

УДК 578

СВЕРХРАННИЕ БЕЛКИ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСА УЧАСТВУЮТ В УСТАНОВЛЕНИИ РЕЗИСТЕНТНОСТИ К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ АНТИБИОТИКУ ДОКСОРУБИЦИНУ ИНФИЦИРОВАННЫХ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ ТНР-1

Я.Ю. Чернорыж, К.И. Юрлов, Р.А. Симонов, Н.Е. Федорова, А.А. Куц.

НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, РФ

Устойчивость опухолей к противоопухолевой терапии – актуальная проблема современной науки и здравоохранения. Резистентность к противоопухолевым препаратам не только снижает эффективность лечения злокачественных новообразований, но и способствует возникновению метастазов. В опухолях человека различного происхождения часто обнаруживаются гены цитомегаловируса человека (ЦМВ) [1]. Для определения вклада ЦМВ в установлении резистентности к противоопухолевым препаратам необходимо выяснить молекулярные механизмы действия вирусных факторов, участвующих в возникновении устойчивости. Однако в настоящее время данных, полученных при изучении этой проблемы, недостаточно.

Цель настоящей работы состояла в изучении влияния цитомегаловирусной инфекции на развитие резистентности к антибиотику доксорубицину клеток лейкемии человека ТНР-1 и в анализе вклада вирусных белков в выживание инфицированных клеток, обработанных доксорубицином.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

В качестве объекта исследования использовали клетки ТНР-1, выделенные от больного острой моноцитарной лейкемией [2]. Клетки культивировали в среде RPMI с добавлением 10 % эмбриональной телячьей сыворотки в атмосфере 5 % CO₂. Клетки заражали цитомегаловирусом человека (ЦМВ) штамм AD169. Присутствие ДНК ЦМВ выявляли методом ПЦР в реальном времени, экспрессию вирусных генов UL122, UL83, UL54, UL138 и UL82 – ОТ-ПЦР, белок ЦМВ IE1-p72 – методом иммуноблоттинга (ИБ). Чувствительность к доксорубицину, применяемому для лечения широкого спектра онкологических заболеваний [3], оценивали по влиянию на жизнеспособность клеток ТНР-1, которую анализировали с помощью микротетразолиевого теста (МТТ) [4].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Клетки ТНР-1 заражали ЦМВ (5 БОЕ/кл) и на 1, 7 и 14 сут определяли содержание вирусной ДНК методом ПЦР. Через 1 сут после инфицирования (с.п.и.) содержание вирусной ДНК составляло 15 ± 6 копий/кл и не изменялось в течение 14 сут (18 ± 5 копий/кл), $p < 0.05$. Методом ОТ-ПЦР изучали уровни мРНК генов, активных при литической инфекции (сверххранного UL122 и ранних UL83, UL54), а также генов UL82 и UL138, экспрессия которых показана при латентной инфекции [5]. К 7 с.п.и. по сравнению с 1 с.п.и. уровень мРНК генов UL122 и UL54 возрастал в 5 и 3 раза соответственно, гена UL83 не изменялся, но к 14 с.п.и. уровни мРНК трех литических генов снижались относительно 7 с.п.и. в 10, 8 и 7 раз соответственно ($p < 0,05$). Транскрипционная активность латентно-ассоциированных генов UL82 и UL138 повышалась к 7 с.п.и. в 8 и 7 раз соответственно и сохранялась на высоком уровне до 14 сут (табл. 1).

Таблица 1. Относительное содержание мРНК сверххранного UL122, ранних UL83, UL54 и латентных UL138, UL82 генов в клетках ТНР-1 в динамике ЦМВ инфекции.

Гены ЦМВ	UL138	UL82	UL122	UL54	UL83
Сутки после инфицирования					
1*	1 ± 0.15	1 ± 0.25	1 ± 0.13	1 ± 0.04	1 ± 0.31
7	$6^{**} \pm 0.18$	8.4 ± 1.03	5 ± 1.3	3.14 ± 0.12	1.4 ± 0.08
14	9 ± 3.46	7.23 ± 1.7	0.5 ± 0.02	0.4 ± 0.03	0.2 ± 0.07

* Уровни мРНК изученных генов через 1 сутки после инфицирования приняты за 1.

**Кратные изменения уровня мРНК генов ЦМВ

В ЦМВ-инфицированных клетках ТНР-1 в течение 14 суток не было выявлено продукции инфекционно-активного вируса. Совокупность данных позволяет заключить, что в клетках ТНР-1 наблюдаются 3 формы ЦМВ инфекции (ЦМВИ): активная (1 с.п.и.) с высоким уровнем мРНК литических генов и высоким содержанием соответствующих вирусных белков; переходная (7 с.п.и.) – с выраженной экспрессией одновременно литических и латентных генов ЦМВ; латентная (14 с.п.и.) – с наличием вирусной ДНК и повышенной активностью латентно-ассоциированных генов ЦМВ. Литическая форма ЦМВИ в клетках ТНР-1 не установлена.

Для изучения чувствительности к ДОКС через 1, 7 и 14 с.п.и. в культуру ТНР-1 вносили 5 мкг/мл ДОКС, инкубировали 1 сут и определяли жизнеспособность клеток методом МТТ. Через 1 с.п.и. и инкубации с ДОКС доля нежизнеспособных клеток в инфицированной культуре составила $34 \pm 1 \%$, в неинфицированной – $80 \pm 4 \%$. Обработка культуры через 7 с.п.и. приводила к гибели $24 \pm 2 \%$ ЦМВ-инфицированных клеток и $82 \pm 2 \%$ – неинфицированных, через 14 суток наблюдалась гибель $7 \pm 2 \%$ инфицированных клеток и $79 \pm 5 \%$ неинфицированных (рис. 2).

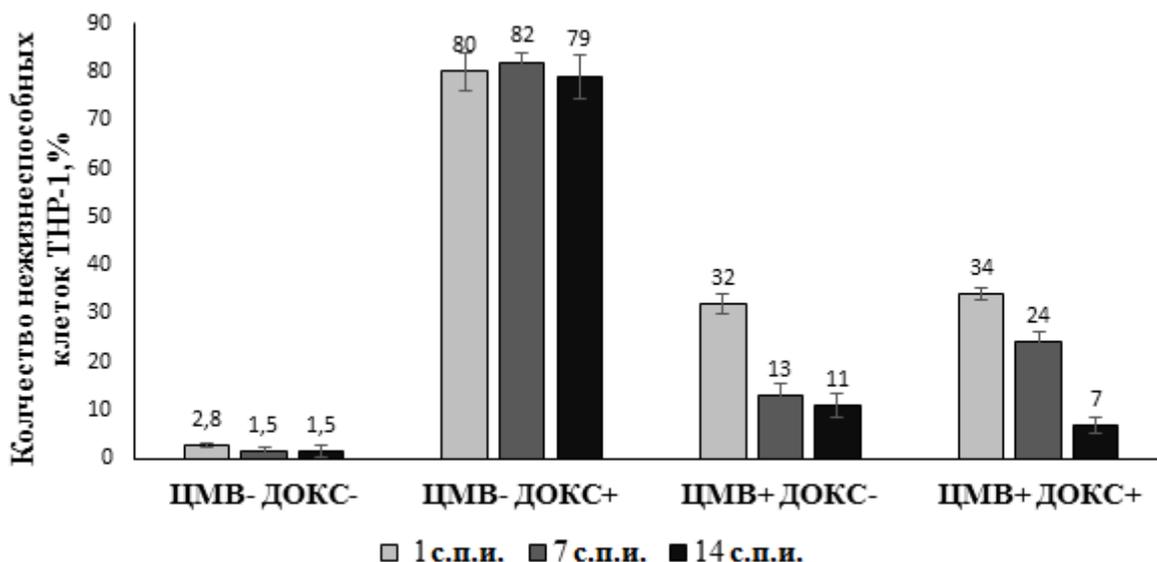


Рис. 2. Цитотоксическое действие ДОКС на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 на 1, 7 и 14 сутки после инфицирования

Это означает, что латентно инфицированные клетки ТНР-1 (14 с.п.и.) также устойчивы к действию ДОКС, как и клетки с активной ЦМВИ (1 с.п.и.).

Оценивали действие ДОКС на клетки ТНР-1, зараженные ЦМВ, инактивированным УФ (30 Вт, 30 минут, на расстоянии 20 см., на льду). Через 4 часа после заражения в клетки вносили ДОКС (5 мкг/мл) и инкубировали 24 часа. Подсчет жизнеспособных клеток показал, что в результате обработки ДОКС инфицированной культуры количество погибших клеток составило $97 \pm 0,29 \%$, неинфицированной культуры – $98 \pm 1,04 \%$ ($p > 0,05$) (рис. 3).

Полученные результаты показали, что после заражения инактивированным УФ ЦМВ клетки ТНР-1 сохраняют высокую чувствительность к действию ДОКС. Так как УФ облучение повреждает ДНК и подавляет репликацию ЦМВ [6], можно заключить, что репликация ЦМВ не является необходимым условием для установления резистентности инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС.

Сделанный вывод был подтвержден в опытах с ингибитором ДНК-полимеразы ЦМВ. Активность этого фермента необходима для продукции вируса при литической инфекции и является мишенью для используемых противовирусных препаратов. Ганцикловир – нуклеозид (аналог гуанина), близкий по химической структуре к ацикловиру, является препаратом выбора при лечении ЦМВИ. Представляло интерес изучить, восстановит ли ганцикловир чувствительность инфицированных клеток ТНР-1 к действию ДОКС. Для этого клетки заражали ЦМВ и через 4 часа и 7 сут вносили ДОКС в концентрации 5 мкг/мл совместно с ганцикловиром в концентрации 25 мкг/мл и инкубировали 24 часа. Предварительно было показано, что в течение 7 сут после заражения

ТНР-1 транскрипционная активность гена ДНК-полимеразы ЦМВ UL54 была высокой. Ганцикловир через 24 часа воздействия вызывал гибель $20 \pm 3,4$ % инфицированных, и $22 \pm 1,5$ % не инфицированных клеток ТНР-1. При совместном добавлении к ТНР-1 ДОКС и ганцикловира через 4 часа после заражения в инфицированной популяции наблюдалась гибель $29 \pm 10,1$ % клеток, в то время как в неинфицированной – $90 \pm 5,8$ %. Через 7 суток после инфицирования ганцикловир совместно с ДОКС вызывал гибель $37 \pm 14,9$ % клеток, тогда как совместное действие на неинфицированные клетки ТНР-1 приводило к гибели $83 \pm 3,5$ % клеток (рис. 4). Полученные данные свидетельствуют о том, что при ингибировании синтеза вирусной ДНК сохраняется устойчивость ТНР-1 к ДОКС. Таким образом, присутствие в клетках репликативно-активного ЦМВ не требуется для установления резистентности инфицированных клеток. Кроме того, полученные данные свидетельствуют о том, что поздние белки ЦМВ, которые синтезируются после репликации вирусного генома [7], не влияют на установление резистентности клеток ТНР-1 к ДОКС.

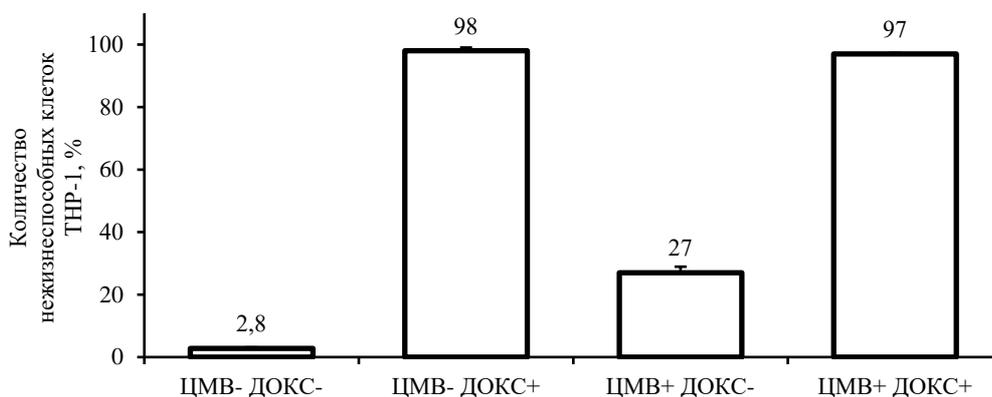


Рис. 3. Цитотоксическое действие ДОКС на клетки ТНР-1, инфицированные инактивированным УФ ЦМВ

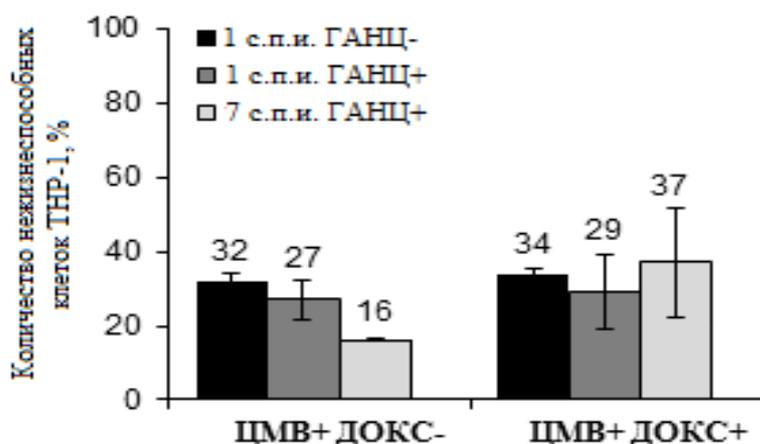


Рис. 4. Цитотоксическое действие ДОКС и ганцикловира на ЦМВ инфицированные клетки ТНР-1 через 4 часа и 7 сут после заражения

Представляло интерес выяснить участие сверхранних белков ЦМВ (IE) в устойчивости инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС. Сверхранние белки ЦМВ – транскрипционные факторы, которые регулируют не только экспрессию вирусных генов, но и координируют молекулярные процессы клеточной гибели [8]. Определяли IE1-p72 в лизатах ТНР-1 в различные сроки после инфицирования методом иммуноблота и обработкой полученных данных в программе ImageJ. (рис. 5). Было показано, что действие ДОКС через 1 с.п.и. приводило к увеличению количества IE1-p72 в 3 раза. При внесении ДОКС через 7 и 14 с.п.и. содержание белка повышалось в 4 и 17 раз, соответственно.

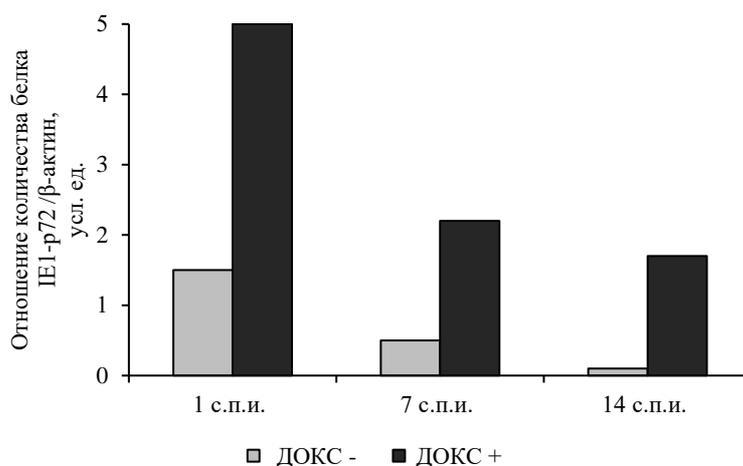


Рис. 5. Изменение содержания сверххраненного белка ЦМВ IE1-p72 под действием ДОКС в динамике ЦМВИ. Отношение IE1-p72/β-актин в усл. ед.

Важно отметить, что ДОКС индуцировал синтез IE1-p72 в клетках, содержащих ДНК ЦМВ в латентном состоянии, и это ассоциировалось с установлением резистентности к антибиотику. Это означает, что регуляторный вирусный белок IE1-p72 вовлечен в процесс формирования устойчивости к ДОКС лейкоэмических клеток, инфицированных ЦМВ.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что в установлении резистентности к ДОКС участвуют сверххраненные вирусные белки, которые определяют судьбу опухолевой клетки при действии ДОКС: гибель или выживание. Таким образом, эта молекулярная мишень может стать основой для создания новых препаратов для лечения опухолей у пациентов, инфицированных ЦМВ.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (РФФИ) грант № 17-04-00812.

ЛИТЕРАТУРА

1. Söderberg-Nauclér C., Johnsen J.I. Cytomegalovirus in human brain tumors: Role in pathogenesis and potential treatment options // World J Exp Med. 2015; 5(1): 1–10
2. Tsuchiya S., Yamabe M., Yamaguchi Y., et al. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1) // Int. J. Cancer 1980; 26: 171–176
3. Yang F., Teves S.S., Kemp C.J., Henikoff S. Doxorubicin, DNA torsion, and chromatin dynamics // Biochim Biophys Acta 2014; 1845: 84–89
4. Tolosa L, Donato MT, Gómez-Lechón MJ. General Cytotoxicity Assessment by Means of the MTT Assay // Methods Mol Biol. 2015; 1250: 333–48.
5. Cheng S., Caviness K., Buehler J., et al. Transcriptome-wide characterization of human cytomegalovirus in natural infection and experimental latency // Proc Natl Acad Sci U S A . 2017; 114(49): p. E10586-E10595.
6. Arcangeletti M., Vasile S., Rodighiero I, et al. Human cytomegalovirus reactivation from latency: validation of a "switch" model in vitro // Virol J. 2016; 13(1): 179.
7. Mocarski E., Shenk T., Griffiths P.D., Pass F.R. Cytomegaloviruses. Knipe D.M., Howley P.M., editors. Fields Virology. 6th ed. Volume 2. USA: Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia; 2013.
8. Spector D.H. Human cytomegalovirus riding the cell cycle // Med Microbiol Immunol. 2015; 204(3): 409–419.