

ВЛИЯНИЕ Е-КАДЕРИНА НА АКТИВАЦИЮ МАР-КИНАЗЫ РОСТОВЫМИ ФАКТОРАМИ В КЛЕТКАХ КАРЦИНОМ ЧЕЛОВЕКА

© В. В. Багаева, К. А. Авров, Г. Ф. Решетникова¹

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург,
¹ электронный адрес: greshet@mail.cytspb.rssi.ru*

Met и рецептор ЭФР могут индуцировать ослабление межклеточной адгезии и увеличение подвижности клеток, что является причиной процесса метастазирования при раковых заболеваниях. Поэтому механизмы взаимодействия рецепторных тирозинкиназ и белков межклеточных контактов привлекают к себе внимание исследователей. Е-кадгерин — основной белок, обеспечивающий клеточную адгезию. Ранее нами было показано, что внутриклеточная локализация Met зависит от функции Е-кадгерина. В данной работе мы обнаружили, что локализация рецептора ЭФР также определяется стабильностью адгезии. Потеря межклеточных контактов в клетках HBL-100 приводит к тому, что рецептор ЭФР не стабилизируется на клеточной мембране. Было проведено сравнительное исследование активации МАР-киназы ростовыми факторами в клетках, различающихся состоянием межклеточной адгезии. Обнаружено, что Е-кадгерин способен модулировать уровень и длительность активации киназы ERK. Представленные результаты дают возможность предположить, что не только внутриклеточная локализация, но и внутриклеточный сигнальный путь, активируемый Met и рецептором ЭФР, зависит от функции Е-кадгерина, что в свою очередь может определять специфику клеточного ответа.

Ключевые слова: Met, рецептор ЭФР, Е-кадгерин, межклеточная адгезия, МАР-киназа.

Принятые сокращения: ЭФР — эпидермальный фактор роста, ГФР — гепатоцитарный фактор роста, МАР — mitogen-activated protein, ERK — extracellular signal-regulated kinase.

В настоящее время многочисленные исследования показали важную роль активации Met и рецептора эпидермального фактора (ЭФР) в развитии инвазивного роста опухолевых клеток (Wells et al., 2002; Birchmeier et al., 2003). Высококачественные формы рака характеризуются ослаблением межклеточных контактов и усилением подвижности клеток, поэтому проблема взаимодействия адгезивных белков и рецепторов факторов роста является весьма актуальной для понимания механизмов метастазирования.

Е-кадгерин является основным белком межклеточных контактов в эпителиальных клетках. Е-кадгеринзависимое взаимодействие между клетками важно для сохранения архитектуры и целостности эпителия, выполняющего функцию барьера между внутренней и внешней средами организма. Е-кадгерин представляет собой одноцепочечную трансмембранную молекулу. Экстраклеточная часть Е-кадгерина имеет пять гомологичных ЕС-доменов, которые участвуют в кальцийзависимом взаимодействии двух молекул Е-кадгерина на поверхности соседних клеток. Цитоплазматический домен Е-кадгерина связывается с активным цитоскелетом через молекулы β - и α -катенина, что обеспечивает стабилизацию межклеточных контактов (Gumbiner, 2000).

Met и рецептор ЭФР относятся к суперсемейству трансмембранных рецепторов, обладающих собственной тирозинкиназной активностью. Гепатоцитарный фактор роста (ГФР) является единственным лигандом Met. Ре-

цептор ЭФР активируется несколькими лигандами, одним из которых является ЭФР. В структуре цитоплазматического домена рецептора ЭФР выделяются тирозинкиназный домен и ряд тирозиновых остатков, аутофосфорилирование которых способствует связыванию рецептора с сигнальными внутриклеточными белками. Цитоплазматическая часть Met имеет уникальную структуру — кроме киназного домена в ней выделяют посадочный домен, аутофосфорилирование которого индуцирует передачу сигнала. В процессе активации оба рецептора фосфорилируются по тирозину и впоследствии взаимодействуют с адапторными белками GRB-2 и GAB1. Эти молекулы позволяют активированным рецепторам инициировать сигнальные каскады через фосфоинозитид-3-киназу (PI3K), фосфолипазу C- γ (PLC γ) и митогенактивированную киназу (МАР-киназу) (Schlessinger, 2000; Zhang et al., 2003).

В последнее время накопились экспериментальные данные, свидетельствующие о том, что Е-кадгерин выполняет не только структурную функцию, но, по-видимому, способен индуцировать внутриклеточный сигнал и модулировать активность рецепторных тирозинкиназ (Yar, Kovacs, 2003). Для рецептора ЭФР и рецептора васкуло-эндотелиального фактора роста показано, что кадгеринзависимая адгезия ингибирует активацию рецепторов лигандом (Takahashi, Suzuki, 1996; Grazia Lampugnani et al., 2003). Взаимодействие рецептора фактора роста фибробластов с N-кадгерин, наоборот, увеличивает уровень фосфорилирования рецептора и способствует миграции

опухолевых клеток (Suyama et al., 2002). Обнаружено, что рецепторы факторов роста могут участвовать в фосфорилировании E-кадгерина и катенинов, ослабляя межклеточную адгезию (Lilien et al., 2002). Также показано, что в процессе становления E-кадгеринзависимых межклеточных контактов происходит кратковременная трансактивация рецептора ЭФР (Pesci, Gutkind, 2000). Эти данные показывают, что между E-кадгерином и рецепторами факторов роста, по-видимому, существует близкое взаимодействие, имеющее функциональное значение. Таким образом, в настоящее время биохимические внутриклеточные сигнальные пути, которые индуцируются Met и рецептором ЭФР, достаточно хорошо изучены, но почти отсутствуют данные, касающиеся механизмов взаимодействия между рецепторами факторов роста и E-кадгерином.

В настоящей работе исследовали влияние E-кадгеринзависимой адгезии на функции Met и рецептора ЭФР. Показано, что внутриклеточная локализация рецептора ЭФР, так же как и Met, зависит от функции E-кадгерина. Рецептор ЭФР колокализован с E-кадгерином в сайтах зрелых межклеточных контактов в клетках HT-29, но распределен преимущественно в цитозоле в клетках, не способных формировать межклеточные контакты, таких как MDA-MB-468, BT-549 и HBL-100. Обнаружено, что E-кадгерин модулирует активацию ERK-киназы при стимуляции клеток ГФР или ЭФР в зависимости от состояния межклеточной адгезии. Высказывается предположение о том, что обнаруженный феномен может определять специфику клеточного ответа на ростовые факторы.

Материал и методика

Реактивы и антитела. Все реагенты, если не оговорено специально, получены от фирмы Sigma (США). Для специфического выявления белков использовали поликлональные кроличьи антитела против Met C-28 и C12 (Santa Cruz Biothehnology, США); моноклональные мышиные антитела против E-кадгерина C20820 (Transduction Labs, США); поликлональные кроличьи антитела против рецептора ЭФР (любезно предоставлены д-ром Карпентером, США); HRP-, Cy-3- и Alexa 488-конъюгированные козы антитела против мышиных и кроличьих иммуноглобулинов (Sigma, США); липофектамин 2000 (Gibco BRL, США); культуральную питательную среду DMEM («Биолот», Санкт-Петербург, Россия); эмбриональную сыворотку (Gibco BRL, США).

Культивирование клеток. Использовали клеточные линии HT-29, BT-549 и MDA-MB-468, полученные из Американской клеточной коллекции (АТТС, США), и HBL-100, полученную из Российской клеточной коллекции Института цитологии РАН (Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM с добавлением 10 % эмбриональной сыворотки в атмосфере 5 % CO₂. Для экспериментов использовали 2—3-суточные культуры. За 16 ч до начала эксперимента клетки переводили на среду DMEM, содержащую 0.5 % эмбриональной сыворотки.

Трансфекция клеток. Клетки BT-549 были трансфицированы ДНК E-кадгерина с помощью липофектамина 2000 согласно инструкции фирмы-производителя. ДНК E-кадгерина была получена из лабораторий д-ра С. Трояновского (Washington University School of Medicine, St. Louis, MO, США). Субконфлюэнтный монослой клеток, растущих в чашках Петри диаметром 5 см,

инкубировали в течение 12 ч в среде, содержащей 1 мкг ДНК и липофектамин (1 : 1). Затем среду меняли на ростовую и продолжали инкубировать клетки до достижения монослоя. Селекцию клонов проводили на среде, содержащей генетицин (500 мкг/мл).

Стимуляция клеток и приготовление тотальных лизатов. Факторы роста добавляли в культуральную среду и продолжали культивировать клетки указанное в эксперименте время. После этого клетки промывали холодным фосфатно-солевым раствором (PBS), pH 7.4. Затем клетки лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 % Тритона X-100, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз. В некоторых экспериментах для лизирования клеток использовали буфер RIPA, содержащий 50 мМ Трис-НСl (pH 7.5), 150 мМ NaCl, 1 % Тритона X-100, 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % додецилсульфата натрия, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз. Для осаждения нерастворимых белков клеточный лизат центрифугировали 15 мин при 14 000 об/мин.

Электрофорез и иммуноблотинг. Электрофоретическое разделение белков проводили в полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия в модификации Лэмбли. Разделенные в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, США). Мембрану блокировали 5%-ным раствором сухого молока в TTBS (20 мМ Трис-НСl, 150 мМ NaCl, 0.05% Твин-20) в течение 1 ч при комнатной температуре, затем инкубировали в течение 1 ч с соответствующими специфическими антителами в TTBS, содержащем 5 % сухого молока, и промывали 1 ч в TTBS со сменой буфера 3 раза. Далее мембрану инкубировали со вторыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Для детекции белков использовали реактив ECL (Amersham Pharmacia Biotech, США).

Имунофлуоресцентное окрашивание. Клетки выращивали на покровных стеклах, промывали 3 раза в PBS и фиксировали 4%-ным раствором формальдегида в течение 10 мин при комнатной температуре. После промывки PBS клетки пермеабелизировали в течение 5 мин 0.2%-ным раствором Тритона X-100 в PBS при 4 °С. В некоторых экспериментах клетки сначала обрабатывали раствором CKS (50 мМ NaCl, 10 мМ Pipes, pH 6.8, 3 мМ MgCl₂, 0.5 % Тритона X-100 и 300 мМ сахарозы), а затем фиксировали в 4%-ном растворе формальдегида в течение 10 мин. Далее клетки инкубировали 30 мин в блокирующем буфере, содержащем 3%-ный раствор бычьего сывороточного альбумина (БСА) в PBS. Инкубацию со специфическими антителами проводили в течение 30 мин при комнатной температуре. Анти-Met C-12 (1 : 300) и анти E-кадгерин (1 : 500) антитела разводили в 1%-ном растворе БСА. Вторые антитела, конъюгированные с иммунофлуорохромом Cy-3 или Alexa 488, разводили в соотношении 1 : 700 в 1%-ном растворе БСА. Препараты анализировали под микроскопом Olympus BX41 или Leica TCS SL (конфокальный).

Результаты

Экспрессия рецептора ЭФР, Met и E-кадгерина в клеточных линиях человека. Прежде чем начать исследование взаимодействия между E-кадгерином

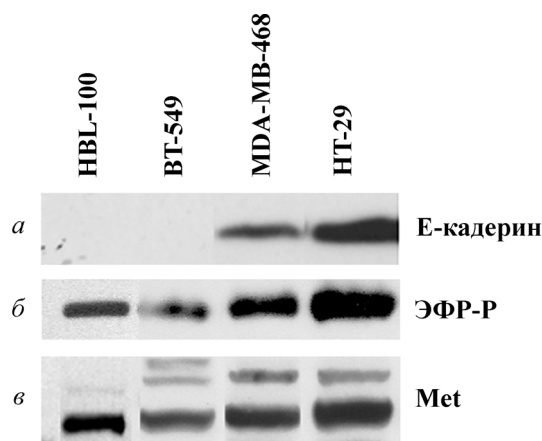


Рис. 1. Экспрессия E-кадгерина, Met и рецептора ЭФР в различных клеточных линиях: HBL-100, BT-549, MDA-MB-468 и HT-29.

Клетки культивировали 2—3 сут, лизировали в буфере RIPA. Белки клеточных экстрактов разделяли в ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и выявляли с помощью иммуноблоттинга.

и рецепторами факторов роста, мы проанализировали экспрессию Met, рецептора ЭФР и E-кадгерина в различных эпителиальных линиях человека. Для анализа брали 2—3-суточные клеточные культуры. Клетки лизировали в буфере RIPA и анализ белков проводили с помощью иммуноблоттинга. Было обнаружено, что клетки HT-29 и MDA-MB-468 содержали высокий уровень E-кадгерина (рис. 1, а), а в клетках линий HBL-100 и BT-549 E-кадгерин отсутствовал полностью (рис. 1, а), что соответствовало данным из литературы. Все проверенные линии экспрессировали Met и рецептор ЭФР, но количество рецепторов значительно варьировало. По уровню экспрессии рецепторов клетки были условно разделены на две группы: клетки HT-29, BT-549 и MDA-MB-468 содержали примерно одинаковое количество Met (рис. 1, в), а клетки HT-29 и HBL-100 были схожи по уровню экспрессии рецептора ЭФР (рис. 1, б). В каждой группе клеток были представлены как линии клеток, имеющие E-кадгерин, так и линии, утратившие его.

Колокализация рецептора ЭФР и E-кадгерина в области зрелых межклеточных контактов клеток HT-29. Ранее мы обнаружили, что Met колокализован с E-кадерином в области межклеточных контактов в культуре HT-29, а в клетках BT-549, утративших E-кадгерин, рецептор преимущественно накапливается в цитозоле в околоядерной области (Reshetnikova et al., 2007). В настоящей работе мы выясняли, влияет ли E-кадгерин на внутриклеточную локализацию рецептора ЭФР. Мы провели сравнительное исследование локализации рецептора ЭФР в клетках HT-29 и HBL-100 с помощью метода двойного иммунофлуоресцентного окрашивания антителами против E-кадгерина и рецептора ЭФР. Было обнаружено, что в клетках HT-29 рецептор ЭФР локализуется на мембране (рис. 2, а). Напротив, в клетках HBL-100, утративших E-кадгерин, рецептор преимущественно накапливается в околоядерной области (рис. 2, б).

Формирование зрелой межклеточной адгезии индуцирует связывание E-кадгерина с актиновым цитоскелетом и коррелирует с устойчивостью E-кадгерина к экстракции Тритоном X-100 (Adams et al., 1996; Pasdar et al., 1997). Клетки HT-29 обрабатывали буфером CSK, а затем фиксировали и окрашивали антителами против E-кадгерина и

рецептора ЭФР. Оказалось, что после экстракции буфером CSK значительное количество E-кадгерина выявляется на мембране (рис. 2, в); это свидетельствует о том, что клетки формируют зрелые межклеточные E-кадгеринзависимые контакты. Более того, рецептор ЭФР также обнаруживается на мембране (рис. 2, з). На рис. 2, д видно, что рецептор колокализуется с E-кадерином на мембране. Поскольку нерастворимая в Тритоне фракция E-кадгерина включена в зрелые контакты, можно предполагать, что рецептор ЭФР и E-кадгерин колокализуется в области межклеточных контактов.

Влияние E-кадгерина на активацию MAP-киназы в клетках HT-29, MDA-MB-468 и HBL-100. Мы обнаружили значительные различия в локализации Met и рецептора ЭФР в клетках с различным статусом E-кадгеринзависимой адгезии. Потеря экспрессии E-кадгерина коррелирует со злокачественной трансформацией клеток (Birchmeier et al., 2003). Поэтому можно предположить, что потеря межклеточной адгезии будет оказывать влияние на активацию рецепторов.

Сначала мы проверили фосфорилирование рецептора ЭФР в клетках HT-29 и HBL-100 при стимуляции клеток ЭФР. Клетки инкубировали с ЭФР (10 нг/мл) в течение 15 мин и лизировали в буфере RIPA. Активированный рецептор ЭФР выявляли иммуноблоттингом с помощью антител на фосфорилированную форму рецептора. В результате эксперимента было обнаружено, что уровень фосфорилирования рецептора как в клетках HT-29, так и в клетках HBL-100 был практически одинаков (данные не показаны). Несмотря на то что иммунофлуоресцентный анализ показал, что на мембране клеток HBL-100 локализуется значительно меньшее количество рецепторов ЭФР (рис. 2, а, б), чем в клетках HT-29, этот факт не повлиял на уровень фосфорилирования рецептора.

Затем мы проанализировали активацию MAP-киназы при стимуляции клеток HT-29, MDA-MB-468 и HBL-100 с помощью ЭФР. Клетки инкубировали с ЭФР (10 нг/мл) и через различные промежутки времени (от 10 мин до нескольких часов) лизировали в буфере RIPA. Активные

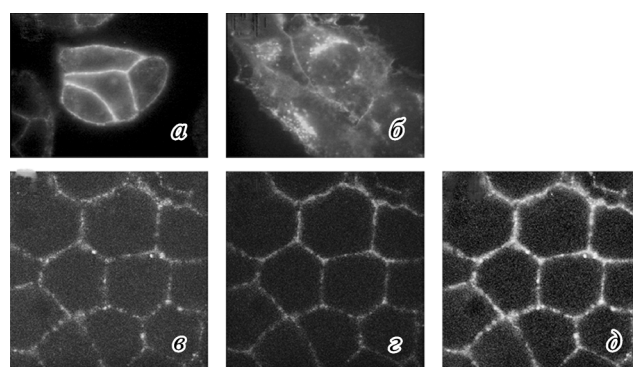


Рис. 2. Внутриклеточная локализация рецептора ЭФР и E-кадгерина в клетках HT-29 и HBL-100.

Рецептор ЭФР локализован на мембране клеток HT-29 (а) и в цитозоле клеток HBL-100 (б). В клетках HT-29 не растворимые в Тритоне X-100 фракции E-кадгерина (в) и рецептора ЭФР (з) колокализируются на мембране клеток (д). Клетки выращивали на покровных стеклах и фиксировали 3%-ным раствором формальдегида. Часть клеток была сначала обработана буфером CSK, а затем зафиксирована (в—д). Выявление белков проводили методом двойного иммунофлуоресцентного окрашивания с помощью моноклональных антител против E-кадгерина и поликлональных антител против рецептора ЭФР. Вторые антитела против мыши были конъюгированы с Alexa 488, вторые антитела против кролика — с Cy-3.

изоформы MAP-киназы определяли с помощью иммуноблота фосфоспецифическими антителами против ERK-1 и ERK-2, обладающими мол. массами 44 и 42 кДа соответственно. Антитела к неактивированной форме ERK использовали для контроля эквивалентности нанесения белков на гель. В исследованных клеточных линиях обнаруживали активацию ERK в ответ на стимуляцию клеток ЭФР. В линии HT-29 наблюдали снижение уровня фосфорилирования ERK уже через 30 мин после активации, а через 2 ч фосфорилирование ERK падало до исходного уровня (рис. 3, *a*). Напротив, стимуляция клеток HBL-100 вызывала длительное активирование ERK. Высокий уровень фосфорилирования сохранялся в течение 2 ч, а затем понижался и только через 6 ч падал до контрольного (рис. 3, *б*).

Клетки MDA-MB-468 экспрессируют E-кадгерин, но утратили α -катенин, поэтому они не способны формировать зрелые межклеточные контакты. Рис. 3, *в* показывает, что в клетках MDA-MB-468 сохраняется высокий уровень активации ERK по крайней мере в течение 1 ч (далее не наблюдали). Таким образом, данные результаты свидетельствуют о том, что потеря межклеточной адгезии вследствие утраты функции E-кадгерина, как в клетках MDA-MB-468, или вследствие отсутствия его экспрессии, как в клетках HBL-100, коррелирует с увеличением длительности активации ERK при стимуляции клеток ЭФР.

Влияние E-кадгерина на активацию ERK при стимуляции клеток HT-29 и BT-549 ГФР. Для того чтобы исследовать, влияет ли E-кадгерин на активацию Met, были выбраны клетки HT-29, формирующие межклеточные контакты, клетки BT-549, утратившие E-кадгерин, и клон клеток BT-549E, трансфицированный ДНК E-кадгерина (Reshetnikova et al., 2007). Клетки стимулировали ГФР (10 нг/мл) в течение различного времени (от 15 мин до 3 ч), после чего лизировали в буфере RIPA. Фосфорилирование ERK оценивали с помощью иммуноблотинга с фосфоспецифическими анти-ERK антителами. В клетках HT-29 ГФР индуцирует фосфорилирование ERK. Активированный ERK сохранялся в клетках как минимум в течение 3 ч (далее не наблюдали) (рис. 4, *a*). Напомним, что в этих же клетках при стимуляции ЭФР уже через 30 мин наблюдали снижение уровня фосфорилирования ERK (рис. 3, *a*). Неожиданный результат был получен на «бесконтактных» клетках BT-549. В этих клетках был обнаружен достаточно высокий базальный уровень фосфорилирования ERK, который при стимуляции клеток ГФР заметно не повышался (рис. 4, *б*). Наоборот, в клетках BT-549E, экспрессирующих экзогенный E-кадгерин, наблюдается активация ERK при стимуляции клеток ГФР (рис. 4, *в*). Полученные результаты дают возможность предполагать, что E-кадгерин может влиять на активацию ERK в клетках HT-29, BT-549 и BT-549E при стимуляции ГФР в зависимости от функции E-кадгерина.

Обсуждение

Многочисленные рецепторные тирозинкиназы вовлечены в модуляцию адгезии в эпителиальных клетках. Met и рецептор ЭФР являются примером таких рецепторов, которые могут ингибировать E-кадгеринзависимую адгезию путем фосфорилирования адгезивных белков (Wells et al., 2002; Yarp, Kovacs, 2003). В данной работе мы показали, что E-кадгерин также способен влиять на функции рецепторных тирозинкиназ. Обнаружено, что мембранная

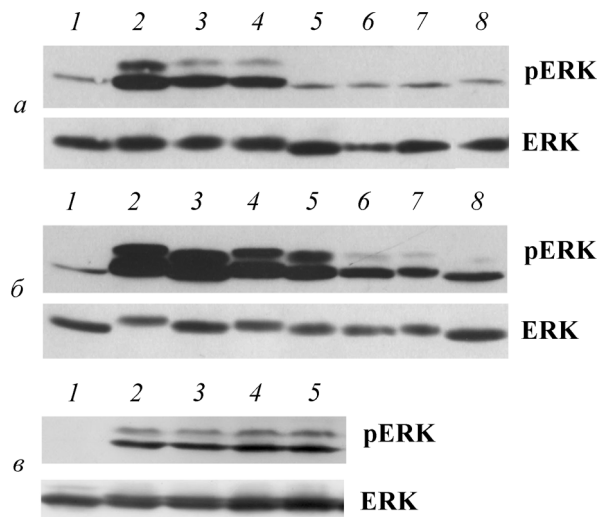


Рис. 3. Стимуляция MAP-киназной активности в клетках HT-29 (*a*), HBL-100 (*б*) и MDA-MB-468 (*в*) при стимуляции ЭФР.

a, б: дорожка 1 — контроль (без стимуляции ЭФР), дорожки 2–8 — стимуляция ЭФР в течение 15 (2) или 30 (3) мин, 1 (4), 2 (5), 3 (6), 4 (7) или 5 (8) ч соответственно. *в*: дорожка 1 — контроль, дорожки 2–5 — стимуляция ЭФР в течение 5 (2), 15 (3), 30 (4) и 60 (5) мин соответственно.

локализация рецептора ЭФР зависит от функции E-кадгерина, что рецептор ЭФР и E-кадгерин колокализуются в области межклеточных контактов. Более того, показано, что E-кадгерин может модулировать активацию ERK при стимуляции клеток ЭФР или ГФР.

В опубликованных ранее работах сообщается о том, что Met и рецептор ЭФР имеют базолатеральную локализацию в эпителиальных клетках (Maratos-Flier et al., 1987; Crepaldi et al., 1994). Однако механизмы, которые регулируют внутриклеточную локализацию рецепторов, в настоящее время неясны. Одним из характерных свойств эпителия является клеточная полярность. Полярность клеток сохраняется благодаря E-кадгеринзависимым адге-

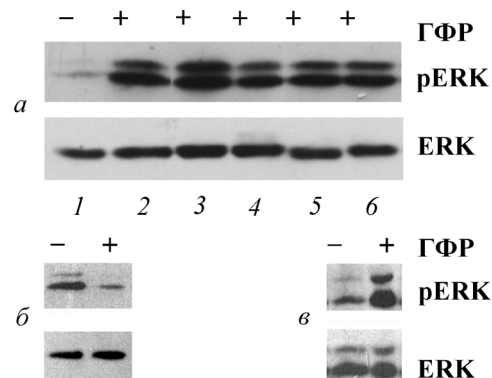


Рис. 4. Активация ERK-киназы в клетках HT-29, BT-549 и BT-549E при стимуляции ГФР.

a: клетки HT-29 стимулировали ГФР (10 нг/мл) в течение 15 (2) или 30 (3) мин, 1 (4), 2 (5) или 3 (6) ч соответственно. Контрольные клетки культивировали без ГФР (1). *б, в*: клетки BT-549 (*б*) и BT-549E (*в*) стимулировали с ГФР 15 мин (+). Контрольные клетки культивировали без ГФР (-). Затем клетки лизировали в буфере RIPA. Белки клеточных лизатов разделяли в 10%-ном ПААГ, переносили на нитроцеллюлозную мембрану и выявляли методом иммуноблотинга, который проводили либо с антителами против ERK, либо с антителами против фосфорилированной формы ERK (pERK).

живным контактам, которые делят клеточную мембрану на апикальный и базолатеральный домены. Эти домены мембраны различаются по составу белков и липидов, что отражает различия в их функциях (Drubin, Nelson, 1996). Потеря полярности влечет за собой изменение статуса клетки. Драматическим изменениям подвергается система сортировки и транспорта мембранных белков. Белки семейства t-SNARE, обеспечивающие транспорт белков на базолатеральную мембрану, при потере клетками полярности не направляются на мембрану, а накапливаются в цитозоле (Low et al., 2000). В то же время обнаружено, что разрушение межклеточных контактов индуцирует быстрый эндоцитоз таких мембранных белков, как E-кадгерин, α -катенин, оклудин, клаудин и ZO-1, и их аккумуляцию в новых внутриклеточных компартментах, названных авторами «кладовой» (Ivanov et al., 2004). Мы высказываем предположение о том, что локализация рецептора ЭФР в цитозоле в E-кадгерин-негативных клетках BT-549 и HBL-100 обусловлена изменением внутриклеточной сортировки и транспорта белков, происходящим при потере клетками полярности. Несомненно, эта гипотеза требует дополнительных исследований.

Общепринято, что ЭФР является одним из основных факторов, который регулирует рост и дифференцировку эпителиальных клеток. Недавно обнаружено, что функция рецептора ЭФР зависит от его локализации — апикальной или базолатеральной (Hobert et al., 1999). На примере клеток Caco-2 показано, что только базолатерально расположенный рецептор ЭФР стимулирует пролиферацию после связывания с лигандом (Bishop, Wen, 1994). Более того, есть данные о том, что тирозинкиназа рецептора ЭФР взаимодействует с различными сигнальными внутриклеточными молекулами в зависимости от локализации рецептора — апикальной или базолатеральной (Kuwada et al., 1998). Сообщают, что фосфорилирование PLC- γ индуцируется только базолатеральным рецептором ЭФР (Amsler, Kuwada, 1999). Мы обнаружили, что нарушение E-кадгеринзависимой адгезии вызывает изменение локализации Met и рецептора ЭФР, что коррелирует с изменением длительности активации ERK. Эти результаты подтверждают концепцию, согласно которой внутриклеточная локализация определяет функции белка.

ERK-киназный сигнальный путь играет важнейшую роль в различных клеточных функциях, включая пролиферацию, дифференцировку, миграцию и выживание. Одним из центральных является вопрос о том, как один и тот же сигнал регулирует столь разные функции клетки. Современные исследования продемонстрировали, что различия в длительности, силе и локализации ERK могут регулировать специфику клеточного ответа на внешний стимул (Ebisuya et al., 2005). В клетках PC12 такие факторы, как ЭФР и фактор роста нервов (NGF), индуцируют разные эффекты — пролиферацию и дифференцировку соответственно. Обнаружено, что различный клеточный ответ коррелирует с различной длительностью активации ERK. В клетках PC12 ЭФР активирует ERK кратковременно, а NGF — длительно (Kao et al., 2001). Показано, что в процессе морфогенеза почечного эпителия ЭФР и ГФР индуцируют различную по длительности активацию ERK (Karihaloo et al., 2001). Кроме того, длительность активации ERK, по-видимому, определяет специфику клеточного ответа на факторы роста. Таким образом, можно предполагать, что обнаруженные нами различия в активации ERK в разных клетках при стимуляции ЭФР и ГФР могут коррелировать с разным ответом клетки на внешний стимул.

Эта гипотеза требует дальнейшего экспериментального развития.

В настоящее время накопилось много работ, показывающих, что не только рецепторы факторов роста могут влиять на функцию E-кадгерина через фосфорилирование белков адгезивного комплекса, но и E-кадгерин способен модулировать функции рецепторов. Например, N-кадгерин и VE-кадгерин вовлечены в регуляцию рецепторов FGFR-1 и VEGFR2 соответственно (Suyama et al., 2002; Grazia Lampugnani et al., 2003). Более того, E-кадгерин способен прямо взаимодействовать с некоторыми рецепторами (Fedor-Chaiken et al., 2003; Qian et al., 2004). Также показано, что становление E-кадгеринзависимой адгезии способствует мембранной локализации таких цитозольных белков, как Rac1 и p120 (Thoreson et al., 2000; Nakagawa et al., 2001). Одним из механизмов регуляции адгезии является фосфорилирование по тирозину белков клеточных контактов (Watabe et al., 1993). Возможно, что колокализация рецепторных тирозинкиназ и E-кадгерина способствует фосфорилированию внутриклеточных белков-мишеней. Кроме того, в области зрелых контактов обнаруживаются фосфатазы (Grazia Lampugnani et al., 2003). Можно предположить, что взаимодействие E-кадгерина с рецепторами факторов роста, с одной стороны, сохраняет последние в нефосфорилированном состоянии до появления лигандов, а с другой — обеспечивает оптимальные условия для передачи внешнего сигнала внутрь клетки по цепочке лиганд—рецептор—субстрат.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ, проект 06-04-49333) и РФФИ совместно с АФГИР (проект 07-04-91154 / RUB1-2868-ST-07).

Список литературы

- Adams C. L., Nelson W. J., Smith S. J. 1996. Quantitative analysis of cadherin-catenin-actin reorganization during development of cell-cell adhesion. *J. Cell Biol.* 135 : 1899—1911.
- Amsler K., Kuwada S. K. 1999. Membrane receptor location defines receptor interaction with signaling proteins in a polarized epithelium. *Amer. J. Physiol.* 276 : C91—C101.
- Birchmeier C., Birchmeier W., Gherardi E., Vande Woude G. F. 2003. Met, metastasis, motility and more. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 4 : 915—925.
- Bishop W. P., Wen J. T. 1994. Regulation of Caco-2 cell proliferation by basolateral membrane epidermal growth factor receptors. *Amer. J. Physiol.* 267 : G892—G900.
- Crepaldi T., Pollack A. L., Prat M., Zborek A., Mostov K., Comoglio P. M. 1994. Targeting of the SF/HGF receptor to the basolateral domain of polarized epithelial cells. *J. Cell Biol.* 125 : 313—320.
- Drubin D. G., Nelson W. J. 1996. Origins of cell polarity. *Cell.* 84 : 335—344.
- Ebisuya M., Kondoh K., Nishida E. 2005. The duration, magnitude and compartmentalization of ERK MAP kinase activity: mechanisms for providing signaling specificity. *J. Cell Sci.* 118 : 2997—3002.
- Fedor-Chaiken M., Hein P. W., Stewart J. C., Brackenburt R., Kinch M. S. 2003. E-cadherin binding modulates EGF receptor activation. *Cell. Commun. Adhes.* 10 : 105—118.
- Grazia Lampugnani M., Zanetti A., Corada M., Takahashi T., Balconi G., Breviario F., Orsenigo F., Cattelino A., Kemler R., Daniel T. O., Dejana E. 2003. Contact inhibition of VEGF-induced proliferation requires vascular endothelial cadherin, beta-catenin, and the phosphatase DEP-1/CD148. *J. Cell Biol.* 161 : 793—804.

- Gumbiner B. M. 2000. Regulation of cadherin adhesive activity. *J. Cell Biol.* 148 : 399—404.
- Hobert M. E., Friend L. A., Carlin C. R. 1999. Regulation of EGF signaling by cell polarity in MDCK kidney epithelial cells. *J. Cell. Physiol.* 181 : 330—341.
- Ivanov A. I., Nusrat A., Parkos C. A. 2004. Endocytosis of epithelial apical junctional proteins by a clathrin-mediated pathway into a unique storage compartment. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 176—188.
- Kao S., Jaiswal R. K., Kolch W., Landreth G. E. 2001. Identification of the mechanisms regulating the differential activation of the mapk cascade by epidermal growth factor and nerve growth factor in PC12 cells. *J. Biol. Chem.* 276 : 18 169—18 177.
- Karihaloo A., O'Rourke D. A., Nickel C., Spokes K., Cantley L. G. 2001. Differential MAPK pathways utilized for HGF- and EGF-dependent renal epithelial morphogenesis. *J. Biol. Chem.* 276 : 9166—9173.
- Kuwada S. K., Lund K. A., Li X. F., Cliften P., Amsler K., Opreko L. K., Wiley H. S. 1998. Differential signaling and regulation of apical vs. basolateral EGFR in polarized epithelial cells. *Amer. J. Physiol.* 275 : C1419—C1428.
- Liang C. C., Chen H. C. 2001. Sustained activation of extracellular signal-regulated kinase stimulated by hepatocyte growth factor leads to integrin alpha 2 expression that is involved in cell scattering. *J. Biol. Chem.* 276 : 21 146—21 152.
- Lilien J., Balsamo J., Arregui C., Xu G. 2002. Turn-off, drop-out: functional state switching of cadherins. *Develop. Dyn.* 224 : 18—29.
- Low S. H., Miura M., Roche P. A., Valdez A. C., Mostov K. E., Weimbs T. 2000. Intracellular redirection of plasma membrane trafficking after loss of epithelial cell polarity. *Mol. Biol. Cell.* 11 : 3045—3060.
- Maratos-Flier E., Kao C. Y., Verdin E. M., King G. L. 1987. Receptor-mediated vectorial transcytosis of epidermal growth factor by Madin-Darby canine kidney cells. *J. Cell Biol.* 105 : 1595—1601.
- Nakagawa M., Fukata M., Yamaga M., Itoh N., Kaibuchi K. 2001. Recruitment and activation of Rac1 by the formation of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion sites. *J. Cell Sci.* 114 : 1829—1838.
- Pasdar M., Li Z., Marreli M., Nguyen B. T., Park M., Wong K. 1997. Inhibition of junction assembly in cultures epithelial cells by hepatocytes growth factor/scatter factor is concomitant with increased stability and altered phosphorylation of the soluble junctional molecules. *Cell. Growth Differ.* 8 : 451—462.
- Pece S., Gutkind J. S. 2000. Signaling from E-cadherins to the MAPK pathway by the recruitment and activation of epidermal growth factor receptors upon cell-cell contact formation. *J. Biol. Chem.* 275 : 41 227—41 233.
- Qian X., Karpova T., Sheppard A. M., McNally J., Lowy D. R. 2004. E-cadherin-mediated adhesion inhibits ligand-dependent activation of diverse receptor tyrosine kinases. *EMBO J.* 23 : 1739—1748.
- Reshetnikova G., Troyanovsky S., Rimm D. L. 2007. Definition of a direct extracellular interaction between Met and E-cadherin. *Cell. Biol. Int.* 31 : 366—373.
- Rosario M., Birchmeier W. 2003. How to make tubes: signaling by the Met receptor tyrosine kinase. *Trends Cell. Biol.* 13 : 328—335.
- Schlessinger J. 2000. Cell signaling by receptor tyrosine kinases. *Cell.* 103 : 211—225.
- Suyama K., Shapiro I., Guttman M., Hazan R. B. 2002. A signaling pathway leading to metastasis is controlled by N-cadherin and the FGF receptor. *Cancer Cell.* 2 : 301—314.
- Takahashi K., Suzuki K. 1996. Density-dependent inhibition of growth involves prevention of EGF receptor activation by E-cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Exp. Cell Res.* 226 : 214—222.
- Thoreson M. A., Anastasiadis P. Z., Daniel J. M., Ireton R. C., Wheelock M. J., Johnson K. R., Hummingbird D. K., Reynolds A. B. 2000. Selective uncoupling of p120(ctn) from E-cadherin disrupts strong adhesion. *J. Cell Biol.* 148 : 189—202.
- Watabe M., Matsumoto K., Nakamura T., Takeichi M. 1993. Effect of hepatocyte growth factor on cadherin-mediated cell-cell adhesion. *Cell. Struct. Funct.* 18 : 117—124.
- Wells A., Kassis J., Solava J., Turner T., Lauffenburger D. A. 2002. Growth factor-induced cell motility in tumor invasion. *Acta Oncol.* 41 : 124—130.
- Yap A. S., Kovacs E. M. 2003. Direct cadherin-activated cell signaling: a view from the plasma membrane. *J. Cell Biol.* 160 : 11—16.
- Zhang Y. W., Vande Woude G. F. 2003. HGF/SF-met signaling in the control of branching morphogenesis and invasion. *J. Cell. Biochem.* 88 : 408—417.

Поступила 15 I 2007

E-CADHERIN AFFECTS MAP ACTIVATION BY GROWTH FACTORS STIMULATION IN HUMAN CARCINOMA CELLS

V. V. Bagaeva, K. A. Avrov, G. F. Reshetnikova¹Institute of Cytology, St. Petersburg; ¹ e-mail: greshet@mail.cytspb.rssi.ru

Met and EGF receptor (EGFR) activation is correlated with dissociation of cell-cell adhesion and with increase in mobility of cancer cells. E-cadherin is a major protein of adhesion junctions. Using different approaches we have shown that EGF receptors intracellular localization depends of E-cadherin function. It was found that EGFR localized on the membrane in HT-29 cells which formed mature cell-cell contacts. Moreover, EGFR was colocalized with E-cadherin at the site of cell-cell adhesion in Triton-insoluble fraction. EGFR was accumulated preliminary in cytosol in E-cadherin negative HBL-100 cells. Study of signal transduction mediated by EGF and HGF in cells with different state of cell adhesion demonstrated that E-cadherin could affect ERK-signal-duration. Our preliminary studies proposed that mislocalization of Met and EGFR in E-cadherin negative cells altered receptors downstream signaling.

Key words: Met, EGF receptor, E-cadherin, cell-cell adhesion, MAP kinase.