



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Focal adhesion signaling in acute renal failure

Alderliesten, M.C.

Citation

Alderliesten, M. C. (2009, February 11). *Focal adhesion signaling in acute renal failure*. LACDR, Division of Toxicology, Faculty of Science, Leiden University. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/13803>

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/1887/13803>

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

Chapter 7

ENGLISH AND DUTCH SUMMARY



English Summary

Acute renal failure (ARF) affects 5% of hospitalized patients and has a mortality rate of approximately 50%. One of the primary causes of ARF is ischemia/reperfusion (I/R), a drop in blood flow leading to inadequate supply of oxygen and nutrients to renal tissue followed by reperfusion of the tissue. Current therapy is limited to supportive measures and preventive strategies, none of which have been definitely shown to alter mortality. Fundamental insights into cellular and molecular biology of I/R-induced renal injury are necessary to develop effective therapies that can prevent or reduce renal injury and thereby improve the quality of life of the patients.

Ischemia results in rapid loss of cytoskeletal integrity and cell polarity with mislocalization of adhesion molecules. Most cell types, including the proximal tubular epithelial cells, require cell-cell and cell-ECM adhesion for proper cellular signaling and tissue function. Signal transduction via focal adhesions (FAs) is implicated in many cellular processes like proliferation, migration, stress and survival. FAK is an important FA protein with a tyrosine kinase as well as a scaffolding function. Likewise it is involved in many downstream signaling pathways. ***The general goal of the work presented in this thesis was to study FA and in particular FAK signaling and dynamics during I/R using both an in vitro and in vivo approach.***

First we studied focal adhesion dynamics during I/R *in vivo* as described in **chapter 2**. For this we used a unilateral renal I/R model to study the temporal and spatial reorganization of FAs and F-actin stress fibers, as well as phosphorylation of FAK during I/R injury and subsequent regeneration. We clamped the left renal artery of male Wistar rats for 30 or 45 min and let it reperfuse for indicated time periods. Our data show the existence of FAs under *in vivo* conditions at the basolateral membrane of the renal proximal tubular epithelial cells. The FA structures are enriched in FAK and paxillin as well as their tyrosine phosphorylated forms and connected to basolateral F-actin stress fibers. Protein tyrosine phosphorylation at the FAs was lost directly after the ischemia, which coincided with a disruption of the FA structures and the F-actin network. During the reperfusion period levels of protein tyrosine phosphorylation increased in association with an increase in FA size and F-actin stress fibers formation. Our data also indicate a differential phosphorylation of FAK tyrosine residues during reperfusion. In conclusion this study shows a dynamic reorganization of FAs, F-actin cytoskeleton and FAK phosphorylation during renal I/R. Increased and tyrosine residue specific phosphorylation of FAK and paxillin during reperfusion may be important in the cellular stress response and cell survival signaling after ischemic injury.

During I/R the ERK pathway is activated. Nevertheless the dynamics of FA organization and phosphorylation during I/R in relation to ERK activation are unknown. In **chapter 3** we

show that preceding phosphorylation of these FA proteins, reperfusion caused increased phosphorylation of ERK1/2. U0126, a specific inhibitor of MEK, a kinase that activates ERK1/2, was injected 30 minutes before ischemia, prevented ERK1/2 activation and attenuated FAK, paxillin and Src phosphorylation, FA restructuring and I/R-induced renal injury. This supports a model whereby an ischemic insult causes loss of tyrosine phosphorylation of FA-associated signaling and adapter proteins followed by a MEK/ERK pathway dependent burst in protein tyrosine kinase activation and loss of FA structures. Inhibition of the MEK/ERK pathway and/or specific protein tyrosine kinases during the ischemic period may be potential therapeutic means to protect against renal failure caused by ischemic insults.

Since the FAs show dynamic reorganization and FAK is differentially phosphorylated on its tyrosine residues during I/R this indicates a role for FAK activation and downstream signaling events during renal I/R. In **chapter 4** we used a conditional proximal tubule specific FAK knockout mouse model to investigate the role of FAK during renal I/R injury. Mice with a floxed fak gene (FAK^{loxP/loxP}) were crossed with transgenic mice expressing tamoxifen-inducible Cre recombinase under control of the γ GT-promoter (γ GT-CreERT²), generating FAK^{loxP/loxP// γ GT-Cre-ERT²} mice. Tamoxifen treatment caused fak recombination (FAK ^{Δ loxP/ Δ loxP}) followed by a reduction in FAK protein levels at the FAs in the proximal tubules. Mice were subjected to unilateral ischemia by 35 minutes of renal pedicle clamping followed by reperfusion for 24 h. Scoring of renal injury in H&E-stained and kidney injury molecule-1-stained sections indicated that the FAK ^{Δ loxP/ Δ loxP} mice are significantly less susceptible to I/R injury than the FAK^{loxP/loxP} littermates. The protection against I/R coincided with decreased immune cell infiltration and endothelium activation of the injured renal tissue. This suggests that FAK drives a cellular stress response in the reperfusion phase after an ischemic period that possibly culminates in immune cell infiltration to the damaged areas in the kidney, resulting in aggravation of renal tissue injury.

One of the prominent features of acute renal failure is ATP depletion, which leads to disruption of the F-actin cytoskeleton, dephosphorylation of proteins and mislocalization of cell-ECM adhesion molecules. Since most renal injury is sublethal and is followed by recovery of the renal cells and restoration of the renal cell function. we studied the role of FAK in primary renal cells during recovery from ATP depletion in **chapter 5**. FAK was conditionally deleted from primary mouse renal cells, using the Cre-LoxP system as described in chapter 4. Upon tamoxifen treatment FAK was deleted. This did not result in changes in proliferation or cell survival nor did it alter the phosphorylation and expression levels of several FA proteins and the expression of total tyrosine phosphorylation. However, FAs of FAK knock out cells were larger in size than those wildtype cells and spreading of the knockout cells was impaired. ATP depletion did not lead to cell

death rather it caused dephosphorylation of FA proteins, a decrease in total tyrosine phosphorylation and F-actin cytoskeleton disruption. During recovery after ATP depletion, FAs of FAK knockout cells restored slower than those of wildtype cells. The same accounts for the F-actin cytoskeleton reorganization. This suggests that FAK is important for the reassembly and recovery of FAs after renal cell injury induced by ATP depletion.

Concluding, the studies on FA signaling and dynamics in renal epithelial cells provided new insights and reinforced prior notions. FAK deletion from the renal epithelial cells can lead to a better prognosis after I/R. However deletion may impair the regeneration process after injury. These findings provide fertile ground for further study.

Nederlandse Samenvatting

Acuut nierfalen is een veel voorkomend klinisch probleem met een sterftepercentage van 50%. Een van de belangrijkste oorzaken van acuut nierfalen is ischemie/reperfusie (I/R). I/R wordt veroorzaakt door een slechte doorbloeding van de nier waardoor het nierweefsel niet genoeg zuurstof en voedingsstoffen krijgt. Na een ischemische periode volgt reperfusie van de nier. Aanvankelijk kan reperfusie extra schade veroorzaken maar uiteindelijk zorgt het in de meeste gevallen voor regeneratie en herstel van het nierweefsel. De huidige behandelmethoden zijn voornamelijk ondersteunend en hebben geen effect op het sterftcijfer. Fundamentele kennis van de cellulaire en moleculaire mechanismen van acuut nierfalen zijn nodig om in de toekomst schade door acuut nierfalen te voorkomen of reduceren en de kwaliteit van leven van de patiënt te verbeteren.

De nier bestaat uit ongeveer een miljoen nefronen, dit zijn de functionele units van de nier. De cellen waaruit de nefron bestaat, zoals de proximale tubulus epitheel cellen hebben cel-cel en cel-matrix interactie nodig voor een goede intra-cellulaire signalering en dienengevolge optimale weefselfunctie. Tijdens een ischemische periode kunnen de cellen hun cel-cel en cel-matrix interactie verliezen door een verkeerde lokalisatie van bepaalde interactie moleculen en verstoorde integriteit van het F-actine cytoskelet.

Cel-matrix interacties worden gevormd door focal adhesions (FAs). Signaal transductie via deze FAs is belangrijk voor processen als proliferatie, migratie, stress en survival signalering van de cellen. Focal adhesie kinase (FAK) is een belangrijk FA eiwit, dat zowel functioneert als een tyrosine kinase, die zorgt voor activatie van eiwitten door fosforylering, als ook een platform eiwit, een functie waarbij FAK fungeert als platform voor het binden van verschillende andere eiwitten. **Het doel van het werk dat wordt beschreven in dit proefschrift was om de dynamiek en signalering van FAs en met name FAK te bestuderen tijdens I/R.** Hierbij is gebruik gemaakt van zowel een *in vivo* als *in vitro* benadering.

Allereerst hebben we in **hoofdstuk 2** de dynamiek van de FAs tijdens I/R *in vivo* bestudeerd. Om de locale en temporele reorganisatie van de FAs en de F-actine stress fibers als ook de activatie van FAK tijdens I/R te onderzoeken, hebben we gebruik gemaakt van een unilateraal I/R model. We hebben de linker nierader van ratten afgeklemd voor 30 of 45 minuten, gevolgd door verschillende perioden van reperfusie. We laten zien dat de FAs, voorheen enkel aangetoond *in vitro*, ook bestaan *in vivo* in de nier en wel aan het basolaterale membraan van de proximale tubulus epitheel cellen. De *in vivo* FAs zijn rijk aan FAK en paxillin even als hun actieve tyrosine gefosforyleerde vorm. De FAs zijn ook verbonden met het F-actin cytoskelet. De tyrosine fosforylering aan de FAs ging direct na ischemie verloren samen met een verstoring van de structuur van de FAs en het F-actine cytoskelet. Tijdens reperfusie werd de fosforylering van de eiwitten verhoogd evenals de grootte

van de FAs en de hoeveelheid F-actin stress fibers die gevormd werden. Ook zien we fosforylering op verschillende tyrosine residuen van het FAK eiwit gedurende reperfusie. We concluderen dat tijdens I/R een dynamische reorganisatie van de FAs, F-actin cytoskelet en FAK fosforylering, dus activatie, plaats vindt. Dit kan belangrijk zijn voor de cellulaire stress reactie en zo bij de survival van cellen na ischemische schade betrokken zijn.

Tijdens I/R wordt naast de dynamische verandering van de FA structuur en verstoring van het cytoskelet ook stress kinase ERK1/2 geactiveerd. Echter de relatie tussen de dynamische veranderingen van de FAs en ERK1/2 activatie is onbekend. In **hoofdstuk 3** laten we zien dat voorafgaand aan de fosforylering van de FA eiwitten na ischemie, de reperfusie activatie van ERK1/2 door fosforylering plaatsvindt. U0126 is een specifieke remmer van MEK1/2, een kinase dat ERK1/2 activeert. Injecteren van ratten, met U0126, 30 minuten voor het afklemmen van de nierader, verhindert ERK1/2 activatie en vermindert FAK, paxillin en Src fosforylering, FA restructuring als ook de I/R geïnduceerde nier schade zoals is beschreven in hoofdstuk 2. Deze resultaten onderschrijven een model waar ischemie verlies van tyrosine fosforylering van FA veroorzaakt, gevolgd door een explosie van kinase activiteit veroorzaakt door ERK en verlies van FAs. Het remmen van ERK1/2 tijdens ischemie kan potentieel een therapie zijn die de nieren beschermt tegen I/R geïnduceerde nierschade.

Zoals we hebben beschreven in hoofdstuk 2 en 3 zijn de FAs dynamische structuren tijdens I/R. FAK wordt gefosforyleerd op verschillende residuen van het eiwit gedurende reperfusie. Dit duidt op een rol voor FAK en FAK activatie tijdens I/R. Om de rol van FAK tijdens I/R te bestuderen hebben we in **hoofdstuk 4** een conditionele proximale tubulus epitheel specifieke knockout muismodel gebruikt. Hiervoor hebben we muizen met een floxed fak gene ($FAK^{loxP/loxP}$) gekruist met muizen met door tamoxifen induceerbaar Cre-recombinase onder controle van de γ GT-promoter (γ GT-Cre $^{ER^{T2}}$). De muizen die uit deze kruising ontstaan zijn $FAK^{loxP/loxP//\gamma$ GT-Cre- ER^{T2} muizen. Na tamoxifen behandeling raken deze muizen, enkel in de proximale tubulus cellen van de nier, het FAK gen kwijt. We zien dat met de deletie van fak ($FAK^{\Delta loxP/\Delta loxP}$) ook de eiwit hoeveelheid van FAK in de proximale tubulus is verminderd. Bij zowel de knockout muizen als de wildtype muizen werd de linker nierader afgeklemd voor 35 min gevolgd door een periode van reperfusie van 24h. De nieren van de $FAK^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ waren significant minder ontvankelijk voor schade dan de nieren van wildtype muizen. Samen met een bescherming tegen nierschade was er ook minder infiltratie van immuuncellen en endotheel activatie in het nierweefsel van de $FAK^{\Delta loxP/\Delta loxP}$ muizen. Dit duidt er op dat FAK betrokken is bij een cellulair stress reactie tijdens de reperfusie periode dat kan leiden tot een verzameling van immuuncellen in het beschadigde weefsel resulterend in verergering van de schade.

Eén van de belangrijkste kenmerken van acuut nierfalen is ATP depletie van de niercel-

len. ATP is de brandstof die de cel gebruikt bij het uitoefenen van al zijn functies. ATP depletie leidt tot verstoring van het F-actine cytoskelet, defosforylering, en dus inactivatie van eiwitten en verkeerde localisatie van cel interactie moleculen betrokken bij cel-cel en cel-matrix interacties. De meeste schade na I/R is niet lethaal voor de cellen en uiteindelijk worden de nier epitheelcellen hersteld en daarmee ook de nierfunctie. In **hoofdstuk 5** bestudeerden we de rol van FAK tijdens ATP depletie en herstel, in vers geïsoleerde muis niercellen. Om FAK uit te knocken in de niercellen maakten we gebruik van het zelfde Cre-LoxP systeem als in hoofdstuk 4. Na een behandeling met tamoxifen was FAK uitgeknocht in de vers geïsoleerde niercellen. Dit leidde niet tot een verandering in survival of proliferatie van de cellen. De fosforylering en expressie van verschillende FA eiwitten bleef ook gelijk. Echter, de FAs van de FAK knockout cellen waren groter dan die van normale wildtype niercellen. Bovendien was het spreiden van de cellen na hechting vertraagd in de FAK knockout niercellen. ATP depletie resulteerde niet in celdood, maar het veroorzaakte wel defosforylering van van FA eiwitten en een vermindering van totale tyrosine fosforylering. Ook was het F-actine cytoskelet verstoord tijdens ATP depletie. Gedurende de recovery na ATP depletie waren de FAs en F-actin cytoskelet van de knockout cellen vertraagd in het herstel vergeleken bij de wildtype cellen. De resultaten leiden tot een model waar FAK belangrijk is voor de heropbouw van de FAs na schade veroorzaakt door ATP depletie.

De studies naar FA signalering en de dynamiek van de FAs in nier epitheel cellen beschreven in dit proefschrift geven nieuwe inzichten en hebben eerdere waarnemingen versterkt. FAK deletie in de nier epitheel cellen leidt tot een betere prognose na I/R maar kan de regeneratie van het weefsel na schade vertragen. Deze bevindingen zijn een vruchtbare bodem voor verder onderzoek.

