



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).

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 sterftecijfer. 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.

