



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Molecular and cellular responses to renal injury : a (phospho)-proteomic approach

Graauw, M. de

Citation

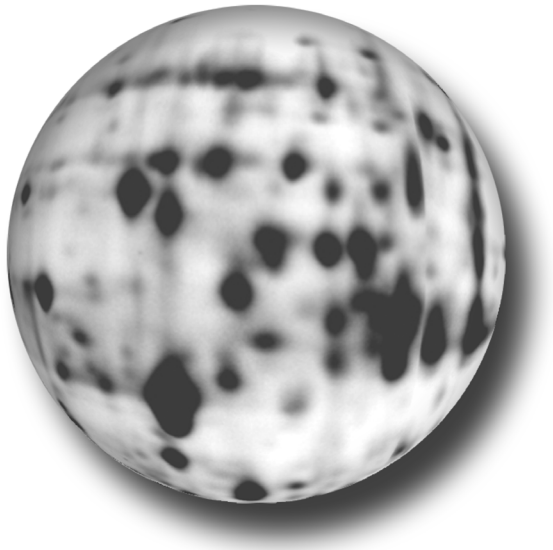
Graauw, M. de. (2007, June 7). *Molecular and cellular responses to renal injury : a (phospho)-proteomic approach*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/12036>

Version: Not Applicable (or Unknown)
License: [Leiden University Non-exclusive license](#)
Downloaded from: <https://hdl.handle.net/1887/12036>

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



Summary



SUMMARY

Our kidneys play a major role in regulating the body's internal environment, via transportation of water, salt, potassium and waste products. As a result of this transport function, cells within the kidney are relatively sensitive to injury. This injury can occur when the kidneys are exposed to anticancer drugs, antibiotics, toxic chemicals or as a result of a drop in blood flow during kidney transplantation (ischemia/reperfusion injury). As a consequence, renal function is rapidly lost. The primary targets for injury are epithelial cells lining the proximal tubule. These cells rest on a basement membrane via cell-matrix interactions and are connected to each other via cell-cell interactions. At these adhesion sites, several signalling complexes are located, which are linked to the F-actin cytoskeleton of the cell. When cells are damaged, they alter or may lose their cell-cell and cell-matrix adhesions in association with reorganization of the actin cytoskeleton. This is associated with changes in the activation status of several signal transduction pathways. *The research described in this thesis was designed to identify 'new' signalling pathways involved in renal cell injury and understand their role in this process.* The changes in protein expression and phosphorylation that occur in association with changes in cell adhesion and cytoskeletal organization prior to or during renal cell injury were analyzed using 2D-Difference In Gel Electrophoresis (DIGE) and 2D-phosphotyrosine blotting.

Renal injury as a result of ischemia/reperfusion (I/R) is associated with loss of cytoskeletal integrity and cell adhesion. Protein phosphorylation is one of the principal regulatory mechanisms that control cell adhesion. To better understand the mechanisms of cell detachment during I/R, differential kinase activities as well as protein (de)phosphorylation events were determined during I/R (**chapter 3**). Male Wistar rats were subjected to unilateral ischemia for 30 or 45 min by renal artery clamping followed by reperfusion periods from 1 h to 2 weeks. Focal adhesions (FAs), rich in tyrosine phosphorylation, were present at the basolateral membrane of RPTE cells. These FAs contained FAK, paxillin and talin which co-localized with F-actin stress fibers. Protein tyrosine phosphorylation was lost directly after ischemia, which was associated with reorganization of the FAs and actin cytoskeleton. During reperfusion, phosphorylation increased in conjunction with an increase in FA size and formation of stress fibers. The phosphorylation status of the FA proteins FAK, Src and paxillin was studied in more detail. The ischemia-induced FAK dephosphorylation was followed by a differential phosphorylation of the different FAK tyrosine residues during reperfusion. Subsequently the downstream signalling proteins Src and paxillin were activated through phosphorylation. These results suggest that reversible loss of protein tyrosine phosphorylation during ischemia drives the dynamic dissolution/re-structuring of focal adhesions and the F-actin cytoskeleton during reperfusion and regeneration.

Loss of cell adhesion during renal cell injury may result in cell death via apoptosis. To unravel the mechanisms underlying this process, different proteomic techniques were used to identify differential protein expression and phosphorylation in relation to apop-

tosis of RPTE cells. In a first study 2D-DIGE was used to determine early changes in the stress response pathways that precede focal adhesion disorganization linked to the onset of apoptosis of renal epithelial cells (**chapter 4**). Proteins were identified that were either alternatively expressed or post-translationally modified in a MAPK-dependent manner after treatment of the renal epithelial cell line LLC-PK1 with the model nephrotoxicant 1,2-(dichlorovinyl)-L-cysteine (DCVC). Treatment of cells with DCVC resulted in a > 1.5-fold up- and down-regulation of 14 and 9 proteins, respectively. These proteins were involved in metabolism, like aconitase and pyruvate dehydrogenase or related to stress responses and cytoskeletal reorganization, like cofilin, Hsp27 and alphaB-crystallin. Most prominent changes were found for the small heat shock protein Hsp27. These changes in the two-dimensional protein profile of Hsp27 were primarily due to increased phosphorylation of Hsp27, which explained a pI shift to the acidic region of the 2D gel. The phosphorylation of Hsp27 was mediated by p38 activation since an inhibitor of p38, SB203580, inhibited the phosphorylation. Furthermore, inhibition of p38 during DCVC-treatment accelerated the reorganization of FAs, which was associated with a more rapid cell detachment and onset of apoptosis. In a similar fashion, stable expression of an Hsp27 phosphorylation defective mutant increased the susceptibility toward FA reorganization caused by DCVC as well as the induction of apoptosis. DCVC also caused activation of the MAPK family member JNK. However, inhibition of JNK with SP600125 resulted in maintenance of cell adhesion and protection against apoptosis. These data show that early p38 activation during toxicant exposure results in a rapid phosphorylation of Hsp27, which is required for proper maintenance of cell adhesion and suppression of renal epithelial cell apoptosis.

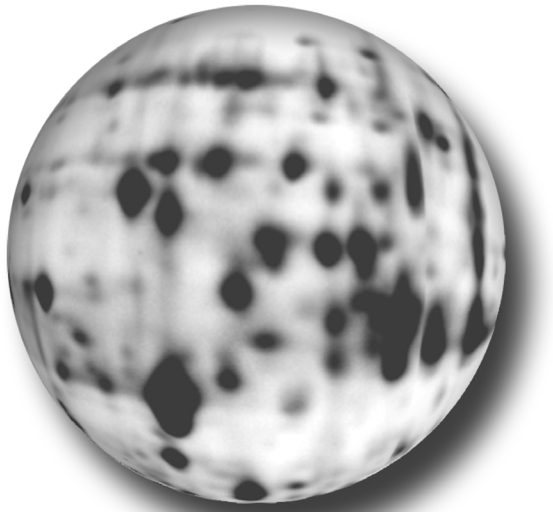
In addition to the DCVC-induced activation of MAPK-dependent stress responses a role for differential tyrosine phosphorylation in DCVC-induced renal cell injury was assessed using phospho-proteomics (**chapter 5**). DCVC-induced cell detachment and apoptosis was preceded by F-actin reorganization and lamellipodia formation which was enhanced by the protein tyrosine phosphatase inhibitor vanadate, and almost completely prevented by the protein tyrosine kinase inhibitor genistein. DCVC caused alterations in the phospho-tyrosine status of proteins involved in metabolism, including pyruvate kinase and glucose-6-phosphate dehydrogenase, in stress response, including Hsp60 and in cytoskeletal reorganization, such as actin-related protein 2 (Arp2). The phosphorylation status of Arp2 was affected most, while the phosphorylation of Arp3 was not affected. Arp2 located in the lamellipodia that were formed prior to the onset of apoptosis. This formation of dynamic lamellipodia and Arp2 phosphorylation were under direct control of tyrosine kinases, since both were blocked by inhibition of tyrosine kinases. A possible role for tyrosine phosphorylation of the Arp2/3 complex in the regulation of F-actin reorganization that precedes the onset of renal cell apoptosis should be further evaluated.

The regenerative capacity of the kidney is well documented. When treated appropriately renal failure may be reversible with complete recovery of renal function. However, toxicant- or IR-induced renal failure can also result in progressive fibrosis of the kidney, lead-

ing to scarring of the kidney, disruption of renal function and finally resulting in renal end-stage disease. The epithelial-to-mesenchymal transition (EMT) plays an important role in such progression of renal injury, but is nowadays also thought to stimulate renal regeneration. The transition is characterized by loss of cell polarity, F-actin reorganization and disappearance of cell-cell interactions. EMT is controlled by receptor tyrosine kinases, which in turn activate downstream tyrosine kinases such as Src kinase. As a result, changes occur in the tyrosine phosphorylation status of cytoskeletal and cell adhesion proteins. In **chapter 6** several phospho-tyrosine-proteins involved in the onset of v-Src kinase-induced EMT were identified using phospho-proteomics. These included the adhesion and cytoskeletal proteins ezrin, radixin, vinculin, annexin A1 and A2. The major differentially phosphorylated protein in this study was annexin A2 (AnxA2), which is phosphorylated at Tyr23 upon activation of Src kinase. Expression of a phospho-mimicking mutant of AnxA2 (Y23E-AnxA2), resulted in F-actin reorganization, cell scattering and 3D branching morphogenesis independent of the scatter factor HGF. The induction of cell scattering by Y23E-AnxA2 was associated with dephosphorylation/activation of the actin binding protein cofilin and inhibited by co-expression of a phospho-mimicking mutant of cofilin (S3E). In addition, RNAi-mediated knockdown of AnxA2 resulted in inhibition of cell adhesion, HGF-induced cell scattering and 3D cyst formation in a collagen gel. Together these data suggest an important role for AnxA2 in renal cell injury and regeneration both *in vitro* as well as *in vivo*.

Altogether, the protein identifications that are described in this thesis point to a more common observation of alterations in the F-actin cytoskeleton that take place during the process of renal cell injury and regeneration. Assessing the precise role of these proteins and their phosphorylation status will increase our understanding of the events that take place during this process.

Samenvatting



NEDERLANDSE SAMENVATTING

Onze nieren zijn belangrijk voor een goede balans in de zout- en waterhuishouding in ons lichaam en het verwijderen van afvalstoffen uit het lichaam. De nier is een orgaan dat relatief gevoelig is voor schade. Deze schade kan optreden op als gevolg van blootstelling aan antikanker geneesmiddelen, antibiotica, toxische stoffen of een tekort aan zuurstof wat kan ontstaan als gevolg van b.v. een niertransplantatie (ischemie-reperfusie schade). De schade treedt vaak op in een bepaald type niercel, n.l. de proximale tubulus cel, en kan leiden tot celdood en uiteindelijk tot het verminderd of zelfs niet functioneren van de nier. De adhesie van niercellen vindt plaats via hechting aan een extracellulaire matrix (cel-matrix interactie) en door onderlinge interactie (cel-cel interacties). De cel adhesie wordt gereguleerd door het cytoskelet van de cel en verschillende signaleringseiwitten. Samen zorgen ze voor het goed functioneren als mede het overleven van de cel. Beschadiging van niercellen leidt tot verandering of zelfs verlies van cel adhesie in combinatie met veranderingen in het cytoskelet van de cel. Over het algemeen zijn deze veranderingen het gevolg van activering van signaal transductie routes, die (in)direct aangrijpen op de organisatie van het cytoskelet. *Het onderzoek dat wordt beschreven in dit proefschrift is gericht op de identificatie van 'nieuwe' signaleringsroutes die betrokken zijn bij niercel schade en het begrijpen van de rol van deze routes in het hele proces van cel schade.* Met behulp van 2D-DIGE en 2D-fosfo-tyrosineblotting zijn de veranderingen in eiwit expressie en fosforylering geanalyseerd die optreden in relatie tot de waargenomen veranderingen in cel adhesie en cytoskelet organisatie.

Nierschade als gevolg van ischemie-reperfusie is geassocieerd met verlies van cytoskelet organisatie en cel adhesie. Eiwit fosforylering is een van de belangrijkste mechanismen voor de regulatie van cel adhesie. Om de mechanismen die ten grondslag liggen aan het verlies van cel adhesie tijdens ischemie-reperfusie beter te begrijpen, zijn de veranderingen in kinase activiteit en eiwit fosforylering die optreden tijdens *in vivo* ischemie-reperfusie bepaald (**hoofdstuk 3**). Hiervoor is de nier arterie in Wistar ratten (m) voor 30 of 45 minuten afgeklemd gevolgd door een reperfusie periode van 1 uur tot 2 weken. In controle nieren, waren op het basolaterale membraan van de proximale tubulus cellen tyrosine gefosforyleerde focal adhesion (FA) complexen zichtbaar. Deze FAs bestonden uit focal adhesion kinase (FAK), paxillin en talin welke co-lokaliseerden met F-actine stress fibers. De eiwit fosforylering verdween direct na ischemie wat geassocieerd was met reorganisatie van de FAs en het actine cytoskelet. Gedurende de reperfusie periode nam de fosforylering van eiwitten toe, samen met een toename in FA grootte en vorming van F-actine stress fibers. De fosforylering van de FA eiwitten FAK, paxillin en Src is in meer detail bestudeerd. Ischemie leidt tot defosforylering van FAK en reperfusie resulteert in fosforylering van FAK op de verschillende tyrosine residuen. Deze toename en het tijdsbestek waarin de toename plaatsvindt, verschilt per residu. Vervolgens worden de eiwitten Src en paxillin geactiveerd door fosforylering. Deze resultaten suggereren dat het omkeerbare verlies van tyrosine fosforylering gedurende ischemie een belangrijke bijdrage levert aan de dynamische herstructurering van de FA en het cytoskelet dat plaats

vindt tijdens reperfusie en regeneratie van de nier.

Verlies van cel adhesie tijdens nier cel schade kan resulteren in cel dood via apoptose. Om de mechanismen te begrijpen die ten grondslag liggen aan dit proces zijn verschillende proteomische technieken gebruikt om eiwitten te kunnen identificeren met een verandering in expressie en fosforylering in relatie tot apoptose van nier cellen. In een eerste studie is gebruik gemaakt van 2D-DIGE om de veranderingen in de stress respons routes te bepalen die vooraf gaan aan FA reorganisatie en cel dood van niercellen (**hoofdstuk 4**). Er zijn eiwitten geïdentificeerd die, of wel veranderd tot expressie komen, of wel veranderingen ondergaan in post-translationele modificaties in relatie tot MAP-kinase activatie na behandeling van de nier cellijn LLC-PK1 met de specifieke niertoxische verbinding 1,2-(dichlorovinyl)-L-cysteïne (DCVC). Behandeling van de cellen met DCVC resulteerde in een >1.5-voudige verhoging en verlaging in de expressie van respectievelijk 14 en 9 eiwitten. Deze eiwitten zijn betrokken bij het metabolisme van de cel, zoals aconitase en pyruvaat dehydrogenase of gerelateerd aan de stress respons of cytoskelet veranderingen, zoals cofilin, Hsp27 en α B-crystallin. De grootste verandering werd waargenomen voor het kleine heat shock protein 27 (Hsp27). De veranderingen in het 2D profiel van dit eiwit werden voornamelijk veroorzaakt door fosforylering van het eiwit, waardoor de pI waarde van het eiwit veranderde, resulterend in een verschuiving van het eiwit naar de lage pH kant (plus kant) van de gel. De fosforylering van Hsp27 wordt gereguleerd door p38 activatie, want een remmer van p38, SB203580, voorkomt de fosforylering. Remming van p38 gedurende DCVC blootstelling leidde tot versnelde reorganisatie van de FAs als mede tot een verhoging in het aantal apoptotische cellen. Dezelfde effecten werden gevonden in cellen die een mutant Hsp27 tot expressie brachten die niet meer gefosforyleerd kon worden. DCVC veranderde ook de activatie van het stress respons eiwit JNK, maar remming van dit eiwit met SP600125 leidde tot behoud van cel adhesie en bescherming tegen DCVC-geïnduceerde apoptose. Deze data laten zien dat vroege p38 activatie tijdens blootstelling aan toxische stoffen resulteert in snelle fosforylering van Hsp27 welke daarmee belangrijk is voor behoud van cel adhesie en onderdrukking van apoptose van proximale tubulus cellen.

Naast het effect van DCVC op de activatie van de MAPK afhankelijke stress respons route, is er met behulp van fosfo-proteomics een rol vastgesteld voor veranderde tyrosine fosforylering van eiwitten in relatie tot DCVC-geïnduceerde celdood (**hoofdstuk 5**). DCVC-geïnduceerde cel ronding en apoptose werd voorafgegaan aan F-actine reorganisatie en vorming van lamellipodia. Dit werd verhoogd door de tyrosine fosfatase remmer vanadaat en verlaagd door de tyrosine kinase remmer genisteïne. DCVC veroorzaakte veranderingen in de fosforylering van eiwitten die betrokken zijn bij het metabolisme van de cel, zoals pyruvaat kinase en glucose-6-fosfaat dehydrogenase, de stress respons, zoals Hsp60 en de cytoskelet organisatie, zoals actin-related protein 2 (Arp2). De fosforylering van Arp2 werd beïnvloed door DCVC, terwijl de fosforylering van Arp3 niet veranderde. Arp2 lokaliseerde in de lamellipodia die werden gevormd voordat niercellen apoptose ondergingen. Zowel de vorming van lamellipodia als mede de fosforylering van Arp2

werd gereguleerd door tyrosine kinase, want de tyrosine kinase remmer genistein blokkeerde beide processen. Een mogelijke rol voor fosforylering van het Arp2/3 complex in de regulatie van het F-actine cytoskelet dat vooraf gaat aan apoptose zal verder moeten worden bestudeerd.

De nier is in staat om te regenereren nadat het schade heeft ondervonden, waarbij de nier functie volledig kan terugkeren. Echter wanneer de schade te ernstig is kan dit leiden tot progressieve fibrose wat leidt tot vorming van litteken weefsel, verder verlies van nierfunctie wat overlijden tot gevolg kan hebben. De epitheel-mesenchymale transitie (EMT) speelt een belangrijke rol in de voortgang van nier schade, maar wordt tegenwoordig ook gerelateerd aan nier regeneratie. De transitie wordt gekarakteriseerd door verlies van polariteit, F-actine reorganisatie en verlies van cel-cel interacties. EMT wordt gereguleerd door activatie van receptor tyrosine kinases, die op hun beurt weer tyrosine kinases kunnen activeren zoals Src kinase. Door deze activatie veranderd de tyrosine fosforylering van eiwitten die betrokken zijn bij de regulatie van het cytoskelet en de cel-cel interactie. In **hoofdstuk 6** zijn met behulp van fosfo-proteomics verschillende eiwitten geïdentificeerd die gefosforyleerd worden in reactie op v-Src kinase-geïnduceerde EMT. Deze eiwitten zijn betrokken bij cel adhesie en het cytoskelet zoals ezrin, radixin, vinculin, annexin A1 en annexin A2 (AnxA2). De fosforylering van AnxA2 veranderde het meeste na Src kinase activatie en vond plaats op tyrosine residu 23. Expressie van een AnxA2 mutant (Y23E-AnxA2), waarin de confirmatie lijkt op de gefosforyleerde vorm van AnxA2, resulteert in F-actine reorganisatie, EMT en de vorming van tubulus structuren in een 3D collageen gel. De Y23E-AnxA2-geïnduceerde EMT is geassocieerd met defosforylering/activering van het actine bindingseiwit cofilin en wordt geremd door co-expressie van een cofilin mutant, waarvan de confirmatie lijkt op de gefosforyleerde vorm van cofilin (S3E-cofilin). Het verlagen van de AnxA2 expressie door middel van RNAi resulteert in remming van cel adhesie, HGF-geïnduceerde EMT en vorming van cystes in een 3D collageen gel. Deze data suggereren een belangrijke rol voor AnxA2 in nier cel schade en regeneratie zowel *in vitro* als *in vivo*.

Samengevat laat het onderzoek in dit proefschrift zien dat de meeste eiwitten die geïdentificeerd zijn met behulp van proteomics, betrokken zijn bij de veranderingen die tijdens nier cel schade optreden in cytoskelet organisatie en cel adhesie. Het bestuderen van hun rol in deze processen zal bijdragen aan het begrijpen van de moleculaire mechanismen die ten grondslag liggen van nier schade en regeneratie.

