



Universiteit
Leiden

The Netherlands

Novel mechanisms and signaling pathways in angiogenesis

Forghany, Z.

Citation

Forghany, Z. (2024, December 18). *Novel mechanisms and signaling pathways in angiogenesis*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/4172661>

Version: 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/1887/4172661>

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

NEDERLANDSE SAMENVATTING

Angiogenese, het proces waarbij nieuwe bloedvaten zich vormen uit bestaande bloedvaten, is essentieel voor wondgenezing, embryonale ontwikkeling en de regulatie van orgaanfuncties. Vascular Endothelial Growth Factor Receptor (VEGFR)- en NOTCH-signaleringswegen behoren tot de belangrijkste paden die samenwerken om het complexe proces van angiogenese te coördineren. Het begrijpen van de onderliggende moleculaire en cellulaire mechanismen is cruciaal voor de ontwikkeling van op angiogenese gebaseerde therapieën voor de behandeling van ziekten zoals kanker en hart- en vaatziekten. Benaderingen om angiogenese te beheersen omvatten het richten op specifieke angiogene signaalmoleculen en het onderdrukken van hun belangrijke intracellulaire transcriptiefactoren. In het kader van dit proefschrift heb ik het precieze beheer van angiogenese en de potentiële effecten van farmacologische interventies in de signaleringswegen die betrokken zijn bij angiogenese onderzocht. De verkregen inzichten werpen nieuw licht op het basismechanisme dat ten grondslag ligt aan angiogenese en kunnen helpen bij ontdekkingsinspanningen voor geneesmiddelen die gericht zijn op het manipuleren van angiogene signaleringswegen voor therapeutisch gewin. De NOTCH-receptor is een transmembraanreceptor die bestaat uit het NOTCH-extracellulaire domein (NECD), het transmembraandomein (TM) en het NOTCH-intracellulaire domein (NICD). Bij zoogdieren worden vier NOTCH-receptoren aangetroffen die sterk geconserveerd zijn. NOTCH-signalisatie wordt geïnitieerd wanneer DELL- of JAGGED-liganden, die ook transmembraaneiwitten zijn, zich binden aan NOTCH-receptoren en daardoor een proteolytische splitsing veroorzaken. Dit resulteert in de afgifte van het intracellulaire domein, dat naar de kern transloceert en specifieke transcriptionele reacties aanstuurt. Deze route wordt op verschillende manieren gereguleerd en nieuwe mechanismen worden voortdurend ontdekt. Naast de bovengenoemde beheersing van angiogenese speelt NOTCH-signalisatie ook een cruciale rol in cel differentiatie, weefselgroei, weefselremodellering en apoptose in verschillende celtypen, waaronder neurale- en kankercellen.

Het onderzoek in hoofdstuk 2 heeft licht geworpen op hoe NOTCH-liganden de vorming van endotheelcelbuizen beïnvloeden. Voorheen was de splitsing van het intracellulaire domein (ICD) van de NOTCH-ligand (DLL4) slecht begrepen. We hebben aangetoond dat DLL4 ICD, dat sterk geconserveerd is bij gewervelde dieren, proteolytisch wordt gesplitst. Daarnaast benadrukken onze gegevens twee eerder niet-gerapporteerde rollen voor DLL4 ICD. Ten eerste is het vereist voor de normale subcellulaire lokalisatie van DLL4. Ten tweede, het ongebonden ICD interageert met de JUN-transcriptiefactor en kan voorkomen dat JUN zich bindt aan DNA, wat op zijn beurt de activering van JUN-doelgenen, waaronder

DLL4 zelf, reguleert. Ons onderzoek toonde ook aan dat JUN een significante rol speelt bij het bevorderen van de vorming van endotheelcelbuizen, terwijl DLL4 dit proces beperkt. Deze bevindingen suggereren de intrigerende mogelijkheid van bidirectionele signalisatie van de NOTCH/DLL4-route en stellen voor dat de DLL4 ICD kan dienen als een cruciaal interactiepunt tussen NOTCH- en receptor-tyrosinekinase (RTK)-signaaltransductie.

Eerdere studies hebben aangetoond dat NOTCH-receptoren worden gereguleerd door twee primaire mechanismen. Eén is door direct cel-celcontact, waarbij NOTCH-liganden van de ene cel interageren met de NOTCH-receptor in een andere cel, wat leidt tot intercellulaire (trans) NOTCH-activering. Het tweede mechanisme betreft de remming van receptorfunctie door ligand-receptorinteracties binnen één cel, bekend als cis-remming. Bovendien hebben recente bevindingen ook de aanwezigheid van cis-activering bij ligand-receptorinteracties binnen één cel aangetoond. In hoofdstuk 3 toont ons onderzoek aan dat NOTCH-liganden, zoals DLL4, effectief kunnen samenvoegen, zowel in biochemische assays als in vitro celkweekstudies. We hebben aangetoond dat het specifieke gebied dat verantwoordelijk is voor deze binding, de membraan proximale epidermale groeifactor (EGF)-achtige herhaling van DLL4 is. Onze bevindingen suggereren dat dimerisatie van DLL4-ligand cruciaal is voor het remmen van NOTCH-receptoractiviteit binnen dezelfde cel (cis-remming). Onze resultaten over NOTCH-ligand dimerisatie/oligomerisatie zijn van groot belang voor het begrijpen van de dynamiek van de NOTCH-signalisatie, aangezien de regulatie van dimer formatie en de afbraak daarvan kan dienen als een extra controlepunt voor de kracht en specificiteit van de NOTCH-signalisatie. Om deze bevindingen te versterken, hebben we krachtige wiskundige modelleringsbenaderingen gebruikt om bestaande modellen van NOTCH-signalisatie uit te breiden, gericht op het gebruik van gewone differentiaalvergelijkingen. De gegenereerde computer gesimuleerde gegevens ondersteunden sterk het idee van dimerisatie-afhankelijke cis-remming van NOTCH-signalisatie, zoals onthuld in ons biochemische en celbiologische onderzoek. Belangrijk is dat ons verfijnde wiskundige model gepubliceerde experimentele gegevens recapituleert en voorspellingen verbetert op basis van gepubliceerde mechanismen van door NOTCH aangedreven weefselontwikkeling. Ons model introduceert een nieuw perspectief voor het begrijpen van de biologische processen die worden gecontroleerd door NOTCH, waarbij embryonale ontwikkeling en angiogenese worden onderbouwd.

In hoofdstuk 4 verkennen we de connectie tussen abnormale functie van de transcriptiefactor FOS en vasculaire tumoren zoals epithelioïde hemangioom, een agressieve tumor gekenmerkt door vasculaire neoplasmen in botten en weke delen. Recent onderzoek heeft FOS-translocaties benadrukt als een potentiële bijdrage aan tumorigenese, hoewel tot op heden geen dergelijke

mutaties als causale mutaties in menselijke kanker zijn geïdentificeerd. Door analyse van menselijke epithelioïde hemangioom tumorcellysaten onthulden we een ingekort FOS (mutant FOS) eiwit in vivo, resulterend uit een FOS-MBNL1-translocatie. Deze vondst leidde ons tot het onderzoeken van de moleculaire basis van een mogelijke rol van FOS-translocaties in vasculaire tumorevolutie en ook tumorangiogenese. Onze studie vertegenwoordigt de eerste uitgebreide moleculaire en biochemische evaluatie van een mutant FOS-eiwit geïdentificeerd in deze menselijke vasculaire tumor. We hebben aangetoond dat het mutant FOS-eiwit veel stabiel was vanwege een carboxy (C)-terminus truncatie, wat de opkomst van vasculaire neoplasmen zou kunnen veroorzaken. We ontdekten dat het mutant FOS-eiwit krachtig endotheliale uitlopers stimuleerde en vasculaire tumorvorming stimuleerde door de productie van matrix metalloproteïnases (MMP) en de NOTCH-signalisatieweg te verstoren, die sleutelspelers zijn in angiogenese. Onze studie introduceerde ook het concept van ubiquitine-onafhankelijke proteasomale afbraak (UIPD) en onthulde de rol van de ongestructureerde FOS C-terminus bij het bemiddelen van eiwitafbraak. Dit is de eerste link tussen FOS-mutaties en natuurlijke tumorgroei. Bovendien bieden onze resultaten therapeutische mogelijkheden voor de behandeling van epithelioïde hemangiomen met mutant FOS-eiwitten door het richten op mutant FOS of eiwitten waarvan de expressie wordt getriggerd door FOS.

De disfunctie van meerdere ETS-transcriptiefactoren is in verband gebracht met het ontstaan van verschillende tumoren, waaronder Ewing-sarcoom (ES) en prostaatkanker. Het onderzoek beschreven in hoofdstuk 5 toont de haalbaarheid aan van het ontwikkelen van moleculaire remmers om de transcriptionele activiteit van ETS-factoren te verminderen door de verstoring van ETS-eiwit-DNA-interacties. Onze unieke benadering omvatte het verkrijgen van zuivere eiwitpreparaten van ETS-factoren en het uitvoeren van functionele high-throughput screens om nieuwe kleine moleculen remmers van ETS-functie te identificeren. Selectie van de moleculen die ETS-DNA-interactie remmen kan de generatie van geneesmiddelachtige moleculen mogelijk maken die in staat zijn specifieke ETS-eiwitten te targeten. Aanvankelijk werd een "Homogeneous Time Resolved Fluorescence" (HTRF)-assay uitgevoerd die het vermogen van verbindingen mat om de binding van een gezuiverd ETS-DNA-bindingsdomein aan zijn specifieke consensus-DNA-bindingsplaats te verstoren, wat resulteerde in de identificatie van vijf nieuwe verbindingen. Vervolgens hebben we de remmers in verschillende biochemische/biologische assays onderzocht (zoals celproliferatie, cytotoxiciteit en endotheliale uitlopers assay met behulp van primaire menselijke endotheelcellen, evenals zebravissen en muismetatarsalen). Deze lopende studie heeft het potentieel om nieuwe therapeutische middelen te leveren die gericht zijn op ETS-eiwitten.