



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

SAMENVATTING

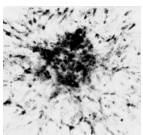
De rol van integrine adhesies in cellulaire mechanotransductie.

Het vermogen van cellen om extracellulaire mechanische stimulatie in intracellulaire signalen te vertalen wordt mechanotransductie genoemd. Cellulaire mechanotransductie speelt een belangrijke rol in de overleving van cellen, cel differentiatie, cel migratie en de progressie van kanker. Mechanotransductie is een bidirectioneel proces. Cellen nemen de mechanische eigenschappen van de omgeving waar en reguleren daarmee hun intracellulaire signalen. Andersom past de cel de mechanische eigenschappen van de omgeving aan door het uitoefenen van tractie of het afscheiden van extracellulair materiaal. Door deze mechanismen kunnen cellen een dynamisch evenwicht behouden met hun omgeving. De verstoring van dit evenwicht treedt vaak op in pathologische aandoeningen als kanker en fibrose.

Integrines zijn transmembraaneiwitten die de extracellulaire matrix verbinden met het intracellulaire cytoskelet. Deze verbinding verloopt via een dynamisch multimoleculair complex en is geconcentreerd in de cel-matrix adhesie plaques. De rol van de cel-matrix adhesie plaques in mechanotransductie is uitvoerig bestudeerd. Sommige van de eiwitten in de plaques spelen een rol in de krachtoverdracht vanuit de cel naar de extracellulaire matrix en vice versa door een verbinding te vormen tussen de integrines en het actine cytoskelet. Anderen doen dit door in reactie op mechanische stress hun activiteit aan te passen of verborgen eiwit-eiwit interactiegebieden te voorschijn te brengen. Uiteindelijk zorgen deze veranderingen ook voor veranderde chemische signalen bij fysieke stimuli die de activiteit van genen kunnen reguleren. In dit proefschrift beschrijf ik de rol van cellulaire mechanotransductie in kanker en onderzoek de eiwitten die effect hebben op mechanotransductie. Ik richt me specifiek op integrines en andere met integrine geassocieerde eiwitten.

In **hoofdstuk 2** presenteer ik mijn bevindingen op het gebied van mechanotransductie in kankerprogressie. In deze *in vitro* studie werden tumorcellen met behulp van microprinting in een driedimensionale extracellulaire matrix bestaande uit collageen aangebracht om zo bolletjes (tumoroides) te vormen. De ontwikkeling van tumorexpan­sie en collageen organisatie werd gevolgd gedurende enige dagen. U kunt de expansie van een tumoroides volgen in de hoek linksonder van de even pagina's van dit proefschrift. Deze studie, waarin ik circa 20 verschillende tumorcellijnen heb gebruikt, geeft aan dat het vermogen om te groeien en lokaal het collageen te doordringen correlatie vertoont met het vermogen om het collageen in de omgeving te reorganiseren. De reorganisatie van het collageen bleek op vrij grote afstand van de tumoroides plaats te vinden, tot wel vijf maal de radius van de tumoroides. Wanneer bloedvatcellen werden geprint in deze gebieden bewogen deze in de richting van de tumor. Het verwijderen van de verbinding tussen de tumoroides en het gereorganiseerde collageen verstoortte die gerichte migratie. De conclusie van dit hoofdstuk is dat de fysieke communicatie tussen tumorcellen en hun omgeving effect heeft op zowel tumorgroei als het rekruteren van bloedvaten, ook wel tumor angiogenese genoemd.

In **hoofdstuk 3** wordt het effect van de expressieprofielen van integrines op cellulaire mechanotransductie gepresenteerd. Cellen werden gehecht aan het extracellulaire matrix eiwit fibronectine via ofwel integrine $\alpha 5 \beta 1$ of $\alpha v \beta 3$. De cellen bleken trekkrachten van vergelijkbare grootte op het fibronectine uit te oefenen. Daarnaast pasten ze op dezelfde manier hun spreiding aan de stijfheid van de omgeving aan. Echter, cellen die fibronectine voornamelijk binden via $\alpha v \beta 3$ vormden cel-matrix adhesie plaques al op zeer zachte substraten vormen en reorganiseerden hun actine cytoskelet relatief sterk wanneer er extracellulaire krachten werden uitgeoefend. Daarnaast, bleek dat deze cellen relatief korte actine cytoskelet draden vormden en krachten op de omgeving in allerlei richtingen uitoefenen terwijl cellen die $\alpha 5 \beta 1$ gebruikten langere actine cytoskelet draden vormden en hun krachten op de omgeving vooral centripetaal oriënteerden. Wanneer de cellen met $\alpha 5 \beta 1$ behandeld werden met een middel dat de lengte van actinedraden verkortte, raakte de centripetale oriëntatie van de krachten verstoord. Hierdoor gingen de cellen sterk lijken op de cellen die juist $\alpha v \beta 3$ voor de hechting gebruiken. Deze studie toont aan dat cellen de mechanische koppeling met de omgeving kunnen moduleren door verschillende integrine receptoren te gebruiken



voor de interactie met de extracellulaire matrix.

In **hoofdstuk 4** wordt de relatie tussen de hoeveelheid eiwitten in de cel-matrix adhesie plaques en de uitgeoefende kracht gepresenteerd. In eerdere studies zijn verscheidene eiwitten geïdentificeerd die een effect hebben op de trekkrachten van de cel. Er zijn nog geen studies uitgevoerd die kijken naar het aantal van deze eiwitten in de adhesie. In dit hoofdstuk worden studies naar de cell-matrix adhesie componenten talin, vinculin, paxillin en focal adhesion kinase (FAK) gepresenteerd. Deze eiwitten zijn belangrijk voor de verbinding tussen integrine en actine en voor de biochemische signalen die het actine cytoskelet controleren. We hebben deze eiwitten gedetecteerd met specifieke antilichamen en bestudeerd op nanoschaal met behulp van super resolutie technieken. Uit de hoge resolutie afbeeldingen is de afstand tussen de eiwit lokalisaties statistisch geanalyseerd. Met deze techniek werd het aantal talin, vinculin, paxillin en FAK eiwitten in de cel-matrix adhesie plaques berekend. Door deze aanpak te combineren met trekkracht microscopie kon een relatie worden gelegd tussen het aantal eiwitten en de lokaal uitgeoefende kracht in een adhesie plaque. Het aantal FAK eiwitten bleek geen relatie te hebben met de uitgeoefende kracht. Een toename in talin, vinculin en paxillin moleculen bleek juist duidelijk te correleren met een toename in de uitgeoefende kracht. Voor elke ~ 60 pN extra trekkracht op een substraat met een stijfheid van ~ 50 kPa bleken 1 talin, 2 vinculin en 2 paxillin moleculen extra te worden gerekruteerd in de adhesie plaque. Op een substraat met een vier keer zo lage stijfheid werd een zelfde toename in kracht geassocieerd met de rekrutering van 2 talin, 12 vinculin en 6 paxillin moleculen. Dit hoofdstuk laat voor het eerst de relatie zien tussen het aantal lokaal aanwezige eiwitten in de adhesie en de kracht die uitgeoefend wordt door de adhesie. De gevonden sterke verandering in vinculin rekrutering bij verlaging van de stijfheid van het substraat wijst op een mogelijke functie als stijfheidsafhankelijke schakelaar.

In **hoofdstuk 5** wordt onderzoek beschreven naar eiwitten die een rol spelen in de migratie van kankercellen, de vorming van cel-matrix adhesie plaques en het uitoefenen van krachten door cellen. Om dit te doen zijn siRNA-knockdowns uitgevoerd en is het effect op borstkankercellen bestudeerd. Er zijn meer dan 200 eiwitten geïdentificeerd die invloed hebben op de grootte en dynamiek van cel-matrix adhesie plaques. De meest effectieve 64 eiwitten zijn getest op hun effect op cel migratie.

Van deze set hadden er 11 ook een significantie invloed op celmigratie. Tot slot zijn vier eiwitten, gecodeerd door de genen TPM1, PPP1R12B, HIPK3 en RAC2, verder bestudeerd met betrekking tot hun rol in de krachttuitoefening door de cel. Het uitschakelen van PPP1R12B, HIPK3 en RAC2 resulteerde in een toename in de krachttuitoefening door de cel en reduceerde de dynamiek van de krachten op de adhesie. Uitschakelen van TPM1 had geen significant effect op krachttuitoefening door de cel. In dit hoofdstuk zijn dus genen geïdentificeerd die coderen voor eiwitten die de migratie van kankercellen, de vorming van cel-matrix adhesies en krachttuitoefening door de cel reguleren.

Samenvattend ontrafelt dit proefschrift de rol van cellulaire mechanotransductie in de verschillende aspecten van kankerprogressie. Het toont de relatie tussen de moleculaire compositie van cel-matrix adhesies en krachttuitoefening door de cel.

