

УДК 576.385

## СОЗДАНИЕ МОДЕЛЬНОЙ ЛИНИИ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК С ИНДУЦИРУЕМОЙ ЭКСПРЕССИЕЙ АДЕНОВИРУСНОГО E1A ДЛЯ ИЗУЧЕНИЯ ЕГО АНТИПРОЛИФЕРАТИВНЫХ И ЦИТОТОКСИЧЕСКИХ СВОЙСТВ *IN VITRO* И *IN VIVO*

© 2024 г. А. В. Моршнева<sup>1</sup>, А. М. Козлова<sup>1</sup>, О. О. Гнедина<sup>1</sup>, М. В. Игotti<sup>1</sup>, \*

<sup>1</sup>Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064, Россия

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

Поступила в редакцию 23.11.2023

После доработки 12.12.2023

Принята к публикации 13.12.2023

В последние десятилетия генная терапия на основе аденовирусного E1A доказала свою эффективность в отношении ряда опухолевых заболеваний, как на животных моделях, так и в клинических исследованиях. Показано, что помимо собственной антипролиферативной активности, E1A также обладает способностью усиливать цитотоксический эффект некоторых противоопухолевых препаратов. Применение E1A в комбинированной терапии может решить ряд проблем клинической онкологии, среди которых наиболее актуальными являются проблема устойчивости или невосприимчивости опухолевых клеток к цитотоксическому воздействию. В настоящей работе описано создание клеточных моделей с индуцируемой антибиотиком доксициклином экспрессией белка аденовирусного E1A на основе клеток колоректального рака человека HCT116 и цисплатин-устойчивых клеток HCT116/C. Нами показана концентрационная и временная зависимость экспрессии белка E1A от доксициклина, а также показан антипролиферативный эффект аденовирусного E1A при индукции его экспрессии в полученных клетках HCT116-E1A и HCT116/C-E1A *in vitro* в экспериментах по оценке жизнеспособности в тестах МТТ и клоногенной активности, а также и *in vivo* в ксенорафтных мышинных моделях. Таким образом, в результате нашей работы была создана модель для анализа антипролиферативных и сенсibiliзирующих свойств E1A в чувствительных и платино-устойчивых клетках колоректального рака и поиска новых подходов противораковой терапии *in vitro* и *in vivo*. Полученная клеточная линия является удобной моделью для подбора наиболее перспективных сочетаний цитостатиков с генной терапией на основе E1A.

**Ключевые слова:** аденовирусный E1A, аденовирус, колоректальный рак, модельная клеточная линия, антипролиферативный эффект, сенсibilизация опухолевых клеток

DOI: 10.31857/S0041377124030041, EDN: PELLCN

Ранняя область *Ia* аденовируса человека (adenovirus early region *Ia*, *eIa*) представляет собой ген, который экспрессируется первым во время репликации аденовируса. Генетическая информация аденовируса кодируется двухцепочечной линейной молекулой ДНК. Примерно через 1 ч после вирусной инфекции запускается транскрипция аденовирусного генома с образованием первичного продукта гена *eIa*. В результате альтернативного сплайсинга, при котором части экзонов или интронов дифференциально соединяются или пропускаются, транскрибируется пять продуктов с коэффициентами седиментации 13S, 12S, 11S, 10S и 9S, каждый из которых кодирует разные белки с различным количеством аминокислотных остатков 289R, 243R, 217R, 171R, 55R соответственно (Radko et al., 2015). Белки 289R и 243R являются основными продуктами, кодируемыми *eIa* Ad5. Эти

два белка имеют почти одинаковые внутренние последовательности, за исключением 46 внутренних аминокислот, уникальных для белка 289R.

Кодируемые геном *eIa* белки функционально важны для репликации аденовируса. Аденовирус обычно инфицирует терминально дифференцированные эпителиальные клетки, что создает для вируса проблему репликации его ДНК. В дифференцированных клетках, таких как эпителиальные, недостаточно условий для репликации вирусного генома. В частности, не хватает пула дезоксирибонуклеотидов и вспомогательных факторов, необходимых для репликации (Hofer et al., 2012). ДНК-вирусы способны преодолевать это ограничение благодаря сформированной стратегии перевода клеток в S-фазу клеточного цикла, в которой есть все условия для репликации вируса (Hofer et al., 2012).

Белок E1A раннего района аденовируса является определяющим фактором, ответственным за перевод дифференцированных клеток в S-фазу после инфекции (Pelka et al., 2008). E1A дерегулирует клеточный цикл и способствует входу в S-фазу, связывая и инактивируя ключевой регулятор выхода из фазы G<sub>1</sub> клеточного цикла белок pRb и родственные ему белки p130 и p107, высвобождая транскрипционный фактор E2F (Ikeda, Nevins, 1993; Tiainen et al., 1996). E1A также способен взаимодействовать с белковым комплексом E2F/DP, активируя E2F-зависимые промоторы (Pelka et al., 2011). E1A-зависимый переход покоящихся клеток в S-фазу также связывают с p300-зависимой индукцией протоонкогена c-myc (Baluchamy et al., 2007; Singhal et al., 2013). Экспрессия E1A в результате инфекции аденовирусом покоящихся клеток приводит к возобновлению репликации клеточной ДНК, которая, однако, идет с нарушениями, в результате чего активируется клеточный ответ на повреждения ДНК (DNA damage response, DDR) (Singhal et al., 2013). Помимо индукции клеточного цикла и перехода клеток в S-фазу, E1A также вовлечен в регуляцию транскрипции с других вирусных промоторов, в подавление ранних этапов иммунного ответа, а именно компонентов врожденного иммунитета, участвующих в ответе на аденовирусную инфекцию, за счет снижения экспрессии IFN $\alpha$  (Cook, Routes, 2005; Hendrickx et al., 2014; Zemke et al., 2023) и инактивации иммунопротеасом (Berhane et al., 2011), а также в перепрограммирование клетки для более эффективной репродукции вируса (Marthaler et al., 2016; Mendoza et al., 2023).

Несмотря на участие аденовируса в кооперации с другими ранними генами в избегании иммунного ответа, экспрессия E1A (по многочисленным данным) приводит к увеличению чувствительности клеток к цитотоксическому воздействию компонентов клеточного иммунного ответа хозяина. Такое противоречие во влиянии E1A на иммунную систему объясняется E1A-зависимым ингибированием интерферон-активируемого сигнального пути, реализуемого как часть иммуносупрессирующего действия аденовируса, но в то же время приводящего к отмене у инфицированных клеток устойчивости к иммунному лизису (Cook, Routes, 2005). В контексте генной терапии рака эти данные представляют особый интерес, поскольку дополнительная стимуляция противоопухолевого иммунного ответа и селективный лизис опухолевых клеток являются несомненным преимуществом в терапии, тогда как иммуносупрессия, вызванная вирусом, не является желательным эффектом. Кроме того, на фоне

экспрессии E1A усиливается действие стимулов, индуцирующих апоптоз, таких как факторы TNF, химиотерапевтические агенты и окислительный стресс (Radke, Cook, 2018).

Показаны онкосупрессорные свойства E1A в самых разных типах опухолевых клеток человека: карциноме, фибросаркоме и меланоме (Frisch et al., 1990; Frisch, Dolter, 1995), что удивительно, принимая во внимание разнообразие генетических изменений в этих типах опухолей. Среди возможных E1A-опосредованных механизмов, подавляющих развитие опухоли, выделяют репрессию транскрипции протоонкогена HER-2/neu (Yu et al., 1993; Chang et al., 1997; Hung et al., 2002), сенсбилизацию клеток к такому виду клеточной гибели как апоптоз (Frisch, 1994), подавление метастатического потенциала (Bernhard et al., 1995), снижение васкуляризации опухоли (Saito et al., 2006), повышение чувствительности к фактору некроза опухоли (Shisler et al., 1996; Deng et al., 2002), а также индукцию апоптоза (Rao et al., 1992; White, 1993; Deng et al., 2002).

Несмотря на участие в широком спектре клеточных процессов и изменении клеточной транскрипции в глобальном масштабе (Ferrari et al., 2012), E1A не обладает ДНК-связывающей способностью (Pelka et al., 2008). Вместо этого E1A связывается с разнообразными клеточными белками, изменяя их активность или локализацию (Pelka et al., 2008). Взаимодействие E1A с белками ремоделирования хроматина, такими как CBP/p300 и p400, также считается необходимым для функции E1A (Chakraborty, Tansey, 2009; Singhal et al., 2013).

Экспрессия аденовирусного E1A повышает чувствительность ряда опухолевых клеток млекопитающих к действию цитотоксических агентов, используемых в противоопухолевой терапии, таких, как этопозид, паклитаксел, цисплатин, таксаны и др. (Sánchez-Prieto et al., 1996; Liao et al., 2004; Chang et al., 2014). При этом подобной сенсбилизации не обнаруживалось в нормальных клетках (Sunamura et al., 2002; Yamaguchi et al., 2010). В связи с этим для исследователей представляет интерес изучение возможности использования аденовирусного E1A в комбинированной терапии опухолей с целью снижения концентраций используемых терапевтических препаратов для устранения побочных эффектов, а также для возможного использования E1A для лечения опухолей, которые приобрели устойчивость к препаратам в ходе терапии.

В представленной работе описано получение модельных линий клеток колоректального рака человека, чувствительных и устойчивых к цисплатину,

с индуцируемой экспрессией аденовирусного E1A. Предложенная нами модель является удобным подходом для изучения способностей аденовирусного E1A оказывать антипролиферативное и (или) сенсибилизирующее к действию цитостатиков влияние на опухолевые клетки. В нашей модели накопление аденовирусного белка E1A индуцируется в клетках добавлением антибиотика доксициклина, одобренного в США FDA (Управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов) и Росздравнадзором в Российской Федерации (Федеральной службой по надзору в сфере здравоохранения и социального развития). Такая модель избавляет исследователей от решения проблемы доставки E1A в клетки-мишени как в экспериментах *in vitro*, так и *in vivo*. Кроме того, в работе приведены результаты использования полученных модельных клеточных линий в экспериментах *in vitro* и *in vivo*, доказывающих антипролиферативную способность аденовирусного E1A в отношении опухолевых клеток.

## МАТЕРИАЛ И МЕТОДИКА

**Конструирование вектора Tight-E1A.** Фрагмент аденовируса, кодирующий E1A, был амплифицирован с использованием праймеров, включающих сайты для эндонуклеаз BamHI и EcoRI (F-grE1-ggtgatccTTGAGTGCCAGCGAGTAG, R-grE1-gctgaattcCAAACTCCCAAGCCTC), с помощью высокоточной ДНК-полимеразы для синтеза крупных фрагментов ДНК (Encyclo, Евроген, Россия). В качестве матрицы была использована плазмидная ДНК p1A, которая содержит последовательность генома аденовируса 5-го типа (1—1834 н. п.) (Whyte et al., 1988). Очистку амплифицированного фрагмента раннего района аденовируса E1A (E1A-AФ) от матрицы и праймеров осуществляли при электрофоретическом разделении в геле из легкоплавкой агарозы. Фрагмент геля, содержащий синтезированный участок E1A-AФ, процессировали в соответствии с инструкцией фирмы производителя для экстракции ДНК из геля (Cleanup Mini для очистки ДНК из геля, Евроген, Россия).

Очищенный амплифицированный фрагмент ДНК, кодирующий E1A, последовательно обрабатывали эндонуклеазами рестрикции BamHI и EcoRI (SibEnzyme, Россия) в течение 1 ч при 37°C для формирования “липких” концов, удобных для последующего лигирования в вектор pLVX-Tight-Puro, который также последовательно обрабатывали BamHI и EcoRI. Для того чтобы исключить самолигирование,

обработанные рестриктазами амплифицированный фрагмент ДНК E1A-AФ и pLVX-Tight-Puro отделяли от вырезанных рестриктазами фрагментов электрофоретически в геле из легкоплавкой агарозы. После очистки линеаризованный акцепторный вектор pLVX-Tight-Puro лигировали с фрагментом E1A-AФ при 16°C в течение 2 ч. Лигазная смесь объемом 10 мкл содержала 200 ед. T4-лигазы (SibEnzym, Россия), 1-кратный буфер для лигазы (SibEnzym, Россия), 50 нг вектора и 55 нг вставки. Количество вставки для лигирования (X, нг) вычисляли по формуле:

$$X = (10 \times Y \times L \times Y) / L,$$

где Y — количество вектора (нг), L — длина вставки (пары оснований). По истечении времени лигирования лигазной смесью (3 мкл) трансформировали 50 мкл компетентных клеток бактерий *Escherichia coli* штамма Stable3, специально разработанного для амплификации крупных лентивирусных векторов. Трансформированные клетки селектировали на ампициллине, отобранные клоны анализировали на наличие в них E1A-экспрессирующего вектора Tight-E1A методом рестрикционного анализа, ПЦР с праймерами к E1A, а также при секвенировании (Евроген, Россия).

**Паковка вирусов и получение стабильных клонов.** Лентивирусные векторы Tet-ON системы Tight-E1A (10 мкг), кодирующий аденовирусный E1A под контролем Tet-оператора, или вектор p-LVX-Tet-On-Advanced (10 мкг), кодирующий рекомбинантный фактор транскрипции rtTA, котрансфицировали с помощью кальций-фосфатной трансфекции в течение 16 ч в клетки линии НЕК293FT (для сборки вирусных частиц в чашках 10 см) с двумя упаковочными плазмидами — psPAX2, 2 мкг (#12260, Addgene, США) и pMD2.G, 2 мкг (#12259, Addgene, США), экспрессирующими оболочку лентивируса. Культуральную среду, содержащую вирусные частицы, собирали трижды через каждые 24 ч. Вирусы из среды осаждали центрифугированием при 47 000 об/мин в течение 2 ч при 4°C и использовали для трансдукции целевых клеточных линий (HCT116 или HCT116/C) с последующим отбором клонов, в которые произошло встраивание конструкции с индуцируемой экспрессией E1A, на селектирующей антибиотике. Инфицированные Tight-E1A клетки селектировали на среде с 15 мкг/мл пурамицина, а после инфицирования p-LVX-Tet-On-Advanced на гигромицине В (100 мкг/мл) для получения клеточных линий с индуцибельной экспрессией E1A (HCT116-E1A или HCT116/C-E1A).

**Клеточные линии и воздействия.** В работе использовали клетки линии колоректальной карциномы человека НСТ116 («ПраймБиоМед», Россия). Клетки культивировали в среде DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium), содержащей 10 % FCS (fetal calf serum) и гентамицин, при 37 °C и 5 % CO<sub>2</sub>. Для индукции экспрессии гена аденовируса *e1a* клетки обрабатывали доксициклином (аптечный препарат) в концентрации 0.5–1 мкг/мл на протяжении 24–72 ч для анализа жизнеспособности или до 14 сут для анализа образования колоний.

**Клоногенный анализ.** Для анализа образования колоний клетки рассеивали на 12-луночные планшеты по 400 клеток на лунку. Через 1 сут после посева в части клеток добавляли доксициклин в концентрации 1 мкг/мл для индукции экспрессии *e1a*. Через 14 сут, когда сформированные вокруг единичных клеток колонии определялись невооруженным глазом, их фиксировали в охлажденном 100 %-ном метаноле в течение 10 мин на холоде, окрашивали в течение 10 мин в 0.5 %-ном растворе кристаллического фioletового, приготовленного в 25 %-ном метаноле, отмывали водой и фотографировали. Число окрашенных колоний считали и сравнивали с необработанным контролем. Анализировали изображения с помощью программного продукта Image J (1.51d; Bethesda, MD, USA).

**Оценка жизнеспособности клеток.** Использовали тест МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-тетразолиум бромид). Для этого клетки рассеивали на 96-луночные планшеты в плотности  $15 \times 10^3$  клеток на ячейку и культивировали в присутствии или отсутствие доксициклина (0.5–1 мкг/мл) в течение 24–72 ч. Жизнеспособность определяли спектрофотометрически, оценивая метаболическую активность клеток по способности восстанавливать МТТ (Sigma, США) до нерастворимого формазана, который имеет пурпурное окрашивание. 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 культуральную среду удаляли, а клетки лизировали в ДМСО. Определяли оптическую плотность в каждой лунке при длине волны 570 нм на приборе Multiskan-EX (Thermo Electron, Германия), используя ДМСО в качестве отрицательного контроля.

**Эксперимент *in vivo*.** Ксенотрансплантаты выращивали после подкожной инъекции  $2 \times 10^6$  клеток НСТ116-E1A в 0.1 мл среды, смешанной в пропорции 1:1 с матригелем (ABW, Китай), в среднюю дорсальную область спины самцов иммунодефицитных мышей Balb/c-NUDE в возрасте 8 нед. Мышей со-

держали в пластиковых клетках по четыре мыши на клетку в условиях 12-часового цикла свет/темнота со свободным доступом к пище и воде и поддержания постоянной температуры и влажности. Мыши получали стандартную диету из облученных кормов (ЗАО Тосненский комбикормовый завод, Россия). После инокуляции животных делили на две группы, которые получали питьевую воду без ограничения. Одна группа получала воду, содержащую 2 мг/мл доксициклина, вторая — воду без доксициклина. Смену воды производили через день в связи с относительной нестабильностью доксициклина в водном растворе. Измерения объемов опухолей производили каждые 3 сут. Использовали электронный штангенциркуль, определяя наибольшие диаметры: продольный (длину  $L$ ) и поперечный (ширину  $S$ ). Объем опухоли  $V$  вычисляли по формуле  $V = \pi / 6 \times (L \times S \times S)$ . Когда объем опухоли превышал 800 мм<sup>3</sup>, мышей умерщвляли по этическим соображениям. Из крупных органов и опухолей брали биопсии, из которых выделяли белки для дальнейшего вестерн-блот-анализа.

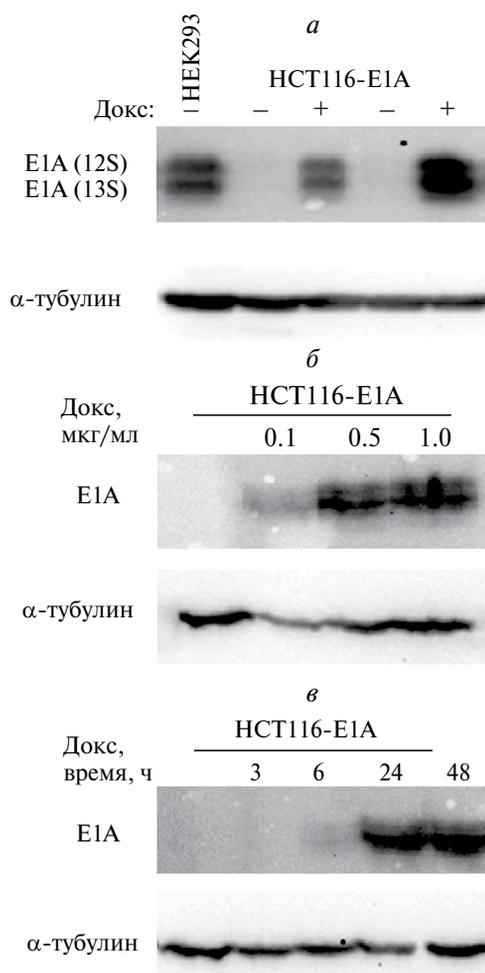
**Вестерн-блот-анализ.** Из культур клеток и препаратов биопсий опухолей и тканей получали экстракты, инкубируя клетки и препараты в течение 20 мин при 4 °C в PBS, содержащем 1 % NP-40, 0.5 % дезоксихолата натрия, 0.1 % додецилсульфата натрия (SDS), ингибиторы протеаз, фосфатаз и 1 mM PMSF. Клеточные экстракты (20 мкг) прогревали в буфере для проб (60 mM Tris-Cl pH 6.8, 2 % SDS, 10 % глицерина, 5 % β-меркаптоэтанола, 0.01 % бромфенолового синего) при 95 °C в течение 5 мин. Белки разделяли электрофоретически в 10 %-ном полиакриламидном геле в присутствии 0.1 % SDS, переносили на мембрану PVDF (Merck Millipore, США). Мембраны блокировали в течение 1.5 ч при комнатной температуре в блокирующем буфере (5 % обезжиренного сухого молока в PBST (PBS с 0.5 % Tween 20)) и инкубировали с первичными антителами, разведенными в 1–5 %-ном BSA/PBST, в течение ночи при 4 °C. Мембраны отмывали в PBST и инкубировали 1 ч при комнатной температуре в 5 %-ном молоке на PBST, содержащем вторые антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена (Jackson ImmunoResearch, Великобритания). Белки на мембранах выявляли методом усиления хемилюминесценции (Thermo Sci., США) и визуализировали на PXi6 Access (Syngene, Великобритания). В работе использовали антитела к Ad-2/5 E1A (M73, sc-25; Santa Cruz Biotechnology, США), каспазе 9 (#9504) и GAPDH (14C10, #2118) (Cell Signalling, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

**Получение клеток с индуцируемой экспрессией аденовирусного E1A.** Для исследования влияния аденовирусного белка E1A на пролиферацию опухолевых клеток колоректального рака человека был сконструирован вектор Tight-E1A, несущий ранний район E1A аденовируса 5 типа человека (Ad5) под контролем Tet-оператора, на основе вектора pLVX-Tight-Puro. Аденовирусный E1A экспрессируется с вектора Tight-E1A при добавлении антибиотика тетрациклинового ряда доксициклина. В присутствии доксициклина трансаактиватор Tet-On специфически связывается и активирует транскрипцию с индуцибельного промотора, который контролирует экспрессию интересующего гена. Необходимость индуцированной экспрессии E1A обусловлена тем, что E1A обладает достаточно выраженными проапоптотическими свойствами, в результате чего получение постоянной E1A-экспрессирующей клеточной линии может вызвать затруднения по причине спонтанной гибели клеток. Поэтому была получена клеточная линия НСТ116-E1A, в которой базальная экспрессия E1A подавлена, а ее активация происходит только в присутствии антибиотика доксициклина (рис. 1а). На рис. 1 представлены данные вестерн-блотинга, демонстрирующие накопление белка E1A аденовируса в зависимости от концентрации индуцирующего экспрессию антибиотика доксициклина (рис. 1б) и времени его действия в клетках НСТ116-E1A (рис. 1в).

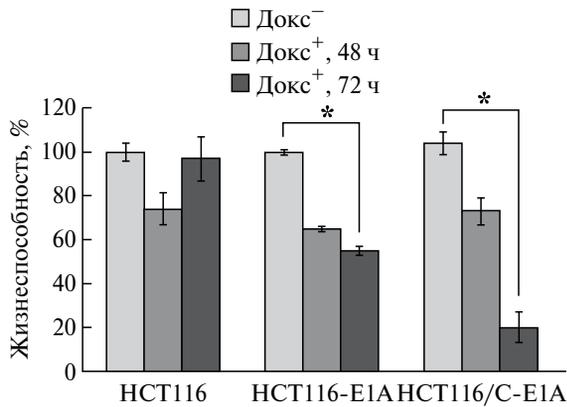
Анализ антипролиферативной способности аденовирусного E1A. Оценку влияния аденовирусного E1A на пролиферацию опухолевых клеток проводили, сравнивая жизнеспособность клеток НСТ116-E1A без экспрессии E1A или при индуцированной экспрессии E1A при добавлении доксициклина в среду культивирования, по изменению метаболической активности, определяемой по тесту МТТ и клоногенной активности.

Клетки НСТ116-E1A оставляли необработанными или обрабатывали доксициклином в концентрации 0.5–1 мкг/мл в течение 24–72 ч и проводили тест МТТ, позволяющий количественно измерить метаболическую активность клеток. Данные МТТ-анализа показывают, что при культивировании клеток НСТ116-E1A в присутствии доксициклина жизнеспособность популяции клеток снижается по сравнению с клетками, культивируемыми без доксициклина, а к 72 ч сокращается вдвое, что свидетельствует об индукции клеточной гибели (рис. 2). Еще более выраженное снижение жизнеспособности при экспрессии E1A показано для устойчивых к цисплатину клеток НСТ116/С-E1A, остаточная популяция которых



**Рис. 1.** Влияние доксициклина (Докс) на экспрессию гена *e1a* под Tet-регулируемым промотором. а — Вестерн-блот с антителами против белка аденовируса E1A экстрактов разных клонов клеток НСТ116-E1A, необработанных (–) или обработанных (+) 1 мкг/мл Докс в течение 18 ч; экстракт клеток HEK293 использовали в качестве положительного контроля к E1A-экспрессирующим клеткам. б, в — Вестерн-блоты с антителами против белка аденовируса E1A экстрактов клеток НСТ116-E1A, необработанных (–) или обработанных Докс в различных концентрациях: 0.1–1 мкг/мл в течение 18 ч (б) или 1 мкг/мл в течение различного времени (3–48 ч; в).

к 72 ч культивирования в присутствии доксициклина составляет 20% от исходной. Для того, чтобы исключить возможность токсического влияния доксициклина на клетки НСТ116, проводили тест МТТ с исходными клетками НСТ116, в которые не встраивали конструкцию с индуцируемой экспрессией E1A. Клетки НСТ116 также рассевали и оставляли необработанными или обрабатывали доксициклином (1 мкг/мл) в течение 24–72 ч и проводили тест МТТ. Результаты показывают, что в клетках НСТ116



**Рис. 2.** Влияние доксициклина (Докс) на жизнеспособность клеток с индуцируемой экспрессией E1A (клетки HCT116-E1A и HCT116/C-E1A) и без нее (клетки HCT116).

Результаты теста МТТ представлены в виде графиков изменения оптической плотности, прямо пропорциональной жизнеспособности клеток, которую оценивали относительно контроля, принятого за 100%. Клетки оставляли необработанными (Докс<sup>-</sup>) или обрабатывали 1 мкг/мл Докс в течение 48–72 ч (Докс<sup>+</sup>). Здесь и на рис. 3, 4 представлены средние значения и их стандартные ошибки из 3–5 независимых экспериментов; сравнивали попарно значения для Докс<sup>-</sup> и Докс<sup>+</sup>, различия достоверны при  $p < 0.05$  (\*, тест Манна–Уитни).

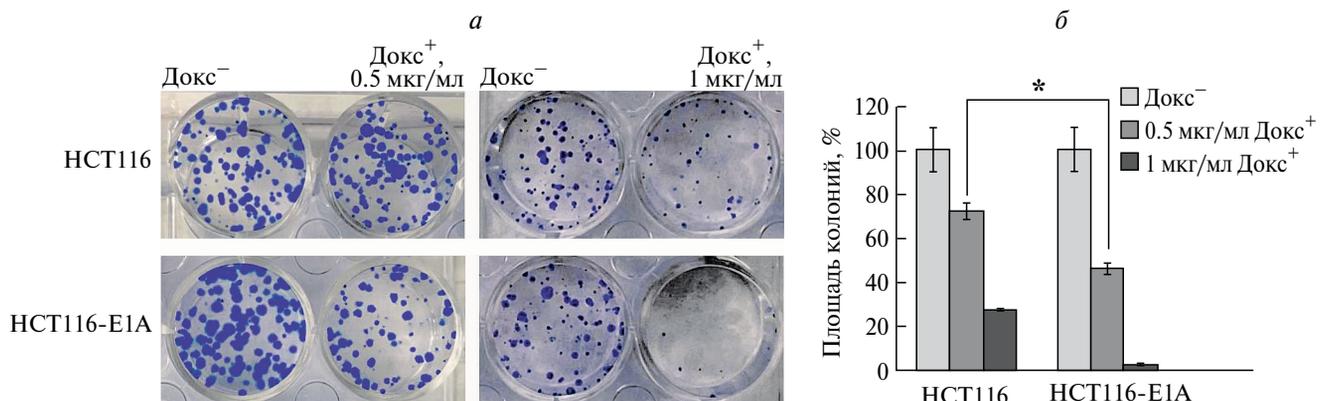
не происходит такого сильного сокращения популяции в присутствии доксициклина, как в клетках HCT116-E1A (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствует о том, что экспрессия аденовирусного E1A приводит к сни-

жению жизнеспособности клеток колоректального рака HCT116.

Аденовирусный E1A снижает клоногенную активность клеток колоректального рака человека. Для подтверждения результатов об антипролиферативном действии E1A в клетках колоректального рака анализировали клоногенную выживаемость. Клоногенный анализ или анализ образования колоний представляет собой анализ выживания и пролиферации клеток *in vitro*, основанный на способности отдельной клетки вырастить в колонию, состоящую как минимум из 50 клеток. Анализ, по своей сути, проверяет, насколько отдельные клетки в популяции способны к «неограниченному» делению.

Для изучения влияния аденовирусного E1A на клоногенную активность опухолевых клеток, оценивали способность клеток HCT116-E1A расти в клональном посеве и образовывать колонии в отсутствие или в присутствии доксициклина. На рис. 3 представлены фотографии лунок с колониями клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым, а также гистограммы усредненных результатов подсчета колоний, сформированных при культивировании без или в присутствии различных концентраций доксициклина. Данные клоногенного анализа показывают, что клетки HCT116-E1A, которые культивировали без доксициклина, формировали множественные крупные колонии. Тогда как при культивировании клеток HCT116-E1A в присутствии доксициклина, индуцирующего экспрессию E1A, колонии практически не формировались, что свидетельствует о спо-



**Рис. 3.** E1A снижает клоногенную активность клеток колоректального рака. *а, в* — Фотографии чашек с клонами клеток, окрашенных кристаллическим фиолетовым. Клетки HCT116 или HCT116-E1A рассеивали в клональной плотности и оставляли для формирования колоний в течение 14 сут в отсутствие доксициклина (Докс<sup>-</sup>) или в его присутствии (Докс<sup>+</sup>) в концентрации 1 (*а*) или 0.5 (*в*) мкг/мл в среде культивирования. Клетки HCT116 использовали в качестве контроля для анализа возможного токсического влияния доксициклина. *б, г* — Диаграммы усредненных значений клоногенной активности клеток HCT116 и HCT116-E1A относительно значений контрольных необработанных клеток (Докс<sup>-</sup>), принятых за 100%.

способности аденовирусного E1A снижать выживаемость клеток колоректального рака *in vitro*.

Для того чтобы оценить влияние самого антибиотика доксициклина на клоногенную активность клеток, анализировали способность клеток HCT116 образовывать колонии в присутствии различных концентраций доксициклина. При обработке доксициклином в концентрации 1 мкг/мл происходило сильное подавление клоногенной активности (рис. 3а, б), поэтому для уменьшения антипролиферативного эффекта доксициклина его концентрация была снижена до 0.5 мкг/мл (рис. 3в, г). Результаты показывают, что сам по себе доксициклин снижает клоногенную активность клеток HCT116, но значительно меньше, чем в клетках HCT116-E1A с индуцируемой экспрессией E1A, у которых клоногенная активность в присутствии 0.5 мкг/мл доксициклина снижается вдвое.

Ввиду выраженного антипролиферативного эффекта доксициклина, известного из данных литературы и подтвержденного нами, все эксперименты с использованием доксициклин-индуцируемых генно-инженерных конструкций, даже при использовании сниженных концентраций антибиотика, должны сопровождаться соответствующими контрольными данными, полученными на клеточных линиях, не несущих конструкцию. Все результаты *in vitro* экспериментов, представленных в данной работе, были проверены таким образом.

Полученные результаты показывают, что аденовирусный E1A проявляет антипролиферативную активность *in vitro* в клетках колоректального рака человека, снижая их жизнеспособность и клоногенную активность.

E1A замедляет рост опухоли в ксенографтных мышинных моделях. Влияние аденовирусного E1A на рост опухоли *in vivo* изучали на ксенографтных мышинных моделях. После подкожной инокуляции клеток колоректального рака человека HCT116-E1A с регулируемой экспрессией E1A мышей делили на две группы. Одна группа получала с питьевой водой доксициклин для индукции экспрессии *e1a*, а вторая (контрольная) получала чистую питьевую воду. Наблюдение за животными показало отсутствие видимых побочных эффектов при внутриопухолевой экспрессии аденовирусного E1A. Реакцию животных оценивали визуально и по изменению массы тела, которая оставалась сравнимой у животных контрольной группы и группы, получавшей доксициклин для индукции *e1a*.

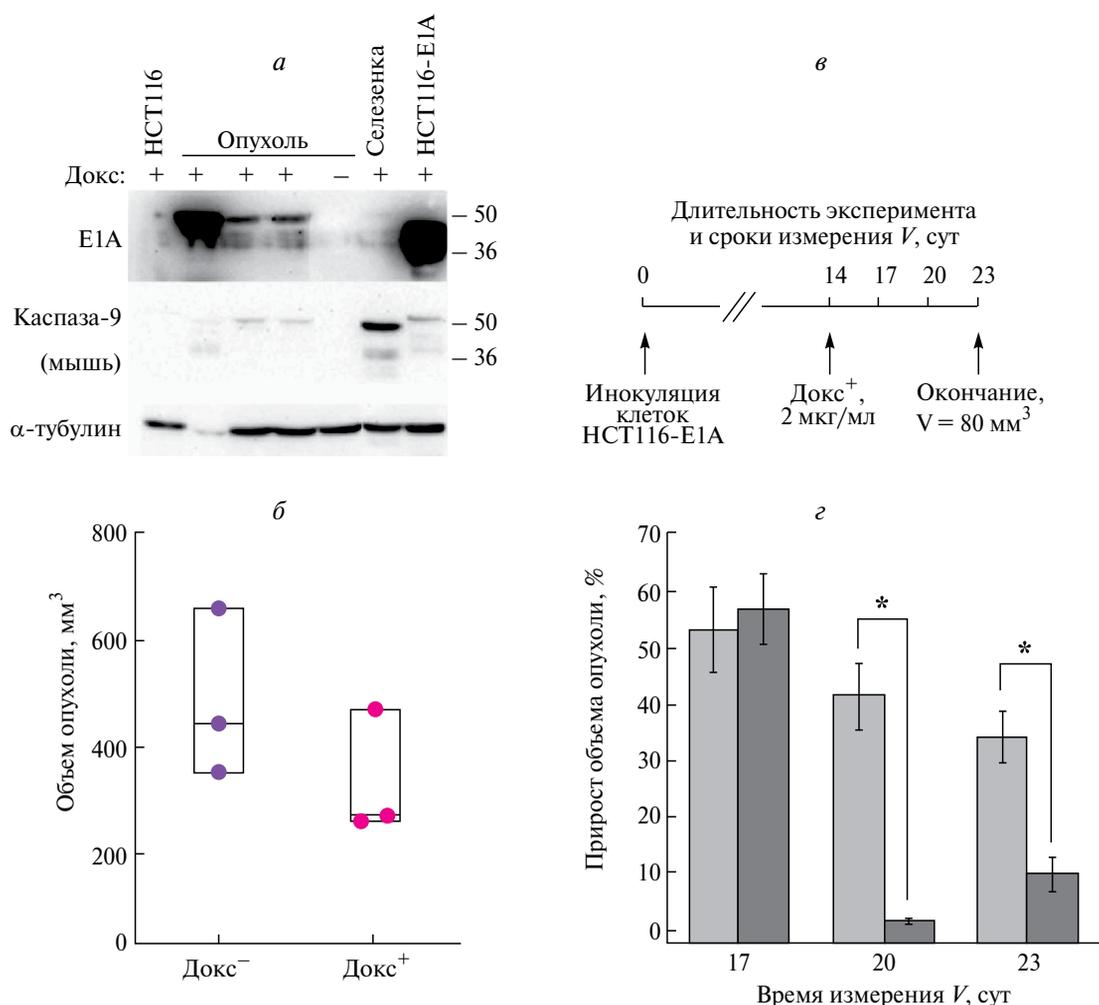
Результаты Вестерн-блот-анализа, приведенные на рисунке 4а, показывают, что у мышей, получавших с питьевой водой доксициклин, в биопсиях опухо-

лей присутствует белок E1A, тогда как в селезенке этих же животных E1A не выявляется, что говорит об отсутствии способности инокулированных клеток к метастазированию в присутствии E1A. При этом у животных, которые не получали доксициклин, E1A отсутствует в опухолевой биопсии. Визуальный анализ внутренних органов животных после эвтаназии также не показал наличия сформированных метастазов нигде в организме, опухоль имела четкую подкожную локализацию, была хорошо васкуляризована. Принимая во внимание способность E1A стимулировать переход покоящихся клеток в S-фазу клеточного цикла, можно предположить, что E1A может отменять потенциальную возможность клеток уйти в состояние покоя (дормантное). Тогда как процесс формирования метастазов подразумевает необходимость перехода клеток в состояние покоя на этапе после выхода клеток из кровотока (Gerstberger et al., 2023). Поэтому можно предположить, что при экспрессии E1A образование метастазов является маловероятным. Приведенные выше данные о влиянии E1A на клоногенную активность клеток (рис. 3) также могут служить аргументом в пользу участия E1A в снижении их метастатического потенциала.

Используя в вестерн-блотинге антитела, специфичные к белку каспазы 9 мышиноного происхождения, было подтверждено, что препараты опухолевых биопсий не содержат мышинных клеток. Специфическая полоса, соответствующая каспазе 9, окрашивалась только на дорожке, нагруженной белками из селезенки экспериментального животного (рис. 4а). Для контроля нагрузки использовали антитела против белка цитоскелета альфа-тубулина, специфические в отношении белка мышцы и человека.

Через 20 сут после инокуляции измеряли объемы опухолей, сформировавшихся у экспериментальных животных. На диаграмме рисунка 4б представлен усредненный объем опухолей трех мышей каждой группы. Полученные результаты показывают разницу в скорости формирования опухоли в ксенографтных мышинных моделях в зависимости от экспрессии *e1a*. У мышей, которые не получали доксициклин, средний объем сформировавшихся опухолей превосходит средний объем опухолей мышей, которые получали доксициклин с водой. Таким образом, развитие опухоли под контролем E1A, экспрессирующегося при индукции доксициклином, происходит с меньшей скоростью, что является следствием его антипролиферативного воздействия на опухолевые клетки.

Для анализа влияния E1A на уже сформировавшуюся опухоль мышам мужского пола линии Balb/c-Nude тоже проводили подкожную инъекцию клеток



**Рис. 4.** E1A замедляет рост опухоли в ксенографтных моделях у мышей Balb/c-Nude с инокулированными клетками колоректального рака человека НСТ116-E1A. *а* — Вестерн-блот тотальных белков, выделенных из опухолей, а также из селезенки мышей, получавших с питьевой водой доксициклин (Докс<sup>+</sup>), или не получавших его (Докс<sup>-</sup>), с антителами против каспазы 9,  $\alpha$ -тубулина и E1A; в качестве позитивного контроля использованы экстракты клеток НСТ116-E1A, обработанные 1 мкг/мл Докс в течение 24 ч, в качестве негативного — экстракты клеток НСТ116 без E1A-конструкции. *б* — Диаграммы прироста объемов опухолей за 20 сут в зависимости от присутствия Докс в питьевой воде. *в* — Схема дизайна эксперимента *in vivo* показывает длительность эксперимента и в какие сроки (сут) измеряли объем опухоли V после инокуляции. *г* — Диаграммы прироста объема опухолей, выраженных в процентах от объема опухолей предыдущего измерения; светлые столбцы — прирост объема опухолей у мышей контрольной группы, которые не получали доксициклин; темные — у мышей, получавших доксициклин (2 мг/мл) с 14-х сут эксперимента.

колоректального рака человека НСТ116-E1A и давали сформироваться опухолям в течение 14 сут (схема эксперимента представлена на рис. 4*в*). После этого мышей с опухолями делили на две группы, одна из которых получала питьевую воду с доксициклином, а вторая — воду без доксициклина, и проводили измерения объемов опухолей каждые 3 сут. Эксперимент продолжали до тех пор, пока объем опухоли не достигал 800 мм<sup>3</sup>.

На рис. 4*г* представлен прирост объема опухолей в течение 10 сут с момента добавления доксициклина.

Из приведенных данных видно, что в течение первых трех суток прирост опухолей не зависит от E1A. Однако с течением времени скорость прироста контрольных опухолей остается примерно на одинаковом уровне, тогда как рост опухолей, в которых индуцирована экспрессия E1A, заметно снижается (рис. 4*г*).

Таким образом, используя полученные клетки колоректального рака с индуцируемой экспрессией аденовирусного E1A в экспериментах *in vivo*, мы продемонстрировали негативное влияние белка E1A на формирование опухолей, а также на скорость при-

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<sup>a</sup>, A.M. Kozlova<sup>a</sup>, O.O. Gnedina<sup>a</sup>, M.V. Igotti<sup>a</sup>, \*

<sup>a</sup> 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