

Analiza funkcjonalna RAB27 w liniach komórkowych czerniaka: wydzielanie małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, migracja, inwazja i sygnalizacja komórkowa

Streszczenie

Czerniak jest najbardziej śmiertelnym nowotworem skóry, a liczba zdiagnozowanych pacjentów wzrasta każdego roku. Wcześnie wykryty jest prawie całkowicie wyleczalny, jednak zaawansowane stadium tej choroby zwykle wiąże się z niskim odsetkiem przeżywalności. Obecnie stosowana terapia celowana z użyciem inhibitorów BRAF i MEK oraz immunoterapia przeciwciałami skierowanymi przeciwko CTLA-4 i PD-1 mają ograniczoną skuteczność. U większości pacjentów występuje wrodzona lub nabyta oporność na leczenie, co przyczynia się do wysokiej śmiertelności czerniaka. Ponadto czerniak jest nowotworem o największej liczbie mutacji, między innymi ze względu na kluczowy udział promieniowania ultrafioletowego w jego powstawaniu. Dlatego wciąż prowadzone są badania poszukujące nowych molekularnych celów terapeutycznych, które mogłyby stanowić wsparcie w jego leczeniu.

Głównym celem niniejszej pracy było poznanie roli RAB27 w komórkach czerniaka. Białko to występuje w postaci izoform RAB27A i RAB27B, a ich udział obserwuje się w licznych procesach fizjologicznych i patologicznych. Badania wskazują na pro-nowotworowy charakter RAB27 w różnych typach nowotworów. Uważa się, że efekt ten jest związany głównie z promowaniem sekrecji małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych przez komórki nowotworowe. Uwalniane pęcherzyki stanowią nośnik onkogennych kwasów nukleinowych i białek, co umożliwia komunikację pomiędzy komórkami nowotworowymi, mikrośrodowiskiem guza i odległymi tkankami. Transport pęcherzykowy przyczynia się do powstawania niszy premetastatycznej, transformacji nowotworowej komórek prawidłowych czy immunosupresji. Jednakże niezależnie od sekrecji pęcherzyków, RAB27 wpływa także na wydzielanie rozpuszczalnych czynników promujących progresję nowotworu (np. cytokin, metaloproteinaz), a także moduluje funkcje komórek takie jak ich proliferacja czy migracja.

Do badań użyto trzech linii komórkowych czerniaka SkMel28, DMBC12 i A375, w których wyciszono ekspresję RAB27A za pomocą CRISPR/Cas9 oraz linię A375 z wyciszoną ekspresją RAB27A i RAB27B. Badania przeprowadzono w trzech etapach. Po uzyskaniu linii komórkowych z nokautem scharakteryzowano małe pęcherzyki zewnątrzkomórkowe uwalniane przez komórki KO w porównaniu do pęcherzyków z komórek typu dzikiego. Wykazano, że liczba oraz rozmiar pęcherzyków nie uległ zmianie na skutek wyciszenia RAB27A lub RAB27A/B. Całkowite stężenie białka było porównywalne w pęcherzykach z komórek WT i RAB27A KO linii SkMel28 i DMBC12, jednak było ono wyższe w przypadku pęcherzyków z komórek KO linii A375, w porównaniu do WT. We wszystkich badanych liniach

zaobserwowano znaczące różnice w poziomie białek charakterystycznych dla małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych - tetraspanin CD63 i CD81 oraz białek ESCRT - TSG101 i Alix. Należy jednak podkreślić, że różnice te były zależne od linii komórkowej i nie wystąpiła ogólna zależność pomiędzy poziomem RAB27A, a poszczególnymi białkami pęcherzykowymi.

W dalszych badaniach skupiono się na funkcjonowaniu komórek czerniaka z wyciszoną ekspresją RAB27A lub RAB27A/B. W tym celu wykorzystano pomiar przyrostu komórkowego DNA w celu oceny proliferacji komórek, test zarastania rasy jako model dwuwymiarowej migracji, oraz badanie przejścia komórek przez warstwę macierzy zewnątrzkomórkowej jako model inwazji. Spośród ocenianych linii jedynie komórki SkMel28 RAB27A KO wykazały ograniczoną proliferację. Natomiast zarówno komórki SkMel28 RAB27A KO, jak i DMBC12 RAB27A KO cechowały się zahamowaną migracją i inwazją. Zaobserwowano także spadek poziomu N-kadheryny, markera mezenchymalnego, co dodatkowo sugeruje, że RAB27A uczestniczy w regulacji inwazyjności tych linii komórkowych czerniaka. Natomiast ruchliwość komórek A375 RAB27A KO pozostała niezmienna, jedynie w przypadku komórek z podwójnym nokautem nastąpiło zahamowanie migracji. Ponieważ linia A375 charakteryzuje się największą inwazyjnością, pozwala to przypuszczać, że RAB27A wpływa na funkcjonowanie komórek o mniejszej agresywności.

W ostatnim etapie badań dokonano oceny poziomu białek zaangażowanych w onkogenezę i/lub progresję nowotworu. Poprzez badanie profilu proteomicznego wyróżniono liczne białka, w których nastąpił wzrost lub spadek ekspresji na skutek wyciszenia RAB27A lub RAB27A/B. Wśród nich znalazły się receptory z rodziny HER, których poziom był znacząco zmieniony. Aby dokładniej poznać zależność pomiędzy RAB27, a receptorami HER zbadano poziom mRNA i białka, a także powierzchniową ekspresję HER2, HER3 i EGFR w komórkach. Otrzymane wyniki pokazały, że wyciszenie RAB27A znacząco obniżyło poziom HER3 we wszystkich badanych liniach czerniaka. Natomiast fluktuacje w poziomie HER2 i EGFR były różne w zależności od linii komórkowej. Ze względu na bezpośredni udział receptorów z rodziny HER w szlakach sygnałowych RAS/RAF/MEK/ERK oraz PI3K-AKT zbadano aktywność białek AKT i ERK1/2. Wykazano, że stopień fosforylacji ERK1/2 oraz AKT był obniżony w komórkach DMBC12 RAB27A KO, natomiast pozostał niezmienny w komórkach SkMel28 RAB27A KO i A375 RAB27A KO. Zaobserwowano także zmniejszoną fosforylację AKT w komórkach A375 z podwójnym nokautem RAB27A/B.

Podsumowując, wyniki przeprowadzonych badań pozwoliły na lepsze poznanie funkcji pełnionych przez RAB27A w komórkach czerniaka. Wykazano, że RAB27A nie wpływa bezpośrednio na liczbę uwalnianych małych pęcherzyków zewnątrzkomórkowych, jednak znacząco kształtuje zawartość pewnych białek. Ponadto, RAB27A reguluje proliferację, migrację oraz inwazję komórek czerniaka w stopniu zależnym od linii komórkowej. Dodatkowo występuje interakcja pomiędzy RAB27A, a receptorami z rodziny HER wpływając na aktywację białek sygnałowych. Przedstawione wyniki

sugerują, że RAB27A pełni rolę w progresji czerniaka, jednak stopień jego zaangażowania jest ściśle zależny od linii komórkowej. Dlatego mało prawdopodobne wydaje się, aby białko RAB27A było uniwersalnym celem terapeutycznym w czerniaku.