

# ВЗАИМНОЕ ВЛИЯНИЕ ОПУХОЛЕВЫХ СУПРЕССОРОВ P53 И ARF НА РЕГУЛИРУЕМУЮ ИМИ АУТОФАГИЮ В КЛЕТКЕ

THE MUTUAL IMPACT OF TUMOR SUPPRESSORS P53 AND ARF ON THE AUTOPHAGY IN THE CELL THAT IS REGULATED BY THESE SUPPRESSORS

**A. Soloviev**  
**A. Budina**  
**T. Anaschenkova**

*Summary.* The article presents data on the mutual impact of tumor suppressors p53 and p14ARF on non-selective autophagy. Experiments on H1299 lung carcinoma cells and mouse embryonic fibroblasts (MEF) have shown that activation of nonselective autophagy by p14ARF tumor suppressor does not depend on p53 expression in the cell. The silencing of tumour suppressor p53 activates autophagy due to the induction of ARF.

*Keywords:* autophagy, tumor suppressor, p53ARF, p14ARF.

**Соловьев Александр Семенович**

*Д.м.н., профессор, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»  
Aleksolo46@yandex.ru*

**Будина Анна Павловна**

*К.м.н., стажер-исследователь, Институт Вистар, Филадельфия, США*

**Анащенко Татьяна Александровна**

*К.м.н., доцент, ФГБОУ ВО «Смоленский государственный медицинский университет»*

*Аннотация.* В статье представлены данные о взаимном влиянии опухолевых супрессоров p53 и p14ARF на неселективную аутофагию. В экспериментах на клетках карциномы легких H1299 и эмбриональных фибробластах (MEF) мышей показано, что активация неселективной аутофагии опухолевым супрессором p14ARF не зависит от экспрессии p53 в клетке. Подавление экспрессии опухолевого супрессора p53 активирует аутофагию вследствие индукции ARF.

*Ключевые слова:* аутофагия, опухолевой супрессор, p53, p14ARF.

## Актуальность проблемы

**А**утофагия (от греческого «auto» — само и «phagein» — поглощать) — генетически запрограммированный катаболический процесс, при котором собственные компоненты клетки, включая макромолекулы и органеллы, доставляются к лизосомам для деградации. В обычных условиях это способствует обновлению органелл и поддержанию гомеостаза в клетке [23]. Однако в условиях недостатка питательных веществ в клетке аутофагия выступает в роли компенсаторного механизма, который обеспечивает клетку субстратом и энергией [22]. Голодание и широкий спектр стрессов резко индуцируют аутофагию, которая имеет решающее значение для выживания клеток и организма в этих условиях [7].

Процесс аутофагии в клетке тонко регулируется на генном уровне с включением в этот процесс многих белковых факторов [8, 10]. Дерегуляция аутофагии в настоящее время рассматривается как одна из ключевых особенностей, способствующих развитию опухоли [13, 16].

Данные литературы о взаимоотношении аутофагии и опухолевого роста свидетельствуют, что аутофагия в целом является сдерживающим фактором опухолевого роста [5, 23]. В тоже время показано, что аутофагия

подавляет образование опухоли на начальных этапах ее развития. На более поздних этапах опухолевого процесса аутофагия способствует дальнейшему развитию опухоли [1]. Это связано с тем, что аутофагия используется опухолевыми клетками как механизм выживания в стрессовых ситуациях, к которым относятся ограничение количества питательных веществ, гипоксия и т.д. [17].

Важное значение имеет раскрытие основных сигнальных путей, регулирующих аутофагию и, в то же время, контролирующих развитие опухоли [13]. В настоящее время изучается ряд белков — супрессоров опухоли в качестве важных регуляторов аутофагии, истощение или мутация которых способствует образованию опухоли. К таким опухолевым супрессорам относятся p53 и белковый продукт альтернативной рамки считывания локуса CDKN2A — p14ARF. Пути p53, ARF и аутофагии функционально переплетены и это имеет важное значение для стрессовых реакций, метаболизма и рака [1, 22].

Важную роль в процессе аутофагии играет ключевой белок — супрессор опухоли p53. Установлены модуляторные функции ядерного p53, направленные на активацию аутофагии. В тоже время физиологический уровень белка p53, локализованного в цитоплазме, оказывает ингибирующее действие на аутофагию [4, 19]. Генотоксический стресс или активация онкогенов, сопрово-

ждающиеся активацией p53 в ядре клетки, стимулируют аутофагию [1]. Вместе с тем накапливаются данные, что дефицит p53 в цитоплазме клетки активирует аутофагию [2, 4]. Показано, что гипоксия и голодание запускают протеосомную деградацию p53 в цитоплазме, необходимую для активации аутофагии в клетках, переживающих различные виды стресса [17]. Таким образом, экспериментальные данные убедительно свидетельствуют, что p53 может выступать как активатор, так и ингибитор аутофагии в зависимости от его субклеточной локализации. Это имеет особое значение, так как дефицит p53 или мутантные варианты p53, накапливающиеся в цитоплазме опухолевых клеток, способствуют активации аутофагии и прогрессированию опухоли [11, 18].

Супрессор опухоли человека p14ARF, который незначительно экспрессируется в нормальных клетках, но экспрессируется в опухоли, также обладает способностью контролировать аутофагию, проявляя супрессивное действие на опухоль [3, 15]. Причем способностью индуцировать аутофагию обладает как полноразмерный белок — супрессор p14ARF, так и его укороченная форма [20]. В настоящее время хорошо изучена основная функция ARF в клеточном цикле, которая сводится к стабилизации опухолевого супрессора p53, что приводит к активации p53-опосредованного апоптоза или блокады клеточного цикла [1, 13]. С другой стороны показано, что p53 транскрипционно подавляет ARF, а опухолевые клетки с мутацией p53 часто экспрессируют высокие уровни ARF [1]. В последние годы широко исследуются независимые от p53 функции ARF как в нормальных, так и злокачественных опухолевых клетках [3, 9, 21, 24]. В тоже время недостаточно изучены вопросы взаимного влияния p53 и ARF в индукции аутофагии. В связи с этим нами предпринята попытка рассмотреть некоторые механизмы такого влияния p14ARF и p53 в активации неselectивной аутофагии.

### Цель исследования

Целью исследования явилось изучение взаимного влияния экспрессии опухолевых супрессоров ARF и p53 на регулируемую ими аутофагию.

### Материалы и методы

В работе использована клеточная линия карциномы легких H1299 и эмбриональные фибробласты (MEF) мышей дикого типа (wt MEF) и с полной делецией гена ARF (arf<sup>-/-</sup>). Для нокдауна генов TP53 и ARF в клетках использовали ретровирусные векторы, экспрессирующие малые интерферирующие РНК (short hairpin RNA) [15, 19]. Для получения полноразмерной и укороченной формы p14ARF использовали клетки опухоли поджелудочной железы Саран 2. На основе мРНК, выделенной из клеток

Саран 2, получали кДНК p14ARF полноразмерной формы ARF(1–173). Используя полученную кДНК в качестве матрицы, с помощью полимеразной цепной реакции и специфических праймеров была генерирована укороченная форма ARF (42–173). Полноразмерную и укороченную формы ARF клонировали в плазмиду pGEM-I Easy (pGEM-I Easy Vector System, Promega, США). Полученные векторы трансфецировали в клетки карциномы легких H1299 для создания двух различных клеточных линий. Чтобы добиться регулируемой экспрессии генов для каждого варианта ARF (1–173, 42–173) были созданы клеточные линии карциномы H1299, содержащие тетрациклин-регулируемую систему экспрессии генов. Инкубация клеток в присутствии доксициклина приводит к повышению экспрессии гена белка ARF, что облегчает изучение этого опухолевого супрессора [6, 14]. Экспрессию исследуемых белков в клеточных лизатах определяли методом Вестерн-блоттинга с использованием соответствующих антител к белкам. Активность аутофагии оценивали по уровню белков LC3 и p62. Активация аутофагии приводит к деградации адаптора аутофагии белка p62 и смещению соотношения между белками LC3-I и LC3-II в сторону повышения LC3-II. В этой связи белки p62 и LC3 являются хорошими маркерами для изучения динамики процесса аутофагии [12, 25]. Уровень аутофагии определяли также методом иммуноцитофлуоресцентного анализа. С этой целью клетки H1299 трансфецировали плазмидой GFP-LC3, кодирующей зеленый флуоресцентный белок GFP (Green Fluorescent protein), слитый с белком аутофагосом LC3. При активации аутофагии белок LC3 накапливается в аутофагосомах, что приводит к накоплению GFP в цитоплазматических вакуолях-аутофагосомах. Формирование аутофагосом анализировали с помощью конфокальной микроскопии. Скопление аутофагосом в клетках исследовали и методом трансмиссивной электронной микроскопии с расчетом среднего значения аутофагосом в клетке. Статистическую достоверность различий оценивали путем расчета *t* критерия Стьюдента в программе SigmaProt V.10. Различия считали достоверными при *p* < 0,05.

### Результаты исследования

Для изучения возможного влияния p53 на ARF-опосредованную аутофагию была исследована способность ARF индуцировать аутофагию при отсутствии p53 в клетке. С этой целью были использованы клетки аденокарциномы легких человека H1299, в которых белок p53 отсутствует. В связи с тем, что в обычных условиях уровень ARF в клетках низок, мы предварительно в клетки карциномы H1299 трансфецировали векторы экспрессии полноразмерного белка ARF человека (1–173) и укороченной формы ARF (42–173) для создания клеточных линий с доксициклин-регулируемой экспрессией генов ARF.

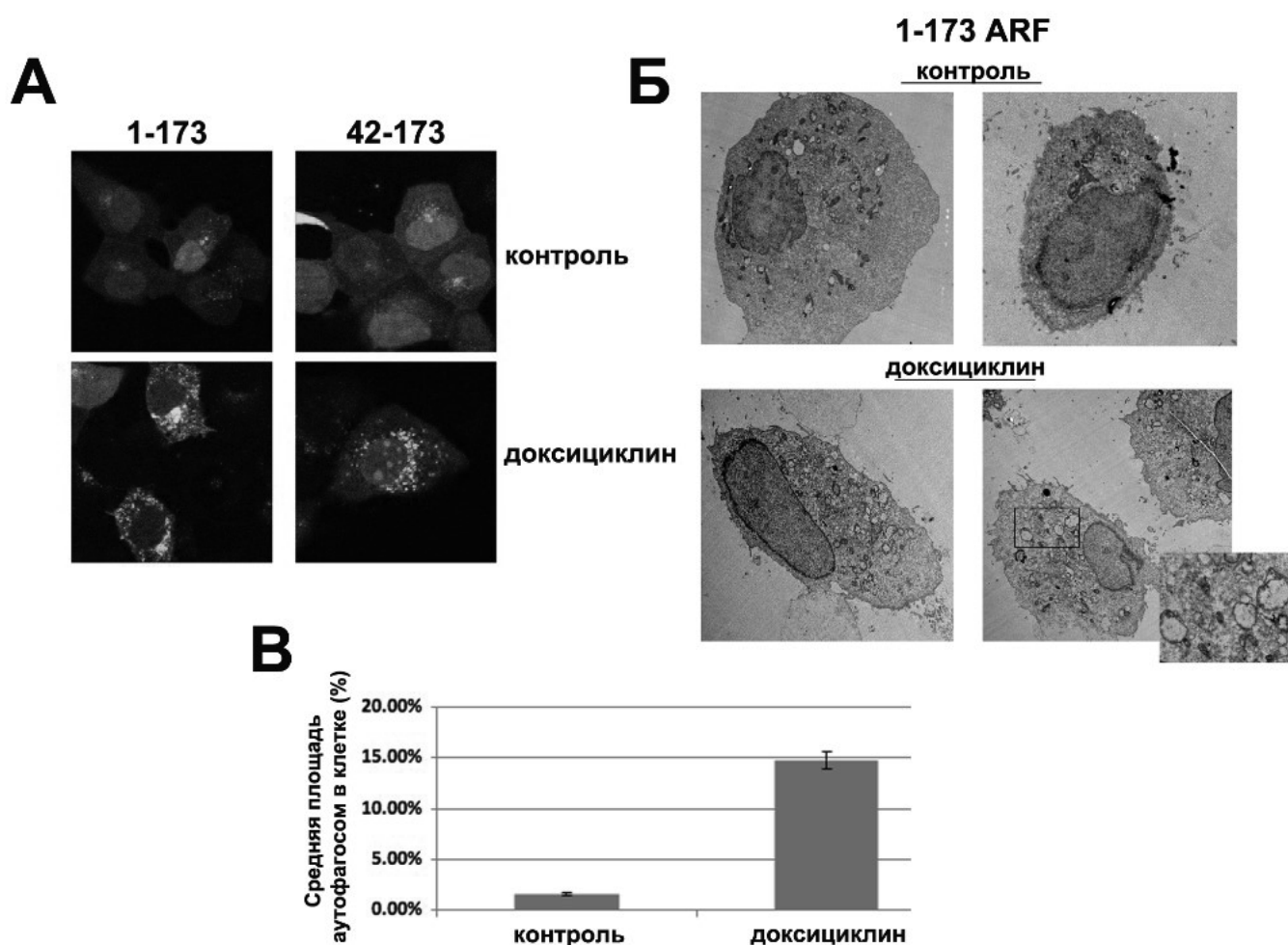


Рис. 1. Определение уровня аутофагии в клетках H1299 до и после индукции ARF доксициклином.

Для выявления аутофагии исследовали накопление аутофagosом в клетках H1299. С этой целью клетки трансфицировали вектором GFP-LC3, содержащим белок аутофagosом LC3 с зеленой меткой GFP. С использованием конфокальной микроскопии было выявлено, что активация обеих форм ARF доксициклином в клетках H1299 стимулировала накопление GFP-LC3 позитивных вакуолей, что характерно для аутофагии (рис. 1А). При электронной микроскопии установлено, что экспрессия 1–173 и 42–173 ARF в клетках H1299 увеличивало число двумембранных аутофagosом в цитоплазме клеток, что подтверждает ARF-опосредованный характер аутофагии (рис. 1Б). Средняя площадь аутофagosом в каждой клетке возросла примерно в 5 раз по сравнению с контрольными не стимулированными доксициклином клетками (рис. 1В).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что отсутствие p53 в клеточной линии H1299 не влияет на способность ARF к активации аутофагии. Активация неселективной аутофагии опухолевым су-

прессором p14ARF не зависит от экспрессии p53 в клетке.

Чтобы доказать, что аутофагия при подавлении экспрессии p53 опосредована именно белком ARF в следующей серии экспериментов мы получили эмбриональные фибробласты (MEF) от мышей дикого типа (wt MEF) и от мышей с полной делецией гена ARF (arf -/-). Затем в MEF дикого типа и arf -/- MEF блокировали экспрессию гена TP53 с помощью специфической для него малой интерферирующей РНК. С этой целью клетки инфицировали ретровирусом, экспрессирующим короткую шпильку shPHK (short hairpin RNA).

Нокдаун гена TP53 в MEF дикого типа вызвал повышение экспрессии ARF и активировал деградацию p62, что свидетельствует об активации аутофагии. Однако нокдаун гена TP53 в клетках с отсутствием ARF не приводил к индукции аутофагии (рис. 2А). Подобные результаты при исследовании влияния нокдауна гена TP53 на индукцию аутофагии в wtMEF и arf -/- были получены при

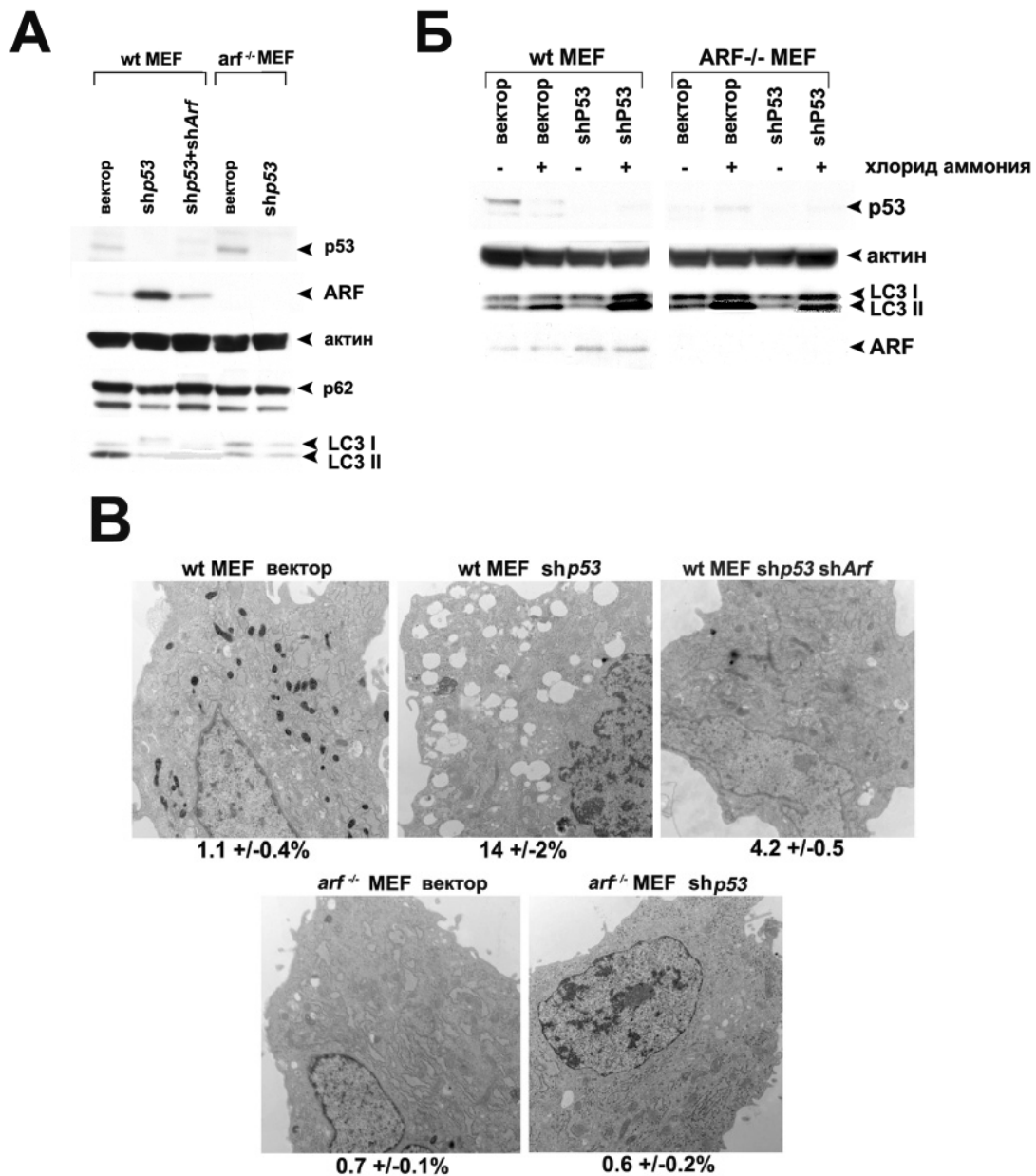


Рис. 2. Исследование влияния экспрессии p53 на ARF — опосредованную аутофагию.

изучении накопления LC3-II. Так как соотношение LC3-I и LC3-II не всегда отражает истинный уровень аутофагии, мы измерили уровень изоформы LC3-II в клетках в присутствии или отсутствии ингибитора лизосом NH<sub>4</sub>Cl. Нокаун гена TP53 в MEF дикого типа в присутствии ингибитора сопровождался значительной аккумуляцией LC3-II (рис. 2Б). Это указывало на то, что ARF активировал продукцию LC3-II (а значит и аутофагию) до того, как деградация белка лизосомами была заблокирована. Однако нокаун гена TP53 в клетках с отсутствием ARF и инкубированных в присутствии хлорида аммония не показал дополнительного увеличения содержания изоформы LC3-II (рис. 2Б).

Результаты по исследованию уровня маркеров аутофагии белков p62 и LC3-II в клетках дикого типа и arf<sup>-/-</sup> при нокауне гена TP53 согласовались с данными электронной микроскопии. Электронная микроскопия выявила образование аутофagosом в wtMEF после блокирования экспрессии p53, чего не наблюдалось в arf<sup>-/-</sup> MEF (рис. 2В). Более того, деградация p62 и аккумуляция аутофagosом полностью прекращалась при одновременном нокауне генов TP53 и ARF в нормальных MEF. Полученные результаты явствуют, что подавление экспрессии опухолевого супрессора p53 активирует неселективную аутофагию вследствие индукции ARF, по крайней мере, в эмбриональных фибробластах мыши.

## Заключение

На основании проведенных экспериментов по оценке взаимного влияния опухолевых супрессоров p53 и ARF на регулируемую ими аутофагию можно конста-

тировать, что активация неселективной аутофагии опухолевым супрессором p14ARF не зависит от экспрессии p53 в клетке. Подавление экспрессии опухолевого супрессора p53 активирует аутофагию вследствие индукции ARF.

## ЛИТЕРАТУРА

- Balaburski G.M., Hontz R. D., Murphy M. E. p53 and ARF: unexpected players in autophagy // *Trends Cell Biol.* — 2010. — № 20 (6). — P. 363–369.
- Comel A., Sorrentino G., Capaci V., et al. The cytoplasmic side of p53's oncosuppressive activities // *FEBS Lett.* — 2014. — № 588 (16). — P. 2600–2609.
- Fontana R., Vivo M. Dynamics of p14 ARF and focal adhesion kinase-mediated autophagy in cancer // *Cancers.* — 2018. — № 10. — P. 221.
- Green D.R., Kroemer G. Cytoplasmic functions of the tumour suppressor p53 // *Nature.* — 2009. — № 458. — P. 1127–1130.
- Han J., Goldstein L. A., Lu C., et al. Involvement of protective autophagy in TRAIL resistance of apoptosis-defective tumor cells // *Biol. Chem.* — 2008. — № 283. — P. 19665–19677.
- Humbey O, Pimkina J, Zilfou JT, et. al. The ARF tumor suppressor can promote the progression of some tumors // *Cancer Res.* — 2008. — № 68 — P. 9608–9613.
- Karsli-Uzunbas G, Guo JY, Price S., et al. Autophagy is required for glucose homeostasis and lung tumor maintenance // *Cancer Discov.* — 2014. — № 4 (8). — P. 914–927.
- Kenzelmann Broz D, Spano Mello S, Biegling KT, et al. Global genomic profiling reveals an extensive p53-regulated autophagy program contributing to key p53 responses // *Genes Dev.* — 2013. — № 27 (9). — P. 1016–1031.
- Kotsinas A, Papanagnou P, Evangelou K., et al. ARF: a versatile DNA damage response ally at the crossroads of development and tumorigenesis // *Front Genet.* — 2014. — 5:236.
- Mizushima N, Komatsu M. Autophagy: renovation of cells and tissues // *Cell.* — 2011. — № 147 (4). — P. 728–741.
- Morselli E., Tardemir E., Maiuri M. C., et. al. Mutant p53 protein localized in the cytoplasm inhibits autophagy // *Cell Cycle.* — 2008. — № 7 (19). — P. 3056–61.
- Moscat J., Karin M., Diaz-Meco M.T. P62 in cancer: signaling adaptor beyond autophagy // *Cell.* — 2016. — № 167 (3). — P. 606–609.
- Mrakovic M., Frohlich L. F. P53-mediated molecular control of autophagy in tumor cells // *Biomolecules.* — 2018. — № 8 (14).
- Pimkina J., Murphy M. E. ARF, autophagy and tumor suppression // *Autophagy.* — 2009. — № 5 (3). — P. 397–399.
- Pimkina J., Humbey O., Zilfou J. T., et al. ARF induces autophagy by virtue of interaction with Bcl-xl // *Journal of biological chemistry.* — 2009. — № 5 (284). — P. 2803–2810.
- Singh SS, Vats S, Chia AY., et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer // *Oncogene.* — 2018. — № 37 (9). — P. 1142–1158.
- Tasdemir E., Maiuri M. C., Galluzzi L., et al. Regulation of autophagy by cytoplasmic p53 // *Nat Cell Biol.* — 2008. — № 10 (6). — P. 676–687.
- Tasdemir E., Maiuri M. C., Orhon I., et al. P53 represses autophagy in cell cycle-dependent fashion // *Cell Cycle.* — 2008. — № 7 (19). — P. 3006–3011.
- Tasdemir E., Maiuri M. C., Morselli E., et al. A dual role of p53 in the control of autophagy // *Autophagy.* — 2008. — № 4 (6). — P. 810–814.
- Ueda Y., Koya T., Yoneda-Kato N., et. al. Small mitochondrial ARF (smARF) is located in both the nucleus and cytoplasm, induces cell death, and activates p53 in mouse fibroblasts // *FEBS Lett.* — 2008. — № 582. — P. 1459–1464.
- Vivo M, Fontana R, Ranieri M, et al. P14 ARF interacts with the focal adhesion kinase and protects from anoikis // *Oncogene.* — 2017. — № 6 (4). — P. 4913–4928.
- White E. Autophagy and p53 // *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine.* — 2016. — № 6 (4).
- White E. The role for autophagy in cancer // *The journal of Clinical Investigation.* — 2015. — № 125 (1). — P. 42–46.
- Zhao R., Choi B. Y., Lee M. H., et al. Implications of genetic and epigenetic alterations of CDKN2A [p16 INK4a] in cancer // *EBioMedicine* — 2016. — № 8. — P. 30–39.
- Zhang H.M., Li S. P., Yu Y., et. al. Bi-directinal roles of IRF-1 on autophagy diminish its prognostic value as compared with Ki 67 in liver transplantation for hepatocellular carcinoma // *Oncotarget.* — 2016. — № 7 (25). — P. 37979–37992.

© Соловьев Александр Семенович (Aleksolo46@yandex.ru), Будина Анна Павловна, Анащенко Татьяна Александровна.

Журнал «Современная наука: актуальные проблемы теории и практики»