

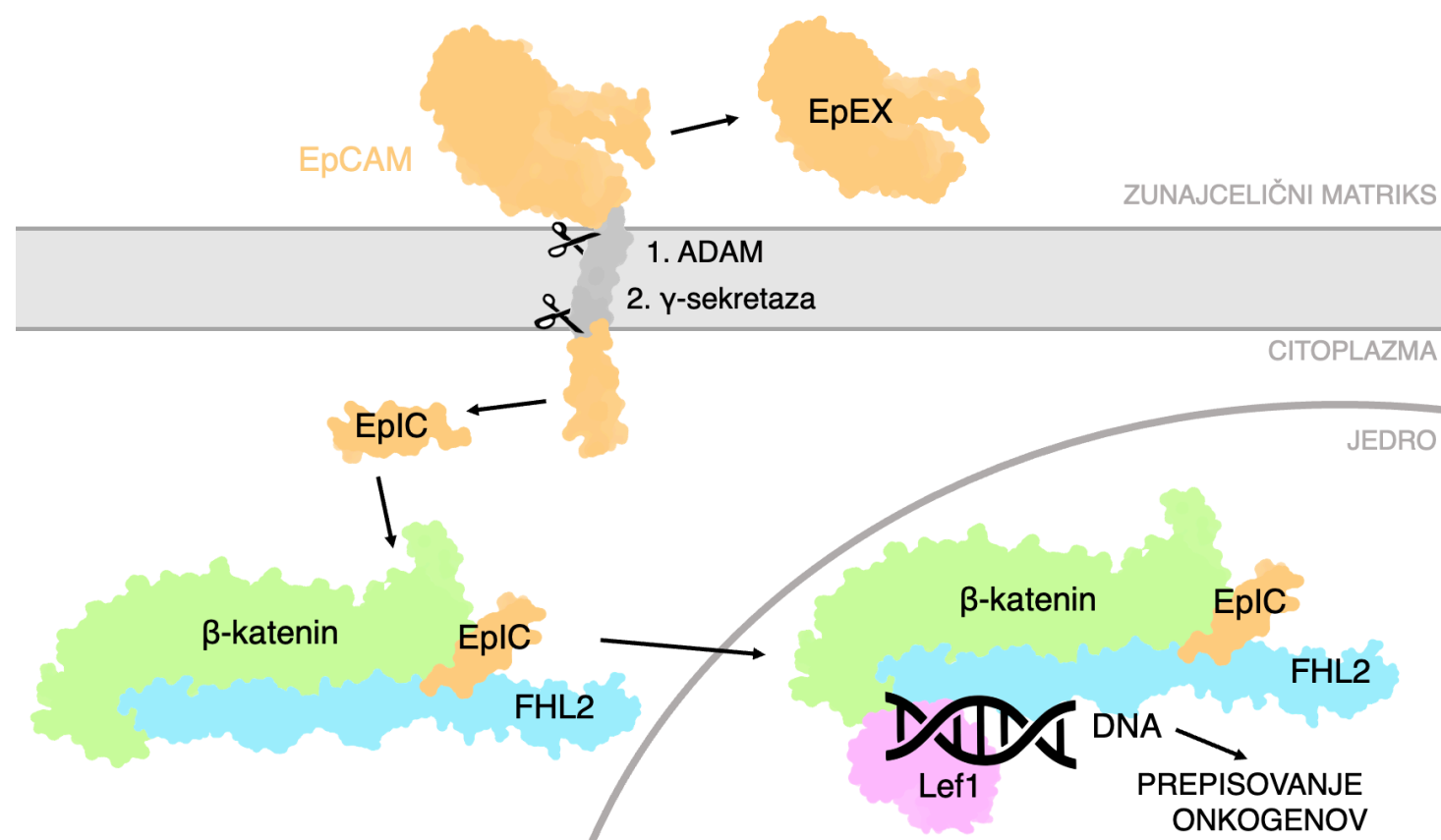
Raziskovanje strukture signalnega kompleksa FHL2:β-katenin v povezavi z EpCAM

Tina Logonder, Aljaž Gaber

Oddelek za kemijo in biokemijo, Fakulteta za kemijo in kemijsko tehnologijo, Univerza v Ljubljani
Večna pot 113, 1000 Ljubljana, Slovenija

UVOD

Epitelijska celična adhezijska molekula (**EpCAM**) je transmembranski glikoprotein pomemben pri morfogenezi epitelijskih celic in karcinogenezi epitelijskih celic. Je eden najpogostejše uporabljenih diagnostičnih označevalcev za karcinome. Po cepitvi EpCAM-a se sprosti topna znotrajcelična domena (**EpIC**: aa 289–314), ki tvori signalni kompleks s proteinoma FHL2 in β-katenin v kanonični signalni poti *Wnt*. To vodi do izražanja onkogenov in posledično proliferacije rakavih celic (slika 1). Kljub terapevtskemu interesu je strukturnih informacij o tem kompleksu malo (slika 2). Glavna omejitev dosedanjih študij je bila, da je bil FHL2 v prejšnjih raziskavah izražen kot fuzijski protein z oznako. Namen dela je **strukturna karakterizacija signalnega kompleksa FHL2:β-katenin z in brez vezanega proteina EpIC**, kar bi prineslo vpogled v mehanizem karcinogeneze proteina EpCAM in razkrilo nove tarče za zdravljenje raka.



Slika 1: Shematski prikaz signalne poti proteina EpCAM, ki se začne z regulirano znotrajmembransko proteolizo (RIP).

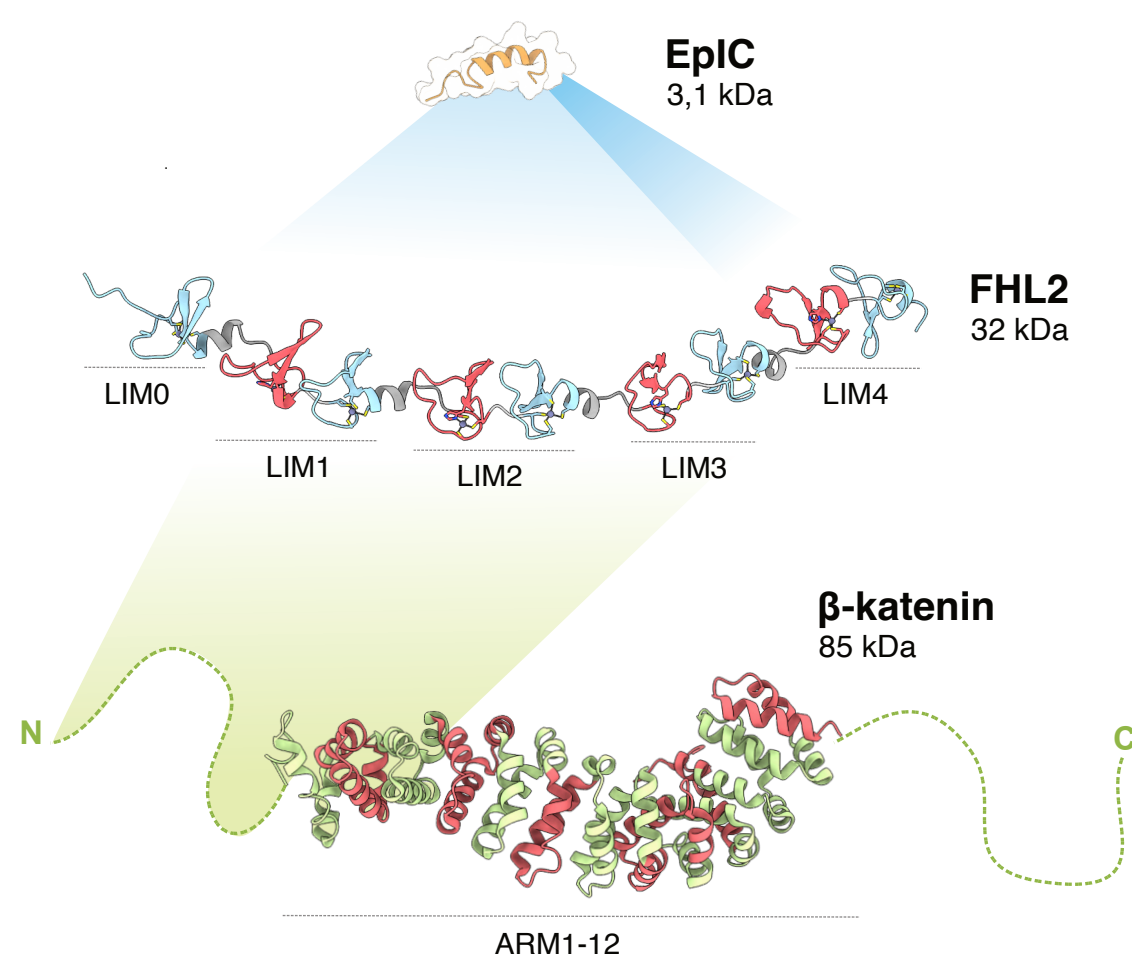
PREDHODNE RAZISKAVE

Interakcija EpIC:FHL2

Y2H, Co-IP, SEC:
• vezava EpIC-a na LIM4 FHL2
(Maetzel, 2009)

Interakcija FHL2:β-katenin

Y2H, Co-IP:
• vse štiri domene LIM (razen LIM0) nujne za vezavo na β-katenin
• vezava FHL2 na N-konec β-katenina
(Martin, 2002; Wei, 2003)

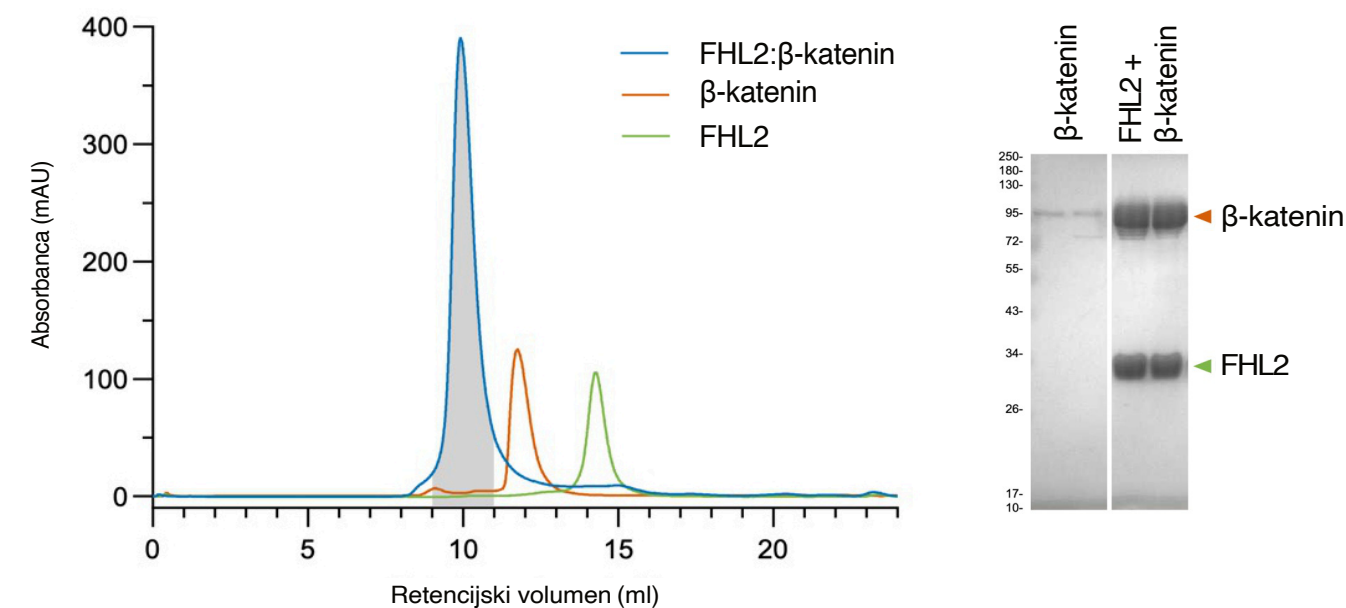


Slika 2: Shematski prikaz interakcij znotraj signalnega kompleksa EpIC:FHL2:β-katenin.

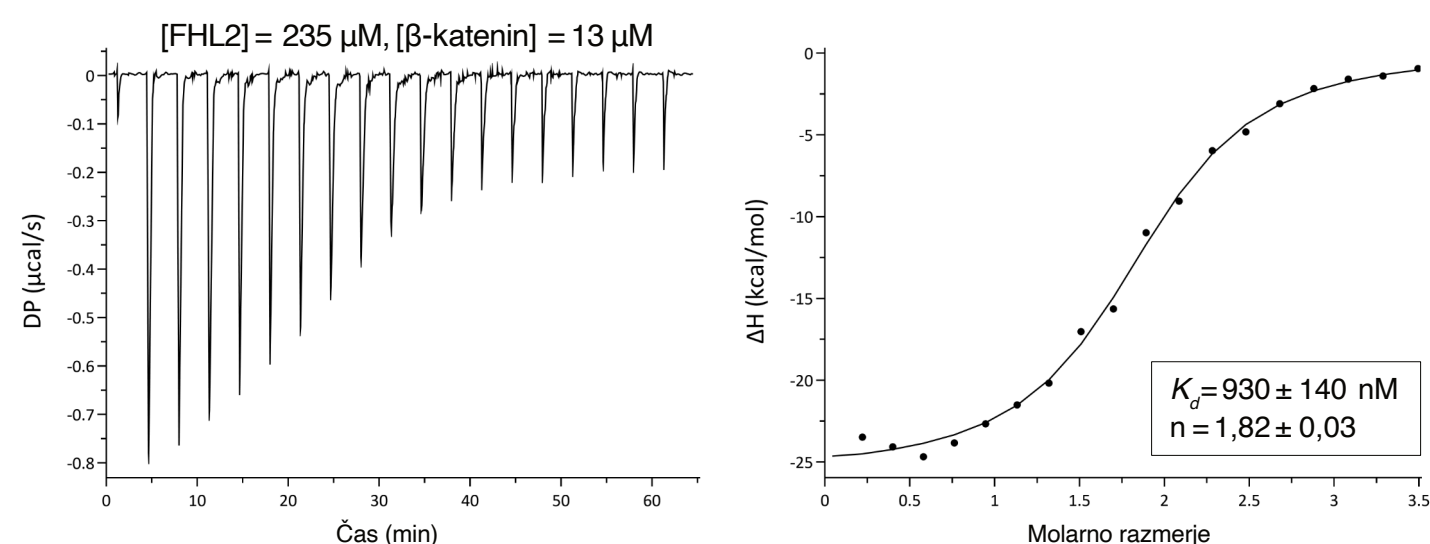
REFERENCE

- Gires, O., Pan, M., Schinke, H., Canis, M. & Baeuerle, P. A. Expression and function of epithelial cell adhesion molecule EpCAM: where are we after 40 years? *Cancer Metastasis Rev.* **39**, 969–987 (2020).
- Habibe, J. J., Clemente-Olivo, M. P. & de Vries, C. J. How (epi)genetic regulation of the LIM-domain protein FHL2 impacts multifactorial disease. *Cells* **10**, 2611 (2021).
- Shang, S., Hua, F. & Hu, Z.-W. The regulation of β-catenin activity and function in cancer: therapeutic opportunities. *Oncotarget* **8**, 33972–33989 (2017).
- Valencia, T., Hausmann, G. & Basler, K. The many faces and functions of β-catenin. *EMBO J.* **31**, 2714–2736 (2012).
- Cao, C. Y., Mok, S. W.-F., Cheng, V. W.-S. & Tsui, S. K.-W. The FHL2 regulation in the transcriptional circuitry of human cancers. *Gene* **572**, 1–7 (2015).
- Cai, T. *et al.* FHL2 promotes tubular epithelial-to-mesenchymal transition through modulating β-catenin signalling. *J. Cell. Mol. Med.* **22**, 1684–1695 (2018).
- Tretter, J. Innovative therapy modalities for solid EpCAM-positive tumors. (Ludwig-Maximilians-Universität München, 2017).
- Trzpis, M., Bremer, E., McLaughlin, P. M. J., De Leij, L. F. M. H. & Harmsen, M. C. EpCAM in morphogenesis. *Frontiers in Bioscience* **13**, (2008).
- Maetzel, D. *et al.* Nuclear signalling by tumour-associated antigen EpCAM. *Nat. Cell Biol.* **11**, 162–171 (2009).
- Martin, B. *et al.* The LIM-only protein FHL2 interacts with beta-catenin and promotes differentiation of mouse myoblasts. *J. Cell Biol.* **159**, 113–122 (2002).
- Wei, Y. *et al.* Identification of the LIM protein FHL2 as a coactivator of beta-catenin. *J. Biol. Chem.* **278**, 5188–5194 (2003).

REZULTATI



Slika 3: Analiza interakcije med proteinoma FHL2 in β-katenin z velikostno izključitveno kromatografijo. Levo: kromatogram z vzorci β-katenin + FHL2, β-katenin and FHL2. Desno: analiza frakcij, ki so na kromatogramu označene s sivo barvo, z SDS-PAGE.

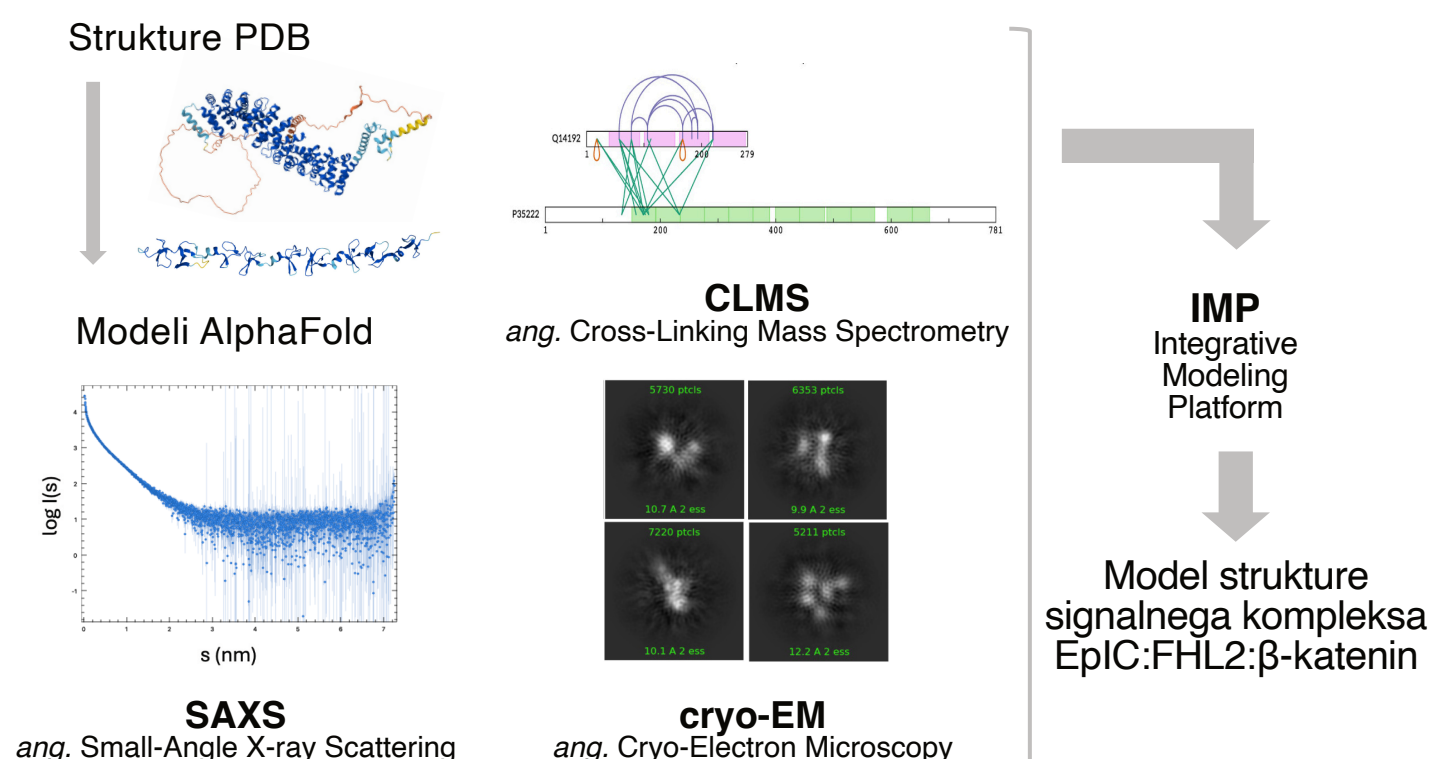


Slika 4: ITC meritve titracije FHL2 v β-katenin. Levo: graf odvisnosti diferencialne moči (DP) v odvisnosti od časa. Desno: graf po integraciji površin vrhov in normalizaciji prikazuje spremembo entalpije v odvisnosti od molarne razmerja FHL2/β-katenin.

- Prvič uspešno izražen in očiščen protein FHL2 brez oznake
- Analiza s SEC (velikostna izključitvena kromatografija): **potrjena tvorba stabilnega kompleksa FHL2:β-katenin** (slika 3)
- ITC (izotermna titracijska kalorimetrija) in SLS (statično sipanje svetlobe): **stehiometrija FHL2:β-katenin = 2:1**
- ITC: K_d v mikromolarnem območju (slika 4)

NADALJEVANJE RAZISKAVE

Določitev strukture kompleksa EpIC:FHL2:β-katenin s pristopom integrativne strukturne biologije



ZAHVALA

Delo je bilo podprto s strani Javne agencije za znanstvenoraziskovalno in inovacijsko dejavnost Republike Slovenije, raziskovalni program P1-0140 in raziskovalni projekt Z1-2637.