

УДК 577.2

# Сверхэкспрессия аденовирусного E1A сенсibiliзирует клетки, трансформированные E1A+Ras, к действию ингибиторов гистоновых деацетилаз

М. В. Иготти\*, С. Б. Светликова, В. А. Поспелов

Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

\*E-mail: marie.igotti@gmail.com

Поступила в редакцию 18.05.2018

Принята к печати 23.10.2018

**РЕФЕРАТ** Аденовирусный белок E1A рассматривается в качестве потенциального средства комплексной терапии злокачественных опухолей. Наибольший цитотоксический эффект E1A в опухолевых клетках наблюдается при совместном применении с ингибиторами гистоновых деацетилаз (ИГД). Однако ранее мы установили, что ИГД не вызывают апоптотической гибели клеток, трансформированных E1A и активированным *cHa-ras*. В представленной работе показано, что в таких клетках ИГД подавляют транскрипцию с собственного промотора гена E1A, что приводит к развитию клеток преимущественно по *cHa-ras*-зависимому пути, который вызывает активацию антиапоптотических каскадов PI3K/Akt и NF- $\kappa$ B. Однако ИГД способны индуцировать апоптотическую гибель клеток E1A+Ras при условии высокой нерегулируемой экспрессии E1A с цитомегаловирусного промотора, активность которого не подавляется ИГД. Таким образом, для эффективного цитотоксического воздействия ИГД и E1A на клетки опухоли оптимальной является экспрессия гена E1A с промотора, независимого от ИГД.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аденовирус, апоптоз, E1A, *cHa-ras*, ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД), трансформированные клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИГД – ингибиторы гистоновых деацетилаз; mERas – эмбриональные фибробласты мыши, трансформированные *cHa-ras* и E1A; NaBut – бутират натрия.

## ВВЕДЕНИЕ

Ранний ген E1A аденовируса человека типа 5 экспрессируется в инфицированной клетке и обеспечивает условия для репликации вируса [1]. В первое время E1A считали онкогеном из-за его способности immortalizировать клетки грызунов и в кооперации с другими онкогенами трансформировать их [2, 3]. Позднее обнаружили, что E1A проявляет противоопухолевую активность [4], в связи с чем его иногда рассматривают как опухолевый супрессор.

Трансформирующая активность E1A определяется его способностью дерегулировать клеточный цикл, связываясь и изменяя активность таких клеточных факторов, как белки семейства pRb [5–7], а также ингибиторы циклинзависимых киназ p21Waf1 [8, 9] и p27Kip1 [10]. E1A взаимодействует также с белками, ремоделирующими хроматин, включая гистон-ацетилтрансферазы (p300/CBP) [11] и гистоновые деацетилазы [12], что приво-

дит к изменению транскрипции ряда генов, вовлеченных в регуляцию клеточного цикла. Известно, что ДНК и белок E1A аденовируса обнаруживаются в клетках легочного эпителия пациентов с хронической обструктивной болезнью легких [13]. Однако, как уже сказано, E1A обладает противоопухолевой активностью и является объектом клинических исследований [14, 15]. Многие экспериментальные данные свидетельствуют о том, что экспрессия аденовирусного белка E1A повышает чувствительность раковых клеток млекопитающих к действию ряда цитотоксических агентов, используемых в противоопухолевой терапии, таких, как этопозид, цисплатин, таксаны и др. [16–19]. При этом совместное действие E1A-генотерапии и ИГД приводило к более существенному повышению уровня гибели раковых клеток при минимальном негативном воздействии на нормальные клетки, чем действие таксола или этопозиды [19].

Аденовирусный E1A способствует апоптотической гибели клеток, модулируя экспрессию генов, регулирующих апоптоз [17–19], активацию MAP-киназы p38 [17] и подавление антиапоптотического фактора NF- $\kappa$ B [20, 21]. Также E1A стабилизирует p53 через модификацию убиквитин-протеасомного механизма [16, 22], в результате чего в клетках, экспрессирующих белок E1A аденовируса, устанавливается повышенное содержание белка p53, что приводит к p53-зависимому апоптозу [16].

Уровень апоптоза в клетках, экспрессирующих E1A, может быть снижен комплементирующим трансформирующим онкогеном *ras*, который, стимулируя киназный каскад Ras/Raf/MEK/ERK, активирует антиапоптотический каскад PI3K/Akt и NF- $\kappa$ B [23]. Антиапоптотические функции Ras связаны также с его способностью стимулировать экспрессию антиапоптотических белков Bcl-2 и Bcl-XL [23]. Так, действие проапоптотического белка E1A и онкогенного Ras сбалансировано в эмбриональных фибробластах мыши, стабильно трансформированных вектором, кодирующим *cHa-ras*, и плазмидой, кодирующей белок E1A аденовируса человека типа 5 [24].

Ингибиторы гистоновых деацетилаз (ИГД) подавляют рост опухолевых клеток, вызывая остановку клеточного цикла, старение или апоптоз, не оказывая при этом токсического воздействия на нормальные клетки [25, 26]. Поэтому ИГД рассматривают как вещества, имеющие перспективы в качестве противоопухолевых препаратов.

Ранее мы показали, что ИГД вызывают остановку клеточного цикла и старение клеток, трансформированных онкогенами *cHa-Ras* и E1A [27–29], но не индуцируют их гибель, что в значительной степени отличает эти клетки от ряда опухолевых клеток, где ИГД стимулируют апоптотическую гибель [25, 26]. Поэтому мы изучали причины отсутствия апоптотической гибели клеток, экспрессирующих E1A с активированным Ras, при действии ИГД. Установлено, что способность клеток, трансформированных E1A и *cHa-ras*, избежать гибели при воздействии ИГД обусловлено ИГД-зависимым снижением экспрессии E1A и активации антиапоптотического фактора NF- $\kappa$ B. Соответственно индукция апоптоза в E1A+Ras-трансформированных клетках ингибиторами гистоновых деацетилаз возможна только при условии нерегулируемой экспрессии E1A.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии

Исследования проводили на линии эмбриональных фибробластов мыши, стабильно трансформированных вектором, кодирующим *cHa-ras*, и плазмидой p1A,

содержащей нуклеотиды 1–1634 генома аденовируса человека типа 5, кодирующие белок E1A [16, 24]. Клетки обрабатывали NaBut (4 мМ) в течение 24–72 ч.

### Распределение клеток по содержанию ДНК

Распределение клеток по содержанию ДНК изучали методом проточной цитофлуориметрии. Клетки промывали раствором PBS (0.14 М NaCl, 2.7 мМ KCl, 6.5 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.5 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.2), пермеабилizировали сапонином в конечной концентрации 0.01% в течение 20 мин и многократно отмывали от сапонины раствором PBS. Затем клетки инкубировали в присутствии РНКазы А (100 мкг/мл) и йодида пропидия (10 мкг/мл, 15 мин при 37°C) с последующим анализом на проточном цитофлуориметре Coulter Epicks XL (Becton, США).

### Жизнеспособность клеток

Жизнеспособность клеток оценивали с помощью МТТ-теста. Для этого клетки рассеивали на 96-луночные планшеты в плотности  $2 \times 10^3$  клеток на ячейку и культивировали в присутствии или в отсутствие соответствующих ингибиторов в течение 24 ч. Жизнеспособность определяли спектрофотометрически, оценивая метаболическую активность клеток по способности восстанавливать 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид (МТТ) (Sigma) в нерастворимый пурпурный формазан. Клетки инкубировали в растворе МТТ в конечной концентрации 0.5 мг/мл, приготовленном на PBS (1.5 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе), после чего удаляли среду культивирования, а клетки суспендировали в диметилсульфоксиде (ДМСО). Определяли оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 570 нм на Multiscan-EX (Labsystems), используя ДМСО в качестве нулевого контроля.

### Иммуноблоттинг белков

Клетки лизировали в буфере, содержащем 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз и фосфатаз. Белки разделяли электрофоретически, переносили на мембрану PVDF (Millipore) и анализировали с помощью соответствующих специфических антител. Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США). Использовали антитела против белков E1A (M73) (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), Gapdh (14C10) (Cell Signalling, США) и pan-Ras (Oncogene Sci., США).

### Анализ транскрипции генов

Клеточную РНК выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США). Реакцию обратной транскрипции

проводили, используя 2 мкг РНК. Реакцию амплификации (ПЦР) проводили в присутствии 100 нг соответствующих праймеров к кДНК генов *e1a* и *gapdh* мыши: 5'-TGTTGATGGGTGTGAACCCAG-3'/5'-CCAGTGAGSTTCCCGTTTCAG-3'. ПЦР в пределах линейной амплификации фрагментов ДНК продолжалась в течение 25–35 циклов. Специфический продукт реакции анализировали с помощью электрофореза в 2% агарозном геле.

### Активность каспазы-3

Активность каспазы-3 *in vitro* оценивали по разрезанию специфического колориметрического субстрата Ac-DEVD-pNA (Calbiochem). Клетки лизировали в течение 20 мин при +4°C в буфере, содержащем 50 мМ Трис-НСl, рН 7.5; 120 мМ NaCl; 1 мМ EDTA; 1% NP-40 и ингибиторы протеаз. Активность каспаз определяли на 96-луночных плато в 40 мкл лизатов, смешанных с 160 мкл реакционного буфера (20% глицерин; 0.5 мМ EDTA; 5 мМ ДТТ; 100 мМ HEPES, рН 7.5) с субстратом Ac-DEVD-pNA. Эффективность разрезания субстрата определяли спектрофотометрически по накоплению *n*-нитроанилида при длине волны 405 нм на планшетном спектрофотометре Multiscan-EX (Labsystems).

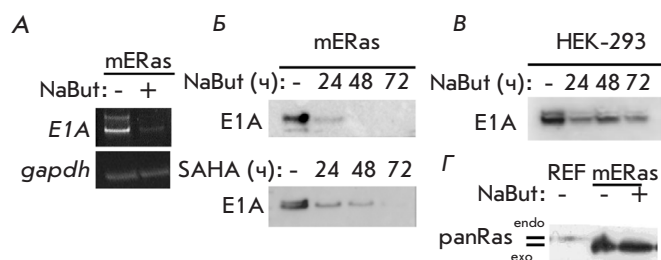
### Временные трансфекции и анализ люциферазной активности

Клетки трансфицировали, используя реагент Lipofectamine-2000 (Invitrogen), по протоколу фирмы-производителя. Для трансфекции использовали люциферазный репортерный вектор, содержащий три копии NF-κB-связывающих последовательностей (3 × κB-luc). В качестве внутреннего контроля использовали экспрессию люциферазы Renilla. Через 24 ч после трансфекции клетки обрабатывали 4 мМ NaBut, а через 48 ч подвергали процессингу согласно инструкции производителя для измерения активности люциферазы. Люциферазную активность определяли на люцинометре TD-20/20 (Turner Designs). Каждый эксперимент повторяли не менее 3 раз.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Ингибитор гистоновых деацетилаз бутират натрия подавляет экспрессию аденовирусного E1A

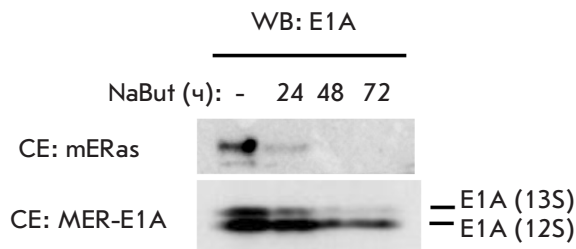
Чтобы выяснить причины отсутствия ожидаемого цитотоксического эффекта ИГД в E1A-экспрессирующих клетках, мы проанализировали влияние ИГД бутирата натрия (NaBut) на экспрессию трансформирующих онкогенов. Представленные на *рис. 1* данные показывают, что экспрессия E1A снижается в присутствии NaBut. Так в ЭФК, транс-



**Рис. 1.** Снижение экспрессии E1A при действии NaBut в клетках, экспрессирующих E1A. А – ОТ-ПЦР-анализ транскрипции гена *E1A* в клетках mERas, необработанных (-) и обработанных в течение 16 ч NaBut (+). Б – иммуноблоттинг белков из клеток mERas, необработанных или обработанных NaBut в течение 24–72 ч (верхняя панель) или 2.5 мкМ SAHA (нижняя панель) с антителами против E1A аденовируса человека типа 5 (E1A5Ad). В – иммуноблоттинг белков из клеток HEK-293 с антителами против E1A5Ad. Г – иммуноблоттинг белков из клеток mERas с антителами против panRas

формированных онкогенами E1A и сHa-Ras (линия mERas), уже в первые часы действия NaBut снижается как транскрипция гена *E1A* (*рис. 1А*), так и количество белкового продукта E1A (*рис. 1Б*). Специфичен ли наблюдаемый эффект для конкретной клеточной линии и используемого ИГД? Чтобы понять это, мы проанализировали экспрессию E1A в трансформированных линиях человека, а также использовали альтернативные ИГД. Оказалось, что вальпровая кислота (VA), трихостатин А (TSA) (данные не представлены) и вориностат также приводили к уменьшению E1A в трансформантах mERas (*рис. 1Б*, нижняя панель). Результаты, приведенные на *рис. 1В*, показывают, что снижение экспрессии E1A при действии ИГД не является специфичным только для линии mERas. Методом иммуноблоттинга показано, что в присутствии NaBut уменьшается количество белка E1A в трансформированных клетках почечного эпителия человека HEK-293. Результаты иммуноблоттинга показывают, что экспрессия белка Ras не изменяется при действии NaBut (*рис. 1Г*). Таким образом, установлено, что ИГД подавляют экспрессию аденовирусного E1A, тогда как экспрессия Ras не модулируется ИГД.

Выявленное нами снижение содержания белка E1A при действии ИГД может приводить к сдвигу баланса активностей трансформирующих белков в клетках mERas. При этом доминирующим становится действие онкогенного Ras. Мы предположили, что низкий уровень апоптотической гибели клеток, трансформированных E1A+Ras, в присутствии ИГД связан со снижением экспрессии проапоптотического



**Рис. 2.** Иммуноблоттинг белков клеток mERas (верхняя панель) и MER-E1A (нижняя панель), обработанных NaBut в течение 24–72 ч, с антителами против E1A5Ad

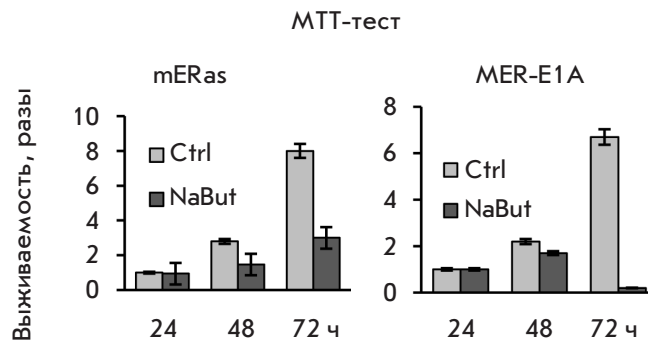
белка E1A и активацией антиапоптотического каскада Ras/Akt/NF-κB.

**Получение E1A+Ras-трансформированной клеточной линии, с нерегулируемой ИГД экспрессией E1A**

Клеточную линию mERas-1A получали с использованием плазмиды p1A, которая содержит нуклеотиды 1–1634 генома аденовируса человека типа 5, кодирующие белок E1A [16, 24]. В этих клетках экспрессия гена E1A регулируется собственным промотором. Чтобы проверить гипотезу, согласно которой снижение экспрессии E1A необходимо для уменьшения индуцируемого ИГД апоптоза, мы сначала на основе клеток mERas создали клеточную линию MER-E1A, которая дополнительно экспрессирует белок E1A 12S под контролем нерегулируемого в этих условиях промотора цитомегаловируса (CMV). Регуляция и активность вирусных промоторов CMV и Ad5 имеют существенные различия. Это позволяет использовать их с различной целью в клетках-мишенях. Высокоактивный промотор CMV удобен для эффективной экспрессии трансгена.

На рис. 2 представлены результаты иммуноблоттинга, показывающие как NaBut влияет на экспрессию белка E1A в исходной клеточной линии mERas (верхняя панель) и в новой клеточной линии MER-E1A с конститутивной экспрессией E1A под контролем промотора CMV (нижняя панель). В контрольных клетках mERas экспрессия E1A снижается практически до нуля уже в первые часы действия NaBut и находится на низком уровне на протяжении всего времени исследования (до 72 ч). Однако в клетках линии MER-E1A белок E1A 12S экспрессируется на высоком уровне независимо от NaBut.

Таким образом, нами получена линия трансформированных клеток грызунов, экспрессирующая аденовирусный ген E1A под контролем промотора CMV, в которой экспрессия E1A не снижается при действии ИГД.

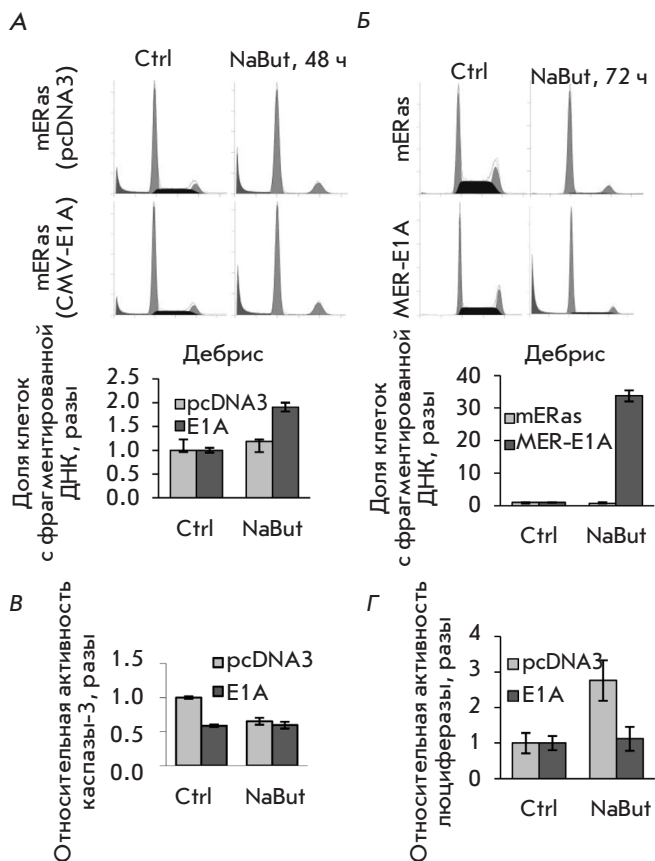


**Рис. 3.** NaBut подавляет жизнеспособность клеток mERas и MER-E1A в разной степени. Контрольные клетки mERas и клетки MER-E1A, стабильно экспрессирующие E1A, обрабатывали NaBut в течение 24–72 ч и определяли их жизнеспособность с помощью МТТ-теста. Изменение жизнеспособности (разы) оценивали относительно жизнеспособности необработанных клеток через 24 ч после посева

**Бутират натрия индуцирует апоптоз только в E1A+Ras-трансформированных клетках, количество E1A в которых не снижается при действии ИГД**

Далее сравнили влияние ИГД на пролиферацию E1A+Ras-трансформированных клеток, в которых E1A экспрессируется под контролем собственного промотора, и в клетках, где экспрессия E1A регулируется промотором CMV. Мы оценили влияние NaBut на жизнеспособность клеток в зависимости от характера экспрессии E1A. Контрольные клетки mERas и клетки MER-E1A с нерегулируемой экспрессией E1A обрабатывали NaBut в течение 24–72 ч и определяли их жизнеспособность, используя тест МТТ. Как показано на рис. 3, жизнеспособность контрольных клеток mERas, обработанных NaBut, снижается сильнее, чем необработанных. Однако количество формазана, характеризующего жизнеспособность клеток, повышается при увеличении продолжительности воздействия NaBut на клетки mERas, отражая тот факт, что клетки не делятся, но остаются живыми. Количество жизнеспособных клеток MER-E1A при этом снижается ниже стартового уровня, что указывает на их гибель.

Чтобы проверить предположение об индукции гибели клеток с нерегулируемой экспрессией E1A под действием NaBut, мы проанализировали распределение клеток по содержанию ДНК на проточном цитофлуориметре. На рис. 4А приведено распределение клеток после временной трансфекции. Видно, что NaBut не вызывает увеличения субдиплоидного пика в клетках, трансфицированных



пустым контрольным вектором pcDNA3 (рис. 4А, верхняя панель). При этом в клетках, трансфицированных CMV-E1A, доля клеток с субдиплоидным содержанием ДНК увеличивается в 2 раза уже через 48 ч после действия NaBut (рис. 4А, нижняя панель).

Полученные данные указывают на существенную разницу в характере ответа клеток на ИГД в зависимости от того, как ИГД модулируют экспрессию E1A.

Соответствующие результаты получены в стабильных клонах со сверхэкспрессией E1A под промотором CMV (MER-E1A). В контрольных клетках mERas NaBut и через 72 ч не вызывал характерного для гибнущих клеток увеличения субдиплоидного пика в гистограмме распределения по содержанию ДНК (рис. 4Б). При этом в клетках линии MER-E1A через 72 ч после действия NaBut 35% клеток содержали фрагментированную ДНК.

Таким образом, показано, что NaBut индуцирует гибель только тех Ras-трансформированных клеток, в которых экспрессия E1A не снижается при действии NaBut.

Мы проанализировали активность каспазы-3, опосредующей передачу апоптотического сигнала. Для этого клетки, трансфицированные pcDNA3 или CMV-E1A, оставляли необработанными или обрабатывали NaBut в течение 24 ч, после чего определяли активность каспазы-3 *in vitro* в клеточных лизатах. Оказалось, что в контрольных клетках, трансфицированных pcDNA3, NaBut вызывает снижение активности каспазы-3, как в исходных клетках mERas [30]. При этом в клетках, трансфицированных CMV-E1A, активность каспазы-3 не снижается при действии NaBut (рис. 4В). Различия в регуляции активности каспазы-3 ИГД в зависимости от модуляции экспрессии E1A соответствуют полученным нами данным о различиях в пролиферативном ответе таких клеток на ИГД.

#### Активность NF-κB не возрастает при действии NaBut в клетках с нерегулируемой экспрессией E1A

Ранее было показано, что ИГД активируют антиапоптотический фактор NF-κB в клетках, трансформированных E1A и cHa-ras [30]. Это позволяет трансформантам избегать апоптоза при действии ИГД. Поэтому мы сравнили влияние ИГД на активность NF-κB в клетках с регулируемой и нерегулируемой экспрессией E1A. Для этого исходные клетки mERas котрансфицировали вектором 3×κB-luc, содержащим ген люциферазы под промотором, регулируемым NF-κB, а также либо экспрессионным вектором CMV-E1A, либо пустым вектором pcDNA3 в качестве контроля. Спустя 24 ч после трансфекции клетки оставляли необработанными, либо обрабатывали NaBut в течение 24 ч, и измеряли активность люциферазы в лизатах. Оказалось, что в контрольных клетках (pcDNA3) NF-κB-зависимая транскрипция увеличивалась при действии NaBut в 3 раза, тогда как в клетках с нерегулируемой высокой экспресси-

ей E1A (CMV-E1A) активность NF- $\kappa$ B не изменялась (рис. 4Г). Нами установлено, что нерегулируемая высокая экспрессия аденовирусного E1A с промотора CMV препятствует ИГД-зависимой активации антиапоптотического фактора NF- $\kappa$ B. Таким образом, подавление активности NF- $\kappa$ B аденовирусным E1A является одной из причин индукции апоптоза ИГД в этих клетках.

### Клетки с нерегулируемой экспрессией E1A не накапливают маркер клеточного старения SA- $\beta$ -Gal при действии NaBut

Клеточное старение и апоптоз – альтернативные антипролиферативные программы, которые индуцируются цитотоксическими стресс-факторами. Ранее было показано, что ИГД индуцируют старение клеток, трансформированных онкогенами *cHa-Ras* и E1A [27–29]. Запуск программы старения в этих клетках, вероятно, связан с тем, что под действием ИГД снижается уровень экспрессии E1A, что приводит к доминированию процессов, индуцируемых активированным Ras, а именно, программы клеточного старения [31]. Чтобы проверить предположение, согласно которому клеточное старение не индуцируется в тех E1A+Ras-трансформированных клетках, экспрессия E1A в которых не подавляется ИГД, мы проанализировали экспрессию маркера стареющих клеток SA- $\beta$ -Gal. Результаты световой микроскопии, приведенные на рис. 5, показывают, что почти во всех контрольных трансформантах mERas через 72 ч действия NaBut выявляется SA- $\beta$ -Gal, что указывает на индукцию клеточного старения. Тогда как в клетках MER-E1A маркер SA- $\beta$ -Gal не накапливается. Стоит отметить, что после воздействия NaBut в течение 72 ч очень мало клеток MER-E1A оставалось прикрепленными к стеклам для дальнейшей окраски на SA- $\beta$ -Gal, а большинство клеток погибало и всплывало. Таким образом, можно заключить, что NaBut индуцирует клеточное старение в клетках, трансформированных E1A и Ras, если экспрессия E1A снижается при действии NaBut, тогда как трансформанты с конститутивной экспрессией E1A подвергаются гибели, а не старению.

### ОБСУЖДЕНИЕ

Аденовирусный E1A иммортализирует и трансформирует в кооперации с активированным Ras или другими онкогенами первичные клетки грызунов [2, 3]. В связи с этим E1A рассматривали как онкобелок, несмотря на то, что он не был ассоциирован ни с какой онкогенной активностью. Позднее обнаружили, что E1A проявляет противоопухолевую активность [2, 17–19]. Сверхэкспрессия E1A вызывает остановку пролиферации и апоптоз опухолевых клеток челове-

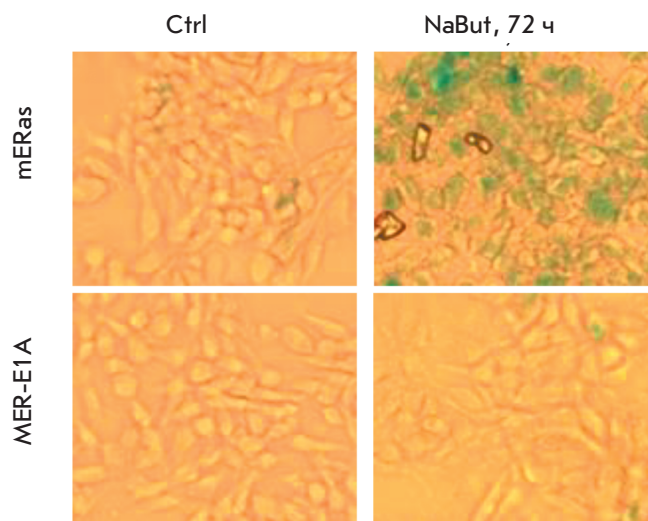


Рис. 5. Бутират натрия не вызывает старение в клетках с нерегулируемой экспрессией E1A. Окрашивание SA- $\beta$ -Gal. Клетки mERas и MER-E1A обрабатывали NaBut в течение 72 ч, после чего фиксировали и окрашивали на SA- $\beta$ -Gal

ка *in vitro* [4, 16]. Причем именно апоптоз играет ключевую роль в противоопухолевой активности E1A. В ряде доклинических исследований было показано, что липосомная или аденовирусная доставка гена E1A подавляет рост и метастазирование опухолей у животных [17, 32]. Клинические испытания генной моно-, а также комбинированной терапии с применением E1A при раке различной локализации показали рациональность такого подхода [14, 33, 34]. В последнее время усилия многих ученых направлены на изучение возможности терапии с использованием онколитических вирусов на основе аденовируса типа 5 человека (Ad5) [35]. По данным портала ClinicalTrials.gov Национального института здоровья, к настоящему моменту проведено более 180 клинических испытаний с использованием аденовирусов в той или иной форме. Основной мишенью при создании онколитических аденовирусов с ограниченной репликативной способностью является ген, кодирующий E1A, благодаря способности белка E1A побуждать покоящуюся клетку к делению за счет секвестрирования опухолевого супрессора pRb. Принимая во внимание потенциальную значимость аденовирусов и аденовирусного E1A в противоопухолевой терапии, подробное изучение функционирования и регуляции E1A, приводящие к сенсбилизации клеток к действию цитостатиков, является актуальной задачей молекулярной биологии.

Многие исследования указывают на усиление цитотоксического эффекта при совместном исполь-

зовании ИГД и аденовирусного E1A в опухолевых клетках [19, 36, 37]. ИГД не вызывали гибель использованных нами клеток, трансформированных онкогенами *cHa-ras* и *E1A*. Однако бутират натрия индуцировал апоптоз в этих клетках, если аденовирусный *E1A* экспрессировался под ИГД-нерегулируемым промотором. В работах, описывающих усиление цитотоксического эффекта при совместном использовании *E1A* и ИГД, *E1A* экспрессировался не с собственного промотора, а с промотора цитомегаловируса (CMV) или каталитической субъединицы теломеразы (TERT), активность которых не подавляется, а стимулируется ИГД [19, 38–40]. Следовательно, наши результаты подтверждают данные об эффективности совместного использования ИГД и *E1A* для элиминирования злокачественно трансформированных клеток при условии повышенной нерегулируемой экспрессии *E1A*. Приоритетность наших результатов заключается в том, что мы показали способность ИГД подавлять экспрессию *E1A* на нескольких уровнях. Во-первых, при действии NaBut снижается транскрипция гена *E1A* (рис. 1А). Регуляция экспрессии *E1A* к настоящему моменту изучена недостаточно. Не опубликованы данные о роли ацетилтрансфераз или деацетилаз в регуляции транскрипции *E1A*. Ингибирование деацетилаз гистонов активирует транскрипцию генов через релаксацию структуры хроматина. С другой стороны, ИГД могут ингибировать или активировать транскрипцию, изменяя уровень ацетилированности факторов транскрипции [41]. Таким образом, показанное нами ингибирование транскрипции *E1A* опосредовано скорее модуляцией гистоновыми деацетилазами активности факторов транскрипции, вовлеченных в регуляцию экспрессии *E1A*. В энхансерной области промотора гена ранней области *E1A* наряду с иными регуляторными элементами присутствуют два участка связывания транскрипционных факторов семейства E2F [42]. Отсутствие этих участков полностью подавляет экспрессию *E1A*, что указывает на исключительную значимость E2F-связывающих областей в регуляции транскрипции *E1A*. Ранее мы показали, что NaBut подавляет *транс*-активирующую способность фактора E2F [28, 43]. Следовательно, можно предположить, что наблюдаемое снижение экспрессии *E1A* отчасти обусловлено NaBut-зависимым ингибированием фактора E2F. Известно, что активности других часто используемых в генной инженерии вирусных промоторов – цитомегаловирусного и полиомавирусного (SV40), стимулируются ИГД [38]. Вирусные промоторы, несмотря на ряд схожих особенностей, существенно отличаются характером регуляции их активности. Например, промотор CMV положительно регулируется белком *E1A* [44], тогда как собствен-

ный промотор гена *E1A*, а также промотор HIV-LTR репрессированы белком *E1A* [45, 46]. Поэтому можно предположить, что регуляция активности вирусных промоторов ингибиторами деацетилаз также не является универсальной.

Во-вторых, наши данные свидетельствуют о том, что ИГД вызывают снижение содержания белка *E1A* как в клетках mERas, так и в линии трансформированных клеток НЕК-293 эмбриональной почки человека (рис. 1Б). Причем содержание белка *E1A* снижается более интенсивно, чем транскрипция гена *E1A*, что указывает на модуляцию стабильности белка *E1A* ингибиторами деацетилаз. Как и многие клеточные белки, белки, кодируемые вирусами, также служат субстратами ацетилтрансфераз и деацетилаз. Белок *E1A* способен связываться с p300/CBP и может ацетилироваться p300 и PCAF [47]. Ацетилирование изменяет характер взаимодействия *E1A* с белками-партнерами [48] и определяет его внутриклеточную локализацию [47]. Так, ацетилирование *E1A* препятствует ядерному импорту и соответственно приводит к накоплению *E1A* в цитоплазме. Однако показано, что ингибирование деацетилаз бутиратом натрия в клетках НЕК-293, экспрессирующих *E1A*, не увеличивало количество ацетилированного *E1A* и не приводило к накоплению *E1A* в цитоплазме [47]. Эти данные предполагают, что *E1A* подвергается быстрой деградации, следующей за ацетилированием белка. Деградация *E1A* может осуществляться в протеасомах [48]. Также показано, что белки раннего района 1А аденовирусов типа 2 и 12 (Ad2 и Ad12 *E1A*) расщепляются каспазами-3 и -7 в процессе индуцированного апоптоза в трансформированных аденовирусом клетках человека и мыши [49]. В соответствии со сказанным можно заключить, что усиленное ацетилирование белка *E1A*, индуцированное ИГД, может быть одним из факторов, определяющих деградацию *E1A*.

Сравнение ответа трансформированных клеток с регулируемой и нерегулируемой экспрессией *E1A* на ИГД показало, что апоптоз индуцировался только в клетках с нерегулируемой повышенной экспрессией *E1A*, тогда как в контрольных клетках mERas, где содержание *E1A* снижалось, запускалась программа клеточного старения (рис. 5). Мы показали, что избегание контрольными клетками mERas апоптотической гибели связано со снижением экспрессии проапоптотического белка *E1A* и активацией антиапоптотического каскада NF-κB. При этом доминирующим становится действие онкогенного Ras, который индуцирует старение. В свою очередь, индукция апоптотической гибели в присутствии NaBut на фоне сверхэкспрессии *E1A* связана с подавленной и нерегулируемой активностью антиапоптотического

комплекса NF- $\kappa$ B. Опубликованы данные о репрессии активности NF- $\kappa$ B онкобелком E1A [18, 20, 21]. Так, E1A конкурентно связывает и инактивирует протеинкиназу A, которая должна фосфорилировать NF- $\kappa$ B и таким образом активировать его [21]. Также E1A подавляет активность ИКК, что приводит к снижению деградации И $\kappa$ B – ингибитора, регулирующего функционирование NF- $\kappa$ B [20]. Таким образом, принимая во внимание сказанное, а также данные о синхронизированном во времени уменьшении содержания E1A и активации NF- $\kappa$ B [30], можно предположить, что в клетках, трансформированных E1A+Ras, ИГД влияет на активность NF- $\kappa$ B, модулируя экспрессию E1A.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия аденовирусного E1A повышает чувствительность опухолевых клеток к агентам, индуцирующим апоптоз [18], в связи с чем E1A представляет большой интерес в качестве потенциального компонента комбинированной терапии

опухолей. Совместное использование E1A и ИГД приводит к усилению цитотоксического эффекта во многих раковых клетках с минимальным негативным влиянием на нормальные клетки [19]. Однако ИГД не индуцируют апоптоз в трансформированной онкогенами *cHa-Ras* и E1A клеточной линии, в которой E1A экспрессируется под контролем собственного вирусного промотора. В представленной работе нами показано, что ИГД подавляют экспрессию аденовирусного E1A. Апоптотическая гибель клеток E1A+Ras может быть индуцирована ИГД, если E1A экспрессируется на нерегулируемом высоком уровне. Иными словами, избегание апоптотической гибели Ras-трансформированными клетками, экспрессирующими E1A, связано со снижением экспрессии E1A в присутствии ИГД. В свою очередь, форсированная экспрессия E1A, независимая от ИГД, создает условия для индукции апоптоза. ●

*Работа проведена при поддержке Российского  
научного фонда (грант № 14-50-00068).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Flint J., Shenk T. // *Annu. Rev. Genet.* 1989. V. 23. № 1. P. 141–161. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2533472>
- Frisch S.M., Mymryk J.S. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2002. V. 3. № 6. P. 441–452. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12042766>
- Ruley H.E. // *Nature.* 1983. V. 304. № 5927. P. 602–606. <http://www.nature.com/doi/10.1038/304602a0>
- Frisch S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 20. P. 9077–9081. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1833772>
- Pelka P., Ablack J.N.G., Fonseca G.J., Yousef A.F., Mymryk J.S. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 15. P. 7252–7263. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18385237>
- Chinnadurai G. // *Trends Microbiol.* 2011. V. 19. № 4. P. 174–183. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21330137>
- Zamanian M., La Thangue N.B. // *EMBO J.* 1992. V. 11. № 7. P. 2603–2610. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1385776>
- Keblusek P., Dorsman J.C., Teunisse A.F., Teunissen H., van der Eb A.J., Zantema A. // *J. Gen. Virol.* 1999. V. 80. № 2. P. 381–390.
- Bulavin D.V., Tararova N.D., Aksenov N.D., Pospelov V.A., Pospelova T. V. // *Oncogene.* 1999. V. 18. № 41. P. 5611–5619. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10523840>
- Mal A., Poon R.Y.C., Howe P.H., Toyoshima H., Hunter T., Harter M.L. // *Nature.* 1996. V. 380. № 6571. P. 262–265. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8637577>
- Ferrari R., Pellegrini M., Horwitz G.A., Xie W., Berk A.J., Kurdistani S.K. // *Science.* 2008. V. 321. № 5892. P. 1086–1088. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18719284>
- Miura T.A., Cook J.L., Potter T.A., Ryan S., Routes J.M. // *J. Cell. Biochem.* 2007. V. 100. № 4. P. 929–940. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17063489>
- Keicho N., Higashimoto Y., Bondy G.P., Elliott W.M., Hogg J.C., Hayashi S. // *Am. J. Physiol.* 1999. V. 277. № 3 Pt 1. P. L523–L532. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10484459>
- Madhusudan S., Tamir A., Bates N., Flanagan E., Gore M.E., Barton D.P.J., Harper P., Seckl M., Thomas H., Lemoine N.R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. № 9. P. 2986–2996. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15131034>
- Yoo G.H., Hung M.C., Lopez-Berestein G., LaFollette S., Ensley J.F., Carey M., Batson E., Reynolds T.C., Murray J.L. // *Clin. Cancer Res.* 2001. V. 7. № 5. P. 1237–1245. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11350889>
- Lowe S.W., Ruley H.E. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 4. P. 535–545. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8384579>
- Liao Y., Hung M.-C. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. № 17. P. 5938–5942. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15342371>
- Radke J.R., Siddiqui Z.K., Figueroa I., Cook J.L. // *Cell Death Discov.* 2016. V. 2. № 1. P. 16076. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27833761>
- Yamaguchi H., Chen C.-T., Chou C.-K., Pal A., Bornmann W., Hortobagyi G.N., Hung M.-C. // *Oncogene.* 2010. V. 29. № 41. P. 5619–5629. <http://www.nature.com/doi/10.1038/onc.2010.295>
- Shao R., Tsai E.M., Wei K., von Lindern R., Chen Y.H., Makino K., Hung M.C. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. № 20. P. 7413–7416. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11606372>
- Guan H., Jiao J., Ricciardi R.P. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 1. P. 40–48. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17959673>
- Nakajima T., Morita K., Tsunoda H., Imajoh-Ohmi S., Tanaka H., Yasuda H., Oda K. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 32. P. 20036–20045. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9685342>
- Pylayeva-Gupta Y., Grabocka E., Bar-Sagi D. // *Nat. Rev. Cancer.* 2011. V. 11. № 11. P. 761–774. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21993244>
- Pospelova T.V., Medvedev A.V., Kukushkin A.N., Svetlikova S.B., van der Eb A.J., Dorsman J.C., Pospelov V.A. // *Gene Expr.* 1999. V. 8. № 1. P. 19–32. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10543728>



25. Bolden J.E., Shi W., Jankowski K., Kan C.-Y., Cluse L., Martin B.P., MacKenzie K.L., Smyth G.K., Johnstone R.W. // *Cell Death Dis.* 2013. V. 4. № 2. P. e519. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23449455>
26. Bolden J.E., Peart M.J., Johnstone R.W. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2006. V. 5. № 9. P. 769–784. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16955068>
27. Romanov V.S., Abramova M.V., Svetlikova S.B., Bykova T.V., Zubova S.G., Aksenov N.D., Fornace A.J., Pospelova T.V., Pospelov V.A. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 19. P. 3945–3955.
28. Abramova M.V., Pospelova T.V., Nikulenkov F.P., Hollander C.M., Fornace A.J., Pospelov V.A. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 30. P. 21040–21051.
29. Igotti-Abramova M.V., Pojidaeva A.K., Filippova E.A., Gnedina O.O., Svetlikova S.B., Pospelov V.A. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2014. V. 51. № 6. P. 102–110.
30. Abramova M.V., Zatulovskiy E.A., Svetlikova S.B., Pospelov V.A. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2010. V. 42. № 11. P. 1847–1855.
31. Kilbey A., Terry A., Cameron E.R., Neil J.C. // *Cell Cycle.* 2008. V. 7. № 15. P. 2333–2340. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18677118>
32. Ueno N.T., Bartholomeusz C., Xia W., Anklesaria P., Bruckheimer E.M., Mebel E., Paul R., Li S., Yo G.H., Huang L., et al. // *Cancer Res.* 2002. V. 62. № 22. P. 6712–6716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12438271>
33. Hortobagyi G.N., Ueno N.T., Xia W., Zhang S., Wolf J.K., Putnam J.B., Weiden P.L., Willey J.S., Carey M., Branham D.L., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2001. V. 19. № 14. P. 3422–3433. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11454891>
34. Villaret D., Glisson B., Kenady D., Hanna E., Carey M., Gleich L., Yoo G.H., Futran N., Hung M.-C., Anklesaria P., et al. // *Head Neck.* 2002. V. 24. № 7. P. 661–669. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12112540>
35. Larson C., Oronsky B., Scicinski J., Fanger G.R., Stirn M., Oronsky A., Reid T.R. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 24. P. 19976–19989. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26280277>
36. Hulin-Curtis S.L., Davies J.A., Jones R., Hudson E., Hanna L., Chester J.D., Parker A.L. // *Oncotarget.* 2018. V. 9. № 41. P. 26328–26341. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29899862>
37. Marchini A., Scott E., Rommelaere J. // *Viruses.* 2016. V. 8. № 1. P. 9. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26751469>
38. Lai M.-D., Chen C.-S., Yang C.-R., Yuan S.-Y., Tsai J.-J., Tu C.-F., Wang C.-C., Yen M.-C., Lin C.-C. // *Cancer Gene Ther.* 2010. V. 17. № 3. P. 203–211. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19851354>
39. Balakrishnan L., Milavetz B. // *Virology.* 2008. V. 5. P. 43. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18353181>
40. Takakura M., Kyo S., Sowa Y., Wang Z., Yatabe N., Maida Y., Tanaka M., Inoue M. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. № 14. P. 3006–3011. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11452025>
41. Chueh A.C., Tse J.W.T., Tögel L., Mariadason J.M. // *Antioxid. Redox Signal.* 2015. V. 23. № 1. P. 66–84. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24512308>
42. Kirch H.C., Pützer B., Schwabe G., Gnauck H.K., Schulte Holthausen H. // *Cell. Mol. Biol. Res.* 1993. V. 39. № 8. P. 705–716. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7951410>
43. Abramova M.V., Zatulovskiy E.A., Svetlikova S.B., Kukushkin A.N., Pospelov V.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 391. № 1. P. 142–146. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19900401>
44. Metcalf J.P., Monick M.M., Stinski M.F., Hunninghake G.W. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1994. V. 10. № 4. P. 448–452. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8136160>
45. Schaack J., Allen B., Orlicky D.J., Bennett M.L., Maxwell I.H., Smith R.L. // *Virology.* 2001. V. 291. № 1. P. 101–109. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11878880>
46. Song C.Z., Loewenstein P.M., Green M. // *J. Virol.* 1995. V. 69. № 5. P. 2907–2911. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707515>
47. Madison D.L., Yaciuk P., Kwok R.P.S., Lundblad J.R. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 41. P. 38755–38763. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12161448>
48. Turnell A.S., Grand R.J., Gorbea C., Zhang X., Wang W., Mymryk J.S., Gallimore P.H. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 17. P. 4759–4773. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10970867>
49. Grand R.J.A., Schmeiser K., Gordon E.M., Zhang X., Gallimore P.H., Turnell A.S. // *Virology.* 2002. V. 301. № 2. P. 255–271. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12359428>