

## STRESZCZENIE ROZPRAWY DOKTORSKIEJ

### „Badanie proteolizy i aktywności biologicznej domeny zewnątrzkomórkowej mysiej neureguliny 2”

Autor: mgr Maria Czarnek

Promotor: prof. dr hab. Joanna Bereta

Neureguliny 1-4 to czynniki wzrostu należące do rodziny naskórkowego czynnika wzrostu (*epidermal growth factor*, EGF). Czynniki wzrostu z rodziny EGF wiążą się do błonowych receptorów ERBB o aktywności kinazy tyrozynowej. Do ERBB zalicza się cztery receptory: EGFR (znany także jako ERBB1 lub HER1 u człowieka), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) oraz ERBB4 (HER4). Neureguliny 1 oraz 2 oddziałują z receptorami ERBB3 oraz ERBB4, natomiast neureguliny 3 i 4 jedynie z ERBB4. Neureguliny uczestniczą w wielu procesach biologicznych. Są to zarówno procesy fizjologiczne, jak proliferacja i różnicowanie komórek w czasie rozwoju embrionalnego organizmu czy różnicowanie komórek sutka w czasie ciąży i ekspresja białek mleka podczas laktacji, jak i patologiczne – np. progresja nowotworów i rozwój chorób neuropsychiatrycznych.

Większość czynników wzrostu z rodziny EGF wykazuje zbliżoną budowę: na N-końcu białka zlokalizowana jest część zewnątrzkomórkowa (ektodomena), następnie domena transbłonowa oraz domena wewnątrzkomórkowa, umiejscowiona bliżej C-końca białka. Cechą charakterystyczną wszystkich ligandów ERBB jest obecność w obrębie części zewnątrzkomórkowej domeny typu EGF, która odpowiada za wiązanie do receptora i jego aktywację. Ligandy ERBB są produkowane jako błonowe prekursorzy, z których większość wymaga uwolnienia części zewnątrzkomórkowej do związania i aktywacji receptorów ERBB. Spośród wszystkich neuregulín zdecydowanie najlepiej scharakteryzowana pod względem budowy oraz aktywności biologicznej została neuregulina 1.

W niniejszej pracy podjęto próbę zbadania proteolizy oraz aktywności biologicznej mysiej neureguliny 2 (NRG2). Używając drobnocząsteczkowych inhibitorów metaloproteaz oraz inhibitorów białek BACE udowodniono, że w proteolizę zaangażowane są ADAM10 oraz BACE2. Udział ADAM10, a nie innych białek ADAM, potwierdzono poprzez badanie uwalniania domeny zewnątrzkomórkowej NRG2 w komórkach transfekowanych siRNA wyciszających ekspresję poszczególnych białek ADAM. Wykorzystując barwienie immunohistochemiczne z detekcją fluorescencyjną na skrawkach mózgu myszy udowodniono,

że istnieją komórki o jednoczesnej ekspresji BACE2 oraz NRG2, tak więc BACE2 może stanowić fizjologicznie istotną proteazę dla NRG2. Co więcej, udowodniono, że w pierwotnych mysich neuronach BACE2, obok ADAM10, może uwalniać domenę zewnątrzkomórkową NRG2.

Stosując drobnocząsteczkowe inhibitory metaloproteaz oraz elektroporację komórek mRNA Cas9 oraz sgRNA targetującym *Adam17* udowodniono także, że w komórkach pozbawionych ekspresji ADAM10 oraz BACE2 proteoliza może zachodzić z udziałem ADAM17, choć jest to proces niewydajny. Dodatkowo potwierdzono, że NRG2 podlega procesowi regulowanej proteolizy wewnątrz błonowej – zakotwiczony w błonie fragment C-końcowy, powstający po uwolnieniu domeny zewnątrzkomórkowej, stanowi substrat dla kompleksu  $\gamma$ -sekreazy.

Drugą część pracy stanowiła analiza aktywności biologicznej domeny zewnątrzkomórkowej NRG2. Aby zbadać, jak aktywacja receptorów ErbB przez NRG2 wpływa na mysie linie komórek nowotworowych, uzyskano rekombinowane domeny typu EGF dwóch izoform NRG2:  $\alpha$  i  $\beta$  oraz NRG1 $\beta$ , wykorzystując prokariotyczny system ekspresyjny. Wykazano, że żadna z izoform NRG2, w przeciwieństwie do NRG1 $\beta$ , nie wpływa znacząco na fosforylację receptorów ErbB, proliferację komórek oraz ekspresję białek proangiogennych. Natomiast w komórkach mysiego śródbłonna naczyń włosowatych mózgu (MBE) izoforma  $\alpha$  NRG2 zwiększała fosforylację receptorów ErbB; NRG2 $\beta$  oraz NRG1 $\beta$  nie wpływały na poziom fosforylacji ErbB w tych komórkach. Co więcej, jedynie stymulacja przez NRG2 $\alpha$  prowadziła do zwiększenia żywotności komórek MBE oraz nasilała ich migrację; efekty te nie występowały po stymulacji komórek ani przez NRG2 $\beta$ , ani NRG1 $\beta$ .

Podczas analizy fosforylacji ERBB w ludzkiej linii nowotworu sutka MDA-MB-468 metodą Western blotting zaobserwowano pojawienie się skróconych form fosfo-EGFR po stymulacji rekombinowanymi NRG2, przy czym nie dochodziło do zwiększenia poziomu fosforylacji EGFR pełnej długości. Stymulacja NRG1 $\beta$  natomiast prowadziła do zwiększenia poziomu fosfo-EGFR pełnej długości, oraz pojawienia się skróconych form fosfo-EGFR. Udowodniono, że skrócone formy fosfo-EGFR powstają na drodze proteolizy. Powstawanie skróconych form fosfo-EGFR mogło być zahamowane przez inhibitor proteaz serynowych AEBSF, ale nie przez inne inhibitory proteaz tej klasy (PMSF, aprotynina).

Joanna Bureta

Maria Ciolek

## Abstract

Neuregulins 1-4 belong to the epidermal growth factor (EGF) family of growth factors. Growth factors belonging to the EGF family bind to the ERBB membrane receptors possessing tyrosine kinase activity. The ERBB family includes four receptors: EGFR (also known as ERBB1 or HER1 in humans), ERBB2 (HER2), ERBB3 (HER3) and ERBB4 (HER4). Neuregulins 1 and 2 interact with ERBB3 and ERBB4 receptors, while neuregulins 3 and 4 interact only with ERBB4. Neuregulins participate in many biological processes. These include both physiological processes, such as cell proliferation and differentiation during embryonal development or differentiation of breast cells during pregnancy and expression of milk proteins during lactation, as well as pathological processes, such as cancer progression and the development of neuropsychiatric diseases.

Most growth factors belonging to the EGF family have a similar structure: the extracellular part (ectodomain) is located at the N-terminus of the protein, next is the transmembrane domain and the intracellular domain, located closer to the C-terminus of the protein. A characteristic feature of all ERBB ligands is the presence of the EGF-type domain within the extracellular part, which is responsible for binding to the receptor and its activation. ERBB ligands are produced as membrane precursors, most of which require the release of the extracellular domain to bind and activate ERBB receptors. Among all neuregulins, neuregulin 1 is by far the best characterized in terms of structure and biological activity.

In this study, I investigated the proteolysis and biological activity of murine neuregulin 2 (NRG2). Using small molecule inhibitors of metalloproteases and BACE, I proved that ADAM10 and BACE2 are involved in NRG2 proteolysis. The contribution of ADAM10 and not other ADAM proteins was confirmed by examining the release of the extracellular domain of NRG2 in cells transfected with siRNA silencing the expression of various ADAM proteins. Using immunohistochemical staining with fluorescence detection on mouse brain sections, I showed that the cells expressing BACE2 and NRG2 simultaneously exist, thus BACE2 may be a physiologically relevant protease for NRG2. Moreover, I demonstrated that in primary mouse neurons, BACE2, in addition to ADAM10, can release the extracellular domain of NRG2.

Using small-molecule inhibitors of metalloproteases and electroporation of cells with *Cas9* mRNA and *Adam17*-targeting sgRNA, I also showed that in cells devoid of ADAM10 and BACE2 expression, proteolysis may occur due to the activity of ADAM17, although it is an inefficient process. In addition, I confirmed that NRG2 is subjected to the process of regulated

intramembrane proteolysis – the C-terminal fragment anchored in the membrane, formed after the release of the extracellular domain of NRG2, is a substrate for the  $\gamma$ -secretase complex.

In the second part of the work, I studied the activity of the biological extracellular domain of NRG2. To study how activation of ErbB receptors by NRG2 affects murine tumor cell lines, I obtained recombinant EGF-like domains of two NRG2 isoforms:  $\alpha$  and  $\beta$  and NRG1 $\beta$  using a prokaryotic expression system. I showed that none of the NRG2 isoforms, in contrast to NRG1 $\beta$ , affects substantially the phosphorylation of ERBB receptors, cell proliferation and the expression of pro-angiogenic factors. In contrast, in mouse brain microvascular endothelial (MBE) cells, the  $\alpha$  isoform of NRG2 increased the phosphorylation of ErbB receptors; NRG2 $\beta$  and NRG1 $\beta$  did not affect the level of ErbB phosphorylation in these cells. Moreover, only NRG2 $\alpha$  stimulation led to an increase in MBE cell viability and enhanced their migration; none of these effects were observed after stimulation of the cells with NRG2 $\beta$  and NRG1 $\beta$  cells.

When analyzing ERBB phosphorylation in the human breast tumor line MDA-MB-468 by Western blotting, I observed truncated forms of phospho-EGFR that appeared after stimulation of the cells with recombinant NRG2, but there was no increase in full-length EGFR phosphorylation. On the other hand, NRG1 $\beta$  stimulation led to an increase in the level of full-length phospho-EGFR, and also to the appearance of shortened forms of phospho-EGFR. I demonstrated that the truncated forms of phospho-EGFR are a result of EGFR proteolysis. The formation of truncated forms of phospho-EGFR could be inhibited by the serine protease inhibitor AEBSF, but not by other protease inhibitors of enzymes belonging to this class (PMSF, aprotinin).

Joanne Berte

Marie Lamb