

Streszczenie

Analyzing the proteolytic network interactions of tissue kallikreins and matrix metalloproteases

Macierz zewnątrzkomórkowa (*ang. extracellular matrix (ECM)*) jest niekomórkowym elementem struktury wszystkich tkanek i organów. Oprócz funkcji podporowej/strukturalnej, odpowiada za regulację przekazu sygnału pomiędzy komórkami a ich otoczeniem. Proteazy, będące kluczowymi enzymami występującymi w ECM, odpowiadają m.in. za przebudowę białkowych elementów strukturalnych oraz aktywację ligandów dla receptorów powierzchniowych komórek. Główne zewnątrzkomórkowe proteazy występujące w ECM zaliczane są do dwóch rodzin katalitycznych: metaloproteaz - metaloproteazy macierzy zewnątrzkomórkowej (MMP) oraz proteaz serynowych – kalikreiny (KLK).

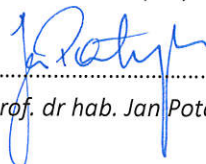
Podczas przebudowy tkanek poziom ekspresji proteaz jest podwyższony, zatem kontrola aktywności proteolitycznej ma fundamentalne znaczenie dla prawidłowego funkcjonowania tkanki. Aktywność proteaz MMP typu błonowego (*ang. membrane type-MMP (MT-MMP)*) jest niezbędna dla regulacji migracji komórek inicjującej gojenie się ran. Z drugiej, strony w przypadku przewlekłych stanów zapalnych, zwiększona aktywność proteolityczna może skutkować nadmierną destrukcją własnych tkanek i zakłóceniem funkcji sygnałnych, co może prowadzić do rozwoju i przerzutowania nowotworów. Proteazy z rodziny KLK ulegają ekspresji w różnych tkankach organizmu i są obecne w płynach ustrojowych, biorąc udział w szeregu procesów fizjologicznych i patofizjologicznych. Dotychczasowy stan wiedzy opisujący kaskadowy mechanizm aktywacji proteaz w obrębie ich rodzin jest bardzo rozległy, jednak niewiele wiadomo o możliwości krzyżowej aktywacji proteaz należących do odmiennych grup katalitycznych. Równoległa ekspresja KLK i MMP w wielu typach komórek i tkanek, wskazuje iż zbadanie ich wzajemnego oddziaływania ułatwi zrozumienie wielu procesów biologicznych.

Aby ocenić możliwą aktywację proMMPs przez KLK, opracowano system analizy specyficzności substratowej proteaz. System CleavEx (*ang. Cleavage of Exposed peptide sequences*), stanowi bibliotekę rekombinowanych białek fuzyjnych, złożonych z krótkich fragmentów naturalnie występujących sekwencji aminokwasowych, przyłączonych do rozpuszczalnego, odpornego na proteolizę białka nośnikowego. W celu określenia czy KLK zlokalizowane w ECM mogą rozpoznawać i hydrolizować sekwencje profragmentów MMP, prowadząc tym samym do ich aktywacji, przygotowano bibliotekę CleavEx - zawierającą substraty z fragmentami N-terminalnych sekwencji wszystkich 23 ludzkich proMMP, które poddano inkubacji z aktywnymi KLK13 i 14. Wykazano iż KLK14 selektywnie hydrolizuje wiązania peptydowe w obrębie profragmentów dziesięciu spośród testowanych MMP, w miejscach typowych dla

aktywacji tych proenzymów, dodatkowo potwierdzono metodą degradacji Edmana i analizą MS-MS. Wspomniana analiza CleavEx ujawniła, że proMMP typu membranowego (MT-MMP) są preferowanym celem KLK14. W celu potwierdzenia tej hipotezy, komercyjnie dostępne proMMP14-17 traktowano KLK14. Analiza sekwencji N-końców metodą degradacji Edmana, analiza aktywności względem swoistych syntetycznych substratów oraz wyniki zymografii potwierdziły uwalnianie w pełni aktywnych, MT-MMP. Co więcej, wyniki dotyczące obróbki proteolitycznej powierzchniowej proMMP14 przez KLK14, znalazły potwierdzenie w modelu *in vitro*, z zastosowaniem analizy biotynylacji białek powierzchniowych.

Degradacja elementów ECM w tkankach może być efektem aktywności proteaz ECM ale również konsekwencją obecności egzogennych proteaz, co jest obserwowane np. w chorobach infekcyjnych, takich jak zapalenie przyzębia, w którego rozwoju bardzo ważną rolę odgrywają proteazy produkowane przez patogenne gatunki bakterii. Gingipainy – wydzielnicze proteazy cysteinowe wytwarzane przez *Porphyromonas gingivalis*, biorą udział w indukcji wyniszczającego zapalenie tkanki dziąseł. Istnieją również doniesienia dotyczące aktywacji niektórych przedstawicieli rodziny MMP przez gingipainy. Bezpośrednia aktywacja przez gingipainy innych proteinaz wydzielniczych obecnych w ECM, takich jak KLK, nie została dotychczas w pełni zbadana. W niniejszych badaniach, wykorzystując ponownie system CleavEx oceniono potencjał trzech gingipain (HRgpA, RgpB i Kgp) do aktywowania 15 ludzkich kalikrein. Wyniki pokazały, że proteiny te posiadają potencjał do hydrolizy wiązań peptydowych w obrębie sekwencji profragmentów kalikrein, co sugeruje ich możliwą aktywację. Aktywację natywnych proKLK 7, 8, 13 i 14 przez Kgp potwierdzono dodatkowo w testach z użyciem syntetycznych substratów wykrywających aktywność KLK oraz oceniając utratę N-końcowych profragmentów (z zastosowaniem metody Western blot w celu wizualizacji).

Przedstawione badania pozwoliły wykazać potencjał kalikreiny 14 do specyficznej aktywacji zymogenów MT-MMP. Chociaż wyniki te mają charakter wstępny, jest to krok w kierunku zrozumienia złożonej sieci powiązań występującej pomiędzy różnymi grupami proteaz w ECM. Egzogenne proteazy, takie jak gingipainy mogą wpływać na zwiększenie aktywności proteolitycznej w nabłonku, na skutek aktywacji obecnych tam proform ludzkich kallikrein, co może prowadzić również do dalszej aktywacji MMP. Nadmierna aktywność proteolityczna może prowadzić do zaostrzenia stanu zapalnego i postępu w destrukcji tkanek przyzębia, a przy zaangażowaniu MMP dodatkowo może stanowić mechanistyczne powiązanie między chorobami przyzębia a rozwojem nowotworów jamy ustnej.


.....
Promotor: Prof. dr hab. Jan Potempa



Abstract

Analyzing the proteolytic network interactions of tissue kallikreins and matrix metalloproteases

The extracellular matrix (ECM) is the non-cellular component present within all tissues and organs, which is essential for maintenance of tissue homeostasis. It regulates signaling for communication between cells and their pericellular environment. Proteases are crucial enzymes within the ECM and are required for activation of ligands for cell surface receptors, providing a necessary step in signal transduction. Extracellular proteases prevalently expressed in the ECM include matrix metalloproteinases (MMPs) and tissue kallikrein related peptidases (KLKs) consisting of metallo- and serine protease catalytic families, respectively. Both families play vital roles within the ECM, controlling its assembly and degradation. ECM degradation is also observed in tissues, as a consequence of certain diseases such as periodontitis. In this condition, gingipains, extracellular proteases produced by the pathogenic *Porphyromonas gingivalis*, are known to induce destructive inflammation of gum tissue leading to periodontitis.


During tissue remodeling that may occur due to disease or inflammation, protease expression is elevated. This signifies that the control of protease activity is fundamental for tissue function. MMP proteases of the membrane-type subfamily (MT-MMPs) are essential in regulating cell migration necessary in wound healing, which is significant during normal physiological processes as well as chronic inflammatory states leading to cancer progression and metastasis. The KLK family proteases are expressed in various tissues throughout the body and are present in extracellular fluids suggesting their participation in a range of physiological and pathophysiological functions. Multiple reports describe the activation cascade within each proteinase family, yet little is known about the crosstalk between these proteolytic systems. KLKs and MMPs are typically co-expressed in many cell types and tissues, hence understanding their cross-talk may decipher the regulation of KLK and MMP activity in health and disease.

To assess the possible activation of proMMPs by KLKs, a system for analysis of substrate specificity was developed. This approach, named CleavEx (**C**leavage of **E**xposed peptide sequences), is based on a library set of short fragments of naturally occurring amino acid sequences attached to a soluble, proteolysis-resistant carrier protein. A library of all 23 human proMMP sequences was produced and screened with KLK13 and 14 to determine whether ECM-localized KLKs can recognize and release MMP profragments. Active KLK14 was able to hydrolyze a total of ten MMP profragments, which were validated by both, MS-MS and Edman degradation. The CleavEx analysis revealed that membrane-type MMPs are

likely targeted by KLK14 for activation. Correspondingly, commercially available proMMP14-17 were investigated *in vitro* and found to be effectively processed by nanomolar concentrations of KLK14. In addition, productivity of proMMP activation was analyzed by using activity assays employing synthetic substrates and gelatin zymography, which indicated the release of the fully active, mature MT-MMPs upon KLK14 treatment. Lastly, *in vitro* cell surface biotinylation experiments confirmed surface processing of proMMP14 by KLK14 which provides an additional layer of proMMP regulation within the ECM.

The upregulation of MMP activity is a well-established phenomenon during periodontitis development. However, the direct activation of other secretory proteinases such as KLKs within the ECM by gingipains, has not been fully investigated. Once again, the CleavEx system was employed to assess the potential of 3 gingipains (HRgpA, RgpB and Kgp) to process all 15 KLK proforms. The results showed that these pathogenic proteinases have the potential to activate and disrupt the control of KLKs, possibly promoting tissue destruction. Furthermore, Kgp-mediated activation of full-length proKLK 7, 8, 13 and 14 proforms was observed in assays using synthetic substrates to detect the release of active KLK and in Western blots to visualize the loss of the N-terminal profragments.

This interaction may increase tissue dysregulation and add to the tissue pathologies which can possibly lead to tumor progression and metastasis. In addition, gingipains may have an effect on increasing proteolytic activation in the epithelium by activating KLKs which can lead to further activation of MMPs. This excessive proteolytic activity can lead to severe tissue inflammation and periodontal tissue destruction and, in consequence, may constitute a mechanistic link between periodontitis and the development of oral cancer. Although these results are preliminary, it is a step towards understanding the complex protease network in the ECM.


.....
Promotor: Prof. dr hab. Jan Potempa

