

DOI: 10.31116/tsitol.2018.07.07

**УЧАСТИЕ ТРАНСКРИПЦИОННЫХ ФАКТОРОВ E2F1 И p73  
В ФОРМИРОВАНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ДОКСОРУБИЦИНУ  
ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ТНР-1, ИНФИЦИРОВАННЫХ  
ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ ЧЕЛОВЕКА**

© С. С. Емельянова,<sup>1</sup> Я. Ю. Чернорыж,<sup>2</sup> К. И. Юрлов,<sup>2</sup> Н. Е. Федорова,<sup>2</sup>  
А. В. Иванов,<sup>3</sup> С. Н. Кочетков,<sup>3</sup> В. Н. Вербенко,<sup>1</sup>  
А. А. Куц,<sup>2</sup> Г. Р. Виноградская<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Петербургский институт ядерной физики им. Б. П. Константинова  
Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»,  
Гатчина, Ленинградская обл., 188300,

<sup>2</sup> Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи  
Министерства здравоохранения РФ, Москва, 123098, и

<sup>3</sup> Институт молекулярной биологии им. В. А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991;

\* электронный адрес: [vinogradskaya\\_gr@pnpi.nrcki.ru](mailto:vinogradskaya_gr@pnpi.nrcki.ru)

Лейкозные клетки от разных пациентов с гематологическими злокачественными заболеваниями различаются по чувствительности к противораковым препаратам, в том числе к доксорубину. Резистентность к химиотерапии снижает эффективность лечения, способствует возникновению рецидивов и метастазов. Попытки влияния на развитие множественной лекарственной устойчивости пока не продемонстрировали больших успехов *in vivo*. Альтернативные подходы могут быть связаны с E2F1-регуляцией белка p73, изоформы которого могут оказывать как проонкогенное (DNp73), так и антионкогенное (TAp73) действие. На E2F1/p73-путь может влиять цитомегаловирус человека, часто обнаруживаемый в опухолях, так как стратегия вирусного генома включает в себя блок апоптоза. В этой работе мы впервые показали, что в результате заражения цитомегаловирусом в клетках моноцитарного лейкоза ТНР-1 значительно повышается уровень E2F1 и изменяется соотношение изоформ белка p73 в сторону укороченной изоформы DNp73, что способствует выживанию лейкозных клеток после обработки доксорубицином.

Ключевые слова: доксорубин, цитомегаловирус, клетки острого моноцитарного лейкоза ТНР-1, E2F1, изоформы TAp73 и DNp73 белка p73.

Принятые сокращения: ДОКС — доксорубин, МКА — моноклональные антитела, ТНР-1 — клетки моноцитарного лейкоза, ЦМВ — цитомегаловирус.

Резистентность раковых клеток к противоопухолевой терапии является одной из главных причин недостаточно эффективного лечения. Так, положительные результаты лечения лейкемии широко используемым препаратом ДОКС отмечены лишь у 40 % пациентов. В основе резистентности на молекулярном уровне лежат сложные процессы, многие из которых пока не исследованы. Один из путей выяснения клеточных и молекулярных механизмов устойчивости связан с изучением роли цитомегаловирусной инфекции в злокачественных опухолях, так как в последнее время накапливаются данные об обнаружении белков и ДНК цитомегаловируса (ЦМВ) в многочисленных опухолях разного происхождения. Маркеры ЦМВ выявлены в астроцитомах и нейробластомах (Terrasson et al., 2005), в большинстве (> 90 %) глиом (Söderberg-Naucler, Johnsen, 2015) и в колоректальном раке (Chen, Chan,

2014). ЦМВ кодирует белки, которые воздействуют на внешний и внутренний пути активации апоптоза либо через прямое взаимодействие с соответствующими медиаторами, либо через влияние на экспрессию клеточных белков, вовлеченных в проведение сигналов смерти. Одним из основных детерминантов чувствительности к химиотерапии является белок p73 (Lunghi et al., 2009).

Белок p73 принадлежит к семейству опухолевых супрессоров p53. Белки этого семейства разделяют общую структурную организацию, что позволяет им активировать одни и те же гены-мишени. В качестве общих структурных элементов можно выделить N-концевой транскриптивирующий (ТА) домен, ДНК-связывающий домен, который ответствен за связывание со специфическими последовательностями в промоторных областях генов-мишеней, и домен, ответственный за олигомериза-

цию мономерных белков. Однако вопреки структурному сходству белков и соответствующих генов наблюдается поразительное функциональное различие. Так, мутации в гене *p73* чрезвычайно редко встречаются в опухолях у человека (0.5 %). Более того, во многих опухолях наблюдается суперэкспрессия немутированного белка *p73*.

Объяснение этого феномена лежит в сложной структурной организации гена *p73*, позволяющей экспрессию как опухоль-супрессорных, так и онкогенных изоформ белка. Механизм их образования связан с альтернативным сплайсингом 5'- и 3'-концов мРНК и использованием альтернативных промоторов. Укорочение белка на N-конце приводит к полному или частичному отсутствию трансактивирующего домена. Показано, что ΔТА-изоформы могут подавлять транскрипционную активность как ТАР73 с полным трансактивирующим доменом, так и его гомолога *p53*, образуя с ними гетеротетрамеры, и судьба клетки зависит от соотношения этих изоформ (Engelmann et al., 2015). Укороченные изоформы, транскрибируемые со второго промотора (DNp73), не только контролируют активность *p73* и *p53*, но и сами находятся под их контролем. Промотор (P2) содержит очень эффективный элемент для связывания *p53/p73*, в результате которого индуцируется транскрипция с этого промотора и создается петля обратной связи. Зависимая от *p53/p73* активация P2-промотора противоречила бы проапоптотической роли этих белков в ответ на повреждение ДНК, если бы одновременно не индуцировалась быстрая и селективная деградация DNp73-изоформы.

В некоторых случаях равновесие между супрессорными и онкогенными изоформами может изменяться при ЦМВ-инфекции по неизвестному в настоящий момент механизму. Показано, что при ЦМВ-инфекции активируются молекулярные пути, включающие в себя экспрессию транскрипционного фактора E2F1, который может оказывать как активирующее, так и ингибирующее действие на *p73* (Ozaki et al., 2009). Получение данных о соотношении про- и антиапоптотических факторов в ЦМВ-инфицированных клетках моноцитарного лейкоза ТНР-1, обработанных ДОКС, должно прояснить связь транскрипционного фактора E2F1 с регуляцией белка *p73* и роль этих белков в механизме устойчивости зараженных вирусом опухолевых клеток к противоопухолевому антибиотiku доксорубину.

## Материал и методика

Клетки линии ТНР-1 и ФЛЭЧ (фибробласты легкого эмбриона человека) были получены из банка клеточных культур, а штамм ЦМВ AD169 из Государственной коллекции вирусов НИЦЭМ им. Н. Ф. Гамалеи. Клетки ТНР-1 выращивали в среде RPMI 1640 с 10 % эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС), ФЛЭЧ — в среде DMEM с 10 % ЭТС в атмосфере 5 % CO<sub>2</sub>. Клетки ТНР-1 заражали ЦМВ (5 БОЕ/кл.) в течение 1 ч при 37 °С, отмывали и ресуспендировали в свежей ростовой среде. Через 4 ч в инфицированные и контрольные (неинфицированные) клетки ТНР-1 вносили 5 мкг/мл ДОКС и инкубировали еще 20 ч. Действие ДОКС изучали по влиянию на жизнеспособность клеток, которую оценивали методом исключения витального красителя трипанового синего, по выявлению фрагментированной клеточной ДНК *in situ* с помощью набора Dead End™ Fluorometric TUNEL System (G3250, Promega) и по выявлению активированных

каспаз с помощью непрямой иммунофлуоресценции *in situ* с использованием специфических антител. Для выявления каспаз использовали антитела к каспазе 3 (1 : 50, ab52293, Abcam), каспазе 8 (1 : 50, ab4052, Abcam) и к каспазе 9 (1 : 100, ab32539, Abcam). В качестве вторичных антител использовали антивидовые антитела, конъюгированные с ФИТЦ (1 : 100, ab98502, Abcam).

Выделение РНК и ОТ-ПЦР. Тотальную РНК выделяли с помощью набора AurumTotalRNAminikit (BioRad, США). Для обратной транскрипции использовали реагенты iScriptcDNASynthesisKit (BioRad, США) в соответствии с протоколом фирмы-производителя. Для выявления изоформ в N-концевой части *p73* использовали праймеры и зонды, разработанные нами ранее (Волницкий и др., 2012). С-концевые изоформы выявляли с помощью гнездовой ПЦР с праймерами к 10 и 14 экзонам.

Выявление белков методом иммуноблоттинга. Концентрацию белка в клеточных лизатах измеряли по методу Бредфорда с использованием красителя бриллиантового голубого Р (Sigma, США). После электрофореза в полиакриламидном геле белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (0.45 мкм, Schleicher & Schuell, Германия). Для идентификации клеточных белков использовали МКА к белку *p73α* (1 : 200, sc-56194, Santa Cruz Biotechnology) и E2F1 (1 : 1000, ab135251, Abcam). Вторичными антителами служили поликлональные кроличьи антимышьи иммуноглобулины, меченные пероксидазой хрена (1 : 500, P02602, DAKO). Для усиления сигнала использовали Clarity™ Western ECL Substrate (170-5060, Bio-Rad, США). Полученные данные обрабатывали при помощи программы ImageJ (версия 1.45, 2011 г.).

Подсчет средних значений и стандартных ошибок проводили с использованием пакета STATISTIKA 6.0. Достоверность различий оценивали по *t*-критерию Стьюдента. Различия считали значимыми при  $P < 0.05$ .

## Результаты и обсуждение

Обработка незараженных ТНР-1 ДОКС приводила к гибели  $79.8 \pm 7.5$  % клеток. Внесение ДОКС в инфицированную культуру привело к статистически значимому снижению гибели клеток ( $32.6 \pm 5.5$  %) по сравнению с неинфицированной культурой, обработанной ДОКС ( $P < 0.05$ ). В инфицированной культуре под действием ДОКС разрывы ДНК наблюдали в 1.6 раза меньшем количестве клеток, чем при тех же условиях в незараженной культуре ( $29.3 \pm 7.0$  против  $48.3 \pm 4.5$  %,  $P < 0.05$ ). Иммунофлуоресцентный анализ показал (рис. 1), что в контрольной и инфицированной культурах количество клеток, содержащих активированные формы каспаз 3, 8 и 9, было незначительным. После обработки ДОКС количество неинфицированных клеток, содержащих каспазы, значительно увеличивалось. При воздействии ДОКС на инфицированную популяцию ТНР-1 количество клеток с активированными каспазами снижалось приблизительно в 3 раза по сравнению с неинфицированными клетками ( $P < 0.05$ ). Таким образом, после заражения ЦМВ в клетках ТНР-1 снижаются генотоксическое действие ДОКС и доля апоптотических клеток.

Исследование транскрипции методом ОТ-ПЦР показало, что в неинфицированных клетках ТНР-1 наблюдается высокая активность гена *TP73*. Отношение уровней

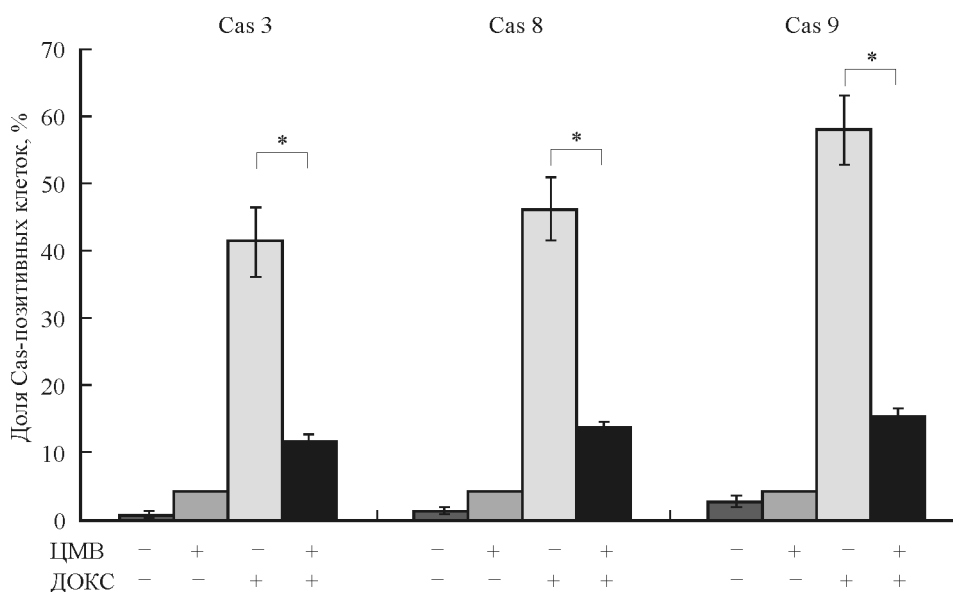


Рис. 1. Выявление каспаз 3, 8 и 9 в ЦМВ-инфицированных клетках ТНР-1 без обработки ДОКС и через 20 ч после воздействия антибиотика.

Звездочкой обозначены достоверные различия показателей между группами ( $P < 0.05$ ).

изоформ-специфических мРНК этого и референсного гена *GAPDH* составило  $3 \times 10^{-2}$  и  $1 \times 10^{-2}$  для изоформ TAp73 и DNp73, что на 3 порядка выше, чем экспрессия гена *TP73* в неопухолевых клетках ФЛЭЧ (Fedorova et al., 2015). В ЦМВ-инфицированных клетках ТНР-1 наблюдали незначительное снижение уровней мРНК для изоформ TAp73 и DNp73 без выраженной динамики по ходу инфекции. Идентификация мРНК для изоформ с измененным С-концом показала наличие 4 типов мРНК. Наиболее выраженной оказалась  $\alpha$ -изоформа. В меньшем количестве присутствовала мРНК для  $\beta$ -изоформы, а экспрессия изоформ  $\gamma$  и  $\epsilon$  была еще слабее.

Для иммуноблотинга мы использовали МКА именно к изоформе альфа. Это позволяло идентифицировать более короткую изоформу как DNp73. Действительно, на иммуноблотах лизатов неинфицированных клеток ТНР-1

были выявлены две полосы примерно равной интенсивности, по молекулярной массе соответствующие изоформам TAp73альфа и DNp73альфа (рис. 2). В инфицированных клетках отмечали постепенное снижение уровня белка TAp73 при сохранении количества изоформы DNp73. Обработка неинфицированных клеток доксорубином приводила к явному увеличению экспрессии белка TAp73 и изменению баланса укороченной и полноразмерной изоформ в пользу последней. При обработке ДОКС ЦМВ-инфицированных клеток баланс изоформ восстанавливался за счет снижения количества изоформы TAp73альфа и увеличения количества изоформы DNp73. Обработка клеток ТНР-1 ДОКС и заражение ЦМВ в отдельности повышали уровень E2F1 в 2.5—1.8 раза соответственно. В то же время при действии ДОКС на ЦМВ-инфицированные опухолевые клетки содержа-

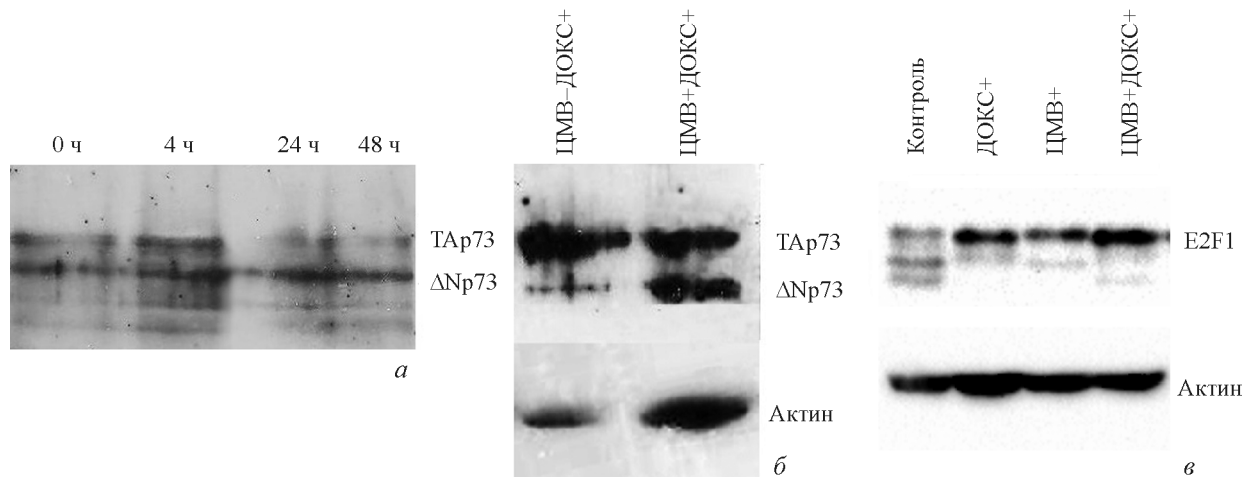


Рис. 2. Выявление изоформ белка p73 и белка E2F1 с помощью иммуноблотинга.

а — изоформы белка p73 TAp73 и DNp73 в неинфицированных и инфицированных клетках ТНР-1; пробы выровнены по общему количеству белка. б — изоформы белка p73 в неинфицированных и инфицированных клетках после действия ДОКС. в — белок E2F1 в неинфицированных и инфицированных клетках ТНР-1 без воздействия и после воздействия ДОКС.

ние данного транскрипционного фактора изменялось значительно сильнее, увеличиваясь в 5 раз.

Для выяснения молекулярных механизмов, влияющих на действие ДОКС в инфицированных опухолевых клетках ТНР-1, в настоящей работе были изучены два транскрипционных фактора — E2F1 и p73. В клетках ТНР-1 из укороченных изоформ мы идентифицировали только изоформу DNp73, транскрибируемую со второго промотора, который не стимулируется E2F1. В связи с этим представляет интерес анализ взаимодействия этих двух транскрипционных факторов на белковом уровне. Полученные данные указывают на то, что увеличение количества изоформы DNp73 является критическим фактором в ответе инфицированных клеток ТНР-1 на действие доxorубина. Резистентность, ассоциированная с высокими уровнями DNp73 и E2F1, возможно, опосредуется через удаление ингибирующего влияния miR205 на экспрессию Bcl2 и АТФ-связывающих кассетных транспортеров (Alla et al., 2012). Белок DNp73, ингибируя miR205, приводит также к накоплению E2F1. E2F1 повышает устойчивость к индуцированному апоптозу посредством прямого взаимодействия с TAp73 и ингибирования его транскрипционной активности в отношении промоторов MDM2 и ВАХ. Показано, что большие количества E2F1 индуцируют даже деградацию TAp73 в протеасомонезависимой манере (Ozaki et al., 2009). Данные, полученные в настоящей работе, могут способствовать выбору молекулярных мишеней для эффективной терапии опухолей, содержащих белки и (или) ДНК ЦМВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 17-04-00812).

## Список литературы

- Волницкий А. В., Виноградская Г. П., Филатов М. В. 2012. Экспрессия гена p73 в глиомах. Вопросы онкологии. 58 (4): 545—548.
- Alla V., Kowtharapu B. S., Engelmann D., Emmrich S., Schmitz U., Steder M., Pulzer B. M. 2012. E2F1 confers anticancer drug resistance by targeting ABC transporter family members and Bcl-2 via the p73/DNp73-miR205 circuitry. *Cell Cycle*. 11: 3067—3078.
- Chen H. P., Chan Y. J. 2014. The oncomodulatory role of human cytomegalovirus in colorectal cancer: Implications for clinical trials. *Front. Oncol.* 4: 1—5.
- Engelmann D., Meier C., Alla V., Putzer B. M. 2015. A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression. *Oncogene*. 34: 4287—4299.
- Fedorova N. E., Emelyanova S. S., Vinogradskaya G. R., Chichev E. V., Murzakova A. V., Kirichenko A. A., Verbenko V. N., Kushch A. A. 2015. The effect of the anticancer drug doxorubicin on cytomegalovirus infected human fibroblasts. *Cell Tissue Biol.* 9: 377—384.
- Lunghi P., Costanzo A., Mazzera L., Rizzoli V., Levrero M., Bonati A. 2009. The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clin. Cancer Res.* 15: 6495—6502.
- Ozaki T., Okoshi R., Ono S., Kubo N., Nakagawara A. 2009. Deregulated expression of E2F1 promotes proteolytic degradation of tumor suppressor p73 and inhibits its transcriptional activity. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 387: 143—148.
- Söderberg-Nauclér C., Johnsen J. I. 2015. Cytomegalovirus in human brain tumors: role in pathogenesis and potential treatment options. *World J. Exp. Med.* 5: 1—10.
- Terrasson J., Allart S., Martin H., Lule J., Haddada H., Caput D., Davrinche C. 2005. P73-dependent apoptosis through death receptor: impairment by human cytomegalovirus infection. *Cancer Res.* 65: 2787—2794.

Поступила 7 III 2018

## PARTICIPATION OF TRANSCRIPTIONAL FACTORS E2F1 AND p73 IN THE DEVELOPMENT OF DOXORUBICIN RESISTANCE IN THE TUMOROUS CELLS THP-1 INFECTED WITH HUMAN CYTOMEGALOVIRUS

S. S. Emelyanova,<sup>1</sup> Ya. Yu. Chernoryzh,<sup>2</sup> K. I. Yurlov,<sup>2</sup> N. E. Fedorova,<sup>2</sup> A. V. Ivanov,<sup>3</sup> S. N. Kochetkov,<sup>3</sup> V. N. Verbenko,<sup>1</sup> A. A. Kushch,<sup>2</sup> G. R. Vinogradskaya<sup>1</sup>. \*

<sup>1</sup> B. P. Konstantinov Petersburg Nuclear Physics Institute, National Research Centre «Kurchatov Institute», Gatchina, Leningrad Region, 188300,

<sup>2</sup> N. F. Gamaleya National Research Center of Epidemiology and Microbiology, Ministry of Healthcare of Russian Federation, Moscow, 123098, and

<sup>3</sup> V. A. Engelhardt Institute of Molecular Biology RAS, Moscow, 119991;

\* e-mail: vinogradskaya\_gr@pnpi.nrcki.ru

Leukemia cells taken from different patients with malignant hematologic diseases vary in their sensitivity to anticancer drugs, doxorubicin (DOX) including. Chemotherapy resistance lowers the therapy efficiency and promotes the development of metastases as well as tumor recurrence. The efforts to encourage multiple drug resistance *in vivo* have not presented major achievements as yet. Alternative ways may be associated with E2F1 regulation of p73 protein whose isoforms can have both pro-oncogenic (DNp73) and anti-oncogenic (TAp73) effect. The E2F1/p73 pathway may be influenced by human cytomegalovirus (CMV) that is often found in tumors due to the fact that the viral genome strategy includes the apoptosis block. In our work, we are pioneers to demonstrate that in monocytic leukemia cells of THP-1 line infected with CMV the level of E2F1 increases considerably while p73 protein isoforms balance is shifted to the predominance of shortened isoform DNp73, which favours leukemia cells survival after their treatment with DOX.

Key words: doxorubicin, cytomegalovirus, THP-1 cells of acute monocytic leukemia, E2F1, TAp73 and DNp73 isoforms of p73 protein