

Translational control during hypoxia: consequences for gene expression and hypoxia tolerance

Citation for published version (APA):

van den Beucken, A. M. (2008). *Translational control during hypoxia: consequences for gene expression and hypoxia tolerance*. Universiteit Maastricht.

Document status and date:

Published: 01/01/2008

Document Version:

Publisher's PDF, also known as Version of record

Please check the document version of this publication:

- A submitted manuscript is the version of the article upon submission and before peer-review. There can be important differences between the submitted version and the official published version of record. People interested in the research are advised to contact the author for the final version of the publication, or visit the DOI to the publisher's website.
- The final author version and the galley proof are versions of the publication after peer review.
- The final published version features the final layout of the paper including the volume, issue and page numbers.

[Link to publication](#)

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal.

If the publication is distributed under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license above, please follow below link for the End User Agreement:

www.umlib.nl/taverne-license

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us at:

repository@maastrichtuniversity.nl

providing details and we will investigate your claim.

CHAPTER 9

General discussion and summary

General discussion and summary

This thesis describes the consequences of regulating mRNA translation on gene expression during hypoxia. It has been known for more than a decade that hypoxia causes a profound drop in the rate of overall protein synthesis^{1, 2}. In 2002 and just prior to the start of this thesis it was found that this reduction in protein synthesis was due to a HIF independent, oxygen-sensitive pathway that results in direct inhibition of mRNA translation³. This initial publication also demonstrated that phosphorylation of eIF2 α plays an important role in the repression of overall mRNA translation. As described in the general introduction, eukaryotic translation is a highly regulated process which involves many eIFs and complicated signaling cascades. This fact and preliminary data from our lab led us to hypothesize that translational control is mediated through several distinct pathways during hypoxia.

In the study described in chapter 2 we were able to define the contribution of eIF2 α phosphorylation to translational control in hypoxic cells. Using MEF cells that are compromised in their ability to phosphorylate eIF2 α upon hypoxia, we showed that this pathway was responsible for the majority of the initial drop in protein synthesis, but that additional pathways contributed to translational repression especially during chronic exposure. As hypothesized, we found an additional hypoxia sensitive regulatory step in the cap-binding complex eIF4F. Our data shows that the formation of eIF4F is severely compromised during hypoxia by different mechanisms. First, prolonged exposure to hypoxic conditions leads to dephosphorylation of 4E-BP1. This hypophosphorylation results in an increased affinity for the cap-recognizing protein eIF4E. As a consequence, eIF4E is unable to participate in the formation of eIF4F and translation initiation is repressed.

Regulation of 4E-BP1 is controlled by the kinase mTOR which integrates signals from several upstream pathways. Arsham and colleagues have previously shown that 4E-BP1 hypophosphorylation is the result of mTOR inhibition during moderate hypoxia in combination with

serum deprivation⁴. In a recent paper Liu and colleagues demonstrate that moderate hypoxia causes repression of mTOR through activation of AMPK⁵. Strikingly, this only affects overall protein synthesis rates after hypoxic exposure periods of over 24 hours. From these studies it remains unclear what the relative contribution of mTOR inhibition to the overall inhibition of mRNA translation observed during hypoxia really is. This needs to be addressed in the following years. Likewise it will be interesting to establish the role of mTOR in hypoxia tolerance and hypoxia-induced gene expression.

The observation that disruption of eIF4F took place prior to complete dephosphorylation of 4E-BP1 led us to the discovery of a new interesting step in the regulation of eIF4F. We were able to show that eIF4F formation is hampered by translocation of eIF4E together with the shuttling factor 4E-T into the nucleus or to recently discovered cytoplasmic bodies of mRNA processing (P-bodies)^{6, 7}. Although the exact mechanism of how this takes place is unclear, our data suggests that dephosphorylation of 4E-T might be important. Thus, as hypothesized hypoxia leads to the activation of at least two distinct pathways that inhibit mRNA translation. A rapid, transient response through phosphorylation of eIF2 α and a prolonged effect through disruption of eIF4F.

In chapter 2 we also showed for a variety of genes that gene-specific translation is modulated by hypoxia. This data led us to our second hypothesis that translational control plays an important role in mediating rapid changes in gene expression upon hypoxia (chapter 4). To test this hypothesis we assessed the hypoxic phenotype after acute (1 h) and chronic (24 h) hypoxia using a proteomic approach. Remarkable changes in the expression of specific proteins were observed after only 1 hour of hypoxic exposure. Due to the short exposure time it is very unlikely that these changes are due to a transcriptional response. These data suggest that mechanisms other than transcription are responsible for the observed proteomic changes.

Chapter 9

To investigate whether rapid changes in protein expression might be mediated through modulation of gene-specific mRNA translation we applied a technique that allowed us to assess translation efficiency on a genome-wide scale. For this purpose, both total mRNA as well as efficiently translated mRNAs from hypoxia exposed cells was hybridized to Affymetrix microarrays. Using a similar technique, Blais et al. had identified multiple preferentially translated genes during prolonged hypoxia (16h)⁸. As described above, at this time point translation inhibition is predominantly regulated through disruption of eIF4F. Since we were interested to determine genes affected by both eIF2 α and eIF4F regulation we performed a similar study after acute hypoxia (4 h) (chapter 4). We were able to show that of the top 50 genes with the largest induction during hypoxia, 20% displayed a selective ability to be translated⁹. This included several genes dependent on HIF-1 or involved in the UPR. These data showed that regulation of gene-specific mRNA translation contributes to the hypoxic proteome.

One important question that was raised by these data was what the relative contributions of transcriptional and translational control are on overall changes in gene expression during hypoxia. To address this issue we studied the effect of hypoxia on gene expression in more detail. Since the activation of these mechanisms during hypoxia are complex and operate with different kinetics (chapter 2), we extended our pilot study described above by assessing mRNA translation as a function of hypoxic exposure time (chapter 5). Our results reveal that translational regulation contributes predominantly to gene induction during acute hypoxia, whereas transcriptional control seems more important after prolonged hypoxic exposure. In contrast, translational control appears to be the main mechanism for down regulation of gene expression during hypoxia. These data suggest that translational control may be especially important during acute hypoxia. Translationally regulated genes reach a minimum after 8 hours of hypoxia, and then increase again with a kinetic pattern that is consistent with the disruption of eIF4F. Altogether our data

demonstrates that gene expression regulated through translational control during hypoxia is a highly dynamic process. This might be important for the adaptive response during acute hypoxia. Especially since oxygenation levels within the tumor can fluctuate dramatically over very short periods of time that are often too short to elicit effective transcriptional response¹⁰. Hypoxia down regulated mRNA translation rates of genes encoding for translation factors, ribosomal proteins as well as proteins involved in cell growth. We believe that this might lead to a more persistent inhibition of mRNA translation compared to the transient repression by eIF2 α phosphorylation and eIF4F disruption. Whether this might provide tumor cells with a survival mechanism to tolerate long term hypoxic stress needs to be further evaluated. On the other hand hypoxia stimulated mRNA translation of genes involved in signal transduction, metabolism and transcriptional regulation. The possibility that translational control regulates the transcriptional response during hypoxia is an interesting finding and will be worthwhile to explore in the future.

One of the genes that we characterized in more detail, *Cited2*, was identified as one of the top translationally regulated genes in our gene profiling studies (chapter 4 and 5). *Cited2* is interesting because it had been proposed to act as negative regulator of HIF-1 transcriptional activity by antagonizing its interaction with coactivator CBP/p300^{15, 16}. In chapter 6 we provided the first clear evidence using HIF-1 α null cells that *Cited2* is indeed a genuine HIF-1 α target and thus can act as postulated antagonist. We were able to validate the gene expression results and showed that the translational and transcriptional inductions mimic each other closely. This results in a net increase in *Cited2* protein synthesis as the overall protein synthesis in the cell drops. To find an explanation for the preferential translation of *Cited2* we analyzed the 5'UTR sequences from different species and discovered an evolutionary conserved uORF. As discussed earlier, this RNA element is essential for gene specific translation of ATF4 during hypoxia. We were able to show that *Cited2* translation is not impaired in cells that have lost the ability to induce translation of uORF

Chapter 9

regulated genes like ATF4. Despite of this, our data shows that translational control regulates the expression of Cited2 during hypoxia and thus indirectly affects HIF-1 transcriptional activity. This study also indicates that cross-talk between transcriptional and translational changes during hypoxia may be more ubiquitous than previously recognized.

In chapter 7 we followed up on one of the leads we obtained from an ongoing screen in our laboratory, CA9. This screen involves characterization of UPR mediated changes in gene expression during hypoxia by transcriptional profiling of wild-type and eIF2 α S51A mutant MEFs. We identified CA9 as one of the top differentially regulated genes between the WT and S51A cells. Using different model systems we were able to show that expression of CA9 was dependent on the cells capacity to phosphorylate eIF2 α . We were able to show that PERK/eIF2 α translationally regulated gene ATF4 binds directly to the CA9 promoter and that this was associated with loss of the transcriptional repressive histone 3 lysine 27 (H3K27) tri-methylation mark. We furthermore confirmed the role of ATF4 in regulating CA9 during hypoxia by transient knock-down or over expression of ATF4. This study indicates that CA9 expression is mediated through independent activation of both the HIF-1 and UPR hypoxia response pathways. These data may have important implications for the use of CA9 as a diagnostic tumor marker.

In chapter 8 we described the development of a novel tumor model designed to investigate the relative importance of different hypoxia response pathways. The rational behind this new tumor model is that we can manipulate these hypoxia responsive pathways in established xenograft tumors. This model allows us to more accurately determine the importance of the various pathways compared to conventional xenograft models. Our *in vitro* data showed that PERK/eIF2 α , mTOR/eIF4F and HIF signaling independently contribute to hypoxia tolerance as their disruption significantly sensitized cells to hypoxia induced cell death. Finally, we demonstrated that this isogenic inducible system can be used to efficiently express transgenes in established xenograft tumors by administration of

doxycycline to the drinking water of tumor bearing mice. This enables us in the future to determine the relative importance of targeting these pathways *in vivo* in pre-established tumors in a manner that closely mimics the therapeutic situation.

Concluding remarks and future perspectives

Translational control has emerged as an important adaptive response to hypoxia by changing the hypoxic phenotype and increasing the cellular tolerance towards this condition. Modulation of mRNA translation affects essential hypoxia regulated transcription factors like HIF and ATF4. Consequently, this also causes changes in the expression of many downstream genes in an indirect manner. The discovery of the pathways that mediate translational control in response to hypoxia has provided insight into the link between translational control and hypoxia tolerance. However, as often new findings raise more research questions. One important question to resolve in the coming years is how specific mRNA species become preferentially translated during hypoxia. There is good evidence that suggests a pivotal role for the untranslated regions of mRNA transcripts in their ability to become translated. It will be interesting to identify RNA elements that stimulate mRNA translation on a genome-wide scale. For this it will be very useful to use genetic models in which particular translational control pathways have been disrupted. For example, the MEF S51A model is an excellent model to identify genes regulated by uORFs like ATF4, as its induction is abolished under hypoxia in S51A MEF cells compared to the wild type controls. However these kind of studies need further validation on an individual basis. This will be a difficult task, requiring a lot of effort. Even for a widely studied gene, like HIF-1 α which it has been proven difficult to unravel its translational regulation and it still remains partly unclear. In addition to IRES activity and uORFs it is has recently become clear that changes in translation of specific genes may also result from expression of a class of small non-coding RNAs called microRNAs (miRNAs)¹⁷. Interestingly, two recent

Chapter 9

studies have shown that hypoxia alters the expression pattern of known miRNAs, although the importance of these miRNAs and their targets on the hypoxic phenotype remain unknown^{18, 19}. An interesting hypothesis to investigate in the future is that regulation of miRNA expression during hypoxia contributes to changes in mRNA translation and that this is relevant for cell phenotype and tumor growth.

A second point of research will be to address to which degree translational control pathways are altered in cancer. This is important if we consider these pathways as new therapeutic targets. Especially for the eIF4F dependent response, since the upstream signaling pathways are often mutated in tumors. Furthermore, it will be interesting to sort out the relative importance of the various known hypoxia responsive pathways on cancer growth and treatment response in the context of a real tumor microenvironment. This will provide guidance in developing new types of therapies aimed at targeting tumor hypoxia and its cellular response. We made some progress on this by developing an inducible model system in which the different hypoxia response pathways can be inactivated. Efforts are currently underway to determine the relative importance of these pathways in xenograft tumor models. Although these issues remain to be addressed it certainly does not slow down the development of these novel therapeutic agents by the pharmaceutical industry. Finally the success of these new therapeutic drugs will be dependent upon their careful and logical introduction into the clinic. Since hypoxia is highly heterogeneous within the tumour it is crucial to consider targeting hypoxia only in combination with other traditional treatments.

References

1. Pettersen EO, Juul NO, Ronning OW: Regulation of protein metabolism of human cells during and after acute hypoxia, *Cancer Res* 1986, 46:4346-4351
2. Kraggerud SM, Sandvik JA, Pettersen EO: Regulation of protein synthesis in human cells exposed to extreme hypoxia, *Anticancer Res* 1995, 15:683-686
3. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG: Regulation of protein synthesis by hypoxia via

General discussion and summary

- activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2 α , *Mol Cell Biol* 2002, 22:7405-7416
4. Arsham AM, Howell JJ, Simon MC: A Novel Hypoxia-inducible Factor-independent Hypoxic Response Regulating Mammalian Target of Rapamycin and Its Targets, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:29655-29660
 5. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC: Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth, *Mol Cell* 2006, 21:521-531
 6. Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA, Sonenberg N: A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E, *Embo J* 2000, 19:3142-3156
 7. Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R: A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies, *Rna* 2005, 11:717-727
 8. Blais JD, Filipenko V, Bi M, Harding HP, Ron D, Koumenis C, Wouters BG, Bell JC: Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress, *Mol Cell Biol* 2004, 24:7469-7482
 9. Koritzinsky M, Seigneuric R, Magagnin MG, van den Beucken T, Lambin P, Wouters BG: The hypoxic proteome is influenced by gene-specific changes in mRNA translation, *Radiother Oncol* 2005, 76:177-186
 10. Cardenas-Navia LI, Yu D, Braun RD, Brizel DM, Secomb TW, Dewhirst MW: Tumor-dependent Kinetics of Partial Pressure of Oxygen Fluctuations during Air and Oxygen Breathing, *Cancer Res* 2004, 64:6010-6017
 11. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ: Hypoxia-inducible factor-1 α mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia, *Mol Biol Cell* 2002, 13:1792-1801
 12. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E: Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia, *Mol Cell Biol* 1998, 18:3112-3119
 13. Thoma C, Bergamini G, Galy B, Hundsdoerfer P, Hentze MW: Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP, *Mol Cell* 2004, 15:925-935
 14. Suzuki Y, Ishihara D, Sasaki M, Nakagawa H, Hata H, Tsunoda T, Watanabe M, Komatsu T, Ota T, Isogai T, Suyama A, Sugano S: Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries, *Genomics* 2000, 64:286-297
 15. Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM: Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1, *Genes Dev* 1999, 13:64-75
 16. Yin Z, Haynie J, Yang X, Han B, Kiatchoosakun S, Restivo J, Yuan S, Prabhakar NR, Herrup K, Conlon RA, Hoit BD, Watanabe M, Yang YC: The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1 α , in heart development and neurulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:10488-10493
 17. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 2004, 116:281-297
 18. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M: A microRNA signature of hypoxia, *Mol Cell Biol* 2007, 27:1859-1867
 19. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ: High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma, *Mol Cancer* 2007, 6:5

Algemene discussie en samenvatting

In dit proefschrift zijn de gevolgen van translationele regulatie op gen expressie tijdens hypoxie beschreven. Het is al meer dan tien jaar bekend dat hypoxie een grote daling in totale eiwit synthese veroorzaakt^{1,2}. In 2002, vlak voor de start van dit promotieonderzoek, werd bekend dat deze reductie in eiwit synthese door een HIF onafhankelijk, zuurstofgevoelig mechanisme wordt gereguleerd dat resulteert in een directe inhibitie van mRNA translatie³. Deze initiële publicatie demonstreerde ook dat fosforylatie van eIF2 α een belangrijke rol speelt in de remming van totale mRNA translatie. Zoals beschreven in de algemene introductie, is eukaryotische translatie een strict gereguleerd proces waarin vele eIFs en ingewikkelde signaal transductie routes een rol spelen. Dit feit en preliminaire data van ons lab hebben geleid tot de hypothese dat translationele regulatie wordt veroorzaakt door verscheidene mechanismen tijdens hypoxie.

In hoofdstuk 2 wordt een studie beschreven waarin de bijdrage van eIF2 α fosforylatie op translationele controle in hypoxische cellen wordt gedefinieerd. Door MEF cellen te gebruiken die niet in staat zijn om eIF2 α te fosforyleren tijdens hypoxie, konden we aantonen dat dit mechanisme grotendeels verantwoordelijk is voor de initiële daling in eiwit synthese. Er blijken echter additionele mechanismen actief die ook zorgen voor remming van mRNA translatie voornamelijk tijdens chronische blootstelling aan hypoxie. Zoals veronderstelt, hebben we een extra regulatie mechanisme gevonden in het cap-binding complex eIF4F. Onze data laat zien dat de formatie van eIF4F ernstig belemmerd wordt door verschillende mechanismen tijdens hypoxie. Ten eerste, een langdurige blootstelling aan hypoxische condities leidt tot defosforylatie van 4E-BP1. Deze hypofosforylatie resulteert in een verhoogde affiniteit voor het cap-herkende eiwit eIF4E. Het resultaat hiervan is dat eIF4E niet meer deel kan nemen in de formatie van eIF4F en de initiatie van translatie wordt geremd.

Algemene discussie en samenvatting

De regulatie van 4E-BP1 wordt gecontroleerd door de kinase mTOR die signalen integreert van verschillende bovenliggende mechanismen. Arsham en collega's hebben al eerder laten zien dat 4E-BP1 hypofosforylatie het resultaat is van mTOR inhibitie tijdens matige hypoxie in combinatie met serum depletie⁴. In een recent onderzoeksartikel beschrijven Liu en collega's dat matige hypoxie onderdrukking van mTOR veroorzaakt door AMPK te activeren⁵. Opmerkelijk is dat dit alleen effect heeft op totale eiwit synthese na blootstelling aan hypoxische condities voor perioden langer dan 24 uur. Na deze studies blijft het onduidelijk wat de relatieve bijdrage van mTOR inhibitie op de totale remming van mRNA translatie waargenomen tijdens hypoxie werkelijk is. Verder onderzoek is nodig om dit te verduidelijken. Evenzo zal het interessant zijn om te onderzoeken hoe mTOR de gevoeligheid voor hypoxie en hypoxie-geïnduceerde gen expressie beïnvloed.

De observatie dat eIF4F desintegreerd voordat 4E-BP1 volledig gedefosforyleerd was leidde tot de ontdekking van een nieuwe interessante controle punt in de regulatie van eIF4F. We hebben kunnen aantonen dat eIF4F formatie wordt voorkomen door translocatie van eIF4E samen met de shutteling factor 4-ET naar de nucleus of naar de recent ontdekte cytoplasmatische bodies waar mRNA processing (P-bodies) plaatsvindt^{6,7}. Hoewel het exacte mechanisme nog onduidelijk is, wijst onze data erop dat defosforylatie van 4-ET belangrijk kan zijn. Derhalve, zoals veronderstelt leidt hypoxie tot de activatie van tenminste twee duidelijke mechanismen die mRNA translatie remmen. Een snelle, tijdelijke reactie door fosforylatie van eIF2 α en een langdurig effect door eIF4F desintegratie.

In hoofdstuk 2 hebben we voor verscheidene genen laten zien dat gen-specifieke translatie wordt gemoduleerd door hypoxie. Deze data heeft geleid tot onze tweede hypothese, dat translationele controle een belangrijke rol speelt in het veroorzaken van snelle veranderingen in gen expressie tijdens hypoxie (hoofdstuk 4). Om deze hypothese te testen hebben we bepaald wat het hypoxische fenotype is na acute (1 uur) en

chronische (24 uur) hypoxie. Opmerkelijke veranderingen in eiwit expressie werden al 1 uur na blootstelling aan hypoxie waargenomen. Vanwege de korte blootstellingstijd is het erg onwaarschijnlijk dat deze veranderingen tot stand komen door een transcriptionele inductie. Deze data duiden erop dat er andere mechanismen dan transcriptie verantwoordelijk zijn voor de waargenomen veranderingen in eiwit expressie.

Om te onderzoeken of snelle veranderingen in eiwit expressie veroorzaakt worden door veranderingen in gen-specifieke mRNA translatie, hebben we een techniek toegepast die ons in staat stelt om translatie efficiëntie op een genomwijde schaal te bepalen. Voor dit doeleinde, werd zowel totaal mRNA als efficiënt getransleerd mRNA van cellen die blootgesteld waren aan hypoxie, gehybridiseerd op Affymetrix microarrays. Gebruik makend van dezelfde techniek, hebben Blais et al. meerdere specifiek getransleerde genen tijdens hypoxie (16 uur) geïdentificeerd⁸. Zoals hierboven beschreven, is op dit tijdpunt translatie inhibitie voornamelijk gereguleerd door desintegratie van eIF4F. Omdat we graag genen wilden identificeren die door zowel eIF2 α als eIF4F gereguleerd worden hebben we een vergelijkbare studie uitgevoerd na acute hypoxie (4 uur) (hoofdstuk 4). Hierin hebben we kunnen aantonen dat van de top 50 genen met de hoogste inductie tijdens hypoxie, 20% een selectief vermogen om getransleerd te kunnen worden lieten zien⁹. Hierbij inbegrepen waren meerdere genen die afhankelijk zijn van HIF-1 of die in rol spelen in de UPR. Deze data laten zien dat regulatie van gen-specifieke mRNA translatie bijdraagt aan het hypoxische fenotype.

De relatieve bijdrage van transcriptionele en translationele controle op de totale veranderingen in gen expressie tijdens hypoxie bleef onbekend. Om hier meer inzicht in te krijgen hebben we in meer detail gekeken naar de effecten van hypoxie op gen expressie. Aangezien de activatie van de mechanismen die mRNA translatie beïnvloeden tijdens hypoxie zeer complex is (hoofdstuk 2), hebben we ervoor gekozen om onze pilot studie, zoals hierboven beschreven uit te breiden door mRNA translatie te

Algemene discussie en samenvatting

bepalen als functie van hypoxische blootstellingstijd (hoofdstuk 5). Onze resultaten tonen aan dat translationele regulatie voornamelijk een rol speelt bij gen expressie tijdens acute hypoxie, terwijl transcriptionele controle belangrijker is na langdurige blootstelling aan hypoxie. Verder lijkt translationele controle het belangrijkste mechanisme te zijn voor de onderdrukking van gen expressie tijdens hypoxie. Dit wijst erop dat translationele controle vooral belangrijk is tijdens acute hypoxie. Het aantal translationeel gereguleerde genen bereiken een minimum na 8 uur hypoxie en neemt dan weer toe met een kinetisch patroon dat gelijk is aan de desintegratie van eIF4F. Gezamenlijk toont onze data aan dat gen expressie gereguleerd door translationele controle tijdens hypoxie een zeer dynamisch proces is. Hierdoor kan het functioneren als een belangrijk aanpassings mechanisme voor tumor cellen, aangezien zuurstof concentraties in tumoren dramatisch kunnen veranderen over een heel korte tijd¹⁰. Onze data laat zien tijdens hypoxia mRNA translatie specifiek geremd wordt voor transcripten die coderen voor transcriptie factoren, ribosomale eiwitten en eiwitten betrokken bij cel groei. Dit zou mogelijk kunnen leiden tot een meer langdurigere inhibitie van mRNA translatie vergeleken met de tijdelijke remming veroorzaakt door verstoring van eIF4F en eIF2 α fosforylatie. Of dit tumor cellen in staat stelt om langdurige blootstelling aan hypoxische condities te overleven moet verder onderzocht worden. Aan de ander kant tonen onze resultaten aan dat hypoxia de mRNA translatie van genen stimuleerd die betrokken zijn bij signaal transductie, metabolisme en de regulatie van transcriptie. Dit suggereerd dat de transcriptionele respons tijdens hypoxia beïnvloed wordt door regulatie van mRNA translatie. Deze hypothese is zeer interessant voor verder onderzoek.

Een van de genen die we in meer detail bestudeerd hebben, Cited2, hebben we geïdentificeerd in onze microarray studies als een van de meest translationeel gereguleerde genen (hoofdstuk 4 en 5). Dit is zeer interessant aangezien Cited2 mogelijk de transcriptionele activiteit van HIF-1 negatief beïnvloed door de interactie met coactivator CBP/p300 te

verhinderen^{15, 16}. In hoofdstuk 6 tonen we eenduidig aan dat Cited2 mRNA expressie afhankelijk is van HIF-1 α en dat Cited2 dus als negatief respons mechanisme voor HIF activatie kan dienen. We hebben de microarray data succesvol gevalideerd en aangetoond dat Cited2 zowel transcriptioneel als translationeel in dezelfde mate geïnduceerd wordt. Dit resulteert in een netto toename van Cited2 eiwit synthese aangezien de totale eiwit synthese in de cel afneemt. Om deze preferentiele mRNA translatie te verklaren hebben wij de niet-coderende gedeeltes van het Cited2 transcript verder onderzocht. In het 5' gedeelte troffen we een evolutioneër geconserveerd uORF aan. Zoals eerder besproken stimuleert dit RNA element ondermeer translatie van de hypoxia gereguleerde transcriptie factor ATF4. Onze resultaten tonen echter aan dat het uORF in Cited2 niet de translatie bevordert zoals bij ATF4. Desondanks laat deze data zien dat de regulatie van mRNA translatie HIF-1 activiteit indirect beïnvloed via Cited2. Tevens blijkt hieruit dat transcriptionele en translationele veranderingen elkaar meer beïnvloeden dan voorheen gedacht.

In hoofdstuk 7 hebben wij het eiwit CA9 verder bestudeerd dat tijdens een nog voortdurende screening in ons laboratorium opgepikt is. Deze screening is gebaseerd op het bepalen van transcriptie profielen in WT en S51A MEF cellen. CA9 was een van de genen die een zeer groot expressie verschil vertoonde tussen de WT en S51A MEFs. In verschillende model systemen hebben wij laten zien dat CA9 expressie afhankelijk is van eIF2 α fosforylatie. We hebben kunnen aantonen dat de PERK/eIF2 α afhankelijke transcriptie factor ATF4 bind aan de promoter regio van CA9. De CA9 promoter toonde tevens een verlies van histon 3 lysine 27 (H3K27) trimethylatie aan, een histon modificatie die geassocieerd is met inhibitie van transcriptie. De betrokkenheid van ATF4 in de regulatie van CA9 hebben we verder gevalideerd door tijdelijke uitschakeling of overexpressie van ATF4. Onze studie toont aan dat CA9 expressie onafhankelijk gereguleerd wordt door HIF-1 α en de UPR. Deze resultaten

Algemene discussie en samenvatting

zijn mogelijk van groot belang wanneer CA9 als een diagnostische tumor marker gebruikt zou worden.

In hoofdstuk 8 beschrijven we de ontwikkeling van een nieuw tumor model waarmee het belang van verschillende hypoxia respons mechanismen bepaald kan worden. In dit nieuwe tumor model kunnen deze mechanismen uitgeschakelt worden in reeds ontwikkelde xenograft tumoren. Dit stelt ons in staat om het belang van de verschillende hypoxia respons mechanismen beter te bepalen vergeleken met de conventionele xenograft modellen. Onze in vitro data toont aan dat PERK/eIF2 α , mTOR/eIF4F en HIF allen bijdragen aan de gevoeligheid voor hypoxische condities. Tot slot hebben we laten zien dat dit induceerbaar isogeen model gebruikt kan worden voor het tot expressie brengen van transgenen in reeds ontwikkelde xenograft tumoren. Hiermee kunnen we in de toekomst op een meer relevante manier bepalen welke van de verschillende hypoxia respons mechanismen geschikt is als aangrijpingspunt voor een mogelijk nieuwe therapie.

Conclusies en toekomst perspectieven

Regulatie van mRNA translatie manifesteert zich als een belangrijk mechanisme dat door tumor cellen gebruikt wordt om de gevoeligheid voor hypoxische condities te verminderen. Veranderingen in mRNA translatie hebben *rechstreeks invloed op belangrijke transcriptie factoren* zoals HIF en ATF4. Indirect beïnvloedt dit de expressie van een groot aantal genen die door deze transcriptie factoren gereguleerd worden. Het ontdekken van de mechanismen die mRNA translatie reguleren tijdens hypoxie heeft geleid tot nieuwe inzichten in de relatie tussen mRNA translatie en de *gevoeligheid voor hypoxische condities*. Natuurlijk leidt deze ontdekking tot nieuwe vraagstellingen. Zo zal het interessant zijn om te onderzoeken hoe specifieke mRNA transcripten actief getransleerd blijven terwijl translatie van het merendeel van mRNAs geremt is. Er zijn duidelijke aanwijzingen dat de niet-coderende gedeeltes van een mRNA

transcript hierin een rol spelen. Of er specifieke RNA elementen bestaan in de niet-coderende mRNA gedeeltes die mRNA translatie stimuleerd moet verder bepaald worden. Hiervoor zouden microarrays uitgevoerd kunnen worden met cel modellen waarin specifieke mRNA regulatie mechanismen uitgeschakeld zijn. Zo zou het MEF S51A model ideaal zijn om mRNA transcripten te identificeren die voor actieve translatie afhankelijk zijn van uORFs in hun niet-coderende mRNA. Translatie van deze mRNAs wordt namelijk niet geïnduceerd in de S51A MEFs vergeleken met de WT MEFs. Aangezien alle geïdentificeerde genen op individuele basis gevalideerd moeten worden zal dit veel tijd en inzet vergen. Zelfs voor veelvuldig bestudeerde genen zoals HIF-1 α is het moeilijk gebleken om het mechanisme dat translatie van HIF-1 α mRNA mogelijk maakt te bepalen en blijft het gedeeltelijk onbekend. Naast de reeds bekende IRES en uORF elementen is recent gebleken dat mRNA translatie ook beïnvloed kan worden door expressie van kleine, niet-coderende mRNA moleculen die microRNAs (miRNAs) worden genoemd¹⁷. Uit twee recente studies is gebleken dat de expressie van bekende miRNAs beïnvloed wordt door hypoxia^{18, 19}. Hoewel deze resultaten zeer interessant zijn blijft het momenteel onbekend of dit ook het hypoxische fenotype van de cel verandert. De gedachte dat veranderingen in miRNA expressie translatie van specifieke mRNA transcripten beïnvloed die van belang zijn voor het hypoxische fenotype en tumor ontwikkeling is een interessante hypothese om verder te bestuderen.

Een ander interessant onderwerp voor verder onderzoek is om te bepalen in hoe verre de mechanismen die mRNA translatie beïnvloeden veranderd zijn in tumoren. Informatie hierover is van groot belang als we nieuwe behandelwijzen willen baseren op deze mechanismen. In het bijzonder voor de eIF4F afhankelijke respons aangezien de bovenliggende signaal transductie routes vaak veranderd zijn in tumoren. Verder zal het belangrijk zijn om te achterhalen welk hypoxia respons mechanisme het meest interessant is om een nieuwe therapie op te richten. Belangrijk hierbij is dat dit bepaald wordt in de context van een echt tumor

Algemene discussie en samenvatting

micromilieu. Dit bevordert de ontwikkeling van een nieuw soort therapie die gericht is op de hypoxische cellen in een tumor. We hebben enige voortgang geboekt met de ontwikkeling van een induceerbaar xenograft tumor model systeem waarin de verschillende hypoxia respons mechanismen uitgeschakeld kunnen worden. Momenteel zijn er muizen studies aan de gang waarin de relevantie van deze mechanismen getest wordt. Ondanks dat er nog veel vragen onbeantwoord blijven is de ontwikkeling van nieuwe therapeutische middelen door de farmaceutische industrie in volle gang. Het succes van nieuwe therapeutische middelen zal afhangen van een rationele en zorgvuldige invoering in de kliniek. Vanwege de zeer heterogene aard van tumor hypoxia zal het aan te raden zijn om een dergelijke nieuwe therapie alleen te gebruiken in combinatie met traditionele behandelwijzen.

Referenties

1. Pettersen EO, Juul NO, Ronning OW: Regulation of protein metabolism of human cells during and after acute hypoxia, *Cancer Res* 1986, 46:4346-4351
2. Kraggerud SM, Sandvik JA, Pettersen EO: Regulation of protein synthesis in human cells exposed to extreme hypoxia, *Anticancer Res* 1995, 15:683-686
3. Koumenis C, Naczki C, Koritzinsky M, Rastani S, Diehl A, Sonenberg N, Koromilas A, Wouters BG: Regulation of protein synthesis by hypoxia via activation of the endoplasmic reticulum kinase PERK and phosphorylation of the translation initiation factor eIF2alpha, *Mol Cell Biol* 2002, 22:7405-7416
4. Arsham AM, Howell JJ, Simon MC: A Novel Hypoxia-inducible Factor-independent Hypoxic Response Regulating Mammalian Target of Rapamycin and Its Targets, *J. Biol. Chem.* 2003, 278:29655-29660
5. Liu L, Cash TP, Jones RG, Keith B, Thompson CB, Simon MC: Hypoxia-induced energy stress regulates mRNA translation and cell growth, *Mol Cell* 2006, 21:521-531
6. Dostie J, Ferraiuolo M, Pause A, Adam SA, Sonenberg N: A novel shuttling protein, 4E-T, mediates the nuclear import of the mRNA 5' cap-binding protein, eIF4E, *Embo J* 2000, 19:3142-3156
7. Andrei MA, Ingelfinger D, Heintzmann R, Achsel T, Rivera-Pomar R, Luhrmann R: A role for eIF4E and eIF4E-transporter in targeting mRNPs to mammalian processing bodies, *Rna* 2005, 11:717-727
8. Blais JD, Filipenko V, Bi M, Harding HP, Ron D, Koumenis C, Wouters BG, Bell JC: Activating transcription factor 4 is translationally regulated by hypoxic stress, *Mol Cell Biol* 2004, 24:7469-7482
9. Koritzinsky M, Seigneuric R, Magagnin MG, van den Beucken T, Lambin P, Wouters BG: The hypoxic proteome is influenced by gene-specific changes in mRNA translation, *Radiother Oncol* 2005, 76:177-186

Algemene discussie en samenvatting

10. Cardenas-Navia LI, Yu D, Braun RD, Brizel DM, Secomb TW, Dewhirst MW: Tumor-dependent Kinetics of Partial Pressure of Oxygen Fluctuations during Air and Oxygen Breathing, *Cancer Res* 2004, 64:6010-6017
11. Lang KJ, Kappel A, Goodall GJ: Hypoxia-inducible factor-1alpha mRNA contains an internal ribosome entry site that allows efficient translation during normoxia and hypoxia, *Mol Biol Cell* 2002, 13:1792-1801
12. Stein I, Itin A, Einat P, Skaliter R, Grossman Z, Keshet E: Translation of vascular endothelial growth factor mRNA by internal ribosome entry: implications for translation under hypoxia, *Mol Cell Biol* 1998, 18:3112-3119
13. Thoma C, Bergamini G, Galy B, Hundsdoerfer P, Hentze MW: Enhancement of IRES-mediated translation of the c-myc and BiP mRNAs by the poly(A) tail is independent of intact eIF4G and PABP, *Mol Cell* 2004, 15:925-935
14. Suzuki Y, Ishihara D, Sasaki M, Nakagawa H, Hata H, Tsunoda T, Watanabe M, Komatsu T, Ota T, Isogai T, Suyama A, Sugano S: Statistical analysis of the 5' untranslated region of human mRNA using "Oligo-Capped" cDNA libraries, *Genomics* 2000, 64:286-297
15. Bhattacharya S, Michels CL, Leung MK, Arany ZP, Kung AL, Livingston DM: Functional role of p35srj, a novel p300/CBP binding protein, during transactivation by HIF-1, *Genes Dev* 1999, 13:64-75
16. Yin Z, Haynie J, Yang X, Han B, Kiatchoosakun S, Restivo J, Yuan S, Prabhakar NR, Herrup K, Conlon RA, Hoyt BD, Watanabe M, Yang YC: The essential role of Cited2, a negative regulator for HIF-1alpha, in heart development and neurulation, *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002, 99:10488-10493
17. Bartel DP: MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function, *Cell* 2004, 116:281-297
18. Kulshreshtha R, Ferracin M, Wojcik SE, Garzon R, Alder H, Agosto-Perez FJ, Davuluri R, Liu CG, Croce CM, Negrini M, Calin GA, Ivan M: A microRNA signature of hypoxia, *Mol Cell Biol* 2007, 27:1859-1867
19. Hebert C, Norris K, Scheper MA, Nikitakis N, Sauk JJ: High mobility group A2 is a target for miRNA-98 in head and neck squamous cell carcinoma, *Mol Cancer* 2007, 6:5