

ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ p53/p21/Rb И MAP-КИНАЗНЫХ СИГНАЛЬНЫХ ПУТЕЙ В ЭНДОМЕТРИАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА В УСЛОВИЯХ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

© П. И. Дерябин, А. В. Бородкина, Н. Н. Никольский, Е. Б. Бурова¹

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064;

¹ *электронный адрес: lenbur87@mail.ru*

Недавно мы показали, что в мезенхимных стволовых клетках эндометрия человека (СКЭ) в ответ на окислительный стресс активируются сигнальные пути p53/p21/Rb и p38/MAPKAPK-2, играющие определяющую роль в индукции преждевременного старения СКЭ. Однако до сих пор не было проведено комплексного анализа взаимодействия между p53/p21/Rb и семейством митогенактивируемых протеинкиназ (MAP-киназ), включающим в себя p38, ERK1/2 и JNK. В настоящей работе мы изучили функциональную активность p53/p21/Rb и MAP-киназных сигнальных путей в условиях окислительного стресса при ингибировании входящих в них компонентов. Согласно результатам ингибиторного анализа, проведенного с использованием специфичных ингибиторов MAP-киназ и p53, супрессия каждой из MAP-киназ в H₂O₂-стимулированных клетках в значительной степени усиливала активацию p53, а также приводила к повышению экспрессии белка p21 и соответственно гипофосфорилированию Rb. В то же время в результате ингибирования p53 повышался уровень активации всех MAP-киназ, но в наибольшей степени ERK1/2. Полученные результаты позволяют предполагать наличие взаимной негативной регуляции между p53-зависимыми и MAP-киназными сигнальными путями. Было показано также, что в H₂O₂-стимулированных СКЭ существует сложноорганизованная система взаимодействий между членами семейства MAP-киназ. Как оказалось, MAP-киназы p38 и JNK функционируют в качестве антагонистов в регуляции ERK1/2: если JNK активирует, то p38 блокирует активацию ERK1/2. С другой стороны, ингибирование ERK1/2 понижало активность и p38, и JNK. Настоящая работа устанавливает сложную взаимосвязь между активностью p53/p21/Rb и каждым из трех MAP-киназных путей и открывает новые направления исследований феномена преждевременного старения.

Ключевые слова: стволовые клетки, окислительный стресс, MAP-киназы, p53, пифитрин- α , ингибиторный анализ.

Принятые сокращения: СКЭ — стволовые клетки эндометрия, JNK — c-Jun N-концевая киназа (c-Jun N-terminal kinase), ERK — киназа, регулируемая экстраклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase), TNF- α — фактор некроза опухолей- α , IL-1 β — интерлейкин-1 β , ASK — апоптозрегулирующая киназа (apoptosis signal-regulating kinase), DDR 1 — discoidin domain receptor 1, Rb — белок ретинобластомы, МКР-3 — фосфатаза 3 MAP-киназы (MAP kinase phosphatase 3), MAPKAPK-2 (или МК-2) — протеинкиназа 2, активируемая MAP-киназой (MAP kinase-activated protein kinase 2).

Информационное пространство клетки, содержащее сложноорганизованную сеть сигнальных путей, функционирующих по принципу прямой и обратной связи, в качестве неперемного компонента включает в себя митогенактивируемые протеинкиназные (MAP-киназные) каскады. Основными представителями семейства MAP-киназ являются стрессактивируемые протеинкиназы JNK и p38, а также регулируемые экстраклеточными сигналами киназы ERK1/2. В ответ на внеклеточные стимулы MAP-киназы координируют широкий спектр внутриклеточной активности — от метаболизма, подвижности, митоза, воспаления и дифференцировки до клеточной гибели и выживания (Wu, 2004; McCubrey et al., 2007; Kyriakis, Avruch, 2012; Kim, Choi, 2015). С канонической точки зрения, ERK1/2 активируются митогенами (ростовыми факторами, форболовыми эфирами), однако было показано, что стрессовые факторы также способны стимулиро-

вать этот путь (Lewis et al., 1998; Burova et al., 2007). В отличие от ERK, стресс-киназы p38 и JNK активируются, как правило, стрессами разных типов, включая окислительный, генотоксический, осмотический, а также индуцированный провоспалительными цитокинами TNF- α и IL-1 β (Kyriakis, Avruch, 2012).

Передающие сигнал MAP-киназные каскады организованы в виде модулей, содержащих иерархическую последовательность протеинкиназ, активность которых регулируется при помощи различных, специфичных для каждого модуля киназ и фосфатаз путем фосфорилирования или дефосфорилирования по сериновым, треониновым и тирозиновым остаткам. После стимуляции происходит активация киназы ASK в случае JNK и p38 (Fujisawa et al., 2007) или Raf посредством GTP-связывающего белка Ras в случае ERK (Chang, Karin, 2001; Pearson et al., 2001). Далее ASK и Raf стимулируют активность киназ

двойной специфичности (киназы MAP-киназ или МКК), которые включают в себя МКК-1/2 (или MEK1/2), МКК-3/6 и МКК-4/7, селективно активирующие ERK1/2, p38 и JNK соответственно (Kyriakis, Avruch, 2012). Активированные MAP-киназы фосфорилируют различные белки-мишени, включая транскрипционные факторы c-Jun, AP-1, p53, c-Myc, Elk1 и ATF2 наряду с антиапоптотическими и проапоптотическими белками Bcl-2 и Bad соответственно (Bogoyevitch, Kobe, 2006; Takeda et al., 2011).

Классические представления, согласно которым ERK функционирует преимущественно в передаче пролиферативного сигнала с мембранно-связанных рецепторов и опосредует дифференцировку и выживание клеток, а p38 и JNK вовлечены в инициацию клеточной гибели, постоянно расширяются с появлением новых данных, свидетельствующих о неоднозначности функциональной роли MAP-киназ. Так, в зависимости от стимула и клеточного контекста Raf/MEK/ERK-путь влияет в разной степени и даже противоречивым образом на апоптоз, старение, остановку клеточного цикла и пролиферацию (McCubrey et al., 2007; Sawe et al., 2008). Активированные различными стрессовыми факторами p38 и JNK сигнальные пути вовлечены не только в апоптоз (Xia et al., 1995; Porras et al., 2004; Guan et al., 2006; Xiao et al., 2015), но и в старение клеток (Zarubin, Han, 2005; Debacq-Chainiaux et al., 2010; Passos et al., 2010; Borodkina et al., 2014).

Транскрипционный фактор p53, проявляющий тумор-супрессорную активность, в ответ на генотоксический стресс регулирует экспрессию различных генов, индуцирующих механизмы антиканцерогенеза, включая арест клеточного цикла, апоптоз и старение, в зависимости от клеточного контекста, типа и жесткости стресса (Wu, 2004; Riley et al., 2008; Menendez et al., 2009). Транскрипционная активность p53 проявляется в результате взаимодействия с многочисленными сигнальными путями, в том числе MAP-киназными — p38 (She et al., 2001; Duan et al., 2011; Xiao et al., 2015), JNK (Wu, 2004; Hsu et al., 2009; Lorin et al., 2010) и ERK (Persons et al., 2000; Kaji et al., 2003; Lin et al., 2008; Drosten et al., 2014), которые фосфорилируют и активируют p53 при стимуляции стрессовыми факторами. В свою очередь p53 может активировать Ras/Raf/MEK/ERK-сигналинг (Wu, 2004; Singh et al., 2007; Lee et al., 2013) через механизм, опосредованный p53-зависимой индукцией тирозинкиназного рецептора DDR 1 (Ongusaha et al., 2003) и лигандов рецептора эпидермального фактора роста (Lee et al., 2000; Fang et al., 2001). Предполагается, что такой механизм играет важную роль в защите раковых клеток от p53-зависимого апоптоза. В то же время транскрипционный фактор p53 способен подавлять активность ERK, активируя гены ряда фосфатаз, которые дефосфорилируют ERK и блокируют ее антиапоптотическую активность, что может способствовать p53-индуцированному апоптозу (Bermudez et al., 2011; Zhang et al., 2015). Очевидно, что конечный ответ клеток определяется балансом между разнообразными стресс-активированными путями.

Помимо индукции апоптоза p53 играет определяющую роль в репликативном и стресс-индуцированном старении клеток разных типов, необратимо ингибируя прогрессию клеточного цикла в составе p53/p21/Rb-сигнального пути, что приводит к потере пролиферативного потенциала, характерной, наряду с изменением фенотипа, для старых клеток. В предыдущих исследованиях мы установили, что мезенхимные стволовые клетки эндомет-

рия человека (СКЭ) преждевременно стареют в условиях сублетального окислительного стресса. В передачу окислительного сигнала, индуцирующего процесс старения СКЭ, вовлечены пути p53/p21/Rb и p38/MAPKAPK-2 (Borodkina et al., 2014).

Целью представленной работы является оценка взаимного влияния p53/p21/Rb- и MAP-киназных сигнальных путей, включающих в себя ERK, p38 и JNK, при окислительном стрессе в СКЭ.

Материал и методика

Культивирование клеток. Стволовые клетки эндометрия человека (СКЭ), полученные в Институте цитологии РАН (Санкт-Петербург), выделяли из десквамированного эндометрия менструальной крови здоровых доноров (Земелько и др., 2011) и культивировали в среде DMEM/F12 (Gibco, США), содержащей 10 % эмбриональной сыворотки (HyClone, США), 1 % гентамицина и 1 % глутамакса, в атмосфере 5 % CO₂ при 37 °C во флаконах 25 или 75 см². Для экспериментов клетки рассеивали с плотностью 15 тыс. кл./см² на чашки диаметром 35 мм; использовали клетки 6—9-го пассажей.

Окислительный стресс вызывали добавлением в бессывороточную ростовую среду H₂O₂ (до конечной концентрации 200 мкМ), раствор которой готовили из 30%-ной H₂O₂ непосредственно перед использованием. Обработку клеток проводили в течение 30 мин или 1 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂, после чего клетки дважды промывали бессывороточной средой и далее культивировали в свежей ростовой среде.

В экспериментах использовали следующие фармакологические и н г и б и т о р ы : пифитрин-α — селективный ингибитор транскрипционного фактора p53 (Komarov et al., 1999); вещество U0126 (1,4-diamino-2,3-dicyano-1,4-bis(2-aminophenylthio) butadiene) — высокоселективный ингибитор киназ MEK1/2, регулирующих активность ERK1/2 (Favata et al., 1998); SB203580 (4-[4-(4-fluorophenyl)-2-(4-(methylsulfinylphenyl)-1H-imidazol-5-yl] pyridine) — специфический ингибитор p38 MAP-киназного пути, связывающийся в АТФ-связывающем кармане молекулы p38 и предотвращающий фосфорилирование мишеней p38, в частности киназы МК-2, но не препятствующий фосфорилированию самой киназы p38 (Young et al., 1997); SP600125 (anthrapyrazolone) — специфический ингибитор JNK (Bennett et al., 2001). Эксперименты проводили по следующей схеме: 1) клетки предварительно культивировали в присутствии 10 мкМ U0126, 5 мкМ SB203580 или 5 мкМ SP600125 в течение 1 ч либо 50 мкМ пифитрина в течение 2 ч при 37 °C в атмосфере 5 % CO₂; 2) затем клетки подвергали окислительному стрессу в присутствии одного из ингибиторов и далее культивировали в свежей ростовой среде (без H₂O₂) в течение 3 сут при постоянном присутствии одного из исследуемых ингибиторов.

Иммуноблоттинг. Клетки дважды промывали холодным PBS и лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Трис-HCl, 150 мМ NaCl, 1 мМ ЭДТА, 1 мМ ЭГТА, 10 % глицерина, 1 % Тритона X-100, 1 мМ Na₃VO₄, 1 мМ NaF, 0.5 мМ PMSF и коктейль ингибиторов протеаз (1 : 500; Sigma, США), в течение 10 мин на льду. После лизиса клетки соскребали с чашек и центрифугировали в течение 15 мин при 15 000 g. К супернатанту добавляли 1/4 часть буфера для электрофоретических проб (40 мМ

Трис, pH 6.8, 10 % SDS, 20 % 2-меркаптоэтанола и 40 % глицерина) и инкубировали в течение 5 мин при 100 °С. Концентрацию белка определяли по методу Бредфорд, используя овалбумин для построения калибровочной кривой. Электрофоретическое разделение белков проводили методом SDS-электрофореза в полиакриламидном геле с последующим переносом белков на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C extra (Amersham Pharmacia Biotech, Швеция). Для визуализации белковых полос использовали Ponceau S (Sigma, США). Для специфического выявления белков использовали моноклональные кроличьи антитела против ингибитора циклинзависимых киназ p21Cip1, глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (GAPDH, clone 14C10), фосфо-МАРКАРК-2 (Thr334), p38- α MAPK, SAPK/JNK, а также поликлональные кроличьи антитела против фосфо-Rb (Ser807/811), фосфо-p53 (Ser15), фосфо-p38 (Thr180/Tyr182), ERK2, фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204), фосфо-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185) и p53. В качестве вторичных антител применяли козы антитела, выработанные против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена (GAR-HRP). Все антитела, за исключением антител против ERK2 (Santa Cruz Biotechnology, США), были получены от фирмы Cell Signaling (США). Для детекции пероксидазной активности конъюгатов GAR-HRP использовали реакцию усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Швеция). Хемилюминесцентное излучение регистрировали экспонированием на рентгеновскую пленку CEA RP NEW (CEA AB, Швеция).

В работе использовали неорганические соли и перекись водорода производства фирмы Sigma (США).

Результаты и обсуждение

В предыдущих исследованиях мы установили, что СКЭ при пульсовом воздействии H_2O_2 в сублетальных концентрациях входят в состояние преждевременного старения, которое постепенно развивается во времени и становится необратимым (Burova et al., 2013). Активация основных сенсоров окислительного воздействия, включая киназу ATM, гистон H2AX, адапторный белок 53BP1 и транскрипционный фактор p53, происходит в течение первых 5—30 мин стимуляции, тогда как необратимое старение СКЭ наступает как минимум через 1—2 сут (Borodkina et al., 2014). В основу изучения взаимодействия МАР-киназных и p53-зависимых сигнальных путей был положен комплексный ингибиторный анализ с использованием специфических ингибиторов U0126, SB203580, SP600125 и пифитрина- α для блокирования активности белковых компонентов этих путей — ERK1/2, p38, JNK и p53 соответственно. Изменение статуса фосфорилирования белков в ответ на действие H_2O_2 в присутствии ингибиторов анализировали методом Вестерн-блоттинга в двух временных точках: через 30 мин (инициация индуцированного старения) и через 3 сут после действия H_2O_2 (фаза необратимого индуцированного старения).

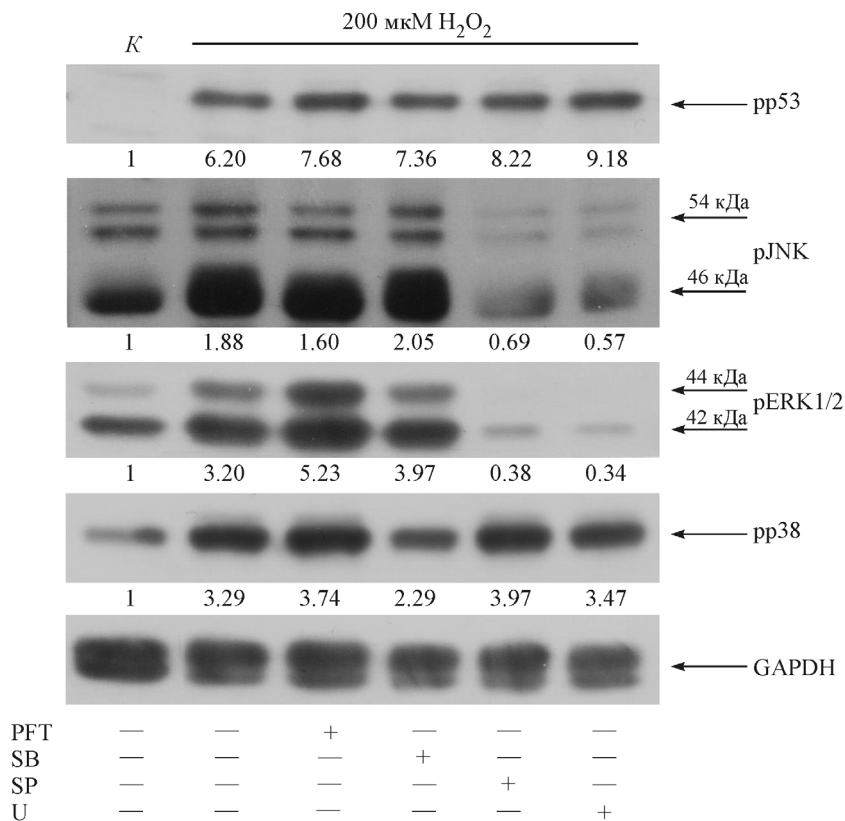


Рис. 1. Статус фосфорилирования МАР-киназ и транскрипционного фактора p53 после 30-минутного действия H_2O_2 на мезенхимные стволовые клетки эндометрия (СКЭ) человека в присутствии и в отсутствие их ингибиторов.

Использовали специфические ингибиторы p53 (пифитрин- α : PFT) и киназ p38 (SB203580: SB), JNK (SP600125: SP) и ERK1/2 (U0126: U). Уровень фосфорилирования p53 и МАР-киназ определяли в иммуноблоте с помощью антител, специфичных к их фосфорилированным формам (см. раздел «Материал и методика»). К — контроль. Числа показывают результаты денситометрии, нормированные к контролю.

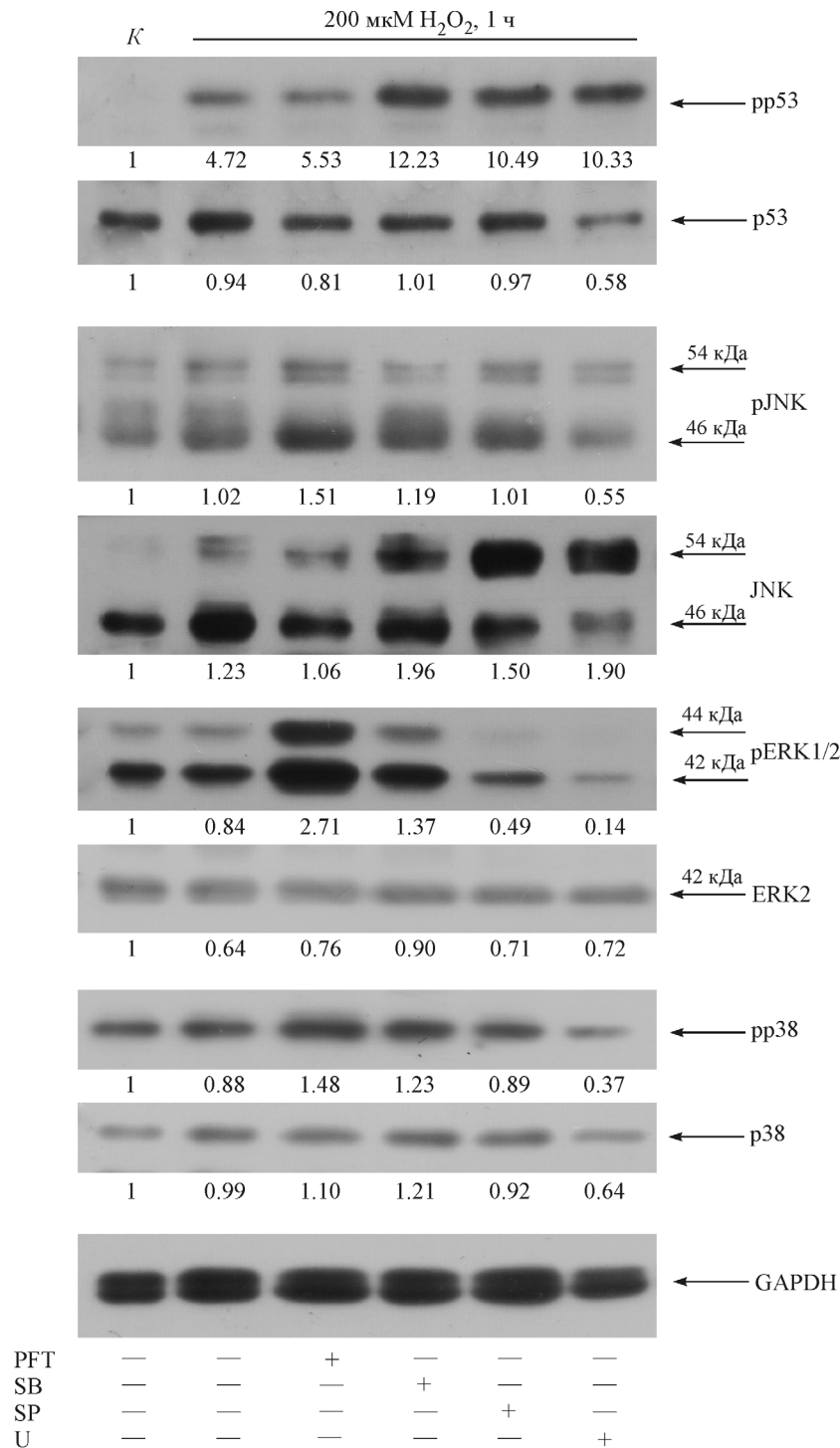


Рис. 2. Модуляция уровня H₂O₂-индуцированного фосфорилирования и экспрессии MAP-киназ и p53 при действии специфических ингибиторов.

После обработки клеток ингибиторами и H₂O₂ (в течение 1 ч) клетки культивировали в присутствии ингибиторов в течение 3 сут, лизировали и анализировали методом Вестерн-блоттинга. К — необработанные клетки. Числа показывают результаты денситометрии полос, нормированные к контролю. Остальные объяснения см. в подписи к рис. 1.

Действие пифитрина-α. Пифитрин селективно ингибирует p53, препятствуя его транслокации в ядро, и подавляет его транскрипционную активность, но не влияет на фосфорилирование основных сайтов молекулы p53, включая Ser15 (Gudkov, Komarova, 2005). Предобработка СКЭ пифитрином не изменяла уровень H₂O₂-индуцированного фосфорилирования белка p53 по Ser15 (рис. 1, 2),

но оказывала существенное влияние как на экспрессию белка p21, транскрипционную мишень p53, так и на фосфорилирование белка Rb (рис. 3, a). Следовательно, пифитрин эффективно ингибирует транскрипционную активность p53 в H₂O₂-стимулированных СКЭ. Ранее мы продемонстрировали, что повышение экспрессии p21 необходимо для запуска преждевременного старения в СКЭ

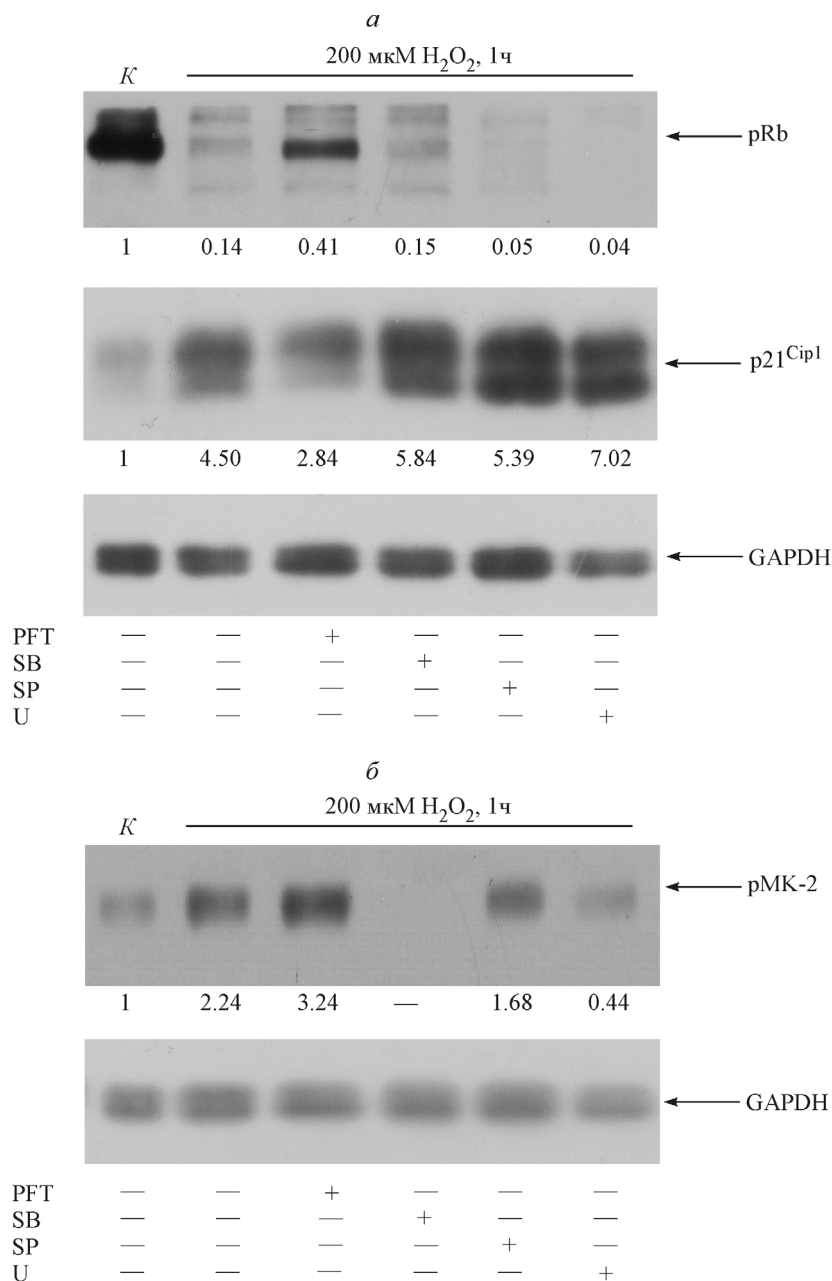


Рис. 3. Влияние ингибирования p53 и MAP-киназ на уровень H₂O₂-индуцированного фосфорилирования Rb и МК-2, а также экспрессии белка p21.

Обработку СКЭ проводили, как указано в подписи к рис. 2. С помощью специфических антител в иммуноблоте выявляли: *a* — фосфорилированную форму белка Rb (pRb) и уровень экспрессии p21 (p21^{Cip1}); *б* — фосфорилированную форму киназы МК-2 (pМК-2). Числа показывают результаты денситометрии полос, нормированных к контролю. *K* — необработанные клетки.

в ответ на окислительный стресс, вследствие чего белок Rb становится гипофосфорилированным (Bogodkina et al., 2014). В клетках, обработанных пифитрином, уровень экспрессии p21 через 3 сут был существенно понижен по сравнению с H₂O₂-стимулированными клетками, тогда как фосфорилирование Rb повышалось в значительной степени. Эти результаты свидетельствуют в пользу возможного предотвращения старения СКЭ в условиях блокирования p53, ключевого компонента p53/p21/Rb-пути, активирующего программу H₂O₂-индуцированного старения клеток.

В контексте взаимодействия MAP-киназных и p53/p21/Rb-сигнальных путей в СКЭ было интересно ис-

следовать влияние пифитрина на H₂O₂-индуцированную активацию киназ ERK1/2, p38 и JNK. Оказалось, что через 30 мин действие пифитрина практически не отражается на фосфорилировании p38 и JNK, но значительно повышает уровень активации ERK1/2 (рис. 1). Через 3 сут пифитрин индуцирует активацию всех MAP-киназ, однако киназы ERK1/2 по-прежнему сохраняли самую высокую активность (рис. 2). В присутствии пифитрина усиливаются H₂O₂-индуцированная активация p38 и ее прямой мишени киназы МК-2 (рис. 2; 3, б), а также фосфорилирование одной из форм JNK — белка p46 (рис. 2). Таким образом, супрессия пифитрином p53-зависимого пути приводила к продолжительной активации

ERK1/2, p38 и JNK. Однако нельзя исключать возможность того, что пифитрин может запускать активацию MEK/ERK-каскада через p53-независимый механизм (Kim et al., 2010). Существует также интригующая возможность активации Raf/MEK/ERK-каскада посредством Rb, что было показано на примере p53-мутантных клеток (Drosten et al., 2014). Основываясь на представленных результатах, мы предполагаем, что в стареющих СКЭ функционально активный белок p53 негативно регулирует активность MAP-киназных каскадов, что в итоге может быть необходимо для развития клеточного старения.

Действие ингибиторов MAP-киназных каскадов. При изучении влияния ингибирования ERK1/2, p38 или JNK на p53/p21/Rb-сигналинг в СКЭ оказалось, что супрессия активности ни одной из MAP-киназ в течение 30 мин не приводила к изменению уровня H₂O₂-индуцированного фосфорилирования p53 (рис. 1). Напротив, в условиях ингибирования MAP-киназных путей через 3 сут фосфорилирование p53 значительно увеличивалось по сравнению с H₂O₂-стимулированными клетками (рис. 2), что коррелировало со значительным повышением экспрессии белка p21 и последующим гипофосфорилированием белка Rb (рис. 3, а). Если в присутствии пифитрина было выявлено ожидаемое подавление экспрессии p21, то усиление экспрессии p21 при блокировании активности MAP-киназ оказалось довольно неожиданным фактом, который наводит на мысль о вовлеченности ERK1/2, JNK и p38 в регуляцию экспрессии p21 независимо от активации p53. Что касается Rb, ингибирование каждой из MAP-киназ вносит дополнительный вклад в наблюдаемую полную дезактивацию этого белка наряду с ингибирующим сигналом, передающимся через p53/p21-путь.

На основе анализа взаимовлияния MAP-киназных и p53/p21/Rb-сигнальных путей и принимая во внимание продолжительную активацию ERK1/2, p38 или JNK при ингибировании p53 и, наоборот, активацию p53-опосредованного пути в ответ на блокирование любой из MAP-киназ, мы заключаем, что исследуемые сигнальные пути в СКЭ функционируют по принципу взаимного супрессирования. В клетках с функционально неактивным белком p53 как на коротких сроках стимуляции H₂O₂, так и через несколько суток из всех MAP-киназ именно активация ERK1/2 была наиболее сильно выраженной. Исходя из этих наблюдений можно предположить, что в процессе инициации и развития старения при окислительном стрессе активированный белок p53 негативно регулирует ERK1/2 (и в меньшей степени p38 или JNK). Сопоставление полученных нами результатов с литературными данными показывает, что они в принципе совпадают с работами, в которых утверждается роль активированного транскрипционного фактора p53 в качестве негативного регулятора активности ERK1/2 через механизм, включающий p53-зависимую индукцию специфических фосфатаз (Bermudez et al., 2011; Zhang et al., 2015). Согласно последним сообщениям, цитоплазматическая фосфатаза МКР-3, специфично дефосфорилирующая ERK1/2, вовлечена в установление фенотипа, характерного для старых клеток (Zhang et al., 2015).

Мы анализировали также взаимодействие между ERK1/2, p38 и JNK, поочередно подавляя активность каждой из этих киназ посредством соответствующих фармакологических ингибиторов и оценивая уровень фосфорилирования MAP-киназ. Из наиболее интересных и значимых эффектов следует отметить противополож-

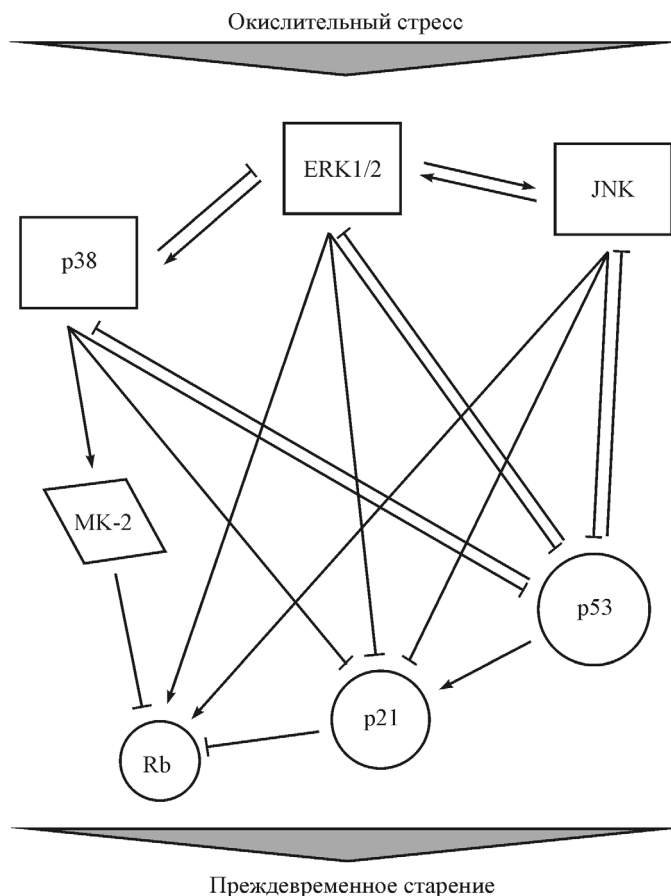


Рис. 4. Схема, отражающая взаимное влияние сигнальных путей в СКЭ в условиях окислительного стресса.

MAP-киназные каскады включают в себя ERK, p38, МК-2 и JNK; ингибитор циклинзависимых киназ p 21 и белок ретинобластомы Rb являются компонентами p53-опосредованного пути.

ное влияние ингибирования p38 и JNK на активацию ERK. Действие SB203580 инициировало заметное повышение фосфорилирования ERK1/2, тогда как действие SP600125 приводило практически к полной дезактивации ERK1/2 через 30 мин (рис. 1) и значительному уменьшению уровня фосфорилирования через 3 сут (рис. 2). Следовательно, p38 супрессирует активацию ERK1/2 и действует в этом отношении синергично с p53, ингибирующий эффект которого отмечен выше. Напротив, функционирование JNK связано с позитивной регуляцией активности ERK1/2. В свою очередь киназы ERK1/2 могут активировать JNK и p38, поскольку следствием ингибирования ERK1/2 является падение уровня фосфорилирования p38 (рис. 2), МК-2 (рис. 3, б) и JNK (рис. 1, 2) до значения ниже контрольного. Если в случае p38 понижение активации могло быть следствием понижения экспрессии белка через 3 сут, то в случае JNK наблюдали инверсию экспрессии p54 и p46 изоформ JNK по сравнению с H₂O₂-обработанными клетками, что вряд ли может быть причиной дезактивации JNK.

Результаты проведенного исследования взаимодействия сигнальных путей в тканеспецифичных мезенхимных СКЭ человека в условиях окислительного стресса представлены в виде диаграммы (рис. 4), которая демонстрирует сеть сложных ингибирующих и активирующих связей между составляющими ее белками. Полученные новые данные вносят вклад в понимание регуляторных

механизмов индуцированного стрессом старения СКЭ и могут быть полезны при разработке более эффективных подходов, направленных на предотвращение преждевременного старения стволовых клеток человека мезенхимной природы.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 14-04-01720-а), Российского научного фонда (проект 14-50-00068) и ФАНО России.

Список литературы

Земелько В. И., Гринчук Т. М., Домнина А. П., Арцыбашева И. В., Зенин В. В., Кирсанов А. А., Бичеева Н. К., Корсак В. С., Никольский Н. Н. 2011. Мультипотентные мезенхимные стволовые клетки десквамированного эндометрия. Выделение, характеристика и использование в качестве фидерного слоя для культивирования эмбриональных стволовых линий человека. Цитология. 53 (12) : 919—929. (Zemel'ko V. I., Grinchuk T. M., Domnina A. P., Artzibasheva I. V., Zenin V. V., Kirsanov A. A., Bichevaya N. K., Korsak V. S., Nikolsky N. N. 2011. Multipotent mesenchymal stem cells of desquamated endometrium. Isolation, characterization, and application as a feeder layer for maintenance of human embryonic stem cells. Tsitologiya. 53 (12) : 919—929.)

Bennett B. L., Sasaki D. T., Murray B. W., O'Leary E. C., Sakata S. T., Xu W., Leisten J. C., Motiwala A., Pierce S., Satoh Y., Bhagwat S. S., Manning A. M., Anderson D. W. 2001. SP600125, an anthrapyrazolone inhibitor of Jun N-terminal kinase. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 98 : 13 681—13 686.

Bermudez O., Jouandin P., Rottier J., Bourcier C., Pages G., Gimond C. 2011. Post-transcriptional regulation of the DUSP6 /MKP-3 phosphatase by MEK/ERK signaling and hypoxia. J. Cell. Physiol. 226 : 276—284.

Bogoyevitch M. A., Kobe B. 2006. Uses for JNK: the many and varied substrates of the c-Jun N-terminal kinases. Microbiol. Mol. Biol. Rev. 70 : 1061—1095.

Borodkina A., Shatrova A., Abushik P., Nikolsky N., Burova E. 2014. Interaction between ROS dependent DNA damage, mitochondria and p38 MAPK underlies senescence of human adult stem cells. Aging. 6 : 481—495.

Burova E., Borodkina A., Shatrova A., Nikolsky N. 2013. Sublethal oxidative stress induces the premature senescence of human mesenchymal stem cells derived from endometrium. Oxid. Med. Cell. Longev. 2013 : 474931.

Burova E., Vassilenko K., Dorosh V., Gonchar I., Nikolsky N. 2007. Interferon gamma-dependent transactivation of epidermal growth factor receptor. FEBS Lett. 581 : 1475—1480.

Chang L., Karin M. 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. Nature. 410 : 37—40.

Debacq-Chainiaux F., Boilan E., Dedessus Le Moutier J., Weemaels G., Toussaint O. 2010. p38 (MAPK) in the senescence of human and murine fibroblasts. Adv. Exp. Med. Biol. 694 : 126—137.

Drosten M., Sum E. Y., Lechuga C. G., Simón-Carrasco L., Jacob H. K., Garcia-Medina R., Huang S., Beijersbergen R. L., Bernards R., Barbacid M. 2014. Loss of p53 induces cell proliferation via Ras-independent activation of the Raf/Mek/Erk signaling pathway. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 111 : 15 155—15 160.

Duan W. J., Li Q. S., Xia M. Y., Tashiro S., Onodera S., Ikejima T. 2011. Silibinin activated p53 and induced autophagic death in human fibrosarcoma HT1080 cells via reactive oxygen species-p38 and c-Jun N-terminal kinase pathways. Biol. Pharm. Bull. 34 : 47—53.

Fang L., Li G., Liu G., Lee S. W., Aaronson S. A. 2001. p53 induction of heparin-binding EGF-like growth factor counteracts p53 growth suppression through activation of MAPK and PI3K/Akt signaling cascades. EMBO J. 20 : 1931—1939.

Favata M. F., Horiuchi K. Y., Manos E. J., Daulerio A. J., Stradley D. A., Feeser W. S., Van Dyk D. E., Pitts W. J., Earl R. A.,

Hobbs F., Copeland R. A., Magolda R. L., Scherle P. A., Trzaskos J. M. 1998. Identification of a novel inhibitor of mitogen-activated protein kinase kinase. J. Biol. Chem. 273 : 18 623—18 632.

Fujisawa T., Takeda K., Ichijo H. 2007. ASK family proteins in stress response and disease. Mol. Biotechnol. 37 : 13—18.

Guan Q. H., Pei D. S., Zong Y. Y., Xu T. L., Zhang G. Y. 2006. Neuroprotection against ischemic brain injury by a small peptide inhibitor of c-Jun N-terminal kinase (JNK) via nuclear and non-nuclear pathways. Neuroscience. 139 : 609—627.

Gudkov A. V., Komarova E. A. 2005. Prospective therapeutic applications of p53 inhibitors. Biochem. Biophys. Res. Commun. 331 : 726—736.

Hsu S. P., Ho P. Y., Liang Y. C., Ho Y. S., Lee W. S. 2009. Involvement of the JNK activation in terbinafine-induced p21 up-regulation and DNA synthesis inhibition in human vascular endothelial cells. J. Cell. Biochem. 108 : 860—866.

Kaji A., Zhang Y., Nomura M., Bode A. M., Ma W. Y., She Q. B., Dong Z. 2003. Pifithrin-alpha promotes p53-mediated apoptosis in JB6 cells. Mol. Carcinog. 37 : 138—148.

Kim E. K., Choi E. J. 2015. Compromised MAPK signaling in human diseases: an update. Arch. Toxicol. 89 : 867—882.

Kim S., Han J., Lee S. K., Hur S. M., Koo M., Cho D. H., Bae S. Y., Choi M. Y., Shin I., Yang J. H., Nam S. J., Lee J. E. 2010. Pifithrin-alfa, an Inhibitor of p53 transactivation, up-regulates COX-2 expression through an MAPK-dependent pathway. Pharmacology. 86 : 313—319.

Komarov P. G., Komarova E. A., Kondratov R. V., Christov-Tselkov K., Coon J. S., Chernov M. V., Gudkov A. V. 1999. A chemical inhibitor of p53 that protects mice from the side effects of cancer therapy. Science. 285 : 1733—1737.

Kyriakis J. M., Avruch J. 2012. Mammalian MAPK signal transduction pathways activated by stress and inflammation: a 10-year update. Physiol. Rev. 92 : 689—737.

Lee S. W., Fang L., Igarashi M., Ouchi T., Lu K. P., Aaronson S. A. 2000. Sustained activation of Ras/Raf/mitogen-activated protein kinase cascade by the tumor suppressor p53. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 97 : 8302—8305.

Lee S. Y., Shin S. J., Kim H. S. 2013. ERK1/2 activation mediated by the nutlin-3-induced mitochondrial translocation of p53. Int. J. Oncol. 42 : 1027—1035.

Lewis T. S., Shapiro P. S., Ahn N. G. 1998. Signal transduction through MAP kinase cascades. Adv. Cancer Res. 74 : 49—139.

Lin T., Mak N. K., Yang M. S. 2008. MAPK regulate p53-dependent cell death induced by benzo[a]pyrene: involvement of p53 phosphorylation and acetylation. Toxicology. 247 : 145—153.

Lorin S., Pierron G., Ryan K. M., Codogno P., Djavaheri-Mergny M. 2010. Evidence for the interplay between JNK and p53-DRAM signalling pathways in the regulation of autophagy. Autophagy. 6 : 153—154.

McCubrey J. A., Steelman L. S., Chappell W. H., Abrams S. L., Wong E. W., Chang F., Lehmann B., Terrian D. M., Milella M., Tafuri A., Stivala F., Libra M., Basecke J., Evangelisti C., Martelli A. M., Franklin R. A. 2007. Roles of the Raf/MEK/ERK pathway in cell growth, malignant transformation and drug resistance. Biochim. biophys. acta. 1773 : 1263—1284.

Menendez D., Inga A., Resnick M. A. 2009. The expanding universe of p53 targets. Nat. Rev. Cancer. 9 : 724—737.

Ongusaha P. P., Kim J. I., Fang L., Wong T. W., Yancopoulos G. D., Aaronson S. A., Lee S. W. 2003. p53 induction and activation of DDR1 kinase counteract p53-mediated apoptosis and influence p53 regulation through a positive feedback loop. EMBO J. 22 : 1289—1301.

Passos J. F., Nelson G., Wang C., Richter T., Simillion C., Proctor C. J., Miwa S., Olijslagers S., Hallinan J., Wipat A., Saretzki G., Rudolph K. L., Kirkwood T. B., von Zglinicki T. 2010. Feedback between p21 and reactive oxygen production is necessary for cell senescence. Mol. Syst. Biol. 6 : 347.

Pearson G., Robinson F., Beers Gibson T., Xu B. E., Karandikar M., Berman K., Cobb M. H. 2001. Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. Endocr. Rev. 22 : 153—183.

Persons D. L., Yazlovitskaya E. M., Pelling J. C. 2000. Effect of extracellular signal-regulated kinase on p53 accumulation in response to cisplatin. *J. Biol. Chem.* 275 : 35 778—35 785.

Porras A., Zuluaga S., Black E., Valladares A., Alvarez A. M., Ambrosino C., Benito M., Nebreda A. R. 2004. p38 alpha mitogen-activated protein kinase sensitizes cells to apoptosis induced by different stimuli. *Mol. Biol. Cell.* 15 : 922—933.

Riley T., Sontag E., Chen P., Levine A. 2008. Transcriptional control of human p53-regulated genes. *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 9 : 402—412.

Sawe N., Steinberg G., Zhao H. 2008. Dual roles of the MAPK/ERK1/2 cell signaling pathway after stroke. *J. Neurosci. Res.* 86 : 1659—1669.

She Q. B., Bode A. M., Ma W. Y., Chen N. Y., Dong Z. 2001. Resveratrol-induced activation of p53 and apoptosis is mediated by extracellular-signal-regulated protein kinases and p38 kinase. *Cancer Res.* 61 : 1604—1610.

Singh S., Upadhyay A. K., Ajay A. K., Bhat M. K. 2007. p53 regulates ERK activation in carboplatin induced apoptosis in cervical carcinoma: a novel target of p53 in apoptosis. *FEBS Lett.* 581 : 289—295.

Takeda K., Naguro I., Nishitoh H., Matsuzawa A., Ichijo H. 2011. Apoptosis signaling kinases: from stress response to health outcomes. *Antioxid. Redox. Signal.* 15 : 719—761.

Wu G. S. 2004. The functional interactions between the p53 and MAPK signaling pathways. *Cancer Biol. Ther.* 3 : 156—161.

Xia Z., Dickens M., Raingeaud J., Davis R. J., Greenberg M. E. 1995. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science.* 270 : 1326—1331.

Xiao Y., Yan W., Lu L., Wang Y., Lu W., Cao Y., Cai W. 2015. p38/p53/miR-200a-3p feedback loop promotes oxidative stress-mediated liver cell death. *Cell Cycle.* 14 : 1548—1558.

Young P. R., McLaughlin M. M., Kumar S., Kassis S., Doyle M. L., McNulty D., Gallagher T. F., Fisher S., McDonnell P. C., Carr S. A., Huddleston M. J., Seibel G., Porter T. G., Livi G. P., Adams J. L., Lee J. C. 1997. Pyridinyl imidazole inhibitors of p38 mitogen-activated protein kinase bind in the ATP site. *J. Biol. Chem.* 272 : 12 116—12 121.

Zarubin T., Han J. 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell Res.* 15 : 11—18.

Zhang H., Chi Y., Gao K., Zhang X., Yao J. 2015. p53 protein-mediated up-regulation of MAP kinase phosphatase 3 (MKP-3) contributes to the establishment of the cellular senescent phenotype through dephosphorylation of extracellular signal-regulated kinase 1/2 (ERK1/2). *J. Biol. Chem.* 290 : 1129—1140.

Поступила 27 VIII 2015

RELATIONSHIP BETWEEN p53/p21/Rb AND MAPK SIGNALING PATHWAYS IN HUMAN ENDOMETRIUM-DERIVED STEM CELLS UNDER OXIDATIVE STRESS

P. I. Deryabin, A. V. Borodkina, N. N. Nikolsky, E. B. Burova¹

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg, 194064;

¹ e-mail: lenbur87@mail.ru

Human endometrium-derived mesenchymal stem cells (hMESC) under the sublethal oxidative stress induced by H₂O₂ activate both p53/p21/Rb and p38MAPK/MAPKAPK-2 pathways that are responsible for the induction of hMESC premature senescence (Borodkina et al., 2014). However the mutual relations between p53/p21/Rb and MAPK signaling pathways, including ERK, p38 and JNK remain unexplored as yet. Here, we used the specific inhibitors — pifithrin- α (PFT), U0126, SB203580 and SP600125 to «switch off» one of the proteins in these cascades and to evaluate the functional status alterations of the rest proteins. Suppression each of the MAPK significantly increased the p53 phosphorylation levels, as well as p21 protein expression followed by Rb hypophosphorylation. On the other hand, PFT-induced p53 inhibition enhanced mostly the ERK1/2 activation compared with p38 and JNK. These results suppose the existence of the reciprocal negative regulation between p53- and MAPK-dependent signaling pathways. Analyzing the possible interactions among the members of the MAPK family, we showed that p38 and JNK can function as the ERK antagonists: JNK is capable to activate ERK, while p38 may block the ERK activation. Together, these results demonstrate complex links between different signaling cascades in stressed hMESC, implicating ERK, p38 and JNK in regulation of the premature senescence via p53/p21/Rb pathway.

Key words: premature senescence, MAPK, pifithrin- α , p53, endometrial stem cells, oxidative stress, signaling pathways.