

УДК 577.3.4\*24'142

©Коллектив авторов

## ЭКСПРЕССИЯ ИНТЕРСТИЦИАЛЬНОЙ КОЛЛАГЕНАЗЫ И ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ЕЁ АКТИВНОСТИ В ФИБРОБЛАСТАХ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ГЕНОМ E7 HPV-16

*О.С. Рыжакова<sup>1</sup>, Т.А. Гуреева<sup>1</sup>, В.А. Журбицкая<sup>2</sup>, Н.И. Соловьева<sup>1\*</sup>*

<sup>1</sup>ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, эл. почта: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

<sup>2</sup>Центр физико-химической фармакологии РАН, Москва

Матриксным металлопротеиназам (ММП) отводится ключевая роль в развитии процессов инвазии и метастазирования при канцерогенезе. Цель работы - выяснение особенностей экспрессии и взаимодействия интерстициальной коллагеназы – ММП-1 и эндогенных регуляторов её активности при трансформации фибробластов геном E7 HPV16. Вирусы папиллом высокого риска (HPV 16 и 18 типов) являются этиологическим фактором рака шейки матки. В иммортализованных и трансформированных линиях клеток проведено исследование экспрессии МТ1-ММП (мембраносвязанной ММП) и ММП-1, а также тканевого ингибитора этих ферментов – ТИМП-1 и активатора плазминогена урокиназного типа (уАП), активирующего ММП-1 через плазмин. Исследовали экспрессию мРНК (RT-PCR) и энзиматическую активность эмбриональных фибробластов (первичные фибробласты – ПФ) крысы и фибробластов последовательно иммортализованных LT-геном вируса полиомы (иммортализованные фибробласты - ИФ) и трансформированных геном E7 HPV-16 (трансформированные фибробласты - ТФ). Трансформация фибробластов геном E7 HPV16 сопровождалась: а) увеличением экспрессии мРНК МТ1-ММП в 2-3 раза; б) снижением экспрессии ТИМП-1 в 1,5-2 раза; в) экспрессия уАП в ТФ оставалась на уровне ПФ. В ИФ было обнаружено: а) увеличение экспрессии МТ1-ММП в 1,5-2 раза; б) экспрессия ТИМП-1 не изменялась; в) увеличение экспрессии уАП в 2-4 раза по сравнению как с ПФ так и с ТФ. Коллагенолитическая активность как секретируемая (ММП-1), так и мембраносвязанная (МТ1-ММП), измеренная в лизатах, в ТФ возрастала, а уровень свободных эндогенных ингибиторов снижался по сравнению с ИФ. Данные по экспрессии генов согласуются с данными по энзиматической активности и свидетельствуют о том, что как при трансформации так и при иммортализации наблюдается нарушение баланса фермент/ингибитор/активатор. Однако в ТФ эти нарушения выражены в значительно большей степени, что в конечном итоге приводит к увеличению активности ММПз и их деструктивного потенциала.

**Ключевые слова:** матриксные металлопротеиназы, ММП-1, МТ1-ММП, ТИМП-1, уАП, HPV16.

**ВВЕДЕНИЕ.** Интерстициальная коллагеназа относится к семейству матриксных металлопротеиназ (ММП), функция которых связана с обменом компонентов соединительнотканного матрикса (СТМ). ММП играют ключевую роль в генерализации процессов инвазии и метастазирования, которые определяют степень злокачественности опухолей [1-6]. Коллагеназы специфически гидролизуют белки группы коллагена, которые составляют 20-25% от общего количества белков в организме и являются одним из основных компонентов СТМ.

\* - адресат для переписки

## ИНТЕРСТИЦИАЛЬНАЯ КОЛЛАГЕНАЗА I И ЕЁ РЕГУЛЯТОРЫ

Коллагеназа I типа или интерстициальная коллагеназа – ММП-1 инициирует специфический гидролиз фибриллярных коллагенов I, II и III типов (которые составляют более 90% общего количества коллагенов) и тем самым обеспечивает инвазию клеток в матрикс [1, 2, 4]. ММП-1, как и большая часть ММП, относится к индуцируемым, секретлируемым ферментам. Индукция их синтеза может происходить с помощью онкогенов, цитокинов, химических агентов и других факторов. Регуляция активности ММП на посттрансляционном уровне в организме осуществляется с помощью эндогенных активаторов и ингибиторов. Основными эндогенными ингибиторами ММП являются тканевые ингибиторы ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-3 и ТИМП-4, которые обладают относительной специфичностью [1, 3-5]. Так, ТИМП-1 предпочтительно ингибирует ММП-1. Активация про-ММП происходит ступенчато с участием нескольких протеиназ в том числе и некоторых ММП. Основным физиологическим активатором про-ММП-1 является плазмин [1, 3-6]. Аналогичной ММП-1 специфичностью обладает мембраносвязанная ММП – МТ1-ММП, которую считают интерстициальной коллагеназой, связанной с мембраной [7]. Она характеризуется всеми основными свойствами ММП-1. Предпочтительная экспрессия той или иной ММП (например, коллагеназ или желатиназ, специфически гидролизующих базальные мембраны, мембраносвязанных ММП или секретлируемых) может привести к различным последствиям, учитывая их специфичность и локализацию. Основные исследования по выяснению роли ММП в многоступенчатом процессе канцерогенеза и, в частности, при раке шейки матки, проводятся на клинических образцах с использованием иммуногистохимических методов [8-12]. С целью изучения особенностей экспрессии и взаимодействия ММП и эндогенных регуляторов их активности в процессе канцерогенеза было проведено исследование экспрессии активности интерстициальной коллагеназы – ММП-1, мембраносвязанной ММП – МТ1-ММП, а также уАП, как участника активации про-ММП-1 (через плазмин) и основного тканевого ингибитора ММП-1 и МТ1-ММП – ТИМП-1. В работе исследовали экспрессию мРНК и энзиматическую активность в иммортализованных и трансформированных геном E7 HPV16 фибробластах крысы. Вирусы папиллом высокого риска (HPV 16 и 18 типов) являются этиологическим фактором рака шейки матки, который занимает второе место (после рака молочной железы) по смертности у женщин при онкологических заболеваниях.

**МЕТОДИКА.** *Клеточная модель.* Работа проведена на эмбриональных фибробластах крысы линии Фишер, которые были последовательно иммортализованы LT-геном вируса полиомы (иммортализованные фибробласты - ИФ) и трансформированы геном E7 вируса папилломы человека 16 типа - HPV-16 (трансформированные фибробласты - ТФ). Эта оригинальная клеточная модель была разработана в лаборатории молекулярной биологии вирусов Института канцерогенеза ОНЦ РАМН [13]. В результате были получены два трансформированных клона - trF8 и trB4, которые различались по степени туморогенности. Клон trF8nmcc был получен путем селекции клона trF8 на бестимусных мышках [14,15]. Все ТФ экспрессировали ген E7 HPV-16. Для работы было проведено три независимых опыта по выращиванию клеток. В качестве контроля использовали первичную культуру эмбриональных фибробластов (ПФ).

*Коллагенолитическую активность определяли в культуральной (кондиционированной) среде и клеточных лизатах.* Клетки культивировали в течение 48 часов в бессывороточной среде DMEM, содержащей 0,5% гидролизат лактальбумина (1:1) с добавлением витаминного раствора (10 мкл/мл) и гентамицина (100 ед./мл). Клетки собирали с помощью 0,0002% раствора химопсина, затем промывали 4-5 раз раствором Хенкса и осаждали центрифугированием при 500 g в течение 10 мин. Кондиционированную среду собирали, замораживали и хранили при -20°C [16].

*Клеточные лизаты* получали путем добавления к клеткам раствора 0,45% NaCl, содержащего 1 mM CaCl<sub>2</sub> и 0,1% тритон X-100 (из расчета 1×10<sup>6</sup> клеток в

0,3 мл раствора), затем клетки подвергали 4-кратному замораживанию-оттаиванию и разрушали в тefлоновом гомогенизаторе. Осадок отделяли центрифугированием при 500 g 10 мин. и в супернатанте определяли активность. Все процедуры проводили при 4–7°C

*Активность ММП-1* определяли, используя собственный метод [17]. Для определения активности интерстициальной коллагеназы (коллагеназы I типа - ММП-1) использовали меченый флуоресцеинизотиоцианатом коллаген I типа, полученный из кожи крыс. Раствор меченого коллагена доводили до pH 7,6 концентрированным трис-HCl буфером. После чего 15 мкл коллагена вносили в короткие стеклянные пробирки, пробы инкубировали в течение 2 часов при температуре 35°C до образования реконструированных фибрилл (пленок). Затем в течение 1-2 часов эти пробы инкубировали в 1-2 мл 0,01М трис-HCl буфера pH 7,6 с добавлением 1 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0,2 М NaCl (рабочий буфер) для промывания пленок от слабо связанного флуоресцеина (иногда эту процедуру повторяли дважды). Буфер отбирали и в нем измеряли флуоресценцию, значение которой в контрольных пробах не превышало 20-25 единиц флуоресценции. На поверхность пленок наносили исследуемые пробы. Источником тканевой интерстициальной коллагеназы служили культуральная среда и лизаты фибробластов. В пробы вносили от 20 до 1000 мкл культуральной среды, что соответствовало 0,1–1,3 млн клеток, или от 3 до 50 мкл супернатанта клеточного лизата, что соответствовало 30–500 тысячам клеток соответственно. После внесения соответствующего количества среды или лизата объем пробы доводили до 1 мл 0,01 М трис-HCl буфером pH 7,6 с добавлением 1 мМ CaCl<sub>2</sub> и 0,2 М NaCl. Инкубацию проводили в течение 18-20 часов при 35°C. Контролем служили пробы, инкубированные с буфером, а также пробы с определенным количеством трипсина (от 2 до 10 мкг). После ночной инкубации (20 часов) пробы аккуратно отбирали пипеткой и флуоресценцию измеряли при длинах волн 490 и 520 нм возбуждения и поглощения соответственно. Гидролиз пленок трипсином служил в качестве показателя степени их возможной денатурации при мечении коллагена. В наших экспериментах он не превышал 5-10%.

Для расчета активности в мкг подвергшегося гидролизу субстрата использовали калибровочную кривую, построенную по гидролизу различных количеств меченого коллагена бактериальной коллагеназой, принимая за 100% гидролиз коллагена этим ферментом.

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента, различия считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .

*Одновременное выделение ДНК и РНК.* ДНК и РНК выделяли из клеток, гомогенизированных в растворе гуанидинизотиоцианата, с последующим наслаиванием на раствор CsCl, дальнейшим центрифугированием при 30000 об/мин, 16 час. (центрифуга Beckman L7, ротор SW 50.1), и разделением на фракции ДНК и РНК, как описано [18].

*Реакцию обратной транскрипции РНК проводили по методу [19].*

Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг тотальной клеточной РНК. Реакцию проводили в конечном объеме 20 мкл в следующих условиях: RT буфер для обратной транскрипции (50 мМ трис-HCl pH 8,4, 75 мМ KCl, 3 мМ MgCl<sub>2</sub>, 0,01 М ДТТ), 0,1 мМ каждого из четырех дезоксинуклеозидтрифосфатов (dNTP), 20 пмоль гексапраймера (Литех) и 200 ед. активности обратной транскриптазы Superscript<sup>™</sup> II RNaseH<sup>-</sup> ("Invitrogen", США). Первоначально смесь РНК, dNTP и гексапраймера в соответствующем объеме прогревали при 65°C в течение 5 мин., затем охлаждали в ледяной бане и добавляли буфер с ДТТ для обратной транскрипции. Смесь прогревали 2 мин при 42°C и вносили обратную транскриптазу. После этого реакционную смесь выдерживали при 25°C в течение 10 мин (для удлинения праймера) и далее проводили основную реакцию обратной транскрипции при 42°C в течение 1 ч. В завершение реакционную смесь прогревали при 50°C 10 мин и при 70°C в

## ИНТЕРСТИЦИАЛЬНАЯ КОЛЛАГЕНАЗА I И ЕЁ РЕГУЛЯТОРЫ

течение 15 мин (для инактивации фермента) и разводили бидистиллированной водой до конечного объема 100 мкл. Полученную кДНК в количествах, подобранных экспериментальным путем, использовали в полуколичественной ПЦР со специфическими праймерами. Праймеры были подобраны к участкам последовательностей ДНК, расположенным в разных экзонах генов крысы MT1-ММП, TIMP1. Праймеры к последовательности ДНК гена крысы уАП были заложены в один экзон. Чтобы избежать считывания продукта с примесей ДНК, кДНК крысиных клеточных линий получали с обработкой РНК ДНКазой (Deoxyribonuclease I, Amplification Grade, 1U/мкл, Invitrogen).

*Условия полимеразной цепной реакции (ПЦР).*

Исследование экспрессии генов проводили методом полуколичественной ПЦР. Для подбора специфических праймеров были использованы данные GeneBank Nucleotide Sequence Database. Для оценки структуры праймеров использовали компьютерную программу Oligo 4.1 Primer Analysis Software.

Состав праймеров, использованных в данной работе и условия реакции приведены в таблице 1.

*Таблица 1. Условия ПЦР для амплификации кДНК MT1- ММП, TIMP-1 и уАП крысы.*

кДНК	1 – прямой праймер 2 – обратный праймер	Размер продукта	Темпе- ратура отжига	Количество циклов
уАП	1 -5' cat tca tga ggt ctg ctg tt 3' 2 - 5' gga ata ata cat tca agt gga 3'	392 п.н.*	58°C	36
MT1-ММП	1 - 1-5' cct ttt acc agt gga tgg ac 3' 2 2 - 5' cca gct cct taa tgt gct tg 3'	444 п.н.	56°C	29
TIMP-1	1 - 5' gac cac ctt ata cca gct tt 3' 2 - 5' caa agt gat cgc tct ggt ag 3'	401 п.н.	56°C	26
GAPDH	1 - 5' acc aca gtc cat gcc atc ac 3' 2 - 5' tcc acc acc ctg ttg ctg ta 3'	450 п.н.	60°C	28

Примечание.\* п.н. – пар нуклеотидов; GAPDH - глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа.

ПЦР проводили в реакционной смеси (25 мкл), содержащей следующие компоненты: 60 мМ трис-НСI pH 8,6; 1,6 мМ сульфат аммония; 0,01% тритон X-100; 2,5 мМ MgCl<sub>2</sub>; 0,1 мМ каждого из dNTP; 10% глицерина; 20-25 пМ каждого из праймеров и 1-2,5 ед. активности *Taq*-полимеразы; кДНК добавляли в количестве 20-100 нг на одну реакцию. Реакции проводились на аппарате “Терцик” по следующей программе: 94°C – 30 сек,  $t_{отж}$  °C – 30 сек (см. табл. 1), 72°C – 1 мин, (количество циклов для каждой пары праймеров подбиралось индивидуально). Перед началом первого цикла осуществляли денатурацию кДНК при 94°C в течение 5 мин. Полученные ПЦР-продукты анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле.

*Электрофорез в агарозном геле.*

Продукты ПЦР разделяли в 1,5% агарозном геле с бромидом этидия (0,5 мкг/мл). Гель готовили на 0,04 М трис-ацетатном буфере с 0,001 М EDTA, pH 8,0.

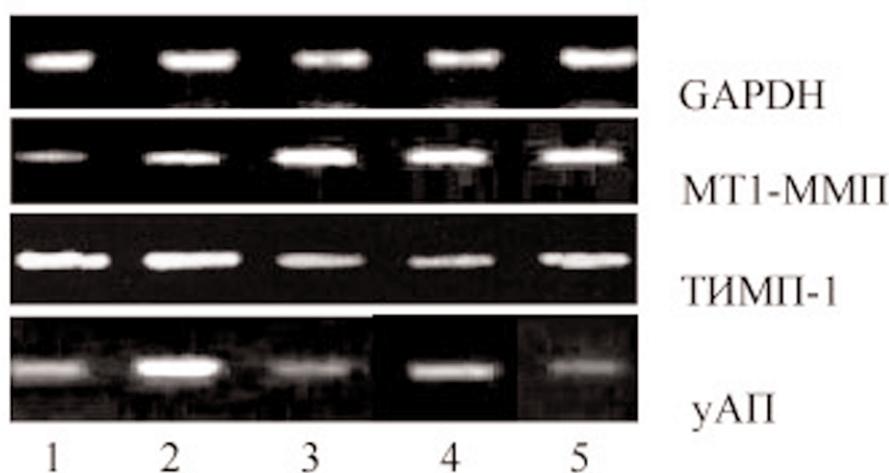
В качестве маркера молекулярной массы использовали Ladder 100 bp (СибЭнзим). Электрофорез проводили при напряжении 5 В. Перед нанесением на гель к раствору ДНК добавляли буфер для нанесения. Распределение продуктов ПЦР в агарозном геле определяли по флуоресценции бромистого этидия в ультрафиолетовом (УФ) свете с длиной волны от 240 до 360 нм. Количественную оценку продуктов экспрессии проводили методом денситометрии.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Проведено сравнительное исследование экспрессии МТ1-ММП, уАП, а также тканевого эндогенного ингибитора ММП-1 – ТИМП-1 в иммортализованных (ИФ) и трансформированных (ТФ) геном E7 HPV-16 фибробластах крысы. Следует отметить, что уАП является активатором плазминогена, а плазмин рассматривается как основной физиологический активатор про-ММП-1.

Исследование экспрессии генов проведено методом полуколичественной обратной полимеразной цепной реакции (ПЦР). Данные по экспрессии мРНК ММП-1 в фибробластах крысы отсутствуют, т.к. не удалось подобрать праймеры для этого фермента. Дело в том, что ген ММП-1 крысы не секвенирован, а подбор праймеров на основе последовательности гена ММП-1 человека не дал результатов. Результаты по экспрессии МТ1-ММП (рис. 1) свидетельствуют о том, что уровень экспрессии мРНК этого фермента в ИФ и одном (trB4) из трёх клонов ТФ повышался в 2 раза, а в двух других трансформированных клонах (tr8 и tr8nmcc) - в три раза по сравнению с ПФ (по данным денситометрии). Из полученных данных следует, что процессы как иммортализации так и трансформации указанными генами сопровождаются увеличением экспрессии МТ1-ММП. Установлено, что МТ1-ММП по своим энзимологическим свойствам очень сходна с ММП-1, неслучайно ее считают ММП-1, связанной с мембраной [7]. Активность этого фермента проявляется в перичеллюлярном пространстве не только как фермента, специфически гидролизующего определенные субстраты, но и как активатора другой ММП, а именно желатиназы А – ММП-2, специфически гидролизующей коллаген базальных мембран. Увеличение экспрессии МТ1-ММП приводит к повышению активности ММП-2, которое происходит двумя путями. С одной стороны, МТ1-ММП, участвуя в образовании тройного активационного комплекса на поверхности клетки, является рецептором для ММП-2 [20]. Таким образом, происходит концентрирование ММП-2 на инвазирующих участках клеточной поверхности. С другой стороны, повышение экспрессии МТ1-ММП приводит к увеличению количества молекул МТ1-ММП, активирующих ММП-2. Таким образом, увеличение экспрессии МТ1-ММП приводит к локализации и активации деструктивных процессов в перичеллюлярном пространстве, что является важным фактором для инвазии опухолевых клеток. Способность опухолевых клеток связывать на своей поверхности (“концентрировать”) и активировать ММП-2 является не менее важным свойством, чем уровень экспрессии ММП и, в частности, МТ1-ММП. Данные по экспрессии ТИМП-1 свидетельствуют о том, что в ПФ и ИФ экспрессия этих ингибиторов происходит на одном уровне, а в ТФ она снижается в 1,5 – 2 раза во всех трех клонах по сравнению как с первичными так и иммортализованными фибробластами (рис. 1). Снижение синтеза ингибитора способствует увеличению активности ферментов, на которые направлено его действие, т.е. ММП-1 и МТ1-ММП. Исследование экспрессии уАП показало, что увеличение экспрессии в 1,5–2 раза мРНК этого фермента происходит только в ИФ, в то время как в ТФ она находится на уровне ПФ. уАП выступает косвенным регулятором активности ММП. Этот фермент активирует плазминоген, который рассматривается как основной физиологический активатор многих ММП, в том числе ММП-1. Активатором МТ1-ММП является фурин – сериновая протеиназа субтилизинового типа. Активация МТ1-ММП может происходить в аппарате Гольджи [2, 6]. Таким образом трансформация фибробластов геном E7 HPV16 сопровождается изменением уровней экспрессии генов исследованных ферментов и ингибитора.

## ИНТЕРСТИЦИАЛЬНАЯ КОЛЛАГЕНАЗА I И ЕЁ РЕГУЛЯТОРЫ

Условно соотношение величин экспрессии мРНК в исследованных клонах, Ref, IE5, trF8, trB4, trF8nmcc, по данным денситометрии, можно представить следующими показателями: для МТ1-ММП как 0,7; 1,4; 2,4; 1,8; 2,1; для ТИМП-1 как 2,6; 2,5; 1,4; 1,0; 2,0; для уАП как 1,2; 2,7; 1,0; 1,3; 1,5 соответственно. Следовательно, при трансформации наблюдается нарушение баланса экспрессии фермент/ингибитор/активатор, при этом происходит увеличение экспрессии фермента, уменьшение экспрессии ингибитора, в то время как экспрессия активатора остается в норме, и в конечном итоге эти нарушения направлены на увеличение активности ММП.



**Рисунок 1.**

Сравнительный анализ уровня экспрессии мРНК генов МТ1-ММП, ТИМП-1 и уАП. Для реакции обратной транскрипции брали 1мкг РНК каждого клона клеток: 1-ref, 2-IE5, 3-trF8, 4-trF8nmcc, 5-trB4

Исследование коллагенолитической активности ММП-1 (оцениваемой по гидролизу коллагена I типа) показало (рис. 2, 3), что в ТФ активность ММП-1 (как секретируемая так и в лизатах клеток) увеличивается в 2-3 раза по сравнению с ИФ, причем уровень активности в лизатах был значительно ниже, чем в кондиционированной среде (рис. 3). Следует отметить, что ММП-1 относится к секретируемым ММП, в то время как МТ1-ММП связана с мембраной. Коллагенолитическая активность, обнаруженная в лизатах клеток, а именно в этой фракции содержатся мембраносвязанные ММП, свидетельствует об активности МТ1-ММП, которую по субстратной специфичности считают ММП-1, связанной с мембраной. Активация про-ММП-1 и про-МТ1-ММП трипсином приводила к значительному увеличению активности (в 1,5- 2 раза), исключение составлял клон trF8nmcc, где активность в лизатах существенно не изменялась по сравнению с ИФ. Эти результаты свидетельствуют о наличии значительного количества ММПз в форме предшественников. Данные по увеличению коллагенолитической активности в ТФ согласуются с полученными нами данными по увеличению экспрессии мРНК в исследованных клонах.

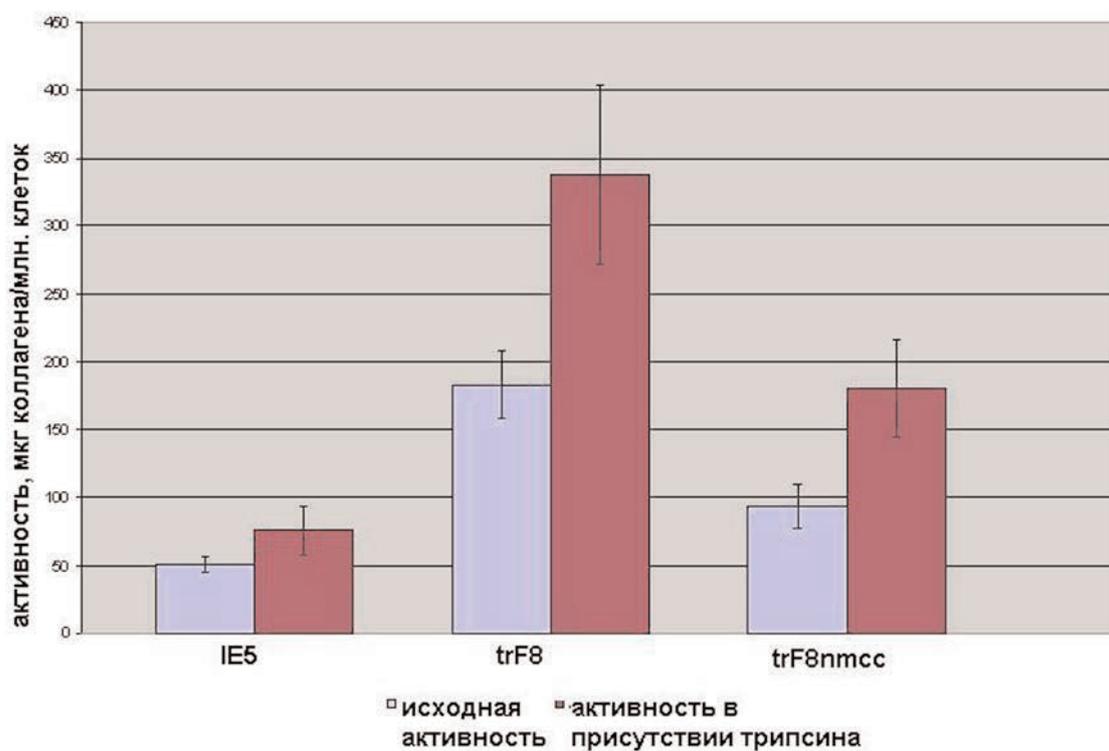


Рисунок 2.  
Секретируемая активность коллагеназ I типа.

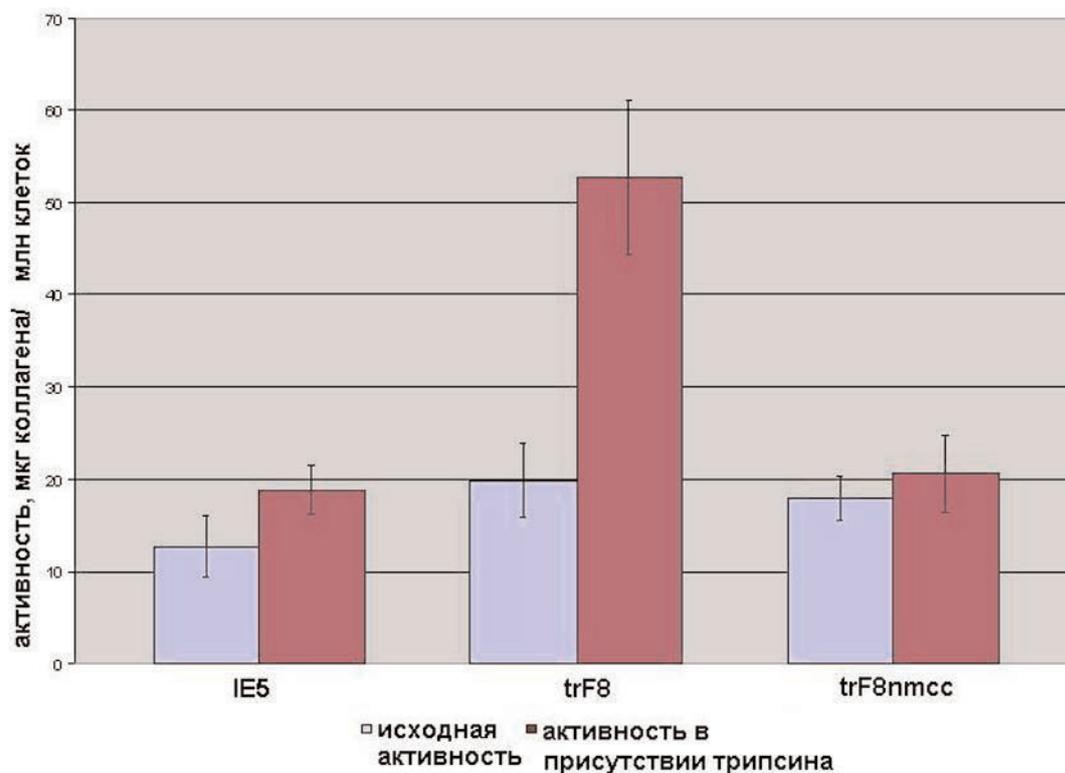


Рисунок 3.  
Активность коллагеназ I типа в лизатах клеток.

## ИНТЕРСТИЦИАЛЬНАЯ КОЛЛАГЕНАЗА I И ЕЁ РЕГУЛЯТОРЫ

Наличие свободных эндогенных ингибиторов ММПз в кондиционированной среде определяли методом разведений. Следует подчеркнуть, что это в значительной степени качественный, а не количественный подход к обнаружению свободных эндогенных ингибиторов ММП. Однако он позволяет оценить тенденцию и в какой-то мере степень изменений соотношения фермент/ингибитор. В качестве субстрата использовали коллаген I типа. Кондиционированную среду разводили в 2-10 раз. В таблице 2 представлены данные только для трёх разведений, где прослеживается общий характер изменений соотношения фермент/ингибитор.

*Таблица 2.* Активность коллагеназ I типа при различных разведениях кондиционированной среды.

Клон клеток	Активность, мкг коллагена / 1млн. клеток*		
	(при различных разведениях кондиционированной среды)		
	1:5	1:2	1:1
IE5	53,03±2,81	60,12±2,25	32,53±3,47
trF8	116,67±14,43	130,0±24,75	98,13±21,83
trF8nmcc	95,93±10,96	113,0±13,73	97,19±18,5

Примечание. \* - Каждое значения является средним ± SD из пяти независимых опытов.

Из полученных данных следует, что свободные ингибиторы коллагеназ выявляются во всех клеточных клонах. Однако в иммортализованных клетках (IE5) в большей степени, чем в обоих трансформированных клонах. Эти результаты согласуются с полученными нами данными по уменьшению экспрессии мРНК ТИМП-1 в трансформированных клонах и свидетельствуют о том, что во всех трансформированных клетках соотношение фермент/ингибитор существенно изменено по сравнению с исходными и иммортализованными фибробластами. Снижение количества свободных эндогенных ингибиторов ММП может свидетельствовать о большей потенциальной возможности проявления ферментативной активности ММП. Результаты данной работы несколько отличаются от данных, полученных нами ранее [16], где было показано снижение активности ММП-1 в ТФ по гидролизу радиоактивного коллагена и значительно большая часть активности ММП оставалась в лизатах. Следует отметить, что в данном исследовании использовали другой субстрат - коллаген с флуорогенной меткой и активность в ТФ сравнивали не с первичными фибробластами, а с иммортализованными, активность которых была ниже ПФ, кроме того в этой работе не было проведено исследование экспрессии генов и условия выращивания клеточных клонов были несколько изменены. В настоящем исследовании данные по экспрессии генов как МТ1-ММП, так и ТИМП-1 и уАП однозначно согласуются с результатами по исследованию ферментативной активности ММП-1 и МТ1-ММП.

**ВЫВОДЫ.** Исследование экспрессии мРНК и активности ММП-1, МТ1-ММП, а также уАП и эндогенного ингибитора этих ферментов – ТИМП-1 в первичных, иммортализованных и трансформированных фибробластах показало, что:

1. Трансформация фибробластов геном E7 HPV16 сопровождается увеличением экспрессии мРНК МТ1-ММП, снижением экспрессии ТИМП-1, который является ингибитором как ММП-1 так и МТ1-ММП, а экспрессия уАП в ТФ остается на уровне первичных фибробластов.

2. Коллагенолитическая активность в ТФ возростала (как секретируемая так и активность в лизатах клеток), а уровень свободных эндогенных ингибиторов снижался по сравнению с ИФ, т.е. изменение активности ММП соответствовало изменению экспрессии их генов.

3. В ИФ обнаружено увеличение экспрессии мРНК МТ1-ММП, экспрессия ТИМП-1 не изменялась по сравнению с ПФ и была выше, чем в ТФ, а экспрессия уАП существенно увеличивалась по сравнению с ПФ и ТФ.

4. Данные по экспрессии генов согласуются с данными по энзиматической активности и свидетельствуют о том, что как при трансформации, так и при иммортализации фибробластов наблюдается нарушение баланса фермент/ингибитор/активатор, причем в ТФ эти нарушения приводят к значительному увеличению активности ММПз.

Данные по экспрессии генов и уровню ферментативной активности ММПз и регуляторов их активности получены на оригинальной модели фибробластов крысы, позволившей выделить стадию иммортализации и получить клоны с различным опухолевым потенциалом [13, 14]. Полученные результаты свидетельствуют о существенных изменениях соотношений фермент/ингибитор/активатор не только в ТФ, но и в ИФ. Они указывают на значительное увеличение деструктивного потенциала клеток при трансформации, а именно деструктивный процесс характеризует степень злокачественности опухолей. Исследование ММПз и особенностей регуляции их активности в определенных видах опухолей вносят вклад в понимание механизмов инвазивных процессов при канцерогенезе. Основные исследования ММП и их регуляторов в клинике при раке шейки матки проводятся чаще всего на образцах карцином с использованием иммуногистохимических и иммунохимических методов, RT-PCR используется очень редко. Результаты имеют прогностическое значение и используются при разработке терапевтических средств [8-12].

Авторы выражают глубокую благодарность к.б.н. Н.П. Киселевой и чл.-корр. РАМН Ф.Л. Киселеву (лаборатория молекулярной биологии вирусов Института канцерогенеза РАМН) за поддержку и помощь в работе по экспрессии ММПз и их регуляторов.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 07-04-01233).

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Ala-aho R., Kahari V.-M.* (2005) *Biochimie*, **87**, 273-286.
2. *Zhai Ya., Hotary K.B., Nan B., Bosch F.X., Munoz N., Weiss St.J., Cho K.R.* (2005) *Cancer Res.*, **65**, 6543-6550.
3. *Nagase H., Visse R., Murphy G.* (2006) *Cardiovasc. Res.*, **69**, 562-573.
4. *Malemud C.J.* (2006) *Front Biosci.*, **11**, 1696-1701.
5. *Deryugina E.I., Quigley J.P.* (2006) *Cancer Metastasis Rev.*, **25**, 9-34.
6. *Fingleton B.* (2006) *Front Biosci.*, **11**, 479-491.
7. *Holmbeck K., Bianc P., Yamada S., Birkedal-Hansen H.* (2004) *J. Cell. Physiol.*, **200**, 11-19
8. *zur Hausen H.* (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **129**, 342-350.
9. *Asha Nair S., Rarunagaran D., Nair M.B., Sudhakaran P.R.* (2003) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **129**, 123-131.

## ИНТЕРСТИЦИАЛЬНАЯ КОЛЛАГЕНАЗА I И ЕЁ РЕГУЛЯТОРЫ

10. *Arguello-Ramirez J., Perez-Cardenas E., Delgado-Chavez R., Solorza-Luna G., Villa-Trevino S., Arenas-Huertero F.* (2004) *Int. J. Gynecol. Cancer*, **14**, 333-340.
11. *Gaiotto M.A., Focchi J., Ribalta J.L., Stavale J.N., Baracat E.C., Lima G., Guerreiro da Silva I.D.* (2004) *Am. J. Obstet. Gynecol.*, **190**, 1278-1282.
12. *Seiki M.* (2003) *Cancer Lett.*, **194**, 1-11.
13. *Komissarova E.V., Soyfer M.V., Pavlova L.S., Kissel'jov F.L.* (1995) *Oncol. Rep.*, **2**, 1169-1174.
14. *Zhurbitskaya V.A., Fedorova L.I., Yartseva N.M., Savel'eva L.V., Zelenin A.V., Kissel'jov F.L.* (1999) *Mol. Biol.* **33**, 243-247.
15. *Yartseva N., Komissarova E., Zhurbitskaya V., Kissel'jova N., Pavlova L., Fedortseva R., Kissel'jov F.* (1997) *Oncol. Rep.*, **4**, 629-635.
16. *Соловьева Н.И., Винокурова С.В., Дилакян Э.А., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Балаевская Т.О.* (2001) *Вопр. мед. химии*, **47**, 72-79.
17. *Рыжакова О.С., Соловьева Н.И.* (2005) *Биомед. химия*, **51**, 432-438.
18. *Samoylova E.V., Shaikhaiev G.O., Petrov S.V., Kissel'jova N.P., Kissel'jov F.L.* (1995) *Int. J. Cancer*, **61**, 337-341.
19. *Ivanova T., Vinokurova S., Petrenko A., Eshilev E., Solovyova N., Kissel'jov F., Kissel'jova N.* (2004) *Int. J. Cancer*, **108**, 882-886.
20. *Strongin A.Ya., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5331-5338.

Поступила: 25. 11. 2006.

### EXPRESSION OF INTERSTITIAL COLLAGENASE AND ITS ENDOGENOUS REGULATORS IN IMMORTALIZED AND TRANSFORMED BY E7 GENE HPV16 FIBROBLASTS

*O.S. Ryzhakova<sup>1</sup>, T. A. Gureeva<sup>1</sup>, V.A. Zhurbitskaya<sup>2</sup>, N.I. Solovyeva<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, Pogodinskaya ul., 10, Moscow, 119121 Russia, fax 245-08-57; e-mail: Nina.solovyeva@ibmc.msk.ru;

<sup>2</sup>Centre of Physical and Chemical Pharmacology, RAS, Moscow, Russia

Matrix metalloproteinases (MMPs) play a critical role in tumor development and invasion. The aim of this study is to elucidate peculiarity of expression of interstitial collagenase (MMP-1) and its endogenous regulators in the process of oncogenic transformation of fibroblasts by E7 gene of HPV16. Papilloma virus type 16 and 18 are aetiological factor of cervical cancer. We have studied expression of MT1-MMP, MMP-1, tissue inhibitor of these proteases – TIMP-1 and urokinase-type plasminogen activator (uAP). The study was carried out using fibroblasts immortalized by LT gene (IF) and transformed by E7 gene of HPV-16 fibroblasts (TF). Primary culture of Fisher rat embryo fibroblasts was used as a control (PF). mRNA expression was studied by RT-PCR, enzymatic activity - by hydrolysis of fluorogenic type I collagen. It was found that cell transformation is accompanied by: a) 2-3 fold induction of MT1-MMP mRNA expression (vs PF); b) the decrease in mRNA level of TIMP-1 (1,5-2 fold); c) unchanged uPA expression. Cell immortalization is accompanied by: a) the increase of MT1-MMP expression (1,5-2 fold); b) unchanged TIMP-1 expression; c) the increase of uPA expression (2-4 fold) (vs PF and TF). MMP secreted activity and activity in lysates of TF increased but the level of free endogenous MMP inhibitors decreased (vs IF). Data on gene expression are consistent with enzymatic data on the collagenolytic activity. These results suggest changes in enzyme/inhibitor/activator ratio both TF and IF and significant enhancement of the destructive potential of the TF.

**Key words:** matrix metalloproteinases, MMP-I, MT1-MMP, TIMP-1, uPA, HPV16.