

University of Groningen

Identification of a novel multiprotein complex in cargo sorting that preserves metabolic pathways in the liver

Fedoseienko, Alina

IMPORTANT NOTE: You are advised to consult the publisher's version (publisher's PDF) if you wish to cite from it. Please check the document version below.

Document Version

Publisher's PDF, also known as Version of record

Publication date:

2016

[Link to publication in University of Groningen/UMCG research database](#)

Citation for published version (APA):

Fedoseienko, A. (2016). *Identification of a novel multiprotein complex in cargo sorting that preserves metabolic pathways in the liver*. [Thesis fully internal (DIV), University of Groningen]. University of Groningen.

Copyright

Other than for strictly personal use, 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), unless the work is under an open content license (like Creative Commons).

The publication may also be distributed here under the terms of Article 25fa of the Dutch Copyright Act, indicated by the "Taverne" license. More information can be found on the University of Groningen website: <https://www.rug.nl/library/open-access/self-archiving-pure/taverne-amendment>.

Take-down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

Downloaded from the University of Groningen/UMCG research database (Pure): <http://www.rug.nl/research/portal>. For technical reasons the number of authors shown on this cover page is limited to 10 maximum.

Summaries

Summary

Scaffold proteins are crucial regulators of a diverse array of biological processes. This thesis aims to better understand the function of the relatively new family of scaffold proteins called the COMMD proteins. COMMD1, the prototype of this family, has been associated with numerous diseases such as hepatic copper toxicity syndrome, hypercholesterolemia and cancer, but the biological role of the other members remains largely unknown.

Chapter 1 provides general introduction to the biology of COMMD proteins and their functions. We mainly focus here on COMMD1, the pleiotropic protein, which is the best-studied member of COMMD family. We give brief introduction to COMMD1 contribution into the regulation of copper and cholesterol metabolism. Also we discuss the role of COMMD1 and other COMMD proteins in inflammation and cancer.

Chapter 2 gives more detailed overview of the current knowledge on the function of COMMD1 in copper homeostasis. A deleterious mutation in *COMMD1* has been found to be associated with copper toxicosis in dogs, and the role of COMMD1 in copper homeostasis was further confirmed in a mouse model. Based on the current data, we suggest that COMMD1 modulates the trafficking of the copper transporting proteins, such as ATP7B, probably similar to the way it coordinates the trafficking of other transmembrane proteins controlled by COMMD1.

COMMD1 is a multifunctional protein, and its expression has been correlated with patients' survival in different types of cancer. *In vitro* studies revealed that COMMD1 plays a role in sensitizing cancer cell lines to cisplatin, however the mechanism and its role in platinum sensitivity in cancer has yet to be established. **In chapter 3** we evaluated the role of COMMD1 in cisplatin sensitivity in ovarian cancer. In a patient cohort we found that nuclear COMMD1 expression is associated with an improved response to chemotherapy. Our *in vitro* results suggest that nuclear expression of COMMD1 sensitize ovarian cancer to cisplatin,

Summary

possibly by modulating the G₂/M checkpoint and through controlling expression of genes involved in DNA repair and apoptosis.

Although all ten COMMD members can interact with each other and have the ability to bind to the CCC complex component CCDC22, it remains unclear whether they share biological functions. **In chapter 4** we used a liver specific *Commd6* knockout mouse model to assess the effect of COMM6 deficiency on cholesterol and copper homeostasis. Here we found that the function of COMMD1 in cholesterol and copper homeostasis relies on COMMD6, as ablation of hepatic *Commd6* results in reduced levels of a subset of COMMD proteins, including COMMD1. This reduction is accompanied by elevated circulating LDL cholesterol and increased susceptibility to hepatic copper accumulation.

To be able to study the role of COMMD6 at the organismal level we generated mice with a hypomorphic *Commd6* allele (**chapter 5**). Combining this hypomorphic allele with either a wild type or knockout allele, a series of live-born mice were generated in which the *Commd6* expression was gradually reduced. However, despite the decreased levels of *Commd6* mRNA we observed no significant effect on COMMD1 protein levels. Moreover, we saw no difference in plasma cholesterol levels between wild type and hypomorphic mice. Altogether, we successfully generated a hypomorphic *Commd6* mouse model, but the reduced expression of *Commd6* did not result in an overt phenotype in this mouse model.

In **chapter 6** we assessed the biological functions of myeloid and hepatocyte COMMD9 using conditional *Commd9* knockout mice. Here we report that, like mice and dogs deficient in COMMD1, hepatic *Commd9* knockout mice are also hypercholesterolemic. On the other hand, myeloid COMMD9 deficiency does not aggravate diet-induced liver inflammation, as we found after COMMD1 inactivation. Furthermore, although *Commd9* ablation destabilizes COMMD1 in hepatocytes, deletion of *Commd9* in macrophages does not affect the protein levels of COMMD1. These data suggest that COMMD1 and COMMD9

together control cholesterol homeostasis in hepatocytes, but do not act together in myeloid cells to inhibit inflammation.

Finally, in **chapter 7** we summarized and discussed the major findings of this thesis and gave directions for future research.

In conclusion, our data provide novel insights into the biology of COMMD family of proteins. Our study show for the first time that in the liver COMMD6 and COMMD9 both an important role have to preserve cholesterol and copper homeostasis, similarly as we previously demonstrated for COMMD1. Interestingly, however, our data indicate that only myeloid COMMD1 prevents uncontrolled inflammation but not COMMD6 and COMMD9. We show that the COMMD proteins form together a stable multi-COMMD protein complex to regulate these cellular processes. The organization of this complex is likely cell type-specific, but the exact composition of these complexes remains unclear, and more research is wanted. Taken together our work revealed that the COMMD proteins likely act together to facilitate the endosomal trafficking of different transmembrane proteins such as LDLR and ATP7B to preserve cholesterol and copper homeostasis. We expect that better understanding of these pathways will advance therapeutic research to treat hypercholesterolemia and copper disorders.

Samenvatting

"Scaffold" (ondersteunende) eiwitten zijn cruciale regulatoren van diverse biologische processen. Dit proefschrift heeft tot doel meer inzicht te verkrijgen in de functie van een relatief nieuwe familie van scaffold-eiwitten, genaamd de COMMD-eiwitten. COMMD1, het prototype eiwit van deze familie, is geassocieerd met verschillende ziektes, zoals koperstapelingsziekte, hypercholesterolemie en kanker. De biologische functie van de andere COMMD-familieleden is tot nu toe echter grotendeels onbekend.

Hoofdstuk 1 geeft een algemene introductie over de biologie en de functie van de COMMD-eiwitten. Hierbij ligt de focus voornamelijk op het multifunctionele COMMD1 eiwit, het best bestudeerde eiwit van de COMMD-familie. We gaan kort in op de functie van COMMD1 in de regulatie van koper- en cholesterolmetabolisme. Verder bediscussiëren we de rol van COMMD1 en andere COMMD-eiwitten in inflammatie en kanker.

Hoofdstuk 2 geeft een meer gedetailleerd overzicht van de huidige kennis over de rol van COMMD1 in koperhomeostase. Een mutatie in *COMMD1* is geassocieerd met koper-toxicose in honden, en de rol van COMMD1 in koperhomeostase is verder bevestigd in een muismodel. Gebaseerd op de huidige kennis denken we dat COMMD1 het transport van kopertransporteiwitten, zoals ATP7B, reguleert, waarschijnlijk op een gelijksoortige manier waarop het transport van andere transmembraaneiwitten gereguleerd wordt door COMMD1.

COMMD1 is een multifunctioneel eiwit, waarvan de expressie is gecorreleerd aan overlevingskans in verschillende soorten kanker. *In vitro* studies lieten zien dat COMMD1 een rol speelt in cisplatinegevoeligheid van kankercellijnen. Tot op heden is het mechanisme waarmee COMMD1 de gevoeligheid van kankercellen voor cisplatine reguleert nog niet vastgesteld. In **hoofdstuk 3** evalueren we de rol van COMMD1 in cisplatinegevoeligheid in eierstokkanker. In een patiënten cohort blijkt dat expressie van COMMD1 in de celkern geassocieerd is met een verbeterde respons op chemotherapie. Onze *in vitro* resultaten

suggereren dat COMMD1 in de kern van eierstokkankercellen een controlepunt (G2/M) in de celcyclus beïnvloed, en dat COMMD1 de expressie van genen betrokken bij DNA-herstel en apoptose reguleert.

Hoewel alle tien de COMMD-eiwitten een binding met elkaar en met het CCC-complex component CCDC22 kunnen aangaan, blijft het onduidelijk of de biologische functies van de COMMD-eiwitten overeenkomen. In **Hoofdstuk 4** hebben we een lever specifiek *Commd6* knock-out muismodel gebruikt om het effect van COMMD6 op cholesterol- en koperhomeostase te bestuderen. Hier tonen we aan dat de functie van COMMD1 in cholesterol- en koperhomeostase afhankelijk is van COMMD6, aangezien verwijdering van COMMD6 in de lever leidt tot verminderde hoeveelheden van een subgroep van COMMD-eiwitten, inclusief COMMD1. Deze vermindering in de hoeveelheid COMMD-eiwitten gaat gepaard met een toename van plasma LDL cholesterol, en verhoogt de gevoeligheid voor koperstapeling in de lever.

Om de rol van COMMD6 in de hele muis te kunnen bestuderen hebben we een muismodel gegenereerd met een hypomorf *Commd6* allel (**hoofdstuk 5**). Door dit hypomorfe allel te combineren met een wildtype- of een knock-out allel waren we in staat om een serie levend geboren muizen te genereren waarin de expressie van *Commd6* gradueel was verminderd. Echter, ondanks de verminderde hoeveelheid *Commd6* mRNA was er geen significant effect op het COMMD1 eiwitniveau zichtbaar. Verder was er geen verschil meetbaar tussen het plasma cholesterol niveau van wildtype en hypomorfe muizen. Samenvattend, in deze studie zijn we erin geslaagd om een hypomorf *Commd6* muismodel te genereren, en we kunnen concluderen dat een verminderde *Commd6* expressie geen duidelijk fenotype in muizen veroorzaakt.

In **hoofdstuk 6** beschrijven we de biologische functies van COMMD9 in macrofagen en levercellen, waarbij we gebruik hebben gemaakt van conditionele *Commd9* knock-out

Summary

muizen. In dit hoofdstuk tonen we aan dat lever specifieke *Comm9* knock-out muizen hypercholesterolemisch zijn, in dezelfde mate als COMMD1 deficiënte honden en muizen. Daarentegen leidt depletie van COMMD9 in macrofagen niet tot verergerde dieet-geïnduceerde inflammatie zoals macrofaag COMMD1 inactivatie. Bovendien, in tegenstelling tot COMMD1 destabilisatie in COMMD9 deficiënte lever cellen, heeft depletie van COMMD9 in macrofagen geen effect op het eiwitniveau van COMMD1. Deze data duiden erop dat COMMD1 en COMMD9 in de lever gezamenlijk cholesterolhomeostase reguleren, maar geen gezamenlijke rol hebben in de remming van inflammatie in macrofagen.

Tot slot bediscussiëren we in **hoofdstuk 7** alle bevindingen van dit proefschrift, waarbij we aanbevelingen doen voor toekomstig onderzoek. Deze studie toont voor de eerste keer aan dat in de lever COMMD6 en COMMD9 allebei een belangrijke rol spelen in cholesterol- en koperhomeostase, op een vergelijkbare manier zoals we dit voor COMMD1 hebben aangetoond. Verrassend, in tegenstelling tot macrofaag COMMD1, blijken COMMD6 en COMMD9 ontstekingsreacties niet te remmen. Onze data suggereren dat de COMMD-eiwitten samen een groot eiwitcomplex vormen, bestaande uit verschillende COMMD-eiwitten. De organisatie van dit eiwitcomplex is waarschijnlijk weefsel-specifiek, maar de exacte compositie van de verschillende complexen is nog onduidelijk en meer onderzoek is nodig. Samenvattend, ons werk toont aan dat de COMMD-eiwitten waarschijnlijk samenwerken om het endosomale transport van verschillende transmembraaneiwwitten zoals LDLR en ATP7B te faciliteren, en hiermee cholesterol- en koperhomeostase handhaven. Wij zijn ervan overtuigd dat beter begrip van deze processen uiteindelijk zal leiden tot verbeterde therapeutische ontwikkelingen voor het behandelen van hypercholesterolemie en koperstapelingsziektes.