

ОКИСЛЕННЫЙ ГЛУТАТИОН ВЫЗЫВАЕТ АКТИВАЦИЮ РЕЦЕПТОРА ЭПИДЕРМАЛЬНОГО ФАКТОРА РОСТА И MAP-КИНАЗ ERK 1,2

© К. П. Василенко,^{1,*} Е. Б. Бурова,¹ В. Г. Антонов,² Н. Н. Никольский¹

¹ Институт цитологии РАН и ² Военно-медицинская академия, Санкт-Петербург;

* электронный адрес: shambala@mail.cytspb.rssi.ru

Активация рецептора эпидермального фактора роста (EGF) происходит не только при действии специфического лиганда, но и в результате активации рецепторов цитокинов, рецепторов, сопряженных с G-белками, а также при действии на клетку стрессовых факторов. Ранее нами была установлена активация рецептора EGF и транскрипционного фактора STAT3 (но не STAT1) при действии окисленного глутатиона (GSSG) и препарата глутоксим на клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431. Глутоксим® (Фарма-ВАМ, Москва) является фармакологическим синтетическим аналогом GSSG и применяется в медицине как иммуномодулятор. В настоящей работе изучена динамика активации рецептора EGF при стимуляции клеток A431 окисленным глутатионом и глутоксимом в концентрации от 0.1 до 500 мкг/мл. Обнаружено, что этот процесс имеет волнообразный характер. Установлено, что собственная тирозинкиназа рецептора EGF ответственна за фосфорилирование рецептора в ответ на действие GSSG и глутоксима. Продемонстрирована активация MAP-киназ ERK 1,2 при действии обоих препаратов на клетки линий A431 и HER14 (мышинные фибробласты NIH 3T3, трансфицированные геном рецептора EGF человека). Активация ERK 1,2 в клетках A431, стимулированных препаратами в среде культивирования, происходит позднее (через 24 ч), чем в среде с пониженным содержанием сыворотки (через 8 ч). Используя специфический ингибитор тирозинкиназы рецептора EGF тирфостин AG1478, мы доказали, что тирозинкиназная активность рецептора EGF необходима для активации ERK 1,2 при действии как GSSG, так и глутоксима.

Ключевые слова: внутриклеточная передача сигнала, рецептор эпидермального фактора роста, трансактивация, окисленный глутатион, MAP-киназы ERK 1,2, фосфорилирование по тирозину.

Принятые сокращения: АФК — активные формы кислорода, MAP-киназа — митогенактивируемые протеинкиназы, EGF — эпидермальный фактор роста, GH — гормон роста, GPCR — рецепторы, сопряженные с G-белками, GSH — восстановленный глутатион, GSSG — окисленный глутатион, STAT — signal transducer and activator of transcription.

В последние годы значительно возрос интерес к функционированию окислительно-восстановительных систем клеток, в частности к роли окисленного и восстановленного глутатиона (GSSG и GSH соответственно). Около 95 % внутриклеточного глутатиона находится в восстановленной форме. GSH является важнейшим внутриклеточным антиоксидантом и способен к регуляторному S-глутатионированию белков (Pompella et al., 2003). О роли как внутриклеточного, так и внеклеточного GSSG известно немного. Продемонстрировано, что GSSG изменяет активность ряда очищенных ферментов, таких как карбоангидраза III (Cabiscol, Levine, 1995), протеинкиназа C (Ward et al., 1998; Chu et al., 2003), альдозоредуктаза человека (Carpiello et al., 1996) и протеаза I типа вируса иммунодефицита человека (Davis et al., 1996). При экзогенном добавлении GSSG в высокой концентрации к клеткам лейкемии человека U937 наблюдаются даун-регуляция антиапоптотического белка Bcl-2, активация MAP-киназы p38 и последующий апоптоз с участием каспаз 3 и 9 (Filomeni et al., 2003). Следует отметить, что GSSG извне не проникает через плазматическую мембрану, и ранее не были известны рецепторные или другие мембранные мишени его действия.

Фармакологический аналог окисленного глутатиона глутоксим как иммуномодулятор широкого спектра действия стимулирует процессы костномозгового кроветворения, активирует системы фагоцитоза, в том числе в условиях иммунодефицитных состояний, способствует восстановлению уровня нейтрофилов, моноцитов, лимфоцитов в периферической крови и функциональной дееспособности тканевых макрофагов (Михайленко и др., 2003). Глутоксим применяется в комплексной фармакотерапии тяжелых форм псориаза (Новиков и др., 2003), антибиотикорезистентных форм туберкулеза (Сokolova и др., 2002), внутриклеточных инфекций половых путей, в профилактике и лечении расстройств кроветворения, сопутствующих злокачественному росту, химио- и лучевой терапии.

По современным представлениям, трансактивация (лиганднезависимая активация) рецептора EGF является частью системы регуляции передачи сигнала в клетке и играет важную роль в реакции клеток на различные внешние воздействия. Трансактивацию вызывают различные цитокины и активаторы рецепторов, сопряженных с G-белками (GPCR) (Fischer et al., 2003). К стрессовым факторам, приводящим к трансактивации, относят-

ся УФ- и гамма-излучение, осмотический и тепловой стресс, окислители и тяжелые металлы (Zwick et al., 1999; Gschwind et al., 2001). Наши недавние исследования продемонстрировали фосфорилирование рецептора EGF по тирозину при действии GSSG и глутоксима на клетки A431 (Бурова и др., 2005). При этом также была выявлена активация транскрипционного фактора STAT3, но не STAT1, однако наблюдаемая степень активации STAT3 была невелика.

В настоящей работе были изучены активация рецептора EGF при действии GSSG и глутоксима в широком диапазоне концентраций и динамика этого процесса, а также активация MAP-киназ ERK 1,2.

Материал и методика

Реактивы. В работе использовали окисленный глутатион (ICN, США), лиофилизированный глутоксим® (Фарма-ВАМ, Москва), неорганические соли («Вектон», Санкт-Петербург) и другие реактивы (Sigma, США).

Культивирование клеток. Клетки эпидермоидной карциномы человека линии A431 были получены из Российской коллекции клеточных культур (Институт цитологии РАН). Фибробласты NIH 3T3, трансфицированы полноразмерным геном рецептора EGF человека (линия HER14), любезно предоставлены проф. Дж. Шлессингером (J. Schlessinger, New York University, USA). Клетки культивировали, как описано ранее (Бурова и др., 2003). В опытах использовали культуры, достигшие субконфлюентного состояния; за 1 сут до начала эксперимента клетки обычно переводили в среду DMEM с пониженным содержанием (0.5 вместо 10.0 %) эмбриональной сыворотки — условия сывороточного голодания. В отдельном эксперименте клетки не переводили на среду с пониженным содержанием сыворотки — «сывороточные» условия.

Проведение эксперимента. Свежеприготовленные водные растворы окисленного глутатиона и глутоксима добавляли в среду для культивирования клеток при 37° С на указанное время. Специфический ингибитор тирозинкиназы рецептора EGF AG1478 (5 мкМ) добавляли в культуральную среду за 1 ч до стимуляции. Приготовление клеточных лизатов, электрофоретическое разделение, электроперенос, иммуоокрашивание белков и удаление с мембраны связавшихся антител проводили, как описано ранее (Бурова и др., 2003).

Антитела. Для специфического выявления белков на мембране использовали моноклональные антитела против рецептора EGF 2760 (Sigma, США) и поликлональные кроличьи антитела против MAP-киназ ERK 1,2 (Santa Cruz, США). Для выявления фосфорилированного рецептора EGF использовали моноклональные антитела против фосфотирозина PY20 (Sigma, США). Активированные киназы ERK 1,2 выявляли с помощью поликлональных кроличьих антител против фосфорилированных ERK 1,2 (Cell Signaling Technology, США). В качестве вторых антител при иммуноблоттинге использовали козы антитела, полученные против иммуноглобулинов кролика, сконъюгированные с пероксидазой (GAR-HRP) (Cell Signaling, США), и козы антитела, полученные против иммуноглобулинов мыши, сконъюгированные с пероксидазой (GAM-HRP) (Sigma, США).

Результаты

Мы протестировали способность GSSG и глутоксима в различных концентрациях активировать рецептор EGF. Основываясь на результатах предыдущих исследований (Бурова и др., 2005), инкубацию клеток с препаратами проводили в течение 1 ч. Как видно на рис. 1, и окисленный глутатион, и глутоксим в различных концентрациях вызывают фосфорилирование рецептора EGF по тирозину в клетках A431. Однако наибольший уровень фосфорилирования наблюдается при действии GSSG в концентрациях 1 и 100 мкг/мл, а при действии глутоксима — в концентрациях 1, 10 и 500 мкг/мл. Таким образом, оба исследованных препарата в широком диапазоне концентраций индуцируют активацию рецептора EGF, хотя степень этой активации различна у обоих препаратов в одинаковых концентрациях.

Далее исследовали динамику активации рецептора EGF при действии данных препаратов. В нашей предыдущей работе был изучен процесс активации рецептора EGF в интервале от 5 мин до 1 ч (Бурова и др., 2005). Было показано, что оба препарата вызывают фосфорилирование рецептора EGF через 5—10 мин, через 30 мин активации не наблюдается, а далее фосфорилированный рецептор обнаруживается через 1 ч после начала воздействия. В настоящей работе был исследован более длительный (до 8 ч) эффект препаратов в концентрациях 1 и 10 мкг/мл на активацию рецептора EGF (рис. 2). Оказалось, что фосфорилирование рецептора EGF, обнаруженное через 1 ч после начала воздействия того или другого препарата, наблюдается и далее — через 4 и 8 ч, и только при обработке клеток GSSG в концентрации 10 мкг/мл уровень фосфорилирования рецептора, постепенно снижаясь, исчезает через 8 ч. Основываясь на этих данных, можно говорить о длительном эффекте GSSG и глутоксима на активацию рецептора EGF в клетках A431.

Для более полного изучения путей передачи сигнала от рецептора EGF при действии данных агентов нами был выбран MAP-киназный каскад, приводящий к активации киназ ERK 1,2. Как видно на рис. 3, действие GSSG и глутоксима в тех же концентрациях и временных интервалах, как на рис. 2, вызывает фосфорилирование как ERK1, так и ERK2 в клетках A431. Аналогично динамике активации рецептора EGF в этом случае также наблюдаются две волны активации ERK 1,2, но время их появления различается. Ранняя активация ERK 1,2 наблюдается через 5—10 мин, причем при действии GSSG в обеих исследованных концентрациях она выражена слабо, тогда как при действии глутоксима имеет отчетливый характер. Через 1 и 4 ч воздействия препаратами фосфорилирование ERK 1,2 не детектируется, тогда как в это же время рецептор EGF активирован. Вторая, максимальная, волна активации ERK 1,2 наблюдается через 8 ч с начала воздействия, причем степень активации практически одинакова для обоих веществ в использованных концентрациях.

Для выявления активации сигнальных белков различными агентами традиционно используют условия сывороточного голодания клеток, т. е. предварительную длительную (в течение 10 или 24 ч) инкубацию клеток в среде с пониженным содержанием сыворотки крови (0.5 вместо 10.0 %). Это необходимо для снижения базальной активации белков различными ростовыми факторами, присутствующими в сыворотке крови, и для получения более выраженного эффекта стимуляции; при этом клетки большинства линий останавливаются в клеточном цикле.

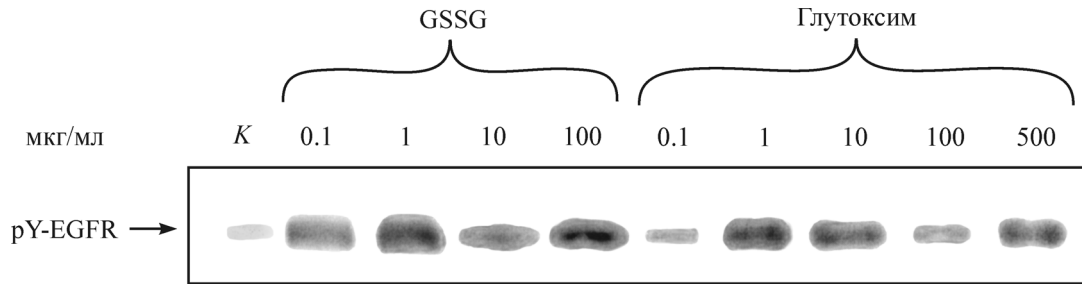


Рис. 1. Активация рецептора EGF в клетках A431 окисленным глутатионом (GSSG) или глутоксимом в различных концентрациях. Клетки обрабатывали GSSG или глутоксимом в указанных концентрациях в течение 1 ч. *K* — необработанные клетки. Иммуноблоттинг электрофоретически разделенных тотальных клеточных лизатов проводили с использованием моноклональных антител против фосфотиозина (PY20). Стрелкой указано положение фосфорилированного по тирозину рецептора EGF (pY-EGFR).

Fig. 1. EGF receptor activation depending on GSSG and glutoxim concentrations in A431 cells.

A431 cells were treated with GSSG or glutoxim at indicated concentrations for 1 h and then were lysed, as described in «Materials and Methods». *K* — control (unstimulated) cells. Immunoblot of whole cell lysates was carried out using anti-phosphotyrosine antibody (pY20, Sigma). Arrow — position phosphorylated of EGF receptor (pY-EGFR).

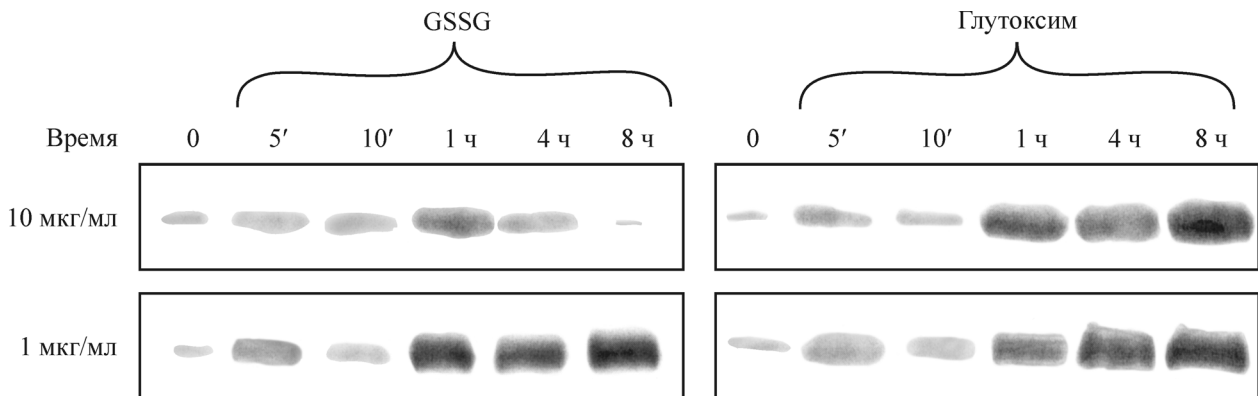


Рис. 2. Динамика фосфорилирования рецептора EGF при действии GSSG или глутоксима на клетки A431.

Клетки инкубировали с GSSG или глутоксимом в концентрации 1 или 10 мкг/мл в течение 5, 10 мин, 1, 4 или 8 ч. Условия проведения иммуноблота указаны в подписи к рис. 1.

Fig. 2. Dynamics of GSSG- and glutoxim-induced EGF receptor phosphorylation in A431 cells.

A431 cells were treated with 1 or 10 µg/ml of GSSG or glutoxim for 5 or 10 min and 1, 4 or 8 h. Immunoblot was carried out as indicated in Fig. 1.

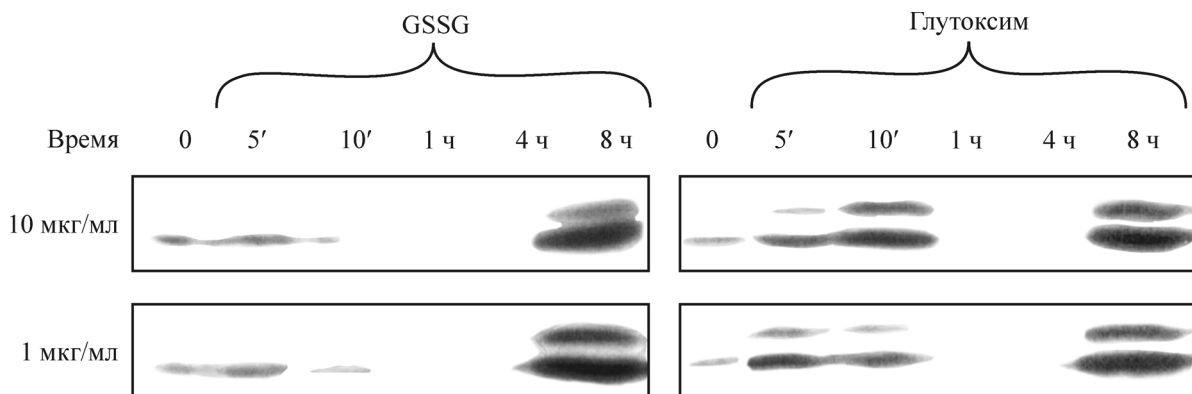


Рис. 3. Активация MAP-киназ ERK 1,2 при действии GSSG или глутоксима на клетки A431.

Условия стимуляции клеток и обозначения см. в подписи к рис. 2. Иммуноблоттинг проводили с использованием антител против фосфорилированных ERK 1,2.

Fig. 3. Effect of GSSG and glutoxim on the activation of MAP kinases ERK 1,2 in A431 cells.

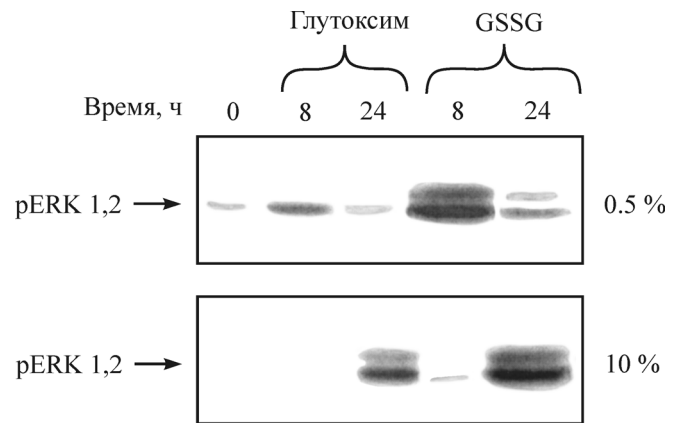
A431 cells were treated as indicated in Fig. 2. Antibodies that recognize double phosphorylated forms of ERK1 and ERK2 (Cell Signaling) were used for immunoblotting.

Рис. 4. Замедление процесса активации ERK 1,2 при действии GSSG или глутоксима на клетки A431 в среде, содержащей 10 % сыворотки.

Клетки A431, переведенные в среду с пониженным содержанием сыворотки (0.5 %, *верхняя панель*) или оставленные в нормальной среде культивирования (10 % сыворотки, *нижняя панель*), инкубировали с глутоксимом или GSSG в концентрации 100 мкг/мл в течение 8 или 24 ч. Условия проведения иммуноблоттинга указаны в подписи к рис. 3. Стрелкой указано положение фосфорилированных ERK 1,2 (pERK 1,2).

Fig. 4. Effect of a high serum concentration in cell culture medium on GSSG- and glutoxim-induced activation of ERK 1,2 in A431 cells.

A431 cells were incubated in media with a decreased (0.5 %) and a high (10 %) fetal calf serum content — top and bottom, respectively. Then A431 cells were treated with GSSG or glutoxim (100 µg/ml) for 8 or 24 h. Immunoblot was carried out as indicated in Fig. 3. Arrow — position of ERK 1,2 phosphorylated (pERK 1,2).



В настоящей работе основная часть результатов получена на клетках в условиях сывороточного голодания. Однако глутоксим как лекарственный препарат вводится пациентам парентерально, поэтому более приближенным к физиологической норме является исследование на клетках в сывороточных условиях. Мы сравнили динамику активации ERK 1,2 при действии GSSG и глутоксима на клетки в нормальных условиях и при сывороточном голодании. Оказалось, что при действии препаратов на клетки A431 в нормальных условиях активация ERK 1,2 происходит не через 8 ч, как в условиях голодания, а через 24 ч (рис. 4). На основании полученных данных можно предположить,

что в организме активация внутриклеточных сигнальных путей под действием GSSG или глутоксима происходит намного медленнее, чем в экспериментальных условиях сывороточного голодания (см. рис. 3).

Клетки эпидермоидной карциномы человека A431 являются традиционной моделью для исследований рецептора EGF, так как в них аномально высок уровень экспрессии рецептора EGF (2 млн молекул на клетку). С одной стороны, это значительно облегчает подобные исследования, с другой — создает трудности в интерпретации результатов и распространении полученных выводов на клетки других типов. Для преодоления этой проб-

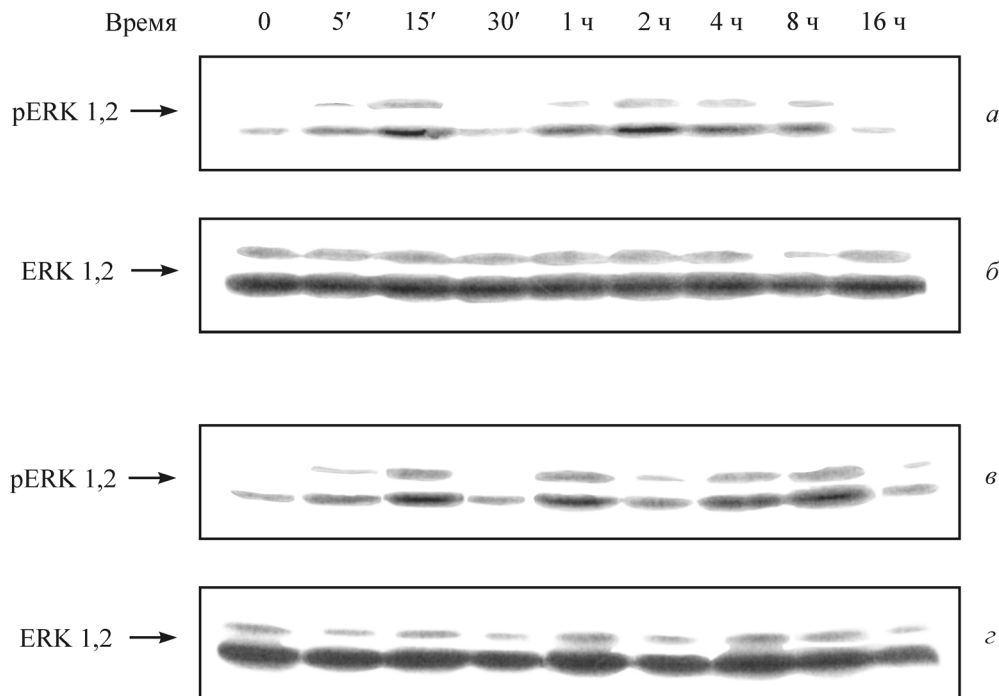


Рис. 5. Активация ERK 1,2 при действии GSSG (*a, б*) или глутоксима (*в, г*) на клетки линии HER14.

Клетки в условиях сывороточного голодания (0.5 % сыворотки) инкубировали с GSSG (*a, б*) или глутоксимом (*в, г*) в концентрации 1 мкг/мл в течение 5, 15, 30 мин, 1, 2, 4, 8 или 16 ч. Иммуноблоттинг проводили с использованием антител против фосфорилированных ERK 1,2 (*a, в*), а после удаления связавшихся антител нитроцеллюлозные мембраны повторно окрашивали антителами против ERK 1,2 (*б, г*).

Fig. 5. GSSG- and glutoxim-induced ERK 1,2, activation in HER14 cells.

HER14 cells were incubated in a medium with a decreased (0.5 %) serum content with GSSG (*a, б*) or glutoxim (*в, г*) at a concentration of 1 µg/ml for 5, 15 or 30 min and 1, 2, 4, 8 or 16 h. *a, в* — antibodies against phosphorylated ERK 1,2 were used for immunoblotting. *б, г* — after stripping, both membranes were reprobed with ERK 1,2 specific antibodies.

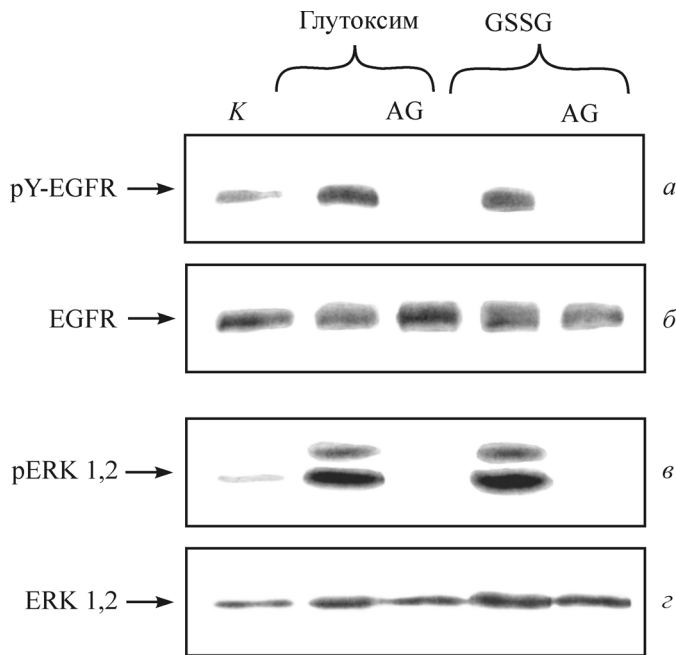


Рис. 6. Влияние ингибитора тирозинкиназы рецептора EGF на активацию рецептора EGF и ERK 1,2, вызываемую GSSG или глутоксимом.

Клетки A431 инкубировали с глутоксимом или GSSG в концентрации 1 мкг/мл в течение 5 мин или предварительно инкубировали с ингибитором тирозинкиназы рецептора EGF AG1478 (AG) в течение 1 ч с последующей стимуляцией препаратами. *К* — необработанные клетки. *а* — фосфорилированный по тирозину рецептор EGF выявляли антителами PY20; *б* — рецептор EGF выявляли моноклональными специфическими антителами 2760; *в* — иммуноблоттинг проводили антителами против фосфорилированных ERK 1,2; *г* — ERK 1,2 выявляли специфическими антителами.

Fig. 6. Inhibitor AG1478 blocks GSSG- and glutoxim-induced activation of EGF receptor and ERK 1,2 in A431 cells.

A431 cells were treated with GSSG or glutoxim (1 μg/ml) for 5 min. In some cases, as indicated, cells were pretreated with EGF receptor kinase inhibitor (tyrphostin AG1478) for 1 h. *K* — control (unstimulated) cells. *a* — phosphorylated EGF receptor was detected by immunoblotting using anti-phosphotyrosine antibody (pY20); *b* — after stripping, membrane *a* was reprobed with EGF receptor specific antibody (mAb 2760, Sigma); *v* — phosphorylated ERK 1,2 was detected by immunoblotting using specific anti-phospho ERK 1,2 antibody; *г* — after stripping, membrane *v* was reprobed with ERK 1,2 specific antibody (Santa Cruz).

лемы мы изучили динамику активации ERK 1,2 при действии GSSG и глутоксима на фибробласты NIH 3T3, трансфицированные полноразмерным геном рецептора EGF человека (линия HER14), экспрессирующие около 400 тыс. молекул рецептора. Оказалось, что GSSG в концентрации 1 мкг/мл вызывает активацию ERK 1,2 в клетках HER14 в условиях сыровоточного голодания, причем максимальная активация наблюдается через 15 мин и 2 ч после начала воздействия, а через 30 мин и 16 ч уровень фосфорилирования снижается до контрольного значения (рис. 5, *а*). Глутоксим тоже вызывает активацию ERK 1,2, но максимальная активация в отличие от действия GSSG наблюдается через 15 мин, 1 и 4—8 ч (рис. 5, *б*). Напротив, отсутствие фосфорилирования ERK 1,2 зафиксировано в то же время (30 мин и 16 ч), что и при действии GSSG. Таким образом, GSSG и глутоксим вызывают активацию ERK 1,2 не только в клетках A431, но и в клетках HER14. Этот процесс в обоих типах клеток характеризуется общими чертами: наличие короткой (минутной) и длительной (часовой) волн активации.

Для доказательства необходимости тирозинкиназной активности рецептора EGF для фосфорилирования его по тирозину, а также для активации ERK 1,2 при действии на клетки GSSG и глутоксима мы использовали специфический синтетический ингибитор тирозинкиназы рецептора EGF тирфостин AG1478. Как видно на рис. 6, *а*, действие этого ингибитора уменьшает до контрольного уровня индуцированное обоими препаратами фосфорилирование рецептора EGF по тирозину в клетках A431. Следовательно, и GSSG, и глутоксим вызывают фосфорилирование рецептора EGF по тирозину за счет его собственной тирозинкиназной активности. Предварительная обработка клеток ингибитором AG1478 также полностью блокирует вызываемую GSSG и глутоксимом активацию ERK 1,2 (рис. 6, *в*). Это означает, что в данном случае активная тирозинкиназа рецептора EGF необходима для активации ERK 1,2.

Обсуждение

Повышенный интерес к рецептору EGF в последние годы связан с открытием процесса трансактивации (лиганд-независимой активации) рецептора EGF. Было показано, что активация рецептора EGF является следствием активации специфических рецепторов цитокинов и рецепторов, сопряженных с G-белками своими лигандами (тромбин, эндотелин, бомбесин, лизофосфатидиловая кислота, ангиотензин II и др.) (Carpenter, 1999). Активация рецептора EGF также вызывается стрессовыми воздействиями (УФ- и гамма-излучение, окислители, гиперосмотический и тепловой шок, алкилирующие агенты) и мембранной деполяризацией (Gschwind et al., 2001). При этом наблюдаемая активация рецептора EGF не является побочным эффектом активации сигнальных путей, а необходима для митогенного эффекта, например, при активации GPCR (Gschwind et al., 2001; Liebmann, 2001). В результате этих исследований сложилось представление о том, что рецептор EGF занимает центральное место в интеграции множества сигналов различной природы и во многих случаях вносит решающий вклад в определение клеточной судьбы при таких воздействиях.

Механизмы трансактивации рецептора EGF, по-видимому, разнообразны, но изучены недостаточно. Показано, что в этом процессе могут участвовать фосфолипаза C, киназы Src-семейства, киназы PYK2, PKC, JAK2 и другие сигнальные белки (Gutkind, 1998; Zwick et al., 1999; Liebmann, 2001). В целом ряде случаев показан аутокринный механизм трансактивации рецептора EGF, который заключается в высвобождении с поверхности клетки лигандов рецептора EGF — HB-EGF, TGF-α и другие — при участии различных металлопротеаз семейства ADAM (Izumi et al., 1998; Gschwind et al., 2003).

В настоящем исследовании продемонстрирована активация рецептора EGF при действии на клетки A431 окисленного глутатиона и его фармакологического аналога глутоксима в широком диапазоне концентраций. Однако эта активация имеет волнообразный характер в противоположность обычно быстрой и временной активации рецептора EGF в ответ на стимуляцию его физиологическим лигандом EGF. Уровень фосфорилирования рецептора повышается в течение первых 5—10 мин после начала стимуляции GSSG или глутоксимом и остается повышенным в течение длительного времени (1—8 ч). Это также отличается от быстрой активации рецептора

EGF, индуцированной УФ-излучением, алкилирующими агентами (Knebel et al., 1996) и H_2O_2 (Бурова и др., 2003).

В настоящей работе доказано, что фосфорилирование рецептора EGF по тирозину осуществляется его собственной тирозинкиназой. Аналогичную картину мы наблюдали ранее при лиганднезависимой активации рецептора EGF в ответ на действие экзогенной H_2O_2 в клетках A431 (Бурова и др., 2003).

Установленный нами факт необходимости рецепторной тирозинкиназы для лиганднезависимой трансактивации рецептора EGF важен для понимания молекулярного механизма действия GSSG и глутоксима, который практически не изучен. Интересно отметить, что хотя GSSG и не способен проникать в клетку через мембрану, но в высокой концентрации он вызывает каким-то образом окисление белков как снаружи клетки, так и внутри (Filomeni et al., 2002). Результаты наших исследований имеют элемент новизны, поскольку анализ литературы показал отсутствие информации о воздействии этих препаратов на какие-либо конкретные белки-мишени клеточной поверхности, в том числе на рецепторные системы. Известно лишь, что GSSG в микромолярных концентрациях способен активировать выделенный рианодинный рецептор, являющийся каналом выхода Ca^{2+} и находящийся на мембране саркоплазматического ретикулума скелетных мышц (Zable et al., 1997).

Для объяснения феномена трансактивации рецептора EGF рассмотрим следующие гипотезы. Возможной причиной активации рецептора EGF является первоначальная активация какого-либо специфического для GSSG и глутоксима мембранного рецептора с последующей передачей сигнала на рецептор EGF. В этот процесс могут быть вовлечены различные цитоплазматические киназы, а также аутокринная регуляция рецептора EGF, особенно при длительных инкубациях клеток с препаратами. Нельзя исключить способность GSSG и глутоксима окислять рецептор EGF, что может приводить к димеризации последнего. Для окончательного понимания процесса трансактивации рецептора EGF, индуцированного GSSG и глутоксимом, пока недостаточно экспериментальных данных.

Активация рецептора EGF в ответ на действие GSSG и глутоксима проявляется двояким образом: во-первых, происходит фосфорилирование по определенным остаткам тирозина на С-конце рецептора, как было показано нами ранее (Бурова и др., 2005); во-вторых, трансактивированный рецептор способен передать сигнал на белки-мишени. Известно, что Ras-зависимая активация MAP-киназ ERK 1,2 происходит в клетках в ответ на действие разнообразных экстраклеточных стимулов, в том числе цитокинов, экзогенных окислителей и др. Детальное изучение механизмов действия экзогенных активных форм кислорода (АФК) позволило установить фосфорилирование остатков тирозина на рецепторе EGF (Gamou, Shimizu, 1995) с последующим связыванием фосфолипазы C_7 , адапторного белка Shc и комплекса Grb2-Sos (Rao, 1996). Следовательно, функциональная активность рецептора EGF имеет общие черты при лиганд- и АФК-зависимой активации. Можно предположить, что и в случае GSSG-индуцированной активации рецептор EGF функционирует сходным образом. Действительно, как показывают результаты нашей работы, при действии и GSSG, и глутоксима происходит активация MAP-киназ ERK 1,2, причем этот процесс имеет волнообразный характер. Использование специфического

ингибитора тирозинкиназы рецептора EGF AG1478 позволило доказать необходимость активной тирозинкиназы рецептора EGF для активации ERK 1,2. Этот факт важно подчеркнуть, поскольку известны случаи независимого от тирозинкиназной активности рецептора EGF участия этого рецептора в передаче сигнала, например, в активации ERK 1,2 при действии гормона роста (GH). Было показано *in vivo* на печени мышей и на культуре клеток печени, что связывание GH с его рецептором вызывает активацию киназы JAK2, которая далее фосфорилирует рецептор EGF по тирозину 1068 (Yamauchi et al., 1997). Это приводит к ассоциации адапторного белка Grb2 с рецептором EGF с последующей активацией киназ ERK 1,2 и индукцией экспрессии гена *c-fos*. Данная активация происходила и в случае экспрессии рецептора EGF с неактивной тирозинкиназой, но блокировалась мутацией по тирозину 1068. Это означает, что рецептор EGF служит только сайтом связывания Grb2, и его киназа не участвует в этом процессе.

В нашей предыдущей работе мы установили факт фосфорилирования рецептора EGF по нескольким сайтам, в том числе по тирозину 1068, при действии GSSG и глутоксима (Бурова и др., 2005). С этим сайтом, как известно, взаимодействуют как транскрипционный фактор STAT3, так и адапторный белок Grb2 — регулятор активации ERK 1,2. Следует отметить, что активация MAP-киназ ERK 1,2 наблюдается в большинстве случаев трансактивации рецептора EGF, что, видимо, связано с важной ролью ERK 1,2 в регуляции пролиферации и апоптоза. Так, например, уже упоминавшийся GH предотвращает апоптоз кардиомиоцитов, вызываемый окислительным стрессом, причем данный эффект обусловлен фосфорилированием рецептора EGF и последующей активацией ERK 1,2 (Gu et al., 2001).

Показано, что GSSG в высокой концентрации вызывает апоптоз в клетках U937 (Filomeni et al., 2002). После обработки клеток 1 мМ GSSG (около 600 мкг/мл) через 3 ч активируется MKK3/6, через 6 ч обнаруживается активированная MAP-киназа p38, а через 24 ч возрастает активность каспазы 3. Обработка клеток SB203580 (ингибитором MKK3/6) в 3 раза снижает токсичность GSSG для клеток. В наших исследованиях при действии как GSSG, так и глутоксима наблюдалась активация других сигнальных путей с существенно различающейся динамикой. Мы продемонстрировали активацию рецептора EGF и MAP-киназ ERK 1,2 уже через 5—10 мин после начала воздействия препаратами, причем GSSG и глутоксим оказывали эффект в достаточно низкой физиологической концентрации — 1 мкг/мл (1.5 мкМ). Данный эффект проявлялся не только на клетках линии A431, имеющих экстраординарно высокий уровень экспрессии рецептора EGF, но и на фибробластах линии HER14. Таким образом, основываясь на результатах нашего исследования, можно сделать вывод о том, что GSSG активирует не только программу реализации апоптоза, как это показано для клеток U937, но и сигнальные пути, ведущие к повышению выживаемости, пролиферации или к дифференцировке клеток. Этим могут объясняться терапевтические эффекты глутоксима, который является фармакологическим аналогом GSSG и используется в клинике как иммуномодулятор широкого спектра действия. Основываясь на полученных нами данных о способности глутоксима трансактивировать рецептор EGF, можно предположить возможность активации (или трансактивации) рецепторов цитокинов глутоксимом в клетках

разных типов, что приводит к стимуляции кроветворения и модуляции иммунной системы.

Авторы выражают благодарность проф. Дж Шлессингеру (J. Schlessinger, New York University, USA) за предоставление клеточной линии HER14.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49773), Федеральной целевой программы «ИРПНПТ» (контракт № 43.073.1.1.2507) и Программы исследований ведущих научных школ (НШ-2231.2003.4).

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 Глутоксимом® в клетках А431. Докл. РАН. 404 : 1—3.
- Бурова Е. Б., Гончар И. В., Никольский Н. Н. 2003. Активация транскрипционных факторов STAT1 и STAT3 при окислительном стрессе в клетках А431 включает Src-зависимую трансактивацию рецептора EGF. Цитология. 45 (5) : 466—477.
- Михайленко А. А., Базанов Г. А., Покоровский В. И., Коненков В. И. 2003. Профилактическая иммунология. М.; Тверь: ООО Триада. 272—278.
- Новиков А. И., Кононов А. В., Охлопков В. А., Правдина О. В., Братухина Г. Д., Городилов Р. В., Чермошеницев А. А. 2003. Эффективность Глутоксима® в комплексной терапии больных каплевидной формой псориаза. Рос. журн. кожных и венерических болезней. 1 : 38—41.
- Соколова Г. Б., Синицин М. В., Кожмякин Л. А., Перельман М. И. 2002. Глутоксим в комплексной терапии туберкулеза. Антибиотики и химиотерапия. 47 : 20—23.
- Cabiscol E., Levine R. L. 1995. Carbonic anhydrase III. J. Biol. Chem. 270 : 14 742—14 747.
- Cappiello M., Voltarelli M., Cecconi I., Vilardo P. G., Dal Monte M., Marini I. et al. 1996. Specifically targeted modification of human aldose reductase by physiological disulfides. J. Biol. Chem. 271 : 33 539—33 544.
- Carpenter G. 1999. Employment of the epidermal growth factor receptor in growth factor-independent signaling pathways. J. Cell Biol. 146 : 697—702.
- Chu F., Ward N. E., O'Brian C. A. 2003. PKC isozyme S-cysteinylation by cystine stimulates the pro-apoptotic isozyme RKCδ and inactivates the oncogenic isozyme PKCε. Carcinogenesis. 24 : 317—325.
- Davis D. A., Dorsey K., Wingfield P. T., Stahl S. J., Kaufman J., Fales H. M., Levine R. L. 1996. Regulation of HIV-1 protease activity through cysteine modification. Biochemistry. 35 : 2482—2488.
- Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. 2002. Cell signaling and the glutathione redox system. Biochem. Pharmacol. 64 : 1057—1064.

Filomeni G., Rotilio G., Ciriolo M. R. 2003. Glutathione disulfide induces apoptosis in U937 cells by a redox-mediated p38 MAP kinase pathway. FASEB J. 17 : 64—66.

Fischer O. M., Hart S., Gschwind A., Ullrich A. 2003. EGFR signal transactivation in cancer cells. Biochem. Soc. Trans. 31 : 1203—1208.

Gamou S., Shimizu N. 1995. Hydrogen peroxide preferentially enhances the tyrosine phosphorylation of epidermal growth factor receptor. FEBS Lett. 357 : 161—164.

Gschwind A., Hart S., Fischer O. M., Ullrich A. 2003. TACE cleavage of proamphiregulin regulates GPCR-induced proliferation and motility of cancer cells. EMBO J. 22 : 2411—2421.

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 transduction. Oncogene. 20 : 1594—1600.

Gu Y., Zou Y., Aikawa R., Hayashi D., Kudoh S., Yamauchi T., Uozumi H., Zhu W., Kadowaki T., Yazaki Y., Komuro I. 2001. Growth hormone signalling and apoptosis in neonatal rat cardiomyocytes. Mol. Cell. Biol. 22 : 35—46.

Gutkind J. S. 1998. Cell growth control by G protein-coupled receptors: from signal transduction to signal integration. Oncogene. 17 : 1331—1342.

Izumi Y., Hirata M., Hasuwa H., Iwamoto R., Umata T., Miyado K. et al. 1998. A metalloprotease-desintegrin, MDC9/meltrin-γ/ADAM9 and PKCδ are involved in TPA-induced ectodomain shedding of membrane-anchored heparin-binding EGF-like growth factor. EMBO J. 17 : 7260—7272.

Knebel A., Rahmsdorf H. J., Ullrich A., Herrlich P. 1996. De-phosphorylation of receptor tyrosine kinases as target of regulation by radiation, oxidants or alkylating agents. EMBO J. 15 : 5314—5325.

Liebmann C. 2001. Regulation of MAP kinase activity by peptide receptor signalling pathway: paradigms of multiplicity. Cell. Signalling. 13 : 777—785.

Pompella A., Visvikis A., Paolicchi A., De Tota V., Casini A. F. 2003. The changing faces of glutathione, a cellular protagonist. Biochem. Pharmacol. 66 : 1499—1503.

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.

Ward N. E., Pierce D. S., Chung S. E., Gravitt K. R., O'Brian C. A. 1998. Irreversible inactivation of protein kinase C by glutathione. J. Biol. Chem. 273 : 12 558—12 566.

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

Zable A. C., Favero T. G., Abramson J. J. 1997. Glutathione modulates ryanodine receptor from skeletal muscle sarcoplasmic reticulum. Evidence for redox regulation of the Ca²⁺ release mechanism. J. Biol. Chem. 272 : 7069—7077.

Zwick E., Hackel P. O., Prenzel N., Ullrich A. 1999. The EGF receptor as central transducer of heterologous signalling systems. Trends Pharmacol. Sci. 20 : 408—412.

Поступила 28 XII 2005

OXIDIZED GLUTATHIONE INDUCES ACTIVATION OF THE EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR AND EXTRACELLULAR SIGNAL-REGULATED KINASES ERK 1,2

K. P. Vasilenko,^{1,*} E. B. Burova,¹ V. G. Antonov,² N. N. Nikolsky¹

¹ Institute of Cytology RAS and ² Military Medical Academy, St. Petersburg;

* e-mail: shambala@mail.cytspb.rssi.ru

Ligand-independent activation («transactivation») of the epidermal growth factor receptor (EGFR) was demonstrated upon cell stimulation with cytokines, activators of G-protein-coupled receptors and various stressors. Recently, we showed transactivation of EGFR and activation of transcription factor STAT3, rather than

STAT1, induced by glutathione disulfide (GSSG) and glutoxim in epidermoid carcinoma A431 cells (Burova et al., Dokl. Akad. Nauk., 2005, 404 : 1—3). Glutoxim® (PHARMA-VAM, Moscow) is a pharmacological synthetic analogue of GSSG, whose therapeutic use as an immunomodulator has been permitted. In this study, we investigated dynamics of EGFR activation upon A431 cell stimulation with GSSG and glutoxim. The time course of activation has a sinuous pattern. It has been shown that the intrinsic EGFR tyrosine kinase is responsible for the receptor phosphorylation induced by GSSG and glutoxim. Here, we also demonstrated the activation of ERK 1,2 upon treatment of A431 cells and HER14 cells (HIN 3T3 fibroblasts transfected with full-length EGFR) with these drugs. ERK 1,2 activation was abolished by AG1478, a pharmacological inhibitor of EGFR tyrosine kinase, implicating intrinsic EGFR tyrosine kinase in this process.

Key words: signal transduction, epidermal growth factor receptor, transactivation, glutathione disulfide, MAP-kinase ERK 1,2, tyrosine phosphorylation.

Abbreviations: EGF — epidermal growth factor, GPCR — G protein-coupled receptor, STAT — signal transducer and activator of transcription, ERK 1,2 — extracellular signal regulated kinase 1,2, GSSG — glutathione disulfide, GSH — reduced glutathione.
