



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Role of integrin adhesions in cellular mechanotransduction

Balcioğlu, H.E.

Citation

Balcioğlu, H. E. (2016, March 8). *Role of integrin adhesions in cellular mechanotransduction*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/38405>

Version: Corrected Publisher's Version

License: [Licence agreement concerning inclusion of doctoral thesis in the Institutional Repository of the University of Leiden](#)

Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/38405>

Note: To cite this publication please use the final published version (if applicable).

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <http://hdl.handle.net/1887/38405> holds various files of this Leiden University dissertation

Author: Balcioğlu, Hayri Emrah

Title: Role of integrin adhesions in cellular mechanotransduction

Issue Date: 2016-03-08

ÖZET

İntegrin bağlantılarının hücrenin mekanik dönüştürmesindeki rolü

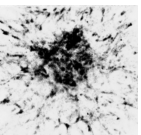
Hücrelerin ekstrasellüler mekanik iletileri ve intrasellüler kimyasal sinyalleri birbirine dönüştürmesine mekanik dönüştürme denir. Mekanik dönüştürme, hücrenin yaşamını sürdürmesinde, farklılaşmasında, embriyonik göçte ve kanser gelişmesinde önemli rol oynar. Mekanik dönüştürme dıştan-içe ve içten-dışa olmak üzere ikiye ayrılır. Dıştan içe mekanik dönüştürmede, hücreler hücre dışı mekanik iletileri sezer ve bu iletileri hücre içi kimyasal sinyallere çevirir. İçten dışa mekanik dönüştürmede ise hücreler hücre dışı proteinleri çekerek veya hücre dışına protein salgılayarak hücre dışı ortamın fiziksel özelliklerini değiştirirler. Hücresel mekanik dönüştürme sayesinde hücreler ortamlarıyla dinamik bir fiziksel denge içerisinde bulunurlar. Bu dengenin bozulmasına kanserde ve lif dejenerasyonunda sıkça rastlanır.

İntegrin transmembran proteinleri, hücrelerarası madde proteinlerini fiziksel olarak hücre-matriks bağlantısı olarak adlandırılan hücre içi çok moleküllü komplekslere bağlarlar. Hücre matriks bağlantıları mekanik dönüştürmede önemli proteinlere ev sahipliği yapar. Bu proteinlerin bir kısmı integrinleri fiziksel olarak hücre iskeletine bağlayarak hücre içi - hücre dışı mekanik iletişimde rol oynarlar. Bazı proteinler ise mekanik hassasiyet gösterir. Uygulanan kuvvet karşısında proteinlerin aktivitesi değişebilir ya da daha önce gizli olan etkileşim bölgeleri ulaşılır hale gelebilir. Bu mekanizmalar sayesinde proteinler fiziksel sinyal ile kimyasal aktivitelerini değiştirerek mekanik dönüştürmede etkili olurlar. Bu tezde hücresel mekanik değiştirmenin kanserdeki önemi ve mekanik değiştirmeyi etkileyen proteinler üzerine çalışıldı. Bahsedilen proteinlerden özellikle mekanik dönüştürmede önemli olması beklenen integrin proteini ve onunla ilişkili bazı diğer proteinler üzerine yoğunlaşıldı.

2. bölümde mekanik dönüştürmenin kanserin ilerlemesindeki rolü üzerindeki bulgular sunulmaktadır. Bunun için laboratuvarında oluşturulan üç boyutlu kollajen dokuya tümör hücresi kültüründen alınmış hücreler, bir noktaya iğneyle küresel bir şekilde koyuldu. Birkaç gün boyunca tümör hücrelerinin yayılımları ve çevreleyen kollajen dokunun düzeni incelendi. Tümöroid denilen bu kanser hücresi topluluğunun bir örneğinin, ikinci günden üçüncü güne gelişimini sayfaların sol altında görebilirsiniz. Yirmiden fazla kanser hücresi kültürü ile yapılan çalışmada, kanser tipi ve protein seviyelerinden bağımsız olarak, kollajen ortamı daha uzun mesafelerde düzenleyebilen tümöroidlerin, daha fazla büyüdüğü ve yerel yayılımda bulunduğu gözlemlendi. Bu tümöroidlerden bazıları kollajen ortamı, kendi yayılma alanlarının beş katı mesafeye kadar düzenlediler. Bu uzun mesafe düzenleme bölgesine konulan damar hücreleri, kollajeni düzenleyen tümöroide doğru ilerleme eğilimi gösterdiler. Tümöroidin damar hücreleri ile olan fiziksel bağlantısının koparılması ise bu eğilimi ortadan kaldırdı. Sonuç olarak bu bölümde tümör hücrelerinin ortamları ile olan fiziksel iletişiminin, hem tümör yayılımını hem de tümör ortamında görülen yeni damar oluşumunu etkileyebileceği gösterildi.

3. bölümde hücrelerin integrin profillerinin hücrel mekanik dönüştürmeye etkisi gösterilmektedir. Fibronektin hücrelerarası madde proteinine bağlanan hücrelerin, bu proteine integrin $\alpha 5 \beta 1$ veya integrin $\alpha \nu \beta 3$ proteinleri ile bağlanmasının, hücrenin dıştan içe ve içten dışa mekanik dönüştürmesini etkilediği görülmektedir. $\alpha \nu \beta 3$ integrinleri daha çok hücrelerin aktif olduğu süreçlerde görülür, mesela damar oluşumu sırasında endotel hücrelerinde. Her iki durumda da hücreler hem ortamlarına benzer miktarlarda kuvvetler uyguladılar, hem de hücre alanlarını ortam sertliğiyle bağlantılı olarak benzer şekilde arttırdılar. Lakin, $\alpha 5 \beta 1$ integrini ile fibronektine bağlanan hücrelerde, aktin hücre iskeletinin daha uzun liflerden oluştuğu, bununla bağlantılı olarak da uygulanan kuvvet doğrultularının daha düzenli olduğu gözlemlendi. Aktin iskeletinin ilaçlarla daha kısa liflerden oluşmasının sağlandığı durumda ise kuvvetlerin düzeninin azaldığı ve $\alpha \nu \beta 3$ integrini ile bağlanan hücrelere benzediği gözlemlendi. Buna karşılık $\alpha \nu \beta 3$ integrini ile fibronektine bağlanan hücrelerin ise hem uygulanan kuvvetler karşılığında aktin iskeletlerinin düzenini daha etkin bir şekilde değiştirdikleri görüldü, hem de daha yumuşak ortamlarda hücre-matriks bağlantıları oluşturdukları gözlemlendi.

4. bölümde hücre-matriks bağlantı proteinlerinin miktarının, uygu-



lanan kuvvetle ilişkisi incelendi. Daha önceki çalışmalarda hücre sel kuvvetleri etkileyen çeşitli proteinler teşhis edilmişti. Yalnız benim bilgi dahilimde bu proteinlerin hücre bağlantılarındaki miktarları üzerine bir çalışma bulunmamaktadır. Bu bölümde talin, vinkülin, paksilin ve fokal adezyon kinaz ile çalışıldı. Bu proteinlerin daha önceki çalışmalarda integrin-hücre iskeleti bağlantısında ve bu yapıdaki kimyasal bildirimlerde önemli olduğu gözlemlenmiştir. Bu proteinler antikor boyaması ile işaretlendi. Örnekler süper çözünürlüklü floresan mikroskopu tekniği ile nanometre düzeyinde incelendi. Bu yüksek çözünürlüklü görüntülerdeki antikorlar arası mesafeler istatistiksel olarak incelenerek ilk defa belirli alanlardaki işaretlenmiş protein miktarı hesaplandı. Bu teknik ile hücre-matriks bağlantısındaki protein miktarları hesaplandı. Bu teknoloji çekiş kuvveti mikroskopu tekniği ile birlikte kullanılarak protein miktarları farklı sertlikteki ortamlarda bağlantıların uyguladığı kuvvetlerle ilişkilendirildi. Fokal adezyon kinaz miktarının kuvvetle herhangi bir ilişkisi görülmedi. Talin, vinkülin ve paksilin miktarlarının artması ise daha yüksek kuvvetlerle özdeşleşti. 60 pN gibi bir kuvvet artışı yaklaşık 50 kPa sertliğindeki bir ortamda, 1 talin, 2 vinkülin ve 2 paksilin molekülüyle ilişkilendi. Dört kat daha yumuşak bir ortamda ise aynı kuvvet artışı 2 talin, 6 paksilin ve 12 vinkülin molekülüyle ilişkilendi. Burada vinkülin molekülündeki büyük değişim ortam sertliğiyle bağlantılı faaliyet değişikliğine işaret ediyor. Sonuç olarak bu bölümde ilk defa belirli hücre-matriks bağlantısı proteinlerinin net miktarının bir bağlantıdaki kuvveti nasıl etkilediği incelendi.

5. bölümde tümör hücrelerinin göçü, hücre bağlantısının dinamiği ve hücre sel kuvvetleri etkileyen proteinler üzerine çalışıldı. Bunun için çeşitli proteinlerin kodlanmaları küçük RNA parçaları ile engellendi. Bu sayede bu proteinlerin hücredeki miktarlarının azalmasının hücre üzerindeki etkisi incelendi. 200'den fazla proteinin hücre-matriks dinamiğini ve büyüklüğünü etkilediği gözlemlendi. Bu proteinlerden en etkili olduğu tespit edilen 64 tanesinden 11 tanesinin hücre göçüyle de ilişkili olduğu tespit edildi. Bu proteinlerden TPM1, PPP1R12B, HIPK3 ve RAC2 genleri ile kodlanan 4 tanesinin hücre sel kuvvetler üzerindeki etkisi incelendi. PPP1R12B, HIPK3 ve RAC2 genlerinin kodlanmasının engellenmesi, hücre sel kuvvetlerin artmasına ve daha yavaş değişmesine sebep oldu. TPM1 geninin kodlanmasının engellenmesi sonucunda ise hücre sel kuvvetlerde kayda değer bir değişim görülmedi. Böylece tümör hücrelerinin göçünü, hücre bağlantısının dinamiğini ve hücre sel kuvvet-

lerin deęişimini etkileyen proteinler teęhis edilmiř oldu.

Bu tezde sunulan bulgular bir bütün olarak ele alındığında, hem hücresel mekanik dönüştürmenin kanser gelişimindeki etkilerini hem de hücre-matriks bağlantısının moleküler yapısının hücresel kuvvetlerle ilişkisini göstermektedir.

