

УДК 577.2:616\_-006

## ФАКТОР РОСТА ЭПИДЕРМИСА УЧАСТВУЕТ В ПОВЫШЕНИИ ЭКСПРЕССИИ ОНКОГЕНА *URGCP* В КЛЕТКАХ ГЕПАТОМЫ ЧЕЛОВЕКА<sup>1</sup>

© 2021 г. Е. Tokay\*

Department of Molecular Biology and Genetics, Project Coordination Office, Balikesir University, Balikesir, 10145 Turkey

\*e-mail: esratokay@balikesir.edu.tr

Поступила в редакцию 01.07.2020 г.

После доработки 16.11.2020 г.

Принята к публикации 18.11.2020 г.

Гепатоцеллюлярная карцинома занимает четвертое место в структуре смертности от злокачественных опухолей в мире. Важную роль в канцерогенезе печени играет сигнальный путь рецептора фактора роста эпидермиса (EGFR). В микроокружении злокачественных опухолей печени наблюдается aberrантная экспрессия фактора роста эпидермиса (EGF). Изучена EGF-зависимая регуляция гена *URGCP* в клетках гепатомы человека (Hep3В). С помощью метода МТТ показано влияние цитокина EGF на пролиферацию клеток Hep3В. С помощью количественной ПЦР в реальном времени и вестерн-блотинга показано участие EGF в экспрессии *URGCP* на уровне мРНК и белка. Конструкциями, содержащими промоторы гена *URGCP* различной длины, транзистентно трансфицировали клетки Hep3В и определяли в них базальную активность промоторов в присутствии EGF. С целью изучения механизма EGF-опосредованной положительной регуляции гена *URGCP* проанализированы некоторые сигнальные пути. Экспрессия *URGCP* увеличивается в зависимости от концентрации EGF и времени воздействия. Опосредованное EGF повышение экспрессии *URGCP* может зависеть от *cis*-действующего элемента в промоторе этого гена (положение –344 ...–482).

**Ключевые слова:** EGF, Hep3В, *URGCP*, регуляция транскрипции

**DOI:** 10.31857/S0026898421040133

### ВВЕДЕНИЕ

Гепатоцеллюлярная карцинома (ГЦК), занимающая четвертое место в структуре смертности от злокачественных заболеваний, ежегодно диагностируется более чем у 500 000 человек во всем мире. ГЦК относится к быстрорастущим опухолям [1–3]. Факторы роста и их рецепторы играют важную роль в процессах развития тканей и заживления ран [4, 5]. Нарушение регуляции сигнальных каскадов, инициируемых факторами роста, включая каскад фактора роста эпидермиса (EGF) и его рецептора (EGFR), влияет на прогрессию многих видов рака [6, 7]. Так, сигнальные пути EGFR и Hippo вовлечены в канцерогенез ГЦК [8]. В частности, во внутрипеченочном микроокружении ГЦК наблюдается aberrантная экспрессия EGF [3, 9–11].

В ГЦК выявлена не только экспрессия генов, кодирующих EGF и EGFR, но также и сверхэкспрессия онкогена *URGCP* [12]. Сверхэкспрессия *URGCP* стимулирует экспрессию мРНК циклина D1 в клетках HepG2, тогда как сайленсинг *URGCP*, опосредованный РНК-интерференцией, приводит

к снижению экспрессии мРНК циклина D1 [13]. Кроме того, экспрессия *URGCP* повышена в опухолях различного типа, таких как рак желудка, остеосаркома, лейкоз и немелкоклеточный рак легкого [14]. Тем не менее, механизмы регуляции этого онкогена недостаточно изучены. Ранее мы сообщали, что экспрессию гена *URGCP* индуцируют цитокины TGF- $\beta$  и TNF- $\alpha$  [15, 16].

Нами изучено влияние EGF на экспрессию *URGCP* и ее транскрипционную регуляцию в клетках Hep3В. Уровни экспрессии *URGCP* определяли на уровне мРНК и белка с помощью количественной ПЦР в реальном времени и вестерн-блотинга соответственно. Четырьмя различными конструкциями, содержащими укороченные с 5'-конца промоторные области гена *URGCP*, транзистентно трансфицировали клетки Hep3В и определяли EGF-опосредованную транскрипционную активность этих конструкций. Для блокирования некоторых сигнальных каскадов и понимания механизмов регуляции экспрессии, опосредованной EGF, использовали несколько селективных ингибиторов сигнальных путей. Представленная работа может внести вклад в понимание механизма EGF-опосредованной регуляции *URGCP* при ГЦК. Данные о EGF-опосредованной регуляции

<sup>1</sup> Статья представлена на английском языке.

*URGCP* могут быть полезными для поиска новых терапевтических мишеней ГЦК.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Реактивы и материалы.** В работе использовали: рекомбинантный EGF человека фирмы “Cell Signaling Technology” (США); антитела к *URGCP* (“Abcam” (ab103323), Великобритания) и к  $\beta$ -актину (“Sigma Aldrich” (sc-81178), США); Ready-To-Glow™ Dual Secreted Reporter Assay (Cat no: 631734) приобретен у “Clontech” (США). Праймеры получены в “Macrogen” (Ю. Корея), вортманнин (ингибитор PI3K, 9951) и PD98059 (ингибитор MEK-1, 9900 S) – в “Cell Signaling Technology”. Использовали также ингибитор P38 PD169316 (P-9248) фирмы “Sigma Aldrich”; SP600125 (Sc-200635, ингибитор JNK) и ингибитор Nfkb Bay-117085 (CAS 196309-76-9) фирмы “Santa-Cruz” (США); набор для выделения РНК (Total RNA isolation Kit) компании “Fermentas” (США).

**Культура клеток.** Клеточная линия ГЦК человека (Her3В) предоставлена Dipak Ramji (Cardiff University). Клетки Her3В культивировали в модифицированной Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы, дополненной 10%-ной эмбриональной сывороткой крупного рогатого скота (“Gibco”, США) и 5 мМ глутамином (“Sigma Aldrich”) при 5% CO<sub>2</sub> и 37°C. Клетки подвергали сывороточной депривации с использованием 0.1% БСА (бычий сывороточный альбумин, “Sigma Aldrich”) в течение 1 ч до добавления EGF.

**Анализ клеточной пролиферации.** Влияние EGF на клеточную пролиферацию Her3В определяли с использованием МТТ-теста (“Sigma Aldrich”). Клетки Her3В высевали в 96-луночные планшеты (3 × 10<sup>4</sup> клеток/луночка), затем обрабатывали EGF (0, 10, 20 и 40 нг/мл) в течение 24 и 48 ч с последующей инкубацией с реагентом МТТ (20 мкл/луночка) в течение 4 ч. Оптическую плотность (OD) измеряли при 550 нм с помощью Thermo Microplate Reader [15, 17].

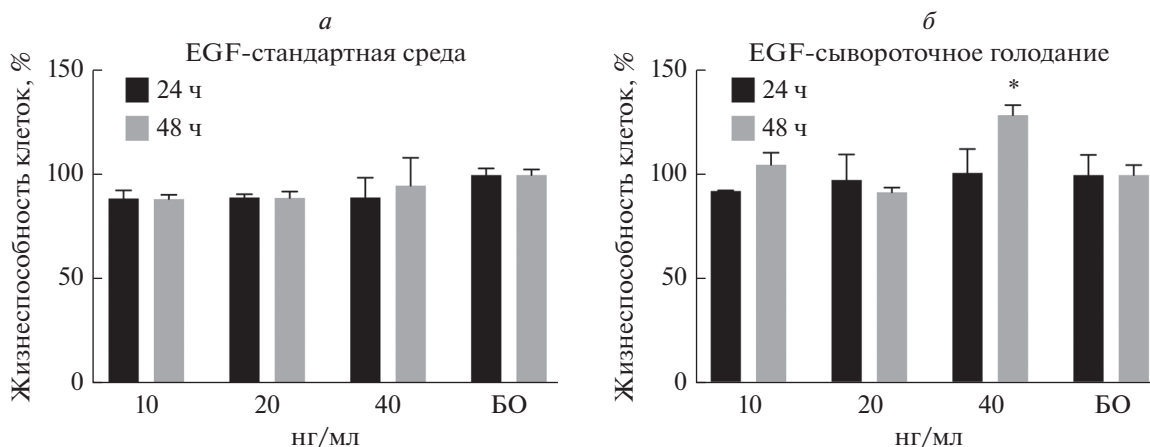
**Выделение РНК и количественная ПЦР в реальном времени.** Суммарную РНК выделяли с помощью набора GeneJET RNA purification kit (“Thermo Scientific™”, США, Cat no: K0732) и количественно определяли с помощью системы Qubit. Первую цепь кДНК синтезировали, используя 1000 нг суммарной РНК, в соответствии с протоколом для ПЦР в реальном времени (RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit, “Thermo Scientific™”, Cat no: K1622). Использовали следующие праймеры для мРНК *URGCP* (GeneBank NM\_017920) (F – CTT CAT CCT GAG TCC CTA CCG; R – GCC GTT CTG CTG CAT TCG) и  $\beta$ 2-микроглобулина человека (H $\beta$ -2F – TTT CTG GCC TGG

AGG CTA TC; H $\beta$ -2 R – CAT GTC TCG ATC CCA CTT AAC T). мРНК  $\beta$ -микроглобулина человека добавляли в каждый образец в качестве внутреннего контроля. Количественное определение генов-мишеней и референсных генов ( $\beta$ -микроглобулин человека) проводили в трех повторах с помощью прибора Light Cycler H480. ПЦР в реальном времени проводили в общем объеме 10 мкл (1 мкл кДНК, 0.5 мкл каждой пары праймеров (100 пмоль/мкл), 5 мкл Light Cycler-Fast-Start DNA Master SYBR Green I mix (“Roche”, Швейцария). Условия реакции в термоциклере включали начальную денатурацию при 95°C (3 мин), за которой следовали 35 циклов при 95°C (30 с), 55°C (30 с) и 72°C (30 с). Уровни экспрессии определяли методом  $\Delta\Delta$ CT для целевого гена [18].

**Анализ сигнальных путей.** Клетки Her3В высевали по 2 × 10<sup>6</sup> клеток/см<sup>2</sup> в культуральный флакон площадью 25 см<sup>2</sup>. Клетки подвергали сывороточному голоданию, используя БСА в конечной концентрации 0.1%, перед обработкой цитокинами и ингибиторами. Ингибиторы, включая ингибитор MAPK, Mek-1, ингибитор p38, PD169316, ингибитор JNK, SP600125 и ингибитор NF- $\kappa$ B, Bay-117085, добавляли в культуральные флаконы до конечной концентрации 10 мкМ после инкубации в течение 24 ч. Кроме того, использовали вортманнин – ингибитор PI3K, в концентрации 1 мкМ. После инкубации в течение 30 мин к клеткам добавляли цитокин EGF (40 нг/мл). Осадок клеток собирали после инкубации в течение 6 ч для выделения РНК и белка [15].

**Вестерн-блотинг.** Клетки лизировали с использованием буфера Laemmli. Вестерн-блот-анализ проводили согласно Токаю и Коскаг [15]. Концентрация антител против *URG4* составляла 1 : 100 (об./об.); загрузку образцов контролировали с использованием антител к  $\beta$ -актину в концентрации 1 : 1000 (об./об.).

**Транзистентная трансфекция промоторных конструкций.** Клетки, культивируемые во флаконах площадью 25 см<sup>2</sup>, трансфицировали четырьмя конструкциями (10 мкг), содержащими промоторные области гена *URGCP* разной длины (–109...+63/рМЕТ (P1), –261...+63/рМЕТ (P2), –344...+63/рМЕТ (P3) и –482...+63/рМЕТ (P4)), клонированные ранее в репортерный вектор рMetLuc, содержащий ген люциферазы, как описано ранее [19]. Клетки инкубировали в течение 24 ч, а затем высевали в 96-луночные планшеты (по 3 × 10<sup>4</sup> клеток на луночку). Через 24 ч в луночки добавляли EGF и ингибиторы сигнальных путей в указанных выше концентрациях. Клетки подвергали сывороточному голоданию за 1 ч до обработки EGF и ингибиторами. Для определения активности люциферазы среду удаляли после инкубации клеток в течение 6 ч. С целью контроля эффективности трансфекции клетки трансфици-



**Рис. 1.** Влияние EGF на пролиферацию клеток Her3B при нормальном содержании сыворотки (а) и в состоянии сывороточного голодания (МТТ-анализ) (б). Клетки рассевали на 96-луночные планшеты (30000 клеток/луночка). После инкубации в течение 24 ч в луночки добавляли EGF – 10, 20 и 40 нг/мл. Сывороточную депривацию с использованием 0.1% БСА проводили в течение 24 ч до добавления EGF. После инкубации в течение 24 и 48 ч измеряли поглощение при 550 нм. Представленные данные репрезентативны по трем независимым экспериментам. Показано стандартное отклонение, вычисленное по трем повторностям. Значения  $p$  получены с помощью  $t$ -теста в результате сравнения с контрольными (необработанными) клетками,  $*p < 0.05$  считали статистически значимыми. Здесь и далее БО – клетки без обработки.

ровали также контрольным вектором pMetLuc (2 мкг), экспрессирующим ген люциферазы.

**Активность репортерных конструкций.** Активность люциферазы определяли с использованием набора для анализа секретируемой люциферазы (“Clontech”, США), измерения проводили на люминометре (Fluoraskan Ascent FL, “Thermo Fisher Scientific”) в соответствии с опубликованным ранее протоколом [20]. Эксперименты повторяли не менее 3 раз.

**Статистический анализ.** Результаты выражали как среднее  $\pm$  стандартное отклонение (SD), вычисленные по трем независимым экспериментам. Статистический анализ проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prism версии 7.0 для Windows и однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

### *EGF влияет на пролиферацию клеток Her3B в зависимости от сывороточных условий*

Влияние EGF на пролиферацию клеток Her3B определяли с помощью МТТ-теста. Клетки высевали на 96-луночные планшеты. Через 24 ч добавляли EGF в конечной концентрации 10, 20 и 40 нг/мл. МТТ-анализ проводили через 24 и 48 ч. Результаты представлены на рис. 1а. Хорошо видно, что в использованных нами условиях (24 и 48 ч, нормальное содержание сыворотки) EGF не влиял на пролиферацию клеток Her3B. В случае сывороточного голодания клетки подвергали сывороточной депривации, добавляя 0.1% БСА за 1 ч

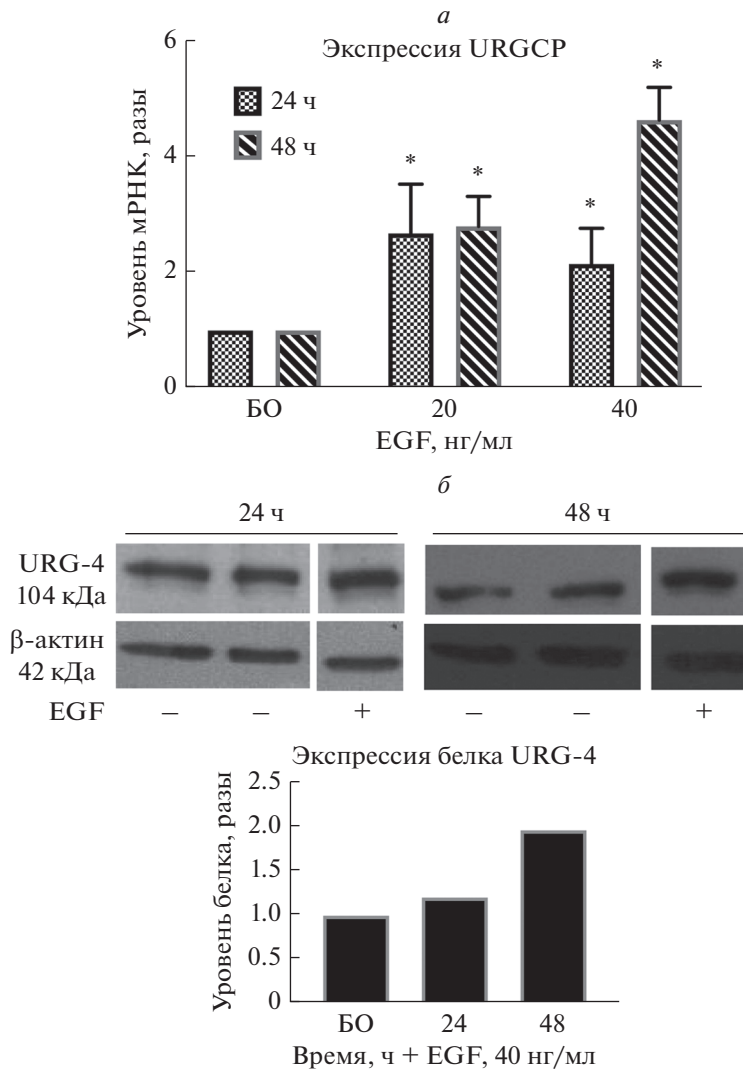
до внесения EGF. Как показано на рис. 1б, EGF в концентрации 40 нг/мл повышал пролиферацию клеток через 48 ч после обработки.

### *EGF повышает экспрессию URGCP на уровне мРНК и белка в зависимости от концентрации и времени*

Влияние EGF на экспрессию URGCP определяли на уровне мРНК и белка с использованием технологии количественной ПЦР в реальном времени и вестерн-блоттинга. Клетки высевали во флакон, а затем в условиях сывороточного голодания добавляли EGF в концентрации 20 и 40 нг/мл. Из рис. 2а видно, что обработка клеток EGF (20 нг/мл) в течение 24 и 48 ч приводила к повышению экспрессии URGCP примерно в 3 и 2.5 раза соответственно. Кроме того, через 48 ч стимулирующий эффект EGF в концентрации 40 нг/мл усиливался примерно в 4.5 раза. Стимуляцию экспрессии белка URGCP подтверждали методом вестерн-блоттинга. Обнаружено, что воздействие EGF в концентрации 40 нг/мл в течение 48 ч приводило к повышению экспрессии белка URGCP примерно в 2 раза (рис. 2б).

### *EGF-опосредованная регуляция URGCP контролируется через путь p38/MAPK*

Механизм положительной регуляции URGCP изучали с помощью анализа сигнальных путей в присутствии EGF с использованием селективных ингибиторов. Транскрипционный уровень URGCP определяли в клетках Her3B, транзientно трансфицированных Са-фосфатным методом четырь-



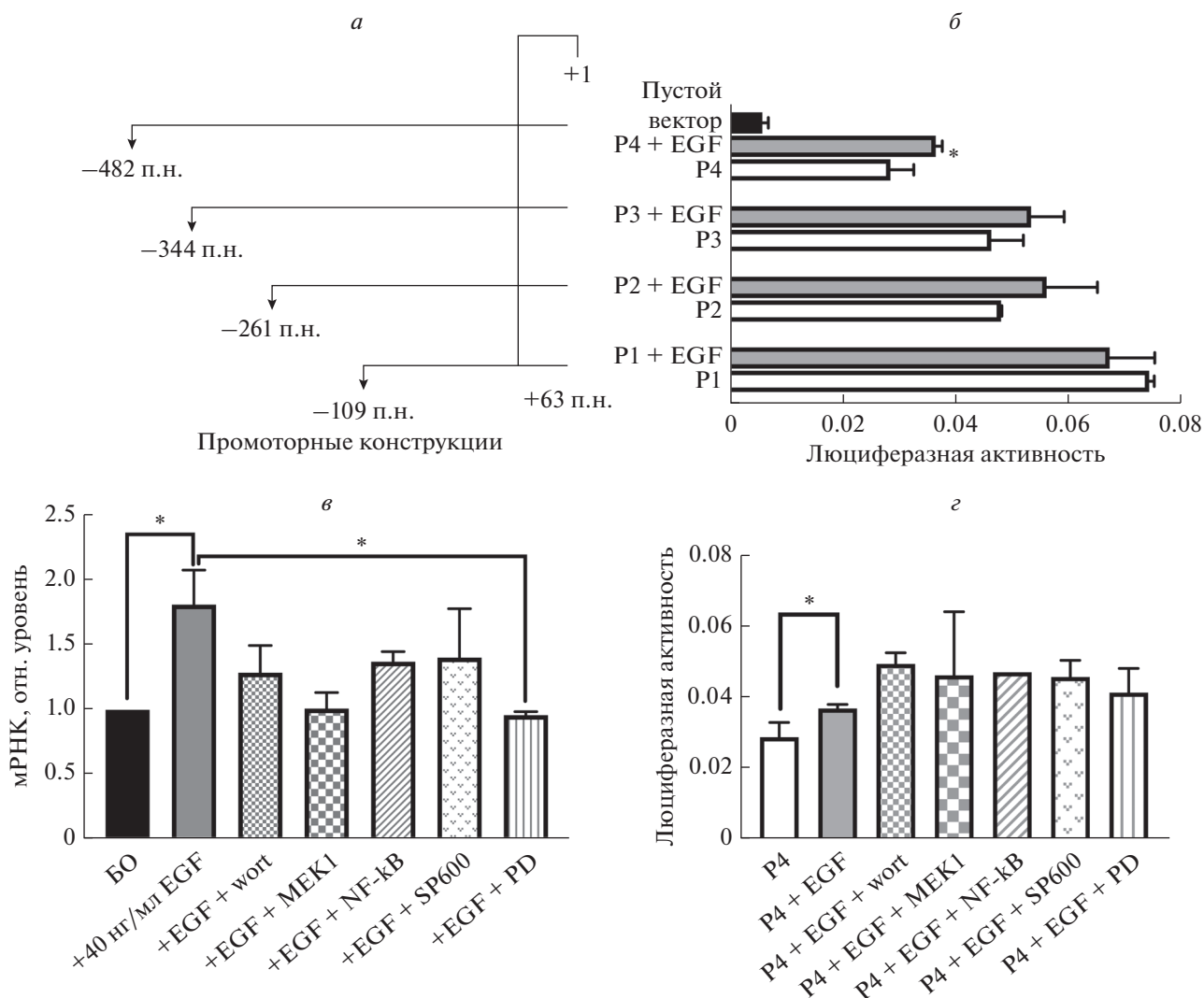
**Рис. 2.** Определение EGF-опосредованной экспрессии *URGCP* в клетках Hec3B на уровне мРНК и белка. *а* – Уровень мРНК *URGCP* определяли с помощью ПЦР в реальном времени. Гистограммы строили с помощью программы Graphpad Prism 7.0. Изменение уровня мРНК рассчитывали методом  $\Delta\Delta Ct$ . Приведены результаты, вычисленные по трем независимым репрезентативным экспериментам. Показано стандартное отклонение для трех повторов. Значения *p* получены с помощью *t*-теста. \**p* < 0.05 считали статистически значимыми. *б* – Вестерн-блот-анализ экспрессии белка *URGCP*. В качестве внутреннего контроля использовали  $\beta$ -актин. Денситометрические определения проводили с помощью программы Image J.

мя различными промоторными конструкциями гена *URGCP*. Добавляли ингибиторы и цитокин EGF и инкубировали в течение 6 ч. После этого собирали среду культивирования и определяли в ней люциферазную активность с использованием системы анализа секретируемой люциферазы. Из рис. 3б видно, что EGF значительно повышает активность промотора P4 (почти в 1.2 раза) по сравнению с его базальной активностью. Уровень мРНК определяли, проводя количественную ПЦР на кДНК-матрице из клеток, обработанных селективными ингибиторами и цитокином EGF. Из рис. 3в видно, что ингибитор PD169316 значительно снижает уровень мРНК *URGCP* в клетках, обрабо-

танных EGF. Показано также, что упомянутые ингибиторы не снижают существенно активность промотора P4 (рис. 3з). Таким образом, мы можем сделать вывод, что EGF-опосредованная экспрессия *URGCP* не регулируется участком  $-482...+63$  промотора *URGCP*.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее показали, что экспрессия EGF в ГЦК значительно выше, чем в нормальных тканях [21]. Высокий уровень экспрессии EGF способствует миграции и инвазии ряда опухолевых клеток, включая клетки ГЦК [22]. Мы проверили, может



**Рис. 3.** Влияние специфических ингибиторов сигнальных путей и цитокина EGF на уровень мРНК в клетках Hep3B и на активность промоторных конструкций. Люциферазную активность промоторных конструкций *URGCP* определяли с помощью люциметра. Ингибиторы сигнальных путей (wortманнин (wort), MEK1, NF-κB, SP600125 (SP600) и PD169316 (PD)) были добавлены к клеткам Hep3B для определения регуляторных участков промотора *URGCP*. Гистограммы строили с помощью программы Graphpad Prism 7.0. Данные репрезентативны для трех независимых экспериментов. Показано стандартное отклонение для трех повторов. \* $p < 0.05$  считали статистически значимыми.

ли стимуляция EGF влиять на экспрессию гена *URGCP* в клетках гепатомы Hep3B. Huang и Xu показали, что стимуляция клеток HepG2 и HSC-CLM3 цитокином EGF (50 и 100 нг/мл) приводит к значительному увеличению пролиферации [23]. Однако, как показано в МТТ-тесте, EGF в концентрации 20 и 40 нг/мл не подавлял пролиферацию клеток Hep3B в течение 24 и 48 ч в условиях нормального содержания сыворотки. При сывороточном голодании EGF в концентрации 40 нг/мл индуцировал пролиферацию клеток Hep3B в течение 48 ч. Эти результаты соответствуют данным [23]. Влияние EGF на пролиферацию клеток имеет временную и концентрационную зависимость.

Нас особенно интересовало, влияет ли воздействие EGF на уровни экспрессии *URGCP*, обычно повышенные в тканях ГЦК, параллельно с уровнями HBxAg (антиген вируса гепатита В) [13]. *URGCP* способствует пролиферации клеток ГЦК путем воздействия на ген циклина D1 [13]. В клетках Hep3B, подвергнутых 48-часовому воздействию EGF, уровни *URGCP* были значительно выше, чем в необработанных клетках. Реагирует ли специфический промоторный участок *URGCP* на EGF? Чтобы ответить на этот вопрос, определили транскрипционный уровень гена *URGCP*, обеспечиваемый четырьмя различными промоторными конструкциями, укороченными с 5'-конца. Значительное повышение активности промотора

P4 под действием EGF указывает на возможное присутствие в участке, охватывающем область –344...–482, сайтов связывания факторов транскрипции, активируемых воздействием EGF.

Установлено, что сигнальные пути EGFR и Hippo играют важную роль в канцерогенезе ГЦК [24]. Механизм повышения экспрессии *URGCP* под действием EGF изучали с использованием нескольких ингибиторов сигнальных путей, таких как вортманнин (ингибитор PI3K), PD98059 (ингибитор MEK-1), SP600125 (ингибитор JNK) и Bay-117085 (ингибитор NF-κB). Димеризация EGFR активировала три основных нисходящих сигнальных пути – Ras/Raf/MEK/ERK/MAPK, PI3K/АКТ (PKB) и JAK/STAT [25]. Каскады MAPK также включали киназу p38. Результаты нашей работы показывают, что EGF усиливает экспрессию *URGCP* на уровне мРНК через путь p38/MAPK. Подробно изучено, влияет ли ингибитор p38/MAPK на повышение активности промотора P4. Установлено, что люциферазная активность конструкции P4 не снижалась в присутствии PD169316 (ингибитор p38) в отличие от уровня мРНК. В этих условиях EGF-опосредованная регуляция *URGCP* не могла контролироваться использованными конструкциями. В нашей работе впервые изучено повышение транскрипции гена *URGCP*, опосредованное EGF.

Опосредованная EGF регуляция *URGCP* может быть ответственной за процесс метастазирования ГЦК. Однако для подтверждения этого предположения необходимы дополнительные исследования. Результаты нашей работы позволят лучше понять механизмы EGF-опосредованной регуляции *URGCP*.

Автор выражает глубокую благодарность Feray Köçkar, Ph.D, которая значительно помогла исследованиям своим опытом, а также Deniz Karayağmurlu, Bsc, за вклад в изучение клеточных культур.

Дизайн исследования, сбор данных, их анализ и интерпретация, подготовка рукописи и ее редактирование выполнены Esra Tokay.

Автор сообщает об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fuchs B.C., Hoshida Y., Fuji T., Wei L., Yamada S., Lauwers G.Y., McGinn C.M., DePeralta D.K., Chen X., Kuroda T., Lanuti M., Schmitt A.D., Gupta S., Crenshaw A., Onofrio R., Taylor B., Winckler W., Bardeesy N., Caravan P., Golub T.R., Tanabe K.K. (2014) Epidermal growth factor receptor inhibition attenuates liver fibrosis and development of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. **59**(4), 1577–1590.
- Huang P., Xu X., Wang L., Zhu B., Wang X., Xia J. (2014) The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.*, **18**(2), 218–230.
- Liu Z.C., Ning F., Wang H.F., Chen D.-Y., Cai Y.-N., Sheng H.-Y., Lash G.E., Liu L., Du J. (2017) Epidermal growth factor and tumor necrosis factor  $\alpha$  cooperatively promote the motility of hepatocellular carcinoma cell lines via synergistic induction of fibronectin by NF- $\kappa$ B/p65. *Biochim. Biophys. Acta Gen. Subj.* **1861**(11PtA), 2568–2582.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2017.08.010>
- Nikolova D., Chalovska V., Ivanova M.G., Nikolovska E., Volkanovska A., Orovchanec N., Kunovska S.K., Petrushevska G., Janevska V. (2018) Immunohistochemical expression of epidermal growth factor receptor in hepatocellular carcinoma. *Pril. (Makedon. Akad. Nauk Umet. Odd Med. Nauki)*. **39**(2–3), 21–28.
- Xia H., Dai X., Yu H., Zhou S., Fan Z., Wei G., Tang Q., Gong Q., Bi F. (2018) EGFR-PI3K-PDK1 pathway regulates YAP signaling in hepatocellular carcinoma: the mechanism and its implications in targeted therapy. *Cell Death Dis.* **9**(3), 269.  
<https://doi.org/10.1038/s41419-018-0302-x>
- Wang W., Ma X.P., Shi Z., Zhang P., Ding D.-L., Huang H.-X., Saiyin H.G., Chen T.Y., Lu P.-X., Wang N.-J., Yu H., Sun J., Zheng S.L., Yu L., Xu J., Jiang D.-K. (2014) Epidermal growth factor receptor pathway polymorphisms and the prognosis of hepatocellular carcinoma. *Am. J. Cancer Res.* **5**(1), 396–410.
- Chen B., Wei W., Ma L., Yang B., Gill R.M., Chua M.-S., Butte A.J., So S. (2017) Computational discovery of niclosamide ethanolamine, a repurposed drug candidate that reduces growth of hepatocellular carcinoma cells in vitro and in mice by inhibiting cell division cycle 37 signaling. *Gastroenterology*. **152**(8), 2022–2036.
- Lu W.C., Kao S.Y., Yang C.C., Tu H.-F., Wu C.-H., Chang K.-W., Lin S.-C. (2014) Affiliations expand EGF up-regulates miR-31 through the C/EBP $\beta$  signal cascade in oral carcinoma. *PLoS One*. **9**(9), e108049.
- Hung W., Yang M., Chang C., Tsai J., Chuang L. (1995) Differential regulation of EGF production, EGF receptor-binding, and cellular growth by sodiumbutyrate in hep3b and plc/prf/5 human hepatoma cells. *Intern. J. Oncology*. **7**(5), 1089–1093.
- Fan F.T., Shen C.S., Tao L., Tian C., Liu Z.-G., Zhu Z.-J., Liu Y.-P., Pei C.-S., Wu H.-Y., Zhang L., Wang A.-Y., Zheng S.-Z., Huang S.-L., Lu Y. (2014) PKM2 regulates hepatocellular carcinoma cell epithelial-mesenchymal transition and migration upon EGFR activation. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**(5), 1961–1970.
- Yan F., Bai L.P., Gao H., Zhu C.-M., Lin L., Kang X.-P. (2014) EGF reverses multi-drug resistance via the p-ERK pathway in HepG2/ADM and SMMC7721/ADM hepatocellular carcinoma models. *Asian Pac. J. Cancer Prev.* **15**(6), 2619–2623.
- Tufan N.L., Lian Z., Liu J., Pan J., Arbuthnot P., Kew M., Clayton M.M., Zhu M., Feitelson M.A. (2002) Hepatitis Bx antigen stimulates expression of a novel cellular gene, URG4, that promotes hepatocellular growth and survival. *Neoplasia*. **4**(4), 355–368.
- Satiroglu-Tufan N.L., Dodurga Y., Gok D., Cetinkaya A., Feitelson M.A. (2010) RNA interference-mediated URG4 gene silencing diminishes cyclin D1 mRNA expression in HepG2 cells. *Genet. Mol. Res.* **9**(3), 1557–1567.
- Dodurga Y., Seçme M., Şatiroğlu-Tufan N.L. (2018) A novel oncogene *URG4/URGCP* and its role in cancer. *Gene*. **668**, 12–17.

15. Tokay E., Kockar F. (2016) Identification of intracellular pathways through which TGF- $\beta$ 1 upregulates *URG-4/URGCP* gene expression in hepatoma cells. *Life Science*. **144**, 121–128.
16. Tokay E., Sagkan R.I., Kockar F. (2020) TNF- $\alpha$  induces *URG-4/URGCP* gene expression in hepatoma cells through starvation dependent manner. *Biochem. Genet.* **59**(1), 300–314.59.  
<https://doi.org/10.1007/s10528-020-09972-z>
17. Alper M., Kockar F. (2014) IL-6 upregulates a disintegrin and metalloproteinase with thrombospondin motifs 2 (ADAMTS-2) in human osteosarcoma cells mediated by JNK pathway, *Mol. Cell. Biochemistry*. **393**(1–2), 165–175.
18. Livak K.J., Schmittgen T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-Delta Delta C(T)</sup> method. *Methods*. **25**(4), 402–408.
19. Tokay E., Kockar F. (2016) SP1 is a transcriptional regulator of *URG-4/URGCP* gene in hepatocytes. *Mol. Cell. Biochem.* **423**(1–2), 75–83.
20. Turkoglu S.A., Kockar F. (2016) SP1 and USF differentially regulate ADAMTS1 gene expression under normoxic and hypoxic conditions in hepatoma cells. *Gene*. **575**, 48–57.
21. Geng J., Li X., Lang X., Qiao C., Hu M., Yang J., Feng J., Lv M. (2014) Combination of cetuximab and rapamycin enhances the therapeutic efficacy in hepatocellular carcinoma. *Technol. Cancer Res. Treat.* **13**(4), 377–385.
22. Shehata F., Abdel M.N., Sakr M., Kasem S., Balbaa M. (2013) Epidermal growth factor, its receptor and transforming growth factor- $\beta$ 1 in the diagnosis of HCV-induced hepatocellular carcinoma. *Med. Oncol.* **30**(3), 673.  
<https://doi.org/10.1007/s12032-013-0673-x>
23. Huang P., Xu X.X. (2014) The role of EGF-EGFR signalling pathway in hepatocellular carcinoma inflammatory microenvironment. *J. Cell. Mol. Med.* **18**(2), 218–230.
24. Xia H., Dai X., Yu H., Zhou S., Fan Z., Wei G., Tang Q., Gong Q., Bi F. (2018) EGFR-PI3K-PDK1 pathway regulates YAP signaling in hepatocellular carcinoma: the mechanism and its implications in targeted therapy. *Cell Death Dis.* **9**(3), 269.
25. Wee P., Wang Z. (2017) Epidermal growth factor receptor cell proliferation signaling pathway. *Cancers (Basel)*. **9**(5), 52.

## EPIDERMAL GROWTH FACTOR MEDIATES Up-REGULATION OF *URGCP* ONCOGENE IN HUMAN HEPATOMA CANCER CELLS

E. Tokay\*

<sup>1</sup>Department of Molecular Biology and Genetics, Project Coordination Office, Balikesir University, Balikesir, Turkey

\*e-mail: esratokay@balikesir.edu.tr

Hepatocellular carcinoma (HCC) is the fourth leading cause of cancer-related death in the World. Epidermal growth factor receptor (EGFR) pathway plays an important role in HCC tumorigenesis. In the tumor micro-environment of HCC, the expression of EGF is aberrant. Here we describe the EGF-dependent regulation of *URGCP* gene in human hepatoma cancer cells (Hep3B). The effect of EGF cytokine on Hep3B proliferation was shown using MTT method. EGF-mediated *URGCP* expression was determined at mRNA and protein level with qRT-PCR analyses and Western blotting method, respectively. Different lengths of *URGCP* promoter constructs were transiently transfected into Hep3B cells and the basal promoter activities were determined in the presence of EGF. In addition, some pathway analyses were performed to find out the mechanism of EGF mediated up-regulation of the *URGCP* gene. In the presence of EGF, *URGCP* expression increases in concentration and time dependent manner. EGF mediated *URGCP* up-regulation might depend on a *cis*-acting element located between –344 and –482 positions in its promoter.

**Keywords:** EGF, Hep3B, *URGCP*, upregulation, transcriptional regulation