

ТРАНСАКТИВАЦИЯ РЕЦЕПТОРА EGF ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ ВКЛЮЧАЕТ НВ-EGF И МЕТАЛЛОПРОТЕАЗНУЮ АКТИВНОСТЬ В КЛЕТКАХ A431

© И. С. Смирнова, И. В. Гончар, А. Н. Шатрова, Н. Н. Никольский, Е. Б. Бурова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: *lenbur87@mail.ru*

Ранее мы показали, что перекись водорода (H₂O₂) вызывает лиганднезависимую активацию (трансактивацию) рецептора EGF в различных клетках с высоким уровнем экспрессии рецептора EGF. В настоящей работе исследован механизм H₂O₂-индуцированной трансактивации рецептора EGF в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431. Продемонстрировано автофосфорилирование рецептора EGF по остаткам тирозина в положениях 1045, 1068, 1148 и 1173, а также фосфорилирование тирозина 845. Показано, что тирозиновое фосфорилирование рецептора EGF не включает в себя автофосфорилирование по тирозину 992. Блокирование функции металлопротеаз ингибитором широкого спектра действия GM6001 приводит к подавлению H₂O₂-индуцированного фосфорилирования рецептора EGF, что свидетельствует о зависимости процесса трансактивации от активности металлопротеаз. Для выяснения возможной роли агонистов рецептора EGF в его активации использовали нейтрализующие антитела против EGF-подобного фактора роста, связывающего гепарин (НВ-EGF), и TGF- α . Ингибирование фосфорилирования рецептора EGF наблюдали только в случае блокирования НВ-EGF нейтрализующими антителами. Можно сделать вывод об участии НВ-EGF в процессе трансактивации, вызванной действием H₂O₂, в клетках A431. Мы полагаем, что механизм трансактивации рецептора EGF при окислительном стрессе осуществляется через автофосфорилирование и включает в себя НВ-EGF как необходимый компонент передачи сигнала, опосредованного активностью металлопротеаз.

Ключевые слова: рецептор эпидермального фактора роста, H₂O₂, трансактивация, НВ-EGF, металлопротеазы, автофосфорилирование, клетки A431.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, EGF — эпидермальный фактор роста, H₂O₂ — перекись водорода, НВ-EGF — EGF-подобный фактор роста, связывающий гепарин, TGF- α — трансформирующий фактор роста альфа, IGF-1 — инсулиноподобный фактор роста, GPCR — рецепторы, сопряженные с G-белками.

По современным представлениям, трансактивация рецептора EGF является частью системы регуляции передачи сигналов в клетке и играет важную роль в реакции клеток на различные внешние воздействия. Трансактивацию вызывают агонисты рецепторов, сопряженных с G-белками (Gschwind et al., 2001; Fischer et al., 2003), некоторые цитокины (Yamauchi et al., 1997; Burova et al., 2007), инсулин (Lyu et al., 2006), интегрины (Moro et al., 1998), IGF-1 (Roudabush et al., 2000; Ahmad et al., 2004), эстрогены (Filaro et al., 2000) и т. д. Действие стрессовых факторов окружающей среды (УФ-излучения, осмотического или теплового шока, окислителей и др.) также приводит к трансактивации рецептора EGF (Knebel et al., 1996; Бурова и др., 2001; Maziere et al., 2003). Воздействие на клетки больших доз активных форм кислорода (АФК), в первую очередь H₂O₂, или повышенный уровень внутриклеточных АФК рассматривается как окислительный стресс. АФК активируют множество серин/треониновых и тирозиновых киназ, которые являются ключевыми регуляторными белками передающих сигнал путей, опосредующих рост клеток, апоптоз, выживание, миграцию и старение (Finkel, Holbrook, 2000; Irani, 2000). При действии H₂O₂ активируются нерецепторные киназы JAK2 и Tyk2 (Simon

et al., 1998; Abe et al., 1999; Frank et al., 2003), киназы Src-семейства (Abe et al., 1997; Griending et al., 2000) и Pyk2 (Frank et al., 2000), STAT-факторы (Simon et al., 1998; Бурова и др., 2001, 2003; Madamanchi et al., 2001), MAP-киназы ERK1,2 (Aikawa et al., 1997; Chen et al., 2001) и фосфолипаза C (Wang et al., 2001). Необходимой промежуточной стадией для инициации этих путей является лиганднезависимая активация рецепторов ростовых факторов, в частности рецептора EGF. H₂O₂ также может опосредовать передачу сигнала и трансактивацию рецептора EGF от других стимулов, таких как УФ-излучение, ангиотензин II и лизофосфатидиловая кислота (Huang et al., 1996; Cunnick et al., 1998; Peus et al., 1999; Frank et al., 2001). Большое количество экспериментальных данных, подтверждающих этот факт, позволяет рассматривать АФК как вторичные сигнальные молекулы.

Механизм трансактивации рецептора EGF в условиях окислительного стресса изучен недостаточно. H₂O₂-индуцированное фосфорилирование рецептора по тирозину может быть следствием как увеличения активности цитоплазматических тирозинкиназ Src- и JAK-семейств, так и ингибирования тирозинфосфатаз. В последнем случае АФК действуют через окисление остатков цистеина в ак-

тивных центрах фосфатаз, что приводит к ингибированию их активности и последующей активации тирозинкиназ (Sullivan et al., 1994; Knebel et al., 1996; Denu, Tanner, 1998; Lee et al., 1998). Альтернативно АФК могут активировать тирозинкиназу рецептора EGF через EGF-подобные ростовые факторы (HB-EGF, TGF- α , амфирегулин и др.) посредством расщепления их мембранно-связанных предшественников металлопротеазами (Dong et al., 1999; Frank et al., 2003). В таком случае предполагается участие аутокринной петли в активации рецептора EGF.

В настоящей работе проверяли гипотезу о вовлеченности в трансактивацию рецептора EGF механизма, включающего активацию металлопротеаз и высвобождение EGF-подобных лигандов с последующей стимуляцией рецептора, при окислительном стрессе в клетках A431.

Материал и методика

Культивирование клеток. Для изучения H_2O_2 -зависимой активации рецептора EGF были использованы клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431, полученные из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде ДМЕМ с глутамином (Биолот, Санкт-Петербург), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (Биолот, Санкт-Петербург) и 40 мкг/мл гентамицина. Для экспериментов использовали культуры, достигшие субконфлюэнтного состояния.

Стимуляция клеток. Окислительный стресс вызывали добавлением к клеткам раствора H_2O_2 (конечная концентрация 0,1, 1 или 2 мМ) в среде ДМЕМ с последующей инкубацией в течение 2, 5, 15 или 30 мин. Стимуляцию клеток EGF проводили в течение 5 мин раствором EGF (50 нг/мл) в среде ДМЕМ. При необходимости клетки предварительно обрабатывали в течение 30 мин ингибитором тирозинкиназы рецептора EGF AG1478 (5 мкМ) или ингибитором металлопротеаз широкого спектра действия GM6001 (50 мкМ) и далее стимулировали H_2O_2 (2 мМ). Клетки инкубировали в течение 1 ч с нейтрализующими антителами к HB-EGF или TGF- α в концентрациях 10 и 0,4 мкг/мл соответственно и далее стимулировали H_2O_2 (2 мМ). Стимуляцию клеток, а также обработку ингибиторами и нейтрализующими антителами проводили при 37 °C в атмосфере 5 % CO_2 .

Приготовление тотальных клеточных лизатов. После окончания инкубации все дальнейшие процедуры проводили при 4 °C. Клетки промывали 3 раза раствором PBS, содержащим 5 мМ NaF и 1 мМ Na_3VO_4 . Для приготовления тотального лизата использовали лизирующий буфер, содержащий 50 мМ Трис-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 1 мМ Na_3VO_4 , 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 детекция при помощи метода ECL были проведены, как описано ранее (Бурова и др., 2001).

Антитела. Для специфического выявления белков использовали поликлональные антитела против ERK1, 2 (Santa Cruz, США) в разведении 1 : 2000 и моноклональные антитела против фосфотирозина pY20 (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1 : 1000. В качестве вторичных антител применяли козьи антитела, вырабо-

ванные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена, GAR-HRP (Cell Signaling Technology, США) в разведении 1 : 10 000; козьи антитела, выработанные против иммуноглобулинов мыши, конъюгированные с пероксидазой хрена, и GAM-HRP (Sigma, CIF) в разведении 1 : 40 000. Для нейтрализации действия HB-EGF использовали нейтрализующие антитела, выработанные против рекомбинантного EGF-подобного фактора роста человека, связывающего гепарин (R&D Systems, Inc., США), в концентрации 10 мкг/мл, для нейтрализации действия TGF- α — антитела, выработанные против рекомбинантного TGF- α человека (R&D Systems, Inc., США), в концентрации 0,4 мкг/мл. Уровень фосфорилирования каждого остатка тирозина в положениях 845, 992, 1045, 1068, 1148 и 1173 в рецепторе EGF был определен с помощью специфических поликлональных антител (phospho EGF receptor antibody sampler kit, Cell Signaling Technology, США) в разведении 1 : 1000.

В работе использовали неорганические соли производства «Вектон» (Санкт-Петербург), ингибитор тирозинкиназы рецептора EGF тирфостин AG1478 (Sigma, США), ингибитор металлопротеаз GM6001 (Calbiochem, США), перекись водорода (Serva, Швейцария) и рекомбинантный EGF человека (PanBiotech, Австрия). Прочие реактивы были от фирмы Sigma (США).

Результаты

Роль внутренней тирозинкиназы рецептора EGF в процессе его трансактивации при действии H_2O_2 на клетки A431. Известно, что действие H_2O_2 приводит к фосфорилированию по остаткам тирозина рецептора EGF клеток разных типов (Gamou, Shimizu, 1995; Goldkorn et al., 1998; Бурова и др., 2001). Подобный эффект H_2O_2 мы наблюдали в клетках A431. Ранее нами было установлено, что степень фосфорилирования рецептора EGF максимальна через 1—5 мин воздействия H_2O_2 на клетки A431, а через 20 мин она снижается до контрольного значения (Бурова и др., 2003). Более подробное изучение динамики H_2O_2 -индуцированной активации рецептора EGF показало, что фосфорилирование рецептора сохраняется на высоком уровне в течение 15 мин после начала стимуляции и зависит от концентрации H_2O_2 (рис. 1). Специфический фармакологический ингибитор тирфостин AG1478 полностью ингибировал H_2O_2 -индуцированное фосфорилирование рецептора EGF, как видно на рис. 1. Это свидетельствует о зависимости активации рецептора EGF от активности его внутренней тирозинкиназы при окислительном стрессе в клетках A431.

Сайты H_2O_2 -индуцированного фосфорилирования рецептора EGF по тирозину в клетках A431. Механизм активации рецептора EGF при стимуляции его лигандом EGF предполагает такую последовательность событий, при которой активация внутренней тирозинкиназы рецептора влечет за собой фосфорилирование остатков тирозина в цитоплазматической части рецептора. В данной работе выявляли конкретные остатки тирозина (сайты автофосфорилирования) в рецепторе EGF, которые фосфорилируются в ответ на стимуляцию H_2O_2 . На рис. 2 представлены результаты изучения сайтов фосфорилирования при помощи антител, специфичных к фосфорилированным остаткам тирозина на С-конце рецептора EGF. В контрольных клетках на-

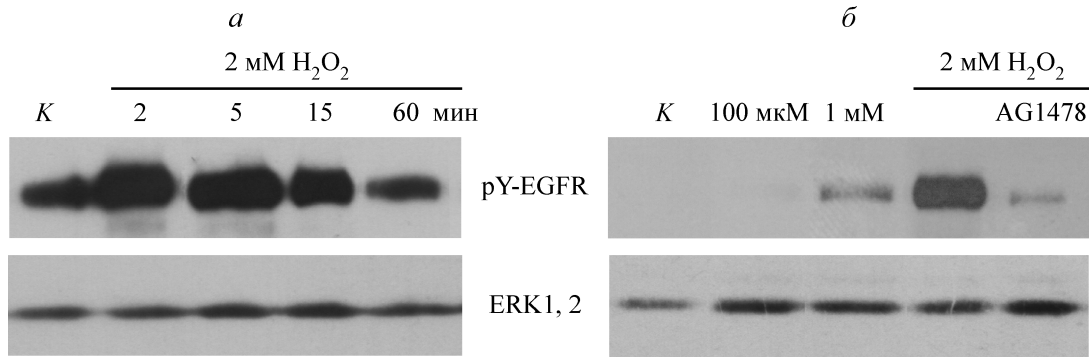


Рис. 1. H_2O_2 -индуцированное фосфорилирование по тирозину рецептора EGF в клетках A431.

а — зависимость от времени действия H_2O_2 ; клетки обрабатывали H_2O_2 в концентрации 2 мМ в течение указанного времени. *б* — действие AG1478; клетки предварительно инкубировали в течение 30 мин с ингибитором тирозинкиназы рецептора EGF AG1478 (5 мкМ) и затем стимулировали H_2O_2 (2 мМ) в течение 15 мин. В отдельном эксперименте клетки обрабатывали в течение 15 мин только H_2O_2 в концентрации 100 мкМ или 1 мМ. Иммуноблоттинг тотальных лизатов клеток проводили с применением антител против фосфотирозина (pY20) и против MAP-киназ ERK1,2. *К* — необработанные (контрольные) клетки.

блюдали небольшое базальное фосфорилирование Tyr845, 992, 1045, 1148 и 1173 и отсутствие фосфорилирования Tyr1068. Стимуляция H_2O_2 (2 мМ) в течение 2 мин приводила к заметному увеличению уровня фосфорилирования Tyr845, 1045, 1068, 1148 и 1173. Ни в одном из экспериментов не детектировалось H_2O_2 -стимулированное фосфорилирование Tyr992. Этот остаток тирозина в молекуле рецептора EGF является сайтом автофосфорилирования и отвечает за связывание с фосфолипазой C. Как и следовало ожидать, в EGF-стимулированных клетках A431 наблюдали сильные сигналы от всех тестируемых сайтов (рис. 2). Следовательно, H_2O_2 -индуцированная трансактивация рецептора EGF происходит через механизм автофосфорилирования в клетках A431, как и при действии собственного лиганда EGF.

Зависимость H_2O_2 -индуцированной трансактивации рецептора EGF от активности металлопротеаз. По современным представлениям, в процессе трансактивации, индуцированной различными стимулами, определяющую роль играют клеточные металлопротеазы (Blobel, 2005). Их активность необходима для расщепления мембранно-закоренных предшественников агонистов рецептора EGF и последующего высвобождения в межклеточное пространство. Наиболее подробно этот механизм изучен на примере трансактивации рецептора EGF, индуцированной лигандами GPCR (Ohtsu et al., 2006). Напротив, относительно невелика доля работ по исследованию роли металлопротеаз в трансактивации в условиях окислительного стресса.

Чтобы определить роль внутриклеточных металлопротеаз в высвобождении лигандов для регуляции сигналинга рецептора EGF при окислительном стрессе, клетки A431 были предварительно обработаны в течение 30 мин ингибитором металлопротеаз широкого спектра действия GM6001 (50 мкМ) и затем стимулированы H_2O_2 (2 мМ) в течение 2 мин. Известно, что металлопротеазные ингибиторы, в том числе GM6001, селективно блокируют процессинг предшественников лигандов рецептора EGF (Shah et al., 2004), что влечет за собой ингибирование активации рецептора. Как показано на рис. 3, ингибитор GM6001 эффективно подавлял H_2O_2 -индуцированное фосфорилирование рецептора EGF. Такая же картина наблюдалась и через 15 мин после воздействия H_2O_2 (рис. 3). Таким образом, очевидно, что активность металлопротеаз необходима для протеолитического расщепле-

ния предшественников лигандов рецептора EGF и в конечном счете для трансактивации рецептора EGF в ответ на стимуляцию H_2O_2 .

H_2O_2 -индуцированная трансактивация рецептора EGF определяется действием НВ-EGF, зависимым от активности металлопротеаз. Лиганды рецептора EGF, находясь в среде в свободном, растворимом состоянии, могут участвовать в аутокринной активации этого рецептора. В полной мере это относится к клеткам A431, в которых рецепторы EGF на плазматической мембране активируются аутокринным путем (Van de Vijver et al., 1991). Чтобы выяснить, какой конкретно агонист рецептора EGF опосредует его активацию при действии H_2O_2 , были использованы нейтрализующие антитела к НВ-EGF и TGF- α . Предварительная нейтрализация функции НВ-EGF соответствующими антителами вызывает существенное уменьшение уровня фосфорилирования рецептора EGF при стимуляции H_2O_2 в течение как 2, так и 15 мин (рис. 3). Нейтрализующие антитела к TGF- α не оказывали ингибирующего эффекта

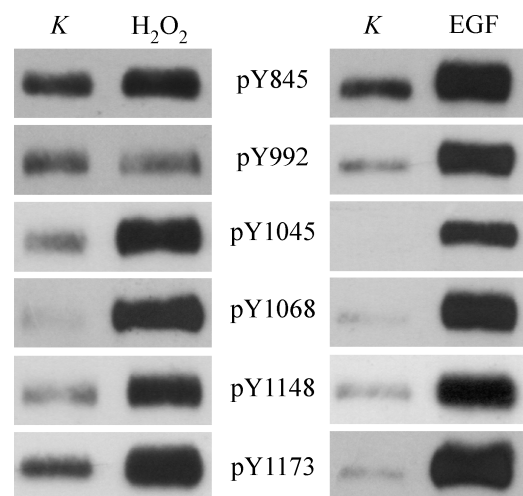


Рис. 2. Сайты фосфорилирования по тирозину рецептора EGF.

Клетки A431 обрабатывали H_2O_2 в концентрации 2 мМ в течение 2 мин или EGF (50 нг/мл) в течение 5 мин. *К* — необработанные (контрольные) клетки. Иммуноблоттинг тотальных лизатов клеток проводили с использованием антител против фосфорилированных по тирозину сайтов рецептора (phospho-EGF receptor antibody sampler kit, Cell Signaling) в положениях 845, 992, 1045, 1068, 1148 и 1173.

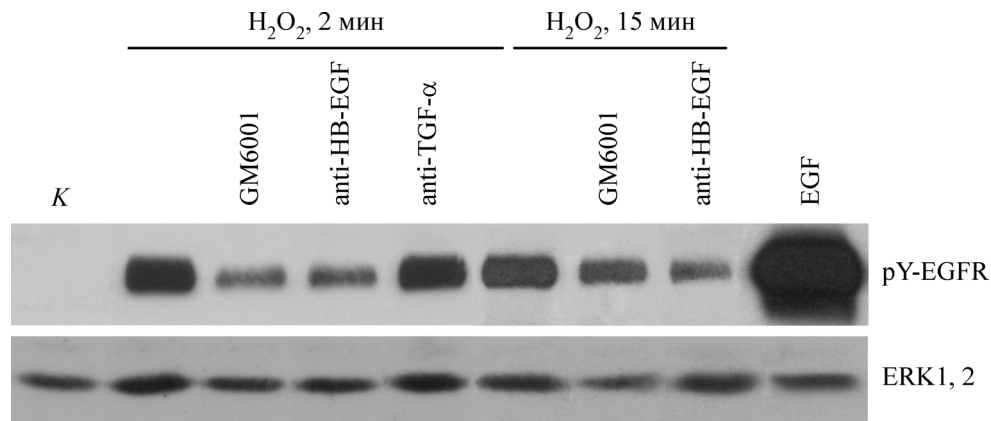


Рис. 3. Необходимость активности металлопротеаз и HB-EGF для H_2O_2 -индуцированного фосфорилирования рецептора EGF в клетках A431.

К — необработанные (контрольные) клетки. Клетки перед стимуляцией H_2O_2 (2 мМ) предварительно обрабатывали в течение 30 мин ингибитором металлопротеаз широкого спектра действия GM6001 (50 мкМ) либо в течение 1 ч нейтрализующими антителами против HB-EGF или TGF α в концентрациях 10 и 0.4 мкг/мл соответственно. В качестве контроля использовали клетки A431, стимулированные EGF (50 нг/мл, 5 мин). Иммуноблоттинг тотальных лизатов клеток проводили с помощью антител против фосфотирозина (pY20) и специфических антител против MAP-киназ ERK1,2.

на H_2O_2 -индуцированную активность рецептора EGF (рис. 3), поэтому можно полагать, что TGF α не включен в процесс трансактивации рецептора.

Поскольку мы выяснили, что активация рецептора EGF, инициированная H_2O_2 , заметно ингибировалась только нейтрализующими антителами к HB-EGF, это указывает на участие именно HB-EGF в активации рецептора. Согласно рекомендациям производителя, эти антитела обладают способностью селективно нейтрализовать биологическую активность только HB-EGF, но не EGF, TGF α или амфирегулина. Следует подчеркнуть, что выявленная нами зависимость трансактивации от активности металлопротеаз позволяет предполагать действие HB-EGF в свободном состоянии, а не в виде его предшественника, локализованного в плазматической мембране. На это обстоятельство косвенно указывает и тот факт, что коммерческие нейтрализующие антитела выработаны на целую молекулу HB-EGF, поэтому они связываются и нейтрализуют действие только того HB-EGF, который высвобождается из заякоренного состояния в мембране в результате протеолитического расщепления.

Таким образом, рассматривая в совокупности данные об ингибировании H_2O_2 -индуцированного фосфорилирования рецептора EGF при блокировании функции как HB-EGF, так и металлопротеаз, можно сделать вывод об их участии в механизме трансактивации при окислительном стрессе в клетках эпидермоидной карциномы A431.

Обсуждение

За последние годы накоплено большое количество данных, свидетельствующих о том, что как в нормальных, так и в трансформированных клетках сигнальные пути тесно взаимосвязаны с внутриклеточным редокс-состоянием. Многие компоненты сигнальных систем являются редокс-чувствительными молекулами, в том числе рецептор EGF. Точный механизм модуляции активности рецептора EGF посредством АФК до сих пор неизвестен. В данной работе проанализированы ранние сигнальные события, вызванные действием H_2O_2 в клетках эпидермоидной карциномы человека линии A431.

Ранее мы показали, что в этих клетках H_2O_2 в концентрации 1—2 мМ вызывала быстрое (за 5 мин) фосфорилирование рецептора EGF по тирозину, уровень которого уменьшался за 20 мин до контрольного значения. Использование для стимуляции высокой концентрации H_2O_2 не противоречит данным литературы, согласно которым в клетках A431 активация рецептора EGF требует более высокой концентрации H_2O_2 по сравнению с фибробластами (Simon et al., 1998). Это может указывать на более высокий уровень антиоксидантных ферментов в этих клетках, что объясняет повышенную устойчивость многих опухолевых клеток к окислительному стрессу (Porta et al., 1996). Изучение динамики H_2O_2 -индуцированной активации рецептора EGF в клетках A431 показало сохранение активирующего эффекта H_2O_2 вплоть до 15 мин, причем наблюдаемый уровень фосфорилирования рецептора зависел от концентрации H_2O_2 . В литературе отмечается пролонгированное действие H_2O_2 (до 4 ч) на клетки разных типов, но при существенно меньших концентрациях (от 1 до 200 мкМ) (Goldkorn et al., 1998) по сравнению с использованными в наших экспериментах.

В предыдущих работах мы детально исследовали роль собственной тирозинкиназы рецептора EGF в процессе его трансактивации различными агонистами, такими как IFN γ , окисленный глутатион и его фармакологический аналог Глутоксим®, в ряде клеток, экспрессирующих рецептор EGF на высоком уровне (Бурова и др., 2005; Бурова et al., 2007). Как показано в данной работе, тирозинкиназная активность рецептора EGF является необходимым условием его трансактивации также и при действии H_2O_2 в клетках A431. На основании имеющихся данных можно сделать вывод о том, что требование тирозинкиназной активности рецептора EGF для процесса его трансактивации является универсальным для разных клеток и не зависит, по-видимому, от стимула.

Воздействие H_2O_2 вызывает в клетках ряд процессов, аналогичных действию EGF: автофосфорилирование рецептора EGF, фосфорилирование SH2-содержащих субстратов (PLC γ , Shc, Grb2 и Src) и активацию Ras-зависимого сигнального пути (Rao, 1996; Aikawa et al., 1997; Goldkorn et al., 1998). В настоящее время считается общепризнанной схема, согласно которой при стимуляции

EGF происходят димеризация рецептора EGF и активация его внутренней тирозинкиназы с последующим автофосфорилированием остатков тирозина на С-конце рецептора, которые выполняют функцию сайтов ассоциации с сигнальными белками. В качестве сайтов автофосфорилирования рассматривают остатки тирозина в положениях 992, 1045, 1068, 1086, 1148 и 1173. Tyr845 в каталитическом киназном домене рецептора EGF не является сайтом автофосфорилирования. Фосфорилирование Tyr1045 отвечает за направление активированного рецептора EGF на деградацию в лизосомы через убиквитинирование рецептора. Tyr1068 является сайтом связывания транскрипционного фактора STAT3 и адаптерного белка Grb2, который образует комплекс с Shc и Sos при стимуляции не только EGF, но и H₂O₂, что ведет к активации MAP-киназного пути. Tyr1173 и Tyr1148 служат сайтами связывания адаптерного белка Shc.

Мы установили, что в ответ на действие H₂O₂ происходит фосфорилирование рецептора EGF по Tyr845 и по сайтам автофосфорилирования 1045, 1068, 1148 и 1173 (за исключением Tyr992). Напротив, стимуляция EGF, как и ожидалось, привела к автофосфорилированию всех сайтов рецептора EGF в клетках A431. Следовательно, H₂O₂ вызывает фосфорилирование рецептора EGF по основным тирозиновым сайтам, подобным тем, которые детектируются при действии EGF. Изучению специфичности фосфорилирования рецептора EGF при окислительном стрессе посвящены лишь немногочисленные работы. В эпителиальных клетках линии NA, сверхэкспрессирующих рецептор EGF, отмечалось преимущественное фосфорилирование Tyr1173, а также минорное фосфорилирование остатков тирозина в положениях 992, 1068, 1086 и 1148 при стимуляции H₂O₂ (Gamou, Shimizu, 1995). Напротив, в клетках Cos7, экспрессирующих рецептор на высоком уровне, при окислительном стрессе не наблюдали фосфорилирования Tyr1173 (Chen et al., 2001). В клетках эпидермоидной карциномы человека A431 детектировали фосфорилирование только Tyr1068 и Tyr845 при действии H₂O₂, но это не являлось предметом специального исследования (Sato et al., 2003). Эта же группа японских авторов установила, что увеличение уровня фосфорилирования Tyr845 зависит от активности киназы c-Src и является следствием прямой ассоциации c-Src и рецептора EGF в клетках A431. В свою очередь Src-катализируемое фосфорилирование рецептора по Tyr845 необходимо для регуляции сигнального пути STAT-p21^{waf1} (Sato et al., 1995a, b). Это согласуется с нашими данными, согласно которым активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3 включает Src-зависимую трансактивацию рецептора EGF при окислительном стрессе в клетках A431 (Бурова и др., 2003). Полученные данные о сайт-специфичности фосфорилирования рецептора EGF являются оригинальными и расширяют наше представление об автофосфорилировании как о необходимой стадии в механизме трансактивации рецептора EGF при окислительном стрессе в клетках A431.

Автофосфорилирование может обеспечиваться активацией рецептора EGF одним из его агонистов. Все лиганды рецептора EGF (EGF, HB-EGF, TGF- α , амфирегулин, бетацеллулин, эпирегулин и эпиген) синтезируются в клетке как мембранно-заякоренные предшественники. Как правило, они подвергаются экстраклеточному протеолитическому расщеплению металлопротеазами семейства ADAM (a disintegrin and metalloprotease) и высвобождаются в межклеточное пространство, чтобы далее активи-

ровать рецептор EGF. Протеолитическое расщепление лигандов является лимитирующей стадией, контролирующей процесс активации рецептора EGF. В литературе активно дискутируется вопрос о роли металлопротеаз в процессе GPCR-индуцированной трансактивации рецептора EGF (Blobel, 2005; Higashiyama, Nanba, 2005; Ohtsu et al., 2006). С другой стороны, мало внимания уделяется изучению механизма ADAM-зависимой трансактивации при окислительном стрессе. Нам казалось привлекательным проверить гипотезу об участии металлопротеаз в H₂O₂-индуцированной трансактивации рецептора EGF в клетках A431. Полученные результаты о подавлении тирозинового фосфорилирования рецептора ингибитором металлопротеаз GM6001 подтверждают наше предположение о зависимости трансактивации от активности металлопротеаз при окислительном стрессе. В дальнейшем необходимо будет определить специфичность металлопротеаз, вовлеченных в процесс активации рецептора, но выполнение такой задачи потребует специального комплексного исследования.

Известно, что металлопротеазы ADAM9, 10 и 17 играют ключевую роль в высвобождении всех лигандов рецептора EGF (Sahin et al., 2004). Можно предполагать участие вышеназванных протеаз также и в H₂O₂-индуцированной трансактивации рецептора EGF в клетках A431. Проблема определения специфичности и регуляции ADAM в контексте трансактивации остается по-прежнему актуальной, несмотря на значительные достижения в этой области. В общем активность металлопротеаз ADAM определяется типом клеток и зависит от стимула. При окислительном стрессе рассматривают ряд возможных механизмов активации ADAM. Во-первых, АФК могут непосредственно вызывать посттрансляционные модификации ADAM путем окисления тиольных групп цистеина в каталитическом домене, что ведет к активации латентной формы энзима. Другая возможность заключается в активации ADAM протеинкиназами PKC и Src, которые являются мишенями действия АФК. Это согласуется с данными об активации c-Src (Sato et al., 1995b) и о необходимости тирозинкиназ Src-семейства для трансактивации рецептора EGF (Бурова и др., 2003) при действии H₂O₂ на клетки A431.

На следующем этапе нашей работы логично было выяснить природу того агониста рецептора EGF, высвобождение которого из плазматической мембраны регулируется металлопротеазами и приводит в результате к активации рецептора. Сравнение ингибирующего эффекта антител, нейтрализующих HB-EGF и TGF- α , позволяет определить именно HB-EGF в качестве агониста, активирующего рецептор EGF. Такое наблюдение впервые сделано в отношении клеток A431 в условиях окислительного стресса. Поскольку HB-EGF является одним из лигандов рецептора EGF, можно предположить, что он осуществляет активацию рецептора в клетках A431 через аутокринную петлю, хотя нельзя исключить и паракринную активацию.

В предыдущих исследованиях механизма H₂O₂-индуцированной трансактивации рецептора EGF в клетках A431 мы показали, что начальные стадии передачи сигнала от H₂O₂ контролируются тирозинкиназами Src-семейства. Обобщая имеющиеся данные, можно заключить, что механизм автофосфорилирования, опосредующий трансактивацию при окислительном стрессе, обеспечивается аутокринной активацией рецептора EGF его агонистом HB-EGF при участии металлопротеаз и тирозинкиназ

Src-семейства. Мы полагаем, что такой механизм регулирует начальные этапы передачи сигнала, инициированного действием H_2O_2 , в клетках эпидермоидной карциномы A431.

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

Список литературы

- Бурова Е. Б., Василенко К. П., Антонов В. Г., Никольский Н. Н. 2005. Трансактивация рецептора эпидермального фактора роста окисленным глутатионом и его фармакологическим аналогом Глутоксим® в клетках A431. Докл. РАН. 404 (1) : 1—3.
- 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.
- Бурова Е. Б., Грудинкин П. С., Бардин А. А., Гамалей И. А., Никольский Н. Н. 2001. H_2O_2 -индуцируемая активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3: роль рецептора EGF и тирозинкиназы JAK2. Цитология. 43 (12) : 1153—1161.
- Abe J., Berk B. C. 1999. Fyn and JAK2 mediate Ras activation by reactive oxygen species. J. Biol. Chem. 274 : 21 003—21 010.
- Abe J., Takahashi M., Ishida M., Lee J. D., Berk B. C. 1997. c-Src is required for oxidative stress-mediated activation of big mitogen-activated protein kinase 1. J. Biol. Chem. 272 : 20 389—20 394.
- 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.
- Aikawa R., Komuro I., Yamazaki T., Zou Y., Kudoh S., Tanaka M., Shiojima I., Hiroi Y., Yazaki Y. 1997. Oxidative stress activates extracellular signal-regulated kinases through Src and Ras in cultured cardiac myocytes of neonatal rats. J. Clin. Invest. 100 : 1813—1821.
- Blobel C. P. 2005. ADAMs: key components in EGFR signaling and development. Nature Rev. Mol. Cell Biol. 6 : 32—43.
- Burova E., Vassilenko K., Dorosh V., Gonchar I., Nikolsky N. 2007. Interferon-gamma-dependent transactivation of EGF receptor. FEBS Lett. 581 : 1475—1480.
- Chen K., Vita J. A., Berk B. C., Keane J. F., Jr. 2001. c-Jun N-terminal kinase activation by hydrogen peroxide in endothelial cells involves Src-dependent epidermal growth factor receptor transactivation. J. Biol. Chem. 276 : 16 045—16 050.
- Cunnick J. M., Dorsey J. F., Standley T., Turkson J., Kraker A. J., Fry D. W., Jove R., Wu J. 1998. Role of tyrosine kinase activity of epidermal growth factor receptor in the lysophosphatidic acid-stimulated mitogen-activated protein kinase pathway. J. Biol. Chem. 273 : 14 468—14 475.
- Denu J. M., Tanner K. G. 1998. Specific and reversible inactivation of protein tyrosine phosphatases by hydrogen peroxide: evidence for a sulfenic acid intermediate and implications for redox regulation. Biochemistry. 37 : 5633—5642.
- Dong J., Opreko L. K., Dempsey P. J., Lauffenburger D. A., Coffey R. J., Wiley H. S. 1999. Metalloprotease-mediated ligand release regulates autocrine signaling through the epidermal growth factor receptor. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 96 : 6235—6240.
- 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.
- Finkel T., Holbrook N. J. 2000. Oxidants, oxidative stress and the biology of ageing. Nature. 408 : 239—247.
- Fischer O. M., Hart S., Gschwind A., Ullrich A. 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. Biochem. Soc. Transact. 31 : 1203—1208.
- Frank G. D., Eguchi S., Inagami T., Motley E. D. 2001. N-acetylcysteine inhibits angiotensin II-mediated activation of extracellular signal-regulated kinase and epidermal growth factor receptor. Biochem. Biophys. Res. Commun. 280 : 1116—1119.
- Frank G. D., Mifune M., Inagami T., Ohba M., Sasaki T., Higashiyama S., Dempsey P. J., Eguchi S. 2003. Distinct mechanisms of receptor and nonreceptor tyrosine kinase activation by reactive oxygen species in vascular smooth muscle cells: role of metalloprotease and protein kinase C-delta. Mol. Cell. Biol. 23 : 1581—1589.
- Frank G. D., Motley E. D., Inagami T., Eguchi S. 2000. PYK2/CAKbeta represents a redox-sensitive tyrosine kinase in vascular smooth muscle cells. Biochem. Biophys. Res. Commun. 270 : 761—765.
- Gamou S., Shimizu N. 1995. Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. FEBS Lett. 367 : 161—164.
- Goldkorn T., Balaban N., Matsukuma K., Chea V., Gould R., Last J., Chan C., Chavez C. 1998. EGF-receptor phosphorylation and signaling are targeted by H_2O_2 redox stress. Amer. J. Respir. Cell Mol. Biol. 19 : 786—798.
- Griendling K. K., Sorescu D., Lassegue B., Ushio-Fukai M. 2000. Modulation of protein kinase activity and gene expression by reactive oxygen species and their role in vascular physiology and pathophysiology. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 20 : 2175—2183.
- Gschwind A., Zwick E., Prenzel N., Leserer M., Ullrich A. 2001. Cell communication networks: epidermal growth factor receptor transactivation as the paradigm for interreceptor signal transmission. Oncogene. 20 : 1594—1600.
- Higashiyama S., Nanba D. 2005. ADAM-mediated ectodomain shedding of HB-EGF in receptor cross-talk. Biochim. biophys. acta. 1751 : 110—117.
- Huang R. P., Wu J. X., Fan Y., Adamson E. D. 1996. UV activates growth factor receptors via reactive oxygen intermediates. J. Cell Biol. 133 : 211—220.
- Irani K. 2000. Oxidant signaling in vascular cell growth, death, and survival: a review of the roles of reactive oxygen species in smooth muscle and endothelial cell mitogenic and apoptotic signaling. Circ. Res. 87 : 179—183.
- Knebel X., Rahmosdorf H. J., Ullrich A., Herrlich P. 1996. Dephosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. EMBO J. 15 : 5314—5325.
- Lee S.-R., Kwon K.-S., Kim S.-R., Rhee S. G. 1998. Reversible inactivation of protein-tyrosine phosphatase 1B in A431 cells stimulated with epidermal growth factor. J. Biol. Chem. 273 : 15 366—15 372.
- 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.
- Madamanchi N. R., Li S., Patterson C., Runge M. S. 2001. Reactive oxygen species regulate heat-shock protein 70 via the JAK/STAT pathway. Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 21 : 321—326.
- Maziere C., Floret S., Santus R., Morliere P., Marchoux 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.
- Ohtsu H., Dempsey P. J., Eguchi S. 2006. ADAMs as mediators of EGF receptor transactivation by G protein-coupled receptors. Amer. J. Physiol. Cell Physiol. 291 : C1—C10.
- Peus D., Meves A., Vasa R. A., Beyerle A., O'Brien T., Pittelkow M. R. 1999. H_2O_2 is required for UVB-induced EGF receptor and downstream signaling pathway activation. Free Radic. Biol. Med. 27 : 1197—1202.

- Porta C., Moroni M., Guallini P., Torri C., Marzatico F. 1996. Antioxidant enzymatic system and free radicals pathway in two different human cancer cell lines. *Anticancer Res.* 16 : 2741—2747.
- Rao G. N. 1996. Hydrogen peroxide induces complex formation of SHC-Grb2-SOS with receptor tyrosine kinase and activates Ras and extracellular signal-regulated protein kinases group of mitogen-activated protein kinases. *Oncogene.* 13 : 713—719.
- 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.
- Sahin U., Weskamp G., Kelly K., Zhou H.-M., Higashiyama S., Peschon J., Hartmann D., Saftig P., Blobel C. P. 2004. Distinct roles for ADAM10 and ADAM17 in ectodomain shedding of six EGFR ligands. *J. Cell Biol.* 164 : 769—779.
- Sato K., Nagao T., Iwasaki T., Nishihira Y., Fukami Y. 2003. Src-dependent phosphorylation of the EGF receptor Tyr-845 mediates Stat-p21^{waf1} pathway in A431 cells. *Genes to cells.* 8 : 995—1003.
- Sato K., Sato A., Aoto M., Fukami Y. 1995a. Site-specific association of c-Src with epidermal growth factor receptor in A431 cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 210 : 844—851.
- Sato K., Sato A., Aoto M., Fukami Y. 1995b. c-Src phosphorylates epidermal growth factor receptor on tyrosine 845. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 215 : 1078—1087.
- Shah B. H., Yesilkaya A., Olivares-Reyes J. A., Chen H.-D., Hunyady L., Catt K. J. 2004. Differential pathways of angiotensin II-induced extracellularly regulated kinase 1/2 phosphorylation in specific cell types: role of heparin-binding epidermal growth factor. *Mol. Endocrinol.* 18 : 2035—2048.
- Simon A. R., Rai U., Fanburg B. L., Cochran B. H. 1998. Activation of the JAK-STAT pathway by reactive oxygen species. *Amer. J. Physiol.* 275 : 1640—1652.
- Sullivan S. G., Chiu D. T., Errasfa M., Wang J. M., Qi J. S., Stern A. 1994. Effects of H₂O₂ on protein tyrosine phosphatase activity in HER14 cells. *Free Radic. Biol. Med.* 16 : 399—403.
- Van de Vijver M. J., Kumar R., Mendelsohn J. 1991. Ligand-induced activation of A431 cell epidermal growth factor receptors occurs primarily by an autocrine pathway that acts upon receptors on the surface rather than intracellularly. *J. Biol. Chem.* 266 : 7503—7508.
- Wang X., McCullough K. D., Wang X. J., Carpenter G., Holbrook N. J. 2001. Oxidative stress-induced phospholipase C- γ 1 activation enhances cell survival. *J. Biol. Chem.* 276 : 28 364—28 371.
- 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 8 XII 2009

METALLOPROTEASE-MEDIATED HB-EGF RELEASE REGULATES EGF RECEPTOR TRANSACTIVATION IN A431 CELLS UNDER OXIDATIVE STRESS

I. S. Smirnova, I. V. Gonchar, A. N. Shatrova, N. N. Nikolsky, E. B. Burova¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: lenbur87@mail.ru

We have shown earlier that H₂O₂ induces EGF receptor transactivation in different cells overexpressing EGF receptor. Mechanism of H₂O₂-induced EGF receptor transactivation in A431 human epidermoid carcinoma cells was examined in this work. We have demonstrated autophosphorylation of Tyr1045, 1068, 1148, 1173 as well as phosphorylation of Tyr845 of EGF receptor in response to H₂O₂, as assessed by autophosphorylation specific antibody. Tyrosine phosphorylation of EGF receptor by H₂O₂ did not involve receptor autophosphorylation at Tyr992. Blocking functions of metalloproteases by broad-spectrum inhibitor GM6001 suppressed H₂O₂-induced phosphorylation of EGF receptor, suggesting dependence of the transactivation on metalloproteases activity. To elucidate the possible role of EGF receptor agonists in its activation we used HB-EGF and TGF- α neutralizing antibody. H₂O₂-induced EGF receptor phosphorylation was inhibited by HB-EGF, but not TGF- α , neutralizing antibody. Taken together, our data suggest that, in human epidermoid carcinoma A431 cells, H₂O₂ stimulates EGF receptor transactivation via metalloprotease-dependent HB-EGF release and autophosphorylation.

Key words: epidermal growth factor receptor, H₂O₂, transactivation, HB-EGF, metalloprotease, autophosphorylation, A431.