

Interakcije EpCAM kot determinante signaliziranja preko regulirane proteolize

Povzetek

EpCAM je dimerni transmembranski protein tipa I, ki je pomemben za normalen potek embrionalnega razvoja in vzdrževanje integritete črevesnega epitelija v razvijajočih in odraslih organizmih. Njegovo izražanje je pogosto povečano pri številnih karcinomih, zato služi kot pomemben tumorski označevalec in terapevtska tarča. Začetni eksperimenti so nakazovali, da EpCAM deluje kot celična adhezijska molekula, vendar so kasnejše študije to spoznanje ovrgle, v ospredje raziskovanja pa je prišla njegova signalna vloga. EpCAM je udeležen v več signalnih poteh, med katerimi je najpomembnejša z RIP aktivirana

Wnt/ β -kateninska signalna pot, ki je odgovorna za večino onkogenih učinkov EpCAM, kot so povečana proliferacija, migracija in invazija. RIP se začne s cepitvijo ektodomene EpCAM (EpEX) s proteazama TACE ali BACE1, čemur sledi znotrajmembransko proteolitično procesiranje z γ -sekretazo in sprostitvev znotrajceličnega dela EpCAM (EpICD), ki sodeluje v jedrnem signaliziranju in induciranju izražanja proteinov, ki so povezani s signalno potjo. Cepitev EpEX je ključni korak za začetek RIP, vendar dejavniki, ki vplivajo na ta proces, niso dobro poznani. Namen doktorskega dela je bil raziskati dva izmed teh potencialnih dejavnikov: oligomerno stanje EpCAM in njegove potencialne interakcijske partnerje.

EpCAM obstaja v dimerni obliki, pri čemer poglavitno dimerizacijsko površino tvorijo podenote EpEX, ki sicer dimerizirajo tudi same po sebi brez preostalega dela EpCAM. Cepitvena mesta proteaz TACE in BACE1, ki sta odgovorni za cepitev EpEX, se nahajajo znotraj njegove dimerizacijske površine, zaradi česar so v dimernem stanju EpCAM proteazam nedostopna. Za uspešno cepitev mora dimer EpCAM disociirati na monomerne podenote, kar smo dokazali s poskusom cepitve izoliranega monomernega in kovalentno povezanega dimernega mutanta EpEX z ektodomeno TACE. Izkazalo se je, da oligomerno stanje EpEX odločilno vpliva na njegovo cepitev, saj je za cepitev z ektodomeno TACE dovzetna izključno monomerna oblika EpEX.

Poleg vpliva oligomernega stanja EpCAM na cepitev EpEX smo preučili še morebiten vpliv njegovih potencialnih interakcijskih partnerjev, pri čemer smo se osredotočili na interakcijske partnerje samega EpEX, saj ta predstavlja poglavitni del površine EpCAM. Eksperiment smo razdelili na dva dela.

V prvem delu smo identificirali potencialne interakcijske površine na EpEX, v drugem delu pa njegove potencialne interakcijske partnerje. Potencialne interakcijske površine smo poskusili identificirati s presejalno mutagenezo aminokislinskih ostankov na površini EpEX, s čimer smo želeli selektivno ošibiti interakcije s potencialnimi interakcijskimi partnerji, učinek zmanjšane interakcije na obsežnost cepitve pa smo preučili s kvantitativno analizo obsežnosti cepitve EpCAM s TACE ali BACE1 v celični liniji kolorektalnega karcinoma HCT8. Pri šestih od osemindvajsetih mutantov se je obsežnost cepitve EpEX statistično signifikantno razlikovala od divjega tipa, in sicer je bila pri vseh mutantih povečana. Mutirani aminokislinski ostanki,

vključeni v teh šest setov mutacij, tako predstavljajo potencialne stične površine, preko katerih se na EpCAM vežejo proteini, ki zaviralno vplivajo na cepitev EpEX. Pri tem je potrebno izpostaviti, da se kar štirje od šestih signifikantnih setov mutacij nahajajo na N-končni domeni EpEX, kar nakazuje na to, da N-končna domena morda predstavlja pomembno interakcijsko površino. Analiza cepitve mutantov EpCAM je dodatno razkrila, da sta cepitvi s TACE ali BACE1 ter matriptazo – proteazo, ki cepi EpEX znotraj tiroglobulinske zanke – medsebojno izključujoči. Ta ugotovitev je na videz protislovna, saj je z matriptazo cepljeni EpEX nezmožen dimerizirati, kar povzroči destabilizacijo dimera EpCAM in izpostavitve cepitvenih mest za proteazi TACE in BACE1, zaradi česar bi pričakovali sinergističen učinek na cepitev EpEX. Na tej točki tako ni jasno ali so opaženi pojavi posledica spremenjene interakcije EpCAM neposredno s proteazami ali so v ozadju kakšni drugi dejavniki, kot je spremenjeno razmeščanje proteinov ali lokalizacija v druge membranske domene.

Drugi del eksperimenta je vključeval identifikacijo potencialnih interakcijskih partnerjev EpCAM s testom bližnje ligacije z biotinizacijo z uporabo nespecifične biotin ligaze TurboID in masno spektrometrijo v celični liniji kolorektalnega karcinoma HCT8. V ta namen smo pripravili sistem za specifično označevanje proteinov na celični membrani, ki temelji na posredni vezavi TurboID na EpCAM po tem, ko je ta v celici že sintetiziran in premeščen na celično membrano. Takšen pristop omogoča časovno in prostorsko nadzorovano označevanje EpCAM bližnjih proteinov na celični membrani. Z eksperimentom smo pridobili nabor kandidatov interakcijskih partnerjev EpCAM, med katerimi so tudi nekateri membranski proteini, ki se vključujejo v obstoječe vedenje o vlogi EpCAM, nekateri pa odpirajo tudi nove možnosti za funkcijske raziskave, zato so potrebne nadaljnje validacijske študije.

To delo predstavlja dobro izhodišče za nadaljnje raziskave dejavnikov, ki vplivajo na cepitev EpEX in potencialno regulacijo signaliziranja EpCAM preko RIP, ter odpira vrata do temeljitejšega razumevanja vloge EpCAM v celici, predvsem z vidika njegovega pomena pri nastanku in razvoju raka.

Ključne besede: EpCAM, signaliziranje, RIP, mutageneza, interakcijske površine, interakcijski partnerji, bližnje označevanje na osnovi biotinizacije, TurboID, masna spektrometrija.