

УДК 577.156., 616.006

© Коллектив авторов

КАТЕПСИНЫ В И L И ИХ ЭНДОГЕННЫЕ ИНГИБИТОРЫ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ ФИБРОБЛАСТАХ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ РАЗЛИЧНЫМИ ГЕНАМИ.

Э. А. ДИЛАКЯН¹, С. В. ВИНОКУРОВА¹, В. А. ЖУРБИЦКАЯ², Е. В. КОМИССАРОВА²,
Л. З. ТОПОЛЬ², Ф. Л. КИСЕЛЕВ², Н. И. СОЛОВЬЕВА¹

¹Институт биомедицинской химии Российской Академии Медицинских наук (РАМН),
Россия, 119832, Москва, Погодинская ул. 10, факс (7) (95) 245-08-57

²Институт канцерогенеза Онкологического научного центра РАМН, Москва

Проведено сравнительное исследование экспрессии цистеиновых протеиназ - катепсинов В и L, и их эндогенных ингибиторов в фибробластах в зависимости от стадии трансформации и трансформирующего гена. Исследованы три модельные системы эмбриональных фибробластов, последовательно immortalized и трансформированных различными генами. В модели I эмбриональные фибробласты были immortalized ДНК аденовируса SA7 (клон REF-1), а затем трансформированы с-Ha-ras онкогеном (REF-2EJ; злокачественная трансформация). В моделях II и III immortalized фибробласты (клон IE5) были получены в результате трансфекции гена большого Т-антигена вируса полиомы, который был утрачен впоследствии; злокачественная трансформация достигалась трансфекцией гена E7 (клон trF8; модель II) и генов E6-E7 [клон A5E5(pC7-1); модель III] вирусов папилломы человека тип 16 и 18, соотв. Показано, что в модели I увеличение общей активности катепсинов L и В коррелировало со стадиями трансформации, в то время как в моделях II и III эта активность на стадии immortalization была выше, чем на стадии трансформации. Активность катепсина L в лизатах трансформированных REF-2EJ фибробластов значительно превосходила активность этого фермента в трансформированных клетках trF8 и A5E5(pC7-1) (в 6, 10 раз, соотв.). В культурах клеток моделей I и II увеличение секретируемой активности катепсинов L и В также коррелировало с развитием процесса трансформации; а в культурах клеток модели III эта активность на стадии трансформации была ниже, чем на стадии immortalization. Таким образом, катепсины L и В экспрессировались в различной степени на разных стадиях онкогенной трансформации, и экспрессия их активности зависела от типа трансформирующего гена. Изменение протеолитического потенциала исследуемых фибробластов коррелировало с различиями в выраженности трансформированного фенотипа у этих клеток. Показано присутствие секретируемого ингибитора(ов) цистеиновых протеиназ во всех типах исследуемых культур клеток. Экспрессия и ингибиторные свойства этого ингибитора(ов) различались на разных стадиях трансформации.

Ключевые слова: цистеиновые протеиназы, катепсины, эндогенный ингибитор, фибробласты, immortalization, трансформация, гены.

ВВЕДЕНИЕ. Протеолитические ферменты, в том числе и цистеиновые протеиназы, вовлечены во многие стадии канцерогенеза. Злокачественная трансформация приводит к увеличению синтеза и секреции цистеиновых протеиназ - катепсинов L и В [1,2]. Кроме того,

в клетках опухолей баланс цистеиновая протеиназа/эндогенный ингибитор - один из главных факторов регуляции активности протеиназ, часто сдвигается в пользу протеолитической активности [3,4]. Показано, что экспрессия катепсина L и, в меньшей степени, катепсина В зависит от специфичности тканей и регулируется множеством факторов, включая митогенные [5]. Однако в настоящее время механизм регуляции активности катепсинов онкогенами еще не установлен. С целью выяснения механизмов регуляции активности цистеиновых протеиназ в физиологических условиях при канцерогенезе в настоящей работе проведено сравнительное изучение экспрессии катепсинов L и В и их эндогенных ингибиторов на отдельных стадиях трансформации фибробластов (иммортализации и злокачественной трансформации) в зависимости от типа трансформирующего гена.

МЕТОДИКА. *Культуры клеток.* В работе использованы три модельные системы эмбриональных фибробластов крысы линии Фишер, последовательно иммортализованных и трансформированных различными онкогенами. В модели I, эмбриональные фибробласты были трансформированы последовательной трансфекцией плазмиды, содержащей EIA ген аденовируса SA7 обезьяны (иммортализованные клетки - REF-1) [6] и плазмидами, содержащими EJras 6.6 ген (с-Ha-ras) и pSVneo (в соотношении 10:1) (клон REF-2EJ; злокачественная трансформация) [6,7]. В моделях II и III, иммортализованные фибробласты (клон IE5) были отобраны из линии клеток, первоначально трансфицированных геном большого Т-антигена вируса полиомы, но утратившими этот ген впоследствии [8,9]. Трансформация достигалась последующей трансфекцией гена E7 вируса папилломы человека тип 16 - клон trF8 (модель II) [9] и генов E6-E7 вируса папилломы человека тип 18 - клон A5E5(pC7-1) (модель III) [10]. Первичные культуры эмбриональных фибробластов крыс линии Фишер (REF) использовали в качестве контроля. Клетки культивировали в течение 48 часов в бессывороточной среде DMEM как описано ранее [11,12]. Клеточную суспензию и кондиционированную среду для определения активности протеиназ готовили как описано в работах [11,12].

Морфологическая и туморогенная характеристика изучаемых клеток. Иммортализованные фибробласты, REF-1 и IE5, имеют фибробластоподобную морфологию, практически не отличаются от исходной эмбриональной культуры [6,9]. Трансформированные с-Ha-ras онкогеном REF-2EJ клетки характеризуются полной морфологической трансформацией и туморогенны для бестимусных мышей (подкожное введение $1-2 \times 10^6$ клеток) [7]. Трансформированные A5E5(pC7-1) фибробласты, как и родительские иммортализованные IE5 клетки, имеют фибробластоподобную морфологию, тогда как трансформированные trF8 фибробласты представляют собой менее вытянутые поляризованные клетки; подкожное введение A5E5(pC7-1) и trF8 клеток ($1-2 \times 10^7$) бестисусным мышам приводило к образованию опухолей на месте введения [9,13]. Клетки трансформированных клонов REF-2EJ и trF8 образовывали колонии в полужидком агаре [7,13].

Исследование активности ферментов. Активность катепсинов L и В определяли по гидролизу синтетических субстратов производных 7-амино-4-метил-кумариамида карбобензоксиг-L-фенилаланил-L-аргинина (Z-FR-MCA) и карбобензоксиг-L-аланил-L-аргинил-L-аргинина (Z-ARR-MCA), соответственно. Реакцию проводили в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,5, содержащем 20-30 мкМ концентрации субстрата в присутствии и в отсутствие дитиотрейтола (ДТТ) и ЭДТА и в присутствии специфических ингибиторов как описано [11,12, 14].

Исследование ингибиторов. С целью обнаружения эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ кондиционированную бессывороточную среду инкубировали в течение 60 минут при 60°C для инактивации протеиназ и изучали влияние термоинактивированной среды на активность катепсина L. Преинкубацию катепсина L с

термоинактивированной средой (50 мкл) проводили в течение 15-20 минут при 37°C. Активность катепсина исследовали как описано выше.

Статистическую обработку полученных данных проводили по методу [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Активность катепсинов L и B и их эндогенных ингибиторов исследовали в лизатах и кондиционированной среде на разных стадиях трансформации (иммортализации и опухолевой трансформации) эмбриональных фибробластов и в зависимости от трансформирующего гена

Активность катепсинов L и B в лизатах клеток. В модели I онкогенная трансформация сопровождалась постепенным увеличением активности цистеиновых протеиназ в лизатах клеток в соответствии с развитием процесса трансформации (рис. 1A, 2A). Активность как катепсина L (гидролиз Z-FR-MCA), так и катепсина B (гидролиз Z-ARR-MCA) в иммортализованных REF-1 клетках выше (в 3-4 раза), чем в первичных фибробластах (REF). Наиболее высокая активность обоих катепсинов обнаружена в лизатах трансформированных c-Ha-ras фибробластов, REF-2EJ. В этих клетках активность катепсина L была в 17 раз выше, чем в первичных фибробластах и в 4 раза выше, чем в иммортализованных клетках (рис. 1A, 2A).

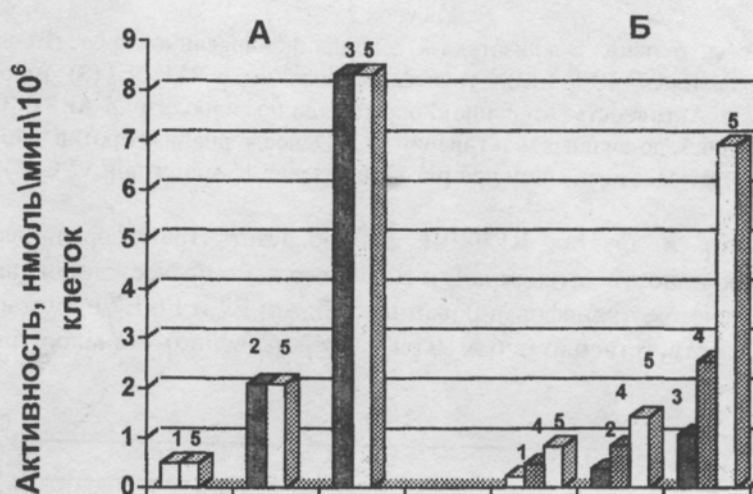


Рисунок 1.

Модель I. Активность катепсина L в лизатах (A) и кондиционированной среде (Б) первичных - REF (1), иммортализованных - REF-1 (2) и трансформированных REF-2EJ (3) эмбриональных фибробластов крысы. Активность катепсина L определяли по гидролизу Z-FR-MCA в 0.1 M Na-фосфатном буфере, pH 6,5, до диализа и активации (1,2,3), после диализа против 0.45% р-ра NaCl, pH 6,5 (4) и после активации при pH 4,2 в течение 15 минут при 37°C (5).

В отличие от этого в моделях II и III наивысшая активность катепсинов L и B в лизатах фибробластов наблюдалась на стадии иммортализации (рис. 3A, 4A). Активность катепсинов L и B в иммортализованных IE5 клетках была в 5 и 3 раза, соответственно, выше, чем в первичных фибробластах и от 1,5 до 2,5 раз выше, чем в трансформированных фибробластах - trF8 и A5E5(pC7-1). Оказалось, что в лизатах A5E5(pC7-1) клеток, трансформированных геном E7 (модель III), активность обоих катепсинов значительно ниже (1,5-2 раза), чем в лизатах trF8 клеток, трансформированных генами E6/E7 (модель II) (рис. 3A, 4A).

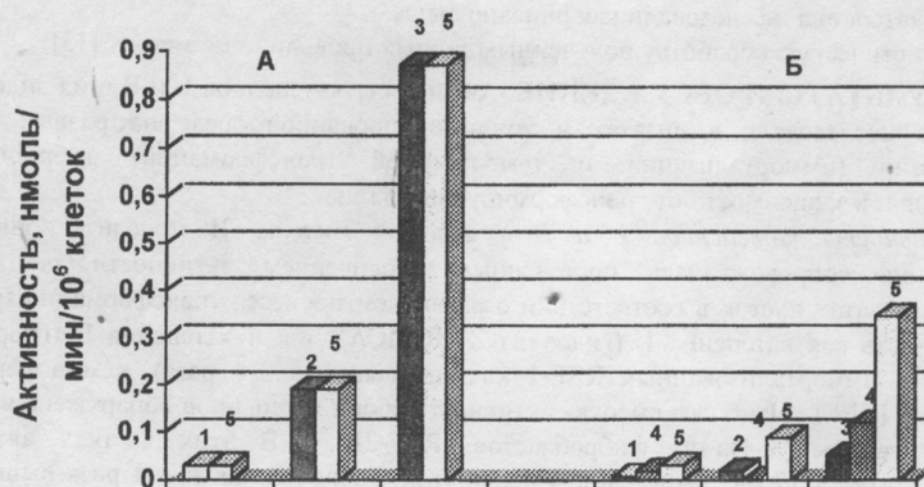


Рисунок 2.

Модель I. Активность катепсина В в лизатах (А) и кондиционированной среде (Б) первичных - REF (1), иммортализованных - REF-1 (2) и трансформированных - REF-2EJ (3) эмбриональных фибробластов крысы. Активность катепсина В определяли по гидролизу Z-ARR-MCA в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,5, до диализа и активации (1,2,3), после диализа против 0,45% р-ра NaCl, pH 6,5 (4) и после активации при pH 4,2 в течение 15 минут при 37°C (5).

Показано, что, в лизатах REF-2EJ фибробластов, трансформированных с-Ha-ras (модель I), уровни активности катепсина L и В значительно превосходили таковые в лизатах trF8 и A5E5(pC7-1) клеток, трансформированных генами E7 и E6/E7 вирусов папилломы человека тип 16 и 18, соответственно (в 6 и 10 раз, соответственно). Однако в лизатах REF-1 и

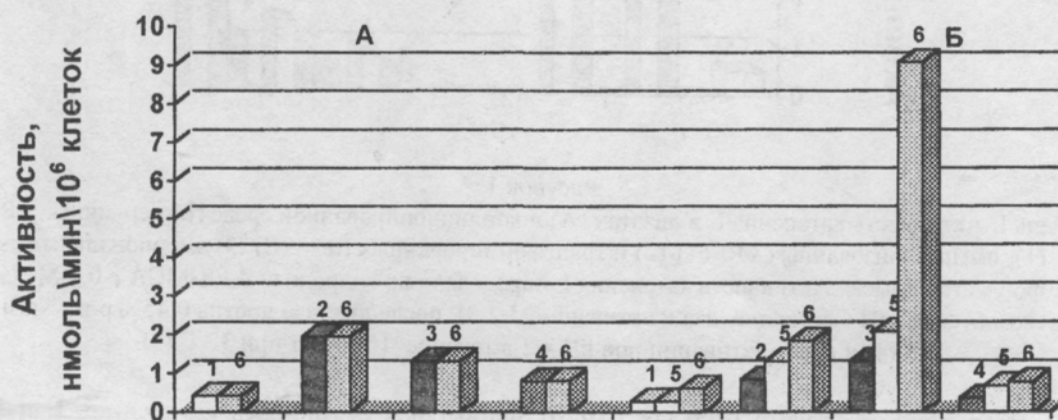


Рисунок 3.

Модели II и III. Активность катепсина L в лизатах (А) и кондиционированной среде (Б) первичных - REF (1), иммортализованных - IE5 (2) и трансформированных trF8 (3) и A5E5(pC7-1) (4) эмбриональных фибробластов крысы. Активность катепсина L определяли по гидролизу Z-FR-MCA в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,5, до диализа и активации (1,2,3, и 4), после диализа против 0,45% р-ра NaCl, pH 6,5 (5) и после активации при pH 4,2 в течение 15 минут при 37°C (6).

IE5 фибробластов, иммортализованных различными генами, уровни активности катепсинов L и B были практически одинаковыми (рис. 1А, 2А, 3А и 4А).

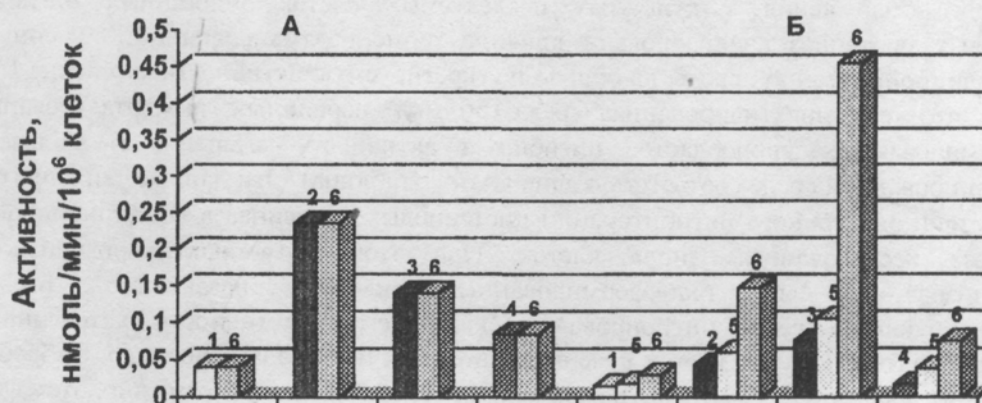


Рисунок 4.

Модели II и III. Активность катепсина B в лизатах (А) и кондиционированной среде (Б) первичных - REF (1), иммортализованных - IE5 (2) и трансформированных trF8 (3) и A5E5(pC7-1) (4) эмбриональных фибробластов крысы. Активность катепсина B определяли по гидролизу Z-ARR-MCA в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,5, до диализа и активации (1,2,3 и 4), после диализа против 0,45% раствора NaCl, pH 6,5 (5) и после активации при pH 4,2 в течение 15 минут при 37°C (6).

Активность катепсинов L и B в кондиционированной среде. Как видно из представленных на рис. 1В, 2В, 3В и 4В данных, в клеточных культурах моделей I и II увеличение секретируемой активности катепсинов L и B коррелирует со стадиями трансформации фибробластов. Секретируемая активность этих протеиназ в культурах иммортализованных REF-1 и IE5 клеток была выше, чем в кондиционированной среде первичных фибробластов. Дальнейшее увеличение секретируемой активности происходило на стадии злокачественной трансформации: уровни секретируемой активности катепсинов L и B в трансформированных REF-2EJ и trF8 клетках значительно превышали уровни активности в культурах иммортализованных (в 4,5 и 1,5 раза, соответственно) и первичных фибробластов (в 5 раз). В то же время в модели III, секретируемая активность этих катепсинов в трансформированных A5E5(pC7-1) клетках была в два раза ниже, чем в кондиционированной среде иммортализованных фибробластов (рис. 1В - 4В).

Во всех исследованных моделях фибробластов, независимо от субклеточной локализации, характер изменения активности катепсинов L и B в процессе трансформации был идентичен. Однако активность катепсина B была значительно ниже активности катепсина L: в лизатах клеток она составляла лишь 10-15%, а в кондиционированной среде менее 5% от величины активности катепсина L (рис. 1 - 4).

Диализ кондиционированной среды при pH 6,5 приводил к увеличению секретируемой активности катепсинов L и B от 1,5 до 3 раз во всех исследованных культурах клеток (рис. 1В, 2В, 3В и 4В). Преинкубация диализованной кондиционированной среды при pH 4,2 в течение 15 минут при 37°C вызывала дальнейшее увеличение (от 2 до 7 раз) активности обоих катепсинов (Рис. 1В-4В). Преинкубация в этих условиях недиализованной кондиционированной среды также приводила к подобному увеличению секретируемой активности. В то же время, аналогичная обработка (pH 4,2) лизатов всех исследованных

клеток не сопровождалась увеличением активности ферментов. Эти данные позволяют предположить, что во всех изучаемых культурах клеток катепсина L и B секретируются в виде комплекса протеиназа-ингибитор и/или в форме предшественника.

Для обнаружения в культурах исследуемых клеток эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ анализировали влияние термоинактивированной (60 минут при 60°C) кондиционированной среды на общую и секретируемую активность катепсина L. Было показано, что термоинактивированная среда (50 мкл) первичных, иммортализованных и трансформированных фибробластов ингибирует активность катепсина L в лизатах и кондиционированной среде соответствующих клеток (таблица). Эти данные свидетельствуют о присутствии эндогенного ингибитора(ов) цистеиновых протеиназ в кондиционированной среде всех исследованных типов клеток. При этом термоинактивированная среда иммортализованных и трансформированных клеток, независимо от типа трансформирующего гена, ингибировала секретируемую активность катепсина L в соответствующих культурах клеток в меньшей степени, чем среда первичных фибробластов тормозила активность фермента из нормальных клеток (таблица). Возможно, этот феномен может быть обусловлен изменениями в свойствах катепсина L или изменениями свойств самого эндогенного ингибитора при иммортализации и трансформации. Эти данные согласуются с результатами, полученными при исследовании ингибитора цистеиновых протеиназ (стефина А), изолированного из саркомы человека, где было показано, что стефин А из саркомы тормозит активность катепсина В в меньшей степени, чем ингибитор из ткани нормальной печени [16,17].

Таблица. Влияние термоинактивированной кондиционированной среды на активность катепсина L фибробластов на разных стадиях трансформации.

Культуры клеток	АКТИВНОСТЬ КАТЕПСИНА L			
	В лизатах клеток		В кондиционированной среде	
	Удельная, активность, нмоль\мин\1х10 ⁶ кл	Ингибирование, %	Удельная, активность, нмоль\мин\1х10 ⁶ кл	Ингибирование, %
REF	0.420 ± 0.038	85	0.270 ± 0.019	80
IE5	1.936 ± 0.153	55	0.830 ± 0.066	49
trF8	1.310 ± 0.120	58	1.306 ± 0.098	51
A5E5 (pC7-1)	0.810 ± 0.073	54	0.358 ± 0.026	64

Каждое значение является средним ± SD из 5 независимых экспериментов (p < 0,001). Стандартное отклонение для всех величин ингибирования ниже 5%.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что независимо от субклеточной локализации катепсина L и B экспрессируются в различной степени на разных стадиях онкогенной трансформации, и экспрессия их активности зависит от выраженности трансформированного фенотипа клеток. Уровни активности исследуемых катепсинов в иммортализованных различными генами REF-1 и IE5 фибробластах не различались. В то же время активность катепсинов L и B в лизатах трансформированных REF-2EJ фибробластов (модель I; трансфекция c-Ha-ras) значительно превышает их активность в лизатах трансформированных как trF8 (модель II; трансфекция гена E7 вируса папилломы человека тип 16), так и A5E5(pC7-1) клеток (модель III; трансфекция генов E6/E7 вируса папилломы человека тип 18). Кроме того, во всех исследованных модельных системах активность

катепсинов L и В в лизатах иммортализованных и трансформированных клеток была значительно выше, чем в кондиционированной среде. При этом активность катепсинов в лизатах оставалась выше, секретiruемой активности ферментов даже после активации последней во время диализа и последующей преинкубации при кислом рН. Исключение составляла секретiruемая активность катепсина L в культуре trF8 клеток. Эти результаты отличаются от данных Dong J., который показал, что 94% прокатепсина L секретiruется [18]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что наиболее высоким протеолитическим потенциалом характеризуются трансформированные с-Ha-ras онкогеном REF-2EJ клетки, меньшим потенциалом обладают trF8 фибробласты, трансфицированные геном E7 вируса папилломы человека тип 16, а наиболее низкий протеолитический потенциал имеют A5E5(pC7-1) фибробласты, трансформированные E6/E7 областью генома вируса папилломы человека тип 18. Эти результаты коррелируют с данными по изменению морфологической характеристики и проявлению трансформированного фенотипа изучаемых клеток в процессе трансформации [7,9,13]. Предварительные результаты по изучению эндогенных ингибиторов цистеиновых протеиназ позволяют предположить, что при трансформации клеток могут изменяться как уровень синтеза, так и свойства этих ингибиторов, что приводит к уменьшению степени ингибирования ферментов.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, проект 97-04-49331.

ЛИТЕРАТУРА.

1. Sloane B.F. and Berquin I.M. (1994). In book: Proteolysis and Protein Turnover. - London and Chapel Hill, «Portland Press Proceeding».- pp. 225-231.
2. Ahram M. and Sloane B.F. (1997). In book: Proteolysis in Cell Functions. - Amsterdam, IOS Press.- pp. 455-463.
3. Rozhin J., Gomez A.P., Zieger G.H., et al. (1990). Cancer Res.- **50**.- 6278-6284.
4. Calkins C.C. and Sloane B.F. (1995). Biol. Chem. Hoppe-Seyler.- **376**.- 71-80.
5. Gottesman M.M. (1994). In Proteolysis and Protein Turnover.- London and Chapel Hill, «Portland Press Proceeding».- pp. 247-251.
6. Тополь Л.З., Тараховский А.М., Ревазова Е.С. и др. (1986). Бюл. exper. биол. мед.- **N 2**.- 190-192.
7. Тополь Л.З., Спитковский Д.Д. и Киселев Ф.Л. (1988). Бюл. exper. биол. и мед.-**N3**.- 329-332.
8. Комиссарова Е.В., Ревазова Е.С. и Киселев Ф.Л. (1988). Бюл. exper. биол. и мед.- **N 3**.- 347-349.
9. Yartseva N., Komissarova E.V., Zhurbitskaya V.A. et al. (1997). Oncology Reports.- **4**.- 629-635.
10. Komissarova E.V., Spitkovsky D.D. and Kisseljov F.L. (1991). Biomedical Science.- **3**.- 305-308.
11. Дилакян Э.А., Балаевская Т.О., Закамалдина-Цама Т.А. и др. (1994) Вopr. мед. химии.- **40**-(N 3).- 2-6.
12. Solovyeva N.I., Balayevskaya T.O., Dilakyan E.A., et al. (1995). Int. J. Cancer.- **60**.- 495-500.

13. Журбицкая В.А., Ровенский Ю. А., Каверина И.Н. и др. Бюл. exper. биол. и мед. - в печати
14. Дилакян Э.А. , Соловьева Н.И. и Тополь Л.З. (1991). Вopr. мед. химии.-37 (6). - 36-39.
15. Рокитский П.Ф. (1963) В кн.: "Биологическая статистика". Минск. "Высшая школа"
16. Lah T.T., Clifford J.L., Helmer K.M. et al. (1989). Bioch. Biophys. Acta.- 993.- 63-73.
17. Lah T.T., Kokalj-Kunovar M. and Turk V. (1990). Biol. Chem. Hoppe-Seyler.- 371.- Suppl.- 199-203.
18. Dong J., Prencce E.M. and Sahagian G.G. (1989). J.Biol. Chem.- 264.- 7377- 7383.

CATHEPSINS L AND B AND THEIR ENDOGENOUS INHIBITORS IN EMBRYO FIBROBLASTS TRANSFORMED BY DIFFERENT GENES.

E.A. DILAKYAN, S.V. VINOKUROVA, V.A. ZHURBITSKAYA, E.V. KOMISSAROVA,
L.Z. TOPOL, F.L. KISSELJOV, N.I. SOLOVYEVA

Institute of Biomedical Chemistry RAMS, Pogodinskaya St., 10, Moscow, 119832 Russia,
Institute of Carcinogenesis, Cancer Research Center, RAMS

Expression of cysteine proteinases, cathepsins L and B, and their inhibitors was studied out in three model systems of rat embryo fibroblasts, sequentially immortalized and transformed by different genes. In Model I rat embryo fibroblasts were immortalized with DNA of early region of simian adenovirus SA7 (clone REF-1) and then transformed by c-Ha-ras oncogene (REF-2EJ; malignant transformation). In Model II and III, the immortalized fibroblasts (clone IE5) were obtained by transfection with the polyoma virus LT gene and the clone IE5 used lost this gene; the malignant transformation was achieved by transfection with the E7 gene (clone trF8; Model II) and E6/E7 genes {clone A5E5(pC7-1); Model III} of human papilloma virus types 16 and 18 respectively. In Model I, the increase in the total cathepsin L and B activity was correlated with the stages of transformation, at the same time, in Models II and III, this activity in immortalized IE5 fibroblasts was higher than at transformation stage. The activity of cathepsin L in lysates of transformed fibroblasts - REF-2EJ, significantly exceeded this activity both in transformed cells trF8 and A5E5(pC7-1) (6- and 10-fold, respectively). In cell cultures of Models I and II, the increases in secreted activity of cathepsins L and B were correlated with the stages of fibroblasts transformation, but in cultures of Model III, this activity at the stage of malignant transformation was lower than that the stage of immortalization. Therefore, the activities of cathepsins L and B were expressed to varying degrees at different stages of oncogenic transformation and the expression of their activities were dependent on type of transforming gene. It was established that changes in proteolytic potential were correlated with differences in the transforming phenotype of cell clones. An endogenous inhibitor(s) of cysteine proteinases was found in conditioned media of all type cell cultures. Expression and inhibitory properties of this inhibitor(s) were different at distinct stages of transformation.

Key words: cysteine proteinases, cathepsins, endogenous inhibitor, fibroblasts, immortalization, transformation, genes.