

**„Wpływ 3-bromopirogronianu na właściwości katepsyny B w aspekcie potencjału  
metastatycznego komórek raka jelita grubego”**

**STRESZCZENIE**

Katepsyna B (EC 3.4.22.1) jest proteazą występującą fizjologicznie w lizosomach, której biosynteza, lokalizacja, dystrybucja wewnątrzkomórkowa oraz aktywność enzymatyczna ulegają zmianom w trakcie patogenezy nowotworów. Enzym ten odgrywa istotną rolę w procesie metastazy poprzez degradację białek macierzy zewnątrzkomórkowej oraz nasilanie kaskady proteolitycznej na skutek inaktywacji tkankowych inhibitorów metaloproteinaz. W centrum aktywnym katepsyny B znajduje się reszta cysteiny, co czyni opisywane białko teoretycznie podatnym na działanie 3-bromopirogronianu - związku będącego analogiem kwasu pirogronowego, o cechach alkilatora, intensywnie badanego w ostatnich latach pod kątem działania przeciwnowotworowego. Opiera się ono na hamowaniu enzymów szlaku glikolizy, który jest głównym źródłem energii komórek nowotworowych. Niniejsza praca stanowi pierwsze doniesienie dotyczące oddziaływania tego związku bezpośrednio na katepsynę B oraz pośrednio na mechanizmy prowadzące do jej odmiennych od fizjologicznych właściwości, skutkujących m. in. wzmożonym potencjałem metastatycznym komórek nowotworowych.

Głównym celem badawczym niniejszej pracy było poznanie skutków działania 3-bromopirogronianu na te właściwości komórek nowotworowych wybranych linii raka jelita grubego, które decydują o ich potencjale metastatycznym, a których istotny element stanowi katepsyna B. Ponadto zbadano skutki bezpośredniego działania 3-bromopirogronianu na cząsteczkę katepsyny B w warunkach *in vitro*. Cel ten realizowano poprzez badania oparte na hodowlach komórek raka jelita grubego linii Caco-2 i HCT 116 oraz z użyciem oczyszczonego enzymu. Oceniono potencjał migracyjny, metodą gojenia rany, i inwazyjność komórek poddanych działaniu 3-bromopirogronianu. Dokonano analizy wpływu tego związku na poziom sekrecji katepsyny B oraz na jej aktywność enzymatyczną w komórkach raka jelita grubego i płynach pochodzących metodą spektrofлуorymetryczną. Przeanalizowano również skutki działania 3-bromopirogronianu na proces ekspozycji katepsyny B na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej komórek Caco-2 i HCT 116 z zastosowaniem cytometrii przepływowej. Doświadczenia z wykorzystaniem oczyszczonego enzymu inkubowanego z 3-bromopirogronianem obejmowały spektrofлуorymetryczne pomiary aktywności enzymatycznej

katepsyny B, określenie charakteru inhibicji metodą zymografii oraz próbę identyfikacji ewentualnych modyfikacji cząsteczki białka z wykorzystaniem spektrometrii mas sprzężonej z chromatografią cieczą.

Na podstawie przeprowadzonych badań stwierdzono, że 3-bromopirogronian obniża potencjał migracyjny oraz inwazyjność ludzkich komórek raka jelita grubego linii Caco-2 i HCT 116. Wykazano, że omawiany związek obniża aktywność katepsyny B w komórkach Caco-2 oraz wpływa negatywnie na jej sekrecję do medium hodowlanego w obu liniach komórkowych. Potwierdzono również, że działanie 3-bromopirogronianu powoduje znaczne zmniejszenie ekspozycji katepsyny B na zewnętrznej powierzchni błony komórkowej w komórkach Caco-2 i HCT 116. Badania z wykorzystaniem oczyszczonego białka wykazały, że 3-bromopirogronian hamuje aktywność katepsyny B, nie alkiluje jednak cząsteczki enzymu, a inhibicja ta ma charakter odwracalny.

*„The effect of 3-bromopyruvate on properties of cathepsin B in the aspect of metastatic potential of colon cancer cells”*

## **ABSTRACT**

Cathepsin B (EC 3.4.22.1) is a protease that physiologically resides in lysosomes, which biosynthesis, location, intracellular distribution and enzymatic activity undergo changes during the pathogenesis of cancer. This enzyme plays an important role in the metastatic process through the degradation of extracellular matrix proteins and intensification of the proteolytic cascade due to inactivation of tissue inhibitors of metalloproteinases. There is a cysteine residue in the active center of cathepsin B, which makes the described protein theoretically susceptible to the action of 3-bromopyruvate - a compound which is an analogue of pyruvic acid, an alkylator that has been intensively studied in the recent years for its anti-cancer activity. This is based on the inhibition of enzymes in the glycolysis pathway, which is the main source of cancer cell energy. The following thesis is the first report on the effect of 3-bromopyruvate directly on cathepsin B and indirectly on the mechanisms leading to its distinct physiological properties, resulting in, among others, the increased metastatic potential of cancer cells.

The aim of this study was to investigate the effects of 3-bromopyruvate on these tumor cell properties in selected colorectal carcinoma cell lines in order to determine their metastatic potential, of which the essential element is cathepsin B. Moreover, the effect of 3-bromopyruvate's direct action on the cathepsin B molecule was investigated *in vitro*. This goal was achieved through studies in cultures of Caco-2 and HCT 116 colon cancer cells and with the use of purified enzyme. Evaluation of migration potential, using the wound healing method, and the invasiveness of cells treated with 3-bromopyruvate was completed. The effect of this compound on the level of cathepsin B secretion and its enzymatic activity in colon cancer cells and culture media was analyzed via the spectrofluorimetric method. Furthermore, the effects of 3-bromopyruvate on the exposure process of cathepsin B on the outer surface of the cell membrane of Caco-2 and HCT 116 cells were analyzed using flow cytometry. Experiments using the purified enzyme incubated with 3-bromopyruvate included: spectrofluorimetric measurements of the cathepsin B enzymatic activity, determination of the characteristics of inhibition with zymography, and an attempt to identify possible modifications of the protein molecule using liquid chromatography - mass spectrometry method.

According to the conducted studies, it was found that 3-bromopyruvate reduces the migration potential and invasiveness of human colorectal cancer cells - Caco-2 and HCT 116. It was shown that this compound reduces the activity of cathepsin B in Caco-2 cells and negatively affects its secretion into the culture medium in both cell lines. It was also confirmed that the effect of 3-bromopyruvate significantly reduces the exposure of cathepsin B on the outer surface of the cell membrane in Caco-2 and HCT 116 cells. Studies using purified protein showed that 3-bromopyruvate inhibits the activity of cathepsin B reversibly and does not alkylate the enzyme's molecule.