

Abstract

The anthrax toxin receptors (ANTXR1/2) are well known for their role in the internalization of the anthrax toxin, but information on the physiological function is limited. Earlier reports suggested a direct interaction of both receptors with collagen VI. The C5 domain of the collagen VI $\alpha 3$ chain was reported to directly bind to ANTXR1 and, when released as a matrikine (termed as endotrophin), to promote tumor aggressiveness, inflammation, fibrosis, and metabolic dysfunction. In this thesis, the functional relationship between the anthrax toxin receptors and collagen VI, with emphasis on the role of the C5 domain, was studied. SPR assays using recombinant C5 showed no binding to the VWA domains of the receptors, while the anthrax toxin component protective antigen (PA) bound. Assays based on cultured cells overexpressing both anthrax toxin receptors showed a strong retention of PA on the cell surface, but not of C5. Physiologically assembled collagen VI tetramers, endogenously released fragments including endotrophin, and microfibrils of collagen VI showed no interaction with either anthrax toxin receptor, while the cell surface receptor NG2 was able to retain collagen VI at the cell surface when overexpressed in cell culture. The nature of the endotrophin receptor remains unclear, as NG2 could not bind the C5 domain alone. These findings challenge previous results that indicate the anthrax toxin receptors as bona fide collagen VI receptors. However, pathological conditions occurring upon loss of either receptor suggest a role in the regulation of collagen VI and the overall ECM. To further study the physiological relevance of the receptor, ANTXR1 deficient fibroblasts were generated by use of the CRISPR/Cas system. A mass spectrometry based secretome analysis, confirmed by qPCR and immunoblotting, showed a downregulation of matrisome proteins and an upregulation of proteins associated with the inflammatory response. Further experiments revealed that upon loss of ANTXR1, cells enter a state of cellular senescence and secrete proinflammatory factors of the senescence associated secretory phenotype (SASP). Interestingly, ANTXR1 deficient patients develop the GAPO syndrome, characterized by growth retardation, alopecia, pseudoanodontia, and optical atrophy, due to alterations in the ECM. The observed senescence phenotype is likely to be the driver of this ECM dysregulation. Studies on the nuclear structure of ANTXR1 deficient cells showed a weakening of the nuclear lamina, which is likely to lead to prolonged DNA damage and genomic instability. It therefore serves as a stimulus to trigger the program of cellular senescence and secretion of the SASP factors by activating the NF- κ B pathway. Fibroblasts derived from two ANTXR1 deficient GAPO patients were studied and the senescence phenotype and the loss of nuclear integrity was confirmed. Thus, the results point to a need to reassess the GAPO syndrome and consider it as a progeroid disease. This understanding indicates the possibilities for new therapeutic approaches for GAPO patients.

Zusammenfassung

Die Anthrax-Toxin-Rezeptoren (ANTXR1/2) sind für die Internalisierung des Anthrax-Toxins verantwortlich, allerdings ist die physiologische Funktion der beiden Rezeptoren weitgehend unbekannt. Frühere Studien deuten auf eine direkte Interaktion beider Rezeptoren mit Kollagen VI hin. Es wurde berichtet, dass die C5-Domäne von Kollagen VI direkt an ANTXR1 bindet und, wenn sie als Matrikin (Endotrophin) freigesetzt wird, die Aggressivität von Tumoren, sowie Entzündungen, Fibrose und Störungen des Stoffwechsels fördert. In dieser Arbeit wurde die Interaktion zwischen den Anthrax-Toxin-Rezeptoren und Kollagen VI unter besonderer Berücksichtigung der C5-Domäne untersucht. SPR Studien mit rekombinantem C5 zeigten keine Bindung an die VWA-Domäne beider Rezeptoren, während die Anthrax-Toxin-Komponente Protektives Antigen (PA), wie in früheren Studien bereits gezeigt, gebunden wurde. Zellkulturbasierte Experimente, bei denen beide Anthrax-Toxin-Rezeptoren überexprimiert wurden, zeigten eine starke Bindung von PA an die Zelloberfläche, nicht jedoch von C5. Physiologische assemblierte Kollagen VI-Tetramere, endogen freigesetzte Fragmente einschließlich Endotrophin, sowie abgelagerte Mikrofibrillen konnten an keinen der beiden Anthrax-Toxin-Rezeptoren binden, während der Zelloberflächenrezeptor NG2 bei Überexpression in zellkulturbasierten Experimenten Kollagen VI an der Zelloberfläche binden konnte. Da NG2 nicht an die einzelne C5-Domäne binden konnte, bleibt ein Rezeptor für Endotrophin weiterhin unbekannt. Die erhobenen Daten widersprechen früheren Ergebnissen, dass die Anthrax-Toxin-Rezeptoren direkte Kollagen VI-Rezeptoren sind. Die Veränderungen, die durch den Verlust eines der ANTXR entstehen, deuten jedoch auf eine Rolle bei der Regulierung von Kollagen VI und der ECM hin. Zur weiteren Untersuchung der physiologischen Relevanz des Rezeptors, wurden mit Hilfe des CRISPR/Cas-Systems ANTXR1-defiziente Fibroblasten erzeugt. Eine auf Massenspektrometrie basierende Sekretomanalyse, die durch qPCR und quantitative Immunoblots bestätigt wurde, zeigte eine Herabregulierung mehrerer Matrisom-assoziiierter Proteine und eine Hochregulierung von Proteinen, die mit Entzündungsreaktionen assoziiert werden. Die anschließende Untersuchung mehrerer Biomarker ergab, dass Zellen nach dem Verlust von ANTXR1 in den Zustand der zellulären Seneszenz eintreten und entzündungsfördernde Faktoren des Seneszenz-assoziierten sekretorischen Phänotyps (SASP) sekretieren. Der durch Seneszenz induzierte SASP und die Dysregulation von Matrisom-Komponenten könnten die Veränderung der ECM-Homöostase bei ANTXR1-defizienten Patienten erklären, die zur Entwicklung des GAPO-Syndroms führt, welches durch Wachstumsbeeinträchtigung, Alopezie, Pseudoanodontia und einer Atrophie des Sehapparats charakterisiert wird. Untersuchungen der Struktur der Zellkerne von ANTXR1-defizienten Zellen ergaben eine Schwächung der Kern-Lamina, die wahrscheinlich zu einer andauernden DNA-Schädigung und genomischer Instabilität führt und somit das Eintreten von Zellen in die Seneszenz sowie die Sekretion der SASP-Faktoren durch Aktivierung des

NF- κ B-Signalwegs erklären könnte. Fibroblasten von zwei ANTXR1-defizienten GAPO-Patienten wurden untersucht und der Seneszenz-Phänotyp und der Verlust der Kernintegrität konnten bestätigt werden. Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse ermöglichen eine Neubewertung des GAPO-Syndroms als progeroide Erkrankung. Dieses Verständnis eröffnet Möglichkeiten für neue therapeutische Ansätze für GAPO-Patienten.