

Povzetek

Trop-2 (angl. Trophoblast-specific surface antigen 2) je transmembranski glikoprotein, katerega izražanje je povišano med embriogenezo in pri malignih tvorbah. Zaradi slednjega je Trop-2 potencialna tarča tumorske terapije, kakršna je že uveljavljena pri sorodni molekuli EpCAM. Cilj naših raziskav sta bili strukturna in biokemijska karakterizacija Trop-2, s čimer smo želeli osvetliti podobnosti in razlike med Trop-2 in EpCAM.

Zaradi kompleksnosti preučevanja transmembranskih molekul smo multidomenski zunajcelični del (zgrajen iz N-končne, tiroglobulinske in C-končne domene) in citosolni del Trop-2 obravnavali ločeno. V okviru raziskav zunajceličnega dela smo optimirali postopek izražanja njegove rekombinantne oblike. Ugotovili smo, da zunajcelični del Trop-2 pri fiziološkem pH tvori dimer, pri povišanem pH pa tvori različne agregate. Primerjalna analiza termične stabilnosti zunajceličnih delov Trop-2 z EpCAM je pokazala, da je stabilnost slednjega znatno nižja, pri čemer drugačno obnašanje pripisujemo razlikam v zaporedju N- in C-končne domene. V nadaljevanju smo še pokazali, da se inzulinu podobni rastni faktor 1 (IGF-1) veže tako na monomerno kot tudi dimerno obliko zunajceličnega dela Trop-2.

Pripravili smo kristale zunajceličnega dela Trop-2 ter posneli več setov difrakcijskih podatkov kristalov zunajcelične oblike Trop-2, ki so sipali rentgensko svetlobo do najvišje ločljivosti 2,94 Å. Z metodo molekularne zamenjave smo določili strukturo zunajceličnega dela Trop-2, pri čemer se nekaterih gibljivih delov molekule (predvsem na predelu N-končne domene) ne da zanesljivo zgraditi zaradi šibke elektronske gostote.

V okviru karakterizacije citosolnega dela Trop-2 smo preučili strukturni vpliv fiziološko pomembne fosforilacije na mestu Ser³⁰³. Citosolni del je v fizioloških razmerah nestrukturiran, za podrobnejše strukturne študije pa smo topilu dodali 2,2,2-trifluoroetanol, ki ustvarja razmere, podobne tistim na medproteinskih stikih. Z uporabo slednjega smo določili NMR-strukturo nefosforilirane in fosforilirane oblike citosolnega dela. Nefosforiliran citosolni del ima obliko črke L (daljši krak predstavlja α -vijačnica, krajšega pa 3_{10} -vijačnica), ob fosforilaciji pa pride do znatnih strukturnih sprememb: spremeni se oblika molekule (v upognjeno palico), zraven tega pa smo opazili tudi konformacijsko spremembo prolinskega ostanka iz *trans*- v *cis*-obliko.

Naši rezultati pomembno prispevajo k razumevanju zgradbe in delovanja Trop-2, hkrati pa predstavljajo dobro osnovo za nadaljnje raziskave v smislu karakterizacije vezave z drugimi molekulami.

Ključne besede

Trop-2, dimerizacija, kristalizacija, termična stabilnost, fosforilacija