

ИССЛЕДОВАНИЕ РОЛИ НЕРЕЦЕПТОРНОЙ ТИРОЗИНКИНАЗЫ
c-Abl В РЕГУЛЯЦИИ p53-ЗАВИСИМОЙ АКТИВАЦИИ
ERK1/2-ЗАВИСИМОГО КАСКАДА

© 2020 г. Е. А. Олейник¹, А. А. Наумова¹, Д. В. Немирич², С. Д. Николаева¹,
В. Т. Бахтеева¹, А. С. Березовская¹, Е. В. Черниговская¹, М. В. Глазова¹, *

¹Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН,
Санкт-Петербург, Россия

²Университет ИТМО, кафедра компьютерных технологий,
Санкт-Петербург, Россия

*E-mail: mglazova@iephb.ru

Поступила в редакцию 28.08.2019 г.

После доработки 02.12.2019 г.

Принята к публикации 03.12.2019 г.

Белок p53 является транскрипционным фактором, который в ответ на клеточный стресс запускает старение, остановку клеточного цикла, или апоптоз. Данные литературы свидетельствуют о том, что проапоптотный белок p53 участвует не только в апоптозе, но и в регуляции процессов нейрональной дифференцировки, а также оказывает активирующее влияние на ERK1/2 сигнальный каскад. Однако до сих пор нет точного ответа на вопрос, касающийся характера и механизмов влияния p53 на ERK1/2 сигнальный каскад. В данной работе мы провели анализ внутриклеточных механизмов, опосредующих активирующее влияние p53 на ERK1/2. Исследование было проведено на недифференцированных клетках линии PC12. Для кратковременной активации TrkA-рецепторов в среду добавляли фактор роста нервов NGF. Результаты показали, что активация p53 введением Nutlin-3 привела к повышению активности TrkA/cRaf/ERK каскада и нерцепторной киназы c-Abl. Ингибирование c-Abl на фоне активации p53 не изменило активность TrkA-рецепторов, но при этом сохранялась повышенная активность cRaf и ERK1/2. Однако сочетанное введение Nutlin-3 и ингибиторов c-Abl и TrkA-рецепторов привело к значительному снижению активности ERK1/2. Полученные нами данные свидетельствуют о том, что p53 оказывает активирующее влияние на ERK1/2 каскад как опосредованно, в составе комплекса p53/c-Abl и активируя Trk-рецепторы, так и независимо от c-Abl, влияя на ERK1/2 каскад на уровне или выше cRaf.

Ключевые слова: ERK1/2, клетки PC12, NGF, TrkA-рецепторы, Nutlin-3, GNF-5, GW 441756

DOI: 10.31857/S0869813920020077

Изучению роли p53 посвящены тысячи исследований, но до сих пор этот белок вызывает огромный интерес. Показано, что p53 регулирует стабильность генома, апоптоз, клеточный цикл, дифференцировку, развитие, метаболизм и т.д. [1–3]. Известно, что p53 является транскрипционным фактором и контролирует экспрессию множества генов. С другой стороны, p53 также работает и как цитоплазматический белок. При этом его транскрипционная и цитоплазматическая активность зависит не только от посттрансляционных изменений, но и от прямых белковых

взаимодействий, и одним из белков, связывающихся с p53 и регулирующих его активность является c-Abl (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1). Так, показано, что c-Abl повышает транскрипционную активность p53 [4–7]. В цитоплазме белковый комплекс p53/c-Abl связывается с тирозинкиназным доменом Trk-рецепторов, защищает p53 от MDM2-зависимой дегградации и стабилизирует p53 [6, 8].

Нерцепторная тирозинкиназа c-Abl экспрессируется практически во всех типах клеток млекопитающих с максимальным уровнем в мозге, селезенке и тимусе [9]. В нейронах киназа c-Abl преимущественно локализована в цитоплазме, где связывается с мембранами, актиновыми филаментами и различными белками. Ядерная локализация c-Abl определяет ее транскрипционную активность, основанную на ее прямом связывании с С-терминальным доменом РНК-полимеразы II типа, или, как уже было сказано выше, на образовании комплекса с p53. Более того, c-Abl участвует в регуляции репарации ДНК и контроле клеточного цикла [10]. Также показана ее роль в процессах апоптоза, где она может вести себя как про- так и анти-апоптозный фактор. Нокаутирование c-Abl летально для организма (приводит к гибели на ранних сроках эмбрионального развития) [9]. В нейронах c-Abl регулирует формирование синапсов [11]. Последние исследования свидетельствуют о связи активации c-Abl с нейродегенеративными процессами, в частности, с болезнями Паркинсона и Альцгеймера. Было показано, что c-Abl может фосфорилировать белок Parkin, что приводит к его инактивации и, соответственно, к гибели дофаминергических нейронов [12]. На основании этих данных c-Abl рассматривается как потенциальная мишень в разработке новых подходов в лечении болезни Паркинсона [13, 14]. С другой стороны, показано, что c-Abl и ERK1/2-киназа (extracellular signal related protein kinase 1 and 2) функционально связаны [15]. Известно, что ERK1/2 киназа также является одним из факторов, вовлеченным в патогенез болезни Паркинсона [16, 17]. В частности, показано, что гибель дофаминергических нейронов черной субстанции непосредственно связана с повышением активности ERK1/2 в тельцах Леви на ранних стадиях развития болезни Паркинсона [16]. При этом гибель дофаминергических нейронов опосредована активацией p53-зависимого пути апоптоза [18]. В свою очередь опубликованные данные свидетельствуют об активирующем влиянии p53 на ERK1/2-сигнальный каскад. Было показано, что в клетках меланомы, экспрессирующих мутантную, неактивную, форму p53 отмечается снижение активности ERK1/2 [19]. На различных клеточных линиях также были получены аналогичные результаты, при этом было показано, что функционально активные Ras и cRaf являются необходимыми посредниками p53-зависимой активации каскада [20–23]. С другой стороны, активирующее влияние p53 на ERK1/2 каскад может быть опосредовано c-Abl. На культуре клеток PC12 было показано, что при NGF-стимулированной дифференцировке белок p53 является необходимым фактором для стимуляции ERK1/2 [24]. Таким образом, в разных типах клеток влияние p53 на активность ERK1/2 одинаково, однако механизм выявленного эффекта до конца не выяснен. Предполагается, что эти эффекты опосредованы транскрипционной активностью p53, поскольку мутантная форма p53, не обладающая транскрипционной активностью, снижает активность ERK1/2, а ингибирование транскрипционной активности p53 введением специфического блокатора Pifithrin-alfa снижает уровень фосфорилирования ERK1/2 *in vivo* [20, 25–27]. Важно подчеркнуть, что c-Abl, так же, как и p53, принимает участие в регуляции активности ERK1/2 каскада как в норме, так и при различных патологических состояниях клетки [28, 29].

Таким образом, наличие функциональных связей между p53 и cAbl, p53 и ERK1/2, и cAbl и ERK1/2 объединяет их в тесно связанное функциональное трио, однако это третичное взаимодействие до сих пор остается не изученным. В данной работе было проведено исследование внутриклеточных механизмов, опосредую-

ших влияние p53 на активность ERK1/2 в экспериментах с использованием различных сочетаний блокаторов и/или активаторов p53, c-Abl и членов ERK1/2 каскада. В качестве модели исследования мы выбрали клетки линии PC12, которые являются широко применяемым объектом для изучения регуляции функциональной активности дофаминергических нейронов. Полученные результаты показали, что p53-зависимая активация ERK каскада опосредована взаимодействием p53, TrkA и протеинкиназы c-Abl.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Роль протеинкиназы c-Abl в опосредовании влияния p53 на активацию ERK каскада исследовалась на клеточной линии PC12 (Sigma-Aldrich). Данную клеточную линию получают из феохромоцитомы крыс – опухоли, представленной хромаффинными клетками мозгового вещества надпочечников, они секретируют дофамин и широко используются как модель дофаминергических нейронов, а также широко применяются в исследованиях механизмов внутриклеточной сигнализации. Культуры клеток PC12 инкубировали в среде DMEM (#D5796, Sigma-Aldrich), с добавлением 10% лошадиной сыворотки (HS) (#H1138, Sigma-Aldrich) и 5% сыворотки плодов коровы (FBS) (#F9665, Sigma-Aldrich). Клетки содержались в инкубаторе с подачей 5% CO₂ при температуре 37°C с 95%-ной влажностью. Клетки инкубировались на планшетах, покрытых коллагеном IV типа. Смена среды производилась каждые два дня. Исследуемые вещества добавляли в среду на 5-й день инкубации по достижению 70% конфлюентности культуры. Каждая серия экспериментов включала следующие экспериментальные группы:

1. Контроль – введение DMSO;
2. Введение селективного активатора p53 Nutlin-3 (20 мкМ; #3984/10, Tocris);
3. Сочетанное введение Nutlin-3 (20 мкМ) и селективного аллостерического ингибитора c-Abl GNF-5 (10 мкМ; #4908/10, Tocris);
4. Сочетанное введение Nutlin-3 (20 мкМ) и селективного ингибитора TrkA-рецепторов GW 441756 (50 мкМ; 2238/10, Tocris);
5. Сочетанное введение Nutlin-3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441756 (50 мкМ).

Известно, что клетки PC12 как в дифференцированном, так и в недифференцированном состоянии экспрессируют не только катехоламины, c-Abl, p53 и белки ERK1/2 MAPK каскада, но также TrkA-рецепторы фактора роста нервов NGF. При этом связывание TrkA-рецепторов с NGF приводит к быстрому фосфорилированию тирозинкиназного домена TrkA-рецептора и к последующей активации ERK1/2. При длительном введении NGF постоянная активация TrkA/ERK1/2 каскада вызывает остановку клеточного цикла и дифференцировку клеток PC12 [30]. Для активации TrkA-рецепторов в недифференцированных клетках NGF (100 нг/мл; #01-125, Millipore) добавляли в среду за 15 мин перед добавлением исследуемых веществ. Клетки инкубировали 3 ч и затем собирали в лизатном буфере для дальнейшего Вестерн-блот анализа. Было проведено 4 серии экспериментов с двойным повтором каждой экспериментальной группы.

Вестерн-блот анализ

Белки в пробах разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле по Лэммли (SDS-PAGE) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану. Для Вестерн-блот анализа были использованы следующие антитела против: cRaf1 (1 : 1000; Cell Signaling, #9422), p-cRaf1 (Ser3381 : 1000; Cell Signaling, #2330), ERK1/2 (1 : 10000; Cell Signaling, #9102), pERK1/2 (Thr202/Thr204; 1 : 10 000; Cell Signaling, #4376); p53 (1 : 1000; Cell Signaling, #2524), p-p53 (Ser392; 1 : 500; Santa

Cruz, #sc-51960), p-TrkA (Tyr496; 1 : 500, Santa Cruz, #sc-8058), TrkA (1 : 500, Santa Cruz, #sc-7268), p-c-Abl (Tyr393/412; 1 : 1000, Sigma, #SAB4504330) и Actin (1 : 2000, abcam, # ab3280). Визуализация результатов проводилась при помощи SuperSignal@West Dura Extended Duration Substrate (#34075, ThermoFisher Scientific).

После промывок в TBST-Т мембраны помещали в раствор вторых антител против иммуноглобулина G кролика, конъюгированные с биотином (1 : 3000, Sigma) или против иммуноглобулина G мыши, конъюгированные с биотином (1 : 3000, Sigma) в TBS-Т. Затем мембраны инкубировали с раствором стрептавидин-пероксидазы (Sigma). Визуализация результатов проводилась при помощи ECL plus системы (Amersham Biosciences).

Денситометрический анализ количества белка осуществлялся в программе ImageJ после сканирования пленок, полученных в результате как минимум трех экспериментов. Уровень серого специфических бендов был скорректирован по фоновому сигналу и нормирован по уровню GAPDH, используемого для определения общего количества белка в пробе. Также в анализе учитывалась площадь специфических бендов.

Статистическая обработка результатов

Обработка полученных данных производилась при помощи непараметрического теста ANOVA (критерий Краскела–Уоллиса) и U-критерия Манна–Уитни в коммерческой программе GraphPad Prism7. Данные представлены в виде медианы и интерквартильного размаха. Достоверными считались отличия при уровне значимости $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Анализ уровня активности p53

Полученные данные показали, что при введении Nutlin-3, как и ожидалось, наблюдалось достоверное увеличение уровня фосфорилирования p53 (рис. 1). В группах с сочетанным введением активатора p53 и ингибиторов c-Abl и TrkA также наблюдалось достоверное повышение уровня активности белка p53 относительно контроля (рис. 1). Мы полагаем, что активация p53 в группах с введением ингибитора TrkA-рецепторов связана с активацией NGF нейротрофинового рецептора p75NT, что, как известно, приводит к активации p53.

Активация p53 повышает активность c-Abl

При введении активатора p53 происходит значительное увеличение активности протеинкиназы c-Abl (рис. 2). При этом введение ингибитора c-Abl GNF-5 на фоне активации p53 не привело к изменению активности c-Abl (рис. 2). Также активность c-Abl не изменялась и при сочетанном введении Nutlin-3, GNF-5 и ингибитора TrkA-рецепторов GW 441756 (рис. 2). Однако введение ингибитора TrkA-рецепторов GW 441756 и ингибитора c-Abl GNF-5 на фоне активации p53 привело к достоверному снижению активности c-Abl (рис. 2).

p53 повышает активность TrkA-рецепторов и членов ERK1/2-зависимого сигнального каскада

Анализ уровня активности TrkA-рецепторов показал, что активация p53 введением Nutlin-3 значительно повышала уровень фосфорилирования TrkA (рис. 3A). Однако ингибирование c-Abl на фоне активации p53 не изменило активность TrkA-рецепторов по сравнению с контрольными значениями, но была достоверно

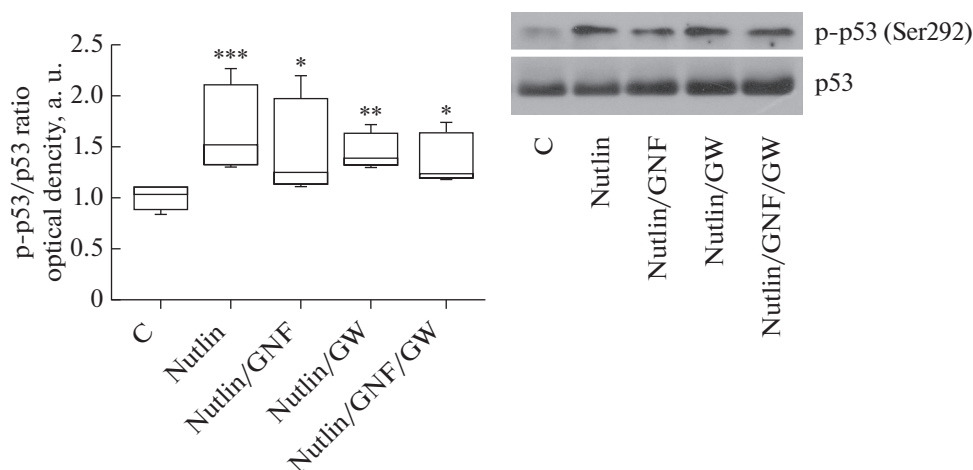


Рис. 1. Анализ активности белка p53 в клетках линии PC12. Относительное содержание фосфорилированного p53 по Ser292 (p-p53) оценивалось методом Вестерн-блот анализа. Нормировка количества белка в пробе производилась по общей форме p53. По оси ординат – оптическая плотность, измеренная в условных единицах; по оси абсцисс – исследуемые группы: C – контроль, Nutlin – введение Nutlin-3 20 мкМ, Nutlin/GNF – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ). Полученные данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ по сравнению с контрольной группой.

Fig. 1. Analysis of p53 activity in the PC12 cells p53 phosphorylation at Ser292 (p-p53) was estimated using the Western blot analysis and calculated as p-p53 to p53 ratio. Y axis – optical density in arbitrary units. X axis – experimental groups: C – control, Nutlin – treatment with Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – treatment with Nutlin 3 (20 μМ) and GNF-5 (10 μМ), Nutlin/GW – treatment with Nutlin 3 (20 μМ) and GW 441746 (50 μМ), Nutlin/GNF/GW - treatment with Nutlin 3 (20 μМ), GNF-5 (10 μМ) and GW 441746 (50 μМ). Data are shown as box-plots. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control.

ниже, чем при введении Nutlin-3 (рис. 3A). При этом ингибирование TrkA как на фоне активации p53, так и при сочетанном введении Nutlin-3 и GNF-5, как и ожидалось, привело к значительному снижению уровня фосфорилирования TrkA (рис. 3A).

Под влиянием повышения активированного p53 происходило увеличение фосфо-c-Raf. Также увеличение уровня активности cRaf наблюдалось в группе с сочетанным введением Nutlin-3 и GNF-5 (рис. 3B). В группах с введением GW 441756 наблюдалась тенденция к снижению уровня фосфорилирования cRaf относительно контрольной группы, однако это снижение было не достоверным (рис. 3B).

Далее мы проанализировали уровень активности ERK1/2. Результаты показали, что введение блокатора TrkA привело к достоверному снижению активных форм ERK1/2 (рис. 3C). При этом в группе с введением активатора p53, а также в группе с сочетанным введением Nutlin-3 и GNF-5 наблюдалось достоверное увеличение уровня активности ERK1/2 (рис. 3C).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЙ

Полученные в ходе данного исследования данные показали, что влияние p53 на ERK1/2 каскад во многом зависит не только от активности p53, но и от уровня ак-

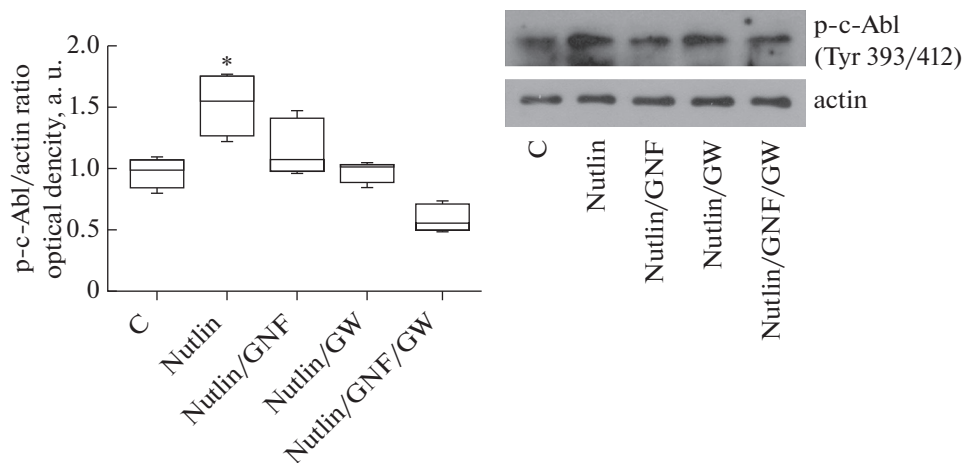
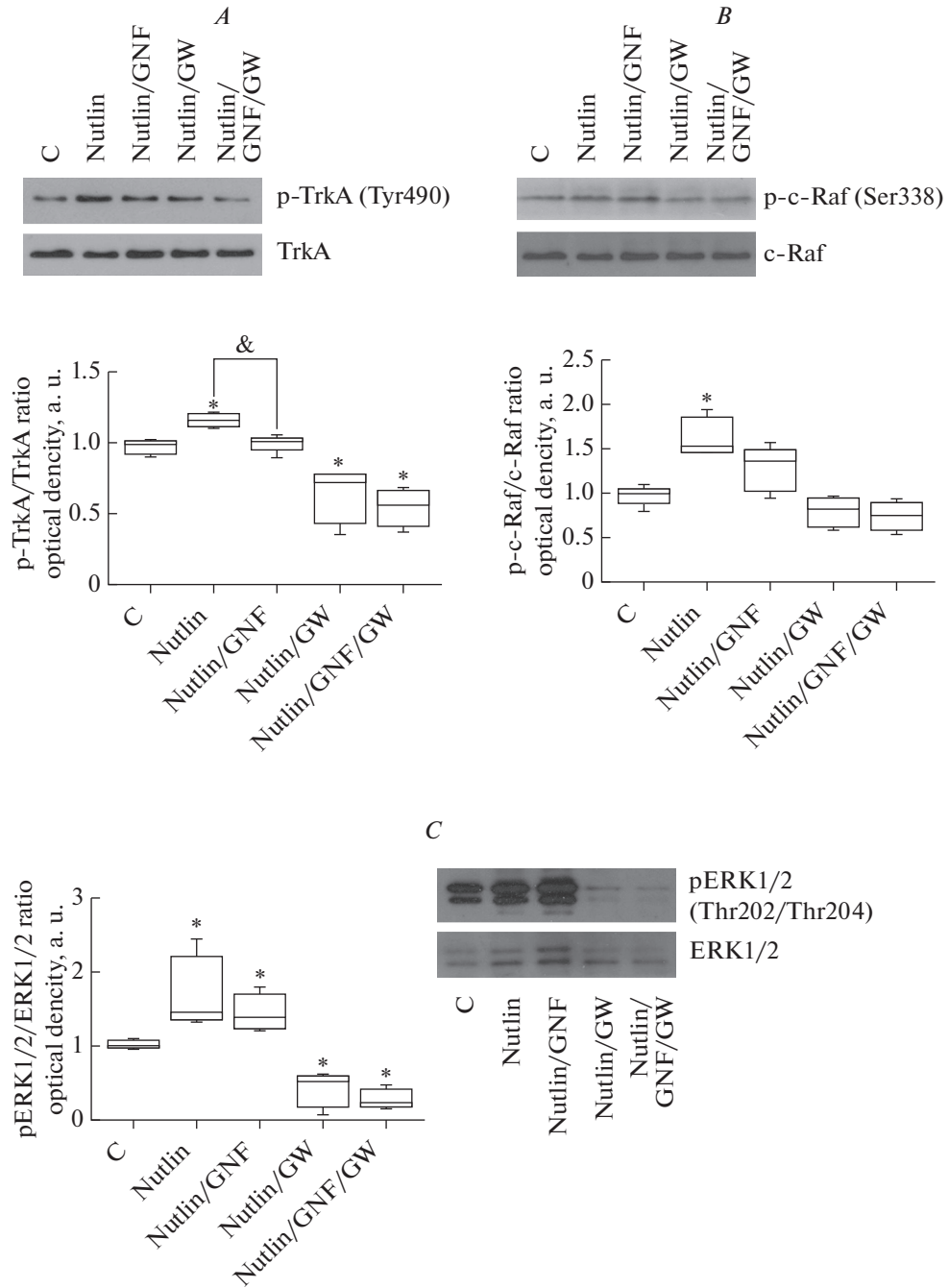


Рис. 2. Оценка уровня фосфорилирования нерецепторной тирозинкиназы c-Abl. Содержание фосфорилированной киназы c-Abl по Tyr393/412 (p-c-Abl) в клетках PC12 было исследовано с помощью Вестерн-блот анализа. В качестве контроля количества белка в пробах использовался actin. По оси ординат – оптическая плотность, измеренная в условных единицах; по оси абсциссе – исследуемые группы: C – контроль, Nutlin – введение Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ). Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой.

Fig. 2. Estimation of the non-receptor tyrosine kinase c-Abl phosphorylation c-Abl at Tyr393/412 (p-c-Abl) phosphorylation was estimated using the Western blot analysis and calculated as p-c-Abl to actin ratio. Y axis – optical density in arbitrary units. X axis – experimental groups: C – control, Nutlin – treatment with Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ). Data are shown as box-plots. * $p < 0.05$, versus control. # $p < 0.05$, versus Nutlin.

Рис. 3. Анализ активности TrkA-рецепторов и членов ERK1/2 сигнального каскада. Оценка содержания фосфорилированных форм рецепторов TrkA (p-TrkA по Tyr490) (A), c-Raf (p-c-Raf по Ser 338) (B) и ERK1/2-киназ (p-ERK1/2 по Thr202/Thr204) (C) в клетках PC12 проводилась с применением Вестерн-блот анализа. Для нормировки количества белка в пробе были использованы общие формы TrkA (A), c-Raf (B) и ERK1/2 (C). По оси ординат – оптическая плотность, измеренная в условных единицах; по оси абсциссе – исследуемые группы: C – контроль, Nutlin – введение Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – сочетанное введение Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) и GW 441746 (50 мкМ). Данные представлены в виде медиан и интерквартильных размахов. * $p < 0.05$ по сравнению с контрольной группой. & $p < 0.05$ при сравнении уровня активности TrkA между группами с введением Nutlin-3 и группой с сочетанным введением Nutlin-3 и GW 441746 (Манн–Уитни U-тест).

Fig. 3. Analysis of the TrkA receptor and members of ERK1/2 cascade activity Estimation of phosphorylated TrkA (p-TrkA Tyr490) (A), c-Raf (p-c-Raf Ser 338) (B) and ERK1/2 (p-ERK1/2 Thr202/Thr204) was performed using the Western blot analysis. TrkA, c-Raf and ERK1/2 phosphorylation was calculated as a ratio between phosphorylated and total studied proteins. Y axis – optical density in arbitrary units. X axis – experimental groups: C – control, Nutlin – treatment with Nutlin-3 (20 мкМ), Nutlin/GNF – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GNF-5 (10 мкМ), Nutlin/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ), Nutlin/GNF/GW – treatment with Nutlin 3 (20 мкМ), GNF-5 (10 мкМ) and GW 441746 (50 мкМ). Data are shown as box-plots. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ versus control. & $p < 0.05$ Nutlin-3 vs Nutlin-3/GW 441746 (by Mann-Whitney test).



тивности нейротрофиновых рецепторов и нерцепторной протеинкиназы c-Abl. Наши данные показали, что на фоне повышения активности p53 также происходит повышение активности c-Abl. Одним из объяснений данного влияния является прямое белок-белковое взаимодействие p53 и c-Abl, которое приводит к переходу киназного домена c-Abl в открытую активную конформацию [6]. С другой стороны, мы показали, что ингибирование активности c-Abl приводит к де-фосфорилированию p53. Однако данных литературы, свидетельствующих о c-Abl-зависимом фосфорилировании p53 мы не обнаружили. Было показано, что c-Abl повышает транскрипционную активность p53 [5, 6]. Также известно, что c-Abl фосфорилирует белок p75, относящийся к семейству белков p53 [5], а формирование комплекса p53/c-Abl стабилизирует активность p53 [6]. На основании полученных нами данных о снижении уровня фосфорилирования p53 при введении ингибитора c-Abl и данных литературы о c-Abl-зависимом фосфорилировании p75 можно предположить, что протеинкиназа c-Abl не только стабилизирует белок p53, но и принимает участие в его фосфорилировании. Таким образом, мы показали, что связь между p53 и c-Abl двухсторонняя: не только c-Abl регулирует активность p53, но и от уровня активности p53 может зависеть активность c-Abl.

Известно, что дифференцировка клеток линии PC12 по нейрональному типу происходит за счет активации ERK1/2 зависимого каскада при введении NGF [30], что также сопровождается активацией белка p53 [24]. С другой стороны, в цитоплазме белковый комплекс p53/c-Abl связывается с тирозинкиназным доменом Trk-рецепторов, приводя к активации ERK1/2 каскада [6, 8]. Кроме того, было показано, что эффект p53 на ERK1/2 каскад может быть опосредован взаимодействиями только одного белка p53 с рецептором TrkA [31, 32]. Однако имеются данные, свидетельствующие о позитивном влиянии p53 на активность ERK1/2 без участия нейротрофиновой стимуляции Trk-рецепторов [20, 23]. При этом авторы показали, что p53 активирует ERK-зависимый MAPK каскад на уровне или выше cRaf-киназы. Мы показали, что при введении ингибитора c-Abl на фоне активации p53 в группах с введением NGF наблюдается снижение уровня фосфорилирования TrkA-рецепторов по сравнению с введением только Nutlin-3. Этот факт позволяет предположить, что протеинкиназа c-Abl действительно способствует активации TrkA-рецепторов при участии p53. С другой стороны, активация c-Raf и ERK1/2 при сочетанном введении Nutlin-3 и GNF-5 свидетельствует о том, что при активации TrkA-рецепторов p53 может оказывать влияние на активность ERK1/2-сигнального каскада на уровне или выше c-Raf и независимо от c-Abl.

Важно отметить, что p53, c-Abl и ERK1/2 вовлечены в развитие нейродегенеративных болезней, в частности, болезни Хантингтона, Альцгеймера и Паркинсона [12, 18, 33, 34]. На сегодняшний день в терапии в основном раковых заболеваний уже применяются или разрабатываются препараты, основанные на точечном влиянии на p53, c-Abl и ERK1/2 [13, 35–38]. Однако действие применяемых препаратов ограничено и в ряде случаев малоэффективно, а в большинстве случаев также развивается толерантность к применяемым препаратам. Логично предположить, что малая эффективность препаратов, направленных только на одну мишень, связана с изменением активности как минимум одного или обоих составляющих данного комплекса.

Таким образом, наши данные свидетельствуют о том, что p53 оказывает активизирующее влияние на ERK1/2 каскад как опосредованно, в составе комплекса p53/c-Abl и активируя Trk-рецепторы, так и независимо от c-Abl, влияя на ERK1/2 каскад на уровне или выше cRaf (рис. 4). Также на основании полученных нами данных можно предположить, что применение различных сочетаний блокаторов

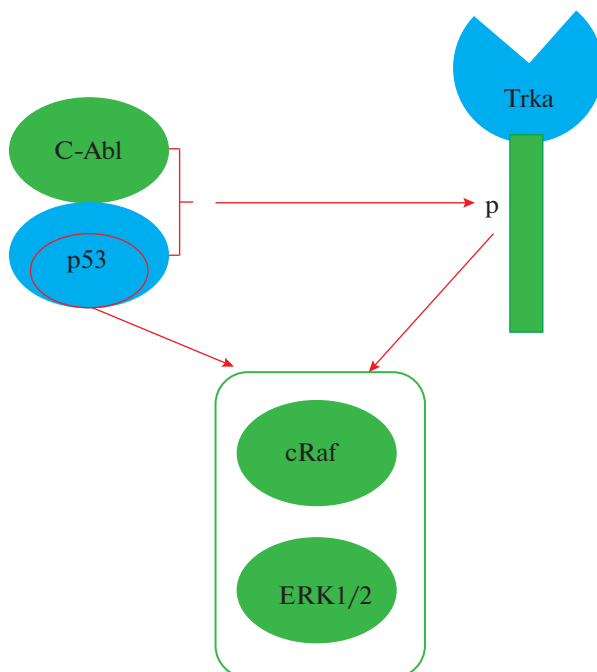


Рис. 4. Предполагаемая схема p53 зависимой регуляции активности ERK1/2 сигнального каскада.

Fig. 4. Hypothetical scheme of p53-dependent regulation of the ERK1/2 signaling.

и/или активаторов p53, c-Abl и членов ERK1/2 каскада может стать основой для разработки комплексной терапии для лечения нейродегенеративных состояний.

ИСТОЧНИК ФИНАНСИРОВАНИЯ

Работа выполнена при поддержке Гос.задания по теме № 075-00776-19-02 и при использовании ЦКП ИЭФБ РАН № 441590.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ko L.J., Prives C. p53: puzzle and paradigm. *Genes Dev.* 10(9): 1054–1072. 1996.
2. Sola S., Aranha M.M., Rodrigues C.M. Driving apoptosis-relevant proteins toward neural differentiation. *Mol. Neurobiol.* 46(2): 316–331. 2012.
3. Vousden K.H., Prives C. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell.* 137(3): 413–431. 2009.
4. Jing Y., Wang M., Tang W., Qi T., Gu C., Hao S., Zeng X. c-Abl tyrosine kinase activates p21 transcription via interaction with p53. *J. Biochem.* 141(5): 621–626. 2007.
5. Kharbanda S., Yuan Z.M., Weichselbaum R., Kufe D. Determination of cell fate by c-Abl activation in the response to DNA damage. *Oncogene.* 17(25): 3309–3318. 1998.
6. Levav-Cohen Y., Goldberg Z., Zuckerman V., Grossman T., Haupt S., Haupt Y. C-Abl as a modulator of p53. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 331(3): 737–749. 2005.
7. Nie Y., Li H.H., Bula C.M., Liu X. Stimulation of p53 DNA binding by c-Abl requires the p53 C terminus and tetramerization. *Mol. Cell Biol.* 20(3): 741–748. 2000.
8. Brown A., Browes C., Mitchell M., Montano X. c-abl is involved in the association of p53 and trk A. *Oncogene.* 19(26): 3032–3040. 2000.
9. Tsygankov A. Y. Non-receptor protein tyrosine kinases. *Front. Biosci.* 8: s595–635. 2003.

10. Raitano A.B., Whang Y.E., Sawyers C.L. Signal transduction by wild-type and leukemogenic Abl proteins. *Biochim. Biophys. Acta.* 1333(3): F201–F216. 1997.
11. Wang J.Y. The capable ABL: what is its biological function? *Mol. Cell Biol.* 34(7): 1188–1197. 2014.
12. Ko H.S., Lee Y., Shin J.H., Karuppagounder S.S., Gadad B.S., Koleske A.J., Pletnikova O., Troncoso J.C., Dawson V.L., Dawson T.M. Phosphorylation by the c-Abl protein tyrosine kinase inhibits parkin's ubiquitination and protective function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 107(38): 16691–16696. 2010.
13. Abushouk A.I., Negida A., Elshenawy R.A., Zein H., Hammad A.M., Menshawy A., Mohamed W.M.Y. C-Abl Inhibition; A Novel Therapeutic Target for Parkinson's Disease. *CNS Neurol. Disord. Drug Targets.* 17(1): 14–21. 2018.
14. Zhou H., Yamamura Y., Ogawa M., Tsuji R., Tsuchiya K., Kasahara J., Goto S. c-Abl Inhibition Exerts Symptomatic Antiparkinsonian Effects Through a Striatal Postsynaptic Mechanism. *Front. Pharmacol.* 9: 1311. doi: eCollection 2018
<https://doi.org/10.3389/fphar.2018.01311>
15. Long J., Liao G., Yinna Wang Y., Tang D.D. Specific protein 1, c-Abl and ERK1/2 form a regulatory loop. *J. Cell Science.* 132. doi: 2019
<https://doi.org/10.1242/jcs.222380>
16. Dzamko N., Zhou J., Huang Y., Halliday G.M. Parkinson's disease-implicated kinases in the brain; insights into disease pathogenesis. *Front. Mol. Neurosci.* 7, article 57.
<https://doi.org/10.3389/fnmol.2014.00057>
17. Bohush A., Niewiadomska G., Filipek A. Role of Mitogen Activated Protein Kinase Signaling in Parkinson's Disease. *Int. J. Mol. Sci.* 19, 2973; doi: 2018
<https://doi.org/10.3390/ijms19102973>
18. Szybińska A., Leśniak W. P53 Dysfunction in Neurodegenerative Diseases – The Cause or Effect of Pathological Changes? *Aging and Disease.* 8(4): 506–518. 2017.
19. Gulati A.P., Yang Y.M., Harter D., Mukhopadhyay A., Aggarwal B.B., Benzil D.L., Whysner J., Albino A.P., Murali R., Jhanwar-Uniyal M. Mutant human tumor suppressor p53 modulates the activation of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-kappaB, but not c-Jun N-terminal kinase and activated protein-1. *Mol. Carcinog.* 45(1): 26–37. 2006.
20. Lee S.W., Fang L., Igarashi M., Ouchi T., Lu K.P., Aaronson S.A. Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 97(15): 8302–8305. 2000.
21. Sablina A.A., Chumakov P.M., Levine A.J., Kopnin B.P. p53 activation in response to microtubule disruption is mediated by integrin-Erk signaling. *Oncogene.* 20(8): 899–909. 2001.
22. Singh S., Upadhyay A.K., Ajay A.K., Bhat M.K. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett.* 581(2): 289–295. 2007.
23. Zosen D.V., Glazova M.V. The role of the interaction of p53 and the MAPK cascade in controlling neuronal differentiation in the PC12 cell line. *Neurosci. Behav. Physiol.* 46(5): 559–565. 2016
24. Zhang J., Yan W., Chen X. p53 is required for nerve growth factor-mediated differentiation of PC12 cells via regulation of TrkA levels. *Cell Death Differ.* 13(12): 2118–2128. 2006.
25. Wu G.S. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 3(2): 156–161. 2004.
26. Dorofeeva N.A., Chernigovskaya E.V., Nikitina L.S., Glazova M.V. Effect of p53 inhibition by pifithrin-alpha on functional activity of vasopressin neurones in rat hypothalamus. *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 99(8): 901–916. 2013.
27. Nikitina L.S., Dorofeeva N.A., Kirillova O.D., Korotkov A.A., Glazova M., Chernigovskaya E.V. Role of the ERK signaling pathway in regulating vasopressin secretion in dehydrated rats. *Bio-tech. Histochem.* 89(3): 199–208. 2014.
28. Cilloni D., Saglio G. Molecular pathways: BCR-ABL. *Clin. Cancer Res.* 18(4): 930–937. 2012.
29. Jain A., Tripathi R., Turpin C.P., Wang C., Plattner R. Abl kinase regulation by BRAF/ERK and cooperation with Akt in melanoma. *Oncogene.* 36(32): 4585–4596. 2017.
30. Vaudry D., Stork P.J., Lazarovici P., Eiden L.E. Signaling pathways for PC12 cell differentiation: making the right connections. *Science.* 296(5573): 1648–1649. 2002.
31. Montano X. P53 associates with trk tyrosine kinase. *Oncogene.* 15(3): 245–256. 1997.
32. Browes C., Rowe J., Brown A., Montano X. Analysis of trk A and p53 association. *FEBS Lett.* 497(1): 20–25. 2001.
33. Bowles K.R., Jones L. Kinase signalling in Huntington's disease. *J. Huntingtons Dis.* 3, 89–123. 2014.
34. Schapira A.H., Olanow C.W., Greenamyre J.T., Bezard E. Slowing of neurodegeneration in Parkinson's disease and Huntington's disease: future therapeutic perspectives. *Lancet.* 384. 545–555. 2014.

35. Burgess A., Chia K.M., Haupt S., Thomas D., Haupt Y., Lim E. Clinical Overview of MDM2/X-Targeted Therapies. *Front Oncol.* 2016. <https://doi.org/10.3389/fonc.2016.00007>
36. Liu F., Yang X., Geng M., Huang M. Targeting ERK, an Achilles' Heel of the MAPK pathway, in cancer therapy. *Acta Pharm. Sin. B.* 8: 552–562. 2018.
37. Rossari F., Minutolo F., Orciuolo E. Past, present, and future of Bcr-Abl inhibitors: from chemical development to clinical efficacy. *J. Hematol. Oncol.* 11(1): 84. 2018.
38. Khorasanizadeh, M., Eskian, M., Gelfand, E.W., Rezaei, N. Mitogen-activated protein kinases as therapeutic targets for asthma. *Pharmacol. Ther.* 174: 112–126. 2017.

The Role of Non-Receptor Tyrosine Kinase c-Abl in the Regulation of p53-Dependent Activation of ERK1/2 Signaling Cascade

E. A. Oleynik^a, A. A. Naumova^a, D. V. Nemirich^b, S. D. Nikolaeva^a, V. T. Bachtееva^a,
A. S. Berezovskaya^a, E. V. Chernigovskaya^a, and M. V. Glazova^{a,*}

^a*Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences, St-Petersburg, Russia*

^b*ITMO University, St-Petersburg, Russia*

*e-mail: mglazova@iephb.ru

Protein p53 is a transcription factor that induces aging, cell cycle arrest and apoptosis in response to cell stress. Published findings suggest that proapoptotic protein p53 is involved not only in apoptosis, but also in the regulation of neural differentiation along with the activation of ERK1/2 signaling cascade. However, the nature and the mechanisms of p53 effects on ERK1/2 are not completely understood. Here, we examine the intracellular mechanisms underlying p53-dependent activation of ERK1/2. The study was performed on undifferentiated PC12 cells. For short-term activation of TrkA receptors the cells were incubated with NGF. Our results demonstrate that p53 activation with Nutlin-3 results in the increase of TrkA/cRaf/ERK cascade and c-Abl activity. c-Abl inhibition under p53 activation had no effect on TrkA receptors, but was associated with enhanced activity of cRaf and ERK1/2. At the same time, combined application of Nutlin-3 with c-Abl and TrkA inhibitors evoked considerable decrease of ERK1/2 activity. Our results suggest that p53 activates ERK1/2 cascade either in complex with c-Abl or in c-Abl-independent manner by modulating the c-Raf or upstream targets.

Keywords: ERK1/2, PC12 cells, NGF, TrkA- receptors, Nutlin-3, GNF-5, GW 441756

ЦИТИРОВАТЬ:

Олейник Е.А., Наумова А.А., Немирич Д.В., Николаева С.Д., Бахтеева В.Т., Березовская А.С., Черниговская Е.В., Глазова М.В. Исследование роли нерецепторной тирозинкиназы c-Abl в регуляции p53-зависимой активации ERK1/2-зависимого каскада. *Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова.* 106(2): 243–253.

DOI: 10.31857/S0869813920020077

TO CITE THIS ARTICLE:

Oleynik E.A., Naumova A.A., Nemirich D.V., Nikolaeva S.D., Bachtееva V.T., Berezovskaya A.S., Chernigovskaya E.V., Glazova M.V. The Role of Non-Receptor Tyrosine Kinase c-Abl in the Regulation of p53-Dependent Activation of ERK1/2 Signaling Cascade. *Russian Journal of Physiology.* 106(2): 243–253.

DOI: 10.31857/S0869813920020077