

Rafał Seredyński

Badania aktywności wybranych metaloproteinaz macierzy w liniach komórkowych poddanych procedurze terapii fotodynamicznej

Rozprawa doktorska

wykonana w Zakładzie Fizykochemii Drobnoustrojów Instytutu Genetyki i Mikrobiologii

Promotor: prof. dr hab. Jan Gutowicz

Streszczenie

Metaloproteinazy macierzy (ang. *matrix metalloproteinases*, MMP) to endopeptydazy, których aktywność jest zależna od obecności jonów cynku oraz wapnia. Przedstawiciele tego typu katalitycznego – metaloproteinazy macierzy 2 oraz 9 (MMP-2 i MMP-9; żelatynazy) – odgrywają istotną rolę w wielu fizjologicznych oraz patologicznych procesach w ludzkim organizmie, z uwzględnieniem powstawania i rozwoju zmian nowotworowych oraz przerzutowania. Mimo potwierdzenia przydatności tych enzymów w diagnostyce onkologicznej, żadna z przeprowadzonych dotąd prób klinicznych w obszarze inhibicji metaloproteinaz macierzy w nowotworzeniu nie zakończyła się sukcesem.

Procedury terapii fotodynamicznej (ang. *photodynamic therapy*, PDT) wykorzystują neutralne związki światłoczułe, które stają się toksyczne dla komórek po ekspozycji na fale świetlne o odpowiedniej długości. Dostępne współcześnie formy PDT znalazły szerokie zastosowanie w onkologii, dermatologii, ginekologii, urologii, a także w zwalczaniu przewlekłych stanów zapalnych oraz infekcji z udziałem antybiotykoopornych szczepów bakterii. Kwas 5-aminolewulinowy (ang. *5-aminolevulinic acid*, 5-ALA) to produkt pośredni szlaku syntezy hemu, naturalnie występujący w żywych organizmach. W procedurze PDT, związek ten aplikowany jest w roli prekursora i ulega we wnętrzu komórek przemianom do protoporfiryny IX (PpIX), wykazującej właściwości fotouczulające.

Przeciwnowotworowa skuteczność terapii fotodynamicznej z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego (5-ALA-PDT) opiera się na produkcji reaktywnych form tlenu oraz indukcji

Serd

apoptozy. Reaktywne formy tlenu mogą w złożony sposób kształtować wewnątrz- oraz zewnątrzkomórkową aktywność MMP-2 i MMP-9, od bezpośredniego udziału w aktywacji latentnych form tych enzymów, poprzez ograniczanie skuteczności ich inhibicji z udziałem białek TIMP, po stymulację ekspresji genów *MMP2* i *MMP9*. Tak złożone interakcje nasuwają pytania o związek procedury 5-ALA-PDT z aktywnością MMP-2 i MMP-9 w komórkach nowotworowych, zwłaszcza w kontekście właściwości komórek przetrwałych; stąd też za główny cel pracy obrano ocenę aktywności MMP-2 i MMP-9 oraz potencjału inhibicyjnego względem tych enzymów w populacjach nowotworowych komórek przetrwałych, uzyskanych wskutek jednokrotnego zastosowania procedury terapii fotodynamicznej z użyciem kwasu 5-aminolewulinowego.

W prezentowanych badaniach wykorzystano trzy linie komórek nowotworowych: linie gruczolakoraka jelita grubego SW480 i SW620, pochodzące (odpowiednio) z ogniska pierwotnego oraz przerzutowego, a także linię czerniaka złośliwego Me45. Hodowle poddawano procedurze 5-ALA-PDT z zastosowaniem kwasu 5-aminolewulinowego w stężeniu 1,2 mM oraz światła o długości fali 630 nm (dawka energii około 1 J/cm²). Po upływie 18, 45 oraz 115 godzin oceniano zmiany (1) przeżywalności komórek metodą MTT, (2) zewnątrzkomórkowej aktywności MMP-2 i MMP-9 metodą zymografii substratowej, a także (3) zewnątrz- oraz wewnątrzkomórkowej zawartości wspomnianych enzymów metodą western blot; przeprowadzono ponadto analizę potencjału inhibicyjnego badanych linii względem MMP-2 i MMP-9 z użyciem fluorymetrii, zymografii substratowej i zymografii odwróconej.

Przeżywalność komórek badanych linii zmniejszała się wyraźnie w pierwszej dobie po zastosowaniu procedury 5-ALA-PDT, w kolejnych dniach obserwowano jednak postępującą regenerację hodowli. Po 18 godzinach od zainicjowania reakcji fotodynamicznej, zewnątrzkomórkowa aktywność proMMP-2 w hodowlach 5-ALA-PDT badanych linii komórkowych nie różniła się znacząco od tej rejestrowanej w hodowlach kontrolnych; w kolejnych dniach obserwowano akumulację proMMP-2 w podłożach hodowli kontrolnych, podczas gdy aktywność tego enzymu w hodowlach 5-ALA-PDT wyraźnie zanikała. Stosowana procedura terapii fotodynamicznej okazała się tym samym powodować nie natychmiastowe, lecz długookresowe zmniejszenie aktywności MMP-2. W żadnej z badanych linii nie zaobserwowano przywrócenia początkowej aktywności proteolitycznej do końca trwania eksperymentu. Redukcji proteolizy towarzyszyło zmniejszenie zawartości MMP-2 bądź 9 w podłożach

hodowlanych, podczas gdy wewnątrzkomórkowa zawartość tych enzymów nie ulegała znaczącym zmianom. Obserwacje te przeczą obniżeniu poziomu ekspresji badanych metaloproteinaz macierzy jako głównej przyczyny zaniku aktywności MMP-2 i MMP-9 w badanych liniach komórkowych, nie wskazują też zaburzeń mechanizmów sekrecji tych enzymów.

Procedura 5-ALA-PDT spowodowała wzrost potencjału inhibicyjnego we wszystkich badanych liniach komórkowych; wzrost ten powiązano z nasiloną sekrecją inhibitorów TIMP-1 i TIMP-2, a w przypadku linii Me45 prawdopodobnie też α_2 -makroglobuliny. Obecność powierzchniowej frakcji żelatynaz w badanych hodowlach komórek (szczególnie bogatej w przypadku linii Me45) oraz zwiększenie sekrecji endogennych inhibitorów tych enzymów pod wpływem procedury 5-ALA-PDT wspierają koncepcję nasilonej endocytozy metaloproteinaz macierzy, potencjalnie z udziałem białek LRP-1 i LRP-2.

Obniżenie aktywności MMP-2 i MMP-9 pod wpływem procedury 5-ALA-PDT, obserwowane w przetrwałych komórkach nowotworowych, wydaje się złożonym procesem, związanym nie tylko z osłabioną produkcją i sekrecją enzymów, lecz również z inhibicją i endocytozą wcześniej wydzielonych białek. Szczegółowa charakterystyka mechanizmów zmian aktywności i inhibicji metaloproteinaz macierzy w takich właśnie populacjach komórek stanowi ważny i interesujący aspekt kontynuacji badań nad efektami stosowania terapii fotodynamicznej.

Rafał Szedłymiński
31.05.2019

Abstract

Matrix metalloproteinases 2 and 9 (MMP-2 and MMP-9, respectively; gelatinases) belong to the family of zinc- and calcium-dependent endopeptidases, involved in multiple physiological and pathological processes in human body, including cancer progression and metastasis. Although the diagnostic and prognostic value of both MMP-2 and MMP-9 is well established, none of the clinical trials performed on the MMP inhibition in cancerogenesis were successful.

Photodynamic therapy (PDT) procedures involve neutral, light-sensitive agents, which become cytotoxic after the exposition to light of the appropriate wavelength. Nowadays, PDT is widely used in oncology, dermatology, gynecology, urology and the treatment of antibiotic-resistant bacterial infections. 5-aminolevulinic acid (5-ALA) is a natural intermediate of the heme synthesis pathway. During PDT, 5-ALA is used as an inactive precursor, which is then converted inside the treated cells to protoporphyrin IX (PpIX), acting as photosensitizer.

The antineoplastic efficacy of the 5-aminolevulinic-based PDT (5-ALA-PDT) results from the intracellular generation of the reactive oxygen species (ROS) and the subsequent induction of apoptosis. ROS have been shown to directly activate MMP-2 and MMP-9 zymogens, to prevent the inhibition of these enzymes with TIMPs, and to indirectly stimulate the *MMP2* and *MMP9* genes expression. These complex interactions rise questions about the relation of 5-ALA-PDT procedure and the MMP-2 and MMP-9 activity in cancer cell cultures, especially in the context of cell resistance to PDT. Therefore, the main goal of the present study was to evaluate the MMP-2 and MMP-9 activity and inhibition in populations of the persistent cancer cells, obtained by the single treatment with the 5-ALA-PDT procedure.

The study was conducted on three cancer cell lines: SW480 and SW620 – primary and secondary (respectively) colon adenocarcinoma cell lines, and the Me45 melanoma cell line.

Cultures were treated with 5-ALA-PDT procedure using 1,2 mM 5-ALA and the dose of 630 nm light of about 1 J/cm². After 18, 45 and 115 hours, the following parameters were evaluated: (1) cell survival rate, with the MTT method; (2) the extracellular (secretory) MMP-2 and MMP-9 proteolytic activity, with the substrate zymography; (3) extra- and intracellular amount of the mentioned enzymes, with the western blot technique. Additionally, the analysis of the inhibitory potential against MMP-2 and MMP-9 was performed using fluorimetry, substrate zymography and reverse zymography.

Cell survival was significantly reduced in the first day after 5-ALA-PDT treatment, but in consecutive days the culture regrowth was observed in all three lines. After the first 18 hours (counted from the initializing of the photodynamic reaction) the extracellular proMMP-2 activity in all 5-ALA-PDT-treated cultures did not differ from the control. In the following days, the proMMP-2 amount and activity were increasing in the control samples, while decreasing markedly in the PDT-treated ones. Therefore, the 5-ALA-PDT procedure occurred to reduce the secretory MMP-2 activity not in the instant, but the long-term manner. The intracellular MMP-2 amount has not changed visibly in the course of the experiment, suggesting that neither the *MMP2/MMP9* under-expression nor the secretion disturbances were the major cause of the reduced enzymes activity.

The 5-ALA-PDT procedure caused the increase in the inhibitory potential (mostly against MMP-2) in all cell lines investigated; the increase was related to the higher secretion of the TIMP-1 and TIMP-2 inhibitors, and – in case of Me45 cell line – presumably also α_2 -macroglobulin. Presence of the surface fraction of gelatinases (particularly rich in Me45 cultures), as well as the increase in the secretion of endogenous inhibitors of these enzymes after 5-ALA-PDT treatment, support the concept of the elevated endocytosis of MMPs, likely mediated by the LRP-1 and LRP-2 proteins.

The 5-ALA-PDT-related decrease in MMP-2 and MMP-9 activity, observed in the populations of the persistent cancer cells, appears to be a complex process, linked to both reduced enzymes production and to the elevated inhibition and endocytosis of the already secreted proteins.

Detailed analysis of the molecular background of these findings is an important aspect of the research on the long-term effects of the photodynamic therapy.

Rafal Sewczynski
31-05-2019