

УДК 616-006.44:577.15:577.122

*Максим ЛУЦИК¹, Святослав НАВИТКА², Ольга ПРИДАТКО³,
Ростислав СТОЙКА^{1,2}*

ФРАКЦІОНУВАННЯ І ВЛАСТИВОСТІ ПРОТЕЇНАЗ КЛІТИН МИШАЧОЇ ЛІМФОМИ NK/LY

¹*Інститут біології клітини НАН України
вул. Драгоманова, 14/16, 79005 Львів, Україна*

²*Львівський національний університет імені Івана Франка
вул. Університетська, 1, 79000 Львів, Україна*

³*Інститут експериментальної патології, онкології і радіобіології
ім. Р.Є. Кавецького НАН України, Київ
вул. Васильківська, 45, 03022 Київ, Україна*

Виявлено, що лізат клітин мишачої лімфоми NK/Ly містить протеїнази, активність яких за рівнем гідролізу казеїну при рН 5,4 становить 26,3 мкг казеїну за хвилину на мг білка, а при рН 8,0 - 15,0 мкг казеїну за хвилину на мг білка. Для очистки протеїназ і дослідження їх властивостей проведено фракціонування лізату клітин NK/Ly за допомогою ступеневого висолювання амонію сульфатом, диференційного осадження глобулінів за умов низької іонної сили і поступового зниження рН, хроматографії на колонці цібакрон-сефарози та афінної хроматографії на Т-гелі, а також шляхом імунопреципітації. Використання різних способів фракціонування дозволило досягти певного підвищення питомої протеолітичної активності препаратів, проте при цьому не вдалося одержати препарати протеїназ, які б були гомогенними за білковим складом. Результати електрофоретичного аналізу досліджуваних зразків протеїназ вказують на значну агрегацію білкових комплексів, до яких вони входять. Іншою особливістю протеїназ клітин лімфоми NK/Ly є нечутливість до інгібувальної дії йодацетаміду, α -2 макроглобуліну і трасилолу. Обговорено роль різних типів протеїназ при пухлинному рості.

Ключові слова: пухлини, лімфома NK/Ly, протеїнази.

Інвазія і метастазування пухлинних клітин тісно пов'язані з активністю різних типів протеїназ, здатних руйнувати білкові компоненти позаклітинного матриксу [1-5]. Під час пухлинного росту виявлено підвищену активність лізосомних протеїназ – катепсинів [6-11], одночасно із зниженням активності їхніх інгібіторів [9, 12, 13]. Такі зміни особливо яскраво виражені при агресивних формах раку грудної залози [14-16], легені [17-20], шлунку [6] і простати [21], що має прогностичне значення [4-16]. Варто зазначити, що крім протеолітичної активності, катепсини проявляють й інші біологічні ефекти, які можуть мати значення при пухлинному рості.

ті. Зокрема, катепсин D володіє мітогенною активністю [4, 7] і пригнічує імунну відповідь організму щодо пухлин [4], а катепсини B і L можуть відігравати важливу роль у руйнуванні позаклітинного матриксу і процесах пухлинної інвазії [4, 8, 22]. Тому катепсини і протеїнази вважаються потенційними молекулярними мішенями дії протипухлинних хіміотерапевтичних препаратів, а ефективні інгібітори цих ензимів є перспективними у лікуванні раку, включаючи його пізні стадії [4, 9, 24-30].

У проведеній роботі досліджено протеолітичну активність лізату клітин мишащої лімфоми NK/Ly [31, 32]. Проведено фракціонування такого лізату з метою очистки протеїназ, досліджено склад препаратів частково очищених протеїназ та їхні властивості, зокрема, чутливість до дії інгібіторів.

Матеріал і методи дослідження

Лімфому NK/Ly (асцитна форма) пасажували на мишах лінії C57Bl. Штам одержано з колекції Інституту експериментальної патології, онкології і радіобіології ім. Р.С. Кавецького НАН України (м. Київ). Клітинну масу NK/Ly осаджували центрифугуванням і зберігали при -20°C не більше 1 місяця. Лізат клітин готували розморожуванням цієї маси, після чого суспендували його в 3-х об'ємах фізіологічного розчину і нерозчинний матеріал видаляли центрифугуванням при 4000 об/хв протягом 20 хв.

Протеолітичну активність у лізаті та в одержаних з нього фракціях визначали за розщепленням казеїну при рН 5,4 і 8,0, як описано [33]. Для цього розчин казеїну (препарат отриманий за методом Хаммарстена [34]), інкубували із зразком протеїнази і нерозщеплений казеїн осаджували сумішшю 0,3 М трихлорацетату натрію, 0,2 М оцтової кислоти і 0,1 М трихлороцтової кислоти, рН 4,0-4,2. За таких умов навіть мінімально розщеплений казеїн не осаджується даним реагентом. Кількість розщепленого казеїну визначали у надосадовій рідині. Реакційна суміш складалася з 1 мл 1% розчину казеїну, який інкубували протягом 30 хв при 37°C із 0,2 мл досліджуваного зразка протеїнази (у контролі замість протеїнази додавали 0,2 мл дистильованої води). Після цього додавали рівний об'єм вищезазнаного розчину, що містив трихлороцтову кислоту, суміш витримували протягом 10-15 хв при 4°C , осад відділяли центрифугуванням (15 хв при 7 тис. об/хв.) і в надосадовій рідині визначали спектрофотометрично оптичне поглинання при 280 нм проти контролю.

Фракційне осадження білків лізату здійснювали амонію сульфатом [35]. Попередні експерименти показали, що найбільш доцільним є розділення білків лізату клітин NK/Ly на три фракції: умовно імуноглобулінову, альбумінову і пост-альбумінову. Для їх одержання до лізату клітин поступово, з перемішуванням на магнітній мішалці, додавали насичений розчин амонію сульфату, рН 6,0, у кількості 2/3 від об'єму лізату. Суміш залишали при 4°C на 1 добу, після чого осад відділяли центрифугуванням (10-15 хв при 4000 g), поміщали його на фільтрувальний папір для підсушування і зберігали при 4°C у герметично закритій посудині. Одержану фракцію позначали як умовно імуноглобулінову.

Для осадження альбумінової фракції до прозорої надосадової рідини додавали розчин 2 N HCl у невеликих об'ємах до досягнення рН 4,7, після чого додавали при постійному перемішуванні розраховану кількість тонко подрібненого амонію сульфату до досягнення ступеня насичення 55%. Кількість амонію сульфату розраховували за таблицею [35]. Суміш залишали на 6 годин при 4°C , осад відділяли

центрифугуванням (5000 g, 20 хв), підсушували на фільтрувальному папері і зберігали, як описано вище.

Решту білка осаджували амонію сульфатом (насичення 100%) із надосадової рідини після попереднього доведення її рН до 6,0 за допомогою 10% розчину NaOH. Осад збирали фільтруванням, підсушували на фільтрувальному папері і зберігали у герметично закритій посудині. Одержану фракцію позначали як пост-альбумінову.

Для подальших дослідів відбирали аліквоту осаду потрібної фракції, розчиняли у 3-кратному об'ємі дистильованої води і діалізували проти забуференого фізіологічного розчину (ЗФР).

Хроматографію на тіофільному гелі (Т-гель) [36] застосовували для розділення імуноглобулінів і білків неімуноглобулінової природи із умовно імуноглобулінової фракції. Т-гель селективно зв'язує імуноглобуліни у середовищі, що містить сульфати (натрію або амонію). За присутності хлоридів або фосфатів імуноглобуліни десорбуються з гелю. Хроматографію здійснювали за рекомендаціями виробника із незначними модифікаціями. На колонку із Т-гелем, врівноважену 0,7 М амонію сульфатом, рН 7,8, наносили розчин білків (із розрахунку 20 мг білка на 1 мл сорбента) імуноглобулінової фракції із тією ж концентрацією амонію сульфату і рН. Колонку промивали 5-ма об'ємами розчинника, збираючи фракції елюату. Адсорбований білок (імуноглобуліни), елюювали ЗФР, рН 7,4, із додачею 1 М NaCl. Додаткову фракцію білка елюювали тим же буфером, до якого додавали сечовину в концентрації 4 М. Концентрацію білка в елюаті визначали за оптичним поглинанням при 280 нм. Білок хроматографічних фракцій висолювали амонію сульфатом при 40 % насиченні даної солі. Осад збирали центрифугуванням (4000 g 20-30 хв.) і зберігали, як описано вище. Фракцію, яку елюювали 4 М сечовиною, перед висолюванням розводили у 2 рази дистильованою водою.

Хроматографію на цїбакрон-сефарозі (сорбент із іммобілізованим на агарозі барвником цїбакроновим голубим) використовують для селективного зв'язування деяких білків, найчастіше альбуміну сироватки крові. Разом з тим, селективність зв'язування важко передбачити, оскільки вона залежить від багатьох умов, у першу чергу, від іонного складу середовища. Тому застосування цього методу має де-що емпіричний характер. Нами було використано даний метод для видалення сироваткового альбуміну із білкових фракцій. Це дозволило підвищити питому активність протеїназ пост-альбумінової фракції.

Для здійснення хроматографії колонку (5×0,5 см) врівноважували буфером 0,01 М тріс-НСІ, рН 7,6, після чого на неї наносили 8 мг білка пост-альбумінової фракції, діалізованої проти вказаного буферу. Колонку промивали 5-ма об'ємами цього буферу для видалення незв'язаних білків. Адсорбовані білки елюювали 0,1 М тріс-НСІ буфером, рН 7,5-8,0, із додаванням 1,5 М NaCl. Визначення вмісту білка в елюаті, осадження білка хроматографічних фракцій амонію сульфатом (100% насичення), збір фракцій та їх зберігання здійснювали, як описано вище.

Електрофорез у поліакриламідному гелі використовували для дослідження білкового складу фракцій, зібраних під час очистки протеїназ. Застосовували два типи електрофорезу: електрофорез нативних білків у тріс-гліцинової системі, рН 8,9 (система Девіса) [37] та електрофорез за денатуруючих умов за присутності натрію додецилсульфату (система Леммлі) [35].

Антитіла до білків крові миші одержували шляхом гіперімунізації кроликів довшим введенням сироватки крові мишей лінії С57В1. Тривалість такої імуніза-

ції становила 2 місяці. Антитіла із отриманої антисироватки ізолювали афінною хроматографією на Т-гелі, осаджували амонію сульфатом (40% насичення) і зберігали як осад при 4°C.

Статистичну обробку одержаних результатів здійснювали за стандартним методом, використовуючи програму Excel, а достовірність різниці оцінювали за *t* критерієм Стьюдента.

Результати дослідження

Як видно з таблиці 1, у надосадовій рідині центрифугованого лізату клітин мишачої лімфоми NK/Ly містяться протеїнази, здатні гідролізувати казеїн за кислого (5,4) і лужного (8,0) значення рН. Для більш детального дослідження Властивостей протеїназ було проведено фракціонування лізату лімфомних клітин, одержаних після видалення асцити на 12-14 день росту пухлини. Білки надосадової рідини лізату піддавали фракційному висолюванню амонію сульфатом, в результаті чого одержували 3 фракції: умовно імуноглобулінову (осад білка при 40% насичення солі, рН 6,0), альбумінову (осад білка після доведення насичення солі у надосадовій рідині до 55%, рН 4,7) і пост-альбумінову (осад решти білків надосадової рідини при 100% насиченні солі, рН 6,5). Вихід білка (із 100 мл клітинного лізату) в окремих фракціях становив: 2-2,5 г в імуноглобуліновій, 0,6-0,8 г – в альбуміновій і 80-100 мг – у пост-альбуміновій фракції. Результати визначення протеолітичної активності цих фракцій графічно приведено на рис. 1.

Таблиця 1

Протеїназна активність лізатів клітин лімфоми NK/Ly

Розщеплення казеїну, мкг за хв. на мг білка лізату	
рН 5,4	рН 8,0
26,3±2,4	15,0±1,3

Білковий склад одержаних фракцій за результатами диск-електрофорезу в тріс-гліциновій буферній системі, рН 8,9, наведено на рис. 2. Як видно із цих результатів, значна кількість білка залишається на старті і не мігрує під час електрофорезу в поліакриламідному гелі, що вказує на наявність у досліджуваних зразках високо агрегованих білкових комплексів.

Зроблено спробу очистити протеїнази з імуноглобулінової фракції шляхом фракційного осадження білків поступовим зниженням рН при низькій іонній силі (0,05 М ацетатний буфер) і поступовому зниженні рН від 5,5 до 4,7. Активність одержаних при цьому фракцій наведено у таблиці 2.

Наведені дані свідчать про те, що протеїнази клітин мишачої лімфоми NK/Ly мають властивості глобулінів. Вони осаджуються у слабо кислому середовищі при низькій іонній силі, проте питома активність ензимів при цьому дещо знижується.

Враховуючи наявність білків сироватки крові в асцитній рідині, зроблено спробу видалити їх шляхом імунопреципітації специфічними антитілами. Для цього очищені антитіла проти білків сироватки крові миші поступово у зростаючій кількості додавали до розчину постальбумінової фракції до припинення утворення преципітату в надосадовій рідині. На рис. 3 наведено електрофореграми одержані

них препаратів і їх протеолітичну активність. Нами досягнуто приблизно 3-кратної очистки протеїназ, разом з тим, на електрофореграмах видно значну кількість агрегованих білків, які не проникають в гель під час електрофорезу.

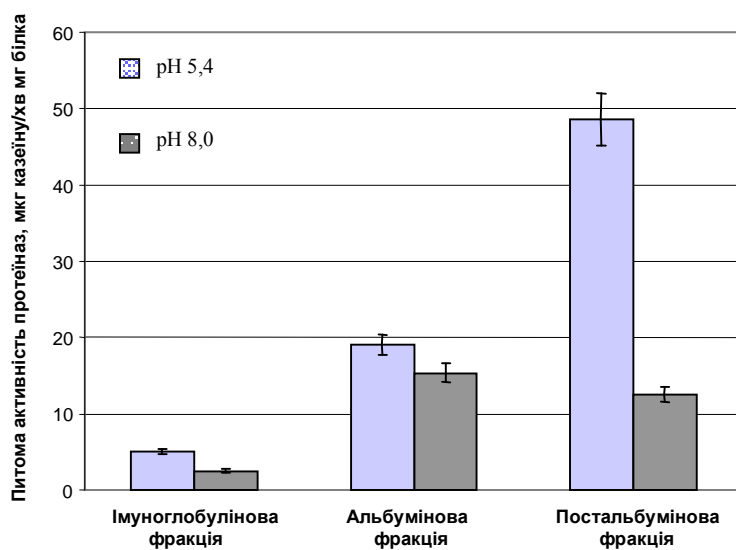


Рис. 1. Протеолітична активність білкових фракцій, одержаних шляхом фракційного висолування амонію сульфатом лізату клітин лімфоми NK/Ly.

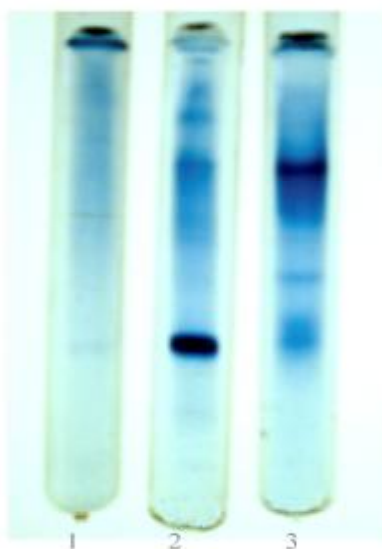
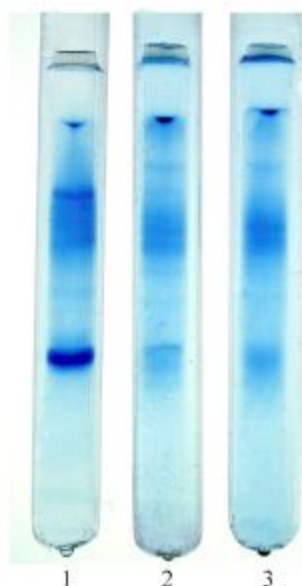


Рис. 2. Диск-електрофорез білкових фракцій, одержаних із лізату клітин лімфоми NK/Ly: 1 – імуноглобулінова фракція; 2 – альбумінова фракція; 3 – пост-альбумінова фракція.

Таблиця 2

Протеолітична активність білків імуноглобулінової фракції та її субфракцій, отриманих діалізом проти 0,05M ацетатного буферу і поступовим зниженням рН

Білкові фракції	Протеолітична активність, мкг казеїну/хв. на мг білка
Імуноглобулінова	44,00±4,2
Осад 1, одержаний при рН 5,5	23,51±2,1
Осад 2, одержаний при рН 5,0	28,00±2,6
Осад 3, одержаний при рН 4,7	11,02±0,9
Осад 4, одержаний осадженням амонію сульфатом при 50% насиченні солі при рН 5,0	6,34±0,5



Фракція	Протеолітична активність, мкг казеїну за хв. на мг білка
1	42,17±4,2
2	91,67±8,9
3	126,7±1,1

Рис. 3. Видалення альбуміну із пост-альбумінової фракції із високим вмістом протеїназ шляхом імунопреципітації антитілами проти білків сироватки крові миші. 1 – препарат вихідної пост-альбумінової фракції; 2 – препарат після обробки антитілами, кількість яких була рівна кількості білка у фракції; 3 – препарат після обробки антитілами, доданими у подвійній кількості відносно білка у фракції. У супутній таблиці показано протеолітичну активність одержаних препаратів.

При хроматографії пост-альбумінової фракції білків лізату на колонці ці бакрон-сефарози встановлено, що основна маса білків, включно з протеїназами, не зв'язувалася з сорбентом. Адсорбовані білки елюювалися з колонки буфером 0,1 М тріс із 1,5 М NaCl, рН 8,0 широкою зоною, в якій не було протеїназної активності. Протеолітичну активність одержаних фракцій наведено у таблиці 3. Видно,

що питома активність протеїназовмісної фракції зросла у 3 рази порівняно з такою активністю у вихідному препараті (129,2±10,6 проти 42,2±4,2 мкг розщепленого казеїну за хв. на мг білка). За даними диск-електрофорезу ця фракція містить кілька білкових зон, серед яких кількісно переважає зона альбуміну.

Таблиця 3

Протеолітична активність білків пост-альбумінової фракції, одержаних хроматографією на цїбакрон-сефарозі

Фракція	Протеолітична активність, мкг казеїну / хв. на мг білка
Вихідний препарат	42,2±4,2
Неадсорбовані білки	129,2±10,6
Адсорбовані білки	0

Враховуючи значну агрегованість білків у отриманих фракціях, проведено електрофорез у поліакриламідному гелі за присутності натрію додецилсульфату (дані не показано). Виявлено значну кількість білкових смуг у кожній із фракцій, особливо в умовно імуноглобуліновій фракції, в якій можна розрізнити до 30 смуг. Обробка додецилсульфатом за стандартних умов не призводила до повної дезагрегації комплексів і значна кількість білка не проникала у 5,5% ПААГ.

Відомо, що при старінні пухлин асцитна рідина стає каламутною, оскільки вона містить багато субклітинних частинок. Останні одержували центрифугуванням асцитної рідини (11000 об/хв. протягом 30 хв при 4°C) після видалення з неї клітин попереднім центрифугуванням на низьких швидкостях (1500 g). Оскільки отриманий зразок проявляв невисоку протеолітичну активність, ми вважаємо, що, діючи протягом тривалого часу, протеїнази можуть продукувати пептиди, які володіють токсичною дією. За даними електрофорезу за присутності натрію додецилсульфату, одержаний препарат має складний білковий склад, подібний до складу імуноглобулінової фракції.

Застосовані нами інгібітори протеїназ (йодацетамід, трасилол і препарат α 2-макроглобуліну із сироватки крові людини) не впливали на активність протеїназ клітин лімфоми NK/Ly. У контрольних експериментах з трипсином показано, що активність останнього пригнічувалась, найефективніше діяв трасилол (таблиця 4).

Таблиця 4

Вплив інгібіторів протеїназ на активність протеїназовмісної фракції клітин лімфоми NK/Ly та трипсину

Інгібітор протеїназ	Протеолітична активність, мкг казеїну / хв. на мг білка	
	Протеїназовмісна фракція лізату клітин NK/Ly	Трипсин (0,01% розчин)
Контроль	8,75±0,7	373,3±48,0
Йодацетамід (7 мг/мл)	8,75±0,8	210,7±32,0
α 2-макроглобулін (20 мг/мл)	8,75±0,8	120,4±45,0
Трасилол 1:10 (50000)	8,75±0,7	0

Обговорення результатів

Роль протеолітичних ферментів при пухлинних захворюваннях не обмежується руйнування білків позаклітинного матриксу, що сприяє інвазії пухлин і метастазуванню. Протеїнази є також чинниками, які шляхом обмеженого протеолізу білків запускають інші патологічні процеси [38]. Тому дослідження протеїназ і їх регуляторних функцій у канцерогенезі є перспективними для розробки методів ранньої діагностики онкологічних захворювань і для обґрунтування вибору мішеней хіміотерапії.

З пухлинами асоційовані протеїнази усіх основних каталітичних типів: серинові, цистеїнові, аспартильні і металопротеїнази. Серед них можна виділити чотири групи, тісно зв'язані з процесами канцерогенезу, а саме: матриксні металопротеїнази, тканинні калікреїни, аспартильні катепсини, цистеїнові катепсини і протеїноконвертази. Найбільш повно досліджені катепсини, зокрема цистеїнові катепсини В і L, а також аспартильний катепсин D. Запропоновано використовувати високий рівень експресії цих катепсинів як прогностичний показник протікання захворювання [9].

У пухлинних клітинах, особливо на інвазивних ділянках пухлин, лізосоми локалізуються переважно у примембранному просторі й їх вміст виділяється у зовнішньоклітинне середовище [39]. Разом із матриксними металопротеїназами (ММР) і системою активації плазміногену, вони беруть участь у руйнуванні позаклітинного матриксу і, таким чином, активують клітинну рухливість, інвазію й ангиогенез.

Наведені дані свідчать про значну гетерогенність і поліфункціональність протеїназ, залучених до процесів канцерогенезу. Запропонований нами підхід до одержання протеїназ із клітинного лізату не дозволив одержати високо очищені препарати цих ензимів. Ми вважаємо, що частково ця проблема зумовлена різною субклітинною локалізацією протеїназ. Крім цього, нами встановлено, що протеїнази в клітинному лізаті асоційовані у стійкі надмолекулярні комплекси, і це суттєво ускладнює ізолювання з них окремих протеїназ. Тому більш перспективним тут могло б бути попереднє фракціонування клітинних лізатів і одержання окремих субклітинних фракцій, з яких надалі можна було б проводити очистку протеїназ. Однак, для цього необхідно мати значно більшу кількість клітинного матеріалу, ніж та, яку було використано у даній роботі. Нами було виділено субклітинну фракцію пухирців із асцитної рідини після видалення клітин, які перебували на термінальній стадії росту пухлини. У цій фракції виявлено протеїназну активність, а при електрофорезі у ПААГ із натрію додецилсульфатом в ній показано велику кількість білкових зон. Однак, кількість такого матеріалу була надто малою для здійснення подальшого фракціонування.

У нормальних клітинах активність протеїназ знаходиться під контролем їх ендогенних інгібіторів. Особливістю пухлинного процесу є порушення рівноваги між активністю протеїназ та їх інгібіторів на користь перших. Тому застосування природних і синтетичних інгібіторів протеїназ вважається перспективним напрямком у протипухлинній хіміотерапії. Дослідження *in vivo* на експериментальній пухлині раку підшлункової залози миші показали, що фармакологічне інгібування активності цистеїнових катепсинів на лише інгібує ріст пухлини, але й її васкуляризацію та інвазивність [3]. Аналогічні дані отримані на моделі гліобластоми ми-

ші, де виявлено зниження рівня катепсину В і ММР-9, що значно гальмувало ріст пухлини, інвазію ракових клітин та пухлинний ангиогенез [40].

Інгібітори протеїназ, які досліджували для пригнічення пухлинного росту, включають як відомі чинники (трасилол, α 1-антитрипсин, α 2-макроглобулін), так і нові препарати пептидної природи (цистатини-стефіни А, В, С) [41–43]. Ряд інгібіторів протеїназ природного походження і синтетичні речовини перебувають на різних стадіях клінічного випробування. Серед них варто назвати бріостатин (природний макроциклічний лактон), модифіковані тетрацикліни, синтетичні низькомолекулярні інгібітори металопротеїназ (батимастат, маримастат) [10].

Досліджувані нами препарати протеїназ клітин лімфоми NK/Ly виявилися стійкими до інгібувальної дії трасилолу, йодацетаміду й α 2-макроглобуліну.

Ми припускаємо, що протеїнази клітин мишачої лімфоми NK/Ly можуть мати значення у процесах, пов'язаних з інтоксикацією пухлиноносія, особливо на термінальних стадіях росту асцитної пухлини, внаслідок розщеплення ними білків асцитної рідини й утворення при цьому пептидів із цитотоксичною дією.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Веремєєнко К.Н., Голобородько О.П., Кизим А.И.* Протеолиз в норме и при патологии. – К., Здоров'я. – 1988. – 198с.
2. *Fingleton B.* Matrix metalloproteinases: roles in cancer and metastasis // *Front. Biosci.* – 2006. – Vol. 11. – P. 479-491.
3. *Joyce J. A., Amos B., Kareem Ch., et al.* Cathepsin cysteine proteases are effectors of invasive growth and angiogenesis during multistage tumorigenesis // *Cancer Cell.* – 2004. – Vol. 5, №5. – P. 443-453.
4. *Nomura T., Katunuma N.* Involvement of cathepsins in the invasion, metastasis and proliferation of cancer cells // *J. Med. Invest.* – 2005. – Vol. 52, №1-2. – P. 1-9.
5. *Schwartz M.K.* Tissue cathepsin as tumor markers // *Clin. Chim. Acta.* – 1995. – Vol. 237. – P. 67-78.
6. *Dohchin A., Suzuki J.I., Seki H., Masutani M., Shioto H., Kawakami Y.* Immunostained cathepsin B and L correlate with depth of invasion and different metastatic pathways in early stage gastric carcinoma // *Cancer.* – 2000. – Vol. 89. – P. 482 – 487.
7. *Glondou M., Coopman P., Laurent-Matha V., Garcia M., Rochefolt H., Liaudet-Coopman E.* A mutated cathepsin D devoid of its catalytic activity stimulates the growth of cancer cells // *Oncogene.* – 2001. – Vol. 20. – P. 6920-6929.
8. *Kane S.E., Gottesman M.M.* The role of cathepsin L in malignant transformation // *Semin. Cancer Biol.* – 1990. – Vol. 1, №2. – P. 127-136.
9. *Kos J., Lah T.T.* Cysteine proteinases and their endogenous inhibitors: target proteins for prognosis, diagnosis and therapy of cancer (review) // *Oncol. Rep.* – 1998. – Vol. 5, № 6. – P. 1349-1361.
10. *Leto G., Gebbia N., Rausa L., Tumminello F.M.* Cathepsin D in the malignant progression of neoplastic diseases (review) // *Anticancer Res.* – 1992. – Vol. 12, №1. – P. 235-240.
11. *Liotta L.A., Tryggvason K., Garbissa S., Hart I., Foltz C.M.* Metastatic potential correlates with enzymatic degradation of basement membrane collagen // *Nature.* – 1980. – Vol. 284. – P. 67-68.
12. *Merz G.S., Benedikz E., Schwenk V., Johansen T.E., Vogel L.K., Rushbrook J.J., Wisniewski H.M.* Human cystatin C forms an inactive dimer during intracellular trafficking in transfected CHO cells // *J. Cell. Physiol.* – 1997. – Vol. 173. – P. 423-432.

13. *Visscher D.W., Hoyhtya M., Ottosen S.K., Liang C-M., Sarkar F.H., Crissman J.D., Fridman R.* Enhanced expression of tissue inhibitor of metalloproteinase-2 (TIMP-2) in the stroma of breast carcinomas correlates with tumor recurrence // *Int. J. Cancer.* – 1994. – Vol. 59. – P. 339-344.
14. *Levicar N., Kos J., Blejec A., Golouh R., Vrhovec I., Frkovic-Grazio S., Lah T.T.* Comparison of potential biological markers cathepsin B, cathepsin L, stefin A and stefin B with urokinase and plasminogen activator inhibitor – 1 and clinicopathological data of breast carcinoma patients // *Cancer Detect. Prev.* – 2002. – Vol. 26. – P. 42 – 49.
15. *Premzl A., Puizdar V., Zavasnik-Bergant V., Kopitar-Jerala N., Lah T.T., Katunuma N., Sloane B.F., Turk V., Kos J.* Invasion of ras-transformed breast epithelial cells depends on the proteolytic activity of cysteine and aspartic proteinase // *J. Biol. Chem.* – 2001. – Vol. 382. – P. 853-857.
16. *Rochefort H.* Cathepsin D in breast cancer: a tissue marker associated with metastasis // *Eur. J. Cancer.* – 1992. – Vol. 28. – P. 1780-1783.
17. *Higashiyama M., Doi O., Kodama K., Yokouchi H., Kasugai T.* Influence of cathepsin D expression in lung adenocarcinoma on prognosis: possible importance of its expression in tumor cells and stromal cells, and its intracellular polarization in tumor cells // *J. Surg. Oncol.* – 1997. – Vol. 65, №1. – P. 10-19.
18. *Kayser K., Richter N., Hufnagl P., Kayser G., Kos J., Werle B.* Expression, proliferation activity and clinical significance of cathepsin B and cathepsin L in operated lung cancer // *Anticancer Res.* – 2003. – Vol. 23, №3. – P. 2767-2772.
19. *Ledakis P., Tester W.T., Rosenberg N., Romero-Fischmann D., Cathepsins D.B. and L* in malignant human lung tissue // *Clin. Cancer Res.* – 1996. – Vol. 2, №3. – P. 561-568.
20. *Sloman A., D'Amico F., Yousem S.A.* Immunohistochemical markers of prolonged survival in small cell carcinoma of the lung. An immunohistochemical study // *Arch. Pathol. Lab. Med.* – 1996. – Vol. 120, № 5. – P.465-472.
21. *Whitbread A.K., Vevenis-Lowe T.L.* The role of kallikrein-related peptidases in prostate cancer: potential involvement in an epithelial to mesenchymal transition // *J. Biol. Chem.* – 2006. – Vol. 387, №6. – P.707-714.
22. *Broker L.E., Huisman C., Span S.W., Rodriguez J.A. Krutz F.E., Giaccone G.* Cathepsin B mediates caspase-independent cell death induced by microtubule stabilizing agents in non-small cell lung cancer cells // *Cancer Res.* – 2004. – Vol. 64, № 1. – P. 27-30.
23. *Coussens L.M., Fingleton B., Matrisian L.M.* Matrix Metalloproteinase Inhibitors and Cancer: Trials and Tribulations // *Science.* – 2002. – Vol. 295. – P.2387-2392.
24. *Istvan Botos, Leonardo Scapozza, Dachuan Zhang, Lance A. Liotta, Edgar F. Meyer.* Batimastat, a potent matrix metalloproteinase inhibitor, exhibits an unexpected mode of binding // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1996. – Vol. 93. – P. 2749-2754.
25. *Сыновец А.С., Левицкий А.П.* Ингибиторы протеолитических ферментов в медицине. – К., Здоров'я. – 1985. – 72с.
26. *Jarvinen M., Rinne A.* Human spleen cysteine proteinase inhibitor: purification, fractionation into isoelectric variants and some properties of the variants // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – Vol. 708. – P. 210-217.
27. *Giavazzi R., Garofalo A., Ferri C., Lucchini V., Bone E.A., Chiari S., Brown P.D., Nicoletti M.I. and Taraboletti G.* Batimastat, a synthetic inhibitor of matrix metalloproteinases, potentiates the antitumor activity of cisplatin in ovarian carcinoma xenografts // *Clinical Cancer Research* – 1998. – Vol. 4. – P. 985-992.
28. *Rao B.G.* Recent developments in the design of specific Matrix Metalloproteinase inhibitors aided by structural and computational studies // *Curr. Pharm. Des.* – 2005. – Vol. 11, №3. – P. 295-322.

29. *Stetler-Stevenson W.G.* Matrix metalloproteinases in angiogenesis: a moving target for therapeutic intervention // *Clin. Invest.* – 1999. – Vol. 103. – P. 1237-1241.
30. *Weber E, Bahn H, Günther D.* Monoclonal antibodies against cathepsin L and procathepsin L of different species // *Hybridoma.* – 1997. – Vol. 16, №2. – P.159-166.
31. *Шеллеу К, Экхард Ш., Немет Л.* Лекарственное лечение опухолевых заболеваний. – Будапешт. – 1975. – 413с.
32. *Nemeth L., Kellner B.* A new mouse ascites tumor to be used as screening tool // *Neoplasma.* – 1961. – Vol. 8. – P.337-343.
33. *Каверзнева Е.Д., Рассулин Ю.А.* Выделение и очистка протеазы *Str. griseus* на карбоксиметилцеллюлозе // *Биохимия.* – 1964. – Т. 23, № 6. – С. 1042-1051.
34. *Hipp N.J., Groves M.L., Custer J.H., McMeekin T.L.* Separation of α -, β - and κ -casein // *J. Dairy Sci.* – 1952. – Vol. 35. – P.272-281.
35. *Скоупс Р.* Методы очистки белков. Пер. с англ. – М.: Мир. – 1985. – 358с.
36. T-Gel™ Purification Kit. Instructions.-Pierce Biotechnology, Inc., 6/2003. Printed in the USA.
37. *Маурер Г.* Диск-электрофорез. Теория и практика электрофореза в полиакриламидном геле. – М., Мир. – 1971. – 210с.
38. *Sloane B.F., Sameni M., Podgorski I., Cavallo-Medved D., Moin K.* Functional imaging of tumor proteolysis // *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.* – 2006. – Vol. 46. – P. 301-315.
39. *Koblinski J.E., Ahram M., Sloane B.F.* Unraveling the role of proteases in cancer // *Clin. Chim. Acta.* – 2000. – Vol. 291, №2. – P. 113-135.
40. *Lakka S.S., Gondi Ch.S., Yanamandra N., Olivero W.C., Dinh D.H., Gujrati M., Rao J.S.* Inhibition of cathepsin B and MMP-9 gene expression in glioblastoma cell line via RNA interference reduces tumor cell invasion, tumor growth and angiogenesis // *Oncogene.* – 2004. – Vol. 23, №27. – P. 4681-4689.
41. *Strauss M., Stollwerk J., Lenarcic B., Turk V., Jany K.D., Gassen H.G.* Chemical synthesis of a gene for human stefin A and its expression in *E. coli* // *Biol. Chem. Hoppe-Seyler.* – 1988. – Vol. 369. – P. 1019-1030.
42. *Jarvinen M., Rinne A.* Human spleen cysteine proteinase inhibitor: purification, fractionation into isoelectric variants and some properties of the variants // *Biochim. Biophys. Acta.* – 1982. – Vol. 708. – P. 210-217.
43. *Abrahamson M., Grubb A.* Increased body temperature accelerates aggregation of the leu68-to-gln mutant cystatin C, the amyloid-forming protein in hereditary cystatin C amyloid angiopathy // *Proc. Nat. Acad. Sci.* – 1994. – Vol. 91. – P. 1416-1420.

SUMMARY

Maxim LOOTSIK¹, Svyatoslav NAVYTKA², Olga PRYDATKO³, Rostyslav STOIKA^{1,2}

FRACTIONATION AND PROPERTIES OF PROTEINASES FROM MURINE NK/LY LYMPHOMA CELLS

¹*Institute of Cell Biology, NAS of Ukraine,
Dragomanov str., 14/16, 79005 Lviv, Ukraine*

²*Ivan Franko National University, Lviv,
Hrushevskogo str. 4, 79005 Lviv, Ukraine*

³*Institute of Experimental Pathology,
Oncology and Radiobiology, NAS of Ukraine
Vasylykivska str., 45, 03022 Kyiv, Ukraine*

Proteolytic activity, purification and properties of proteinases from murine lymphoma NK/Ly ascitic cells were investigated. In cell lysates proteolytic activity as measured by hydrolysis of casein was on the level 26.3 ug of casein/min per mg of protein at pH 5,4 and 15.0 ug of casein /min per mg of protein at pH 8,0. By fractional precipitation with ammonium sulfate proteins of lysates were separated into three fractions – immunoglobulin-like, albumin and post-albumin. The highest specific proteolytic activity was detected in post-albumin fraction, but the yield of protein material was the lowest. Disc electrophoresis of obtained fractions in standard conditions at pH 8,9 revealed serum albumin as a predominant protein in albumin and post-albumin fractions. In all fractions the substantial quantity of protein did not enter the gel and was retained in start position, indicating on the presence of highly aggregated protein complexes. For elimination of blood plasma proteins from post-albumin fraction immunoprecipitation with antibodies towards mouse blood proteins was applied, providing three-fold increase in specific proteolytic activity. By chromatography on Cibacron blue sepharose it was revealed that proteinases were not retained on the sorbent and passed through the column resulting in three fold increase of proteolytic activity. Proteinases of immunoglobulin fraction were purified by fractional precipitation of globulins by stepwise lowering of pH at low ionic strength. This approach was however non effective as it did not provide an increase in proteolytic activity apparently due to damaging effect on enzymes. Detectable proteolytic activity was revealed in subcellular particles obtained from ascitic fluid by high speed centrifugation after elimination of cells. SDS PAGE revealed a numerous bands in each fraction, derived mainly from material not entering the gel in non denaturing electrophoresis. This indicates on association of proteinases with multimolecular complexes or subcellular particles. Purified proteinases obtained from NK/Ly cells were insensitive to commonly used inhibitors trasylol, iodoacetamide and α -2 macroglobulin. The role of different types of proteinases in metastasis and other harmful effects during tumor growth is discussed.

Key words: tumors, lymphoma NK/Ly, proteinases.

РЕЗЮМЕ

Максим ЛУЦИК,¹ Святослав НАВИТКА², Ольга ПРИДАТКО³, Ростислав СТОЙКА^{1,2}

ФРАКЦИОНИРОВАНИЕ И СВОЙСТВА ПРОТЕИНАЗ КЛЕТОК МЫШИНОЙ ЛИМФОМЫ НК/Ль

¹Институт биологии клетки НАН Украины,
ул. Драгоманова, 14/16, 79005 Львов, Украина

²Львовский национальный университет имени Ивана Франко
ул. Университетская, 1, 79000 Львов, Украина

³Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии
им. Р.Е. Кавецкого НАН Украины,
ул. Васильковская, 45, 03022 Киев, Украина

Установлено, что в лизате клеток мышинной лимфомы НК/Ль содержатся протеиназы, активность которых по уровню гидролиза казеина при pH 5,4 составляет 26,3 мкг казеина в минуту на мг белка, а при pH 8,0 – 15,0 мкг казеина в минуту на мг белка. Для очистки протеиназ и изучения их свойств проведено фракционирование белков лизата клеток НК/Ль с помощью ступенчатого высаливания сульфатом аммония, дифференцированного осаждения глобулинов в условиях низкой ионной силы и постепенного снижения pH, хроматографии на колонке с цибакрон-сефарозой и аффинной хроматографии на Т-геле, а также с помощью иммунопреципитации. Применение различных методов фракционирования позволило достичь определенного повышения удельной протеолитической активности препаратов, однако не при этом удалось получить препараты протеиназ, которые были бы гомогенны по белковому составу. Результаты электрофоретического анализа исследуемых образцов протеиназ указывают на значительную агрегацию белковых комплексов, в которых они содержатся. Другой особенностью протеи-

наз клеток лимфомы НК/Лу является их нечувствительность к ингибиторному действию иодацетамида, α_2 -макроглобулина и трасилола. Обсуждена роль различных типов протеиназ в процессах опухолевого роста.

Ключевые слова: опухоли, лимфома НК/Лу, протеиназы.

Надійшла 07.04.2010.
Після доопрацювання 15.05.2010.
Прийнята до друку 25.05.2010.