

## УРОВЕНЬ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА EGF ОПРЕДЕЛЯЕТ ЕГО ТРАНСАКТИВАЦИЮ ПРИ ДЕЙСТВИИ IFN $\gamma$ В ЭПИТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ

© И. В. Гончар, В. Н. Дорош, Н. Н. Никольский, Е. Б. Бурова<sup>1</sup>

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;*

<sup>1</sup> *электронный адрес: lenbur87@mail.ru*

Ранее нами была продемонстрирована трансактивация рецептора EGF в ответ на действие интерферона  $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) на клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431. Изучение различных линий эпителиальных клеток показало, что они различаются по возможности трансактивации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$ . В настоящей работе выдвинута гипотеза о корреляции процесса трансактивации рецептора EGF и количества экспрессированного рецептора EGF в клетках. С целью проверки этого предположения провели трансфекцию рецептора EGF, лишённого 99 аминокислотных остатков, в клетки эпителиального происхождения HEK293, в которых изначально не наблюдали трансактивации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$ . В результате получили постоянную линию клеток HEK293 $\Delta$ 99 с высоким уровнем экспрессии рецептора, которая демонстрировала отчетливую трансактивацию рецептора EGF, вызываемую действием IFN $\gamma$ . Динамика этого процесса в клетках HEK293 $\Delta$ 99 и A431 была одинаковой. В полученной линии клеток трансактивация рецептора EGF зависела от активности его тирозинкиназы и происходила за счет механизма автофосфорилирования, как и в клетках A431. Таким образом, в настоящей работе получено прямое доказательство взаимосвязи между процессами IFN $\gamma$ -зависимой трансактивации рецептора EGF и уровнем его экспрессии в эпителиальных клетках.

Ключевые слова: рецептор эпидермального фактора роста, IFN $\gamma$ , трансактивация рецептора EGF, тирозинкиназа, A431, HEK293.

Принятые сокращения: EGF — эпидермальный фактор роста, GPCR — рецепторы, сопряженные с G-белками, IFN $\gamma$  — интерферон гамма, IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста.

Взаимосвязи различных сигнальных путей в клетке являются предметом интенсивных исследований в последние 10 лет. Однако эта сложная сеть передачи информации, регулирующая жизнь как нормальных, так и опухолевых клеток, пока детально не изучена. Основное внимание уделяется изучению трансактивации (EGF-независимой активации) рецептора EGF, которая является частью системы регуляции передачи сигнала в клетке и играет важную роль в реакции клеток на различные внешние воздействия. По современным представлениям, трансактивация рецептора EGF является ключевым событием в процессе передачи сигнала от рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR) (Gschwind et al., 2001; Fischer et al., 2003), интегринов (Moro et al., 1998), эстрогенов (Filardo et al., 2000), некоторых цитокинов (Yamauchi et al., 1997), инсулина (Lyu et al., 2006) и IGF-1 (Roudabush et al., 2000; Ahmad et al., 2004). Трансактивация рецептора EGF происходит также в ответ на действие ряда стрессовых факторов (окислители, УФ- и гамма-излучение, изменение осмотического давления и температуры) (Knebel et al., 1996; Бурова и др., 2001; Maziere et al., 2003). Наряду с множеством работ, посвященных трансактивации рецептора EGF агонистами GPCR и активными формами кислорода, известны только два примера трансактивации при действии цитокинов: активация рецептора EGF гормоном роста (Yamauchi et al., 1997) и рецептора ErbB2 (член семейства рецептора EGF) интерлейкином 6 (Qiu et al., 1998). До наших исследова-

ний не были известны примеры взаимного влияния двух систем рецепторов — EGF и IFN $\gamma$ . Ранее нами впервые была продемонстрирована IFN $\gamma$ -индуцированная трансактивация рецептора EGF в клетках эпидермоидной карциномы человека A431, которая выражалась в необходимой активации его тирозинкиназы с последующим автофосфорилированием остатков тирозина на C-конце рецептора и зависела от активности тирозинкиназы Src и JAK2 (Burgova et al., 2007). В эпителиальных клетках почки эмбриона человека HEK293 трансактивации рецептора EGF в ответ на действие IFN $\gamma$  не обнаружено.

Для объяснения наблюдаемых различий между этими клетками было выдвинуто следующее предположение: возможность трансактивации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$  зависит от количества рецепторов EGF, экспрессированных на плазматической мембране клеток, а не от клеточного типа. Настоящая работа направлена на проверку этой гипотезы.

### Материал и методика

Культивирование клеток. В работе были использованы клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431, эмбриональные клетки почки человека линий HEK293, HeLa и Hep2 (Российская коллекция клеточных культур, Институт цитологии РАН), а также получен-

ные в нашей лаборатории на основе клеток НЕК293 линии трансфектантов НЕК293Δ99 и НЕК293WT.

Клетки культивировали в среде ДМЕМ с глутамином (Панэко, Москва), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (РАА, Австрия) и 40 мкг/мл гентамицина. Для экспериментов клетки рассевали на чашки диаметром 35 мм (Nunc) и использовали культуры, достигшие субконфлюэнтного состояния. За 1 сут до начала эксперимента клетки переводили на среду ДМЕМ, содержащую 0.5 % эмбриональной сыворотки.

Плазмиды. Для получения новых постоянных клеточных линий были использованы плазида, содержащая ген рецептора EGF дикого типа (любезно предоставлена проф. А. Соркиным, США), и плазида, содержащая ген рецептора EGF с делецией 99 С-концевых аминокислот (любезно предоставлена проф. R. Yarden, Израиль). Обе плазмиды предназначены для экспрессии генов в клетках млекопитающих и содержат ген устойчивости к антибиотик G418 для селекции постоянных трансфектантов.

Получение постоянных клеточных линий (трансфектантов). Перед трансфекцией клетки НЕК293 высевали на 24-луночную плату (Nunc). Клетки, достигшие субконфлюэнтного состояния (примерно 150—200 тыс. клеток на 1 лунку), трансфицировали соответствующей плазмидной ДНК в количестве 0.3—1.0 мкг на 1 лунку. Процедуру трансфекции проводили при помощи реагента TransFast (Promega, США) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя, соблюдая соотношение ДНК : TransFast 1 : 3. Через 48 ч после этого клетки из каждой лунки рассевали на чашку диаметром 9 см. Дальнейшее культивирование трансфектантов и отбор клонов проводили в среде, содержащей селектирующий антибиотик G418 (РАА, Австрия) в концентрации 1 мг/мл. Клетки культивировали в течение 10—14 сут, меняя каждые 3 сут культуральную среду на новую. В результате селекции на каждой чашке выросло 10—50 колоний диаметром 1—3 мм каждая. Клетки из каждой колонии переносили в отдельную лунку 96-луночной платы (Nunc), культивировали и затем оценивали уровень экспрессии рецептора EGF методом иммуноблоттинга. Клоны с высоким уровнем экспрессии использовали в дальнейшей работе.

Стимуляция клеток и приготовление тотальных лизатов. Стимуляцию клеток IFN $\gamma$  (10 нг/мл)

или EGF (100 нг/мл) проводили в среде ДМЕМ при 37 °С в атмосфере 5 % CO $_2$ . Ингибиторы тирозинкиназы рецептора EGF тирфостин AG1478 (5 мкМ; Sigma, США) и вещество 56 (1 мкМ; Calbiochem, США) добавляли в культуральную среду за 1 ч до стимуляции, и клетки инкубировали при 37 °С в атмосфере 5 % CO $_2$ . Приготовление клеточных лизатов, электрофоретическое разделение, электроперенос, иммуноокрашивание белков, а также удаление с мембраны связавшихся антител проводили, как описано ранее (Бурова и др., 2001).

Антитела. Для выявления рецептора EGF и его различных мутантных форм использовали поликлональные кроличьи антитела против рецептора EGF (от проф. G. Carpenter, США). Уровень тирозинового фосфорилирования рецептора EGF в постоянных трансфектантах и клетках линии A431 детектировали при помощи моноклональных мышиных антител против фосфотирозина (PY-20, Sigma, США). Уровень фосфорилирования каждого из тирозиновых остатков в положениях 845, 992, 1045, 1068, 1148 и 1173 рецептора EGF выявляли при помощи специфичных кроличьих антител (Cell Signaling Technology, США). В качестве вторых антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика и конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP, Cell Signaling Technology, США), и козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши и конъюгированные с пероксидазой хрена (GAM-HRP, Sigma, США).

## Результаты

Сравнение уровня IFN $\gamma$ -индуцированной трансактивации рецептора EGF в клетках A431 и НЕК293. Исследовали динамику активации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$  на клетки линий A431 эпидермоидной карциномы человека и НЕК293 эмбриональной почки человека. Выбор клеточных линий для нашего исследования был обусловлен следующими причинами. Клетки A431 имеют экстраординарно высокий уровень рецептора EGF (более 2.5 · 10 $^6$  молекул на клетку) (Lin et al., 1984) и являются удобной модельной системой для изучения механизмов передачи сигнала от рецептора EGF. Клетки НЕК293 имеют очень низкий по сравнению

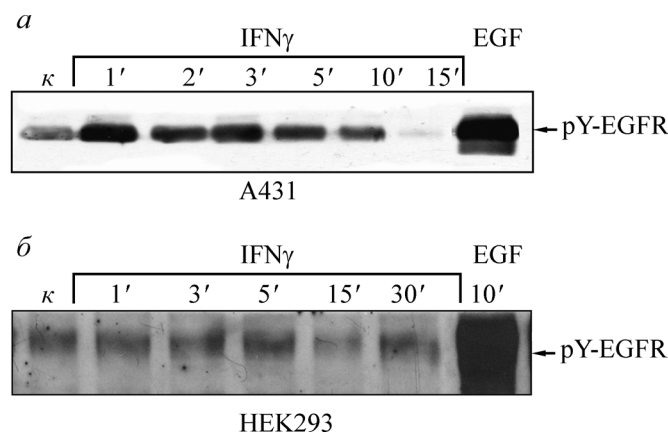


Рис. 1. Сравнительная динамика активации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$  на клетки A431 (а) и НЕК293 (б).

Клетки обрабатывали IFN $\gamma$  в концентрации 10 нг/мл в течение указанного времени или EGF в концентрации 100 нг/мл в течение 10 мин. κ — необработанные (контрольные) клетки. Иммуноблоттинг электрофоретически разделенных тотальных клеточных лизатов проводили с использованием моноклональных антител против фосфотирозина (pY20). Стрелкой указано положение фосфорилированного по тирозину рецептора EGF (pY-EGFR).

с клетками A431 уровень рецептора EGF (менее  $1 \cdot 10^4$  молекул на клетку) (Gan et al., 2007) и характеризуются высокой эффективностью трансфекции, что позволяет экспрессировать на высоком уровне рецептор EGF как дикого типа, так и его различные мутанты. На рис. 1, *a* видно, что IFN $\gamma$  вызывает отчетливое, но непродолжительное увеличение уровня фосфорилирования рецептора в клетках A431. Максимальный активирующий эффект наблюдается через 1—3 мин после начала действия IFN $\gamma$ , а через 15 мин происходит резкое падение уровня активации рецептора ниже контрольного значения. Для сравнения приведена активация рецептора EGF при действии EGF в течение 10 мин. Отметим, что IFN $\gamma$  стимулирует активацию рецептора EGF слабее, чем его собственный лиганд EGF. Как известно, EGF стимулирует быстрое и продолжительное фосфорилирование рецептора EGF в клетках A431 (Nesterov et al., 1990). Напротив, IFN $\gamma$ , согласно полученным результатам, вызывает быстрое и обратимое фосфорилирование рецептора EGF по тирозину. Для того чтобы установить, существует ли взаимосвязь трансактивации рецептора EGF с уровнем экспрессии рецептора, мы провели исследование на клетках HEK293. Многочисленные попытки выявить трансактивацию рецептора EGF в клетках HEK293 при действии IFN $\gamma$  не привели к положительному результату. Как видно на рис. 1, *б*, в этих клетках не наблюдается трансактивации рецептора EGF при стимуляции IFN $\gamma$ , в то время как EGF вызывает отчетливую активацию своего рецептора. Можно предположить, что

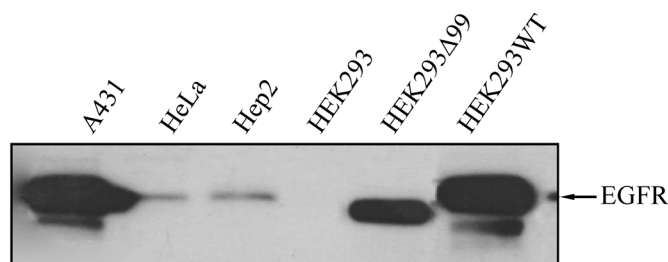


Рис. 2. Уровень экспрессии рецептора EGF в различных линиях клеток эпителиального происхождения.

Имуноблоттинг электрофоретически разделенных тотальных клеточных лизатов проводили с использованием поликлональных антител против рецептора EGF. Стрелкой указано положение рецептора EGF.

низкий уровень экспрессии рецептора EGF в клетках HEK293 не позволяет обнаружить его трансактивацию при действии IFN $\gamma$ . Если в клетках после значительного повышения экспрессии рецептора EGF путем трансфекции его гена появится отчетливая IFN $\gamma$ -индуцированная трансактивация рецептора EGF, то логично допустить, что она будет обеспечиваться трансфицированным, а не собственным эндогенным рецептором.

Описание постоянных линий клеток, полученных на основе клеток HEK293. Как упоминалось выше, клетки HEK293 характеризуются высокой эффективностью трансфекции, поэтому мы использовали их

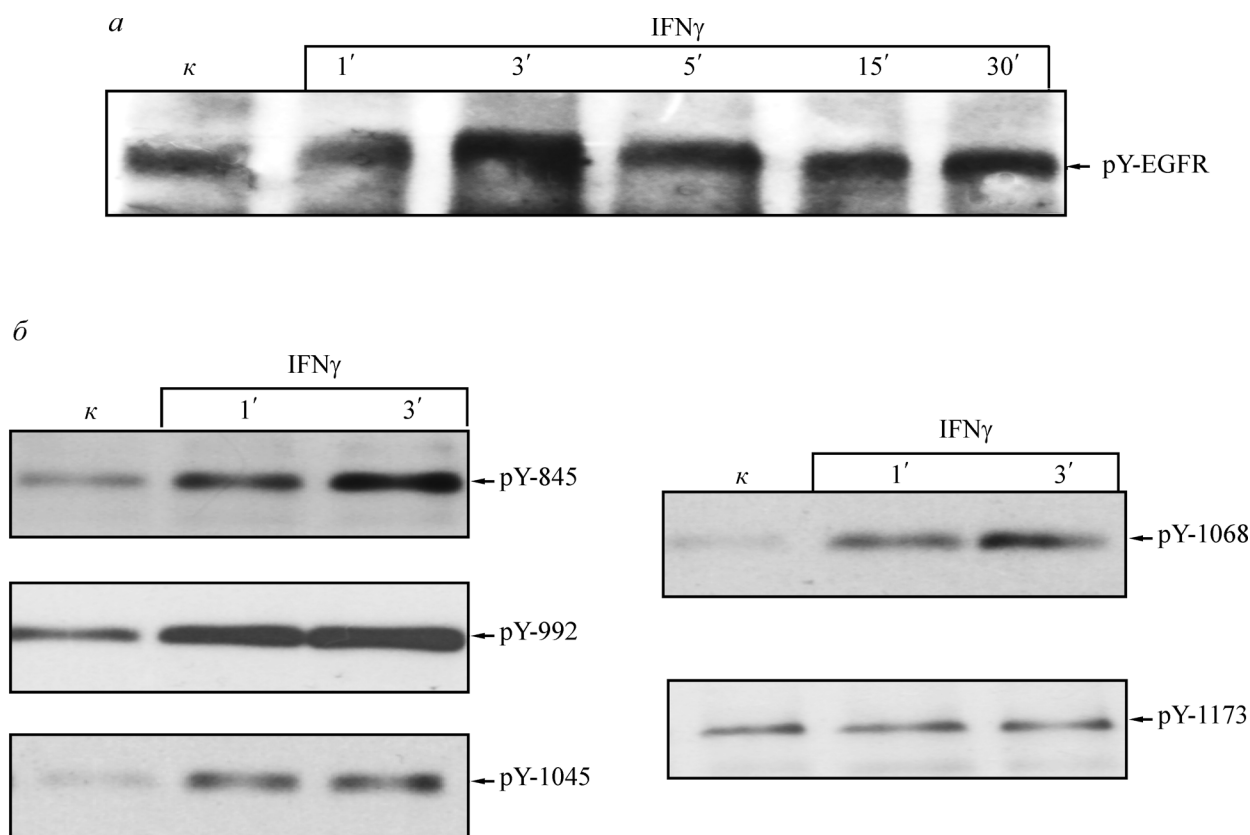


Рис. 3. Трансактивация рецептора EGF при действии IFN $\gamma$  в клетках HEK293Δ99.

*a* — динамика вызываемой IFN $\gamma$  активации рецептора EGF. Клетки обрабатывали IFN $\gamma$  в концентрации 10 нг/мл в течение указанного времени;  $\kappa$  — необработанные (контрольные) клетки; в иммуноблоттинге использовали антитела против фосфотирозина (pY20); стрелкой указано положение фосфорилированного по тирозину рецептора EGF. *б* — выявление сайтов фосфорилирования по тирозину рецептора EGF; клетки HEK293Δ99 обрабатывали IFN $\gamma$  в концентрации 10 нг/мл в течение 1 или 3 мин;  $\kappa$  — необработанные (контрольные) клетки; иммуноблоттинг проводили антителами против фосфорилированных по тирозину сайтов рецептора в положениях 845, 992, 1045, 1068 и 1173, как отмечено справа.

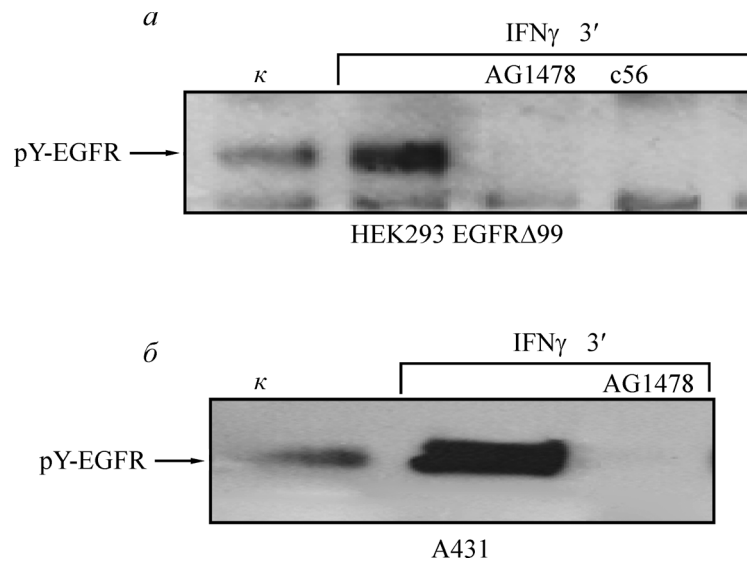


Рис. 4. Влияние ингибиторов тирозинкиназы рецептора EGF на его активацию, вызываемую  $\text{IFN}\gamma$ , в клетках HEK293 $\Delta$ 99 (а) и A431 (б).

Клетки стимулировали  $\text{IFN}\gamma$  (10 нг/мл) в течение 3 мин или перед стимуляцией клетки предварительно инкубировали в течение 1 ч с одним из ингибиторов тирозинкиназы рецептора EGF — тирфостином AG1478 (5 мкМ) или веществом 56 (С 56, 1 мкМ).  $\kappa$  — необработанные (контрольные) клетки. Условия проведения иммуноблотинга указаны в подписи к рис. 1.

для доказательства зависимости трансактивации рецептора EGF от его количества, экспрессированного в клетках. При помощи трансфекции клеток HEK293 плазидами, кодирующими различные формы рецептора EGF с активной тирозинкиназой, были получены две постоянные линии клеток. Клетки HEK293WT, экспрессирующие рецептор EGF дикого типа, и HEK293 $\Delta$ 99 с рецептором EGF, имеющим делецию 99 С-концевых аминокислотных остатков и соответственно без двух последних сайтов автофосфорилирования Y1148 и Y1173. Представленный на рис. 2 иммуноблот позволяет сравнить уровни экспрессии рецептора EGF в различных клеточных линиях. Из приведенных данных видно, что клетки A431, HEK293WT и HEK293 $\Delta$ 99 экспрессируют очень большое количество рецептора по сравнению с клеточными линиями эпителиального происхождения HeLa и Hep2. В клетках HEK293 уровень экспрессии рецептора очень низок и не детектируется на иммуноблоте. Для того чтобы выяснить, приводит ли высокий уровень экспрессии рецептора EGF к появлению трансактивации рецептора при стимуляции  $\text{IFN}\gamma$ , использовали линию клеток HEK293WT. Однако результаты экспериментов по выявлению  $\text{IFN}\gamma$ -зависимой трансактивации рецептора EGF в этих клетках заставили нас отказаться от ее использования из-за высокого уровня базального фосфорилирования рецептора, на фоне которого трудно было детектировать прирост  $\text{IFN}\gamma$ -индуцированного фосфорилирования. По этой причине дальнейшие исследования проводили на клетках линии HEK293 $\Delta$ 99.

$\text{IFN}\gamma$ -индуцированная трансактивация рецептора EGF в клетках HEK293 $\Delta$ 99. Как следует из данных рис. 3, а, в клетках HEK293 $\Delta$ 99 при действии  $\text{IFN}\gamma$  происходит быстрое и обратимое повышение уровня фосфорилирования рецептора, причем динамика этого процесса в целом совпадала с таковой в клетках A431 (см. рис. 1, а). Для доказательства того, что наблюдаемая трансактивация мутантного рецептора EGF в клетках HEK293 $\Delta$ 99 приводит к активации основных функциональных сайтов автофосфорилирования на этом рецепторе, был определен статус фосфорилирования тирозино-

вых остатков в положениях 992, 1045, 1068, 1173, а также 845. На рис. 3, б видно отчетливое  $\text{IFN}\gamma$ -индуцированное повышение уровня тирозинового фосфорилирования тех четырех сайтов, фосфорилирование которых детектируется также в клетках A431, имеющих полноразмерный рецептор EGF (Burova et al., 2007). Как и следовало ожидать, не происходит изменения уровня фосфорилирования тирозина в положении 1173 в клетках, обработанных  $\text{IFN}\gamma$ , по сравнению с контрольными клетками, так как в мутантном рецепторе EGF в клетках HEK293 $\Delta$ 99 этот сайт автофосфорилирования делегирован. Совокупность полученных данных свидетельствует о том, что в клетках HEK293 $\Delta$ 99 мутантный рецептор функционально активен и его трансактивация, вызываемая  $\text{IFN}\gamma$ , опосредуется механизмом автофосфорилирования.

Необходимость активной тирозинкиназы рецептора EGF для его трансактивации в клетках HEK293 $\Delta$ 99 при действии  $\text{IFN}\gamma$ . Для выяснения вопроса о том, контролирует ли активная тирозинкиназа рецептора EGF процесс трансактивации, клетки HEK293 $\Delta$ 99 были предварительно обработаны ингибиторами тирозинкиназной активности AG1478 или веществом 56 с последующей стимуляцией  $\text{IFN}\gamma$ . Как показано на рис. 4, а, действие каждого из этих ингибиторов полностью блокировало индукцию трансактивации рецептора EGF при действии  $\text{IFN}\gamma$ . В клетках A431 ингибирование тирозинкиназы полноразмерного рецептора EGF также приводило к предотвращению трансактивации рецептора EGF, вызываемой  $\text{IFN}\gamma$  (рис. 4, б). Полученные результаты позволяют сделать вывод о необходимости тирозинкиназной активности рецептора EGF для процесса трансактивации в клетках как HEK293 $\Delta$ 99, так и A431.

## Обсуждение

Данная работа является продолжением наших исследований механизма трансактивации рецептора EGF, вызываемой в клетках эпидермоидной карциномы человека

A431 действием IFN $\gamma$ . Клетки A431, сверхэкспрессирующие рецептор EGF, не являются уникальными в отношении способности к IFN $\gamma$ -зависимой трансактивации рецептора EGF. В эпителиальных опухолевых клетках другой природы — Her2 (рак гортани) и HeLa (рак шейки матки) — также наблюдалась IFN $\gamma$ -индуцированная трансактивация рецептора EGF, но более слабая, чем в A431. Согласно нашим данным (рис. 2) и данным литературы, эти клетки занимают промежуточное положение по уровню экспрессии рецептора EGF в ряду исследованных клеток. Как уже упоминалось, эпителиальные клетки почки эмбриона человека HEK293 имеют небольшое количество рецептора EGF — менее 10 тыс. молекул на клетку. Следует подчеркнуть, что рецептор EGF в HEK293 является функционально активным, так как связывание лиганда EGF приводило к активации рецептора EGF (рис. 1, б). Однако трансактивации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$  не было обнаружено в этих клетках. Возможно, этот процесс либо вообще не происходит в клетках HEK293, либо не детектируется из-за низкого уровня экспрессии рецептора EGF.

Мы предположили, что отсутствие трансактивации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$  связано именно с небольшим количеством рецептора EGF в клетках HEK293, и выдвинули гипотезу о зависимости процесса IFN $\gamma$ -индуцированной трансактивации от количества рецептора EGF, экспрессированного в клетках. Для выяснения этого вопроса мы решили повысить уровень экспрессии рецептора EGF в клетках HEK293 за счет трансфекции полноразмерного рецептора EGF дикого типа, имеющего активную тирозинкиназу. В результате была получена постоянная линия клеток HEK293WT, экспрессирующая рецептор на таком же высоком уровне, как и клетки A431 (рис. 2). Однако изучение трансактивации в этой клеточной линии было невозможно из-за неблагоприятного фактора — высокого уровня базального фосфорилирования рецептора EGF. Это обстоятельство побудило нас использовать для трансфекции плазмиду, кодирующую рецептор EGF с делецией 99 аминокислотных остатков. В этом случае мутантный рецептор EGF был лишен двух значимых сайтов автофосфорилирования — Y1148 и Y1173, но обладал тирозинкиназной активностью. Мы полагали, что делеция небольшого фрагмента на С-конце мутантного рецептора не отразится на возможности трансактивации при действии IFN $\gamma$  и поэтому такой рецептор может быть в нашем исследовании аналогом рецептора EGF дикого типа. В данном случае мы также не ограничились временной трансфекцией, а получили постоянную клеточную линию HEK293 $\Delta$ 99 для использования ее при изучении механизма трансактивации. В соответствии с нашим предположением, в этих клетках IFN $\gamma$  вызывал трансактивацию рецептора EGF (рис. 3), тогда как в исходных HEK293 трансактивация не определялась. Следовательно, трансфекция мутантного рецептора EGF приводит к появлению способности к IFN $\gamma$ -индуцированной трансактивации в клетках HEK293. Это является прямым доказательством зависимости трансактивации от уровня экспрессии активного рецептора EGF, а не от клеточного типа.

В клетках HEK293 $\Delta$ 99 при действии IFN $\gamma$  была продемонстрирована аналогичная клеткам A431 динамика активации рецептора EGF и активация тех же сайтов фосфорилирования. Важно подчеркнуть, что наряду с этим для трансактивации мутантного рецептора EGF была строго необходима активность собственной тирозинкиназы рецептора, которая и опосредовала автофосфорилиро-

вание С-концевых тирозиновых сайтов. Аналогичное заключение было сделано нами ранее в отношении A431. Таким образом, IFN $\gamma$ -индуцированная трансактивация рецептора EGF в клетках HEK293 $\Delta$ 99 и A431 имеет очевидное сходство, что свидетельствует в свою очередь о сходстве функциональной активности полноразмерного и мутантного рецепторов EGF, как мы и предполагали. Следовательно, клеточная линия HEK293 $\Delta$ 99 действительно является адекватной и подходящей моделью для доказательства выдвинутой гипотезы. Интересно, что отсутствие 99 аминокислотных остатков на С-конце рецептора не препятствовало процессу трансактивации. По-видимому, эти аминокислотные остатки не играют существенной роли в трансактивации рецептора EGF при действии IFN $\gamma$ .

Сопоставление результатов исследования трансактивации в клетках HEK293 и HEK293 $\Delta$ 99 наводит на мысль о том, что в обеспечении IFN $\gamma$ -индуцированной трансактивации рецептора EGF определяющее значение имеет количество именно рецептора EGF, а не рецептора IFN $\gamma$  в клетке. Действительно, несмотря на одинаковое количество рецептора IFN $\gamma$  в вышеупомянутых клетках (несколько сотен молекул на клетку), в HEK293 эти рецепторы, вероятно, неактивны в отношении трансактивации рецептора EGF, а после повышения уровня экспрессии рецептора EGF за счет трансфекции они становятся важными игроками в процессе трансактивации. На основании проведенных исследований нами сделано заключение о том, что трансактивация рецептора EGF при действии IFN $\gamma$  определяется уровнем экспрессии рецептора EGF, но не рецептора IFN $\gamma$  и не зависит от клеточного типа, что справедливо по крайней мере в отношении изученных эпителиальных опухолевых клеток.

Авторы выражают благодарность проф. А. Соркину (Денвер, США) и проф. R. Yarden (Израиль) за предоставленные плазмиды, кодирующие различные формы рецептора EGF.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01186) и Программы исследований ведущих научных школ (НШ-523.2006.4).

#### Список литературы

- Бурова Е. Б., Грудинкин П. С., Бардин А. А., Гамалей И. А., Никольский Н. Н. 2001. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-индуцируемая активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3: роль рецептора EGF и тирозинкиназы JAK2. Цитология. 43 (12) : 1153—1161.
- Ahmad T., Farnie G., Bundred N. J., Anderson N. G. 2004. The mitogenic action of insulin-like growth factor I in normal human mammary epithelial cells requires the epidermal growth factor receptor tyrosine kinase. J. Biol. Chem. 279 : 1713—1719.
- Burova E., Vassilenko K., Dorosh V., Gonchar I., Nikolsky N. 2007. Interferon-gamma-dependent transactivation of EGF receptor. FEBS Lett. 581 : 1475—1480.
- Filardo E. J., Quinn J. A., Bland K. I., Frackelton A. R., Jr. 2000. Estrogen-induced activation of Erk-1 and Erk-2 requires the G protein-coupled receptor homolog, GPR30, and occurs via transactivation of the epidermal growth factor receptor through release of HB-EGF. Mol. Endocrinol. 14 : 1649—1660.
- Fischer O. M., Hart S., Gschwind A., Ullrich A. 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. Biochem. Soc. Transact. 31 : 1203—1208.
- Gan H. K., Walker F., Burgess A. W., Rigopoulos A., Scott A. M., Johns T. G. 2007. The epidermal growth factor recep-

tor (EGFR) tyrosine kinase inhibitor AG1478 increases the formation of inactive untethered EGFR dimers. Implications for combination therapy with monoclonal antibody 806. *J. Biol. Chem.* 282 : 2840—2850.

Gschwind A., Zwick E., Prenzel N., Leserer M., Ulrich A. 2001. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. *Oncogene*. 20 : 1594—1600.

Knebel X., Rahmosdorf H. J., Ullrich A., Herrlich P. 1996. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinase as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. *Eur. Mol. Biol. Organ. J.* 15 : 5314—5325.

Lin C. R., Chen W. S., Kruiger W., Stolarsky L. S., Weber W., Evans R. M., Verma I. M., Gill G. N., Rosenfeld M. G. 1983. Expressions cloning of human EGF A431 complementary DNA: gene amplification and three related messenger RNA products in A431 cells. *Science*. 224 : 843—848.

Lyu J., Lee K. S., Joo C. K. 2006. Transactivation of EGFR mediates insulin-stimulated ERK1/2 activation and enhanced cell migration in human corneal epithelial cells. *Mol. Vis.* 12 : 1403—1410.

Maziere C., Floret S., Santus R., Morliere P., Marcheux V., Maziere J. C. 2003. Impairment of the EGF signaling pathway by

the oxidative stress generated with UVA. *Free Radic. Biol. Med.* 34 : 629—636.

Moro L., Venturino M., Bozzo C., Silengo L., Altruda F., Beguinot L., Tarone G., Defilippi P. 1998. Integrins induce activation of EGF receptor: role in MAP kinase induction and adhesion-dependent cell survival. *EMBO J.* 17 : 6622—6632.

Nesterov A., Reshetnikova G., Vinogradova N., Nikolsky N. 1990. Functional state of the epidermal growth factor-receptor complexes during their internalization in A431 cells. *Mol. Cell. Biol.* 10 : 5011—5014.

Qiu Y., Ravi L., Kung H. J. 1998. Requirement of ErbB2 for signalling by interleukin-6 in prostate carcinoma cells. *Nature*. 393 : 83—85.

Roudabush F. L., Pierce K. L., Maudsley S., Khan K. D., Luttrell L. M. 2000. Transactivation of the EGF receptor mediates IGF-1-stimulated shc phosphorylation and ERK1/2 activation in COS-7 cells. *J. Biol. Chem.* 275 : 22 583—22 589.

Yamauchi T., Ueki K., Tobe K., Tamemoto H., Sekine N., Wada M., Honjo M., Takahashi M., Takahashi T., Hirai H. 1997. Tyrosine phosphorylation of the EGF receptor by the kinase Jak2 is induced by growth hormone. *Nature*. 390 : 91—96.

Поступила 11 II 2008

#### INTERFERON GAMMA-INDUCED EGF RECEPTOR TRANSACTIVATION DEPENDS ON IFN $\gamma$ RECEPTOR EXPRESSION LEVEL IN EPITHELIAL CELLS

I. V. Gonchar, V. N. Dorosh, N. N. Nikolsky, E. B. Burova<sup>1</sup>

Institute of Cytology, RAS, St. Petersburg;

<sup>1</sup> e-mail: lenbur87@mail.ru

Earlier, we demonstrated transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in response to interferon gamma (IFN $\gamma$ ) in epidermal carcinoma A431 cells. It was shown that IFN $\gamma$ -induced EGFR transactivation is impossible in some cancer epithelial cells. Here, we hypothesize that IFN $\gamma$ -dependent EGFR transactivation in these cells correlates with EGFR quantity on the cell surface. To test this suggestion, a line of stably transfected HEK293 cells (HEK293 $\Delta$ 99 cells) expressing high level of mutant EGFR lacking 99 C-terminal residues has been established. HEK293 $\Delta$ 99 cells demonstrated EGFR transactivation in response to IFN $\gamma$  unlike the parent HEK293 cells, in which transactivation lacked. In HEK293 $\Delta$ 99 and A431 cells, the time courses of EGFR activation induced by IFN $\gamma$  have the same pattern. In HEK293 $\Delta$ 99 cells like A431, IFN $\gamma$ -induced EGFR transactivation requires EGFR kinase activity and occurs via autophosphorylation mechanism. Taken together, these data provide direct evidence of the dependence of IFN $\gamma$ -induced EGFR transactivation upon EGFR expression level in epithelial cells.