

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 577.3.4*24'142
©Коллектив авторов

ЭКСПРЕССИЯ ЖЕЛАТИНАЗ А И В И ЭНДОГЕННЫХ РЕГУЛЯТОРОВ ИХ АКТИВНОСТИ В ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

Н.И. Соловьева, С.В. Винокурова, О.С. Рыжакова, Т.А. Гуреева, И.В. Цветкова*

ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, 119121, Москва,
ул. Погодинская, 10; факс: (495)245-0857; эл. почта: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Матриксные металлопротеиназы (ММП) играют ключевую роль в развитии процессов инвазии и метастазирования при канцерогенезе. Цель работы - выяснение особенностей экспрессии ММП-2 и ММП-9 (желатиназ А и В), ММП мембранного типа – МТ1-ММП (активатора ММП-2) и тканевого ингибитора ММП – ТИМП-2 в иммортализованных (ИФ) и трансформированных фибробластах (ТФ). Работа проведена на эмбриональных фибробластах крысы, последовательно иммортализованных LT-геном вируса полиомы и трансформированных геном E7 вируса папилломы человека - HPV16. Вирусы папиллом высокого риска (HPV16 и HPV18 типов) являются этиологическим фактором рака шейки матки. В качестве контроля использовали первичную культуру фибробластов (ПФ). Исследование ТФ и ИФ включало: определение коллагенолитической активности ММП по гидролизу специфического субстрата – радиоактивного коллагена IV типа; анализ спектра ММП методом зимографии; оценку экспрессии мРНК методом ОТ-ПЦР. Установлено, что: 1) коллагенолитическая активность ММП была увеличена только в ТФ, причем наиболее высокими эти показатели были в клетках с наиболее выраженными опухоленными свойствами; 2) исследование спектра ММП показало, что ММП-9 присутствует в основном в ТФ, в то время как ММП-2 обнаружена и в ИФ; 3) экспрессия мРНК ММП-9, МТ1-ММП и ТИМП-2 была увеличена во всех ТФ, в то время как экспрессия ММП-2 увеличивалась только в ТФ, которые прошли селекцию на животных; 4) как коллагенолитическая активность, так и экспрессия мРНК ММП-2 и ММП-9, а также эндогенных регуляторов активности (МТ1-ММП и ТИМП-2) в ИФ не изменялись по сравнению с ПФ. Полученные данные свидетельствуют об изменении соотношения фермент/активатор/ингибитор и существенном увеличении деструктивного потенциала ТФ. По-видимому, ММП-9 может служить маркером фибробластов, трансформированных геном E7 HPV16 в культуре клеток.

Ключевые слова: желатиназы А и В, ММП-2 и ММП-9, ТИМП-2, иммортализация, трансформация, ген E7 HPV-16.

ВВЕДЕНИЕ. Желатиназы А (КФ 3.4.24.24) и В (КФ 3.4.24.35) или коллагеназы IV типа относятся к семейству матриксных металлопротеиназ (ММП), функция которых связана с обменом соединительнотканного матрикса в норме и при патологии. Особое место отводится ММП в генерализации процессов инвазии и метастазирования [1-5]. Критическим событием для метастазирования является проникновение через базальную мембрану [2-4]. Хотя деструкцию этих мембран осуществляет целый ряд протеолитических ферментов, желатиназы А и В (ММП-2 и ММП-9) играют ключевую роль в этом процессе: они специфически гидролизуют коллаген IV типа – основной компонент базальных мембран.

* - адресат для переписки

ЖЕЛАТИНАЗЫ И ИХ РЕГУЛЯТОРЫ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

ММП-2 и ММП-9 используются как маркеры метастатического потенциала и рассматриваются как прогностические факторы при развитии онкологического процесса [3,5]. Большинство ММП, включая ММП-9, относится к индуцируемым секретлируемым ферментам, в то время как ММП-2 конститутивно экспрессируется многими клетками [1-3].

Регуляция активности ММП в физиологических условиях осуществляется с помощью эндогенных активаторов и ингибиторов. Основными эндогенными ингибиторами ММП являются четыре типа тканевых ингибиторов – ТИМПов, которые обладают определенной избирательной специфичностью – ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-3 и ТИМП-4 [1, 6-8]. Все типы ТИМПов могут ингибировать ММП-9, но ТИМП-2 имеет более высокую ингибирующую активность по сравнению с ТИМП-1 и сопоставимую с ТИМП-3. ТИМП-2 специфически связывается с ММП-2 и принимает участие не только в ингибировании активности ММП-2, но и в активации про-ММП-2 [7, 8]. Активация про-ММП происходит ступенчато с участием нескольких протеиназ. Про-ММП-9 активируется сразу после её секреции в ткани. В этом процессе могут принимать участие плазмин, активатор плазминогена, калликреин, катепсин G, ММП-7, однако, основным активатором ММП-9 служит плазмин [1, 2]. В отличие от других ММП про-ММП-2 активируется в мембраносвязанном виде с помощью ММП мембранного типа – МТ-ММП и ТИМП-2 [6]. Для активации необходимо связывание про-ММП-2 с комплексом МТ-ММП/ТИМП-2 и образование тройного комплекса на поверхности клетки, активация которого происходит за счет свободных МТ-ММП. Активные формы ММП-2 могут ингибироваться свободными молекулами ТИМП-2. Присутствие ТИМП-2 в перичеллюлярном пространстве может играть важнейшую роль в контроле локальной деструкции матрикса. Нарушение баланса фермент/активатор/ингибитор может привести к изменению интенсивности деструктивного процесса, который определяет степень инвазии. Экспрессия различных ММП и их регуляторов зависит от целого ряда факторов и прежде всего от вида опухоли и ткани.

Целью настоящего исследования было выяснение особенностей экспрессии и взаимодействия ММП-2 и ММП-9 (желатиназ А и В), ММП мембранного типа – МТ1-ММП (активатора ММП-2) и тканевого ингибитора ММП – ТИМП-2 в фибробластах иммортализованных LT-геном вируса полиомы (ИФ) и фибробластах трансформированных геном E7 вируса папилломы человека - HPV16. Вирусы папиллом высокого риска (HPV16 и HPV18 типов) являются этиологическим фактором рака шейки матки [9].

МЕТОДИКА. *Клеточная модель.* Работа проведена на модели фибробластов крысы линии Фишер, разработанной в лаборатории молекулярной биологии вирусов Института канцерогенеза ОНЦ РАМН. Иммортализованные клетки (клон IE5) были получены в результате трансфекции LT-гена вируса полиомы. В результате последующей трансфекции в иммортализованные клетки гена E7 HPV-16 были получены два трансформированных клона - trF8 и trB4. Клон trF8nmсс был получен путем селекции клона trF8 на бестимульных мышах [10]. Все трансформированные клоны экспрессировали ген E7 HPV-16 и формировали опухоли. В качестве контроля использовали первичную культуру эмбриональных фибробластов (ПФ). Всего было проведено пять независимых опытов по выращиванию клеток.

Определение опухолевых свойств клеток проводили на сингенных крысах линии Фишер. В трех независимых экспериментах каждый клон в количестве 1×10^7 клеток вводили подкожно десятидневным самкам. Через семь дней после введения клеток, у крыс, которым вводили клетки клона trF8nmсс, были обнаружены опухоли диаметром 1 см. Такого же размера опухоли возникали через 10-11 и 20-22 дня при введении клеток клонов trF8 и trB4, соответственно. Введение крысам 1×10^7 клеток родительского клона иммортализованных клеток IE5 не приводило к развитию опухоли у животных даже через 2,5 месяца

наблюдений. Через указанные промежутки времени животных декапитировали. При вскрытии метастазы не были обнаружены ни в одном случае. Опухоль, образованная при введении клеток клона trF8nmcc, обладала наиболее выраженными инвазивными свойствами и прорастала в брюшную полость. Несмотря на большие размеры (10×6 см), в опухоли, образованной в результате введения клеток клона trF8nmcc, не было обнаружено очагов некроза, что говорит о хорошей васкуляризации опухоли. В то же время опухоль, образованная при введении клеток клона trB4, была сильно некротизирована, несмотря на меньшие размеры. Эти наблюдения позволяют условно распределить исследуемые клоны по степени выраженности туморогенных свойств в следующем порядке: trF8nmcc > trF8 > trB4. Гистологически опухоли представляли собой злокачественную гистиоцитому. Таким образом, проведенные исследования иммортализованных фибробластов (IE5) и трех клонов трансформированных геном E7 HPV фибробластов (trF8, trF8nmcc и trB4) показали, что все клоны способны образовывать опухоли у сингенных животных и различаются по степени выраженности туморогенных свойств.

Для определения коллагенолитической активности клетки культивировали в течение 48 часов в бессывороточной среде DMEM, содержащей 0,5% гидролизат лактальбумина (1:1) с добавлением витаминного раствора (10мкл/мл) и гентамицина (100ед./мл) [11]. Клетки собирали с помощью 0,0002% раствора химопсина, затем промывали 4-5 раз раствором Хенкса и осаждали центрифугированием при 200 g в течение 10 минут. Кондиционированную среду собирали, замораживали и хранили при -20°C [12].

Определение активности желатиназ. Активность ММП-2 и ММП-9 определяли, используя в качестве субстрата ¹⁴C-ацетилированный коллаген из капсулы хрусталика глаза крупного рогатого скота [13]. Для активации про-ММП-2 и про-ММП-9 использовали аминофенилмеркуриацетат (АФМА; конечная концентрация в пробе 1 мМ). Реакцию проводили в трис-НСI буфере, рН 7,6, при 37°C в течение 16 часов [14]. Активность выражали в мкг коллагена, гидролизованного в течение 16 часов, рассчитанного на 10⁶ клеток.

Идентификация желатиназ А и В с помощью метода зимографии. Зимографию с сополимеризованным желатином проводили по модифицированному методу, описанному в статье [15]. Концентрация верхнего (концентрирующего) геля - 4%, нижнего (разделяющего) - 7,5%, концентрация желатина - 1,5 мг/мл. Пробы наносили из расчёта 50000 клеток на лунку. Перед нанесением в лунку к пробам добавляли диссоциирующий буфер, содержащий 2,5% SDS, 1% сахарозу и 4 мг/мл фенолового красного (конечные концентрации). Объем проб доводили до 30-40 мкл. Электрофорез (ЭФ) проводили при температуре 9°C в течение 1,5 часов (I=20 mA). Гель промывали 3 раза по 30 минут в 50 mM трис-НСI буфере рН 7,5, содержащем 5 mM CaCl₂, 2,5% тритон X-100. После отмывки гель инкубировали в течение 20 часов при температуре 37°C в указанном выше буфере с 1% тритон X-100, затем гель фиксировали в смеси изопропанол: уксусная кислота: вода = 5 : 2 : 13, окрашивали в течение 30 минут (кумасы R-250) и отмывали в растворе изопропанол : уксусная кислота : вода = 2 : 1 : 17.

Одновременное выделение ДНК и РНК гуанидинизотиоцианатным методом [16]. Замороженные в жидком азоте клетки разрушали до порошкообразного состояния в гомогенизаторе фирмы Braun в течение 20-40 секунд. Полученный порошок ресуспендировали в 4,2 М гуанидинизотиоцианатном буфере с помощью гомогенизатора Daunce (Wheaton). Суспензию прогревали 10 мин при 65°C, центрифугировали при 700 g в течение 10 минут, наслаивали на раствор 5,7 М CsCl (с=1,8 гр/см³) в 0,01 М ЭДТА рН 7,5 и центрифугировали при 80000 g в течение 18 часов при 18°C. ДНК из интерфазного слоя растворяли в 5 объемах 1×STE с 1% SDS. Далее смесь нагревали на водяной бане при 65°C 5 минут, депротеинизировали смесью хлороформ/изоамиловый спирт (24:1), из супернатанта ДНК осаждали 2 объемами 96% этанола, трижды промывали в 70% этаноле

ЖЕЛАТИНАЗЫ И ИХ РЕГУЛЯТОРЫ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

на STE, растворяли в 100 мкл бидистиллированной воды при температуре +4°C 24 часа. Полученные образцы хранились при -20°C. Осадок РНК растворяли в 300 мкл бидистиллированной воды, обработанной диэтилпирикарбонатом (ДЭПК). К полученному раствору добавляли 30 мкл 3 М ацетата натрия pH 5,1 и 2,5 объема 96% этанола. Пробы оставляли при -20°C на 24 часа, после чего РНК осаждали центрифугированием при 20000 g в течение 10 мин, осадок высушивали и растворяли в бидистиллированной воде. Водные растворы РНК хранились при -70°C.

Реакция обратной транскрипции РНК. Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг тотальной клеточной РНК каждого клона. Условия реакции подробно нами описаны ранее [17].

Условия полимеразной цепной реакции (ПЦР). Исследование экспресс 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. Праймеры были подобраны к участкам последовательностей ДНК, расположенным в разных экзонах генов крысы ММП-2, ММП-9, МТ1-ММП и ТИМП-2. Состав праймеров, использованных в работе, и условия реакции приведены в таблице. Количество кДНК, вносимое в реакцию, соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы) для каждого клона клеток. Условия ПЦР описаны ранее [17].

Таблица. Праймеры и условия ПЦР для амплификации кДНК для ММП-2, ММП-9, МТ1-ММП и ТИМП-2.

кДНК	1 - прямой праймер 2 - обратный праймер	Размер продукта	Условия амплификации
ММП-2	1 - 5' cct-gac-caa-gga-tat-agc-ct 3' 2 - 5' tca-cag-tcc-gcc-aaa-tga-a 3'	328 п.н.	54°C, 30 сек, 26 циклов
ТИМП-2	1 - 5' ggt-ctc-gct-gga-cgt-tgg-ag 3' 2 - 5' gga-gcc-gtc-act-tct-ctt-g 3'	304 п.н.	58°C, 30 сек, 24 циклов
МТ1-ММП	1 - 5' cct-ttt-acc-agt-gga-tgg-ac 3' 2 - 5' cca-gct-ctt-taa-tgt-gct-tg 3'	384 п.н.	56°C, 40 сек, 28 циклов
ММП-9	1 - 5' ccc-ggc-att-cag-gga-gat 3' 2 - 5' gaa-tga-tct-aag-ccc-agc-g 3'	649 п.н.	54°C, 30 сек, 28 циклов
GAPDH	1 - 5' acc-aca-gtc-cat-gcc-ata-ac 3' 2 - 5' tcc-acc-acc-ctg-ttg-ctg-ta 3'	450 п.н.	60°C, 30 сек, 28 циклов

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

Полученные ПЦР-продукты анализировали при помощи электрофореза в агарозном геле, как описано [17].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведено сравнительное исследование экспрессии активности желатиназ А и В (коллагеназ IV типа), а также эндогенных регуляторов активности ММП – ТИМП-2 и МТ1-ММП в иммортализованных LT-геном вируса полиомы и трансформированных геном E7 HPV-16 фибробластах. Для идентификации ММП-2 и ММП-9, секретлируемых клетками, использовали метод зимографии с сополимеризованным желатином (рис. 1).

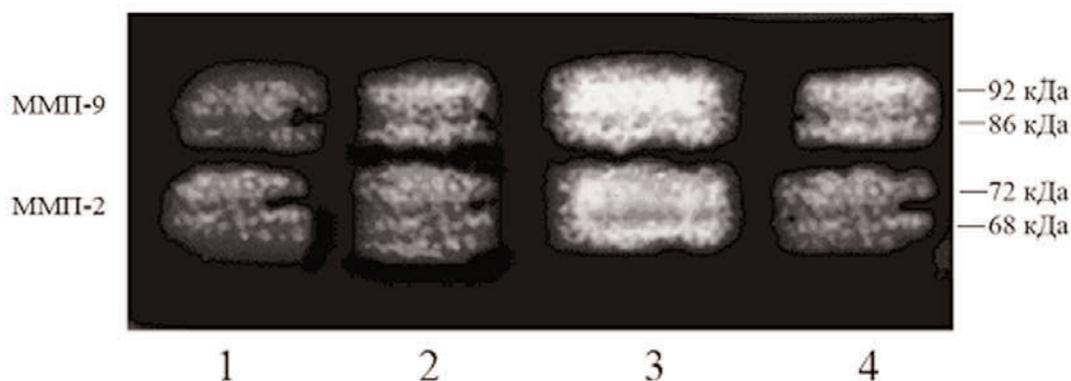


Рисунок 1.

Зимография желатиназ А и Б в 10% ПААГ с 0,1 % желатином. На трек наносили супернатанты клеточных лизатов в объеме 50 мкл, соответствующие 50000 клеток.

Клеточные клоны: 1 иммортализованные клетки - IE5; трансформированные клетки: 2 - trF8; 3 - trF8nmcc; 4 - trB4. ММП-9(латентная форма - 92 кДа и активированная форма - 86 кДа) и ММП-2 (латентная форма - 72 кДа и активированная форма - 68 кДа).

Данные зимографии (рис. 1) показали, что ММП-2 продуцировали как иммортализованные, так и трансформированные клетки. Активность ММП-2, рассчитанная по площади гидролиза желатина в соответствующих дорожках геля, практически не изменялась при трансформации фибробластов в культуре клеток *in vitro*. Увеличение активности ММП-2 (в 1,5-2 раза) происходило только в клетках, прошедших отбор на животных (см. дорожку № 3 – trF8nmcc). ММП-9 продуцировалась главным образом трансформированными фибробластами (в иммортализованных клетках фермент обнаруживается в следовых количествах (см. дорожку № 1), то есть при трансформации происходит индукция экспрессии ММП-9 (в 2-4 раза). Эти результаты согласуются с данными, имеющимися в литературе, которые свидетельствуют о том, что ММП-9 обнаружена в опухолевых клетках [18–21]. По-видимому, ММП-9 может служить маркером трансформации фибробластов. Данные зимографии позволили идентифицировать коллагеназы IV типа и оценить индивидуальные активности ММП-2 и ММП-9. Однако, в дальнейшем суммарную активность коллагеназ определяли по гидролизу коллагена IV типа, поскольку метод зимографии трудоемок и не позволяет с достаточной точностью определить активность ферментов.

Коллагенолитическую активность клеточных клонов, отличающихся опухолевым потенциалом, определяли по гидролизу ^{14}C -ацелированного коллагена IV типа (рис. 2). Этот метод позволяет использовать нативный субстрат, количественно оценить суммарную активность коллагеназ IV типа, и проводить работу на большом количестве проб. Поскольку ММП относятся к секретируемым ферментам, их активность определяли в кондиционированной среде (секретируемая активность) в присутствии и отсутствии ингибиторов металлопротеиназ - ЭДТА и *o*-фенантролина. Ингибиторный анализ показал, что при конечной концентрации обоих ингибиторов 10^{-3} М, ферментативная активность по коллагену IV типа инактивировалась на 90-95%. Таким образом, коллагенгидролизующая активность по коллагену IV типа в основном принадлежала металлозависимым протеиназам. Из представленных на рисунке 2 данных видно, что суммарная секретируемая активность ММП-2 и ММП-9 как исходная, так и после активации АФМА в иммортализованных клетках IE5 не изменялась по сравнению с первичной культурой (REF). Секретируемая активность ММП-2 и ММП-9 в трансформированных клетках клонов trF8 и trB4 увеличивалась (в 2,5 и 3 раза соответственно) по сравнению с ПФ и ИФ.

ЖЕЛАТИНАЗЫ И ИХ РЕГУЛЯТОРЫ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

Существенное увеличение (8-10 раз) активности желатиназ наблюдалось в клетках клона trF8nmcc, однако большая часть фермента находилась в латентной форме. Из полученных данных следует, что увеличение активности желатиназ происходило на стадии трансформации клеток, причем наивысшая активность этих ферментов обнаружена в клетках клона trF8nmcc, обладающих наиболее выраженными туморогенными свойствами. Учитывая данные зимографии, следует подчеркнуть, что в случае ПФ и ИФ гидролиз коллагена происходил за счет ММП-2, а увеличение коллагенолитической активности в клетках trF8 и trB4 происходило за счёт ММП-9, в то время как увеличение активности в клетках trF8nmcc происходило как за счёт индукции ММП-9, так и ММП-2.

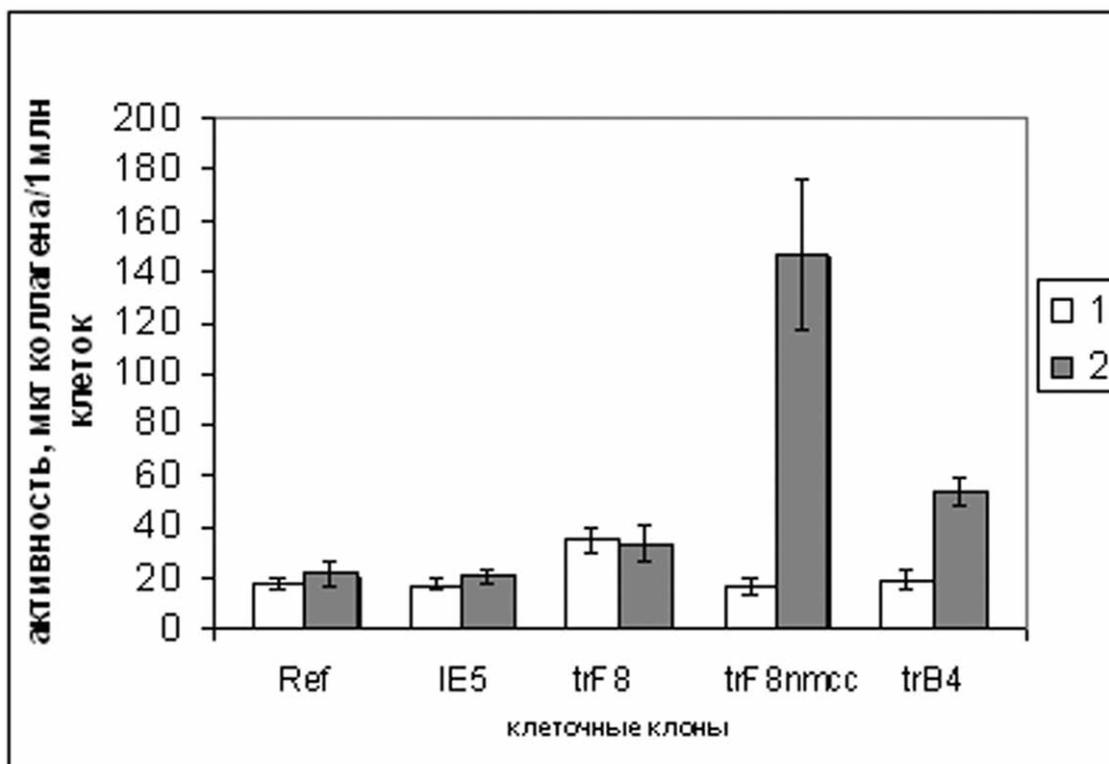


Рисунок 2.

Секретируемая активность желатиназ А и Б. 1- исходная активность. 2- активность в присутствии 10^{-3} М аминоксидилмеркурийацетата (АРМА). Приведены средние значения из трёх независимых опытов, $p < 0,05$.

Исследование экспрессии генов ММП-2, ММП-9, ТИМП-2 и МТ1-ММП проведено методом полуколичественной ПЦР. Полученные данные (рис. 3) свидетельствуют о том, что уровень экспрессии мРНК ММП-9 повышался в ТФ (в 2-3 раза), причем в клетках клона trF8nmcc, обладающих наибольшим туморогенным потенциалом, экспрессия мРНК была наивысшей. Экспрессия мРНК ММП-2 существенно не изменялась во всех клеточных линиях, за исключением клеток клона trF8nmcc, прошедших отбор на животных, где уровень мРНК ММП-2 был выше в 1,5-2 раза по сравнению со всеми остальными клонами. Уровень мРНК ТИМП-2 (ингибитора ММП-2 и ММП-9), также как и уровень мРНК МТ1-ММП (активатора ММП-2) был увеличен в ТФ в 1,5-2 раза по сравнению с ИФ. Полученные данные свидетельствуют о том, что при трансформации геном E7 HPV-16 происходит увеличение экспрессии

мРНК регуляторов активности ММП-2 - ТИМП-2 и МТ1-ММП, в то время как уровень экспрессии мРНК ММП-2 не изменяется. Только отбор клеток на животных приводит к увеличению уровня мРНК ММП-2, что, по-видимому, вносит вклад в наблюдаемое увеличение активности фермента. Уровень экспрессии мРНК ММП-9 повышается только в трансформированных клетках. Эти данные согласуются с данными зимографии и также свидетельствуют о том, что ММП-9, по-видимому, может служить маркером трансформации клеток геном E7 HPV-16. Данные по экспрессии МТ1-ММП согласуются с данными по экспрессии этого фермента в HPV положительных линиях клеток [22].

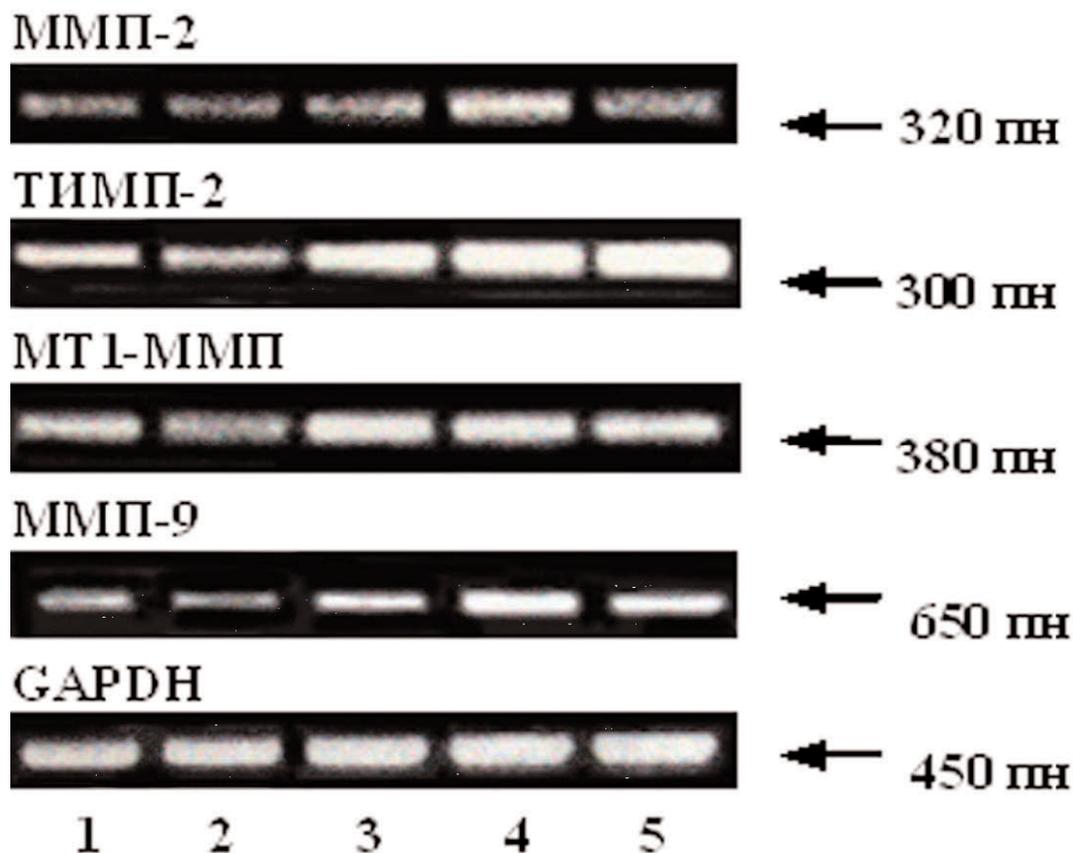


Рисунок 3.

Сравнительный анализ уровней экспрессии м-РНК генов ММП-2, ММП-9, ТИМП-2 и МТ1-ММП. Для реакции обратной транскрипции брали 1 мкг РНК каждого клона клеток: 1. ПФ (REF); 2. IE5; 3. trF8; 4. trF8nmcc; 5. trB4.

Нами обнаружено увеличение экспрессии мРНК ТИМП-2 в трансформированных клетках. В ряде исследований на экспериментальных моделях показано, что увеличение количества ТИМП-2 приводит к ингибированию инвазивных и метастатических свойств клеток [1, 7, 8]. Однако, имеются данные о том, что агрессивное течение многих онкологических заболеваний сопровождается повышенной экспрессией ТИМП-2 [23]. Следует учитывать, что ТИМП-2 выполняет двойную функцию в регуляции активности ММП-2. С одной стороны, ТИМП-2 участвует в образовании активационного комплекса для ММП-2 на клеточной поверхности, с другой стороны, ТИМП-2

ЖЕЛАТИНАЗЫ И ИХ РЕГУЛЯТОРЫ В ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ

является ингибитором активности ММП-2 [24]. Известно, что ТИМП-2 может ингибировать и другие ММП, в частности, ММП-9 [1-3]. Наиболее важным фактором для проявления активности этих ферментов является соотношение ММП-2, ММП-9/ТИМП-2, а не абсолютное значение уровня экспрессии их генов. [1-3], о чём свидетельствуют и наши исследования. Увеличение экспрессии МТ1-ММП в трансформированных клетках приводит к повышению активности ММП-2 двумя путями. С одной стороны, МТ1-ММП, участвуя в образовании тройного активационного комплекса на поверхности клетки, является рецептором для ММП-2 [25, 26]. 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. Следует учитывать, что МТ1-ММП сама может гидролизовать фибриллярные коллагены. Таким образом, увеличение экспрессии МТ1-ММП приводит к активации локальных 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-2.

Полученные данные свидетельствуют о том, что:

1. в иммортализованных клетках (IE5) не происходит изменения экспрессии ММП-2 и её эндогенных регуляторов по сравнению с первичными фибробластами.
2. трансформация геном E7 HPV-16 типа не приводит к заметному изменению экспрессии мРНК ММП-2, за исключением клеток клона trF8nmсс, прошедших отбор на животных, где наблюдается увеличение экспрессии ММП-2.
3. трансформация фибробластов геном E7 HPV-16 типа приводит:
а) к индукции экспрессии ММП-9; б) увеличению мРНК эндогенных регуляторов активности ММП-2 – ТИМП-2 (который может ингибировать и ММП-9) и МТ1-ММП, которая может выступать не только как активатор про-ММП-2, но и гидролизовать фибриллярные коллагены; в) к нарушению баланса ММП-2, ММП-9/МТ1-ММП / ТИМП-2, присущего нормальным и иммортализованным фибробластам; г) существенному увеличению деструктивного потенциала ТФ.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Nagase H., Visse R., Murphy G. (2006) *Cardiovasc. Res.*, **69**, 562-573.
2. Cauwe B., Van den Steen P.E., Opdenakker G. (2007) *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.*, **42**, 113-185.
3. Fingelton B. (2006) *Front Biosc.*, **11**, 479-491.
4. Martin M.D., Matrisian L.M. (2007) *Canc. Metast. Rev.*, **26**, 717-724.
5. Turpeenniemi-Hujanen T. (2005) *Biochimie*, **87**, 287-297.
6. Strongin A.Y., Collier I., Bannikow G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5331-5338.
7. Ramnath N., Creaven P.J. (2004) *Curr. Oncol. Rep.*, **6**, 96-102.
8. Jiang Y., Goldberg I.D., Shi Y.E. (2002) *Oncogene*, **21**, 2245-2252.
9. zur Hausen H. (2002) *Nat. Rev. Cancer*, **2**, 342-350.
10. Zhurbitskaya V.A., Fedorova L.I., Yartseva N.M., Savel'eva L.V., Zelenina A.V., Kissel'jov F.L. (1999) *Mol. Biol. (Russia)*, **33**, 282-286.
11. Solovyeva N.I., Balayevskaya T.O., Dilakyan E.A., Zakamaldina-Zama T.A., Pozdnev V.F., Topol L.Z., Kisselev F.L. (1995) *Int. J. Cancer*, **60**, 495-500.
12. Dilakyan E.A., Zhurbitskaya V.A., Vinokurova S.V., Gureeva T.A., Lubkova O.N., Topol L.Z., Kissel'jev F.L., Solovyeva N.I. (2001) *Clin. Chim. Acta*, **309**, 37-43.

13. *Dixit S.N., Granville R.V.* (1991) in: *Immunochemistry of the extracellular matrix, Methods* (H. Furthmayr ed.) CRC Press, Florida, **1**, 61-74.
14. *Cawston T.E., Murphy G.* (1981) in: *Methods in enzymology* (L. Lorand ed.) Academic press., New York, **80**, 711-722.
15. *Murphy G., Grabbe T.* (1995) in: *Methods in enzymology* (A.J. Barrett ed.) Academic press, San Diego, **248**, 470-484.
16. *Samoylova E.V., Shaikhaiev G.O., Petrov S.V., Kisseljova N.P., Kissel'jov F.L.* (1995) *Int. J. Cancer*, **61**, 337-341.
17. *Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Соловьёва Н.И.* (2007) *Биомед. химия*, **53**, 323-331
18. *Davidson B., Goldberg I., Kropolovic J., Lerner-Geva L., Gotlieb W.H., Ben-Baruch G., Reich R.* (1999) *Gynecol. Oncol.*, **73**, 372-382.
19. *Stygar D., Wang H., Vladic Y.S., Ekman G., Eriksson H., Sahlin L.* (2002) *Biol. Reprod.*, **67**, 889-894.
20. *Sheu B.C., Lien H.C., Ho H.N., Lin H.H., Chow S.N., Huang S.C., Hsu S.M.* (2003) *Cancer Res.*, **63**, 6537-6542.
21. *Asha N.S., Karunagaran D., Nair M.B., Sudhakaran P.R.* (2003) *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **129**, 123-131.
22. *Smola-Hess S., Pahne J., Mauch C., Zigrino P., Smola H., Pfiser H.J.* (2005) *J. Gen. Virol.*, **86**, 1291-1296.
23. *Caussens L.M., Fingleton B., Matrisian L.M.* (2002) *Science*, **295**, 2387-2392.
24. *Shofuda K., Moriyama K., Nishihashi A., Higashi S., Mizushima H., Yasumitsu H., Miki K., Soto H., Seiki M., Miyazaki K.* (1998) *J. Biochem.*, **124**, 462-470.
25. *Strongin A.Y., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I.* (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 5331-5338 .
26. *Itoh Y., Seiki M.* (2006) *J. Cell Physiol.*, **206**, 1-8.

Поступила: 29. 09. 2008.

EXPRESSION OF GELATINASES A AND B AND THEIR ENDOGENOUS REGULATORS
IMMORTAL AND TRANSFORMED FIBROBLASTS

N.I. Solovyeva, S.V. Vinokurova, O.S. Ryzhakova, T.A. Gureeva, I.V. Tsvetkova

Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences (RAMS),
Pogodinskaya Str., 10, Moscow, 119121 Russia; fax: (495)245-0857;
e-mail: Nina.Solovyeva@ibmc.msk.ru

Matrix metalloproteinases (MMP) play a critical role in tumor invasion and metastasis. The aim of this study was to elucidate peculiarity of expression of gelatinases A and B (MMP-2 and MMP-9), membrane type MMP (MT1-MMP) and tissue inhibitor of MMP (TIMP-2) in immortal (IF) and transformed fibroblasts (TF). The study was carried out using embryo rat fibroblasts, sequentially immortalized with the polyomavirus LT gene and transformed with the E7 gene of human papilloma virus (HPV-16). Papilloma virus type 16 and 18 are etiological factors of cervical cancer. The primary fibroblast (PF) culture of Fisher rats was used as control. Analysis of TF and IF involved: determination of MMP-2 and MMP-9 activity by hydrolysis of specific substrate – radioactive collagen type IV; obtaining of MMP spectra by zymographic assay and estimation of the mRNA expression (by RT-PCR) of MMP-2, MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2. It was found: 1) collagenolytic activity of MMP was increased only in TF and was dependent on the degree of cell tumorigenicity; 2) the study of MMP spectra was shown that MMP-9 was found in TF only but MMP-2 was found in all investigated clones; 3) The mRNA expression of MMP-9, MT1-MMP and TIMP-2 was increased in all TF while the MMP-2 expression was increased in TF only after TF cell selection on rats; 4) The collagenolytic activity as well as the mRNA expression of MMP-2 and MMP-9 themselves and of MMP-2 endogenous regulators (MT1-MMP and TIMP-2) did not change in immortalized fibroblasts compared to PF. The data obtained indicate changes in the enzyme/inhibitor/activator ratio and also suggest of a significant increase in the TF destructive potential. MMP-9 is supposed to be a marker of fibroblasts transformed by E7 HPV-16 gene in cell culture.

Key words: gelatinases A and B, MMP-2, MMP-9, MT1-MMP, TIMP-2, immortalization, transformation, gene E7 HPV-16.