

УДК 577.3.4*24'142
©Рыжакова, Соловьева

**МАТРИКСНЫЕ МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ (ММП) – ММП-1,-2,-9
И ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ ИХ АКТИВНОСТИ В ЛИНИЯХ
КЛЕТОК КАРЦИНОМ ШЕЙКИ МАТКИ, ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ
ОНКОГЕНАМИ HPV16 И HPV18**

*О.С. Рыжакова, Н.И. Соловьева**

Учреждение Российской академии медицинских наук
Научно-исследовательский институт биомедицинской химии
имени 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 инвазии и метастазирования опухолей. Цель настоящей работы — выяснение особенностей экспрессии ММП-1, ММП-2, ММП-9, и регуляторов их активности: активатора плазминогена – уАП и тканевых ингибиторов ММП - ТИМП-1, ТИМП-2 в клеточных линиях карцином шейки матки человека. Сравнительное исследование экспрессии ММП проводили на клеточных линиях карцином, которые отличались по типу вируса папиллом человека (HPV) – HPV16 и HPV18: SiHa, Caski – HPV16, Hela и C4-1 – HPV18. В качестве контроля использовали линию C33A, где копии HPV отсутствуют. Исследование экспрессии ММП включало оценку экспрессии мРНК методом ОТ-ПЦР и определение коллагенолитической активности по гидролизу флуорогенного коллагена I типа и методом зимографии. Установлено, что: 1) В обоих типах клеток экспрессия мРНК ММП-1 существенно увеличивалась (от 2 до 8 раз), причём в линиях HPV18 она была наиболее выражена. Исключение составляют клетки SiHa, где наблюдалось снижение экспрессии этого фермента. Экспрессия ММП-2 была на уровне контроля в обоих типах клеток. 2) Экспрессия ингибиторов в основном находилась в пределах контроля. Исключение составила линия C4-1, где экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2 была увеличена в 1,7 и 2,6 раза соответственно. Увеличение экспрессии уАП обнаружено во всех линиях клеток (от 2 до 4,5 раз), кроме SiHa, где она была снижена до 20%. 3) Коллагенолитическая активность в линиях Caski и Hela была в 2-3 раза выше, чем в контроле, а в линии SiHa – сопоставима с контролем. Исследование желатиназной активности, также как и данные по экспрессии мРНК, выявили только наличие ММП-2, но не ММП-9, во всех клеточных линиях карцином шейки матки. Полученные данные свидетельствуют о том, что в исследованных клеточных линиях нарушено соотношение фермент/ингибитор/активатор, которое происходит в основном за счёт увеличения экспрессии ММП-1 и е, активатора, в то время как экспрессия ММП-2 и ингибиторов существенно не изменяется, что приводит к увеличению деструктивного потенциала в клеточных линиях карцином шейки матки.

Ключевые слова: матриксные металлопротеиназы (ММП) – ММП-1,-2,-9, тканевые ингибиторы ММП, клеточные линии карцином шейки матки.

ВВЕДЕНИЕ. Матриксные металлопротеиназы (ММП) относятся к семейству цинковых кальций-зависимых металлопротеиназ, функция которых связана с обменом белков соединительно-тканного матрикса (СТМ) –

* - адресат для переписки

основы соединительной ткани. В настоящее время известно 25 ММП в тканях животных и человека [1-3]. Исходя из данных по субстратной специфичности и структурной организации ММП можно разделить на: коллагеназы, желатиназы, стромелизины, матрилизины, мембраносвязанные ММП и неклассифицированные ММП. Эти ферменты в совокупности способны гидролизовать все компоненты СТМ. Кроме того, они выполняют важные регуляторные функции, модифицируя свойства целого ряда биологически активных молекул. ММП играют решающую роль в таких биологических процессах, как эмбриогенез, ремоделирование и репарация тканей, а также при развитии ряда патологических процессов, таких как ревматоидные артриты, остеоартриты, аневризмы аорты, периодонтиты, аутоимунные поражения кожи [1-4].

Особое место отводится ММП в развитии процессов инвазии и метастазирования опухолей. Тканевые коллагеназы (ММП-1, ММП-8, ММП-13), наряду с желатиназами (ММП-2, ММП-9), играют решающую роль в развитии этих процессов, поскольку они специфически гидролизуют белки группы коллагена – одного из основных компонентов СТМ. Коллагеназы, и в частности интерстициальная коллагеназа (ММП-1), специфически гидролизуют фибриллярные коллагены I, II, III, V и IX типов [1, 3], которые составляют 25% от общего белка организма человека. Нативные фибриллярные коллагены устойчивы к действию протеолитических ферментов. ММП-1 специфически запускает гидролиз фибриллярных коллагенов; образующиеся фрагменты способны денатурировать в физиологических условиях и далее подвергаться действию широкого спектра протеиназ, тем самым ММП-1 обеспечивает развитие деструктивного процесса [1-3]. Желатиназы гидролизуют коллаген IV типа – основу базальных мембран [1-3]. Этим двум группам ферментов принадлежит ключевая роль в разрушении соединительно-тканного барьера при развитии инвазивного онкологического процесса.

Активация про-ММП в физиологических условиях происходит за счёт протеолитических ферментов и носит ступенчатый характер. Основными активаторами про-ММП считаются сериновые протеиназы: плазмин (для секретируемых ММП) и фурин (для мембраносвязанных ММП) [1, 2].

Протеолитическая активность ММП в тканях регулируется специфическими тканевыми ингибиторами – ТИМП. К семейству ТИМП относится четыре ингибитора – ТИМП-1, ТИМП-2, ТИМП-3 и ТИМП-4. Они обладают определенной избирательной специфичностью, однако могут ингибировать активность всех членов семейства ММП [2, 5]. В физиологических жидкостях и, прежде всего в крови, основным ингибитором ММП является α 2-макроглобулин [1, 2, 6].

Настоящая работа посвящена исследованию экспрессии коллагеназ, желатиназ и их эндогенных регуляторов в клеточных линиях карцином шейки матки человека, ассоциированных с вирусами папиллом человека (HPV) 16 и 18 типов, которые служат этиологическими факторами рака шейки матки и являются наиболее агрессивными и широко распространенными. В настоящее время созданы вакцины против онкогенных вирусов папиллом человека, которые в ряде стран уже используются для предотвращения рака шейки матки.

Рак шейки матки занимает второе место, после рака молочной железы, по частоте заболеваемости и смертности от рака у женщин. Установлено, что основными трансформирующими генами вирусов папиллом человека

являются гены E6 и E7 [7-9]. У 90% больных раком шейки матки обнаруживаются транскрипты генов E6 и E7 в биопсийном материале.

Целью настоящего исследования являлось выяснение особенностей экспрессии коллагеназы – ММП-1 и желатиназы А и Б – ММП-2 и ММП-9, их эндогенных тканевых ингибиторов ТИМП-1 и ТИМП-2, и активатора плазминогена уракиназного типа – уАП, как факторов инвазии, в клеточных линиях карцином шейки матки человека – SiHa, Caski, Hela, C4-1.

МЕТОДИКА.

Линии клеток. Исследование проводилось на клеточных линиях карцином шейки матки (American Type Culture Collection, США), любезно предоставленных из банка клеточных культур ОНЦ РАМН. Линии клеток отличались по типу HPV: SiHa и Caski – HPV16, Hela и C4-1 – HPV18. В качестве контроля использовали линию клеток C33A, в которой копии HPV отсутствуют.

Выращивание клеточных культур. Клетки культивировали в течение 48 ч 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 и клетки собирали, замораживали и хранили при -20°C [10, 11].

Приготовление клеточных лизатов. К клеткам добавляли раствор 0,45% NaCl, содержащий 1 mM CaCl₂ и 0,1% тритон X-100 (из расчёта 1×10⁶ клеток в 0,1 мл раствора), затем клетки подвергали 6-кратному замораживанию-оттаиванию и разрушали в тефлоновом гомогенизаторе. Осадок отделяли центрифугированием при 500 g в течение 10 мин, в супернатанте определяли активность. Все процедуры проводили при 4°C [11].

Одновременное выделение ДНК и РНК гуанидинизотиоцианатным методом. Выделение ДНК и РНК проводили из клеток, гомогенизированных в растворе гуанидинизотиоцианата, с последующим наслаиванием на раствор CsCl, центрифугированием при 80000 g в течение 18 часов и разделением на фракции ДНК и РНК, как описано [12, 13].

Реакцию обратной транскрипции РНК проводили по методу [13, 14]. Для реакции обратной транскрипции использовали 1 мкг тотальной клеточной РНК. Реакцию проводили в конечном объёме 20 мкл в следующих условиях: 1× буфер для обратной транскрипции, 0,01 M дитиотритол, 0,1 мкМ каждого из четырёх дезоксинуклеозидтрифосфатов, 20 пмоль гексапраймера (“Литех”) и 200 ед. акт. обратной транскриптазы Superscripttm II RNaseH⁻ (“Invitrogen”, США). Первоначально смесь РНК, дезоксинуклеозидтрифосфатов и гексапраймера в соответствующем объёме прогревали при 65°C в течение 5 мин. Затем охлаждали в ледяной бане и добавляли буфер для обратной транскрипции и дитиотритол, смесь прогревали 2 мин при 42°C и вносили обратную транскриптазу. После этого реакцию 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 реакцию смесь прогревали при 50°C 10 мин и при 70°C в течение 15 мин для инактивации фермента и разводили бидистиллированной водой до конечного объёма 100 мкл. Полученную кДНК в количествах, подобранных экспериментальным путем, использовали в полуколичественной ПЦР со специфическими праймерами. Праймеры были подобраны к участкам последовательностей ДНК,

МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ИХ РЕГУЛЯТОРЫ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ

расположенным в разных экзонах генов человека MMP1, MMP2, MMP9, TIMP1, TIMP-2 и u-PA.

Условия полимеразной цепной реакции (ПЦР) [14]. 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.

Точное значение температуры подбирали экспериментальным путём. Состав праймеров, использованных в данной работе, и условия реакции приведены в таблице.

Таблица. Праймеры, использованные в ОТ-ПЦР.

| | |
|----------------------|---|
| ММП-1 | |
| Прямой праймер | 5' gga caa aca cat ctg acc tac agg a 3' |
| Обратный праймер | 5' ttg tcc cga tga tct ccc ctg aca 3' |
| Размер продукта | 185 п.н. |
| Условия амплификации | 62°C, 34 циклов, 30 с |
| ММП-2 | |
| Прямой праймер | 5' gag ttg gca gtg caa tac ct 3' |
| Обратный праймер | 5' gcc atc ctt ctc aaa gtt gt 3' |
| Размер продукта | 666 п.н. |
| Условия амплификации | 60°C, 34 циклов, 30 с |
| ММП-9 | |
| Прямой праймер | 5' tgg gca agg gcg tcg tgg ttc3' |
| Обратный праймер | 5' tgg tgc agg cgg agt agg att3' |
| Размер продукта | 276 п.н. |
| Условия амплификации | 55°C, 35 циклов, 30 с |
| у-АП | |
| Прямой праймер | 5' agg cga ccc tgg tgc tat 3' |
| Обратный праймер | 5'acc cag caa gga ctg atg ag 3' |
| Размер продукта | 272 п. н. |
| Условия амплификации | 54°C, 33 циклов, 30 с |
| ТИМП-1 | |
| Прямой праймер | 5' gac cac ctt ata cca gct tt 3' |
| Обратный праймер | 5' gca ggc agg caa ggt gac 3' |
| Размер продукта | 410 п.н. |
| Условия амплификации | 51°C, 28 циклов, 30 с |
| ТИМП-2 | |
| Прямой праймер | 5' ggt ctc gct gga cgt tgg ag 3' |
| Обратный праймер | 5' gga gcc gtc act tct ctt g 3' |
| Размер продукта | 304 п.н. |
| Условия амплификации | 58°C, 27 циклов, 30 с |
| GAPDH | |
| Прямой праймер | 5' acc aca gtc cat gcc atc ac 3' |
| Обратный праймер | 5' tcc acc acc ctg ttg ctg ta 3' |
| Размер продукта | 450 п.н. |
| Условия амплификации | 60°C, 28 циклов, 30 с |
| HPRT | |
| Прямой праймер | 5' ctg gat tac atc aaa gca ctg 3' |
| Обратный праймер | 5' gga tta tac tgc ctg acc aag 3' |
| Размер продукта | 230 п.н. |
| Условия амплификации | 60°C, 30 циклов, 30 с |

Полимеразная цепная реакция (ПЦР). ОТ-ПЦР проводили в реакционной смеси (25 мкл), содержащей следующие компоненты: 60 mM трис-HCl pH 8,6; 1,6 mM сульфат аммония, 0,01% Тритон X-100; 2,5 mM хлорид магния, 0,1 mM каждого из дезоксирибонуклеотидтрифосфатов (dATP, dGTP, dCTP, dTTP); 10% глицерин; 20-25 пМ каждого из праймеров и 1-2,5 ед. акт. *Taq*-полимеразы; к-ДНК добавляли в количестве 20-100 нг на одну реакцию. Реакции проводились на аппарате "Терцик" по следующей программе: 94°C – 30 с, $t_{\text{отж}}$ °C – 30 с, 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 [14].

Определение коллагенолитической активности в культуральной среде и лизатах клеток. Для определения коллагеназной активности использовали меченый флуоресцеинизотиоцианатом коллаген I типа, полученный из кожи крыс [15]. Раствор меченого коллагена доводили до pH 7,6 концентрированным трис-HCl буфером. После чего 20 мкл (72 мкг) коллагена вносили в короткие стеклянные пробирки, пробы инкубировали в течение 2 ч при температуре 35°C до образования реконструированных фибрилл (плёнок). Затем в течение 1-2 ч эти пробы инкубировали в 1-2 мл 0,01 M трис-HCl буфера pH 7,6 с добавлением 1 mM CaCl₂ и 0,2 M NaCl (рабочий буфер) для промывания плёнок от слабо связанного флуоресцеина (иногда эту процедуру повторяли дважды). Буфер отбирали и в нём измеряли флуоресценцию, значение которой в контрольных пробах не превышало 20-25 единиц флуоресценции. На поверхность пленок наносили исследуемые пробы. Источником тканевой интерстициальной коллагеназы служили супернатанты лизатов клеток или культуральная среда. В пробы вносили от 20 до 600 мкл супернатанта или культуральной среды, что соответствовало 0,01 – 1,5 млн клеток, объём пробы доводили до 1 мл 0,01 M трис-HCl буфером pH 7,6 с добавлением 1 mM CaCl₂ и 0,2 M NaCl. Инкубацию проводили в течение 18-20 ч при 35°C. Контролем служили пробы, инкубированные с буфером, а также пробы с определенным количеством трипсина (от 2 до 10 мкг). После инкубации в течение 20 ч пробы аккуратно отбирали пипеткой и флуоресценцию продуктов гидролиза измеряли при длинах волн 490 и 520 нм возбуждения и поглощения соответственно. Гидролиз пленок трипсином был показателем степени их возможной денатурации при мечении коллагена. В наших экспериментах он не превышал 5-10%.

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

Идентификация желатиназ с помощью зимографии. Зимографию с сополимеризованным желатином проводили по методу, описанному в статье [13, 16-18]. Концентрация верхнего (концентрирующего) геля была 4%, нижнего (разделяющего) – 7,5% , концентрация желатина – 1,5 мг/мл. Объём пробы соответствовал 0,5 млн. клеток на лунку. Перед нанесением на гель к пробам добавляли диссоциирующий буфер 2,5% ДСН, 1% сахарозы и 4 мг/мл феноловый красный (конечная концентрация).

Электрофорез проводили при температуре 9°C в течение 1,5 ч (I=20mA). Гель промывали 3 раза по 30 мин в буфере, содержащем 50 mM трис-HCl

pH 7,5, 5 mM CaCl₂, 2,5% тритон X-100. После отмывки гель инкубировали в течение 20 ч при температуре 37°C в буфере – 50 mM трис-HCl pH 7,5, 5 mM CaCl₂, 1% тритон X-100. После инкубации гель фиксировали в смеси изопропанол: уксусная кислота : вода = 5 : 2 : 13, окрашивали в течение 30 мин (кумасси R-250) и отмывали в растворе изопропанол : уксусная кислота : вода = 2 : 1 : 17.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведено сравнительное исследование экспрессии мРНК ММП-1, ММП-2, ММП-9, а также эндогенных регуляторов их активности уАП – активатора ММП-1 и тканевых ингибиторов этих ферментов ТИМП-1 и ТИМП-2 в линиях клеток SiHa и Caski, трансформированных онкогенами HPV16 и линиях клеток Hela и C4-1, трансформированными онкогенами HPV18. Следует отметить, что уАП является активатором плазминогена, а плазмин рассматривается как основной физиологический активатор про-ММП-1 и других ММП.

На рисунке 1А приведены результаты типичных опытов по данным экспрессии мРНК методом ОТ-ПЦР. Количественная оценка данных ОТ-ПЦР проведена методом денситометрии и представлена на рисунке 1Б. За 100% (контроль) принят уровень экспрессии мРНК в линии C33-A, не содержащей копий HPV. Денситометрические данные по всем линиям клеток соотнесены с данными в линии C33A (рис. 1Б). Полученные результаты (рис. 1А,Б) свидетельствуют о том, что в обоих типах клеток экспрессия ММП-1 существенно увеличивалась (от 2 до 8 раз), причём в клетках HPV18 (треки 4 и 5) была существенно выше, чем в клетках HPV16 (треки 1 и 2).

В линиях клеток HPV16 (треки 1,2), экспрессия ММП-1 изменялась в 2-2,5 раза, а в SiHa уровень экспрессии ММП-1 составлял всего 50% от контроля (рис. 1 А,Б). Экспрессия ММП-2 изменялась незначительно (на 20-40%) как в клетках HPV16 так и в клетках HPV18. Результаты по экспрессии ММП-9 в клеточных линиях получить не удалось, поскольку праймеры, подобранные к гену ММП-9 человека и дающие положительный результат на клинических образцах, в случае клеточных линий продукта не дали, что может свидетельствовать об отсутствии ММП-9 в исследуемых клеточных линиях. Экспрессия ингибиторов в основном была в пределах контроля (рис. 1 А,Б). Исключение составила линия C4-1, где экспрессия ТИМП-1 и ТИМП-2 была увеличена в 1,7 и 2,6 раза соответственно. Экспрессия уАП увеличена во всех линиях клеток (от 2 до 4,5 раз), кроме SiHa, где она была снижена до 20% (рис. 1 А,Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что в опухолевых клетках существенно нарушено соотношение фермент/ингибитор/активатор, которое происходит в основном за счёт увеличения экспрессии ММП-1 и активатора про-ММП-1 – уАП, в то время как экспрессия мРНК ММП-2 и эндогенных ингибиторов этих ферментов – ТИМП-1 и ТИМП-2 существенно не изменяется, что приводит к увеличению деструктивного потенциала клеток.

Сравнительное исследование коллагенолитической активности. Исследование коллагенолитической активности ММП-1 (по гидролизу флуорогенного коллагена I типа) выявило активность ММП-1 во всех линиях клеток только в кондиционированной среде. В лизатах клеток достоверной активности обнаружено не было, в отличие от клеточных линий фибробластов крысы, где активность ММП-1 в лизатах была существенной, хотя и значительно ниже, чем в кондиционированной среде [14]

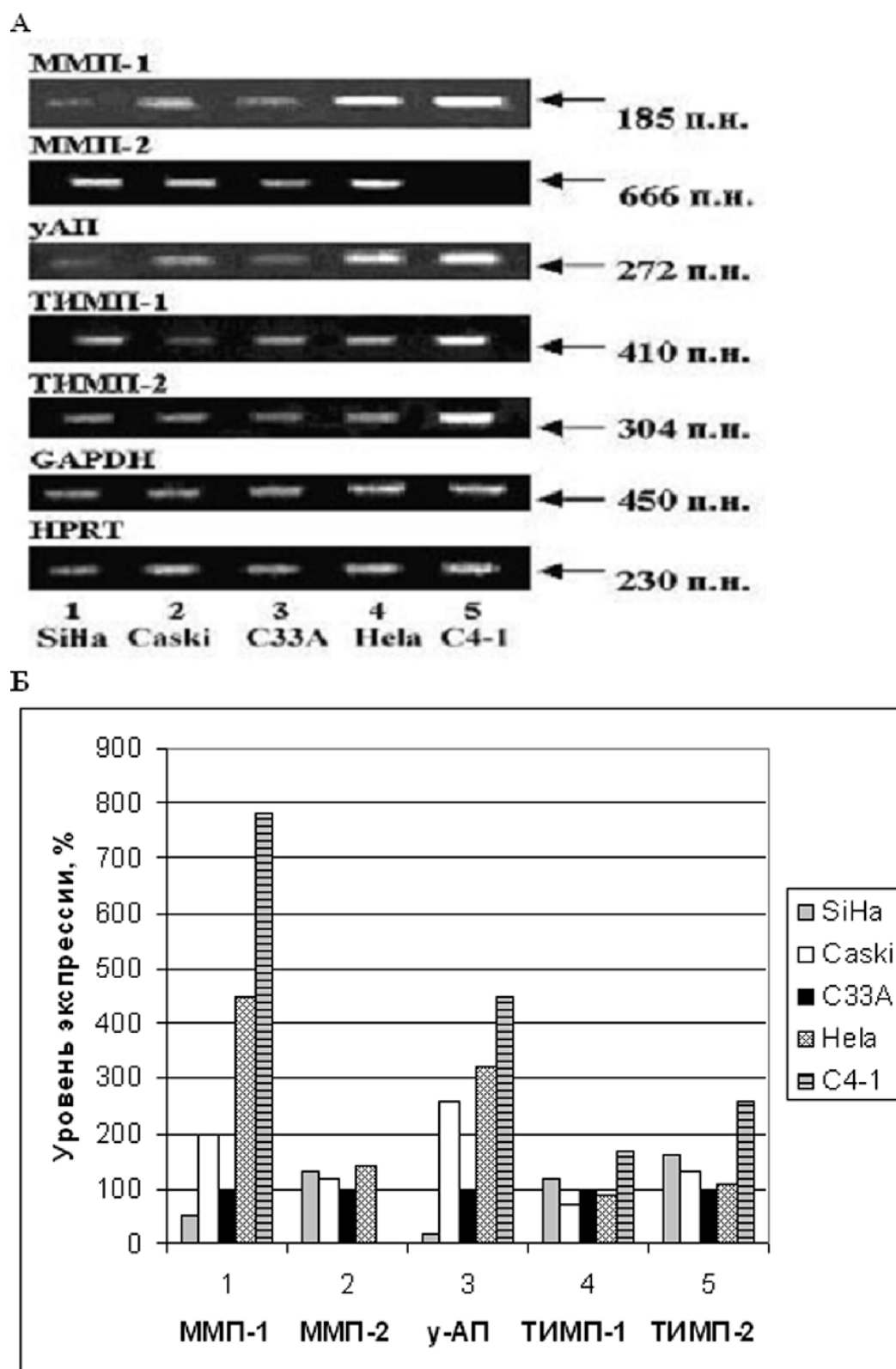


Рисунок 1.

Экспрессия м-РНК генов ММП-1, ММП-2, уАП, ТИМП-1, ТИМП-2 по данным ОТ-ПЦР (А) и денситометрии (Б) в клеточных линиях: SiHa; Caski; C33-A; Hela; C4-1. Количество к-ДНК, вносимое в реакцию соответствовало равному количеству продукта гена GAPDH и HPRT для каждого клона клеток.

МЕТАЛЛОПРОТЕИНАЗЫ И ИХ РЕГУЛЯТОРЫ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМЫ

Уровень коллагенолитической активности в клеточных линиях соотносили с уровнем активности в линии C33A, где отсутствуют копии HPV16 и HPV18. В клеточной линии SiHa активность была сопоставима с активностью в линии C33A, в линии Caski активность была выше, чем в C33A в 2,3 раза, а в линии Hela в 3,3 раза (рис. 2). Активация про-ММП-1 трипсином приводила к увеличению активности (в 1,5-2 раза) во всех клеточных линиях, что свидетельствует о наличии значительных количеств ММП в форме предшественников. Полученные данные указывают на то, что клеточная линия Hela, ассоциированная с HPV18, обладала более высокой коллагенолитической активностью, чем линии Caski и SiHa, ассоциированные с HPV-16. Была предпринята попытка оценить наличие свободных эндогенных ингибиторов в кондиционированной среде клеточных линий карцином методом разведений. Однако в отличие от модели фибробластов крысы в клеточных линиях карцином шейки матки свободных эндогенных ингибиторов в кондиционированной среде не было обнаружено [14].

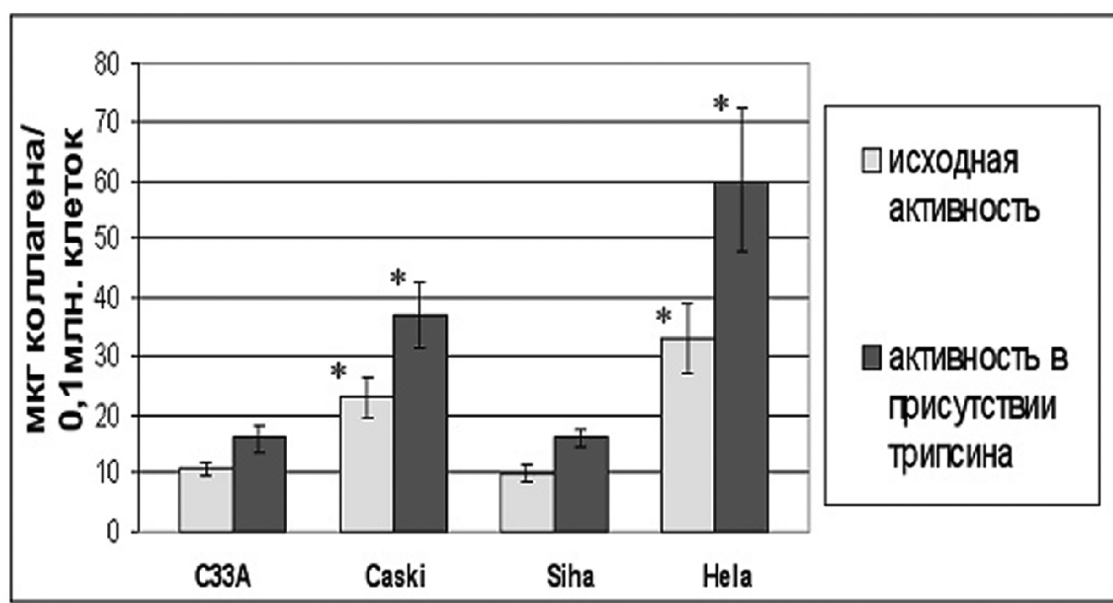


Рисунок 2.

Коллагенолитическая активность в кондиционированной среде исследуемых клеточных линий (* - достоверность изменения, $p < 0,05$).

Данные по исследованию коллагенолитической активности согласуются с данными по экспрессии мРНК и свидетельствуют о том, что: 1) в клетках, трансформированных HPV-18 деструктивный потенциал значительно выше, чем в клетках, трансформированных HPV-16. 2) ММП-1 вносит существенный вклад в деструктивный (инвазивный) потенциал обеих линий клеток. 3) В кондиционированной среде клеточных линий карцином шейки матки свободных эндогенных ингибиторов не было обнаружено.

Исследование желатиназной активности в кондиционированной среде клеточных линий карцином методом зимографии выявило активность только ММП-2, но не ММП-9, причем в линии Hela активность была наивысшей, и (по данным денситометрии) превышала контроль в 3,5 раза (рис. 3). В лизатах клеток, также как и в случае исследования коллагеназной

активности, желатиназной активности обнаружено не было. Инвазивные свойства исследованных клеточных линий, в частности, гидролиз коллагена базальных мембран, могут проявляться за счёт ММП-2, но не ММП-9. Ранее на модельной системе фибробластов крысы, последовательно immortalizированных и трансформированных геном E7 HPV16, было показано, что экспрессия ММП-9 была выражена именно в трансформированных фибробластах [14]. Наши результаты по экспрессии мРНК и желатиназной активности указывают на отсутствие ММП-9 в исследованных клеточных линиях карцином шейки матки человека в отличие от модельных клеточных линий крыс. Экспрессия ММП-9 была обнаружена и в тканях послеоперационных образцов карцином шейки матки [19, 20]. Следует учитывать, что ММП-9 относится к индуцируемым ферментам, в то время как ММП-2 – к конститутивным. Можно предположить, что отсутствие факторов, способных активировать экспрессию ММП-9, было причиной отсутствия ММП-9 в исследованных образцах.

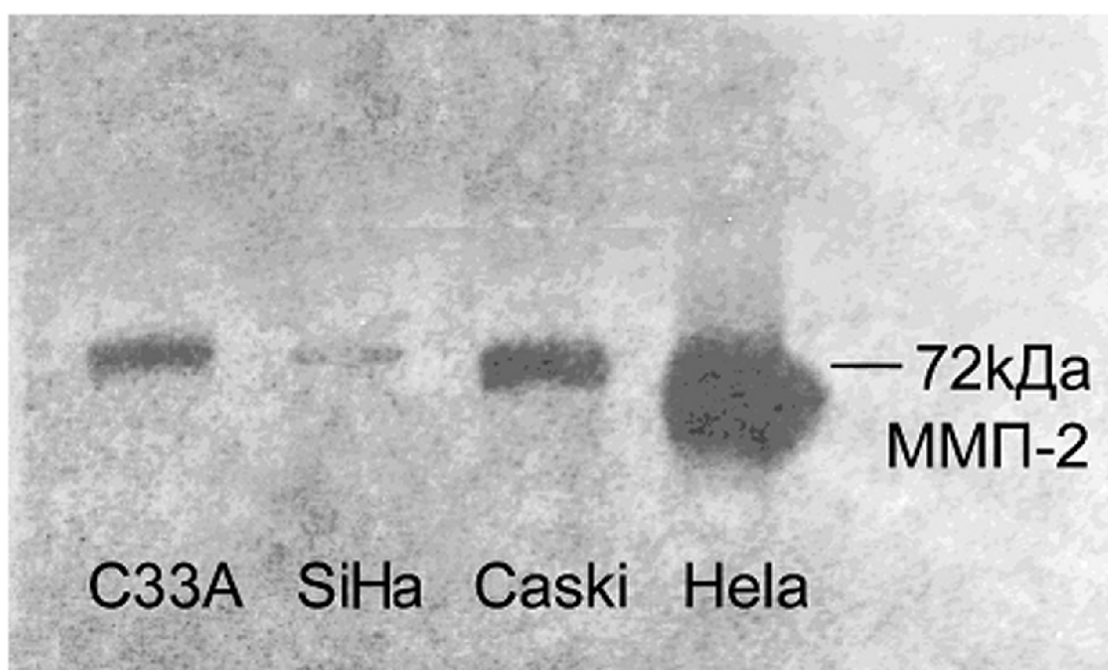


Рисунок 3.

Идентификация желатиназ с помощью метода зимографии.

Таким образом, сравнительное исследование экспрессии ММП-1,-2,-9, эндогенных ингибиторов этих ферментов ТИМП-1 и ТИМП-2, а также активатора про-ММП1 – уАП на клеточных линиях карцином шейки матки, которые отличались по типу HPV (HPV16 и HPV18): SiHa и Caski – HPV16; Hela и C4-1 – HPV18 показало: 1) Инвазивный потенциал в клеточных линиях HPV18 более выражен, чем в линиях HPV16. 2) Изменение деструктивных свойств клеток происходит в основном за счет увеличения экспрессии ММП-1 и её активатора (через плазмин) – уАП, в то время как экспрессия ММП-2 и тканевых ингибиторов существенно не изменяется. ММП-9 отсутствовала во всех клеточных линиях. 3) В кондиционированной среде клеточных линий карцином шейки матки свободных эндогенных ингибиторов не было обнаружено. 4) Данные по экспрессии генов согласуются с данными

по энзиматической активности и свидетельствуют о том, что в исследованных линиях клеток наблюдается нарушение баланса фермент/ингибитор/активатор, что в конечном итоге приводят к увеличению инвазивного (деструктивного) потенциала в клеточных линиях карцином шейки матки.

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 помощь в работе по экспрессии ММПз.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ, гранты 07-04-01233 и 10-04-01573

ЛИТЕРАТУРА

1. Pitliak M., Vargova V., Mechirova V. (2012) *Oncologie*, **35**, 49-53.
2. Hadler Olsen E., Fadnes B., Sylte I., Uhlin Hansen H., Winberg J.O. (2011) *FEBS J.*, **278**, 8-45.
3. Ala-Aho R., Kahari V.-M. (2005) *Biochemie*, **87**, 273-286.
4. Libra M., Scalisi A., Vella N., Clementi S., Sorio R., Stivala F., Spandidos D.A., Mazzarino C. (2009) *Int. J. Oncol.*, **34**, 897-903.
5. Olson M.W., Gervasi D.C., Mobashery S., Fridman R.K. (1997) *The American Society for Biochemistry and Molecular Biology*, **272**, 29975-29983.
6. Sternlicht M.D., Werb Z.A. (2001) *Cell Dev. Biol.*, **17**, 463-516.
7. Longwarth M.S., Laimins L.A. (2004) *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, **68**, 362-372.
8. Munger K., Baldwine A., Edwards K.M. et al. (2004) *Journal of Virology*, **78**, 11451-11460.
9. Um S.-J., Lee S.-Y., Kim E.-J., Myoung J. (2002) *Cancer Lett.*, **181**, 11-22.
10. Dilakyan E.A., Zhurbitskaya V.A., Vinokurova S.V., Gureeva T.A., Lubkova O.N., Topol L.Z., Kisseljov F.L., Solovyova N.I. (2001) *Clin. Chim. Acta*, **309**, 37-43.
11. Ryzhakova O.S., Gureeva T.A., Zhurbitskaya V.A., Solovyeva N.I. (2007) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **1**(4), 342-347.
12. Samoylova E.V., Shaikhaiev G.O., Petrov S.V., Kisseljova N.P., Kisseljov F.L. (1995) *Int. J. Cancer*, **61**, 337-341.
13. Solovyeva N.I., Vinokurova S.V., Ryzhakova O.S., Gureeva T.A., Tsvetkova I.V. (2009) *Biochemistry (Moscow) Supplement Series B: Biomedical Chemistry*, **3**(3), 266-271.
14. Рыжакова О.С., Гуреева Т.А., Журбицкая В.А., Соловьева Н.И. (2007) *Биомед. химия*, **53**, 322-331.
15. Рыжакова О.С., Соловьева Н.И. (2005) *Биомед. химия*, **51**, 432-438.
16. Murphy G., Crabbe T. (1995) *Methods Enzymology*, **248**, 470-484.
17. Leber T.M., Balkwill F.R. (1997) *Anal. Biochem.*, **249**(1), 24-28.
18. Соловьёва Н.И., Рыжакова О.С. (2010) *Клин. лаб. диагн.*, №2, 17-21
19. 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**(19), 6537-6542.
20. Arguello-Ramirez J., Perez-Cardenas E., Delgado-Chavez R., Solorza-Luna G., Villa-Trevino S., Arenas-Huetero F. (2004) *International Journal of Gynecological Cancer*, **14**(2), 333-340.

Поступила: 12. 12. 2011.

**MATRIX METALLOPROTEINASES (MMP) - MMP-1,-2,-9 AND ITS ENDOGENOUS
ACTIVITY REGULATORS IN TRANSFORMED BY E7 ONCOGENE HPV16 AND HPV18
CERVICAL CARCINOMA CELL LINES**

O.S. Ryzhakova, N.I. Solovyeva

Institute of Biomedical Chemistry, Russian Academy of Medical Sciences, ul. Pogodinskaya, 10,
Moscow, 119121 Russia; tel: 8-499-246-50-72; e-mail: nina.solovyeva@ibmc.msk.ru

Matrix metalloproteinases (MMP) play a key role in development of tumor invasion and metastasis. The purpose of the work is the elucidation of peculiarities of expression of MMP-1, MMP-2, MMP-9 and their activity regulators: plasminogen activator uPA and tissue inhibitors of MMPs - TIMP-1 and TIMP-2 in human cell lines of squamous cell carcinoma (SCC).

Comparative study of MMPs' expression was carried out on cell lines SCC which differed in HPV types (HPV-16 and HPV-18): SiHa, Caski – HPV16, Hela, C4-1 – HPV18). As a control, the C33A line was used where HPV copies were absent. The human papilloma viruses (HPV) of high risk – HPV-16, HPV-18, as etiological factors of initiation of cervical cancer, are most widespread and most aggressive among oncogenic HPVs. Study of MMP expression involved estimation of expression of mRNA using the RT-PCR method and determination of collagenolytic activity by hydrolysis of fluorogenic type 1 collagen and also by the zymography method.

It was shown that: 1. In both types of cell lines, the MMP-1 expression was essentially increased (2 to 8 times), and in HPV18 lines it was most expressed. The exception was made by the SiHa line in which the decrease of expression of this enzyme was observed. MMP-2 expression was at the control level in both types of cell lines.

2. Expression of inhibitors generally was at the control level. The only exception was the C4-1 line where the expression of TIMP-1 and TIMP-2 was increased in 1,7 and 2,6 times accordingly. Expression of uPA was increased 2 to 4,5 times in all cell lines except SiHa where was lowered to 20%.

3. Collagenolytic activity in the Caski and Hela cell line was 2-3 times higher than it was in control, while the activity in the SiHa cell line was compatible with that in the control.

Research of gelatinolytic activity also as well as the data on an expression of MMPs has revealed only presence of MMP-2, but not MMP-9 in all cervical carcinoma cell lines.

The data obtained provide evidence for a significant disturbance in transformed cells of enzyme/inhibitor/activator ratio – which occurs, for the most part, at the cost of elevated expression of MMP-1 and its activator whereas the expression of MMP-2 and inhibitors remains virtually unchanged, which leads to the increase of the destructive potential of transformed cells.

Key words: matrix metalloproteinases (MMP) – MMP-1,-2,-9, tissue inhibitors of MMPs, cervical carcinoma cell lines: SiHa, Caski – HPV16, Hela and C4-1 – HPV18.