

УДК. 577. 156. 616. 006.
©Коллектив авторов

ХАРАКТЕРИСТИКА ЭНДОГЕННЫХ ИНГИБИТОРОВ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ТРАНСФОРМИРОВАННЫХ ФИБРОБЛАСТОВ.

Э.А. Дилакян¹, Т.А. Гуреева¹, В.А. Журбицкая², Ю. А. Сулецкая¹,
Н.И. Соловьева¹

¹ГУ НИИ биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича РАМН,
119121, Москва, Погодинская ул. 10; факс 245-08-57.

²Институт канцерогенеза РОНЦ им. Н.Н. Блохина РАМН,
115478, Москва, Каширское шоссе 24.

Изучены термостабильные эндогенные ингибиторы цистеиновых протеиназ (ИЦП) из культур первичных (REF), иммортализованных (клон IE5) и трансформированных (клоны trF8 и trF8nmcc) фибробластов крыс. Все ИЦП являются обратимыми конкурентными ингибиторами катепсинов В и L и папаина. Исследование ингибирования выделенными ИЦП активности катепсинов В и L, очищенных из тех же культур клеток, показало, что величины K_i для ИЦП из культур иммортализованных и трансформированных клеток существенно выше, чем величина K_i для ИЦП первичных фибробластов. Эти данные позволяют предположить, что при трансформации и иммортализации свойства эндогенных ингибиторов, по-видимому, изменяются.

Ключевые слова: эндогенные ингибиторы цистеиновых протеиназ, катепсины В и L, онкогенная трансформация, иммортализация, фибробласты.

ВВЕДЕНИЕ. Эндогенные ингибиторы цистеиновых протеиназ (ИЦП) являются одним из важных факторов регуляции активности этих ферментов как при физиологических условиях, так и при патологических процессах (в частности, при неопластической трансформации [1-4]). В настоящее время ИЦП интенсивно изучаются, они выделены и охарактеризованы из многих органов и тканей животных и человека. Эндогенные ИЦП подразделяются на три семейства (стефины, цистатины и кининогены), которые принадлежат к одному белковому суперсемейству цистатинов [1,3]. Показано, что ИЦП подавляют трансформацию *in vitro* и тормозят развитие опухолей у экспериментальных животных [1,5,6]. Стефин А рассматривается как возможный опухолевый супрессор [7]. Установлена обратная зависимость между уровнями некоторых эндогенных ИЦП и степенью злокачественности неопластического процесса [1,8,9]. Однако исследования роли индивидуальных ИЦП в процессах злокачественной трансформации малочисленны, а полученные результаты довольно противоречивы. Ранее нами были обнаружены термостабильные ИЦП в культурах нормальных и трансформированных фибробластов [10]. В данной работе представлены предварительные результаты по сравнительной характеристике эндогенных ИЦП из культур фибробластов при иммортализации и трансформации.

ЭНДОГЕННЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ.

МЕТОДИКА. *Клеточные культуры.* Работу проводили на эмбриональных фибробластах крыс линии Фишер, последовательно immortalizированных и трансформированных. Immortalizированные клетки получали в результате трансфекции гена большого Т-антигена вируса полиомы в первичные фибробласты [11]. Трансформацию фибробластов осуществляли трансфекцией гена E7 вируса папилломы человека тип 16 (HPV16) в immortalizированные клетки [12]. В работе использовали 2 клон трансформированных фибробластов: клон trF8 и клон trF8nmss, полученный путем селекции клон trF8 на бестимусных мышках [12]. В качестве контроля использовали культуры первичных эмбриональных фибробластов крыс (REF) линии Фишер. Клетки культивировали в течение 48 часов в бессывороточной среде ДМЕМ (как описано ранее [13,14]).

Очистка ингибиторов. Кондиционированную (~70-90 мл) среду каждой культуры клеток, количество которых варьировало от $2-3 \times 10^6$ для первичных до $10-15 \times 10^6$ для immortalizированных и трансформированных фибробластов, хранившуюся при -22°C , оттаивали и доводили pH среды до 4,0, используя 1,0 М HCl, а затем концентрировали лиофилизацией. Полученные препараты кондиционированной среды каждой из исследуемых культур клеток (исходный препарат) растворяли в 4,0 мл 0,05 М Na-фосфатного буфера, содержащего 0,15 М NaCl, pH 7,5, и фракционировали гель-фильтрацией через сефадекс G-75, уравновешенный 0,05 М Na-фосфатным буфером, содержащим 0,15 М NaCl, pH 7,5 (колонок 1,6 x 100 см; "Pharmacia" Швеция). Элюцию белка осуществляли указанным выше буфером со скоростью ~3,5 мл/20 минут. Фракции, характеризующиеся ингибиторной активностью, объединяли, добавляли фенилметилсульфонилфторид (0,010 мг/мл раствора белка) и подвергали биоспецифической хроматографии на сефарозе 4В с иммобилизованным карбоксиметилированным папаином (КМ-папаин; колонка 1,0 x 6,5 см, уравновешенная 0,05 М Na-фосфатным буфером, pH 7,0, содержащим 0,5 М NaCl). Элюцию сорбированной фракции проводили 0,05 М $\text{Na}_2\text{PO}_4/\text{NaOH}$ буфером, pH 11,3, содержащим 0,5 М NaCl. После доведения pH до 7,0 с помощью 1М HCl фракции, содержащие ИЦП, диализовали против воды. Ингибиторную активность во фракциях с колонок оценивали по % торможения суммарной активности катепсинов В и L, которую определяли, используя при pH 6,5 в качестве субстрата (Z-Phe-Arg-MCA). Фракции, характеризующиеся наиболее высокой ингибиторной активностью, объединяли и использовали для дальнейшей работы. Все процедуры проводили при 4°C .

Ингибиторное действие ИЦП оценивали по торможению активности цистеиновых протеиназ: катепсинов В и L, очищенных из тех же культур клеток, и папаина ("Sigma"). ИЦП преинкубировали с ферментом в соотношении 20:1 (в/в) в течение 15-20 минут, затем определяли остаточную активность катепсинов В, L и папаина по гидролизу флуорогенных субстратов Z-Ala-Arg-Arg-MCA и Z-Phe-Arg-MCA соответственно (конечная концентрация 20-30 мкМ; субстраты синтезированы в ГУ НИИ БМХ РАМН) в 0,1 М Na-фосфатном буфере, pH 6,5, в присутствии и отсутствии DTT и ЭДТА (конечная концентрация 10^{-3}M), как описано ранее [13,14]. За единицу ингибиторной активности принимали то количество нмоль продукта реакции, на которое снижалась активность протеиназы за 1 минуту на 1 мг ингибитора.

Электрофорез проводили в 15% ПААГ в денатурирующих условиях по методу [15].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ. Проведено выделение и сравнительное исследование физико-химических и кинетических свойств ИЦП из культур первичных (ИЦП-REF), immortalizированных (ИЦП-IE5) и трансформированных (ИЦП-trF8 и ИЦП-trF8nmss) фибробластов.

При гель-фильтрации через сефадекс G-75 исходных концентрированных препаратов кондиционированной среды первичных, immortalizированных и трансформированных фибробластов элюционные профили выхода белка,

активности катепсинов В и L и активности ИЦП были практически одинаковыми. ИЦП элюировались с колонки после катепсинов в зоне выхода низкомолекулярных белков ~ 20 кДа (рис. 1; в качестве примера представлен только график гель-хроматографии препарата кондиционированной среды трансформированных фибробластов клона trF8). В результате удалось отделить более

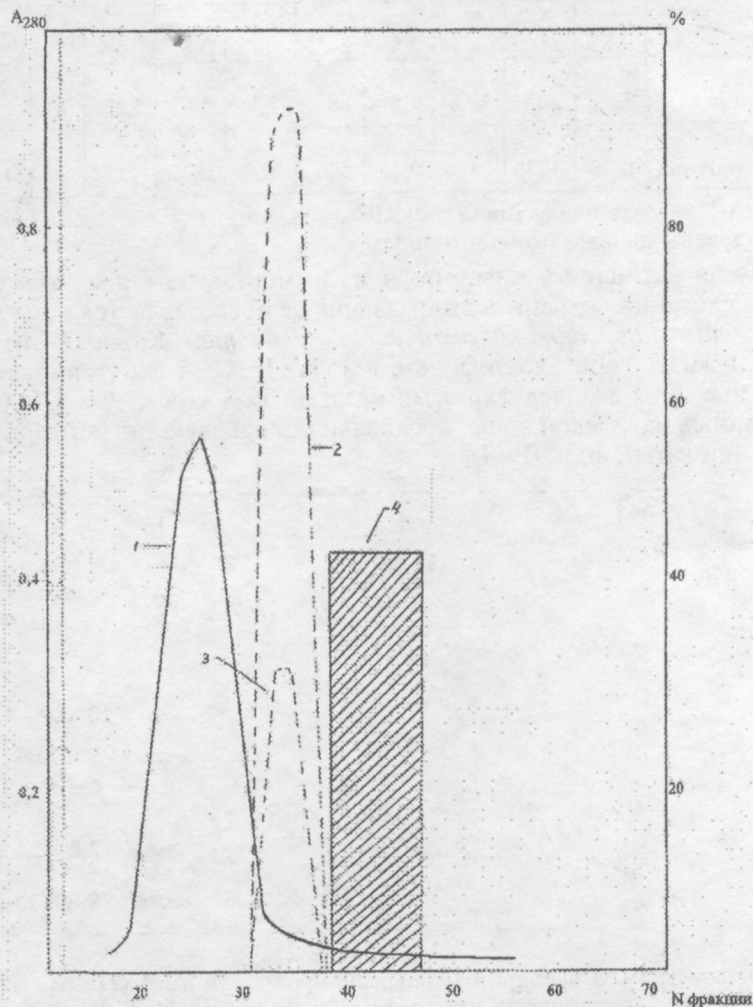


Рисунок 1

Гель-фильтрация препарата кондиционированной среды фибробластов клона trF8 через сефадекс G-75 (колонка 1,6 x 100 см), уравновешенный 0,05 M Na-фосфатным буфером, содержащим 0,15 M NaCl, pH 7,5. Скорость элюции - 11 мл/час; объем фракций - 3,5 мл. 1 - Оптическая плотность при 280 нм; 2 - активность катепсина L по гидролизу Z-Phe-Arg-MCA при pH 6,5 (нмоль/мин/мг); 3 - активность катепсина В по гидролизу Z-Ala-Arg-Arg-MCA при pH 6,5 (нмоль/мин/мг); 4 - ИЦП, % ингибирования.

высокомолекулярные белки (включая катепсины) и вычленив выходящие компактно фракции ИЦП, которые объединяли и подвергали биоспецифической хроматографии на сефарозе 4В с иммобилизованным КМ-папаином. Для всех типов исследуемых клеток ингибиторная активность была обнаружена только в сорбированной фракции. Таким образом получены препараты ИЦП-REF, ИЦП-IE5, ИЦП-trF8 и ИЦП-trF8птсс с очисткой в 71, 32, 90 и 84 раза соответственно (табл. 1). При равноценном выходе по белку для всех препаратов ИЦП удельная активность ИЦП из культур первичных и трансформированных фибробластов \sim в 2 раза выше,

ЭНДОГЕННЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ.

Таблица 1. Очистка ИЦП из кондиционированной среды первичных, иммортализованных и трансформированных фибробластов.*

Стадии очистки	Ингибиторы цистеиновых протеиназ											
	REF			IE5			TrF8			TrF8nmcc		
	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
Исходный препарат	2,82	25	1	3,6	20,2	1	3,8	16,9	1	3,2	15,8	1
Гель-фильтрация	1,17	265	10,6	1,5	88	4,4	1,62	222	13	4,0	213	13,5
Аффинная хроматография	0,38	1776	71	0,45	646	32	0,37	1521	90	0,4	1328	84

1 - Белок, мг; 2 - удельная активность ИЦП нмоль/мин/мг; 3 - степень очистки ИЦП.

* - Представлены данные типичного опыта

чем удельная активность ингибитора из иммортализованных клеток. На данном этапе исследований объяснить эти различия не представляется возможным.

Исследование физико-химических свойств. Каждый из полученных препаратов ИЦП при электрофорезе в 15% ПААГ в денатурирующих условиях давал по две зоны с молекулярными массами 12,3 кДа и 17,8 кДа (рис. 2). Белки, элюированные из каждой зоны, проявляли одинаковую ингибиторную активность в отношении катепсинов В и L.

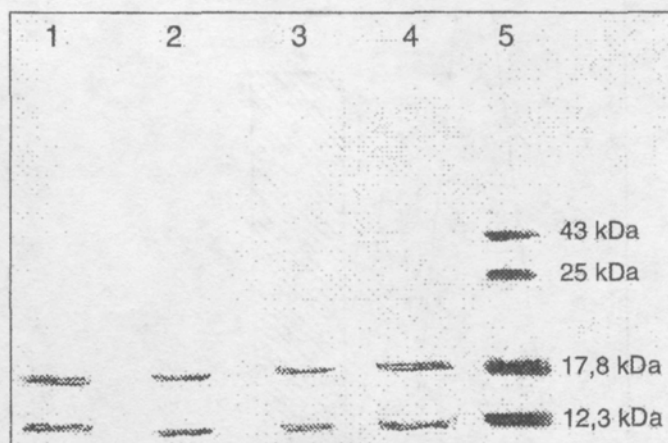


Рисунок 2

Электрофореграмма препаратов ИЦП. ЭФ проводили в 15% ПААГ в присутствии DDS-Na; гель окрашивали Кумасси R-250. Треки: 1 - ИЦП-REF; 2 - ИЦП-IE5; 3 - ИЦП-trF8; 4 - ИЦП-trF8nmcc; 5 - стандартные белки (яичный альбумин - 43 кДа; химотрипсин - 25 кДа; миоглобин - 17,8 кДа; цитохром С - 12,3 кДа).

ИЦП из всех типов исследуемых клеток сохраняли ингибиторную активность после термической обработки при 65°C в течение 90 минут, что указывает на их термостабильность.

Исследование зависимости ингибиторной активности выделенных ИЦП от pH в диапазоне от 4,5 до 9,0 (0,1 М Na-ацетатный и 0,1 М Na-фосфатный буфер) показало, что ИЦП из культур первичных, иммортализованных и обоих типов трансформированных фибробластов характеризуются широким оптимумом pH действия от 5,5 до 7,5.

Исследование ингибиторных свойств ИЦП. Проведено сравнительное исследование взаимодействия ИЦП-REF, ИЦП-IE5, ИЦП-trF8 и ИЦП-trF8nmcc и цистатина из белка куриных яиц (хорошо охарактеризованного ингибитора цистеиновых протеиназ) с катепсинами В и L, выделенными из кондиционированной среды всех исследуемых культур клеток (не опубликованные

Дилакян и др.

данные), а также папаином (цистеиновой протеиназой растительного происхождения). Все выделенные ИЦП являются конкурентными обратимыми ингибиторами, вызывающими полное торможение ферментативной активности. Как видно из представленных в табл. 2 данных, при ингибировании катепсинов В и L из всех типов клеток величины K_i для ИЦП-REF были близки по значениям ($4,7-9,0 \times 10^{-9}$ М). При торможении катепсинов В и L из нормальных и иммортализованных клеток величины K_i для ИЦП-IE5 ($6,0-6,5$ и $7,8-7,2 \times 10^{-8}$ М, соответственно) превышали K_i для ИЦП-REF ~ в 10 раз, а при ингибировании катепсинов из трансформированных клонов trF8 ($1,9-1,7 \times 10^{-8}$ М) и trF8nmcc ($1,7-2,0 \times 10^{-8}$ М) были в 3-4 раза выше величин K_i для ИЦП из первичных фибробластов. В то же время величины констант ингибирования для ИЦП-trF8 и

Таблица 2.

Значения K_i , М.

Катепсины	ИЦП-REF	ИЦП-IE5	ИЦП-trF8	ИЦП-trF8nmcc	Цистатин
REF Кат. В	$5,3 \times 10^{-9}$	$6,0 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-8}$	$0,8 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-7}$
Кат. L	$5,0 \times 10^{-9}$	$6,5 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-8}$	$1,6 \times 10^{-7}$
IE5 Кат. В	$8,4 \times 10^{-9}$	$7,8 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$
Кат. L	$9,0 \times 10^{-9}$	$7,2 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-7}$
TrF8 Кат. В	$4,9 \times 10^{-9}$	$1,9 \times 10^{-8}$	$1,0 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-8}$	$0,8 \times 10^{-7}$
Кат. L	$5,2 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-8}$	$1,2 \times 10^{-8}$	$0,8 \times 10^{-7}$
TrF8nmcc					
Кат. В	$4,7 \times 10^{-9}$	$1,7 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-8}$	$0,8 \times 10^{-7}$
Кат. L	$5,0 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-8}$	$1,9 \times 10^{-8}$	$1,5 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^{-7}$

Примечание: Значения K_i определяли, используя графики Лайнуивера-Берка зависимости скорости реакции от концентрации субстрата в отсутствии и в присутствии концентраций ингибитора.

ИЦП-trF8nmcc при ингибировании протеиназ из всех клеток варьировали от $1,0$ до $2,2 \times 10^{-8}$ М и от $0,8$ до $2,4 \times 10^{-8}$ М соответственно и превосходили K_i для ИЦП-REF в 1,5-3 раза. Приведенные данные свидетельствуют о более низком сродстве ингибиторов из иммортализованных и трансформированных клеток к катепсинам В и L, чем сродство ИЦП из первичных фибробластов к этим протеиназам. Причем наиболее резкое уменьшение сродства имело место при действии ИЦП-IE5 на катепсины из нормальных и иммортализованных клеток. Полученные результаты указывают на то, что онкогенная трансформация приводит к изменению взаимодействия ИЦП с протеиназами. В то же время K_i для цистатина из белка куриных яиц в отношении катепсинов из фибробластов на 1 - 2 порядка выше, чем K_i для ИЦП-REF, и в 2 - 10 раз выше K_i для ИЦП из иммортализованных и трансформированных клеток. Это позволяет предположить большее сродство ИЦП в отношении катепсинов по сравнению с цистатином. Кроме того, концентрации ИЦП-trF8 и ИЦП-trF8nmcc (10^{-7} М), необходимые для 50% торможения (IC_{50}) активности катепсинов В и L, очищенных из исследуемых клеток, значительно выше (в среднем в 1,5 - 2,5 раза), чем концентрации ИЦП-REF, ИЦП-IE5 и цистатина (табл. 3). Величины IC_{50} , при которых ИЦП-trF8 и ИЦП-trF8nmcc ингибируют активность папаина, в 2,5 раза выше величин IC_{50} , при которых указанные ингибиторы тормозят активность катепсинов. При этом ИЦП из первичных фибробластов и цистатин вызывают 50% торможение активности катепсинов В и L и папаина практически при одинаковых концентрациях ($2,0-5,0 \times 10^{-8}$ М). В связи с этим определенный интерес представляют результаты сравнительного исследования стефинов А и В, изолированных из ткани саркомы и нормальной печени человека [16]. В этой работе было показано, что величины K_i при ингибировании папаина и катепсина В стефином В из обоих упомянутых источников являются сопоставимыми, тогда как

ЭНДОГЕННЫЕ ИНГИБИТОРЫ ЦИСТЕИНОВЫХ ПРОТЕИНАЗ ИЗ ФИБРОБЛАСТОВ.

Таблица 3

Значения $[IC_{50}]$, М

Ингибиторы	Катепсины В и L				Папаин
	REF	IE5	trF8	trF8nmcc	
ИЦП- REF	$4,8 \times 10^{-8}$	$5,5 \times 10^{-8}$	$5,0 \times 10^{-8}$	$5,7 \times 10^{-8}$	$6,6 \times 10^{-8}$
ИЦП- IE5	$5,7 \times 10^{-8}$	$7,5 \times 10^{-8}$	$8,5 \times 10^{-8}$	$8,3 \times 10^{-8}$	$12,5 \times 10^{-8}$
ИЦП- trF8	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,08 \times 10^{-7}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$5,3 \times 10^{-8}$
ИЦП- trF8nmcc	$0,9 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$1,6 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$	$5,0 \times 10^{-8}$
Цистатин	$2,0 \times 10^{-8}$	$2,0 \times 10^{-8}$	$4,0 \times 10^{-8}$	$3,8 \times 10^{-8}$	$1,4 \times 10^{-8}$

стефин А саркомы тормозит активность этих протеиназ в меньшей степени, чем стефин А из ткани нормальной печени [16].

Все исследованные нами ИЦП принадлежат к суперсемейству цистатинов. Поскольку выделенные ИЦП являются секретируемыми ингибиторами, а стефины в настоящее время рассматриваются как внутриклеточные ингибиторы [1], изучаемые ИЦП, по-видимому, следует отнести к подсемейству цистатинов. Полученные из трансформированных клеток ИЦП проявляют большую специфичность в отношении катепсинов, чем цистатин. Величины K_i для ИЦП из культур иммортализованных и трансформированных клеток существенно выше, чем величина K_i для ИЦП первичных фибробластов. Выявленные различия в величинах K_i и IC_{50} (имеющих однонаправленный характер) для ИЦП из культур первичных, иммортализованных и трансформированных фибробластов позволяют предположить, что иммортализация и трансформация приводят к изменению ингибиторных свойств эндогенных ингибиторов. Разная степень торможения ИЦП активности катепсинов и папаина может быть обусловлена и изменением при трансформации свойств самих катепсинов.

Авторы выражают глубокую благодарность заведующему лаборатории молекулярной биологии вирусов Института канцерогенеза РОНЦ РАМН, профессору Ф.Л. Киселеву за предоставление клеточных культур и обсуждение полученных результатов.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ, номер проекта (№ 01-04-48838).

ЛИТЕРАТУРА

1. Calkins C.C., Sloane B.F. (1995) Biol. Chem. Hoppe-Seyler, **376**, 71-80.
2. Turk V., Bode W. (1993) In: Innovations in proteinases and their inhibitors, Berlin, Walter de Gruyter, pp.161-178.
3. Turk V., Podovnik M., Turk B., Turk D. (1997) In book: Proteolysis in cell functions, Amsterdam, IOS Press, pp.128-136.
4. Abrahamson M. (1988) Scand. J. Clin. Lab. Invest., **48**, Suppl. **191**, 21-31.
5. Garte S.L., Cox L., Currie D.C., Motz J. and Troll W. (1993) In: Proteinase inhibitors as cancer chemopreventive agents, Plenum Press, New York, pp.251-263.
6. Colella R., Chambers A.F., Denhardt D.T. (1993) In: Proteinase inhibitors as cancer chemopreventive agents, Plenum Press, New York, pp.199-216.
7. Lah T.T., Strojnik T., Levic N., Bervar A., Zajc I and PilkiN G. (2000) Int. J. Biol. Markers, **15**, 90-93.
8. Eide T.J., Jarvinen M., Hopsu-Havu V.M., Maltau J., and Rinne A. (1992) Acta Histochem., **93**, 241-248.
9. Leto G., Tumminello F.M., Pizzolanti G., Montalto G., Soresi M., Gebbia N. (1992) Oncology, **54**, 79-81.

10. Dilakyan E.A., Zhurbitskaya V.A., Vinokurova S.V., Gureeva T.A., Lubkova O.N., Topol L.Z., Kissel'ov F.L., Solovyeva N.I. (2001) Clin. Chim. Acta, **309**, 37-43.
11. Комиссарова Е.В., Ревазова Е.С., Киселев Ф.Л. (1988) Бюл. exper. биол. и мед. №3, 347-349.
12. Yartseva N., Komissarova E.V., Zhurbitskaya V.A., Kissel'ova N., Pavlova L., Fedortseva R., Kissel'ov F. (1997) Oncology Reports, **4**, 629-635.
13. Дилакян Э.А., Балаевская Т.О., Закамалдина-Цама Т.А., Тополь Л.З., Соловьева Н.И. (1994) Вopr. мед. химии, **40**, №3, 2-6.
14. Solovyeva N.I., Balayevskaya T.O., Dilakyan E.A., Zakamaldina-Zama T.A., Pozdnev V.F., Topol L.Z., Kissel'ov F.L. (1995) Int. J. Cancer, **60**, 495-500.
15. Laemmli U.K. (1970) Nature, **227**, N 5259, 680-685.
16. Lah T.T., Clifford J.L., Helmer K.M., Day N.A., Moin K., Honn K.V., Crissman J.D., Sloane B.F. (1989) Biochim. Biophys. Acta, **993**, 67-73.

Поступила 12.05.2002.

CHARACTERIZATION OF ENDOGENOUS CYSTEINE PROTEINASE INHIBITORS FROM TRANSFORMED FIBROBLASTS.

E.A. Dilakyan¹, T.A. Gureeva¹, V.A. Zhurbitskaya², Yu.A. Suletskaya¹,
N.I. Solovyeva¹

¹Institute of Biomedical Chemistry Russian Academy of Medical Sciences (RAMS),
Pogodinskaya St. 10, Moscow, 119121 Russia;

²Institute of Carcinogenesis, Russian Cancer Research Center, RAMS,
Kashirskoye shosse 24, Moscow, 115478 Russia

The thermostable endogenous cysteine proteinase inhibitors (CPI) from the primary (REF), immortal (clone IE5) and transformed (clones trF8 and trF8nmcc) fibroblasts were isolated. All the isolated CPI act as reversible competitive inhibitors of cathepsins B and L and of papain. The study of inhibition of cathepsins B and L, purified from the same cell cultures as the CPI, showed that the K_i values for CPI from the cultures of immortal and transformed cells were by one order higher than the K_i values for CPI of primary fibroblasts. The data obtained suggest that immortalization and transformation alter the CPI properties.

Key words: endogenous cysteine proteinase inhibitors, cathepsins B and L, transformation, immortalization, fibroblasts.