Downloaded from UvA-DARE, the institutional repository of the University of Amsterdam (UvA)
http://dare.uva.nl/document/109736

File ID	109736
Filename	Nederlandse Samenvatting

SOURCE (OR PART OF THE FOLLOWING SOURCE):

Type	Dissertation
Title	Novel Mechanisms and Functions for Hedgehog Signaling in Development and Disease
Author	M.F. Bijlsma
Faculty	Faculty of Medicine
Year	2008
Pages	107
ISBN	978-90-6464-282-1

FULL BIBLIOGRAPHIC DETAILS:
http://dare.uva.nl/record/277849

Copyright

It is not permitted to download or to forward/distribute the text or part of it without the consent of the author(s) and/or copyright holder(s), other then for strictly personal, individual use.

UvA-DARE is a service provided by the library of the University of Amsterdam (http://dare.uva.nl)

Nederlandse Samenvatting.

Vertaling van:
Hoofdstuk 10

De familie van Hedgehog (Hh) eiwitten stelt wetenschappers voor een aantal interessante biologische vraagstukken die veel onderzoek hebben geïnspireerd. Dit proefschrift is daar een voorbeeld van en de volgende samenvatting beschrijft kort wat het in dit proefschrift beschreven werk bijgedragen heeft aan het onderzoeksveld, en welke toekomstige mogelijkheden en onderzoekslijnen te verwachten zijn.

Deel I. Nieuwe mechanismen voor Hedgehog signaaltransductie

Het eerste deel van dit proefschrift beschrijft het mechanisme achter de transductie van het Hh signaal en komt voort uit twee projecten; het eerste is de identificatie van het werkingsmechanisme van Patched-1 (Ptch1, hoofdstukken 2 en 3), het tweede is de vondst van een nieuwe non-canonical signaleringsroute voor Hh eiwitten (hoofdstukken 4, 5 en 6). Het eerste project, erop gericht te onrafelen hoe Ptch1 precies werkt, is geïnspireerd door de heersende onzekerheid omtrent de interactie tussen de twee receptoren voor de Hh pathway; het was bekend dat Ptch1, de receptor voor het Hh ligand, remmend is op Smoothened (Smo), de activerende receptor, en dat Ptch1 in de aanwezigheid van Hh ligand geïnactiveerd wordt zodat Smo vrij kan signaleren. Hoe de remming door Ptch1 gemedieerd werd was onbekend maar een sterke aanwijzing kwam uit een baanbrekend artikel door Taipale cum suis. In dit artikel werd gesuggereerd dat Ptch1 middels een pompfunctie remmend zou kunnen werken op Smo. Er werd bijvoorbeeld getoond dat één Ptch1 receptor remmend kon werken op meerdere Smo receptoren, en gezien de sterke gelijkenis van Ptch1 met eiwitten die een pompfunctie hebben, alsmede het gebrek aan aantoonbare binding met Smo, werd de suggestie gewekt dat Ptch1 als pomp zou kunnen werken. De vraag bleef echter óf en zo ja, wát er gepompt werd.

Door dit raadsel geboeid, besloten we het exacte werkingsmechanisme van Ptch1 te onrafelen, en hebben daartoe een modelsysteem opgezet dat ons in staat stelde de intracellulaire signaleringscapaciteit van Ptch1 naar Smo aan te tonen (hoofdstuk 2). Verder lieten we zien dat Ptch1 in staat was vitamine D_3 naar het extracellulaire medium te transporteren, en dat vitamine D_3 de fysiologische Smo-remmer was. Deze interessante bevinding kwam tegelijk met de publicatie van werk van andere groepen die de chemisch verwante oxysterolen beschreven als Smo-stimulatoir. Hoe deze ogenschijnlijke tegenstrijdige resultaten verklaard kunnen worden is nog onduidelijk, maar het is bekend dat de oxysterolen niet aan Smo binden, wat suggereert dat deze stoffen op Ptch1 werken, in tegenstelling tot vitamine D_3.

Een andere tegenstrijdigheid kwam van een artikel dat een nieuwe rol beschreef voor het enzym dat de voorloper van vitamine D_3 afbreekt (7-dehydrocholesterol reductase, 7-DHCR) die niet overeenkwam met onze bevindingen. Experimenten uitgevoerd in het lab van Koide lieten zien dat het remmen van DHCR7 stimulatoir werkt op de Hh pathway, en niet remmend, zoals op basis van onze resultaten verwacht zou worden. Dit was zowel in tegenspraak met onze data, als met die van eerdere studies die een positieve regulatie van de Hh pathway door 7-DHCR beschreven. Hoewel er grote verschillen bestaan in de gebruikte modelsystemen, en het de vraag is in hoeverre de verkregen resultaten vergelijkbaar zijn, lijkt het erop dat 7-DHCR een duale rol heeft in het reguleren van de Hh pathway; enerzijds verlaagt het enzym door enzymatische activiteit de vitamine D_3 niveaus in de cel, daarmee remming van Smo verminderend, anderzijds is er sprake van een nog onduidelijk mechanisme, onafhankelijk van enzymatische activiteit, waardoor 7-DHCR remmend werkt op Hh signalering.

Dit soort tegenstrijdige resultaten zijn typerend voor het onderzoeksveld, en verklaren misschien het complexe fenotype van het Smith-Lemli-Opitz syndroom (SLOS, zie Hoofdstuk 2). SLOS patienten hebben een slecht functionerend 7-DHCR en daardoor verhoogde 7-dehydrocholesterol (voorloper van vitamine D_3) niveaus, maar tevens weinig cholesterol. Hoewel deze patienten baat hebben bij een dieet met veel cholesterol, lijken hun klinische problemen het beste te correleren met de verhouding van 7-dehydrocholesterol tot cholesterol in het serum, hetgeen suggereert dat lage cholesterol niveaus *per se* niet causaal zijn. Het fenotype van deze patienten doet denken aan dat van patienten met gebrekkige Hh-signalering, en het sterke verband tussen sterol synthese en Hh signalering heeft geleid tot de suggestie dat de verstoorde sterol niveaus in SLOS

patienten de Hh signalering remmen. Hóe de verstoorde sterolhuishouding bijdraagt aan het SLOS fenotype is nog steeds onderwerp van vurig debat, maar het identificeren van vitamine D_3 als Smo-remmer verklaart op zijn minst een deel van het SLOS fenotype.

Door het werkingsmechanisme van Ptch1 alsmede de remmende stof te identificeren, beantwoordden we niet alleen een prangend wetenschappelijk vraagstuk, maar schepten we ook een therapeutische optie zoals beschreven in hoofdstuk 3; er zijn maar weinig effectieve behandelingsopties voor tumoren van de proximale tractus digestivus. Dit gegeven samen met de relatief hoge incidentie (10 gevallen per 10.000 individuen voor pancreaskanker per jaar in westerse landen) maakt nieuwe behandelingsstrategieen meer dan welkom. Recent onderzoek heeft aangetoond dat een overactieve Hh pathway verantwoordelijk is voor de meeste tumoren van de proximale tractus digestivus, en een voor de hand liggende behandelingsmethode zou de bekende Hh-remmer cyclopamine zijn. Hoewel cyclopamine zeer effectief was in diermodellen, was klinische toepassing weinig effectief.

Omdat vitamine D_3 tot hoge doses veilig is, en in onze experimenten een sterkere remmer van de Hh pathway bleek dan cyclopamine, voorspelden we dat vitamine D_3 een effectieve behandeling zou kunnen zijn voor maligniteiten die afhankelijk zijn van een overactieve hh pathway. Deze hypothese wordt ondersteund door epidemiologische studies waaruit bleek dat zonlicht en verhoogde vitamine D_3 niveaus in serum de incidentie en mortaliteit van gastrointestinale kanker verlaagden, en vitamine D_3 leek een veelbelovende behandelingsoptie.

In hoofdstuk 3 blijkt inderdaad dat vitamine D_3 toxisch is voor kankercellen waarvan bekend is dat ze afhankelijk zijn van een overactieve Hh pathway, en daarin nog effectiever is dan cyclopamine. Eerder werd voor cyclopamine beschreven apoptose te induceren door de celcyclus in G0/G1 te stoppen, en uit onze studies bleek eenzelfde mechanisme voor het effect van vitamine D_3 verantwoordelijk te zijn. Het is uit de *in vitro* proeven beschreven in hoofdstuk 3 echter nog niet mogelijk te concluderen wat voor concentraties vitamine D_3 nodig en haalbaar zullen zijn in patienten.

Het werk in hoofdstukken 4 tot en met 6, dat het bestaan van een nieuwe signaaltransductieroute voor Hh beschrijft, was geinspireerd door een andere ontwikkelingspathway, de Wnt pathway. Deze signaleringscascade heeft in principe twee manieren om een ligandsignaal de cel in te communiceren. Eén van die manieren heet de *canonical* respons, en benut de transcriptie/translatie machinerie om een biologische respons te medieren. De andere manier van signaaltranductie is de *non-canonical* respons, welke niet afhankelijk is van transcriptie/translatie. Gezien de vele overeenkomsten tussen de Wnt- en de Hh-pathway, vermoedden we het bestaan van een non-canonical pathway voor de Hh.

Om deze hyopthese te toetsen, maakten we gebruik van assays die te snel zijn om van transcriptie/translatie afhankelijk te zijn. Een voorbeeld daarvaan is de cytoskeletaire respons op Hh ligand die we al na 5 minuten waar konden nemen en een migratoire respons op eenzelfde tijdschaal. Door gebruik te maken van transcriptie/translatieremmers en cellen die de transcriptiefactoren voor de Hh-pathway missen konden we bevestigen dat de snelle Hh respons niet afhankelijk was van de transcriptionele activiteit van de Hh pathway.

Verrassend genoeg vonden we wel een afhankelijkheid van een functionele leukotrieen synthese. De aanleiding om naar de leukotrieensynthese te kijken kwam van eerder werk door de promotor, die had laten zien dat de cytoskeletaire respons op EGF, welke zeer sterkt lijkt op die van Shh, afhankelijk was van leukotrienen. De afhankelijkheid van leukotrienen stelde ons in staat de non-canonical Shh signalering aan te tonen in modelsystemen waar we geen gebruik konden maken van zeer kortstondige stimulaties (hoofdstuk 5). Wat de relevantie is van deze pathway voor ontwikkeling, en homeostase in volwassenen is nog onbekend, maar een zeer suggestieve waarneming is gepubliceerd in de vorm van een case report die een patient beschrijft met een defect in de leukotrieensynthese met een fenotype dat de rol van non-canonical Hh signalering in motorneuron geleiding ondersteunt. Verdere studies zijn nodig om de feitelijke rol van non-canonical siganlering in neurale ontwikkeling te bevestigen, maar een betrokkenheid van deze pathway in de metastasering van tumoren die afhankelijk zijn van een actieve Hh pathway ligt ook in de lijn der verwachting.

Deel II. Nieuwe functies voor Hedgehog signalering

Het tweede deel van dit proefschrift beschrijft de vondst van nieuwe functies voor de Hh eiwitten in volwassenen, met name op cardiovasculair vlak. Eigenlijk vertegenwoordigt dit deel van het proefschrift, en met name hoofdstuk 8 het onderzoeksonderwerp waar de promovendus in eerste instantie voor aangetrokken was; het elucideren van de signalen die beenmerg stamcellen naar het hart recruteren na ischemie. Al vroeg in dat project verschoof de aandacht naar de Hh eiwitten, en naar wat de voordelen zouden kunnen zijn van het stimuleren van de Hh pathway in een model voor myocard ischemie/reperfusie. Jammer genoeg werden de resultaten uit dit project vroegtijdig bevestigd, en werd een omgekeerde strategie gekozen; wat is het effect van remming van de Hh signaleringscascade in het myocard ischemie/reperfusie model ? Verrassend genoeg vonden we

een verbeterde hartfunctie in de dieren die behandeld waren met Hh-remmer, in tegenstelling tot de eerder gepubliceerde artikelen die een positieve rol voor de Hh pathway in herstel na ischemie/reperfusie beschreven. We zijn niet in staat gebleken het exacte mechanisme achter de onverwachte resultaten te ontdekken, maar het lijkt erop dat de endogene productie van Shh (zoals in onze studie onderzocht) een nadelige rol speelt in tegenstelling tot exogeen toegevoegde Shh. Dit suggereert dat vitamine D_3 ook in deze setting een therapeutische optie kan zijn. Het zou mogelijk moeten zijn ondersteunende data voor deze hypothese te vinden in bestaande patient gegevens.

De experimenten beschreven in hoofdstuk 9 zijn gebaseerd op waarnemingen in weefsel uit eerder uitgevoerde experimenten, waarbij muizen waren blootgesteld aan lage zuustofniveaus. In verschillende organen van deze dieren vonden we Shh expressie en ten gevolge daarvan activatie van de Hh pathway. Dit was verrassend omdat de expressie van Shh in het volwassen organisme gedacht werd nogal beperkt te zijn. Verdere *in vitro* studies lietem zien dat de Shh expressie afhankelijk was van HIF-1α activatie. Deze experimenten laten niet alleen zien dat Shh expressie mogelijk is in een groot aantal weefsels in het volwassen dier, maar verklaren ook de eerder waargenomen Shh expressie in verschillende ischemie modellen, zoals het eerdergenoemde myocard ischemie/reperfusie model. De therapeutische mogelijkheden voor geïnduceerde Shh expressie in hypoxische of ischemische organen zijn niet geheel hypothetisch.

Conclusie

Het geheel aan experimenten gepresenteerd in dit proefschrift is divers van aard, maar alle data hebben betrekking op de fascinerende biologie van de Hh pathway. Hoewel het ruim 10 jaar duurde om van de ontdekking van het Hh gen tot de eerste klonering en vervolgens geboorte van een heel onderzoeksgebied te komen, is dit veld inmiddels uitgegroeid tot een van de snelst ontwikkelende wetenschappelijke gemeenschappen en het leidt geen twijfel dat de Hh pathway in de nabije toekomst aan de wieg zal staan van vele behandelingsopties voor een groot aantal ziektes.