

УДК 577.3.4*24'142

©Коллектив авторов

КОЛЛАГЕНАЗЫ I И IV ТИПОВ И ИХ ЭНДОГЕННЫЕ РЕГУЛЯТОРЫ В ИММОРТАЛИЗОВАННЫХ И ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТАХ.

Н.И. СОЛОВЬЕВА¹, С.В. ВИНОКУРОВА¹, Э.А. ДИЛАКЯН¹, Т.А. ГУРЕЕВА¹,
В.А. ЖУРБИЦКАЯ², Т.О. БАЛАЕВСКАЯ¹.

¹НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН, Москва,

²Институт канцерогенеза ОНЦ, Москва

Для выяснения роли матриксных металлопротеиназ (ММП) в процессе канцерогенеза проведено исследование экспрессии коллагеназ I (ММП-1) и IV (ММП-2 и ММП-9) типов, а также активатора плазминогена урокиназного типа (уАП) и тканевых ингибиторов ММП (ТИМП) в immortalized (ИФ) и трансформированных фибробластах (ТФ). Работа проводилась на эмбриональных фибробластах крысы, последовательно immortalized LT-геном вируса полиомы и трансформированных геном E7 вируса папилломы человека - HPV-16. Установлено, что: 1. в ИФ активность коллагеназ была на уровне контроля. Активность уАП в ИФ увеличивалась (в 2-2,5 раза), а титруемое количество свободных эндогенных ингибиторов в ИФ и в контроле находилось на одном уровне и значительно превышало уровень в ТФ. 2. На стадии трансформации фибробластов геном E7 HPV-16 происходило увеличение активности коллагеназ IV типа и уменьшение активности коллагеназы I типа, причем наиболее выраженными эти показатели были в клетках с наиболее выраженными опухоленными свойствами. 3). В ТФ происходило уменьшение свободных эндогенных ингибиторов ММП относительно уровня активности ферментов и увеличение активности уАП, что свидетельствует об изменении соотношения фермент/ингибитор/активатор и предполагает увеличение деструктивного потенциала клеток (в данном случае за счет коллагеназ IV типа).

Ключевые слова: коллагеназы I и IV типов, интерстициальная коллагеназа, желатиназы А и Б, ММП-1, ММП-2, ММП-9, уАП, ТИМП-1, ТИМП-2, immortalization, трансформация, ген E7 HPV-16.

ВВЕДЕНИЕ. Коллагеназы I и IV типов относятся к семейству матриксных металлопротеиназ (ММП), функция которых связана с обменом

соединительнотканного матрикса. Особое место отводится ММП в генерализации процессов инвазии и метастазирования [1-11]. Коллагеназы специфически гидролизуют белки группы коллагена, обеспечивая инициацию и развитие инвазивных процессов. Коллагеназа I типа или интерстициальная коллагеназа – ММП-1 специфически гидролизует коллагены I, II и III типов – основные компоненты соединительнотканного матрикса и тем самым обеспечивает инвазию клеток через матрикс [1,4-6,9]. Коллагеназы IV типа или желатиназы А и Б – ММП-2 и ММП-9, соответственно, специфически гидролизуют коллаген базальных мембран (коллаген IV типа) и тем самым обеспечивают инвазию через базальные мембраны [1,4-8]. Регуляция активности ММП в физиологических условиях осуществляется эндогенными активаторами и ингибиторами. Основными эндогенными ингибиторами ММП являются тканевые ингибиторы ТИМП-1 и ТИМП-2, которые обладают определенной специфичностью [1,4-8]. Так, ТИМП-1 предпочтительно ингибирует ММП-1 и ММП-9, в то время как ТИМП-2 – ММП-2. Активация про-ММП происходит ступенчато с участием нескольких протеиназ. Про-ММП-1 и про-ММП-9 активируются в секретируемой форме. В этом процессе могут принимать участие плазмин, активатор пламиногена, калликреин, катепсин G, ММП-7 и др. Про-ММП-2 активируется в мембранно-связанной форме с помощью ММП мембранного типа – МТ1-ММП и ТИМП-2 [7,8,12], что предполагает важную роль ММП-2 в деструктивных процессах, происходящих в перичеллюлярном пространстве. Предпочтительная экспрессия ММП-1 или ММП-9 и ММП-2 может привести к различным последствиям в зависимости от их специфичности и локализации. С целью изучения роли ММП в процессе канцерогенеза было проведено исследование экспрессии активности коллагеназ I и IV типов, уАП, как участника активации про-ММП-1 и про-ММП-9 (через плазмин), а также тканевых ингибиторов ММП на стадии иммортализации и трансформации фибробластов.

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 [13]. В результате последующей трансфекции в иммортализованные клетки гена E7 HPV-16 были получены два трансформированных клона - trF8 и trB4, которые различались по степени туморогенности [14,15]. Клон trF8nmсс был получен путем селекции клона trF8 на бестимусных мышах. Все трансформированные клоны экспрессировали ген E7 HPV-16. Для исследования активности ММП-1 и уАП были использованы клоны IE5 и trF8, для ММП-2 и ММП-9 - клоны IE5, trF8, trB4 и trF8nmсс. Для работы было проведено пять независимых опытов по выращиванию клеток. В качестве контроля использовали первичную культуру эмбриональных фибробластов (ПФ).

Для определения протеолитической активности 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 снимали раствором Хенкса, содержащим 0,0002% химопсин, затем промывали 4-5 раз раствором Хенкса и осаждали

центрифугированием при 1000 об./мин. Кондиционированную среду собирали, замораживали и хранили при -20°C .

Для приготовления клеточных лизатов к клеткам добавляли раствор 0,45% NaCl, содержащий 1мМ CaCl_2 и 0,1% тритон X-100 (из расчета 1×10^6 клеток в 0,3мл раствора), затем клетки подвергали 6-кратному замораживанию-оттаиванию и разрушали в тефлоновом гомогенизаторе. Осадок отделяли центрифугированием, в супернатанте определяли активность. Все процедуры проводили при 4°C .

Определение активности коллагеназ. При определении активности ММП-1 в качестве субстрата использовали ^{14}C -ацетилированный коллаген кожи крыс. Коллаген был приготовлен и ацетилирован уксусным ангидридом как описано [16]. Активацию про-ММП-1 проводили в присутствии трипсина или АФМА (аминофенилмеркуриацетата). Активность ММП-2 и ММП-9 определяли, используя в качестве субстрата ^{14}C -ацетилированный коллаген из капсулы хрусталика глаза крупного рогатого скота [17]. Для активации про-ММП-2 и про-ММП-9 использовали АФМА (конечная концентрация в пробе мМ). Реакцию проводили в трис-HCl буфере pH 7,6, при 37°C в течение 16 часов. Активность выражали в мкг коллагена, гидролизованного в течение 16 часов, рассчитанного на 10^6 клеток.

Активность активатора плазминогена (уАП) определяли по гидролизу Z-Gly-Gly-Arg-MCA. Реакцию проводили в 0,1М Na-фосфатном буфере, pH 7,8. Инкубационная смесь содержала 20 – 50 мкл лизата или $0,02 - 0,06 \times 10^6$ свежих интактных клеток, суспендированных в 0,9% растворе NaCl (для определения мембрано-связанной активности), 20-30 мкл раствора субстрата в 70% диметилсульфоксиде (конечная концентрация 20-30 мкМ) и соответствующее количество буфера до конечного объема пробы 600 мкл. Инкубацию проводили от 1 до 3 час при 37°C , реакцию останавливали добавлением 2,4 мл 0,05М Na-ацетатного буфера pH 4,0. Флуоресценцию образовавшегося продукта гидролиза - 4-метил-кумаринил-7-амида измеряли при длинах волн: возбуждение 370 нм и флуоресценцию при 460 нм. Активность выражали в нмоль продукта, освобожденного за 1 мин и соотнесенного к 1×10^6 клеток [18].

Статистическую обработку результатов проводили по методу Стьюдента ($p < 0,05$) [19].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведено сравнительное исследование экспрессии активности коллагеназ I и IV типов, уАП, а также свободных эндогенных ингибиторов ММП - ТИМП в иммортализованных и трансформированных геном E7 HPV-16 фибробластах. Следует отметить, что уАП является активатором плазминогена, а плазмин рассматривается как основной физиологический активатор про-ММП-1 и про-ММП-9.

Данные по экспрессии активности ММП-1 в первичных (ПФ), иммортализованных (ИФ) и трансформированных (ТФ) фибробластах представлены на рис. 1. Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ТФ активность ММП-1 как секретируемая, так и в лизатах клеток, значительно снижена (в 7 и 2,5 раза соответственно) по сравнению с ПФ и ИФ. Активность ММП-1 в ИФ была незначительно снижена по сравнению с ПФ. Активация про-ММП-1 трипсином и АФМА приводила к значительному увеличению активности

(в 2-2,5 раза) только в ТФ. Следует отметить, что ММП-1 относится к секретируемым ММП, однако значительная часть ее активности, сравнимая с секретируемой активностью, обнаружена в лизатах клеток, особенно в ТФ т.е. остается внутри клеток.

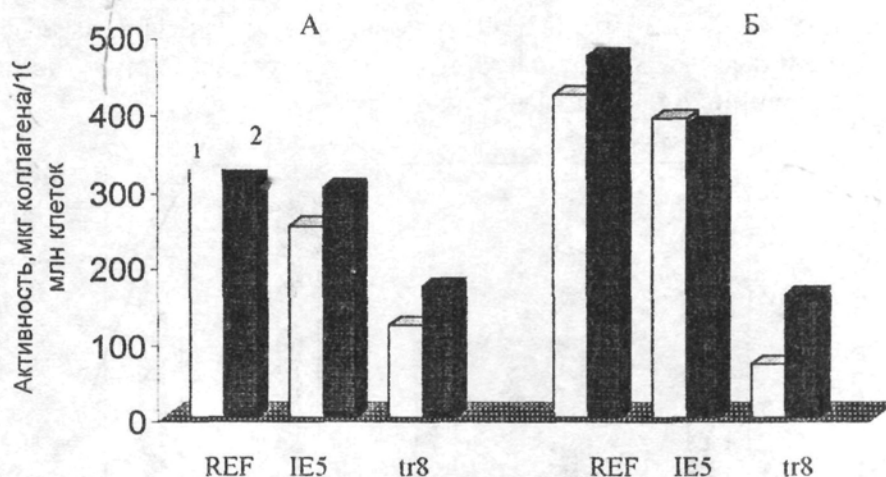


Рисунок 1.

Активность ММП-1 в immortalized и трансформированных фибробластах. А - активность в лизатах клеток. Б - секретируемая активность; 1-активность до и 2 - после активации трипсином и АФМА.

Данные по экспрессии ММП-2 и ММП-9 в ИФ и трех клонах ТФ представлены на рис. 2 и 3. Полученные результаты свидетельствуют о том, что суммарная секретируемая активность ММП-2 и ММП-9 (рис.2), как исходная, так и после активации АФМА, в ИФ (клон IE5) не изменялась по сравнению с ПФ (клон REF). Секретируемая активность коллагеназ IV в ТФ (клоны trF8 и trB4) увеличивалась в 2-3 раза по сравнению с ПФ и ИФ. Существенное увеличение активности коллагеназ (в 8-10 раз) наблюдалось в клетках клона trF8nmcc, однако большая часть секретируемого фермента находилась в латентной форме.

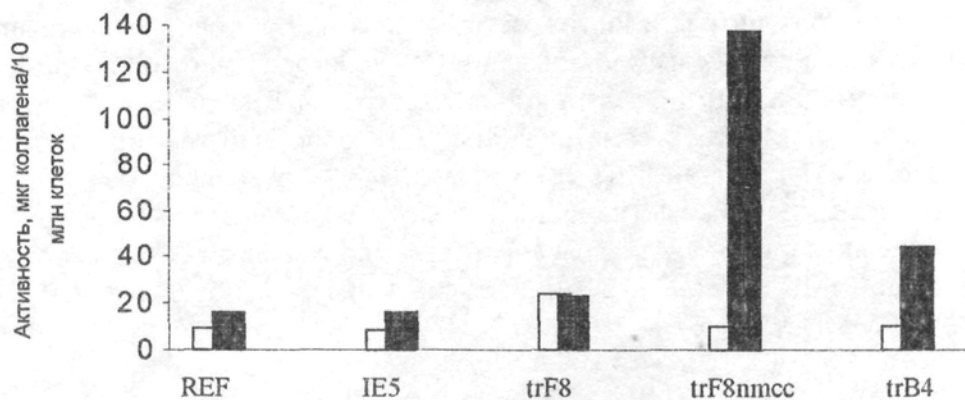


Рисунок 2.

Секретируемая активность ММП-2 и ММП-9. 1 - исходная активность; 2- активность в присутствии АФМА (конечная концентрация 10^{-3} М АФМА)

Из представленных на рис. 3 данных следует, что активность ММП-2 и ММП-9 в лизатах ИФ (IE5) не изменялась по сравнению с ПФ (REF), а в ТФ (trF8, trB4 и trF8nmcc) незначительно увеличивалась. Изменение активности коллагеназ IV типа в лизатах клеток носило тот же характер, что и секретируемая активность, однако активность в лизатах клеток была в 3-10 раз ниже, чем секретируемая. Известно, что ММП-2 и ММП-9 относятся к секретируемым ферментам. Полученные данные указывают на то, что в исследуемых клетках не происходит нарушения секреции коллагеназ IV типа.

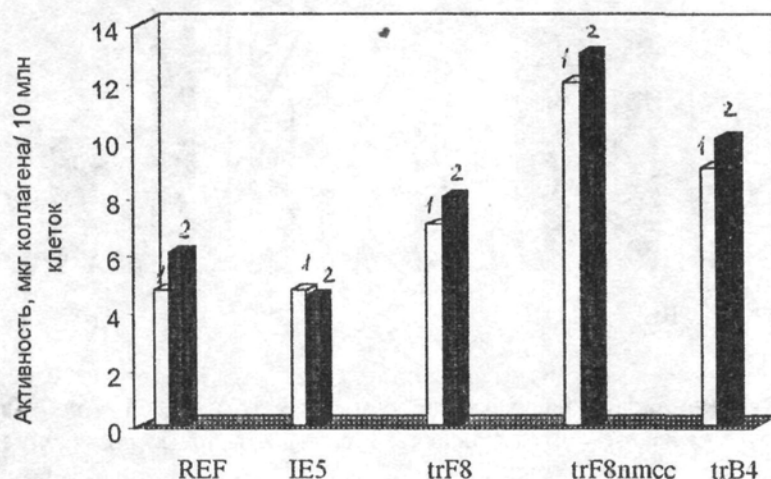


Рисунок 3.

Активность ММП-2 и ММП-9 в лизатах клеток. 1 - исходная активность, 2 - активность в присутствии АФМА (конечная концентрация АФМА $10^{-3}M$).

Из полученных данных следует, что в ИФ величины активностей коллагеназ I и IV типов находилась на уровне активности в ПФ или несколько ниже ее. В ТФ увеличение коллагенолитической активности происходило только за счет коллагеназ IV типа, причем наибольшей активностью обладали ТФ после селекции на животных (trF8nmcc).

Исследование активности уАП показало (рис.4), что его мембранно-ассоциированная активность и активность в лизатах клеток увеличивалась (в 2-2,5 раза) уже на стадии иммортализации (ИФ) и особенно (в 6-7 раз) - на стадии трансформации (ТФ). Следует отметить, что уАП является активатором плазминогена, а плазмин рассматривается как основной физиологический активатор про-ММП-1 и про-ММП-9, но не ММП-2. Активность ММП-1 в ТФ была снижена в то время как активность коллагеназ IV типа повышена (рис.1 и 2). Увеличение активности уАП, а, следовательно, повышенная возможность для активации про-ММП (через плазмин), по-видимому, наибольшее значение имеет для про-ММП-9.

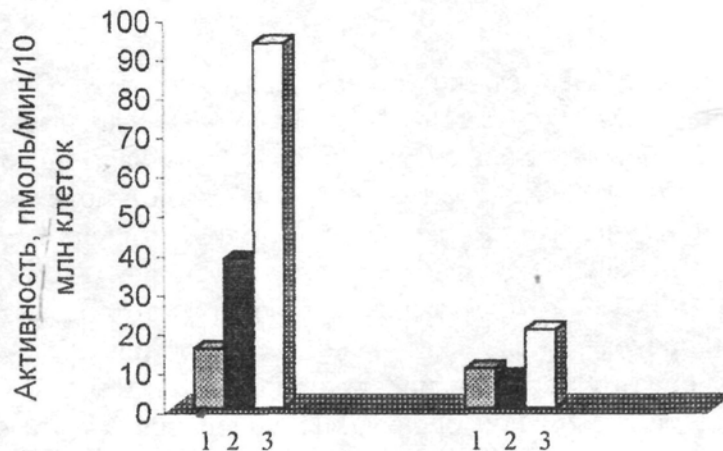


Рисунок 4.

Активность уАП: А - мембрано-ассоциированная; Б - активность в лизатах клеток; 1 - первичные (REF), 2 - иммортализованные (IE5), 3 - трансформированные (trF8) фибробласты.

Наличие свободных эндогенных ингибиторов коллагеназ IV типа 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 IV типа. Кондиционированную среду разводили в 2-10 раз.

В таблице представлены данные только для двух разведений, где прослеживается общий характер изменений соотношения фермент/ингибитор.

Таблица. Активность коллагеназ IV типа при различных разведениях кондиционированной среды.

Клоны Клеток	Активность, мкг коллагена/10 ⁶ клеток при двух разведениях	
	1:2,5	1:5
REF	19 ± 2,35	59 ± 4,04
IE5	17,6 ± 1,86	52 ± 6,11
trB4	19 ± 3,02	39 ± 2,33
trF8	35 ± 2,05	47 ± 4,03
trF8nmcc	17 ± 1,43	16 ± 3,05

Каждое значение является средним ± SD из пяти независимых опытов.

Из полученных данных следует, что свободные ингибиторы коллагеназ выявляются в клетках REF, IE5, trB4 и в меньшей степени в trF8, а в клетках trF8nmcc они не выявлялись совсем, при этом основная часть ферментов в них находилась в латентной форме, судя по определению активности (рис.2). Эти результаты свидетельствуют о том, что во всех трансформированных клетках соотношение фермент/ингибитор существенно изменено (в сторону увеличения активности ММП) по сравнению с исходными и иммортализованными фибробластами. Известно, что ММП могут взаимодействовать с эндогенными ингибиторами как в активной так и в латентной формах. Про-ММП-9 и про-

ММП-2 взаимодействуют по субстратсвязывающему С-концевому домену ферментов с ТИМП-1 и ТИМП-2. Про-ММП, находясь в комплексе с ингибитором, могут активироваться и проявлять частичную ферментативную активность. Однако после активации свободные молекулы ТИМП могут связываться с активным центром ферментов и полностью ингибировать их активность. Снижение количества или отсутствие свободных эндогенных ингибиторов ММП может свидетельствовать о большей потенциальной возможности проявления ферментативной активности ММП.

Таким образом исследование активности коллагеназ I и IV типов, а также уАП и эндогенных ингибиторов ММП в первичных, иммортализованных и трансформированных фибробластах показало, что:

1. В ИФ величины активности коллагеназ были на уровне активностей ПФ. Активность уАП в ИФ увеличивалась (в 2-2,5 раза), а титруемое количество свободных эндогенных ингибиторов в ИФ и ПФ находилось на одном уровне и значительно превышало уровень в ТФ.

2. На стадии трансформации фибробластов геном E7 HPV-16 происходило увеличение активности коллагеназ IV типа и уменьшение активности коллагеназы I типа, причем наиболее выраженными эти показатели были в клетках с наиболее выраженными опухоленными свойствами.

3. В ТФ происходило уменьшение свободных эндогенных ингибиторов ММП относительно уровня активности ферментов и увеличение активности уАП, что свидетельствует об изменении соотношения фермент/ингибитор/активатор и предполагает увеличение деструктивного потенциала клеток (в данном случае за счет коллагеназ IV типа).

Работа поддержана грантом РФФИ № 99-04-49630

ЛИТЕРАТУРА.

1. Nagase H. (1996) in Zinc Metalloproteinases in Health and Disease, (Ed. Hooper N.M.), Taylor & Francis, London, pp. 153-294.
2. Coussens L.M., Werb Z. (1996) Chem Biol., **3**, 895-904.
3. Werb Z. (1997) Cell, **91**, 439-442.
4. Соловьева Н.И. (1998) Биоорганическая химия, **24**, № 4, 245-255.
5. Woessner J.F. (1998) in Matrix Metalloproteinases, (Ed. Parks W.C., Mecham R.P.), Acad. Press, San Diego, pp. 1-15
6. Jeffry J.J. (1998) in Matrix Metalloproteinases, Ed. Parks W.C., Mecham R.P., Acad. Press, San Diego, pp. 15-38.
7. Yu A.E., Murphy A.N., Stetler-Stevenson W.G. (1998) in Matrix Metalloproteinases, Ed. Parks W.C., Mecham R.P., Acad. Press, San Diego, pp. 85-106.
8. Vu Th.H., Werb Z (1998) in Matrix Metalloproteinases, (Ed. Parks W.C., Mecham R.P.), Acad. Press, San Diego, pp. 115-137.
9. Nagase H., Woessner J.F. (1999) J. Biol. Chem., **274**, N 31, 21491-21494.
10. Vu Th.H., Werb Z. (2000) Genes & Devel., **14**, 2123-2133.
11. Chambers A.F., Matrisian L.M. (1997) J. Nat. Canc. Inst., **89**, N 17, 1260-1270.
12. Strongin A.Ya., Collier I., Bannikov G., Marmer B.L., Grant G.A., Goldberg G.I. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 5331-5338.

13. *Komissarova E.V., Soyfer M.V., Pavlova L.S., Kissel'gov F.L.* (1995) *Oncol. Rep.* **2**, 1169-1174
14. *Журбицкая В.А., Савельева Л.В., Зеленин А.В., Киселев Р.Л.*, (1999) *Мол. биол.* **33**, N2, 243-247
15. *Yartseva N., Komissarova E., Zhurbitskaya V., Rissel'jova N., Pavlova L., Fedortseva R., Kissel'gov F.* (1997), *Oncol. Rep.*, **4**, 629-635.
16. *Cawston T.E., Murphy G.* (1981) *Meth. Enzymol.*, **80**, 711-722.
17. *Liotta L.A., Tryggvason K., Garbisa S., Rohey P.G., Abe S.* (1981) *Biochemistry*, **20**, 100-108.
18. *Solovyeva N. I., Balayevskaya T.O., Dilakyan E.A., Zakamaldina-Zama T., Pozdnev V.F., Topol L.Z., Kissel'gov F.L.* (1995) *Int. J. Cancer*, **60**, N 4, 495-500.
19. *Лобашиев А.А.* (1986) *Дисперсионный анализ в биологии*. Издат. МГУ.

Поступила 20.10.2000.

TYPES I AND IV COLLAGENASES AND THEIR ENDOGENOUS REGULATORS IN IMMORTALIZED TRANSFORMED FIBROBLASTS

N.I. SOLOVYEVA¹, S.V. VINOKUROVA¹, E.A. DILAKYAN¹, T.A. GUREEVA¹, V.A. ZHURBITSKAYA², T.O. BALAYEVSKAYA¹

¹Orekhovich Institute of Biomedical Chemistry, RAMS, and ²Institute of Carcinogenesis, Cancer Research Center, RAMS, Moscow, Russia

To elucidate the role of matrix metalloproteinases (MMP) in carcinogenesis, the expression of collagenases of types I (MMP-I) and IV (MMP-2 and MMP-9) as well as the behaviour of urokinase-like plasminogen activator (uPA) and of tissue MMP inhibitors (TIMP) in immortalized (IF) and transformed (TF) fibroblasts were investigated. The study was carried out using embryo rat fibroblasts, sequentially immortalized with the LT gene of human papilloma virus and transformed with the E7 gene of human papilloma virus (HPV-16). As control was used the primary fibroblast (PF) culture of Fisher rats. In IF, the collagenase activity was at the same level as it was in PF. The activity of uPA in IF was increased by 2-2.5-fold; the titrated amount of free endogenous inhibitors in IF and PF was at essentially the same level while being markedly higher than in TF. At the stage of fibroblast transformation with the E7 gene of HPV-16, there was seen an increase of Type IV collagenases and a decrease of Type I collagenase, both these indices being most pronounced in the cells with most developed tumorigenic properties. In TF there occurred a decrease of free endogenous MMP inhibitors relative to the enzyme activity and, at the same time, a decrease in uAF activity, indicating the changes occurring in the enzyme/inhibitor/activator ratio and hence the enhancement of the destructive potential of the cells (in this case, at the cost of Type IV collagenase activity).

Key words: matrix metalloproteinases (MMP), collagenases of types I and IV, interstitial collagenase, gelatinases A and B, MMP-I, MMP-2, MMP-9, uPA, TIMP-1, TIMP-2, immortalization, transformation, gene E7 HPV-16.