

УДК 601.4

ЦИТОМЕГАЛОВИРУС ИНДУЦИРУЕТ УСТОЙЧИВОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК ТНР-1 К ХИМИОТЕРАПИИ, ВЛИЯЯ НА МЕТАБОЛИЗМ ПОЛИАМИНОВ**¹ С.С. Емельянова, ² Я.Ю. Чернорыж, ² К.И. Юрлов, ³ Н.Ф. Закирова, ¹ Г.Р. Виноградская, ¹ В.Н. Вербенко**¹ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Россия² НИЦ эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, Москва, Россия³ Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта, РАН, Москва, Россия

Цитомегаловирус (ЦМВ) человека является представителем семейства *Herpesviridae*, способного вызывать заболевания у людей. До 90 % взрослого населения инфицированы ЦМВ и имеют антитела к нему. ЦМВ не является общепризнанным онкогенным вирусом, однако исследования последних 15 лет показали высокую частоту выявления его ДНК и антигенов в злокачественных опухолях, [1], причем это не связано с гематогенной инфильтрацией, так как в окружающих тканях вирусные маркеры не обнаруживаются. Имеющиеся данные указывают на влияние ЦМВ-инфекции на метаболизм опухолевой клетки, способствуя онкогенезу. Показано также, что проникая в клетку, ЦМВ способен индуцировать антиапоптозную программу, препятствующую противоопухолевой терапии.

Лечение опухолевых заболеваний с помощью широко распространенного антибиотика доксорубина (ДОКС) эффективно лишь у 40 % пациентов. Причины резистентности к нему в настоящее время до конца не изучены, не исключена и роль ЦМВ в развитии устойчивости опухолевых клеток к этому препарату. ЦМВ кодирует белки, воздействующие 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. Важным белком, направляющим клетку по пути гибели или выживания, является транскрипционный фактор семейства p53 – белок p73.

В отличие от широко известного онкосупрессора p53, повреждение которого отмечают в 50 % опухолей человека, мутации в гене p73 встречаются редко (1 % случаев) [2]. Во многих опухолях наблюдается даже суперэкспрессия белка p73. Ген p73 имеет сложную структурную организацию, которая позволяет экспрессироваться как онкосупрессорным, так и онкогенным изоформам. Механизм их образования связан с альтернативным сплайсированием 5' – и 3' – концов мРНК и использованием альтернативных промоторов. Показано, что укороченные изоформы p73 могут подавлять транскрипционную активность как TAp73 с полным трансактивирующим доменом, так и его гомолога p53, образуя с ними гетеротетрамеры. Таким образом, судьба клетки зависит от количественного соотношения этих изоформ [3]. Укороченные изоформы, транскрибируемые со второго промотора, не только контролируют активность p73 и p53, но и сами находятся под их контролем. Внутренний промотор (P2) содержит эффективный элемент для связывания p53/p73, что в условиях стресса индуцирует транскрипцию dNp73 и создает петлю обратной связи.

Равновесие между супрессорными и онкогенными изоформами может изменяться при ЦМВ-инфекции по неизвестному в настоящий момент механизму. В связи с этим актуальной проблемой является определение ключевых факторов, индуцируемых вирусом, которые влияют на судьбу опухолевых клеток и их связь с внутриклеточными молекулярными путями, участвующими в ответе опухолевой клетки на терапию.

Стоит отметить, что зависимость от p53/p73 активация P2-промотора противоречила бы проапоптотической роли этих белков в ответ на повреждения ДНК, если бы одновременно не индуцировалась быстрая и селективная деградация dNp73-изоформы. Показано, что медиатор убиквитин-независимой деградации белков антизим (AZ) может специфически связываться с dNp73. Активность AZ контролируется через полиамин-зависимый путь на трансляционном уровне. При генотоксическом стрессе происходит ряд изменений, приводящих к накоплению высших полиаминов (спермидина и спермина), которые переводят AZ в активную форму. Активированный антизим селективно помечает изоформу dNp73 и направляет ее на деградацию, давая тем самым полноразмерной изоформе TAp73 запустить апоптотическую программу [4]. Потенциальное участие ЦМВ в антизим-зависимом пути деградации dNp73 до настоящего момента не исследовано.

Ранее нами был показан защитный эффект ЦМВ в культуре лейкозных клеток ТНР-1, который возникал благодаря изменению баланса укороченной и полноразмерной изоформ белка p73 [5]. ЦМВ способствовал накоплению укороченной изоформы и блокировке развития апоптоза.

Для более подробного исследования участия полиаминового пути в антиапоптотическом эффекте ЦМВ, мы использовали MDL72.527, ингибирующий SMO и катаболический фермент ацетилполиамин оксидазу (АРАО) в микромолярных концентрациях, которые не влияли на другие ферменты метаболизма полиаминов. Клетки ТНР-1 заражали ЦМВ (5 БОЕ/кл), через 4 часа добавляли ДОКС и / или MDL72.527. После 24 часовой инкубации выделяли мРНК и белки для анализа.

MDL72.527 приводил к гибели приблизительно 20 % клеток независимо от того, были они инфицированы ЦМВ или нет. Незараженные клетки ТНР-1, обработанные ДОКС, гибли в присутствии MDL72.527, в том же количестве, что и без него (80 %). Гибель инфицированных ЦМВ клеток ТНР-1 под воздействием ДОКС составляла $32,6 \pm 6$ %, дополнительная обработка MDL72.527 приводила к увеличению количества погибших клеток в три раза, что полностью отменяло защитный эффект вируса против ДОКС-индуцируемого апоптоза.

Для понимания механизма резистентности, вызываемой ЦМВ, представлялось интересным оценить влияние вируса на экспрессию основных ферментов полиаминового синтеза.

Полиамины – это низкомолекулярные органические соединения, необходимые для клеточного роста и развития у эукариот. При нормальных физиологических условиях их концентрация строго регулируется. В цикле полиаминов аминокислота орнитин превращается в диамин – путресцин с помощью лимитирующего скорость короткоживущего фермента – орнитиндекарбоксилазы (ODC). Путресцин превращается в высшие полиамины спермидин и спермин под действием спермидин / спермин синтаз. Спермин может быть превращен обратно в спермидин, а потом в путресцин с помощью катаболических ферментов спермидин (спермин) – N^ацилтрансферазы (SSAT) и АРАО. Активность ODC контролируется с помощью антизима, который синтезируется полиамин-зависимым способом по принципу петли обратной связи. Az транскрипт имеет две перекрывающиеся открытые рамки считывания. В ответ на возрастание клеточного уровня полиаминов во время трансляции мРНК AZ происходит сдвиг рамки считывания на +1. Это приводит к образованию активного полноразмерного белка, который, в свою очередь, связывает ODC, препятствует ее олигомеризации и направляет мономеры на протеолиз, таким образом, препятствуя дальнейшему накоплению высших полиаминов.

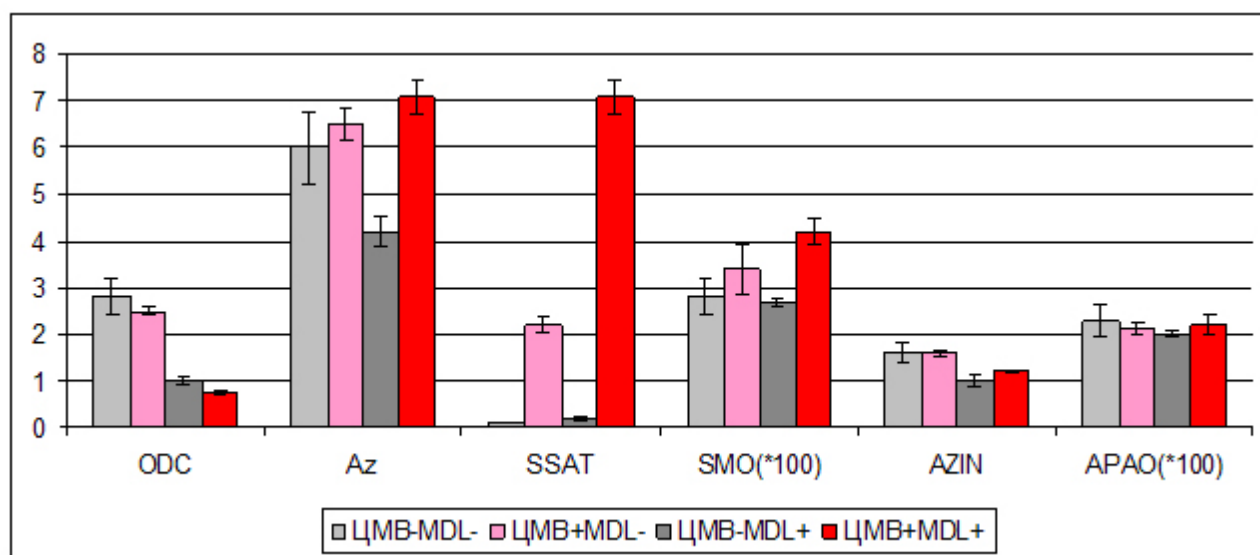


Рисунок 1. Анализ транскрипции генов ферментов полиаминового цикла в культуре ТНР-1. По вертикальной оси отложен относительный уровень мРНК генов ODC, AZ, SSAT, SMO (увеличенный в 100 раз), AZIN, АРАО (увеличенный в 100 раз), нормированный на референсный ген GUS в неинфицированной культуре ТНР-1 (светло-серые столбики) при дополнительной обработке MDL72.527 (темно-серые столбики) и в ЦМВ-инфицированной культуре (розовые столбики), при дополнительной обработке MDL72.527 (красные столбики).

Действие ЦМВ на транскрипцию ферментов полиаминового цикла оценивали с помощью ОТ-ПЦР (рисунок 1). Из представленных результатов видно, что ЦМВ не оказывал никакого влияния на транскрипцию мРНК ODC и не изменял уровень экспрессии как самого антизима, так и его природного ингибитора азина. Не наблюдалось влияние вируса на катаболические ферменты – АРАО и SMO, отвечающие за перевод высших полиаминов в низшие. В то же время было обнаружено влияние вируса на катаболический фермент SSAT, препятствующий накоплению высших полиаминов: ЦМВ увеличивал транскрипцию этого гена в 18 раз. Можно предположить, что увеличение экспрессии SSAT является механизмом, ингибирующим апоптоз, инфицированных клеток. В присутствии MDL72.527 ЦМВ также влиял только на транскрипцию мРНК SSAT, увеличивая ее в 35 раз, что в два раза больше, чем в случае без обработки ингибитором. Однако даже такое изменение оказалось недостаточным для смещения баланса полиаминов в сторону низших и остановки деградации укороченной изоформы белка p73 при ингибировании второго катаболического фермента АРАО.

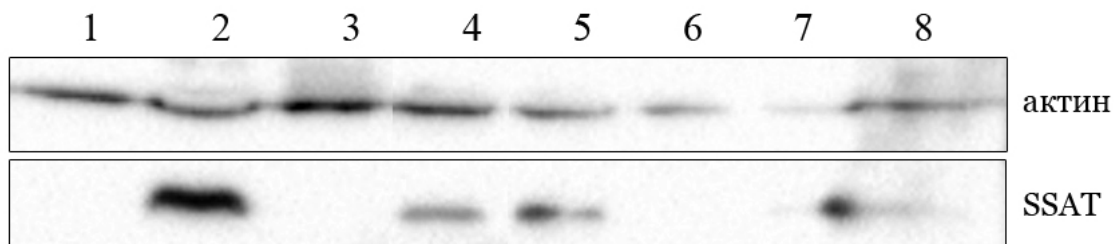
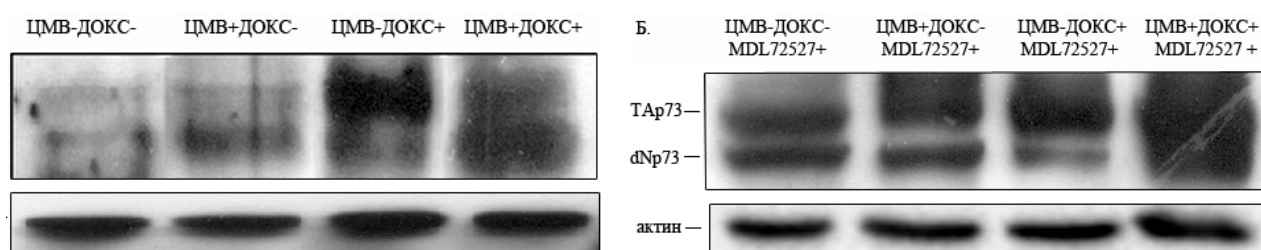


Рисунок 2. Выявления белка SSAT в культуре THP-1 с помощью иммуноблотинга. 1. ЦМВ+ДОКС-MDL72.527+, 2. ЦМВ+ДОКС+MDL72.527+, 3. ЦМВ-ДОКС-MDL72.527+, 4. ЦМВ-ДОКС+MDL72.527-, 5. ЦМВ-ДОКС+MDL72.527+, 6. ЦМВ+ДОКС-MDL72.527-, 7. ЦМВ+ДОКС+MDL72.527-, 8. ЦМВ-ДОКС-MDL72.527-

Влияние ЦМВ на SSAT на белковом уровне оценивали с помощью иммуноблотинга (рисунок 2). Данный белок присутствует в клетках THP-1 на невысоком уровне, и чувствительность метода позволила выявить его лишь в клетках, обработанных ДОКС. В незараженной культуре THP-1, обработанной ДОКС, уровень SSAT был в 1,4 раза ниже, чем в зараженной культуре, что подтверждает гипотезу об увеличении количества этого фермента под действием ЦМВ. Дополнительная обработка MDL72.527 не изменяла этого соотношения.

Анализ влияния ДОКС и MDL72.527 на баланс изоформ белка p73 в инфицированных и неинфицированных клетках THP-1 осуществляли с помощью иммуноблотинга. Воздействие MDL72.527 приводило к превалированию полноразмерной изоформы над укороченной, что могло являться причиной наблюдаемой гибели 20 % клеток. При совместном применении с ДОКС в неинфицированных клетках THP-1 MDL72.527 практически не изменял баланс изоформ p73, поскольку он и так был существенно смещен в сторону полноразмерного белка TAp73. Воздействие ДОКС и MDL72.527 в зараженной культуре сдвигало отношение TAp73/dNr73 в сторону полноразмерной изоформы, что приводило к запуску апоптоза, заблокированного ранее вирусом (рисунок 3).

Представленные данные раскрывают один из возможных механизмов развития ЦМВ-индуцированной устойчивости опухолевых клеток THP-1 к ДОКС. Одной из мишеней вируса становится транскрипционный фактор семейства p53 – белок p73, баланс изоформ которого отвечает за клеточное выживание или гибель. Изоформа TAp73 отвечает за активацию апоптоза и арест клеточного цикла. Изоформа dNr73 обладает способностью блокировать основные онкосупрессорные пути, конкурируя с белками p53 и TAp73 за связывание со специфическими промоторами, и усиливать экспрессию антиапоптотических генов. Кроме того, изоформа dNr73 способна локализоваться непосредственно в месте повреждения ДНК и ингибировать активацию клеточного ответа на накопление двуниевых разрывов. Это может быть выгодно цитомегаловирусу, амплификация ДНК которого происходит по принципу катящегося колеса с нарезкой на фрагменты, которые нужно упаковать в частицы, не вызвав развитие апоптоза. В культуре THP-1 ЦМВ изменяет баланс TAp73/dNr73 на белковом уровне, смещая его в сторону накопления «выгодной» ему укороченной изоформы.



(А)

(Б)

Рисунок 3. Выявление изоформ белка p73 с помощью иммуноблотинга. Соотношение полноразмерной (TAp73) и укороченной (dNp73) изоформ p73. А. Под действием ЦМВ и ДОКС Б. Под действием ЦМВ, ДОКС и MDL72.527. Через 28 часов после начала эксперимента.

Под действием апоптотических сигналов, индуцируемых ДОКС, в клетке происходит активация белка TAp73, которая по принципу петли обратной связи запускает транскрипцию со второго промотора. Одновременно индуцируются механизмы быстрой и селективной деградации dNp73-изоформы, например, через полиаминовый путь.

При индукции апоптоза активируется транскрипционный фактор c-Jun, который ингибирует промотор гена катаболического фермента полиаминового синтеза АРАО, что в норме должно приводить к накоплению высших полиаминов и активации антизима, перекрывающего полиаминовый цикл. Активированный антизим связывается с изоформой dNp73 и направляет ее на деградацию. ЦМВ препятствует накоплению высших полиаминов, увеличивая транскрипцию катаболического фермента полиаминового пути SSAT. В результате высшие полиамины переходят в низшие, активация антизима проходит менее эффективно и деградация dNp73 блокируется.

Использование прямого ингибитора АРАО MDL72527 приводит к нарушению полиаминового цикла и сдвигу баланса в сторону высших полиаминов, активирующих деградацию dNp73 антизимом. При этом отношение TAp73/dNp73 сдвигается в сторону полноразмерной изоформы, а воздействие ЦМВ на SSAT оказывается недостаточным для защиты укороченной изоформы от деградации. Противоапоптотический эффект вируса аннулируется и устойчивость культуры ТНР-1 к химиотерапии исчезает.

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

ЛИТЕРАТУРА

- Duan Y. – L., Ye H. – Q., Zavala A.G. et al. Maintenance of Large Numbers of Virus Genomes in Human Cytomegalovirus-Infected T98G Glioblastoma Cells // J Virol. 2014; 88(7): 3861–3873.
- Dötsch V. et al. P63 and p73, the ancestors of p53 // Cold Spring Harb Perspect Biol. 2010; 2(9).
- Engelmann D., Meier C., Alla V. et al. A balancing act: orchestrating amino-truncated and full-length p73 variants as decisive factors in cancer progression // Oncogene. 2015; 34: 4287 – 4299.
- Bunjobpol W., Dulloo I., Igarashi K. et al. Suppression of acetylpolymine oxidase by selected AP-1 members regulates DNp73 abundance: mechanistic insights for overcoming DNp73-mediated resistance to chemotherapeutic drugs // Cell Death and Differentiation. 2014; 21: 1240–1249.
- Fedorova N.E., Chernoryzh Y.Y., Vinogradskaya G.R., Emelianova S.S. et al., Inhibitor of polyamine catabolism MDL72.527 restores the sensitivity to doxorubicin of monocytic leukemia Thp-1 cells infected with human cytomegalovirus // Biochimie. 2019; 158: P.82–89.