

DISS. ETH NO. 24178

Characterizing the mechanisms of
adhesion initiation and strengthening of integrins
to the extracellular matrix proteins

A thesis submitted to attain the degree of
DOCTOR OF SCIENCES of ETH Zurich

(Dr. sc. ETH Zurich)

presented by

Mitasha Bharadwaj Arora

M.Tech (Biotechnology)
Amity University

born on
27.01.1986

citizen of
India

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Daniel J. Mueller
Prof. Dr. Reinhard Fassler
Prof. Dr. Renato Paro

2017

Summary

Eukaryotic cells are decorated with a plethora of transmembrane proteins, which aid interactions with the environment rich in diverse components. In a homeostatic cell, these interactions are specific and tightly regulated to facilitate various cellular processes including cell adhesion, migration and proliferation.

Cell adhesion is pivotal in the development and in the systematic functioning of the organisms. Decades of impeccable research in adhesion biology achieved many milestones and simultaneously opened-up a Pandora's box asking more complex questions in the field, necessitating future researches. Our research has shed some light on some of the pertinent questions in the field of cell adhesion.

One of the widely used approaches in studying cellular adhesion is single cell adhesion study. Single cell adhesion studies are performed on a variety of cellular phenotypes: round cells to study early onset of adhesion initiation and flattened cells to study adhesion maturation. Therefore, single cell adhesion studies provide diverse insights into the mechanism of the cell adhesion. The first chapter of this thesis contributes to the technical advances in the field of atomic force microscope (AFM) based single cell adhesion studies. The study enumerates the advantages and the limitations of AFM based single cell adhesion studies performed on a round cell and a flattened cell. The second part of the chapter introduces a new methodology devised to study single cell adhesion and traction, using an AFM. Single cell adhesion studies, such as single cell force spectroscopy (SCFS) and traction force microscopy, provide information on adhesion and traction forces during cell adhesion formation. Broadly, living adherent cells can mechanically sense, generate and regulate adhesion and traction. A logical combination of existing tools and methodologies was devised, which provided the direct correlation between adhesion and traction as a living cell comes in contact with the extracellular matrix and/or other cells and initiate cell adhesion and traction.

Next chapters dig deep into the field of cell adhesion and focus on the role of integrins in regulating cell adhesion. Integrins are one of the key cell adhesion molecules, which provide anchorage and mediate signals across the plasma membrane. They allow cells to interact with the other cells and with the extracellular environment. Integrins recognise different extracellular matrix proteins like fibronectin, collagen, laminin etc., with high affinity and specificity. The binding of integrins to their specific ligands initiates signal transduction pathways that facilitate cell adhesion. Integrins mediate bi-directional signalling, inside-out and outside-in signalling. Not only a specific integrin can bind multiple ligands but also a specific ligand can be bound by multiple integrins. This complexity in the integrin-mediated adhesion influences the specificity of

an integrin to the extracellular matrix protein and also the functioning of other integrin types binding to the same extracellular matrix protein, broadly classified as an integrin crosstalk. How different types of integrins, binding to the same (or different) extracellular matrix proteins, interact among themselves and regulate functioning of another integrin type is still not well understood.

With this study, we examine the role of two fibronectin-binding integrins, $\alpha 5\beta 1$ and αV -class integrins in the cell adhesion and their subsequent crosstalk at the early onset of adhesion and during adhesion maturation (chapter 3). In the first part of this chapter, we investigate how $\alpha 5\beta 1$ and αV -class integrins bind the abundant extracellular matrix protein fibronectin and regulate fibroblast adhesion in the early phases of attachment (<120 s). By combining SCFS with various optical microscopy approaches, we quantify the early adhesion formation of engineered mouse fibroblasts expressing $\alpha 5\beta 1$ and/or αV -class integrins. We observe a differential integrin-dependent adhesion wherein fibronectin-binding integrin classes establish distinct adhesion profiles when a fibroblast initiates adhesion to fibronectin. By measuring the binding probability of each fibronectin-binding integrin, we unravel an exclusive relationship between $\alpha 5\beta 1$ and αV -class integrins wherein they both initially compete to bind the RGD-domain of fibronectin and eventually αV -class integrins win this competition. Later, upon activation of αV -class integrins, fibroblasts considerably strengthen adhesion to fibronectin. Our study reveals that after engaging to fibronectin, αV -class integrins send cues to $\alpha 5\beta 1$ integrins to establish new adhesion sites and to strengthen fibroblast adhesion. Surprisingly, this regulation appears to signal across the cell and thus $\alpha 5\beta 1$ integrins establish additional adhesion sites to fibronectin, away from those formed by αV -class integrins: crosstalk. Since integrin adhesion involves cascade of signalling events comprising of various integrin associated proteins, we were intrigued by the role of signalling pathways in our observed crosstalk. We determine that fibronectin-bound αV -class integrins crosstalk with $\alpha 5\beta 1$ integrins *via* RhoA/ROCK/myosin-II and Arp2/3-mediated signalling pathways. The observed crosstalk induces the clustering of $\alpha 5\beta 1$ integrins and eventually matures adhesion. Our data suggests that this dual role of the two integrin classes, i.e. initial competition to bind fibronectin and their subsequent crosstalk, enables $\alpha 5\beta 1$ and αV -class integrins to co-operate and govern the assembly focal adhesions in the mammalian cells.

In the second part of the chapter 3, we elucidate the importance of the synergy site in fibronectin and the subsequent crosstalk between αV -class and $\alpha 5\beta 1$ integrins in adhesion maturation. Adjacent to the RGD site is the so-called synergy site that additionally interacts with the $\alpha 5$ -subunit of $\alpha 5\beta 1$ integrins and not with the αV -class integrins. In this work, genetic studies on mice were complemented with the AFM based SCFS studies. The SCFS was employed to determine the binding probability of the $\alpha 5\beta 1$ and αV -class integrins for the fibronectin, which was isolated from mice with or without the synergy site-mutation. The results revealed that the

initial binding of $\alpha 5\beta 1$ to fibronectin (on-rate) occurs in a synergy site-independent manner, whereas the formation of strengthened bonds with fibronectin (off-rate) was synergy site-dependent.

Further, chapter 4 gives insights into the much-debated topic in the field of integrin activation wherein the synergistical roles of the two-key players, talin and kindlin, are still unclear. Talin and kindlin contribute to integrin activation and signalling, however it is unclear to what extent and how. AFM based SCFS was employed to determine the fibronectin-adhesion exhibited by the fibroblasts in the absence of talin and kindlin. Therefore, we used engineered talin null and kindlin null fibroblasts and compared their fibronectin-adhesion to the control parental fibroblasts. Our results revealed the importance of kindlin during adhesion initiation and contributed the mechanistic insights into the synergy of talin and kindlin in adhesion initiation.

The last part of this thesis discusses the contribution of this work to the field of integrin-mediated cell adhesion and paves the path to hypothesize the possible future projects.

Briefly, all the studies described in this thesis comprise the interaction of αV -class and $\alpha 5\beta 1$ integrins with their ligand in the mouse kidney fibroblasts that appears to be a basic cellular mechanism to assemble focal adhesions to the extracellular matrix. We believe that these studies contribute to the research in the cellular processes including growth, differentiation and therapeutics.

Zusammenfassung

Eukaryotische Zellen besitzen eine Fülle von Transmembranproteinen an ihrer Oberfläche, welche zur Interaktion mit der komponentenreichen Umwelt dienen. In einer homöostatischen Zelle sind diese Interaktionen spezifisch und stark reguliert, um Prozesse, wie Zelladhäsion, -migration und -proliferation zu ermöglichen.

Zelladhäsion hat eine zentrale Aufgabe in der Entwicklung und systematischen Funktion eines Organismus. Durch Jahrzehnte lange Forschung, wurden viele Meilensteine der Adhäsionsbiologie erreicht. Jedoch führt ein dadurch erreichtes tieferes Verständnis immer zu neuen Fragestellungen, was zukünftige Forschung in diesem Feld erforderlich macht und machen wird. Die in dieser Arbeit vorgestellte Forschung hat einschlägige Fragestellungen im Feld der Zelladhäsion bearbeitet.

Die Adhäsionsuntersuchung einzelner Zellen ist ein vielgenutztes Werkzeug, um zelluläre Adhäsion zu untersuchen. Diese Untersuchungen wurden an einer Vielzahl von Zellphänotypen durchgeführt. Um die Adhäsionsinitiierung zu untersuchen, wurden Messungen mit runden Zellen durchgeführt, während für Adhäsionsreifung abgeflachte, adhärierende Zellen verwendet wurden.

Das erste Kapitel dieser Dissertation berichtet von unserem Beitrag zu der technischen Weiterentwicklung der Rasterkraftmikroskopie (RKFM) basierten Adhäsionsuntersuchungen an einzelnen Zellen. Es werden Vorteile und Limitationen der RKFM basierten Adhäsionsuntersuchung an runden und abgeflachten Zellen aufgezählt. Im zweiten Teil des Kapitels wird eine neue Methode vorgestellt, welche durch die Verwendung eines RKFMs Adhäsion und Traktion von Zellen gleichzeitig charakterisiert. Adhärenente Zellen können Adhäsion und Traktion mechanisch wahrnehmen, generieren und regulieren. Durch Adhäsionsmessungen einzelner Zellen mittels Einzelzellkraftspektroskopie (SCFS) in Kombination mit Traktionskraft-Mikroskopie werden Informationen über die Korrelation von Adhäsions- und Traktionskräfte während der Adhäsionsformation gewonnen. Dies betrifft insbesondere die lebende Zelle im Kontakt mit der extrazellulären Matrix (ECM) und/oder einer anderen Zelle.

Die nächsten Kapitel sind auf die Rolle von Integrinen bei der Regulation der Zelladhäsion fokussiert. Integrine sind Teil der wichtigsten Adhäsionsmoleküle, welche eine Verankerung der Zelle ermöglichen und dabei Signale über die Plasmamembran vermitteln. Sie erlauben es, der Zelle mit anderen Zellen und der extrazellulären Umgebung zu interagieren. Integrine binden unterschiedliche extrazelluläre Matrixproteine, wie Fibronectin, Kollagen oder

Laminin, mit hoher Affinität und Spezifität. Das spezifische Binden eines Liganden durch Integrine initiiert Signal-transduktionskaskaden, die Zelladhäsion fördern. Integrine vermitteln bi-direktionale Signale, von intra- nach extrazellulär und umgekehrt. Spezifische Integrine können nicht nur mehrere extrazelluläre Matrixproteine binden, sondern ein spezifischer Ligand kann durch unterschiedliche Integrine gebunden werden. Diese Komplexität der Integrin-vermittelten Adhäsion beeinflusst die Integrin-Spezifität zu der extrazellulären Matrix und die Funktionsweise anderer Integrine, die an die gleichen extrazellulären Matrixproteine binden. Dies wird als Integrin-Crosstalk bezeichnet. Wie Integrin-Typen, welche das gleiche (oder ein unterschiedliches) extrazelluläres Matrixprotein binden, interagieren und die Funktionsweise weiterer Integrin-Typen regulieren, ist noch nicht vollständig verstanden.

In dieser Studie haben wir die Rolle der $\alpha 5\beta 1$ Integrine und der Klasse der αV -Integrine in der Zelladhäsion und deren Crosstalk während der initialen Adhäsionsbildung und der Adhäsionsreifung untersucht (Kapitel 3). Im ersten Teil dieses Kapitels untersuchten wir, wie $\alpha 5\beta 1$ und die Klasse der αV -Integrine das abundante, extrazelluläre Matrixprotein Fibronectin binden und die Adhäsion von Fibroblasten in frühen Phasen der Anhaftung (<120 s) regulieren. Durch die Kombination von SCFS mit verschiedenen optischen Mikroskopietechniken, haben wir die frühe Adhäsionsbildung von modifizierten Maus-Fibroblasten, welche $\alpha 5\beta 1$ und/oder die Klasse der αV -Integrine exprimierten, quantifiziert. Wir beobachteten Integrin-abhängige Adhäsion, wobei die Fibronectin-bindenden Integrinklassen während der Adhäsionsinitiierung unterschiedlich ausgeprägte Adhäsionsprofile aufzeigen. Durch das Quantifizieren von Bindungswahrscheinlichkeiten der einzelnen Integrinklassen haben wir herausgefunden, dass $\alpha 5\beta 1$ und die Klasse der αV -Integrinen anfänglich um die Bindung an die RGD-Domäne des Fibronectins konkurrieren. Die αV -Integrine dominieren in dieser Hinsicht. Nach der Aktivierung der Klasse der αV -Integrine, verstärken Fibroblasten ihre Adhäsion deutlich. Unsere Studie zeigt, dass nach dem Binden von Fibronectin, die Klasse der αV -Integrine Signale an $\alpha 5\beta 1$ Integrine sendet, um neue Adhäsionspunkte zu bilden. Dies verstärkt die Adhäsion zusätzlich. Überraschenderweise erfolgt die Regulation quer durch die Zelle, wobei $\alpha 5\beta 1$ Integrine zusätzliche, von der Klasse der αV -Integrinen entfernte Adhäsionspunkte bilden. Dies ist der Crosstalk. Weiterhin untersuchten wir die Rolle von Signalverläufen in dem beobachteten Crosstalk. Die Integrin-vermittelten Signalkaskaden sind aus einer Vielzahl von Integrin-assoziierten Proteinen zusammengesetzt. Wir fanden heraus, dass die Klasse der αV -mit $\alpha 5\beta 1$ Integrinen durch RhoA/ROCK/myosin-II und Arp2/3-vermittelten Signalwege kommunizieren. Der beobachtete Crosstalk induziert $\alpha 5\beta 1$ Integrin Clustering und führt schlussendlich zu vollständig ausgebildeten Adhäsionspunkten. Unsere Daten legen nahe, dass die anfängliche Konkurrenz um den Liganden und dem darauffolgenden Crosstalk zwischen der Klasse der αV - und $\alpha 5\beta 1$ Integrinen, beide Integrinklassen dazu befähigt bei der Bildung von fokalen Adhäsionen zu kooperieren und sie dadurch zu regulieren.

Im zweiten Teil des dritten Kapitels untersuchen wir die Rolle der sogenannten synergetischen Bindungsstelle in Fibronectin und dem folgenden Crosstalk zwischen der Klasse der α V- und α 5 β 1 Integrinen während der Adhäsionsreifung. Die synergetische Bindungsstelle, welche zusätzlich mit der α 5-Untereinheit der α 5 β 1 Integrine interagiert aber nicht mit der Gruppe von α V-Integrinen, grenzt an die RGD-Bindungsstelle an. In dieser Arbeit wurden Gen-Studien an Mäusen um Resultate mit RKFM-basierenden SCFS Experimenten ergänzt. SCFS wurde eingesetzt, um die Bindungswahrscheinlichkeiten der Integrine zu Fibronectin mit oder ohne Punktmutation in der synergetischen Bindungsstelle zu bestimmen. Die Resultate zeigten, dass das anfängliche Binden von α 5 β 1 Integrinen (Bindungsrate) unabhängig von der synergetischen Bindungsstelle ist, während die Bildung von verstärkten Fibronectinbindungen (Dissoziationsrate) von dieser synergetischen Stelle abhängig ist.

Das vierte Kapitel gibt einen Einblick in ein viel diskutiertes Thema im Feld der Integrinaktivierung, in welchem die synergetische Rolle von zwei Hauptakteuren, Talin und Kindlin, noch immer unklar ist. Talin und Kindlin sind beide an der Integrinaktivierung und der Signaltransduktion beteiligt. Es ist jedoch unbekannt, wie und in welchem Ausmaß sie beitragen. RKFM-basierende SCFS wurde verwendet, um die Adhäsion von Fibroblasten, in denen Talin und Kindlin nicht vorhanden sind, zu bestimmen. Dazu benutzten wir genetisch modifizierte Fibroblasten, welche kein Talin oder Kindlin exprimieren und verglichen deren Adhäsion an Fibronectin mit der Adhäsion der parentalen Fibroblasten. Unsere Resultate zeigen die Bedeutung von Kindlin während der Adhäsionsinitiierung und leisten einen Beitrag zum mechanistischen Verständnis der Synergie zwischen Kindlin und Talin in der Adhäsionsinitiierung.

Der letzte Teil dieser Arbeit diskutiert den Beitrag, den diese Arbeit für das Feld der Integrin vermittelten Adhäsion geleistet hat und ebnet den Weg für Hypothesen über mögliche zukünftige Projekte.

Alle in dieser Dissertation beschriebenen Studien beinhalten die Interaktionen der Klasse der α V- und α 5 β 1 Integrinen mit deren Liganden in Fibroblasten, welche ein grundlegender zellulärer Mechanismus zu sein scheint, um fokale Adhäsionspunkte zu der extrazellulären Matrix zu bilden. Wir glauben, dass diese Studien dazu beitragen zelluläre Prozesse (Wachstum, Differentiation, etc.) unter anderem auch in Hinsicht auf Therapeutik besser zu verstehen.