

роста уже сформированных опухолей в модели мышинных ксенографтов. Внутриопухолевая экспрессия аденовирусного E1A хорошо переносилась животными во время экспериментов, что подтверждает данные клинических исследований о безопасности экспрессии аденовирусного E1A в организме млекопитающего. В большинстве случаев наблюдали замедление роста опухоли, а в единичных — полную ее деградацию.

Таким образом, полученные результаты являются отправной точкой для дальнейшего изучения механизмов антипролиферативного и сенсibiliзирующего влияния E1A в опухолевых клетках и возможности использования введения E1A-экспрессирующих векторов для сдерживания роста и (или) элиминации опухоли в организме млекопитающего. Полученная генно-инженерная конструкция для индуцируемой экспрессии аденовирусного E1A в клетках является удобным и технологичным инструментом для таких исследований. В дальнейшем полученные результаты могут быть использованы для адаптации модельной системы к условиям опухоли *in vivo*. При этом используемая конструкция может быть оптимизирована с целью снижения нагрузки на нормальные ткани за счет использования опухолеспецифических промоторов для контроля экспрессии аденовирусного E1A.

Примерами опухолеспецифических промоторов являются промоторы генов белков hTERT, Sox-2, CXCR4 и VIRC5, для которых характерна сверхэкспрессия контролируемых ими генов во многих типах опухолей и отсутствие или минимальная экспрессия в нормальных тканях (Rein et al., 2004; Pleshkan et al., 2011). Большинство опухолеспецифических промоторов гораздо менее активны по сравнению с конститутивными сильными вирусными промоторами (Gu, Fang, 2003; Zhu et al., 2004; van Houdt et al., 2006; Копорка et al., 2009). В различных линиях опухолевых клеток активность промотора гена сурвивина варьирует от 0.3 до 16 % от активности промотора цитомегаловируса (CMV) (Zhu et al., 2004; Van Houdt et al., 2006), а эффективность работы промотора гена TERT, кодирующего обратную транскриптазу теломеразы, может различаться до 20 раз (Gu, Fang, 2003). Одним из подходов, позволяющих решить проблемы эффективности опухолеспецифических промоторов, является использование гибридных двойных промоторов, один из которых опухолеспецифический, тогда как другой — сильный неспецифический (Davis et al., 2006). Однако для предварительных исследований эффекта внутриклеточной экспрессии гена интереса, в нашем случае раннего района аденовируса E1A, удобно отдать предпочтение сильному промотору и пренебречь опухолеспецифичностью.

Несмотря на то, что генная терапия с использованием E1A еще не одобрена для клинического использования, полученные результаты имеют не только фундаментальное, но и потенциальное прикладное значение, так как могут быть использованы для поиска новых подходов к лечению рецидивирующих опухолей.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Данная работа финансировалась за счет средств бюджета Российского научного фонда № 22-25-20229 (<http://rscf.ru/project/22-25-20229/>) и Санкт-Петербургского научного фонда в соответствии с соглашением от 13 апреля 2022 г. № 05/2022.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Эксперименты с животными проводили в соответствии с Руководством Национального института здравоохранения по уходу и использованию лабораторных животных (<http://oacu.od.nih.gov/regs/index.htm>). Протокол с использованием животных был одобрен Комитетом по этике экспериментов на животных Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия), протокол № 17/23 от 15 августа 2023 г.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Baluchamy S., Sankar N., Navaraj A., Moran E., Thimmapaya B.* 2007. Relationship between E1A binding to cellular proteins, c-myc activation and S-phase induction. *Oncogene*. V. 26. P. 781.
- Berhane S., Aresté C., Ablack J. N., Ryan G. B., Blackburn D. J., Mymryk J. S., Turnell A. S., Steele J. C., Grand R. J. A.* 2011. Adenovirus E1A interacts directly with, and regulates the level of expression of, the immunoproteasome component MECL1. *Virology*. V. 421. P. 149.
- Bernhard E. J., Hagner B., Wong C., Lubenski I., Muschel R. J.* 1995. The effect of E1A transfection on MMP-9 expression and metastatic potential. *Int. J. Cancer*. V. 60. P. 718.
- Chakraborty A. A., Tansey W. P.* 2009. Adenoviral E1A function through Myc. *Cancer Res*. V. 69. P. 6.
- Chang J. Y., Xia W., Shao R., Sorgi F., Hortobagyi G. N., Huang L., Hung M. C.* 1997. The tumor suppression activity of E1A in HER-2/neu-overexpressing breast cancer. *Oncogene*. V. 14. P. 561.
- Chang Y.-W., Hung M.-C., Su J.-L.* 2014. The anti-tumor activity of E1A and its implications in cancer therapy. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.)*. V. 62. P. 195.

- Cook J. L., Routes J. M. 2005. Adenovirus E1A gene-induced tumor cell rejection through cellular sensitization to immune and nonimmune apoptotic injuries. *Front. Biosci.-Landmark*. V. 10. P. 1396.
- Davis J. J., Wang L., Dong F., Zhang L., Guo W., Teraishi F., Xu K., Ji L., Fang B. 2006. Oncolysis and suppression of tumor growth by a GFP-expressing oncolytic adenovirus controlled by an hTERT and CMV hybrid promoter. *Cancer Gene Ther.* V. 13. P. 720.
- Deng J., Kloosterboer F., Xia W., Hung M.-C. 2002. The NH(2)-terminal and conserved region 2 domains of adenovirus E1A mediate two distinct mechanisms of tumor suppression. *Cancer Res.* V. 62. P. 346.
- Ferrari R., Su T., Li B., Bonora G., Oberai A., Chan Y., Sasidharan R., Berk A. J., Pellegrini M., Kurdistani S. K. 2012. Reorganization of the host epigenome by a viral oncogene. *Genome Res.* V. 22. P. 1212.
- Frisch S. M. 1994. E1a induces the expression of epithelial characteristics. *J. Cell Biol.* V. 127. P. 1085.
- Frisch S. M., Dolter K. E. 1995. Adenovirus E1a-mediated tumor suppression by a c-erbB-2/neu-independent mechanism. *Cancer Res.* V. 55. P. 5551.
- Frisch S. M., Reich R., Collier I. E., Genrich L. T., Martin G., Goldberg G. I. 1990. Adenovirus E1A represses protease gene expression and inhibits metastasis of human tumor cells. *Oncogene.* V. 5. P. 75.
- Gerstberger S., Jiang Q., Ganesh K. 2023. Metastasis. *Cell.* V. 186. P. 1564.
- Gu J., Fang B. 2003. Telomerase promoter-driven cancer gene therapy. *Cancer Biol. Ther.* V. 2. P. S64.
- Hendrickx R., Stichling N., Koelen J., Kuryk L., Lipiec A., Greber U. F. 2014. Innate Immunity to Adenovirus. *Hum. Gene Ther.* V. 25. P. 265.
- Hofer A., Crona M., Logan D. T., Sjöberg B.-M. 2012. DNA building blocks: keeping control of manufacture. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* V. 47. P. 50.
- Hung M. C., Hortobagyi G. N., Ueno N. T. 2002. Development of clinical trial of E1A gene therapy targeting HER-2/neu-overexpressing breast and ovarian cancer. In: *Cancer gene therapy: past achievements and future challenges* (N. A. Habib, ed). NY: Springer US. pp. 171–180.
- Ikeda M. A., Nevins J. R. 1993. Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell. Biol.* V. 13. P. 7029.
- Konopka K., Spain C., Yen A., Overlid N., Gebremedhin S., Düzgüneş N. 2009. Correlation between the levels of survivin and survivin promoter-driven gene expression in cancer and non-cancer cells. *Cell. Mol. Biol. Lett.* V. 14. P. 70.
- Liao Y., Zou Y.-Y., Xia W.-Y., Hung M.-C. 2004. Enhanced paclitaxel cytotoxicity and prolonged animal survival rate by a nonviral-mediated systemic delivery of E1A gene in orthotopic xenograft human breast cancer. *Cancer Gene Ther.* V. 11. P. 594.
- Marthaler A. G., Adachi K., Tiemann U., Wu G., Sabour D., Velychko S., Kleiter I., Schöler H. R., Tapia N. 2016. Enhanced OCT4 transcriptional activity substitutes for exogenous SOX2 in cellular reprogramming. *Sci. Rep.* V. 6. P. 19415.
- Mendoza G., González-Pastor R., Sánchez J. M., Arce-Cerezo A., Quintanilla M., Moreno-Bueno G., Pujol A., Belmar-López C., de Martino A., Riu E., Rodríguez T. A., Martín-Duque P. 2023. The E1a adenoviral gene upregulates the Yamanaka factors to induce partial cellular reprogramming. *Cells.* V. 12. P. 1338.
- Pelka P., Ablack J. N. G., Fonseca G. J., Yousef A. F., Mymryk J. S. 2008. Intrinsic structural disorder in adenovirus E1A: a viral molecular hub linking multiple diverse processes. *J. Virol.* V. 82. P. 7252.
- Pelka P., Miller M., Cecchini M., Yousef A. F., Bowdish D., Dick F., Whyte P., and Mymryk J. S. 2011. Adenovirus E1A Directly Targets the E2F/DP-1 Complex. *J. Virol.* V. 85. P. 8841.
- Pleshkan V. V., V. P. V., Alekseenko I. V., V. A. I., Zinovyeva M. V., V. Z. M., Vinogradova T. V., V. V. T., Sverdllov E. D., D. S. E. 2011. Promoters with cancer cell-specific activity for melanoma gene therapy. *Acta Naturae.* V. 3. P. 13.
- Radke J. R., Cook J. L. 2018. Expression of adenoviral E1A throws the PIDD switch. *Cell Death Dis.* V. 8: e2527. <https://doi.org/10.1038/cddis.2016.445>
- Radko S., Jung R., Olanubi O., Pelka P. 2015. Effects of adenovirus type 5 e1a isoforms on viral replication in arrested human cells. *PLoS One.* V. 10: e0140124. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0140124>
- Rao L., Debbas M., Sabbatini P., Hockenbery D., Korsmeyer S., White E. 1992. The adenovirus E1A proteins induce apoptosis, which is inhibited by the E1B19-kDa and Bcl-2 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* V. 89. P. 7742.
- Rein D. T., Breidenbach M., Nettelbeck D. M., Kawakami Y., Siegal G. P., Huh W. K., Wang M., Hemminki A., Bauerschmitz G. J., Yamamoto M., Adachi Y., Takayama K., Dall P., Curiel D. T. 2004. Evaluation of tissue-specific promoters in carcinomas of the cervix uteri. *J. Gene Med.* V. 6. P. 1281.
- Saito Y., Sunamura M., Motoi F., Abe H., Egawa S., Duda D. G., Hoshida T., Fukuyama S., Hamada H., Matsuno S. 2006. Oncolytic replication-competent adenovirus suppresses tumor angiogenesis through preserved E1A region. *Cancer Gene Ther.* V. 13. P. 242.
- Sánchez-Prieto R., Quintanilla M., Cano A., Leonart M. L., Martín P., Anaya A., Ramón y Cajal S. 1996. Carcinoma cell lines become sensitive to DNA-damaging agents by the expression of the adenovirus E1A gene. *Oncogene.* V. 13. P. 1083.
- Shisler J., Duerksen-Hughes P., Hermiston T. M., Wold W. S., Gooding L. R. 1996. Induction of susceptibility to tumor necrosis factor by E1A is dependent on binding to either p300 or p105-Rb and induction of DNA synthesis. *J. Virol.* V. 70. P. 68.
- Singhal G., Leo E., Setty S. K. G., Pommier Y., Thimmapaya B. 2013. Adenovirus E1A oncogene induces rereplication of cellular DNA and alters DNA replication dynamics. *J. Virol.* V. 87. P. 8767.
- Sunamura M., Yatsuoka T., Motoi F., Duda D. G., Kimura M., Abe T., Yokoyama T., Inoue H., Oonuma M., Takeda K., Matsuno S. 2002. Gene therapy for pancreatic cancer based on genetic characterization of the disease. *J. Hepatobiliary. Pancreat. Surg.* V. 9. P. 32.

- Tiainen M., Spitkovsky D., Jansen-Dürr P., Sacchi A., Crescenzi M. 1996. Expression of E1A in terminally differentiated muscle cells reactivates the cell cycle and suppresses tissue-specific genes by separable mechanisms. *Mol. Cell Biol.* V. 16. P. 5302.
- Van Houdt W.J., Haviv Y.S., Lu B., Wang M., Rivera A.A., Ulasov I.V., Lamfers M.L.M., Rein D., Lesniak M.S., Siegal G.P., Dirven C.M.F., Curiel D.T., Zhu Z.B. 2006. The human survivin promoter: a novel transcriptional targeting strategy for treatment of glioma. *J. Neurosurg.* V. 104. P. 583.
- White E. 1993. Regulation of apoptosis by the transforming genes of the DNA tumor virus adenovirus. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* V. 204. P. 30.
- Whyte P., Ruley H.E., Harlow E. 1988. Two regions of the adenovirus early region 1A proteins are required for transformation. *J. Virol.* V. 62. P. 257.
- Yamaguchi H., Chen C.-T., Chou C.-K., Pal A., Bornmann W., Hortobagyi G.N., Hung M.-C. 2010. Adenovirus 5 E1A enhances histone deacetylase inhibitors-induced apoptosis through Egr-1-mediated Bim upregulation. *Oncogene.* V. 29. P. 5619.
- Yu D., Wolf J.K., Scanlon M., Price J.E., Hung M.C. 1993. Enhanced c-erbB-2/neu expression in human ovarian cancer cells correlates with more severe malignancy that can be suppressed by E1A. *Cancer Res.* V. 53. P. 891.
- Zemke N.R., Hsu E., Barshop W.D., Sha J., Wohlschlegel J.A., Berk A.J. 2023. Adenovirus E1A binding to DCAF10 targets proteasomal degradation of RUVBL1/2 AAA+ ATPases required for quaternary assembly of multiprotein machines, innate immunity, and responses to metabolic stress. *J. Virol.* V. 97: e00993. <https://doi.org/10.1128/jvi.00993-23>
- Zhu Z.B., Makhija S.K., Lu B., Wang M., Kaliberova L., Liu B., Rivera A.A., Nettelbeck D.M., Mahasreshti P.J., Leath C.A., Yamamoto M., Alvarez R.D., Curiel D.T. 2004. Transcriptional targeting of adenoviral vector through the CXCR4 tumor-specific promoter. *Gene Ther.* V. 11. P. 645.

CREATION OF A MODEL LINE OF TUMOR CELLS WITH INDUCIBLE EXPRESSION OF ADENOVIRAL E1A TO STUDY ITS ANTIPROLIFERATIVE AND CYTOTOXIC PROPERTIES IN VITRO AND IN VIVO

A.V. Morshneva^a, A.M. Kozlova^a, O.O. Gnedina^a, M.V. Igotti^a, *

^a Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, 194064, St-Petersburg, Russia

* e-mail: marie.igotti@gmail.com

Over the past decades, gene therapy based on the adenoviral E1A has proven its benefit against a number of tumor diseases, both in animal models and in clinical studies. It has been shown that in addition to its own antiproliferative activity, E1A also has the ability to enhance the cytotoxic effect of some anticancer drugs. The use of E1A in combination therapy can solve a number of problems in clinical oncology, among which the most pressing is the problem of drug-resistance of tumor cells. This work describes the establishment of a cell model based on human colorectal cancer cells HCT116 and cisplatin-resistant HCT116/C cells with doxycycline-inducible expression of adenoviral E1A. We have shown the concentration-dependent and time-dependent dynamics of E1A expression upon doxycycline treatment, and shown the antiproliferative effect of adenoviral E1A in the HCT116-E1A and HCT116/C-E1A cells in vitro in experiments assessing viability in MTT and clonogenic activity tests and in vivo in xenograft mouse models. Thus, as a result of our work, a model was created to explore the antiproliferative and sensitizing properties of E1A in platinum-sensitive and platinum-resistant colorectal cancer cells and to search for new approaches to anticancer therapy both in vitro and in vivo. The resulting cell line is a convenient model for selecting the most promising combinations of cytostatic drugs with E1A-based gene therapy.

Keywords: adenoviral E1A, adenovirus, colorectal cancer, model cell line, antiproliferative effect, tumor cell sensitization