

ВЛИЯНИЕ ЭФР НА ПЕРЕДАЧУ ПРОЛИФЕРАТИВНОГО СИГНАЛА У ИНФУЗОРИЙ *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

© И. В. Шемарова, Г. В. Селиванова, Т. Д. Власова

*Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И. М. Сеченова РАН
и Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;
электронный адрес: irina@lis.mail.iephb.ru*

Установлено, что в клетках инфузорий *Tetrahymena pyriformis* передача пролиферативного сигнала, индуцированного ЭФР, не связана с автофосфорилированием рецепторных тирозинкиназ. У этих микроорганизмов ЭФР инициирует митогенный путь, который включает в себя мембранные белки тирозинкиназного типа (без сайтов фосфорилирования по тирозину), аденилатциклазу, тирозин- и Ca^{2+} -зависимые ERK-подобные киназы.

Ключевые слова: *Tetrahymena pyriformis*, внутриклеточная сигнализация, фосфорилирование по тирозину, пролиферация, ЭФР, Src-тирозинкиназа, Ca^{2+} , ERK.

Принятые сокращения: АЦ — аденилатциклаза, цАМФ — циклический аденозинмонофосфат, G_s — гетеротримерный G-белок стимулирующего типа, EGF — эпидермальный фактор роста, ERK1 и ERK2 — интегральные MAP-киназы, MAP-киназа — митогенактивируемая протеинкиназа, РТК — протеин(тироzin)киназа, Src-тироzinкиназа — клеточная тирозинкиназа.

Внутриклеточная сигнализация имеет древнее эволюционное происхождение, и многие структурные и биохимические элементы регуляторных сигнальных механизмов обнаруживаются уже у низших эукариот. У отдельных представителей простейших на клеточной поверхности обнаружены рецептороподобные структуры, способные активироваться под действием гормонов и факторов роста млекопитающих (Шемарова, 2006). В результате рецепторной стимуляции запускаются каскады реакций, лежащих в основе передачи пролиферативного сигнала. Помимо элементов сигнализации, функционально связанных с рецепторами факторов роста, у одноклеточных микроорганизмов имеется параллельный, по-видимому не зависимый от ЭФР и других ростовых факторов, механизм регуляции клеточного роста, в котором активная роль отводится циклическим нуклеотидам (Шемарова и др., 2002).

Ранее (Шемарова и др., 2004) нам удалось показать, что ЭФР млекопитающих оказывает стимулирующее влияние на пролиферативную активность инфузорий *Tetrahymena pyriformis*. Мы выяснили, что ЭФР в концентрации 10^{-8} М ускоряет синтез белка и РНК и тем самым вносит существенный вклад в увеличение скорости синтеза ДНК и соответственно скорости клеточного роста (Шемарова и др., 2004). Однако сигнальные механизмы, обеспечивающие регуляцию этого процесса у микроорганизмов, по-прежнему неясны. В частности, остается открытым вопрос о том, каким образом микроорганизмы распознают индуцированные ЭФР сигналы. Являются ли эти сигналы пролиферативными, действующими, как у высших эукариот, через механизм автофосфорилирования рецепторов факторов роста, либо они за-

пускают программу роста через стимуляцию сигнального пути, независимого от автофосфорилирования рецепторных тирозинкиназ. В настоящей работе мы сделали попытку прояснить этот вопрос.

Материал и методика

Экспериментальная часть работы была выполнена на экспоненциально и стационарно растущих культурах *T. pyriformis* (амикронуклеусный штамм GL), выращиваемых аксенически при 28°C в среде следующего состава: 100 мг/л NaCl , по 10 мг/л KCl , CaCl_2 и MgCl_2 , 20 мг/л NaHCO_3 , 1 г/л сухого экстракта бычьей печени (Difco, США), 15 г/л пептона (Richter, Венгрия), 2 г/л сухого дрожжевого экстракта (Serva, Германия) и 0.1 мл/л триксульфона. Условия выращивания клеток описаны ранее (Шемарова и др., 2002). В опытной серии инокулум исходной культуры объемом 1 мл, содержащий $5.0 \cdot 10^5$ — $7.5 \cdot 10^5$ клеток, помещали в культуральную среду объемом 10 мл, из состава которой были исключены экстракт бычьей печени и дрожжевой экстракт и в которую был добавлен ЭФР в конечной концентрации 10^{-8} М. В контрольной серии тетрахимен помещали в такую же среду без ЭФР. ЭФР был выделен из подчелюстных желез самцов мыши по общепринятой методике (Соркин и др., 1989). Синхронизацию делений клеток вызывали путем переноса инокулума клеток, находившихся в средней стационарной фазе роста культуры (48 ч культивирования), в свежую ростовую среду (Шемарова и др., 2002).

Гомогенат клеток для определения АЦ получали из осажденных центрифугированием (600 г в течение 5 мин)

тетрахимен. Осажденные клетки осторожно отмывали 20 мМ Трис-HCl-буфером (рН 7.5), после чего их разрушали озвучиванием в течение 30 с на ультразвуковом дезинтеграторе УЗДН-2Е при частоте 20 кГц. Активность АЦ (КФ 4.6.1.1) определяли по общепринятой методике (Solomon et al., 1974).

Количество ДНК в ядрах определяли в стартовой точке (0 мин), а в дальнейшем через каждые 30 мин на протяжении 4 ч в фиксированных жидкостью Карнуги и окрашенных по Фельгену препаратах методом абсорбционной цитофотометрии (Шемарова и др., 2002).

Для выявления рецепторов к ЭФР стимулированные ЭФР клетки центрифугировали при 600 g в течение 5 мин, промывали 1 раз PBS и 2 раза раствором PBS, содержащим 5 мМ NaF и 1 мМ Na₃VO₄. Тотальный лизат получали добавлением к клеточной суспензии 0.2 мл лиазирующего буфера, содержащего 50 мМ Трис-HCl-буфера (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ PMSF, по 1 мкг/мл лейпептина, аprotинина и пепстатина, 10 % глицерина и 1 % Тритона X-100. Клетки инкубировали 15—45 мин при 4 °C. Клеточный лизат центрифугировали в течение 15 мин при 10 000 g. К супернатанту добавляли 0.25 буфера для электрофоретических проб (40 мМ Трис, рН 6.8, 10 % додецилсульфоната натрия — SDS, 20 % 2-меркаптоэтанола и 40 % глицерина) и инкубировали в течение 5 мин при 100 °C. Электрофоретическое разделение белков проводили методом электрофореза в поликарбамидном геле в присутствии SDS в модификации Лэммли (Laemmli, 1970). Концентрирующий гель (рН 6.8) содержал 4 % поликарбамиды, разделяющий (рН 8.8) — 8 %. Разделение белков проводили в блоках геля 90 × 60 × 1 мм при силе тока 30 mA на пластину в течение 2 ч. Разделенные в поликарбамидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Электроперенос осуществляли при силе тока 0.8 mA на 1 см² геля в течение 1 ч в буфере для полусухого переноса (48 мМ Трис, 39 мМ глицина, 0.037 % SDS и 3 % метанола). Для визуализации белковых полос использовалиponceau S (Sigma, США).

Иммуноблотинг проводили в соответствии с методикой ECL Western blotting protocols (Amersham). Инкубацию с антителами против фосфорилированного тирозина (клон PY20) проводили при 4 °C. Все остальные процедуры осуществляли при комнатной температуре. Мембрану промывали TIBS (20 мМ Трис-HCl, рН 7.5, 150 мМ NaCl и 0.1 % Tween-20), после чего инкубировали последовательно в 5%-ном растворе обезжиренного молока в TIBS в течение 1 ч и в растворе первичных антител в 1%-ном растворе бычьего сывороточного альбумина в TIBS в течение 1 ч, затем промывали TIBS (3 раза по 5 мин). Далее мембрану помещали на 1 ч в раствор вторичных антител в 5%-ном растворе обезжиренного молока в TIBS, после чего промывали TIBS (3 раза по 5 мин). Для детекции пероксидазной активности вторичных антител — козьих антител, полученных против иммуноглобулинов мыши, сконъюгированных с пероксидазой (GAM-HRP; Sigma, США), — использовали реакцию усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham). Мембрану промывали водой и инкубировали в темноте 1 мин в свежеприготовленном растворе, содержащем 100 мМ Трис-HCl (рН 8.5), 1.25 мМ люминола, 0.2 мМ кумаровой кислоты и 0.01 % H₂O₂. Хемилюминесцентное излучение регистрировали после экс-

понирования на рентгеновской пленке (СЕА АВ, Швеция).

В работе использовали неорганические соли производства «Вектон» (Санкт-Петербург); реактивы фирмы Sigma (США): ингибитор тирозинкиназы рецептора ЭФР тирофостин AG1478 (5 мКМ), ингибитор MAP ERK1,2-киназ PD98059 (40 мКМ); ингибитор Src-киназы CGP77675 (1 мКМ; Novartis, Швейцария); моноклональные антитела против фосфорилированного тирозина PY20 (Cell Signaling Technology, США); [³²P]αATФ фирмы «Изотоп» (Санкт-Петербург).

Результаты и обсуждение

В экспериментах первой серии мы исследовали мембранные белки, способные к трансмембранный передаче в клетку сигнала, индуцированного ЭФР, выявляя их с использованием иммуноблотинга тотальных лизатов клеток *T. pyriformis*, стимулированных ЭФР. Стимуляцию клеток ЭФР осуществляли на протяжении 15—45 мин при 28 °C. По окончании пролиферативной стимуляции из клеток готовили лизаты, проводили иммуноблотинг, после которого гели клеточных лизатов подвергали обработке антителами против фосфорилированного тирозина. Оказалось, что ни при каких обработках ЭФР — ни при более кратковременных в течение 15 мин, ни при более длительных в течение 45 мин — не наблюдается даже незначительного окрашивания белковых полос на мембране. При этом во всех контрольных пробах ЭФР вызывал фосфорилирование по тирозину рецептора ЭФР мыши через 15 мин после воздействия с последующим его снижением (визуальная оценка). На основании проведенного эксперимента, а также с учетом данных о том, что антитела PY20 специфически узнают фосфорилированный тирозин в белках животных разного уровня организации, в том числе и в белках одноклеточных эукариот (Flores-Robles et al., 2003), мы заключили, что в мембранах тетрахимен отсутствуют рецепторы, способные к автофосфорилированию по тирозину.

Интересно, что ранее у тетрахимен были обнаружены белки, сходные с β-цепями инсулиноподобного фактора роста I (Christopher, Sundermann, 1996), которые на основании структурного сходства были отнесены к рецепторным тирозинкиназам. Как и рецептор ЭФР, они могут активироваться ЭФР. Отсутствие тирозинового фосфорилирования в мембранный клеточной фракции тетрахимен может говорить о том, что механизм трансмембранный передачи сигнала, индуцированного ЭФР, у этих организмов не связан с автофосфорилированием рецепторов тирозинкиназного типа. Однако функциональное сходство в действии ЭФР на нисходящие звенья митогенного пути позволяет предполагать возможность существования у этих микроорганизмов рецепторов тирозинкиназного типа, активирующихся при участии неизвестного пока альтернативного механизма.

Мишенью действия рецепторных тирозинкиназ являются регуляторные и сигнальные тирозинсодержащие белки, многие из которых являются начальными звеньями митогенактивируемых протеинкиназных каскадов. Для того чтобы выяснить, могут ли влиять факторы роста, действующие у млекопитающих через тирозинкиназы, на пролиферативную активность тетрахимен, мы провели эксперимент с использованием ингибиторов РТК и ассоциированной с рецептором Src-тирозинкина-

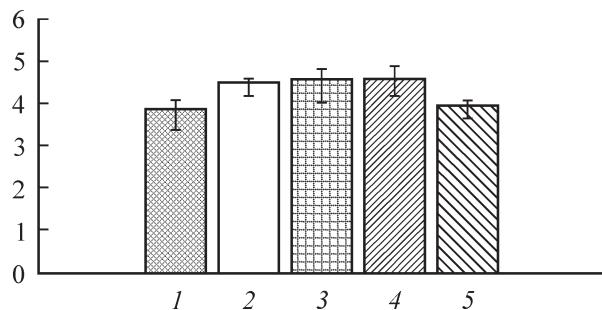


Рис. 1. Влияние ингибиторов тирозинкиназы на пролиферативную активность *Tetrahymena pyriformis*, индуцированную ЭФР.

По вертикали — содержание ДНК в клетках, отн. ед. 1 — покоящиеся клетки (контроль 1); 2 — клетки, вступившие в клеточный цикл без воздействия ЭФР (контроль 2); 3—5 — клетки через 1 ч после стимуляции ЭФР: 3 — стимуляция клеток ЭФР, 4 — стимуляция клеток ЭФР после их инкубации с ингибитором рецепторной тирозинкиназы AG1478 (5 мкМ), 5 — стимуляция клеток ЭФР после их инкубации с ингибитором Src-тироzinкиназы CGP77675 (1 мкМ).

зы. С этой целью инфузорий, стимулированных к росту ЭФР, в течение 1 ч инкубировали с вышеизложенными ингибиторами, а затем оценивали влияние ингибиторов на рост клеток по среднему содержанию в их ядрах ДНК. Как видно из представленных на рис. 1 данных, тетрахимены, растущие в свежей среде, в среде с ЭФР, а также в среде с ингибитором рецепторных тирозинкиназ, содержащими несколько больше ДНК по сравнению с не стимулированными к росту клетками и клетками, растущими в среде с ингибитором Src-тироzinкиназ. По-видимому, некоторое подавление синтеза ДНК, вызванное ингибитором Src-тироzinкиназ, в большей степени обусловлено его цитотоксическим действием и лишь незначительно связано со специфическим влиянием на сигнальную функцию. На это могут указывать гибель части клеточной популяции сразу после воздействия ингибитора и отсутствие фосфорилирования по тирозину в клеточных лизатах. Тем не менее полученные в эксперименте данные не исключают возможности существования у тетрахимена белка с функциональными свойствами Src-тиро-

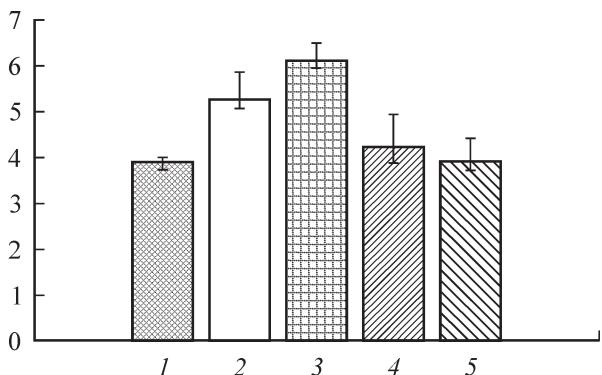


Рис. 2. Влияние ингибиторов ERK1,2-киназ и Ca^{2+} -каналов на пролиферативную активность *Tetrahymena pyriformis*, индуцированную ЭФР.

По вертикали — содержание ДНК в клетках, отн. ед. 1 — покоящиеся клетки (контроль 1); 2 — клетки, вступившие в клеточный цикл без воздействия ЭФР (контроль 2); 3—5 — клетки через 3.5 ч после стимуляции ЭФР: 3 — стимуляция клеток ЭФР, 4 — стимуляция клеток ЭФР после их инкубации с ингибитором ERK1,2-киназ PD98059 (40 мкМ), 5 — стимуляция клеток ЭФР после их инкубации с ингибитором Ca^{2+} -каналов LaCl_3 (1 мкМ).

зинкиназ и его участия в передаче пролиферативного сигнала. Такое участие, будучи не связанным с фосфорилированием эффекторных белков по тирозину, может носить опосредованный характер и включать в себя механизм аллостерической активации.

В целом полученные в этих двух экспериментах результаты свидетельствуют о том, что у тетрахимен отсутствуют структурные аналоги тирозинкиназ млекопитающих — рецепторные компоненты пролиферативного пути, активируемого ЭФР, и согласуются с представлениями о более позднем эволюционном происхождении механизмов рецепторной передачи сигнала с помощью процессов фосфорилирования по тирозину.

В экспериментах 2-й серии мы изучали цитоплазматическое звено передачи пролиферативного сигнала, индуцированного ЭФР. В работе было использовано соединение PD98059, которое является ингибитором MAP ERK1,2-киназ. Установлено, что предобработка тетрахимен в течение 1 ч названным ингибитором в значительной степени замедляет скорость синтеза ДНК в клетках, стимулированных ЭФР. Максимальное действие ингибитора проявлялось перед завершением клеточного цикла — к 3.5 ч после начала стимуляции (рис. 2). Так как ингибитор оказывает действие преимущественно на клетки в фазе S/G₂, можно полагать, что мишенью его действия является фермент, требующийся на более поздних стадиях прохождения сигнала. Полученные нами данные свидетельствуют о наличии у тетрахимен фермента, функционально подобного MAP ERK1,2-киназам млекопитающих, и о его участии в передаче пролиферативных сигналов в геном. Исходя из имеющихся данных о первичной структуре и функциональных свойствах выявленной у тетрахимен единственной ERK1-подобной киназы MRK (40 % гомологии первичной структуры с ERK 1 человека — Nakashima et al., 1999) можно предположить, что ингибитор воздействует именно на эту киназу. Отмечено, что MRK-киназа у тетрахимен активируется в условиях осмотического или температурного стресса (Nakashima et al., 1999). Так как в наших экспериментах клетки, обработанные LaCl_3 (ингибитором Ca^{2+} -каналов), росли с меньшей скоростью, чем интактные клетки (рис. 2), можно предположить, что ионы Ca^{2+} наряду со стрессиндуцируемыми клеточными факторами, вызванными изменением условий культивирования клеток, могут участвовать в активации MRK. Такие примеры можно обнаружить при анализе механизмов активации ERK1,2-киназ млекопитающих (Schliess et al., 1996).

В экспериментах 3-й серии мы изучали активность АЦ в клеточных гомогенатах тетрахимен, предварительно стимулированных ЭФР. Активность ферmenta определяли в гомогенатах покоящихся (контроль) и вступивших в клеточный цикл клеток. Ранее нами было показано, что большинство стационарно растущих клеток тетрахимен находится в состоянии пролиферативного покоя (в G₀-фазе), в то время как логарифмически растущие культуры клеток представляют собой гетерогенную возрастную популяцию, которую ЭФР в значительной мере синхронизирует (Шемарова и др., 2004). Исходя из того что через 15 мин после воздействия ЭФР большая часть *T. pyriformis* уже вступила в новый генеративный цикл, мы предположили, что в случае участия цАМФ-зависимой сигнальной системы в передаче пролиферативного сигнала активность АЦ к этому сроку должна существенно возрасти. Действительно, ЭФР в концентрациях 10⁻⁸ и 10⁻⁹ М отчетливо стимулировал активность АЦ в

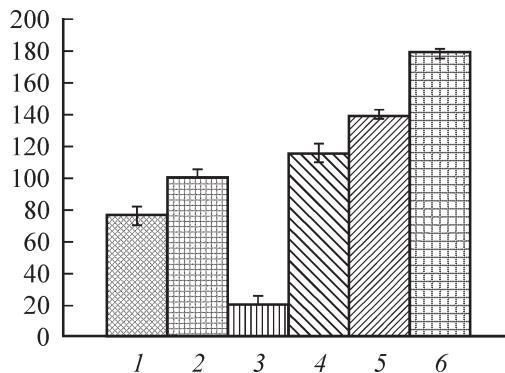


Рис. 3. Влияние ЭФР на активность АЦ в гомогенатах *Tetrahymena pyriformis*.

По вертикали — активность АЦ. 1 — покоящиеся клетки без ЭФР; 2 — покоящиеся клетки с ЭФР, через 15 мин после стимуляции; 3 — клетки, вступившие в цикл, с ЭФР, через 15 мин после стимуляции и сразу после переноса в свежую питательную среду; 4 — клетки, вступившие в цикл, без ЭФР, через 15 мин после переноса в свежую питательную среду; 5 — клетки, вступившие в цикл, с ЭФР в концентрации 10^{-9} М, через 15 мин после переноса в свежую питательную среду; 6 — такой же вариант, но ЭФР в концентрации 10^{-8} М.

гомогенатах клеток, вступивших в клеточный цикл (рис. 3). Активность фермента в гомогенатах, приготовленных из таких клеток, была на порядок выше, чем в гомогенатах из покоящихся клеток. Максимальное стимулирующее влияние ЭФР на АЦ достигалось при концентрации ЭФР 10^{-8} М.

Полученные данные согласуются с представлениями о том, что у инфузорий процесс клеточного роста является зависимым от активности АЦ (Kassis, Zeuthen, 1979). Известно, что активность АЦ в клетках тетрахимен, вступивших в клеточный цикл, выше, чем в покоящихся клетках, находящихся в стационарной фазе роста (Kassis, Zeuthen, 1979). Полагают, что возрастание роли усилющего фермента АЦ-сигнальной системы у *T. pyriformis*, вступивших в генеративный цикл, связано с необходимостью продукции цАМФ как основного регулятора митогенеза в клетках низших эукариот. Так как активность АЦ у тетрахимен, преинкубированных с ЭФР, в среднем на 15 % выше, чем в интактных клетках, можно полагать, что ЭФР оказывает на фермент стимулирующее действие.

Пока трудно сказать, с чем связан механизм стимулирующего действия ЭФР на АЦ тетрахимен. Поскольку у этих одноклеточных организмов отсутствуют рецепторы, 7 раз пронизывающие мембрану, и гетеротримерные G-белки, участвующие в активации АЦ (Шемарова, 2005), нельзя проводить параллели в действии ЭФР на клетки высших и низших эукариот. Однако данные о наличии функционального и биохимического сходства в строении АЦ-сигнальных систем млекопитающих и инфузорий (Шпаков и др., 2003) позволяют предположить существование у инфузорий способа активации АЦ с помощью комплексного сигнального механизма, запускаемого действием ЭФР, через активацию тирозин-подобных киназ (через альтернативный механизм; см. выше). Известно, что в клетках млекопитающих ЭФР стимулирует АЦ в результате автофосфорилирования рецепторной тирозинкиназы и активации гетеротримерного G_s-белка (Poppleton et al., 1996). У отдельных представителей различных таксономических групп протистов обнаружены тирозин-подобные киназы (без сайтов авто-

фосфорилирования), тирозинсодержащие белки (Шемарова, 2006), АЦ и гетеротримерные G-белки (Шемарова, 2005), однако пока все еще недостаточно данных для обоснования гипотезы об участии АЦ инфузорий в сигнальном пути, активируемом ЭФР.

Таким образом, на основании полученных результатов и литературных данных представляется возможным предположить, что в клетках инфузорий *T. pyriformis* имеется сигнальный путь, активируемый ЭФР. Элементами этого пути могут быть мембранные белки тирозинкиназного типа (без сайтов фосфорилирования по тирозину), АЦ, тирозин- и Ca^{2+} -зависимые ERK-подобные киназы.

Авторы выражают глубокую признательность Е. Б. Буровой за неоценимую помощь в проведении экспериментов по выявлению у тетрахимен рецепторов ЭФР и сотрудникам Лаборатории молекулярной эндокринологии за определение активности АЦ у инфузорий.

Список литературы

- Соркин А. Д., Богданова Н. П., Сорокин А. Б., Тесленко Л. В. 1989. Рециклирование ЭФР-рецепторных комплексов в клетках А431. Цитология. 31 (3) : 300—311.
- Шемарова И. В. 2005. Путь передачи сигнала через cAMP-РКА в клетках низших эукариот. Цитология. 47 (4) : 296—309.
- Шемарова И. В., Селиванова Г. В., Власова Т. Д. 2002. Влияние эпидермального фактора роста и инсулина на пролиферацию и синтез ДНК в клетках цилият *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 44 (11) : 1097—1103.
- Шемарова И. В., Селиванова Г. В., Власова Т. Д. 2004. Цитофотометрическое исследование влияния эпидермального фактора роста на синтез РНК и белка в инфузориях *Tetrahymena pyriformis*. Цитология. 46 (11) : 993—995.
- Штиков А. О., Деркач К. В., Успенская З. И., Кузнецова Л. А., Плеснева С. А., Перцева М. Н. 2003. Регуляция биогенными аминами и пептидными гормонами активности аденилатциклазы и протеинкиназы А у инфузорий *Dileptus* и *Tetrahymena pyriformis*. Докл. РАН. 388 : 275—277.
- Christopher G. K., Sundermann C. A. 1996. Intracellular insulin binding in *Tetrahymena pyriformis*. Tissue and Cell. 28 : 427—437.
- Flores-Robles D., Rosales C., Luis Rosales-Encina J., Talamas-Rohana P. 2003. *Entamoeba histolytica*: a beta 1 integrin-like fibronectin receptor assembles a signaling complex similar to those of mammalian cells. Exp. Parasitol. 103 : 8—15.
- Kassis S., Zeuthen E. 1979. Adenylate cyclase and cyclic AMP through the cell cycle of *Tetrahymena*. Exp. Cell Res. 124 : 73—78.
- Laemmli U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature. 227 : 680—685.
- Nakashima S., Wang S., Hisamoto N., Sakai H., Andoh M., Matsumoto K., Nozawa Y. 1999. Molecular cloning and expression of a stress-responsive mitogen-activated protein kinase-related kinase from *Tetrahymena* cells. J. Biol. Chem. 274 : 9976—9983.
- Poppleton H., Sun H., Fulgham D., Bertics P., Patel T. B. 1996. Activation of Gsalpha by the epidermal growth factor receptor involves phosphorylation. J. Biol. Chem. 271 : 6947—6951.
- Schliess F., Sinning R., Fischer R., Schmalenbach C., Haussinger D. 1996. Calcium-dependent activation of Erk-1 and Erk-2 after hypo-osmotic astrocyte swelling. Biochem. J. 320 : 167—171.
- Shemarova I. V. 2006. The role of tyrosine phosphorylation in regulation of signal transduction pathways in unicellular eukaryotes. Curr. Issues Mol. Biol. 8 : 27—50.
- Solomon Y., Londos C., Rodbell M. A. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. Anal. Biochem. 58 : 541—548.

THE INFLUENCE OF THE EGF ON PROLIFERATIVE SIGNAL TRANSDUCTION
IN CILIATE *TETRAHYMENA PYRIFORMIS*

I. V. Schemarova, G. V. Selivanova, T. D. Vlasova

I. M. Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry RAS
and Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;
e-mail: irina@lis.mail.iephb.ru

It has been shown that the transduction of the proliferative signal induced by EGF in ciliata *Tetrahymena pyriformis* cells is not connected with autophosphorylation of the receptor tyrosine kinases. The results obtained indicate that EGF in ciliata cells initiates the mitogenic pathway including the membrane proteins of the tyrosine kinases-like type (without tyrosine phosphorylation sites), adenylate cyclase, tyrosine- and Ca^{2+} -dependent ERK-like kinases.

Key words: *Tetrahymena pyriformis*, intracellular signaling, tyrosine phosphorylation, proliferation, EGF, Src-tyrosine kinase, Ca^{2+} , ERK.