

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/23057> holds various files of this Leiden University dissertation.

**Author:** Rian, Hanan

**Title:** Functions of P38 and ERK kinases in zebrafish early development

**Issue Date:** 2014-01-15

## **CHAPTER VII**

### **Nederlandse samenvatting**



## De functies van P38 en ERK kinasen in de vroege ontwikkeling van de zebrafish

Mitogen activated protein kinases (MAPK) vormen een eiwitfamilie, die een rol speelt in de signaaltransductie van de cel. Het zijn kinase enzymen die de overdracht van een fosfaat groep van ATP naar substraten katalyseren en het substraat wordt daarbij geactiveerd. De MAPK eiwitfamilie komt voor in alle eukaryoten en er zijn maar liefst 14 isovormen geïdentificeerd in gewervelden. MAPK functioneren in cascades van eiwitten die signalen overdragen vanuit het celmembraan naar andere compartimenten van de cel om een cellulaire respons te genereren t.g.v. veranderingen in de micro-omgeving. De nucleus is een van de cellulaire organen waar MAPK zich naartoe verplaatsen na activatie. MAPK beïnvloeden in de nucleus de activiteit van transcriptie factoren en daarmee de expressie van genen. Er zijn drie MAPK subgroepen te onderscheiden namelijk de extracellular signal regulated kinases (Erk1,2,3,4,5,6,7), de c-Jun amino-terminal kinases (Jnk1/2/3) en de P38 MAPK ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ , and  $\Delta$ ).

Er is tot heden ongeveer dertig jaar onderzoek verricht om de functies van MAPK eiwitten in diverse cellen en onder verschillende condities te achterhalen en er is aanzienlijk veel informatie verworven. Extracellulaire stimulansen, membraaneiwitten (receptoren), substraten en overige eiwit interacties die de cascade beïnvloeden zijn geïdentificeerd en goed in kaart gebracht voor enkele isovormen. Het meeste informatie is verworven met betrekking tot Erk2 en P38 $\alpha$  MAPK. Deze twee MAPK zijn met name interessant omdat ze essentieel zijn gebleken voor verschillende cellulaire functies. Afwijkende Erk2 en P38 $\alpha$  activiteit wordt geassocieerd met verschillende aandoeningen. Erk2 reguleert, als gevolg van stimulering met groeifactoren, de celdeling en in verschillende vormen van kanker (bijvoorbeeld melanoma) is de Erk2 cascade hyperactief aanwezig. De P38 $\alpha$  MAPK cascade wordt voornamelijk door stress signalen gestimuleerd zoals endotoxinen, DNA beschadigende radiatie, osmotische stress, en functioneert o.a in de aanmaak van cytokinen. Cytokinen zijn eiwitten die een belangrijke functie vervullen in het immuunsysteem maar ook ontstekingen kunnen veroorzaken. P38 $\alpha$  is betrokken bij verschillende ontsteking gerelateerde aandoeningen zoals reumatoid arthritis. Tevens vervullen Erk2 en P38 $\alpha$  een essentiële rol in de vroege ontwikkeling van zoogdieren. Muis embryos waarvan het Erk2 of P38 $\alpha$  ontbreekt overlijden in een zeer vroeg stadium gedurende de eerste 11 dagen na fertilisatie. Alhoewel er veel bekend is over beide eiwitten is het nog onduidelijk hoe verschillende MAPK isovormen gemeenschappelijk betrokken zijn bij cellulair processen die vaak door een combinatie van meerdere signaaltransductie cascades worden gereguleerd. Door verder onderzoek te doen naar specifieke en overeenkomstige functies van MAPK isovormen ontstaat er meer duidelijkheid over de rol van eiwitfamilies in de

ontwikkeling en handhaving van (specifieke) karaktereigenschappen van cellen. Om MAPK gerelateerde aandoeningen beter te begrijpen en behandelingen te ontwikkelen, is het tevens van belang om de functies van afzonderlijke MAPK te onderzoeken.

Wij zijn daarom geïnteresseerd in de specifieke rol van MAPK in embryologische processen om uiteindelijk meer inzicht te krijgen in de pathogenese van tumoren. Tumor en embryonale cellen hebben de capaciteit om continue te delen en de cellulaire mechanismen die bedoeld zijn om de celdeling te beperken ontbreken. Daarbij zijn het ongespecialiseerde cellen die niet volledig gedifferentieerd zijn tot een celtype met een specifieke functionaliteit zoals erythrocyt, endotheelcel of een hepatocyt. Wanneer muizen getransplanteerd worden met embryonale stamcellen ontstaan er teratomas, tumoren bestaande uit verschillende soorten weefsels. Ook op moleculair niveau blijken bepaalde eiwitten met een essentiële functie in embryologie betrokken te zijn bij de metastasering van tumoren. De MAPK eiwitfamilie is bijvoorbeeld betrokken bij zowel embryologische processen als kanker en door deze eiwitfamilie als uitgangspunt te nemen kunnen we een relatie leggen tussen deze twee processen op moleculair niveau. We gebruiken de zebrafish vanwege de praktische voordelen die het een geschikt model organisme maken voor embryologisch en kanker onderzoek. Een zebrafish paar kan 200-300 bevruchte eitjes leggen na een periode van 10 uur donker wat de mogelijkheid biedt om een significant aantal embryo's van een gewenste embryonale stadium te verzamelen voor een experiment. De ontwikkeling van zebrafish embryo's geschiedt extern van de zebrafish waardoor de morfogenese microscopisch gevolgd kan worden. Binnen een dag zijn de meeste organen ontwikkeld en is het bevruchte eitje uitgegroeid tot een herkenbaar visje. Zebrafish embryo's zijn transparant en kunnen geïnjecteerd worden met stoffen of getransplanteerd worden met (tumor) cellen. Dit proefschrift is een vervolg van eerder verricht onderzoek van Dr. Krens (Proefschrift: The mitogen activated protein kinases in zebrafish development) en omvat de resultaten van vier verschillende projecten naar de rol van MAPK eiwitten in de ontwikkeling van zebrafishes.

Om de hyperactiviteit van Erk2 in tumor cellen na te bootsen hebben we, met het project beschreven in hoofdstuk II, mutant ontwikkeld met een verhoogde kinetische activiteit. Dit is gebeurd door specifieke puntmutaties te introduceren in Erk2, bedoeld om de eiwitstructuur zodanig te veranderen dat autofosforylering mogelijk wordt en inactiveren wordt belemmerd. Constructen met genen coderend voor gemuteerde en wild type Erk2 zijn getransfecteerd in zebrafish fibroblast cellen en ik heb aangetoond dat de mutant een verhoogde capaciteit hebben om reeds bekende substraten te fosforyleren. Daarnaast is de verhoogde kinetische activiteit gevalideerd in zebrafish embryo's. Er is mRNA gesynthetiseerd, gebruik makend van

de Erk2 constructen, en geïnjecteerd in embryo's van transgene zebravissen die het groen fluorescerend eiwit (GFP) produceren onder controle van de promotor van het Dusp6 gen. De Dusp6 promotor wordt beïnvloed door signalen van de ERK2 cascade en een verandering in de activiteit van deze cascade is kwantitatief vast te leggen in deze transgene zebravissen door het GFP signaal te detecteren. De mutant met drie geïntroduceerde punt mutaties heeft een sterke verhoging van het GFP signaal veroorzaakt en is verder gebruikt om de effecten van verhoogde Erk2 activiteit te bepalen m.b.v. peptide microarrays. Lysaten van embryo's geïnjecteerd met RNA coderend voor de drievoudige mutant veroorzaken een verhoogde fosforylering van het CDK1 eiwit dat betrokken is bij de celdeling. Hierdoor concluderen wij dat de drievoudige mutant gebruikt kan worden om Erk2 hyperactivatie te creëren in specifieke cellijnen van de zebravis om mogelijke gevolgen voor celdeling en cel transformatie te bestuderen.

In hoofdstuk III hebben we het expressiepatroon van P38 $\beta$  en P38 $\delta$  gedurende de ontwikkeling van de zebravis bestudeerd. P38 $\beta$  RNA is detecteerbaar vanaf de zygote, wordt maternaal overgedragen en blijft detecteerbaar gedurende een reeks aan stadia, tussen zygoote tot vijf dagen post fertilisatie, van ontwikkeling. P38 $\beta$  expressie is gelokaliseerd in het brein, hart en de lens. P38 $\delta$  wordt niet maternaal overgedragen en het expressiepatroon is meer variabel tijdens de vroege zebravis ontwikkeling. P38 $\delta$  komt tot expressie in het chondrocranium, borstvinnen, brein, voorlopers van de kieuwen, darm, en mogelijk de groeiende venen.

P38 $\alpha$  en Erk2 zijn twee MAPK die essentieel zijn voor cel migratie processen die belangrijk zijn voor de gastrulatie een proces waarbij embryonale cellen differentiëren tot drie kiemlagen het mesoderm, ectoderm en endoderm. In hoofdstuk IV is aangetoond dat het injecteren van stoffen die de translatie van Erk2 of P38 $\alpha$  RNA blokkeren resulteert in een volledige remming van de celmigratie van embryonale cellen, en daardoor ook de gastrulatie. Omdat beide MAPK betrokken zijn bij dit proces hebben we verder onderzocht hoe de stoffen de embryos zodanig beïnvloeden dat de ontwikkeling wordt geremd. Met transcriptome microarrays hebben we genen geïdentificeerd die een rol spelen in de embryonale celmigratie. De genen worden ofwel door Erk2 en P38 $\alpha$  gemeenschappelijk gereguleerd danwel afzonderlijk. Tevens was de expressie van een aanzienlijk aantal genen coderend voor ribosomale eiwitten verlaagd in embryos geïnjecteerd met gemanipuleerd P38 $\alpha$  expressie en niet in embryos met afwijkend Erk2 eiwit gehalte. Dit duidt op een specifieke interactie functie tussen de twee MAPK in signaaltransductie gedurende stress wat al ontwikkeld is in embryonale stadia.

In hoofdstuk V is aangetoond dat P38 $\alpha$  tevens een belangrijke rol speelt in de migratie van endotheel cellen, die de binnenkant van bloedvaten uitlijnen. De groei

van nieuwe bloedvaten kan bestudeerd worden m.b.v transgene zebravissen bevattende GFP gemarkeerde endotheel cellen. Gedoseerde toediening van P38 $\alpha$  blokerende stoffen aan zebravissen veroorzaken afwijkingen in de vorming van het bloedvatenstelsel tijdens de ontwikkeling door obstructie van angiogenese (bloedvaten vertakkingen). P38 $\alpha$  is ook betrokken bij de angiogenese van zoogdieren (muizen) tijdens ontwikkeling. Wij hebben aangetoond dat de functie van P38 $\alpha$  in angiogenese evolutionair geconserveerd is in zebravissen. De specifieke rol van P38 $\alpha$  in deze context kan daarom verder bestudeerd worden m.b.v het zebravis model. Tevens hebben we op transcriptie niveau gekeken naar de effecten van P38 $\alpha$  manipulatie in endotheel cellen en we hebben daarbij een aantal gen kandidaten geïdentificeerd die een rol spelen in angiogenese en mogelijk gereguleerd worden door de P38 $\alpha$  MAPK cascade.