

УДК 576.32/.36

Ras участвует в регуляции стабильности аденовирусного белка E1A через MAP-киназу ERK

А. В. Моршнева*, О. О. Гнедина, Д. Н. Киндт, М. В. Иготти

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия

*E-mail: 1195alisa@gmail.com

Поступила в редакцию 30.12.2021

Принята к печати 18.03.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11675

РЕФЕРАТ Аденовирусный белок E1A, необходимый для реализации жизненного цикла вируса, активно изучается в связи с его возможным применением в качестве сенсibiliзирующего агента в комбинированной терапии рака, в частности опухолей с активированным Ras. Мы изучили роль сигнального пути Ras в регуляции стабильности E1A и показали, что при сверхэкспрессии активированного Ras в E1A-экспрессирующих клетках увеличивается содержание E1A и при этом усиливается его деградация при действии ингибиторов гистоновых деацетилаз (ИГД). Установлено, что ключевым фактором стабилизации E1A является MAP-киназа ERK, которая инактивируется при действии ИГД, что приводит к деградации белка E1A. Полученные результаты указывают на то, что возможности применения аденовирусного E1A и ингибиторов деацетилаз гистонов в комбинированной терапии опухолей с активированным Ras ограничены ввиду интенсивной ИГД-зависимой деградации E1A. Тем не менее участие MAP-киназы ERK в регуляции стабильности E1A может быть использовано для подбора эффективных комбинаций препаратов на основе аденовирусного белка E1A.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА молекулярная онкология, Ras, E1A, комбинированная терапия, ингибиторы деацетилаз гистонов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИГД – ингибиторы гистоновых деацетилаз; E1A – белок, кодируемый ранним геном 1A аденовируса; LC – лактацистин (ингибитор протеасом); WM – вортманнин (ингибитор PI3K); NaBut – бутират натрия; Ac-Lys – ацетилированный лизин.

ВВЕДЕНИЕ

Ранний ген E1A аденовируса человека типа 5 (Ad5) первым экспрессируется при аденовирусной инфекции и является критическим регулятором вирусной репликации. Белок E1A запускает экспрессию других генов Ad и создает условия, необходимые для его репликации, а именно, стимулирует переход инфицированной клетки в фазу синтеза ДНК – фазу S клеточного цикла [1]. E1A не способен непосредственно взаимодействовать с ДНК, но, будучи кофактором, он изменяет активность многих транскрипционных факторов и коактиваторов, среди которых белок ретинобластомы Rb, ингибитор циклинзависимых киназ p21/Waf, ацетилтрансферазы SVF/p300, ATF, AP1, Sp1 и др. [2].

Несмотря на вирусную природу E1A, научный интерес к этому гену и его функциям выходит далеко за пределы вирусологии. Благодаря стимуляции перехода инфицированной клетки в S-фазу клеточного цикла и подавлению репликативного старения [3], белок E1A обладает иммортализирующей активностью. При экспрессии в первичных клетках грызунов E1A

способствует онкогенной трансформации в сочетании с активированным *ras* [4] или другими комплементирующими онкогенами, например, другим геном раннего региона Ad5 E1B [5]. Однако в клетках человека E1A не является онкогенным [6, 7].

Многочисленные экспериментальные данные свидетельствуют об онкосупрессорных свойствах E1A в различных типах опухолевых клеток человека: карциноме, фибросаркоме и меланоме, что удивительно, принимая во внимание разнообразие генетических изменений в этих трех типах опухолей. Показано несколько механизмов опосредованного E1A подавления опухолевого роста, среди которых снижение метастатического потенциала, а также индукция апоптоза [8, 9].

Более поздние исследования показали, что экспрессия аденовирусного E1A повышает чувствительность раковых клеток к действию ряда цитотоксических агентов, используемых в противоопухолевой терапии, таких, как этопозид, цисплатин, таксаны и др. [10, 11]. При этом наблюдается селективная сенсibiliзирующая активность аденовирусного E1A

по отношению к раковым, но не нормальным клеткам [12, 13]. В связи с этим аденовирусный E1A рассматривается как перспективный сенсibiliзирующий компонент комбинированной терапии опухолей.

Объектом нашего интереса является изучение возможности использования E1A в комбинированной химиотерапии – в сочетании с ингибиторами гистоновых деацетилаз (ИГД). Действие ИГД направлено на повышение уровня ацетилирования гистонов – эпигенетической модификации, обеспечивающей регуляцию таких фундаментальных клеточных процессов, как экспрессия генов, репликация ДНК, стабильность генома [14]. Показано, что сенсibiliзирующий эффект E1A в отношении цитотоксического действия ИГД (SANA, TSA) сильнее, чем других химиотерапевтических препаратов (5-фторурацил, цисплатин, эпопозид, паклитаксел) [13]. Однако, как показано нами ранее, действие ИГД приводит к деградации E1A [15].

В качестве ИГД мы выбрали бутират натрия – ИГД широкого спектра, ингибирующий все деацетилазы гистонов, за исключением деацетилаз 6 и 10 второго класса и деацетилаз третьего класса [16]. Бутират натрия – метаболит, образующийся в организме млекопитающих [17], поэтому он обладает низкой цитотоксичностью в отношении нормальных клеток и избирательно убивает раковые клетки [18].

Белок E1A, как и продукты других онкогенов, имеет довольно короткое время полужизни, равное примерно 40 мин [19]. Внутриклеточный уровень регуляторных белков с коротким временем полужизни, таких, как циклины, p53, бета-катенин, p27kip и Мус, контролируется убиквитин-протеасомной системой. В связи с этим такой путь деградации предположительно реализуется и для белка E1A. Тем не менее точный механизм регуляции стабильности белка E1A все еще не установлен. Показано, что деградация белка E1A запускается не через убиквитинирование, а через фосфорилирование его С-концевых аминокислотных остатков [20]. Примечательно, что сам белок E1A действует как протеасомный регулятор, способный как подавлять убиквитин-протеасомную систему путем прямого связывания его N-концевого участка с 26S субъединицей протеасомы [20], так и стимулировать убиквитинирование отдельных белков [21].

Ранее нами были отмечены различия в интенсивности ИГД-индуцированной деградации белка E1A в клетках, экспрессирующих Ras дикого типа или мутантный белок, что дало нам возможность выдвинуть предположение о роли белка Ras в регуляции стабильности E1A [15]. Малая GTP-аза Ras является ключевым регулятором клеточного роста [22]. В норме она активируется в ответ на вне-

клеточные стимулы и запускает программы пролиферации, однако при патологиях, приводящих к активации Ras-сигналинга, белок Ras постоянно находится в активированном состоянии, что приводит к независимому от сигналов внешней среды делению клеток и индукции канцерогенеза [23]. Конститутивная активность белка Ras, обусловленная мутациями в кодирующем его гене, выявлена в целом ряде опухолей, включая такие агрессивные и трудно поддающиеся лечению формы, как меланома, колоректальный рак и рак легкого [24], поэтому изучение опухолей с мутациями Ras имеет большое значение для разработки методов их терапии.

Наша работа посвящена изучению вклада активированного Ras в стабильность E1A при воздействии ИГД, что необходимо для рассмотрения возможности применения комплексной терапии с использованием ИГД и аденовирусного E1A, направленной на усиление антипролиферативного эффекта в опухолевых клетках с активированным Ras.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

Линия E1A+Ras получена трансформацией эмбриональных фибробластов мыши комплементирующими онкогенами – раннего гена E1A аденовируса человека типа 5 (Ad5) и сНа-ras, несущим активирующие мутации в кодонах 12 и 61 [25]. Линия E1A+E1B получена трансформацией эмбриональных фибробластов крысы HindIII-районом Ad5, кодирующим белки E1A и E1B. Клетки эмбриональной почки человека, трансформированные аденовирусом типа 5 (HEK293), получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных».

Клетки культивировали при 37°C и 5% CO₂ в среде DMEM с 10% FCS. Клетки обрабатывали 4 мМ бутиратом натрия (Calbiochem, США) и/или 1–2 мкМ лактацистинном (Calbiochem).

ОТ-ПЦР

РНК выделяли из клеток с использованием реактива Trizol (Invitrogen, США). Обратную транскрипцию проводили с 2 мкг РНК и 1 мкг случайных гексапраймеров. Реакцию ПЦР проводили с использованием ПЦР-циклера Eppendorf Mastercycler personal (AG 22331) в присутствии 100 нг праймеров к кДНК интересующих генов (E1A: 5'-CTTTCCACCCAGTGACGACG-3'/5'-TGTCGGCGTCTCAGGATAG-3'; gapdh: 5'-TCATCAGCAATGCCTCCTGCACC-3'/5'-ACAGTTTCCCGAGGGGCSA-3') в течение 22–32 циклов, включающих денатурацию в течение 30 с (95°C), отжиг праймеров 30 с (61°C E1A, 58°C gapdh) и элонгацию – 1 мин (72°C).

Фракционирование клеточных экстрактов

Клетки суспендировали в 10 мМ HEPES-КОН (рН 7.9), после чего добавляли 0.4% NP-40 и центрифугировали при 5000 об/мин для получения цитоплазматических экстрактов. Осадки лизировали в 20 мМ HEPES-КОН (рН 7.9) и затем центрифугировали при 15000 об/мин для получения ядерных экстрактов.

Иммунопреципитация и иммуноблотинг

Клетки лизировали в буфере, содержащем 0.5% NP-40, 1% Triton X-100, ингибиторы протеаз и фосфатаз (для иммунопреципитации использовали буфер, содержащий 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% додецилсульфата натрия SDS). Белки разделяли в 10–12% полиакриламидном геле, переносили на мембрану PVDF (Millipore, США) и анализировали с помощью специфических антител, выявляя методом усиления хемилюминесценции (ECL, Amersham Biosciences, Великобритания) и визуализировали на Syngene PXi6 Access. Использовали антитела к белкам E1A sc-25 G1713 1 : 1000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc., США), pan-Ras OP40 1 : 1000 (Calbiochem), pERK1/2 #4377 1 : 800 (Cell Signalling, США), pAkt (Ser 473) #4060 1 : 1000 (Cell Signalling), p-p38 #9211 1 : 1000 (Cell Signalling), p-JNK #9251 1:500 (Cell Signalling), ацетилованного лизина #9441 1:500 (Cell Signalling), α -тубулина sc-32293 1 : 10000 (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) и Gapdh 2118 1 : 1000 (Cell Signalling). Каждый белок был проанализирован не менее чем в трех повторностях. Для денситометрического анализа использовали программу ImageJ. Значения нормированы на контроль нагрузки (Gapdh) и приведены к относительным единицам измерения. На графиках приведены средние значения 3–5 экспериментов, планки погрешности – стандартная ошибка среднего (SEM).

Временная трансфекция

Для трансфекции клетки высевали на 12-луночную плату (среда DMEM с 10% FCS без антибиотика) в плотности 150×10^3 клеток на ячейку. Трансфекцию векторов pcDNA3 (Addgene) и pSV2-ras, кодирующего сHa-ras (Addgene) проводили с помощью Lipofectamine-2000 (Invitrogen) по протоколу производителя.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика деградации белка E1A при действии ИГД бутирата натрия в клетках с различным статусом Ras

Для изучения влияния Ras-сигнального пути на стабильность E1A были использованы две экспрессирующие E1A линии трансформированных клеток, от-

личающиеся статусом активности белка Ras: линия E1A+Ras, экспрессирующая активированный сHa-ras, и линия E1A+E1B, экспрессирующая *ras* дикого типа.

Данные ОТ-ПЦР и иммуноблотинга показывают, что бутират натрия (NaBut) не влияет на транскрипцию гена *E1A* (рис. 1А), тогда как белковый продукт подвергается деградации в обеих клеточных линиях, но с различной динамикой и интенсивностью (рис. 1Б). В клетках E1A+Ras белок E1A деградирует быстро, тогда как в клетках линии E1A+E1B он продолжает выявляться даже спустя 72 ч действия NaBut. Схожая динамика умеренного снижения количества E1A наблюдается и в клетках HEK293, экспрессирующих ген *ras* дикого типа (рис. 1В).

Экспрессия активированного Ras увеличивает содержание белка E1A, однако приводит к его дестабилизации при действии бутирата натрия

Для подтверждения вовлеченности активированного Ras в регуляцию стабильности белка E1A экспрессионный вектор, кодирующий сHa-Ras с активирующими мутациями, был введен в клетки HEK293. Активированное состояние экзогенного Ras подтверждается данными иммуноблотинга о накоплении фосфорилированной формы киназы ERK,

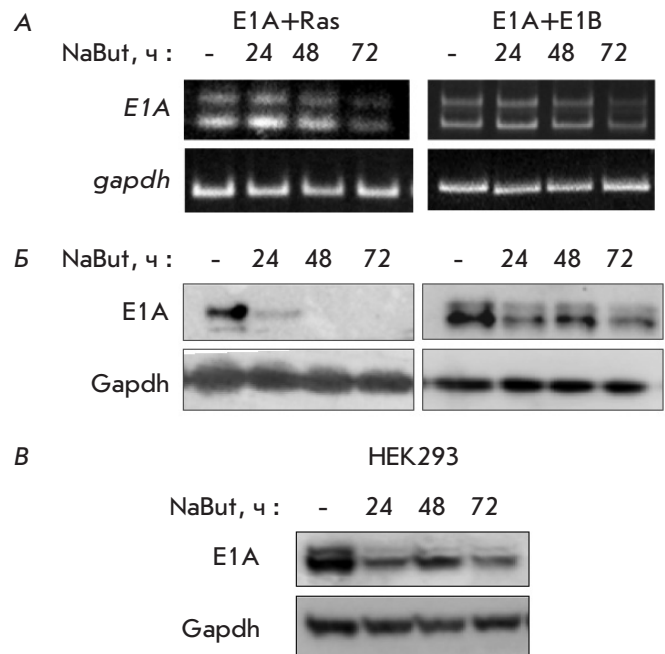


Рис. 1. NaBut вызывает деградацию белка E1A, наиболее выраженную в клетках с активированным Ras. А – анализ транскрипции *E1A* методом ОТ-ПЦР. Изменение количества белкового продукта E1A методом иммуноблотинга в E1A-экспрессирующих клетках грызунов (Б) и человека (В). Ген *gapdh* и его белковый продукт использованы в качестве контроля нагрузки в ОТ-ПЦР и иммуноблотинге соответственно

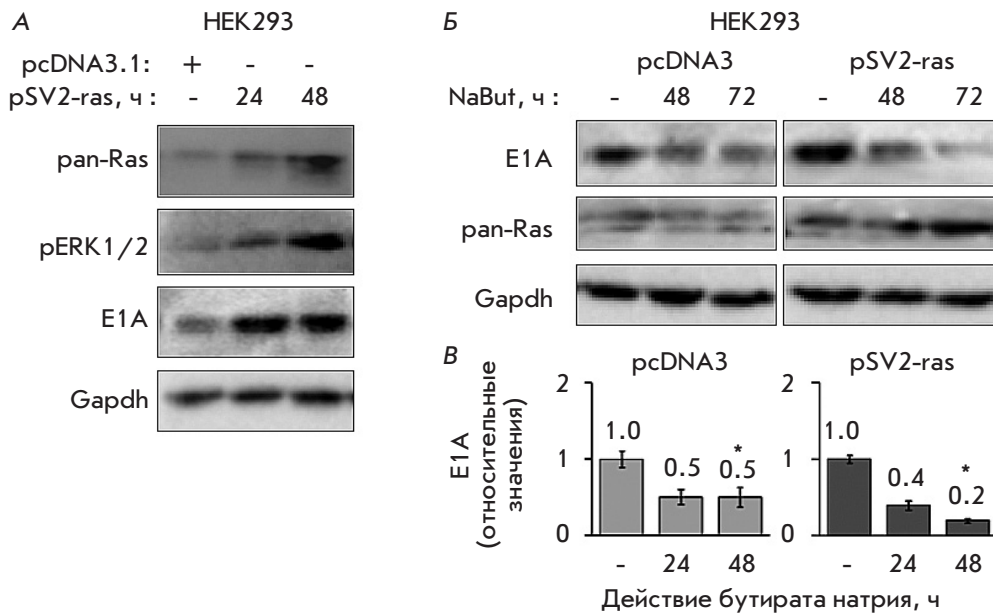


Рис. 2. Активированный Ras стабилизирует E1A, однако усиливает его деградацию при действии NaBut. Иммуноблоттинг белков из клеток HEK293: трансфицированных векторами pcDNA3 (контрольный вектор) или pSV2-ras, с антителами против E1A, pERK и pan-Ras (A); и трансфицированных векторами pcDNA3 (контрольный вектор) или pSV2-ras, и обработанных 4 мМ NaBut в течение 0–72 ч, с антителами к E1A и pan-Ras (Б). Gapdh использован в качестве контроля нагрузки. В – гистограммы усредненного количества E1A в трансфицированных клетках HEK293 при действии NaBut, полученные денситометрическим анализом данных иммуноблоттинга с нормированием на контроль нагрузки (Gapdh); количество E1A в необработанных клетках принято за единицу. Планки погрешности построены по значениям стандартной ошибки среднего (SEM). Для проверки значимости различий использовали тест Манна–Уитни, сравнивая попарно значения каждой временной точки для двух векторов (* $p < 0.05$)

нижележащей MAP-киназы, после трансфекции клеток мутантным сHa-ras (рис. 2А). Экспрессия активированного Ras сопровождается накоплением аденовирусного белка E1A (рис. 2А). Таким образом, наши результаты показывают стабилизирующее влияние активированного Ras-сигналинга на белок E1A аденовируса.

При действии NaBut в клетках, трансфицированных вектором, кодирующим активированный Ras (pSV2-ras), деградация белка E1A происходит быстрее, чем в клетках, трансфицированных контрольным вектором pcDNA3 (рис. 2Б,В). Таким образом, сверхэкспрессия активированного Ras приводит к накоплению белка E1A, однако делает E1A более чувствительным к действию NaBut, усиливая его деградацию.

Механизмы, вовлеченные в Ras-зависимую стабилизацию белка E1A, выявляли с использованием ингибиторов нижележащих киназ в Ras-зависимых сигнальных каскадах. С помощью иммуноблоттинга показано, что подавление только активности киназы ERK фармакологическими ингибиторами PD098059 или PD0325901 приводит к снижению количества E1A в клетках E1A+Ras (рис. 3А).

С целью изучения механизмов ИГД-индуцированной деградации E1A сравнили изменения актив-

ности различных Ras-зависимых киназ при действии NaBut в клетках с различным статусом Ras. По данным иммуноблоттинга с использованием фосфоспецифических антител NaBut сходным образом изменяет активность киназ p38 и JNK в клетках с нормальным и активированным Ras (рис. 3Б). Выявлены принципиальные различия в изменении активности киназ ERK и PKB/Akt. Так, в клетках E1A+Ras с активированным Ras NaBut вызывает падение активности киназ ERK и PKB/Akt, тогда как в клетках HEK293, экспрессирующих нормальный Ras, активность этих киназ увеличивается (рис. 3Б), что подразумевает вовлеченность этих киназ в регулирование как базального уровня белка E1A, так и изменения его количества при воздействии NaBut.

Ингибирование протеасом не отменяет индуцированное бутиратом натрия снижение количества E1A

Для выявления роли убиквитин-протеасомной системы в ИГД-зависимом снижении количества E1A клетки E1A+Ras обрабатывали ингибитором протеасом лактацистином (LC). Обработка LC сопровождается дозозависимым увеличением количества белка E1A (рис. 4А).

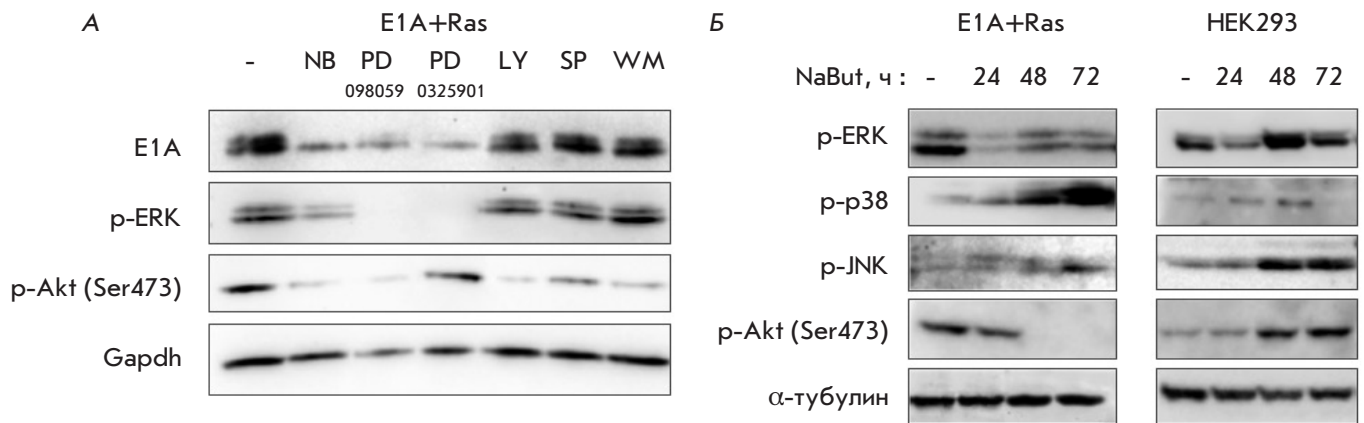


Рис. 3. Киназы Akt и ERK как факторы стабилизации E1A в Ras-экспрессирующих клетках. А – изменение количества белка E1A в E1A-экспрессирующих клетках с активированным Ras при обработке 4 мМ NaBut и ингибиторами Ras-зависимых киназ (50 мкМ PD098059 и PD0325901 – ингибиторы ERK, 20 мкМ LY и 10 мкМ WM – ингибиторы PI3K, 10 мкМ SP – ингибитор JNK) в течение 24 ч. Б – динамика фосфорилирования киназ при действии NaBut в клетках с активированным и нормальным Ras. Иммуноблотинг белков из клеток E1A+Ras и HEK293, необработанных или обработанных 4 мМ NaBut в течение 0–48 ч. Gapdh/α-тубулин использован в качестве контроля нагрузки

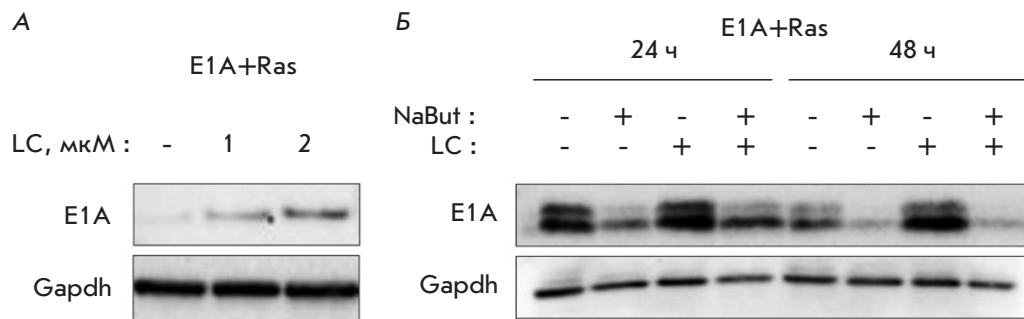


Рис. 4. Иммуноблотинг белков клеток E1A+Ras, обработанных ингибитором протеасом лактацистином (1 мкМ и 2 мкМ LC) (А) или совместно обработанных в течение 24–48 ч NaBut и/или 2 мкМ LC, с антителами против E1A (Б). Gapdh использован в качестве контроля нагрузки

Для проверки возможности предотвращения NaBut-индуцированной деградации E1A при подавлении активности протеасом клетки E1A+Ras обрабатывали NaBut или NaBut в сочетании с LC в течение 24–48 ч. Методом иммуноблотинга показано, что через 24 ч LC оказывает легкий стабилизирующий эффект как на контрольные, так и на обработанные NaBut клетки, однако при более продолжительном действии агентов количество белка E1A падает независимо от присутствия LC (рис. 4Б).

Таким образом, нами показано, что LC повышает базальный уровень белка E1A, но не предотвращает его деградацию при длительном действии NaBut.

Как известно, для деградации белка необходима его локализация в цитоплазме. Ранее было показано, что на релокализацию E1A может влиять его ацетилирование [26]. В связи с этим изучено влияние NaBut на степень ацетилированности E1A и его внутриклеточную локализацию. По данным иммуноблотинга, проведенного после иммунопреципитации с антителами к ацетилированному лизину, в первые

24 ч NaBut вызывает накопление ацетилированного E1A в клетках E1A+Ras, однако затем белок E1A перестает выявляться (рис. 5А). При этом данные иммуноблотинга фракционированных клеточных экстрактов свидетельствуют о том, что белок E1A, имеющий преимущественно ядерную локализацию, выходит из ядра при действии NaBut (рис. 5Б). Это позволяет предположить, что NaBut способствует усилению ацетилирования белка E1A, что влечет за собой его релокализацию из ядра в цитоплазму, где он подвергается быстрой деградации.

ОБСУЖДЕНИЕ

Способность ИГД вызывать деградацию аденовирусного белка неоднократно показана экспериментально [13, 26–28], однако механизмы регуляции этого процесса, а также факторы стабилизации E1A до сих пор не установлены. Ранее мы показали, что такие ИГД, как бутират натрия, трихостатин А и вориностат (SAHA), вызывают деградацию аденовирусного белка E1A, при этом динамика ИГД-

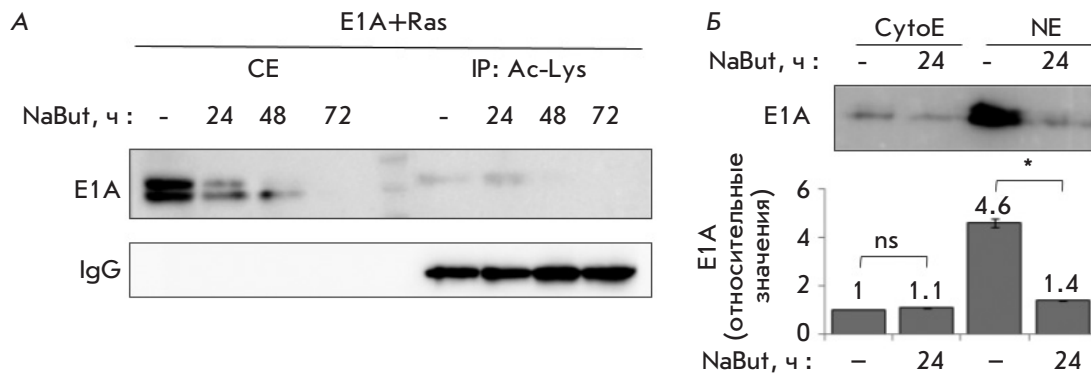


Рис. 5. Ацетилирование и релокализация E1A при действии NaBut. **А** – иммунопреципитация с антителами против ацетилированного лизина (IP: Ac-Lys) с последующим иммуноблоттингом с антителами к E1A. Иммуноглобулины G (IgG) использованы в качестве контроля нагрузки. **Б** – иммуноблоттинг фракционированных клеточных экстрактов (CytoE – цитоплазматические экстракты, NE – ядерные экстракты) с антителами к E1A. Экстракты получены из клеток, необработанных или обработанных 4 mM NaBut в течение 24 ч. Гистограмма отображает усредненное количество E1A, полученное денситометрическим анализом данных иммуноблоттинга с нормированием на интенсивность сигнала загрузки дорожки (Ponceau S); количество E1A в необработанном NaBut цитоплазматическом экстракте принято за единицу. Планки погрешности построены по значениям стандартной ошибки среднего (SEM). Для проверки значимости различий использовали тест Манна–Уитни (ns $p > 0.05$, * $p < 0.05$)

индуцированного снижения уровня E1A коррелирует с активностью белка Ras в клетках [29].

В представленной работе нами изучен эффект участников Ras-сигналинга на стабильность аденовирусного E1A. Впервые мы показали, что сверхэкспрессия активированного Ras приводит к накоплению белка E1A. Согласно нашим данным, в Ras-зависимой стабилизации E1A определяющую роль играют киназы ERK1/2. Так, накопление аденовирусного белка E1A, индуцированное сверхэкспрессией активированного Ras, сопровождается активацией ERK1/2 (рис. 2A), а подавление активности пути MEK/ERK фармакологическими ингибиторами вызывает снижение количества E1A (рис. 3B).

Индукцированная ИГД деградация E1A опосредована также активностью киназы ERK. Уменьшение количества белка E1A, вызванное действием NaBut, сопровождается инактивацией киназы ERK (рис. 3A). В подвергнутых действию NaBut клетках с активированным Ras выявлена также отрицательная динамика киназы Akt, однако ее инактивация не влияет на содержание E1A, как показано в опытах с использованием специфических ингибиторов Akt (рис. 3A).

Участие Ras-сигналинга в регуляции аденовирусного белка не случайно, так как при инфекции вирусы индуцируют передачу сигналов через MAP-киназный каскад [30] и, в частности, через киназу ERK [31]. Известно, что аденовирус усиливает активность ERK как на ранней, так и на поздней фазе инфекции [32].

Понимание взаимодействия вируса с компонентами Ras-сигнального пути клетки может быть определяющим для конструирования онколитических вирусов, специфически реплицирующихся в ра-

ковых клетках, а также для разработки подходов к противоопухолевой терапии с использованием аденовирусных белков.

Фосфорилирование по остаткам серина играет важную роль в регуляции активности белка E1A, в частности, фосфорилирование Ser185 и Ser188 активированной киназой ERK1/2 увеличивает экспрессию генов с промотора E4 [33]. Возможность участия фосфорилирования в стабилизации белка E1A пока недостаточно изучена. До сих пор только в двух работах показано, что как функции, так и содержание белка E1A находятся в сильной зависимости от киназного каскада MEK/ERK [32, 33], при этом предполагается, что изменение активности сигнального пути Ras/MEK/ERK влияет скорее не на скорость деградации белка E1A, а на эффективность трансляции.

Используя ингибитор протеасом лактацистин, мы установили, что базальный уровень белка E1A увеличивается при добавлении лактацистина, то есть в норме E1A утилизируется в протеасомах, что согласуется с результатами выявления роли протеасом в деградации изоформ E1A [34]. В отличие от базального уровня белка E1A, который повышался при действии лактацистина, его содержание снижалось в условиях ингибирования протеасом при длительном воздействии бутирата натрия. Это означает, что ИГД-зависимая деградация E1A происходит не по убиквитин-протеасомному пути, что указывает на индукцию альтернативного механизма дестабилизации E1A при действии ИГД в *ras*-трансформированных клетках.

Как ингибитор обширного класса деацетилаз гистонов, которые используют в качестве субстрата

и негистоновые белки, бутират натрия может влиять на состояние ацетилированности белка E1A. Белок E1A ацетируется по Lys239 в С-концевом домене его клеточными кофакторами ацетилтрансферазами СВР, р300 и рCAF, что препятствует его ядерной локализации из-за нарушения связывания с импортином- α [26] и делает его доступным для систем деградации.

Известно, что постоянная активация Ras-сигнального пути приводит к индукции транскрипционного фактора HSF1, контролирующего экспрессию белков теплового шока [35], что дает возможность предположить вовлеченность Hsp-зависимого механизма деградации [36] в ИГД-зависимой дестабилизации белка E1A. Тем не менее, вклад шаперон-опосредованной аутофагии в утилизацию белка E1A требует экспериментального подтверждения.

ВЫВОДЫ

1. Активированный Ras стабилизирует E1A через активацию нижележащей киназы ERK.
2. При действии бутирата натрия на клетки с активированным Ras происходит стремительное

падение уровня белка E1A, индуцированное ИГД-зависимой инактивацией киназы ERK.

3. В норме E1A утилизируется путем протеасомной деградации, однако при длительном действии бутирата натрия деградация E1A наблюдается даже в условиях ингибирования протеасом, а значит, ИГД-зависимая деградация E1A происходит не по убиквитин-протеасомному пути.

4. Наши результаты указывают на то, что ИГД-индуцированная деградация E1A может приводить к снижению его проапоптотического потенциала в клетках с активированным Ras, поэтому возможность применения E1A в сочетании с ИГД в комбинированной терапии опухолей с мутантным активированным Ras ограничена. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда (РНФ) № 22-25-20229 и частично Фонда директора Института цитологии РАН. Клеточные линии получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-683).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Berk A.J. // Cancer Surv. 1986. V. 5. № 2. P. 367–387.
2. Pelka P., Ablack J.N.G., Torchia J., Turnell A.S., Grand R.J.A., Mymryk J.S. // Nucl. Acids Res. 2009. V. 37. № 4. P. 1095–1106.
3. Deng Q., Li Y., Tedesco D., Liao R., Fuhrmann G., Sun P. // Cancer Res. 2005. V. 65. № 18. P. 8298–8307.
4. Reed J.C., Haldar S., Croce C.M., Cuddy M.P. // Mol. Cell Biol. 1990. V. 10. № 8. P. 4370–4374.
5. Cuconati A., Degenhardt K., Sundararajan R., Anselm A., White E. // J. Virol. 2002. V. 76. № 9. P. 4547–4558.
6. Byrd P.J., Grand R.J., Gallimore P.H. // Oncogene. 1988. V. 2. № 5. P. 477–484.
7. Gallimore P.H., Grand R.J., Byrd P.J. // Anticancer Res. 1986. V. 6. № 3. P. 499–508.
8. Chang Y.-W., Hung M.-C., Su J.-L. // Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.). 2014. V. 62. № 3. P. 195–204.
9. Frisch S.M., Reich R., Collier I.E., Genrich L.T., Martin G., Goldberg G.I. // Oncogene. 1990. V. 5. № 1. P. 75–83.
10. Liao Y., Hung M.-C. // Cancer Res. 2004. V. 64. № 17. P. 5938–5942.
11. Radke J.R., Siddiqui Z.K., Figueroa I., Cook J.L. // Cell Death Discov. 2016. V. 2. P. 16076–16076.
12. Sánchez-Prieto R., Quintanilla M., Cano A., Leonart M.L., Martin P., Anaya A., Ramón y Cajal S. // Oncogene. 1996. V. 13. № 5. P. 1083–1092.
13. 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.
14. Seto E., Yoshida M. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2014. V. 6. № 4. P. a018713.
15. Morshneva A., Gnedina O., Marusova T., Igotti M. // Cells. 2019. V. 9. № 1. P. 97.
16. Davie J.R. // J. Nutr. 2003. V. 133. № 7 Suppl. P. 2485S–2493S.
17. Liu H., Wang J., He T., Becker S., Zhang G., Li D., Ma X. // Adv. Nutr. Bethesda Md. 2018. V. 9. № 1. P. 21–29.
18. Wang W., Fang D., Zhang H., Xue J., Wangchuk D., Du J., Jiang L. // OncoTargets Ther. 2020. V. 13. P. 4691–4704.
19. Slavicek J.M., Jones N.C., Richter J.D. // EMBO J. 1988. V. 7. № 10. P. 3171–3180.
20. Turnell A.S., Grand R.J.A., Gorbea C., Zhang X., Wang W., Mymryk J.S., Gallimore P.H. // EMBO J. 2000. V. 19. № 17. P. 4759–4773.
21. Guan H., Ricciardi R.P. // J. Virol. 2012. V. 86. № 10. P. 5594–5602.
22. Song S., Cong W., Zhou S., Shi Y., Dai W., Zhang H., Wang X., He B., Zhang Q. // Asian J. Pharm. Sci. 2019. V. 14. № 1. P. 30–39.
23. Downward J. // Nat. Rev. Cancer. 2003. V. 3. № 1. P. 11–22.
24. Fernández-Medarde A., Santos E. // Genes Cancer. 2011. V. 2. № 3. P. 344–358.
25. Поспелова Т.В., Кислякова Т.В., Медведев А.В., Светликова С.Б., Поспелов В.А. // Цитология. 1990. Т. 32. № 2. С. 148–155.
26. Madison D.L., Yaciuk P., Kwok R.P.S., Lundblad J.R. // J. Biol. Chem. 2002. V. 277. № 41. P. 38755–38763.
27. Игotti М.В., Светликова С.Б., Поспелов В.А. // Acta Naturae. 2018. Т. 10. № 4. С. 70–78.
28. Saha B., Parks R.J. // J. Virol. 2019. V. 93. № 12. P. e00088-19.
29. Morshneva A., Gnedina O., Svetlikova S., Pospelov V., Igotti M. // AIMS Genet. 2018. V. 5. № 1. P. 41–52.
30. Popik W., Pitha P.M. // Virology. 1998. V. 252. № 1. P. 210–217.
31. Bruder J.T., Kovesdi I. // J. Virol. 1997. V. 71. № 1. P. 398–404.
32. Schümann M., Dobbstein M. // Cancer Res. 2006. V. 66. № 3. P. 1282–1288.
33. Whalen S.G., Marcellus R.C., Whalen A., Ahn N.G., Ricciardi R.P., Branton P.E. // J. Virol. 1997. V. 71. № 5. P. 3545–3553.
34. Radko S., Jung R., Olanubi O., Pelka P. // PLoS One. 2015. V. 10. № 10. P. e0140124.
35. Dai C. // Philos. Trans. R. Soc. B Biol. Sci. 2018. V. 373. № 1738. P. 20160525.
36. Cuervo A.M. // Trends Endocrinol. Metab. 2010. V. 21. № 3. P. 142–150.