



Universiteit
Leiden
The Netherlands

Regulators of integrin $\alpha 6 \beta 4$ function

Molder, L. te

Citation

Molder, L. te. (2021, February 25). *Regulators of integrin $\alpha 6 \beta 4$ function*. Retrieved from <https://hdl.handle.net/1887/3147161>

Version: 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/1887/3147161>

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

Cover Page



Universiteit Leiden



The handle <https://hdl.handle.net/1887/3147161> holds various files of this Leiden University dissertation.

Author: Molder, L. te

Title: Regulators of integrin $\alpha 6 \beta 4$ function

Issue Date: 2021-02-25

Nederlandse samenvatting

Hemidesmosomen zijn essentieel voor het verankeren van je huidcellen aan het onderliggende basale membraan. Integrine $\alpha 6 \beta 4$ vormt de kern van deze hemidesmosomen en is daardoor essentieel voor de integriteit van de huid. Daarnaast kan integrine $\alpha 6 \beta 4$, los van hemidesmosomen, bijdragen aan versterking van signaalroutes. Maar te sterke signaalroutes kunnen leiden tot kanker. Dit proefschrift beschrijft onze zoektocht naar mechanismen die de functie van integrine $\alpha 6 \beta 4$ reguleren zowel bij het vormen of ontmantelen van hemidesmosomen als in het versterken van signaalroutes. Kennis over deze eiwitten en interacties draagt bij aan ons begrip van (huid)kanker en Epidermolysis Bullosa (vlinderziekte).

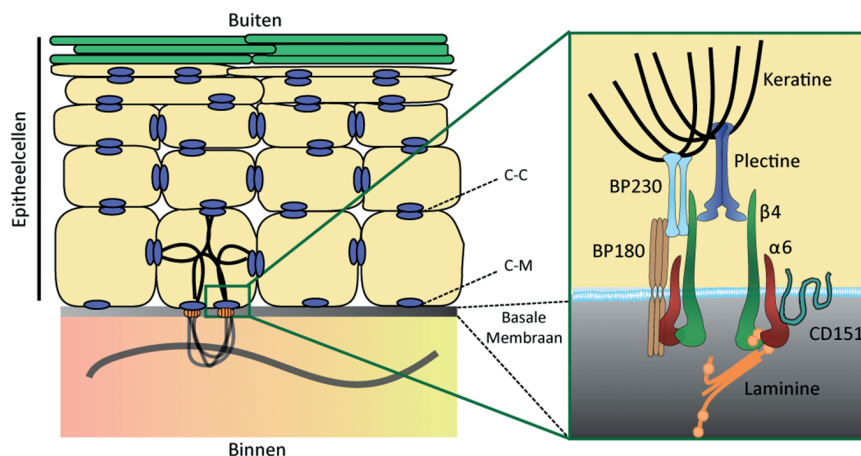
Achtergrond

Het menselijk lichaam bestaat uit meer dan 30 miljard cellen van verschillende types en met verschillende functies, waaronder epitheelcellen. Epitheelcellen zijn de cellen die de holtes en weefsels bedekken die in contact staan met de buitenwereld, zoals het maag-darmkanaal, de urinewegen en de huid. De epitheelcellen vormen daar een laag van op elkaar aansluitende cellen, die fungeert als beschermende barrière. Deze laag voorkomt vochtverlies uit de onderliggende weefsels, maakt gecoördineerde uitwisseling van stoffen mogelijk en beschermt het lichaam tegen het ongewenst binnenkomen van schadelijke invloeden (zoals virussen, chemische stoffen en UV-straling).

De precieze vorm, functie en schikking van de epitheelcellen verschilt per weefsel. In de darmen bestaat het epitheel bijvoorbeeld uit één laag langwerpige epitheelcellen die, met een extra groot oppervlak, zeer geschikt zijn voor het opnemen van voedingsstoffen. Het epitheel van de huid bestaat echter uit meerdere lagen cellen waarbij iedere laag zijn eigen vorm en specialisatie heeft (Fig. 1 links). Neem bijvoorbeeld de buitenste laag cellen. Die bestaat uit dode, verhoornde cellen die de daaronder gelegen levende cellen beschermen tegen onder andere zonlicht.

Om een continue sluitende laag te vormen, verankeren de epitheelcellen zich stevig aan elkaar (met cel-cel adhesies). Om goed vast te zitten aan de rest van het lichaam verankeren de epitheelcellen zich aan het onderliggende basale membraan. Deze verankering aan het basale membraan gebeurt door cel-matrix adhesies (Fig. 1 links). Het gespecialiseerde type cel-matrix adhesie waar dit proefschrift zich op richt zijn de hemidesmosomen (HD's).

Een HD bestaat uit verschillende eiwitten: het integrine $\alpha 6 \beta 4$, plectine, BP180, BP230 en tetraspanine CD151. Gezamenlijk vormen deze eiwitten een fysieke link tussen het keratine cytoskelet van de epitheelcel en laminine in het basale membraan (Fig. 1 rechts). Het integrine $\alpha 6 \beta 4$ vormt de kern van een HD en is essentieel voor de vorming van deze structuren.



Figuur 1 Hemidesmosomen in de huid verzorgen adhesie van epitheelcellen aan het basale membraan. Links: illustratie van de huid bestaande uit verschillende lagen epitheelcellen, voorzien van cel-cel (C-C) en cel-matrix (C-M) adhesies. Rechts: een uitvergroting van één type cel-matrix adhesie: een hemidesmosoom bestaande uit BP180, BP230, Plectine, het integrine $\alpha6\beta4$ en CD151. Gezamenlijk vormen deze eiwitten een fysieke link tussen het keratine cytoskelet van de epitheelcel en laminine in het basale membraan.

Integrines zijn eiwitten die door het celmembraan heen steken, waardoor een deel van het eiwit zich binnen de cel (intracellulair) en een deel zich buiten de cel (extracellulair) bevindt. Ze bestaan altijd uit twee subeenheden: één α -subeenheid en één β -subeenheid. De $\beta4$ -subeenheid, die een paar vormt met de $\alpha6$ -subeenheid, is uniek onder de β -subeenheden door zijn extreem lange intracellulaire staart. Deze staart bevat bindingsplaatsen voor andere eiwitten, waaronder het eiwit plectine. Door binding van plectine aan de intracellulaire staart van de $\beta4$ -subeenheid vormt zich een link tussen het integrine $\alpha6\beta4$ en het keratine cytoskelet in de epitheelcel. Extracellulair, vormen de $\alpha6$ - en $\beta4$ -subeenheid gezamenlijk een bindingsplaats voor laminine in het basale membraan.

Zoals eerder genoemd, zijn HD's essentieel voor de stabiele verankering van cellen aan het basale membraan. Afwijkingen in de eiwitten van een HD, kunnen leiden tot de ziekte Epidermolysis Bullosa (EB; vlinderziekte). Bij deze ziekte laten verschillende huidlagen los van elkaar, wat resulteert in blaarvorming. Kinderen die aan deze ziekte lijden, worden vanwege hun fragiele huid ook wel vlinderkinderen genoemd. EB gaat gepaard met symptomen als jeuk, blaarvorming, darm-, oog- en luchtwegproblemen, extreme littekenvorming en huidkanker. De symptomen en de ernst van de ziekte variëren van mild tot dodelijk. De uiting van de ziekte is afhankelijk van welk eiwit afwijkt en hoe het eiwit afwijkt. Verlies van het integrine $\alpha6\beta4$ (de kern van een HD) resulteert bijvoorbeeld in een ernstige vorm van EB, waarbij patiënten al kort na de geboorte overlijden. De oorzaak hiervan is dat, zonder het integrine $\alpha6\beta4$, HD's niet gevormd worden, waardoor de epitheelcellen loslaten van het basale membraan bij de minste aanraking.

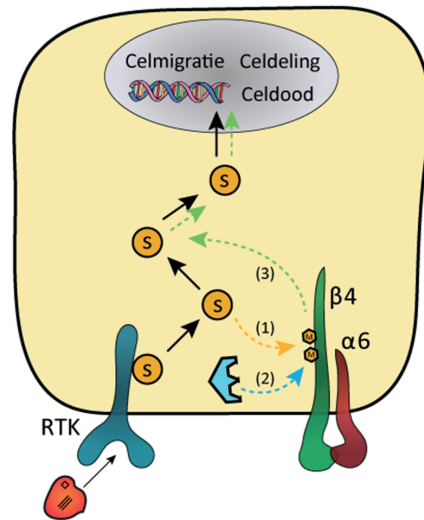
Wanneer het integrine $\alpha\beta_4$ niet aanwezig is in HDs, kan het een bijdrage leveren aan signaalroutes. Een signaalroute wordt geactiveerd door een 'bericht' van buiten de cel die op het oppervlak van de cel een tyrosine kinase receptor (RTK) activeert. Deze RTK start vervolgens een kettingreactie van signaaleiwitten die elkaar activeren en het signaal overbrengen naar de kern van de cel waar celfuncties gereguleerd worden. Verschillende signaalroutes beslissen gezamenlijk over het lot van een cel door bijvoorbeeld aan te zetten tot celdeling, celmigratie of celdood (Fig. 2). Overactivatie van specifieke signaalroutes kan echter leiden tot ongecontroleerde celdeling, oftewel kanker.

Een RTK die vaak aanwezig is op het oppervlak van epiteelcellen heet de epidermale groeifactor receptor (EGFR). Te veel of overactief EGFR is een belangrijke stap in het ontstaan van verschillende epitheliale tumoren, zoals huidkanker. Signaaleiwitten die geactiveerd worden door de EGFR kunnen, behalve het signaal doorgeven naar de kern, ook het integrine $\alpha\beta_4$ markeren. Deze markeringen bepalen welke eiwitten aan integrin $\alpha\beta_4$ kunnen binden en welke juist niet. Door markering van integrin $\alpha\beta_4$ kunnen HD-eiwitten niet meer binden, terwijl signaaleiwitten mogelijk juist wel kunnen binden.

Door binding van signaaleiwitten aan het integrine $\alpha\beta_4$ kan het integrine $\alpha\beta_4$ weer andere signaaleiwitten activeren en de al aanwezige signaalroutes in de cel versterken (Fig. 2). Het integrine $\alpha\beta_4$ kan dus tumorformatie en kwaadaardigheid van een tumor stimuleren, wanneer het integrine $\alpha\beta_4$ bijdraagt aan signaalroutes die aanzetten tot bijvoorbeeld celdeling.

Zoektocht om mechanismen te begrijpen die de functie van integrine $\alpha\beta_4$ reguleren

Kortom, het integrine $\alpha\beta_4$ is belangrijk om de integriteit van de huid te waarborgen, maar is ook geïdentificeerd als een eiwit dat bijdraagt aan tumorgroei. Hoe bepaald wordt wanneer integrine $\alpha\beta_4$ een goedaardige of kwaadaardige rol uitoefent, is nog



Figuur 2 Het integrine $\alpha\beta_4$ kan signaalroutes versterken. Tyrosine kinase receptoren (RTKs) worden geactiveerd door extracellulaire binding van een 'bericht'. Vervolgens activeert de RTK een signaalroute aan signaaleiwitten (S). De signaaleiwitten brengen het signaal naar de kern waar het functioneren van de cel wordt bepaald. Daarnaast kunnen de signaaleiwitten ook de integrine β_4 -subeenheid markeren (1)(M) waardoor hier andere eiwitten (2) aan kunnen binden die de signaalroutes kunnen versterken (3).

onduidelijk. In dit proefschrift wordt onze zoektocht beschreven naar het identificeren en begrijpen van mechanismen die de rol van integrine $\alpha 6 \beta 4$ in cel-matrix adhesie en in signaalroutes reguleren.

Dit proefschrift begint, na een algemene introductie in hoofdstuk 1, in hoofdstuk 2 met een literatuuronderzoek naar de rol van integrine $\alpha 6 \beta 4$ (en andere integrines) in de verschillende stappen van tumorformatie en metastasering. Hierbij komen verschillende factoren aan bod die de functie van integrines beïnvloeden, waardoor integrines soms als een tumoronderdrukker en soms als tumorversterker kunnen optreden. We concluderen dat voor de bijdrage van het integrine $\alpha 6 \beta 4$ aan tumorgenese twee aspecten van belang zijn: ten eerste het uiteenvallen van HD's waardoor integrine $\alpha 6 \beta 4$ 'de handen vrij heeft' om bij te dragen aan signaalroutes, en ten tweede de aanwezigheid van al geactiveerde signaalroutes.

Het uiteenvallen van HD's gebeurt door te voorkomen dat het integrine $\alpha 6 \beta 4$ aan andere HD-eiwitten zoals plectine bindt. Binding van plectine aan de $\beta 4$ -subeenheid kan worden voorkomen door $\beta 4$ te markeren op specifieke plaatsen (serines/treonines). In hoofdstuk 3 hebben we onderzocht welke signaaleiwitten verantwoordelijk zijn voor het markeren van de integrine $\beta 4$ subeenheid op een specifieke plek (T1736). We vonden onder andere dat het signaaleiwit RSK1 na activatie van de EGFR verantwoordelijk is voor markering van de $\beta 4$ -subeenheid op T1736. Deze data geeft inzicht in hoe HD's en specifiek de binding van plectine aan het integrine $\alpha 6 \beta 4$ wordt gereguleerd.

Wanneer de HDs uiteengevallen zijn, heeft het integrine $\alpha 6 \beta 4$ 'de handen vrij' om bij te dragen aan signaalroutes. Andere gemarkeerde plekken (tyrosines) op de integrine $\beta 4$ -subeenheid zouden vervolgens kunnen dienen als bindingsplaats voor signaaleiwitten die op hun beurt tumorstimulerende signaalroutes kunnen versterken (Fig. 2). Echter of deze markeringen van $\beta 4$ daadwerkelijke bijdragen aan het versterken van signaalroutes is al jaren onderdeel van het wetenschappelijke debat. Op basis van onze data, beschreven in hoofdstuk 4, concluderen we dat deze markeringen van $\beta 4$ geen effect hebben op de sterkte van de door de EGFR verzonden signalen. Dit heeft tot gevolg dat, ook na dit onderzoek, niet bekend is wat de biologische relevantie is van deze markeringen van $\beta 4$.

Behalve eiwitten die het integrine $\alpha 6 \beta 4$ markeren, kunnen ook andere eiwitten, zoals de tetraspanine CD151, de functie van integrines beïnvloeden. In hoofdstuk 5 hebben we onderzocht hoe de tetraspanine CD151 de adhesie van huidcellen door het integrine $\alpha 6 \beta 4$ aan het onderliggende basale membraan beïnvloedt. CD151 blijkt niet essentieel te zijn voor de vorming van HD's en niet significant bij te dragen aan de kracht waarmee het integrine $\alpha 6 \beta 4$ bindt aan het basale membraan. Echter, samen met het integrine $\alpha 3 \beta 1$, speelt CD151 een belangrijke rol bij het stabiliseren van een nog niet eerder

beschreven HD-type. In dit hoofdstuk hebben we de samenstelling van dit HD-type gekarakteriseerd, inzichten verkregen in de dynamiek van de verschillende types HD's en opperen we een mogelijke functie van dit nieuwe type HD.

Het is mogelijk dat er nog onbekende eiwitten zijn die de functie van het integrine $\alpha6\beta4$ reguleren en daardoor effect hebben op de integriteit van de huid of formatie van (huid)kanker. In hoofdstuk 6, hebben we alle eiwitten die in de buurt komen van het integrine $\alpha6\beta4$ in kaart gebracht met behulp van proteomics. We hebben 135 eiwitten geïdentificeerd als het "interactoom" van het integrine $\alpha6\beta4$. De identificatie van het interactoom van het integrine $\alpha6\beta4$ biedt een basis voor een hele nieuwe reeks onderzoeken naar mogelijke regulatoren van het integrine $\alpha6\beta4$.

Afsluitend zijn de resultaten van dit onderzoek samengevat en bediscussieerd in Hoofdstuk 7. Concluderend, kunnen we stellen dat interessante nieuwe inzichten zijn verschaft in de mechanismen die het integrine $\alpha6\beta4$ reguleren, en daardoor de integriteit van de huid of ontwikkeling van (huid)kanker beïnvloeden. Echter, om volledig te begrijpen hoe de integriteit van de huid wordt gewaarborgd, of hoe (huid)kanker zich ontwikkelt, is begrip van alleen het integrine $\alpha6\beta4$ niet voldoende. Hiervoor zijn o.a. inzichten nodig in de communicatie tussen alle verschillende RTK's, verschillende integrines, en verschillende cel-matrix adhesies die gelijktijdig actief zijn in dezelfde cel.