



TRPM7: Ca²⁺ Signaling, Actomyosin Remodeling and Metastasis

J.P.D. Visser

Elke cel communiceert met zijn omgeving. Dit geldt zowel voor een individuele cel als voor cellen die onderdeel uitmaken van een weefsel. Net zoals in de huidige maatschappij zijn goede (lees: de juiste) communicatievaardigheden essentieel om te overleven. Communicatie op cellulair niveau omvat het ontvangen en verwerken van een enorm divers scala van signalen (bijv. groeihormonen, neurotransmitters, mechanische krachten, temperatuur) die afkomstig zijn van buiten de cel. Cellen zijn daarom uitgerust met een uitgebreid pakket aan receptoren, ion kanalen, enzymen, structurele eiwitten en “second messengers” (boodschappers). Cellen produceren zelf ook signalen die vervolgens de omgeving beïnvloeden en vorm geven, zoals de generatie van mechanische krachten door middel van het actomyosine cytoskelet. Elke cel in elke willekeurige omgeving wordt echter ook aan mechanische krachten blootgesteld van buitenaf door fysieke interacties met de extracellulaire matrix (ECM). De balans tussen de interacties die cellen hebben met hun omgeving zijn zeer dynamisch en worden scherp gecontroleerd om de functie en structuur van weefsels te behouden. Als deze balans wordt verstoord en de controle- en reparatiemechanismen niet goed functioneren kunnen er ziektes ontstaan. Een klassiek voorbeeld hiervan is kanker.

Celcommunicatie wordt bepaald door receptoren en signaaltransductoren op de plasmamembraan die reageren op een extracellulaire stimulus. Ion kanalen zijn een belangrijke groep van signaaltransductoren die ionen zoals calcium (Ca^{2+}), magnesium (Mg^{2+}), natrium (Na^+) en kalium (K^+) over de plasmamembraan brengen. Deze ionstromen reguleren verscheidene essentiële celprocessen en ze zijn cruciaal voor celcommunicatie. Ionen fungeren bijvoorbeeld als second messengers die extracellulaire signalen doorgeven in de cel en daarmee de cel in staat stelt om te reageren op en zich aan te passen aan zijn omgeving.

TRPM7 is een uniek ion kanaal, omdat het ook een functioneel enzymatisch domein (α -kinase) bevat; er zijn slechts twee andere ion kanalen bekend met een vergelijkbare eigenschap, TRPM6 en TRPM2. Alhoewel er een diversiteit aan mogelijke regulatiemechanismen, ionselectiviteit (vnl. Ca^{2+} en Mg^{2+}) en signaleringsroutes zijn beschreven voor TRPM7 is de specifieke functie van TRPM7 grotendeels onbekend. Tevens is zijn mogelijke rol in verschillende aandoeningen slecht omschreven. In dit proefschrift hebben wij ons gericht op verschillende aspecten van de signaleringsfunctie van TRPM7 door gebruik te maken van een combinatie van biofysische en celbiologische technieken. De nadruk lag hierbij op celadhesie, het actomyosine cytoskelet en Ca^{2+} signalen en de mogelijke rol van TRPM7 in kanker.

In hoofdstukken 2 en 3 leveren wij het eerste *in vivo* bewijs dat TRPM7 (expressie) bijdraagt aan het ontstaan van metastasen (“uitzaaiingen”) in twee typen kanker, borstkanker en neuroblastoma. Borstkanker cellen waarvan we de TRPM7 expressie kunstmatig hebben verlaagd, groeien minder vaak uit als metastase nadat ze zijn ingespoten in de bloedbaan van muizen. Na het inspuiten van neuroblastoma cellen met kunstmatig verhoogde TRPM7 expressie zien we juist meer metastasen in vergelijking met de controle cellen. In overeenkomst hiermee vinden wij dat het TRPM7 expressie niveau in primaire borstkanker tumoren correleert met de overlevingskansen van borstkanker patiënten in twee onafhankelijke patiëntengroepen, waarbij hogere expressie overeenkomt met een slechtere prognose en een hogere kans op het ontstaan van of de terugkeer van metastasen. In neuroblastoma vinden we deze correlatie echter niet en vervolgonderzoeken zullen daarom aan moeten tonen hoe algemeen TRPM7 is betrokken in verschillende kankertypen.

De grote vraag is uiteraard hoe TRPM7 tumorcellen aggressiever maakt en het ontstaan van metastases bevordert. Onze gedetailleerde analyses wijzen op verschillende manieren uit dat TRPM7 de deling van tumorcellen

en de groei van tumoren niet bevordert. Er zijn echter meerdere eigenschappen die de aggressiviteit van tumor cellen bepalen en celadhesie en celmigratie zijn enorm belangrijk gedurende de verschillende fasen van metastasering. Wij laten door middel van biochemische- en celbiologische technieken zien dat de migratie en beweeglijkheid van zeer invasieve en aggresieve borstkanker cellen sterk vermindert door het verlagen van TRPM7 expressie. Slecht hechtende en migrerende controle neuroblastoma cellen, hechten ('adheren') en migreren daarentegen juist veel beter na het verhogen van de TRPM7 expressie. In beide gevallen zien we ook een duidelijk effect op celadhesie structuren en de contractiliteit van het actomyosine cytoskelet (hogere TRPM7 expressie betekent hogere contractiliteit), welke in de wetenschappelijke literatuur duidelijk zijn gelinked aan de aggressiviteit van kanker en het ontstaan van metastasen. Onze resultaten suggereren dat TRPM7 de migratie van tumor cellen en het ontstaan van metastasen bevordert door het reguleren van het actomyosine cytoskelet en celadhesie structuren.

TRPM7 kan celadhesie en het actomyosine cytoskelet in potentie op verschillende manieren reguleren, namelijk door het faciliteren van ionstromen (m.n. Ca^{2+} en Mg^{2+}), door middel van enzymatische reacties (kinase-functie) of door interacties met andere eiwitten. In hoofdstuk 5 hebben we de bijdrage van globale, en in het bijzonder, lokale Ca^{2+} stromen door het TRPM7 kanaal uitvoerig getest door gebruik te maken van geavanceerde microscopie (TIRF) en het ontwikkelen van beeldanalyse routines. We laten zien dat TRPM7 inderdaad lokale en frequente Ca^{2+} signalen genereert, maar deze verschijnen niet specifiek bij celadhesie structuren en hebben ook geen effect op de formatie of afbraak hiervan. Aangezien ook andere TRPM7-gerelateerde Ca^{2+} signalen geen invloed hebben, moeten we onze initiële veronderstelling herzien en stellen dat Ca^{2+} stromen door het TRPM7 kanaal geen dominante factor zijn in hoe TRPM7 het actomyosine cytoskelet en celadhesie structuren reguleert. In hoofdstuk 3 tonen we daarentegen aan dat TRPM7 onderdeel is van een complex dat grotendeels bestaat uit componenten van het actomyosine cytoskelet. Het overgrote deel hiervan zijn bekende regulatoren van de contractiliteit van het actomyosine cytoskelet en de formatie van celadhesie structuren. In aanvulling op onze andere gegevens, correleren de expressie niveaus van meerdere eiwitten met de overlevingskansen van neuroblastoma patiënten in twee onafhankelijke patiëntengroepen. Samenvattend suggereren onze resultaten dat TRPM7 celadhesie en het actomyosine cytoskelet reguleert door te functioneren als een 'scaffold' (lees: door een complex te formeren). Welke interacties daarbij van belang zijn is een aandachtspunt voor verder onderzoek.

In hoofdstuk 4 hebben we uiteindelijk de signaleringsroutes onderzocht die de activatie van TRPM7 reguleren, met een nadruk op Ca^{2+} stromen en de lipide PIP_2 . We dragen bewijs aan voor een voorname en essentiële rol voor het Ca^{2+} -gevoelige eiwit $\text{PLC}\delta_1$ en de afbraak van PIP_2 om TRPM7 te activeren en voor langere tijd geactiveerd te houden. TRPM7 reguleert echter ook de activiteit $\text{PLC}\delta_1$ en daardoor de PIP_2 niveaus, waarmee we een nieuwe TRPM7-gerelateerde signaleringsroute hebben ontrafeld.