

ВЛИЯНИЕ ИНТЕРФЕРОНА γ НА РЕГУЛЯЦИЮ РОСТА КЛЕТОК С РАЗЛИЧНЫМ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ РЕЦЕПТОРА EGF

Е. Б. Бурова,¹ И. С. Смирнова, А. Н. Шатрова, И. В. Гончар, Н. Н. Никольский

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ *электронный адрес: lenbur87@mail.ru*

В наших предыдущих работах был обнаружен эффект IFN γ на трансактивацию рецептора EGF и зависимость этого эффекта от уровня экспрессии рецептора (Burova et al., 2007; Гончар и др., 2008). В настоящей работе провели сравнительное изучение влияния IFN γ на рост и выживаемость трансформированных клеток эпителиальной природы линий A431, HeLa и HEK293, которые экспрессируют различные количества рецептора EGF. Установили, что клетки HEK293 устойчивы к действию IFN γ , тогда как A431 и HeLa в этих условиях замедляют рост и гибнут. Ингибирование клеточного роста определяли прямым подсчетом клеток и методом МТТ. Гибель клеток определяли по окрашиванию иодидом пропидия непермеабелизованных клеток. Разницу в гибели исследованных клеток при действии IFN γ мы связываем с различным уровнем экспрессии рецептора EGF в этих клетках. Методом проточной цитофлуориметрии показали, что IFN γ вызывает изменения в распределении клеток по фазам цикла, но не приводит к возникновению блоков. На основании результатов об активации каспазы 3 в IFN γ -стимулированных клетках A431 можно заключить, что их гибель происходит апоптогическим путем с участием каспазы 3.

Ключевые слова: IFN γ , рецептор эпидермального фактора роста, апоптоз, клеточный цикл, A431, HeLa.

Принятые сокращения: EGF — эпидермальный фактор роста, IFN γ — интерферон гамма, PI — иодид пропидия, МТТ — thiazolyl blue tetrazolium bromide.

Интерферон гамма (IFN γ) способен эффективно ингибировать рост ряда модельных опухолей (Ferrantini, Belardelli, 2000; Pang et al., 2005), а также клеток различных типов, включая первичные гепатоциты (Wen et al., 1997; Ruiz-Ruiz et al., 2000; McCullough et al., 2007). Антипролиферативный эффект IFN γ тканеспецифичен и зависит от типа клеток.

В наших предыдущих работах на линиях клеток эпителиального происхождения (A431, HeLa и HEK293) было получено доказательство зависимости процесса IFN γ -индуцированной трансактивации рецептора EGF от уровня его экспрессии (Burova et al., 2007; Гончар и др., 2008). Клетки эпидермоидной карциномы человека A431, экспрессирующие более 2.5 млн молекул рецептора EGF на клетку, демонстрировали IFN γ -зависимую трансактивацию рецептора EGF. В эпителиальных опухолевых клетках другой природы — HeLa (рака шейки матки), имеющих около 50 тыс. молекул рецептора на клетку, также наблюдали IFN γ -индуцированную трансактивацию рецептора EGF, но более слабую по сравнению с клетками A431. Напротив, в эпителиальных клетках почки эмбриона человека HEK293, имеющих менее 10 тыс. молекул рецептора EGF на клетку, трансактивации рецептора не обнаружили. Трансактивация рецептора EGF была ранним ответом на действие IFN γ (через 1—3 мин) и имела временный характер. Биологический эффект IFN γ , напротив, обычно проявляется через несколько суток воздействия. При этом остается неизученным вопрос о степени

корреляции выживаемости клеток в ответ на действие IFN γ и количества рецептора EGF.

Цель настоящей работы: на клетках A431, HeLa и HEK293 проверить предположение о зависимости антипролиферативного действия IFN γ от уровня экспрессии рецептора EGF, а также попытаться определить механизм реализации этого действия. В таком сравнительном аспекте исследования до сих пор не проводились, хотя известны данные об антипролиферативном действии IFN γ на клетки A431 и HeLa (Chin et al., 1997).

Материал и методика

Культивирование клеток. Использовали клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431 и эмбриональные клетки почки человека линии HEK293, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки HeLa (эпителий рака шейки матки человека) были получены из двух источников — из Российской коллекции клеточных культур (для оценки жизнеспособности клеток по методу МТТ) и от д-ра Shuh Narumiya (Kyoto University, Япония), которые использовали во всех остальных тестах. Клетки культивировали в среде DMEM (Биолот, Россия), содержащей глутамин, 10 % эмбриональной сыворотки крови (Биолот, Россия) и 40 мкг/мл гентамицина. Для кривой роста клетки сеяли на 12-луночную плату

(Nunc, Дания), снимали смесью растворов Версена и трипсина (7 : 3) через каждые 24 ч в течение 4 сут. Для каждой точки брали по 3 лунки.

Выявление апоптотических клеток. Клетки, открепившиеся от пластика и снятые с пластика смесью растворов Версена и химопсина, объединяли и помещали на покровные стекла, предварительно обработанные полилизинном (Sigma, США). Клетки фиксировали 3.7%-ным раствором формальдегида, окрашивали флуорохромом DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндола) и заключали в среду, содержащую пропиленгликоль, который предохраняет флуорохром от выгорания. Для анализа препаратов использовали флуоресцентный микроскоп Axioscope (Zeiss, Германия). Флуоресценцию DAPI возбуждали светом с длиной волны 280 нм. В каждом препарате подсчитывали не менее 500 клеток.

Распределение клеток по фазам клеточного цикла определяли методом проточной цитометрии. Перед измерением клетки инкубировали 30 мин в PBS, содержащем 0.02 % сапонина, затем трижды отмывали от сапонина при помощи PBS и инкубировали в течение 30 мин при 37 °С в PBS, содержащем 50 мкг/мл иодида пропидия (PI) и 250 мкг/мл рибонуклеазы. Количество «мертвых» клеток оценивали по окрашиванию иодидом пропидия непроницаемых клеток. Анализ клеток по фазам клеточного цикла и количество «мертвых клеток» проводили на двухлазерном проточном цитометре ATC 3000 (Brucker, Германия). В каждом эксперименте оценивали не менее 20 тыс. клеток. Данные получены с использованием программы ModFit 2.0.

Жизнеспособность клеток, выращенных на 96-луночных платах (Nunc, Дания), оценивали каждые 24 ч в течение 4 сут; для этого клетки на плате инкубировали в течение 2 ч в присутствии 50 мкл раствора МТТ (thiazolyl blue tetrazolium bromide, 0.715 мг/мл) (Sigma, США) в среде ДМЕМ с сывороткой в CO₂-инкубаторе. После инкубации среду заменяли на диметилсульфоксид (ДМСО) и измеряли оптическую плотность раствора при 570 нм на приборе UNIPLAN («Пикон», Россия). В каждом опыте использовали 5 повторов для каждой точки. Среднее значение оптической плотности нормализовали к среднему значению оптической плотности лунок в момент перед добавлением IFN γ .

Приготовление тотальных клеточных лизатов. После окончания инкубации клеток с IFN γ все дальнейшие процедуры проводили при 4 °С. Клетки промывали 3 раза раствором PBS, содержащим 5 мМ NaF и 1 мМ Na₃VO₄. Для приготовления тотального лизата использовали лизирующий буфер, содержащий 50 мМ Трис-НСl (рН 7.5), 150 мМ NaCl, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 1 мМ ЭДТА, 0.5 мМ PMSF, по 1 мкг/мл лейпептина, апротинина и пепстатина, 10 % глицерина и 1 % Тритона X-100. Приготовление клеточных лизатов, электрофорез в полиакриламидном геле, электроперенос на нитроцеллюлозную мембрану, иммуноокрашивание белков и их детекцию при помощи метода ECL проводили, как описано ранее (Бурова и др., 2003).

Антитела. Для специфического выявления белков использовали поликлональные антитела против активной (расщепленной по Asp175) каспазы 3 (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1 : 1000. В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, GAR-HRP (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1 : 10 000.

В работе использовали неорганические соли производства «Вектон» (Санкт-Петербург), рекомбинантный IFN γ человека и прочие реактивы (Sigma, США).

Результаты и обсуждение

В ранних работах было показано, что действие IFN γ на клетки A431 приводит к морфологическим изменениям и гибели клеток (Chang et al., 1987), что связывалось с повышенной экспрессией рецептора EGF и ускорением терминальной дифференцировки клеток (Bernstein et al., 1988). Гибель клеток HeLa также наблюдалась при обработке IFN γ (Lizard et al., 1996; Chin et al., 1997). Мы провели сравнительное исследование роста клеток A431, HeLa и HEK293 (с разной экспрессией рецептора EGF) при действии IFN γ в течение 3 сут с использованием двух подходов: прямого подсчета клеток (для построения кривой роста) и МТТ-анализа, который позволяет оценить число жизнеспособных клеток по их суммарной митохондриальной дегидрогеназной активности. Оба использованных метода дали одинаковые результаты.

По данным МТТ-анализа, IFN γ в концентрации 100 нг/мл не вызывал изменения митохондриальной активности в клетках HEK293 по сравнению с контролем (рис. 1, б), следовательно, не изменялось число жизнеспособных клеток. Подсчет клеток показал, что в присутствии IFN γ клетки пролиферировали так же, как контрольные, при этом число их практически не уменьшалось (рис. 1, а). Таким образом, при обработке IFN γ клетки HEK293 не замедляют рост, а наоборот, демонстрируют устойчивость к действию IFN γ и продолжают пролиферировать.

При инкубации клеток A431 с IFN γ наблюдается значительное уменьшение числа клеток по сравнению с контролем (рис. 1, а), причем уменьшение прироста популяции клеток (в 2.5 раза) достигает максимального значения через 72 ч после начала инкубации. По данным МТТ-теста, IFN γ через 72 ч вызывает также и самое сильное уменьшение суммарной митохондриальной активности в клетках A431 (рис. 1, б).

У клеток HeLa мы отмечали замедление роста при действии IFN γ , но эффект был выражен немного слабее, чем у клеток A431. При сравнении кривых роста клеток A431 и HeLa видно, что через 72 ч после начала инкубации с IFN γ число клеток HeLa уменьшилось только в 1.9 раза (против 2.5 раза для A431) по сравнению с контролем (рис. 1, а). Метод МТТ выявил уменьшение суммарной митохондриальной активности в клетках HeLa после обработки IFN γ , которое было наиболее заметным через 72 ч (рис. 1, б), но менее выраженным по сравнению с A431. Очевидно, что при длительном действии IFN γ остается гораздо больше жизнеспособных клеток HeLa, чем A431. В общем, наблюдаемое уменьшение количества клеток и данные МТТ наводят на мысль о том, что ингибирование роста клеток A431 и HeLa, вызываемое IFN γ , связано с их гибелью.

Методом проточной цитофлуориметрии анализировали долю погибших клеток при действии IFN γ , которую определяли по включению PI в непроницаемые клетки. Действие IFN γ в концентрации 10 нг/мл приводит к увеличению количества клеток A431, окрашенных PI: число таких клеток возросло в 4 раза через 72 ч действия IFN γ по сравнению с контролем (рис. 2, а). Дополнительное подтверждение этого получили из анализа распределения клеток A431 по клеточному циклу (рис. 3) при дей-

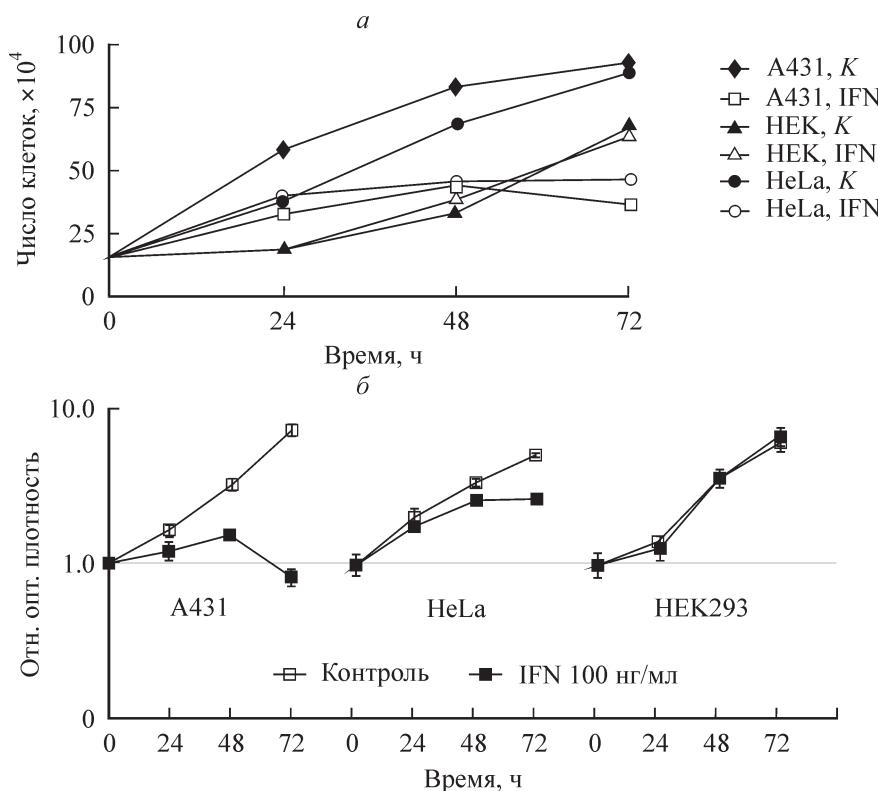


Рис. 1. Влияние $IFN\gamma$ на рост клеток линий A431, HeLa и HEK293.

Рост клеток определяли прямым подсчетом (а) или при помощи метода МТТ (б): а — клетки A431 и HEK293 обрабатывали 10 нг/мл $IFN\gamma$, а клетки HeLa — 100 нг/мл $IFN\gamma$ в течение 24, 48 и 72 ч; К — контрольные (необработанные) клетки; б — все клеточные линии обрабатывали 100 нг/мл $IFN\gamma$ и в указанные сроки добавляли реагент МТТ.

ствии $IFN\gamma$ в течение 3 сут. При этом наблюдали увеличение доли клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК в суб- G_1 . Как будет показано ниже, такое накопление связано с индукцией апоптоза. В клетках HEK293, в противоположность A431, при действии $IFN\gamma$ (10 нг/мл) доля погибших клеток практически не изменялась в течение всего срока инкубации (рис. 2, а). Таким образом, результаты МТТ-анализа и проточной цитофлуориметрии согласуются: $IFN\gamma$ -зависимая гибель наблюдалась в клетках

A431 и отсутствовала в HEK293. Очевидно, что выраженность биологического эффекта $IFN\gamma$ коррелирует с количеством рецептора EGF в этих клетках. Подтверждением этого вывода является описанное в литературе отсутствие $IFN\gamma$ -индуцируемой гибели клеток U1752, экспрессирующих небольшое количество рецептора EGF (Lombardero et al., 1992).

Усиленная гибель клеток происходила при увеличении концентрации $IFN\gamma$, что было ожидаемым резуль-

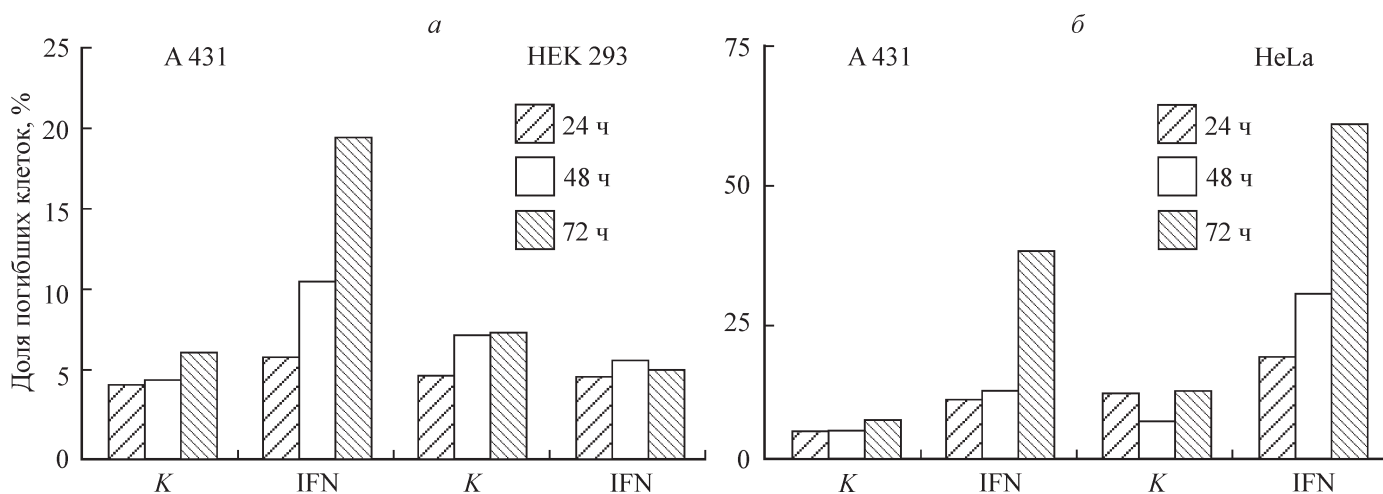


Рис. 2. Гибель клеток, индуцированная $IFN\gamma$.

а — клетки линий A431 и HEK293 обрабатывали 10 нг/мл $IFN\gamma$ в течение 24, 48 и 72 ч; б — клетки линий A431 и HeLa обрабатывали 100 нг/мл $IFN\gamma$ в течение 24, 48 и 72 ч; К — контрольные клетки. Долю погибших клеток определяли методом проточной цитофлуориметрии по включению йодида пропидия в непроницаемые клетки.

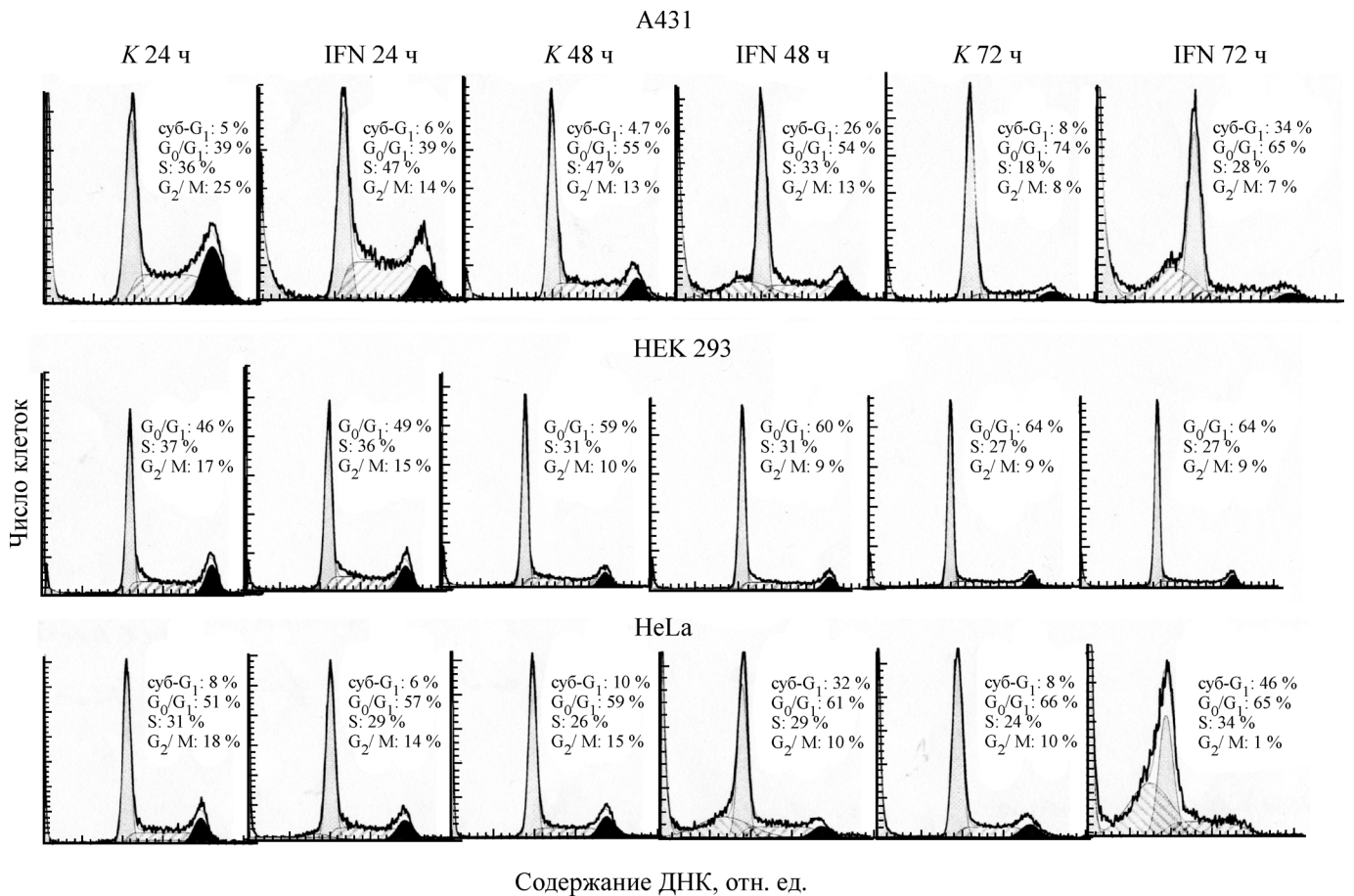


Рис. 3. Влияние IFN γ на распределение клеток линий A431, HeLa и HEK293 по фазам клеточного цикла. Данные проточной цитометрии.

Клетки A431 и HEK293 культивировали в присутствии 10 нг/мл IFN γ в течение 24, 48 и 72 ч; клетки HeLa культивировали в присутствии 100 нг/мл IFN γ в течение 24, 48 и 72 ч; K — контрольные клетки. На каждой гистограмме указаны доли диплоидных клеток в фазах клеточного цикла, а также доля гиподиплоидных клеток в суб-G₁. Представлены данные одного репрезентативного эксперимента из трех независимых.

татом: после действия IFN γ в концентрации 100 нг/мл доля погибших клеток A431 увеличилась в 7.5 раза, а клеток HeLa — в 12 раз (рис. 2, б). Отметим повышенную чувствительность этих клеток HeLa к IFN γ . Для данной линии клеток HeLa, предоставленной японскими коллегами, характерны выраженное торможение роста, как и для клеток A431 (рис. 1, а), и усиленная по сравнению с последними клеточная гибель (рис. 2, б; 3). Клетки HeLa из Российской коллекции клеточных культур, напротив, демонстрировали бóльшую устойчивость к действию IFN γ , как видно на рис. 1, б, жизнеспособность об-

работанных клеток снижалась не столь сильно, как в A431.

Механизмом суммарного антипролиферативного действия может быть гибель клеток и (или) торможение прохождения по клеточному циклу. Как видно на рис. 3, обработка IFN γ вызывает изменения в распределении клеток A431 по циклу по сравнению с контрольными клетками. Отметим, что действие IFN γ не приводит к блокам клеточного цикла на границе фаз G₁/S или G₂/M. Напротив, через 24 ч после начала воздействия увеличивается доля клеток в фазе S, где происходит синтез ДНК

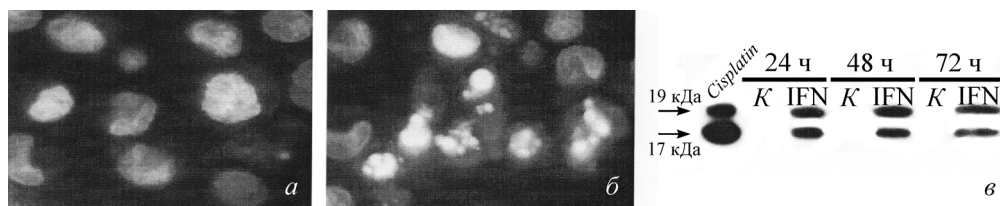


Рис. 4. Изменение морфологии ядер клеток и активация каспазы 3 в клетках A431 при действии IFN γ .

Контрольные клетки (а) и обработанные IFN γ в течение 72 ч (б) окрашивали DAPI. Морфологические изменения в ядрах клеток наблюдали с помощью флуоресцентного микроскопа Axioscope (Zeiss, Германия), об. 40 \times . в — иммуноблот; клетки обрабатывали 10 нг/мл IFN γ в течение 24, 48 и 72 ч; K — контрольные клетки. В качестве положительного контроля апоптоза использовали тотальный лизат клеток SV480, обработанных цисплатином (cisplatin) в течение 4 ч. Активную (расщепленную по Asp175) каспазу 3 в тотальных лизатах клеток выявляли, используя антитела против активной каспазы 3. Стрелками указано положение активной каспазы.

(47 % по сравнению с 36 % в контроле). Далее, через 48 и 72 ч происходит перераспределение клеток A431 из фазы S в фазы G₀/G₁ клеточного цикла, однако через 72 ч количество клеток в фазе S также остается повышенным по отношению к контролю. При этом мы наблюдали значительное увеличение доли клеток с гиподиплоидным содержанием ДНК: в суб-G₁ через 72 ч было 34 % клеток, обработанных IFN γ , против 8 % в контроле. На основании этих фактов можно предположить, что одновременно с гибелью клеток происходит ускорение движения по циклу тех клеток, которые избегают гибели. Интересно, что EGF действует на клетки A431 по-другому: наряду с апоптозом наблюдается замедление прохождения по клеточному циклу (Grudinkin et al., 2007). Суммируя полученные результаты, можно заключить, что механизмом общего антипролиферативного эффекта IFN γ в клетках A431 является индукция гибели клеток.

В клетках HEK293, как и предполагалось, при воздействии IFN γ не происходило абсолютно никаких изменений в распределении клеток по фазам цикла по сравнению с контролем (рис. 3).

Характер распределения HeLa по фазам клеточного цикла принципиально отличался от описанных выше клеточных линий. Главным образом обращает на себя внимание усиливающаяся гибель клеток после воздействия IFN γ : в суб-G₁ через 72 ч находится 46 % гиподиплоидных клеток (рис. 3). При этом доля клеток в фазе S в течение 2 сут оставалась неизменной (в отличие от A431), и только к 3-м сут, когда произошли максимальные изменения в распределении по фазам цикла, эта доля увеличилась на 10 % по сравнению с контролем. Пик G₂/M через 72 ч практически не детектировался. Следовательно, результатом действия IFN γ является ускоренное разрушение клеток HeLa с одновременным выходом их из цикла и накоплением в суб-G₁.

Наиболее распространенной формой клеточной гибели, индуцируемой лигандами клеточных рецепторов, является апоптоз (Strasser et al., 2000). На следующем этапе работы выясняли, проявляет ли IFN γ -индуцируемая гибель клеток A431 признаки апоптоза, к которым относятся уменьшение размера клеток, округление вследствие потери контактов с внеклеточным матриксом, конденсация хроматина, фрагментация ядра и расщепление многих клеточных белков. Важную роль в апоптозе играют каспазы (cysteine-dependent aspartate specific protease) (Riedl, Shi, 2004; Best, 2008). Чтобы продемонстрировать апоптотическую гибель клеток A431, использовали два подхода: окраску клеток, обработанных IFN γ , при помощи DAPI и анализ иммуноблота с использованием антител на активную каспазу 3.

В процессе культивирования клеток A431 было замечено, что при длительном действии IFN γ клетки округляются, теряя при этом характерную эпителиальную морфологию, и открепляются от подложки. Окраска ДНК клеток (как прикрепленных, так и открепившихся) с помощью DAPI позволила обнаружить апоптотические клетки с ядрами, содержащими фрагменты конденсированного хроматина (рис. 4, а, б). Напомним, при анализе клеточного цикла мы наблюдали значительное увеличение доли гиподиплоидных клеток в суб-G₁ при действии IFN γ (рис. 3), что согласуется с апоптотической гибелью, сопровождающейся фрагментацией ДНК. Тем не менее следует учитывать, что пик суб-G₁ не является решающим доказательством апоптоза.

Далее мы исследовали IFN γ -индуцированную активацию каспазы 3 в клетках A431. На рис. 4, в видно, что активная (расщепленная) каспаза 3 детектируется в иммуноблоте начиная с 24 ч после воздействия IFN γ . В качестве положительного контроля апоптоза использовали клетки SV480, обработанные цисплатином в течение 4 ч. Можно заключить, что конечным результатом действия IFN γ на клетки A431 является индукция апоптоза. Следует отметить, что наряду с каспазой 3 IFN γ -индуцированный апоптоз в клетках A431 опосредуется активностью каспазы 1 (Chin et al., 1997). Наши данные углубляют понимание апоптотического механизма гибели клеток A431 и служат доказательством апоптотической природы антипролиферативного эффекта IFN γ .

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 08-04-01186-а), программы МКБ президиума РАН и государственного контракта № 02.740.11.0094.

Список литературы

- Бурова Е. Б., Гончар И. В., Никольский Н. Н. 2003. Активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3 при окислительном стрессе в клетках A431 включает Src-зависимую трансактивацию рецептора EGF. Цитология. 45 (5) : 466—477.
- Гончар И. В., Дорош В. Н., Никольский Н. Н., Бурова Е. Б. 2008. Уровень экспрессии рецептора EGF определяет его трансактивацию при действии IFN γ в эпителиальных клетках. Цитология. 50 (10) : 887—892.
- Bernstein W., Zou Z. Q., Black R. J., Pirollo K. F., Chang E. H. 1988. Association of interferon-gamma induced growth inhibition and modulation of epidermal growth factor receptor gene expression in squamous cell carcinoma cell lines. J. Biol. Regul. Homeost. Agents. 2 : 186—192.
- Best S. M. 2008. Viral subversion of apoptotic enzymes: escape from death row. Annu. Rev. Microbiol. 62 : 171—192.
- Burova E., Vassilenko K., Dorosh V., Gonchar I., Nikolsky N. 2007. Interferon gamma-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. FEBS Lett. 581 : 1475—1480.
- Chang E. H., Ridge J., Black R., Zou Z. Q., Masnyk T., Noguchi P., Harford J. B. 1987. Interferon-gamma induces altered oncogene expression and terminal differentiation in A431 cells. Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 186 : 319—326.
- Chin Y. E., Kitagawa M., Kuida K., Flavell R. A., Fu X.-Y. 1997. Activation of the STAT signaling pathway can cause expression of caspase 1 and apoptosis. Mol. Cell. Biol. 17 : 95 328—95 337.
- Ferrantini M., Belardelli F. 2000. Gene therapy of cancer with interferon: lessons from tumor models and perspectives for clinical applications. Semin. Cancer Biol. 10 : 145—157.
- Grudinkin P. S., Zenin V. V., Kropotov A. V., Dorosh V. N., Nikolsky N. N. 2007. EGF-induced apoptosis in A431 cells is dependent on STAT1, but not on STAT3. Eur. J. Cell Biol. 86 : 591—603.
- Lizard G., Chignol M. C., Chardonnet Y., Schmitt D. 1996. Differences of reactivity to interferon gamma in HeLa and CaSki cells: a combined immunocytochemical and flow-cytometric study. J. Cancer Res. Clin. Oncol. 122 : 223—230.
- Lombardero J., Perez R., Skoog L. 1992. Synergistic inhibitory effect of gamma-interferon and EGF on A431 cells. Anticancer Res. 12 : 201—204.
- McCullough C. T., Tura B. J., Harrison D. J. 2007. c-Myc partially mediates IFN γ -induced apoptosis in the primary hepatocyte. Int. J. Exp. Pathol. 88 : 129—136.
- Pang K. R., Wu J. J., Huang D. B., Tying S. K., Baron S. 2005. Biological and clinical basis for molecular studies of interferons. Methods Mol. Med. 116 : 1—23.

Riedl S. J., Shi Y. 2004. Molecular mechanisms of caspase regulation during apoptosis. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5 : 897—907.

Ruiz-Ruiz C., Muñoz-Pinedo C., López-Rivas A. 2000. Interferon-gamma treatment elevates caspase-8 expression and sensitizes human breast tumor cells to a death receptor-induced mitochondria-operated apoptotic program. *Cancer Res.* 60 : 5673—5680.

Strasser A., O'Connor L., Dixit V. M. 2000. Apoptosis signaling. *Annu. Rev. Biochem.* 69 : 217—245.

Wen L. P., Madani K., Fahrni J. A., Duncan S. R., Rosen G. D. 1997. Dexamethasone inhibits lung epithelial cell apoptosis induced by IFN-gamma and Fas. *Amer. J. Physiol.* 273 : L921—L929.

Поступила 28 VI 2010

INTERFERON γ -MEDIATED GROWTH REGULATION OF EPITHELIAL CELLS

E. B. Burova,¹ I. S. Smirnova, A. N. Shatrova, I. V. Gonchar, N. N. Nikolsky

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: lenbur87@mail.ru

Interferon gamma (IFN γ) is known to inhibit proliferation of certain transformed cell lines. Recently, we have demonstrated the transactivation of the epidermal growth factor receptor (EGFR) in response to IFN γ (Burova et al., 2007) and provided direct evidence for the dependence of IFN γ -induced EGFR transactivation upon EGFR expression level in epithelial cells (Gonchar et al., 2008). This study examines an antiproliferative effect of IFN γ on human epithelial cells lines A431 and HeLa which express high levels of EGFR, as well as HEK293, which expresses low levels of EGFR. We characterized the IFN γ -induced changes in these cells by studying cell growth, the cell cycle and induction of apoptosis. The response to IFN γ differed in the tested cell lines: cell growth was inhibited in both A431 and HeLa cells, but not in HEK293 cells, as shown by cell counts and MTT. The cell cycle phases analyzed by flow cytometry were disturbed in A431 and HeLa cells in response to IFN γ . In contrast, IFN γ treatment did not alter distribution by cell cycle phases in HEK293. Our results indicate that IFN γ exhibit an antiproliferative effect depending on the increased expression of EGFR in A431 and HeLa cells. Further, it was demonstrated that IFN γ induced the caspase 3 activation in A431 cells, suggesting an involvement of active caspase 3 in IFN γ -induced apoptosis.

Key words: IFN γ , epidermal growth factor receptor, apoptosis, cell cycle, A431, HeLa.