

ABSTRACT

Notch signalling is a core patterning module for vascular morphogenesis, which determines the dynamic branching behaviour of endothelial cells (ECs). Tight quantitative and temporal control of Notch activity is essential for normal vascular growth and patterning, yet the details of Notch regulation in ECs are unclear. Here, we identify the deubiquitinase USP10 as a novel positive regulator of endothelial NOTCH1 signalling, which opposes the ubiquitin-dependent degradation of the NOTCH1 intracellular domain (NICD1), a short-lived single activated NOTCH1 receptor. By quantitative mass spectrometry, we found that USP10 interacts with NICD1. We show that ectopic expression of USP10 increases NICD1 levels in a deubiquitinase-dependent manner. Conversely, inactivation of USP10 in ECs reduces NICD1 levels and stability, and suppresses Notch reporter activity and target gene expression. *In vivo*, endothelial-specific deletion of *Usp10* in mice leads to increased vessel branching and density as a result of decreased Notch signalling. Our data indicate that USP10 functions as an NICD1 deubiquitinase, and suggest reversible ubiquitination as a mechanism to control Notch signalling dynamics in the endothelium.

ZUSAMMENFASSUNG

Der Notch Signaltransduktionsweg ist ein entscheidendes Modul der vaskulären Morphogenese, das Wachstum und Musterbildung von Blutgefäßen steuert. Sowohl die quantitative als auch die zeitliche Regulation der Notch Aktivität ist unabdingbar für eine normale Entwicklung des Blutgefäßsystems. Jedoch sind die Mechanismen der Regulation des Notch Signalwegs in Endothelzellen, der kleinsten funktionellen Einheit der Blutgefäße, bisher noch unzureichend verstanden. In der vorliegenden Studie konnten wir die Deubiquitinase USP10 als einen neuen, positiven Regler des endothelialen NOTCH1 Signaltransduktionsweges identifizieren. Wir konnten zeigen, dass USP10 der Ubiquitin-abhängigen Degradierung der NOTCH1 intrazellulären Domäne (NICD1) entgegenwirkt. Die Analyse des NICD1-Interaktoms ergab, dass USP10 mit NICD1 interagiert. Darüberhinaus führte die Überexpression von USP10 zu einer konzentrations-abhängigen Steigerung der USP10 Proteinmenge. Im Gegensatz dazu hatte eine Inaktivierung von USP10 in Endothelzellen eine verminderte Stabilität des NICD1 Proteins zur Folge. Hieraus resultierte eine gestörte Aktivität des NOTCH1 Signaltransduktionsweges, die sich in einer verminderten Expression typischer NOTCH1 Zielgene manifestierte. Im Mausmodell konnten wir zudem nachweisen, dass die endothel-spezifische Inaktivierung von USP10 eine vermehrte Verzweigung der Gefäße hervorrief aus der ein gesteigertes Gefäßwachstum resultierte. Dieser Phänotyp erinnert an Mausmutanten, in denen der NOTCH1 Signalweg im Endothel inaktiviert wurde und lässt vermuten, dass USP10 ein physiologisch relevanter Regulator des Notch Signalkaskade ist.