Ilona Zaręba

***Wpływ dostępności proliny na proces POX-zależnej apoptozy/autofagii w komórkach raka piersi MCF-7****.*

Rozprawa na stopień doktora nauk farmaceutycznych

Promotor rozprawy:

Prof. dr hab. n. farm. Jerzy Pałka

Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Wydział Farmaceutyczny z Oddziałem Medycyny Laboratoryjnej

Zakład Chemii Leków

Białystok, 2018

Streszczenie

Konwersja proliny poprzez dehydrogenazę prolinową/oksydazę prolinową (PRODH/POX) przyczynia się do apoptozy/autofagii. Celem badań była identyfikacja specyficznej ścieżki regulującej PRODH/POX proces apoptozy i autofagii. Zbadano wpływ dostępności wewnątrzkomórkowej proliny na PRODH/POX-zależną apoptozę/autofagię. Przygotowano nowa linię komórek raka piersi ze stabilnie wyciszoną ekspresją białka PRODH/POX (MCF-7shPRODH/POX), użytą jako model do analizy funkcjonalnych konsekwencji zaburzeń wewnątrzkomórkowego stężenia proliny. Do tego celu użyto 2-metoksyestradiolu (MOE, inhibitor utylizacji proliny w procesie biosyntezy kolagenu), rapamycyną (Rap, inhibitor prolidazy, enzymu uwalniającego prolinę z dipeptydów) oraz glicylo-prolinę (GlyPro, substrat dla prolidazy).

Biosyntezę DNA i kolagenu oceniono metodą radiometryczną. Żywotność komórek określono przy użyciu cytometru przepływowego. Aktywność prolidazy oznaczono metodą kolorymetryczną. Ekspresję białek oceniono za pomocą techniki Western blot i immunocytochemii. Stężenie wewnątrzkomórkowej proliny oznaczono metodą chromatografii cieczowej sprzężonej ze spektrometrem mas. Wyciszenie ekspresji białka PRODH/POX nie wpłynęło na żywotność komórek, jednak spowodowało obniżenie biosyntezy DNA i kolagenu, wzrost aktywności prolidazy, stężenia wewnątrzkomórkowej proliny oraz ekspresji białek iNOS, NF-kB, mTOR, HIF-1α, COX-2, AMPK, Atg7 i beclin-1. Wszystkie zastosowane związki obniżały żywotność w obu liniach komórkowych. Rap i MOE hamował biosyntezę DNA, podczas gdy GlyPro upośledzał ten proces jedynie w komórkach MCF-7shPRODH/POX, natomiast MOE+GlyPro w komórkach wild-type MCF-7. Wszystkie badane związki poprzez hamowanie biosyntezy kolagenu, zwiększenie aktywności prolidazy i wewnątrzkomórkowego stężenia proliny indukowały pro-przeżyciowy fenotyp w komórkach MCF-7shPRODH/POX w przeciwieństwie do komórek wild-type MCF-7, u których stwierdzono zwiększoną ekspresję białek pro-apoptotycznych (kaspazy-3 i -9).

Przedstawiono dowody, że wyciszenie ekspresji białka PRODH/POX indukuje autofagię w komórkach wild-type MCF-7, natomiast wolna prolina nasila ten proces. Otrzymana linia komórkowa MCF-7 z wyciszoną ekspresją białka PRODH/POX może służyć jako skuteczny model badawczy procesów regulacji apoptozy/autofagii zależnych od metabolizmu proliny.

Abstract

Proline degradation by proline dehydrogenase/ proline oxidase (PRODH/POX) contributes to apoptosis or autophagy. The aim of the study was to identified the specific pathway regulating PRODH/POX-dependent apoptosis/autophagy. The effect of impaired intracellular proline availability for PRODH/POX-dependent apoptosis/ autophagy was investigated. A new breast cancer cell line was prepared with stably silenced PRODH/POX protein expression (MCF-7shPRODH/POX). It was used as a model to analyze the functional consequences of intracellular proline manipulation. 2-methoxyestradiol (MOE, inhibitor of proline utilization in collagen biosynthesis), rapamycin (Rap, inhibitor of prolidase that generates proline from imidodipeptides) and glicylo-proline (GlyPro, a substrate for prolidase) were used.

DNA and collagen biosynthesis were measured by radiometric method. Cell viability was determined using flow cytometer. Prolidase activity was determined by colorimetric assay. Protein expression was evaluated by Western blot and immunocytochemistry. The concentration of intracellular proline was determined by liquid chromatography coupled with a mass spectrometer. The silencing PRODH/POX protein expression did not affect cell viability; however, it caused a decrease in DNA and collagen biosynthesis, increase in prolidase activity, intracellular proline concentration and expression of iNOS, NF-kB, mTOR, HIF-1α, COX-2, AMPK, Atg7 and beclin-1. All studied compound reduced cell viability of both cell lines. Rap and MOE inhibited DNA biosynthesis, whereas GlyPro inhibited this process only in MCF-7shPRODH/POX and MOE+GlyPro in wild-type MCF-7 cells. All studied compound inhibited collagen biosynthesis, increased prolidase activity and intracellular proline concentration creating pro-survival phenotype in MCF-7shPRODH/POX cells. In wild-type MCF-7 cells the compounds induced expression of caspase-3 and -9 creating pro-apoptotic phenotype of wild-type MCF-7 cells.

The data suggest that PRODH/POX silencing induces autophagy in wild-type MCF-7 cells and free proline enhances this process. The obtained cell line with knock-down PRODH/POX expression can be used as an experimental model to study proline-dependent mechanism of apoptosis/autophagy regulation.