

УДК 578.242.46

**РЕЗИСТЕНТНОСТЬ КЛЕТОК ЛЕЙКЕМИИ ТНР-1,
ИНФИЦИРОВАННЫХ ЦИТОМЕГАЛОВИРУСОМ,
К ПРОТИВООПУХОЛЕВОМУ АНТИБИОТИКУ ДОКСОРУБИЦИНУ
И ВОССТАНОВЛЕНИЕ ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТИ ИНГИБИТОРАМИ
МОЛЕКУЛЯРНОГО ПУТИ PI3K/AKT/mTOR**

**Я. Ю. Чернорыж¹, Н. Е. Федорова¹, К. И. Юрлов¹, Р. А. Симонов¹,
А. Б. Корнев², Д. С. Карпов³, Н. Ф. Закирова³, А. В. Иванов³,
А. А. Куш^{1,*}, академик РАН А. Л. Гинцбург^{1,4}**

Поступило 10.07.2019 г.

Результаты исследований показали, что заражение ЦМВ предотвращало гибель клеток лейкемии ТНР-1, обработанных ДОКС как в активной, так и в латентной форме. В присутствии ингибиторов mTOR (рапамицина и Ториана2) восстанавливалась чувствительность к ДОКС инфицированных клеток. Рапамицин подавлял экспрессию белка IE1-p72 ЦМВ, что повышало чувствительность к ДОКС. Определены молекулярные мишени для создания новых препаратов для лечения лейкемии у пациентов, инфицированных ЦМВ.

Ключевые слова: клетки лейкемии ТНР-1, цитомегаловирус, резистентность к доксорубину, латентная инфекция, белок ЦМВ IE1-p72, ингибиторы пути mTOR.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524894433-437>

Преодоление резистентности опухолевых клеток к химиотерапии является важнейшей, но пока не решённой задачей медицины [1]. Многочисленные данные об обнаружении в опухолевых клетках цитомегаловируса человека (ЦМВ) [2] позволяют предположить, что причины устойчивости связаны с молекулярными механизмами взаимодействия вирусных и клеточных факторов. Ранее мы показали, что клетки лейкемии ТНР-1 после заражения ЦМВ в течение 1 сут приобретают устойчивость к действию антибиотика доксорубина (ДОКС). Резистентность проявлялась на фоне экспрессии литических вирусных генов и синтеза соответствующих белков ЦМВ [3]. Оставалось неясным, влияет ли ЦМВ на чувствительность к ДОКС клеток ТНР-1 на поздних стадиях инфекции, когда мы не наблюдали присутствия вирусных белков и предполагали

латентное состояние ЦМВ. Учитывая, что путь mTOR активирован в большинстве опухолевых клеток, а ЦМВ способен модулировать функциональную активность mTOR и может способствовать выживанию клеток при неблагоприятных условиях [4], мы предположили, что устойчивость к действию ДОКС клеток ТНР-1 может быть связана с активностью этого молекулярного пути. Цель работы состояла в изучении влияния поздних стадий ЦМВ-инфекции (ЦМВИ) на чувствительность клеток линии ТНР-1 к цитотоксическому действию ДОКС и в оценке участия вирусных белков и клеточного пути PI3K/AKT/mTOR в установлении резистентности инфицированных опухолевых клеток к ДОКС.

Мы впервые показали, что ингибиторы пути mTOR восстанавливают чувствительность ЦМВ-инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС.

Клетки лейкемии ТНР-1 заражали ЦМВ (5 БОЕ/кл) и на 1-е, 7-е и 14-е сутки 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. Методом ОТ-ПЦР изучали транскрипционную активность генов литической инфекции (сверххранного *UL122* и ранних *UL83*, *UL54*), а также уровень мРНК *UL82* и *UL138*, экс-

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва

²Институт проблем химической физики Российской Академии наук, Черноголовка Московской обл.

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской Академии наук, Москва

⁴Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)

*E-mail: vitallku@mail.ru

прессия которых показана при латентной инфекции [5]. К 7-м с.п.и. по сравнению с 1-ми с.п.и. уровень мРНК генов *UL122* и *UL54* возрастал в 5 и 3 раза соответственно, уровень гена *UL83* не изменялся, но к 14-м с.п.и. уровни мРНК трёх генов снижались относительно 7-х с.п.и. в 10, 8 и 7 раз соответственно ($p < 0,05$), рис. 1а.

Транскрипционная активность латентно-ассоциированных генов *UL82* и *UL138* повышалась к 7-м с.п.и. в 8 и 7 раз соответственно ($p < 0,05$) и сохранялась на высоком уровне до 14 сут (рис. 1б).

Методом иммуноблота показано, что в 1-е с.п.и. в клетках присутствовали сверхранний (IE1-p72), ранний (pp65) и поздний (gB) белки ЦМВ. К 7-м с.п.и. содержание белков ЦМВ уменьшалось и через 14 с.п.и. определялось в следовых количествах (рис. 1в).

В ЦМВ-инфицированных клетках лейкемии в течение 14 сут не было выявлено продукции инфекционно-активного вируса. Совокупность данных позволяет заключить, что в клетках лейкемии ТНР-1 наблюдаются три формы ЦМВИ: активная

(1-е с.п.и.) с высоким уровнем мРНК литических генов и высоким содержанием соответствующих вирусных белков; переходная (7-е с.п.и.) — с выраженной экспрессией одновременно литических и латентных генов ЦМВ; латентная (14-е с.п.и.) — с наличием вирусной ДНК и повышенной активностью латентно-ассоциированных генов ЦМВ. Литическая форма ЦМВИ в клетках лейкемии 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 $80 \pm 4\%$ (рис. 2). Обработка культуры через 7 с.п.и. приводила к гибели $24 \pm 2\%$ ЦМВ-инфицированных клеток и $82 \pm 2\%$ неинфицированных, через 14 сут наблюдалась гибель $7 \pm 2\%$ инфицированных клеток и $79 \pm 5\%$ неинфицированных.

Это означает, что латентно инфицированные клетки лейкемии ТНР-1 (14 с.п.и.) также устойчивы

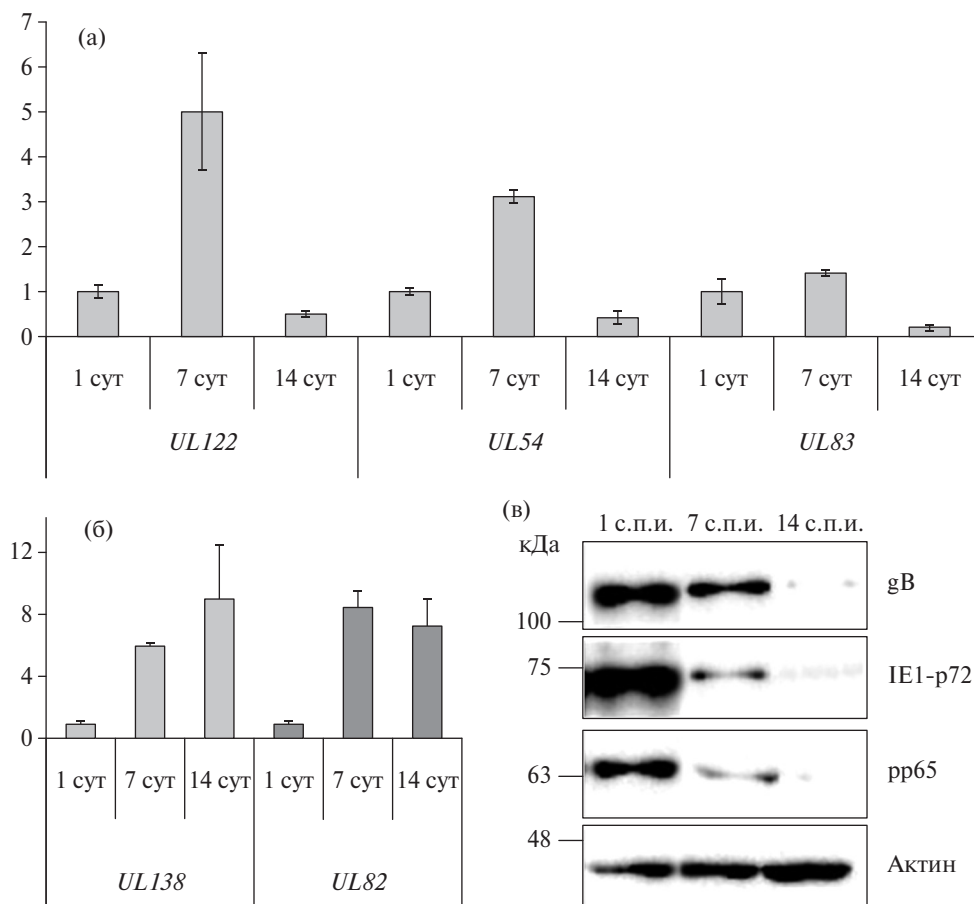


Рис. 1. Изменение экспрессии вирусных генов и содержания белков ЦМВ в клетках ТНР-1 в динамике инфекции. Уровни мРНК литических (а) и латентных (б) генов ЦМВ через 1 с.п.и. приняты за 1.

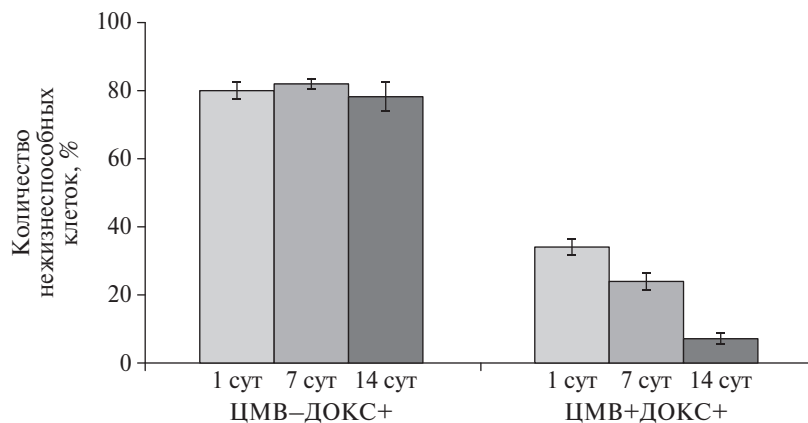


Рис. 2. Влияние ДОКС на жизнеспособность клеток ТНР-1 на разных стадиях ЦМВИ.

к действию ДОКС, как и клетки с активной ЦМВИ (1 с.п.и.).

Для анализа участия сигнального каскада Р13К/АКТ/mTOR в резистентности инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС оценивали действие двух ингибиторов mTOR — рапамицина и Торина2. В клетки совместно с ДОКС вносили рапамицин (8,5 мкг/мл) или Торин2 (0,05 мкг/мл) на 1-е, 7-е и 14-е с.п.и. Через 1 сут оценивали жизнеспособность клеток. Показано (рис. 3), что цитотоксическое действие ДОКС на латентно инфицированные клетки (14 с.п.и.) в присутствии рапамицина увеличивалось в 9 раз, Торина2 — в 11 раз. Сходные данные были получены при обработке клеток через 1 и 7 с.п.и.

Полученные результаты позволяют заключить, что сигнальный путь Р13К/АКТ/mTOR играет важную роль в установлении и поддержании резистентности к ДОКС клеток ТНР-1, содержащих ЦМВ как в активной, так и в латентной формах.

Для выяснения вклада вирусных факторов в формирование устойчивости ЦМВ-инфицированных клеток к ДОКС проводили опыты с применением специфического ингибитора ДНК-полимеразы ЦМВ — ганцикловира (ГЦВ). Доля погибших клеток в инфицированной культуре, не обработанной ГЦВ, под действием ДОКС составляла $34 \pm 1\%$. Внесение ГЦВ (78 мкМ) через 1, 7 и 14 с.п.и. не приводило к достоверному изменению жизнеспособности ТНР-1, доля погибших клеток составила $29 \pm 10\%$, $37 \pm 15\%$ и $20 \pm 7\%$ соответственно. Следовательно, репликация ЦМВ не влияет на устойчивость к ДОКС. Кроме того, по-видимому, не влияют на резистентность и поздние белки вируса, так как они синтезируются только после репликации ДНК ЦМВ [6]. Представляло интерес выяснить участие сверххраненных белков ЦМВ (IE) в устойчивости инфицированных клеток ТНР-1 к ДОКС. Сверххраненные белки ЦМВ — транскрипционные факторы, которые не только регулируют экспрессию вирусных генов,

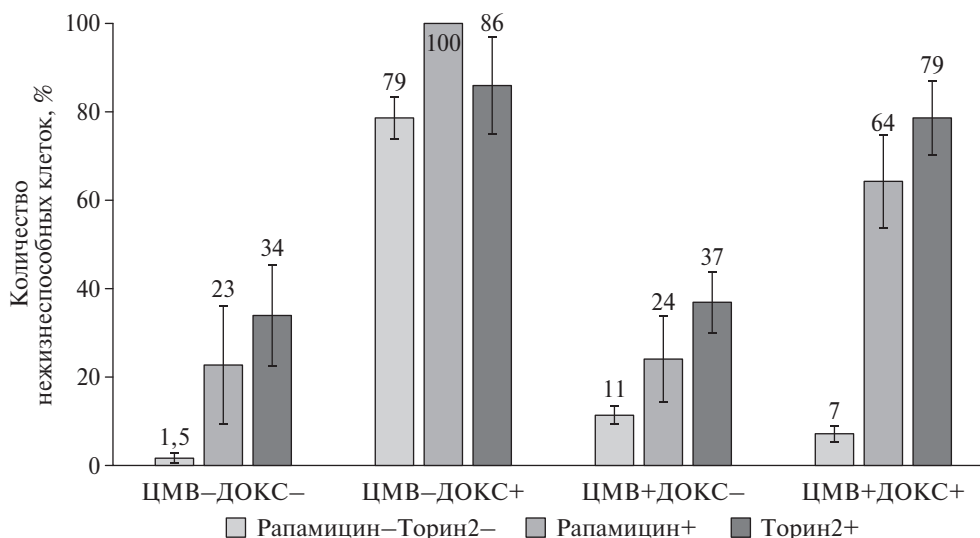


Рис. 3. Влияние ингибиторов mTOR на жизнеспособность латентно инфицированных клеток ТНР-1, обработанных ДОКС.

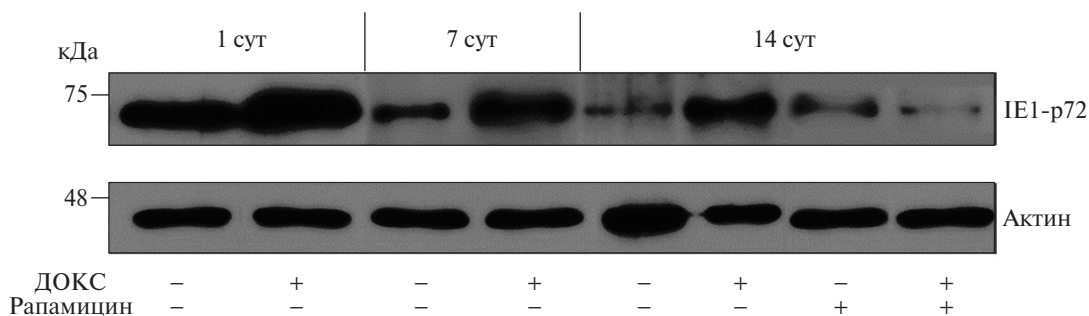


Рис. 4. Изменение содержания белка ЦМВ IE1-p72 под действием ДОКС и рапамицина в клетках THP-1 на разных стадиях инфекции.

но и координируют молекулярные процессы клеточной гибели [7]. Определяли IE1-p72 в лизатах THP-1 в различные сроки после инфицирования методом иммуноблота (рис. 4). Действие ДОКС в 1-е 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. Напротив, при совместном действии ДОКС и рапамицина отмечалось снижение содержания IE1-p72 в 3 раза.

Важно отметить, что ДОКС индуцировал синтез IE1-p72 в клетках, содержащих ДНК ЦМВ в латентном состоянии, и это ассоциировалось с установлением резистентности к антибиотику. Снижение содержания IE1-p72 в клетках под действием ингибитора mTOR приводило к восстановлению чувствительности к ДОКС. Это означает, что регуляторный вирусный белок IE1-p72 вовлечён в процесс формирования устойчивости к ДОКС клеток лейкемии, инфицированных ЦМВ.

Совокупность полученных данных позволяет заключить, что и в установлении резистентности к ДОКС, и в восстановлении чувствительности к антибиотику, по-видимому, участвуют вирусные (сверхгеномные) и клеточные гены (пути PI3K/AKT/mTOR), взаимодействие которых может определять судьбу опухолевой клетки при действии ДОКС: гибель или выживание. Таким образом, данные молекулярные мишени могут стать основой для создания новых препаратов для лечения опухолей у пациентов, инфицированных ЦМВ.

Источники финансирования. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда

фундаментальных исследований, гранты 17-04-00812 и 19-04-01218.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nikolaou M., Pavlopoulou A., Georgakilas A.G., Kyrodimos E. The Challenge of Drug Resistance in Cancer Treatment: a Current Overview // Clin. Exp. Metastasis. 2018. V. 35. № 4. P. 309–318.
2. Herbein G. The Human Cytomegalovirus, from Oncomodulation to Oncogenesis // Viruses. 2018. V. 10. № 8. P. E408
3. Fedorova N.E., Chernoryzh Y.Y., Vinogradskaya G.R., 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. V. 158. P. 82–89.
4. Kudchodkar S.B., Yu Y., Maguire T.G., Alwine J.C. Human Cytomegalovirus Infection Alters the Substrate Specificities and Rapamycin Sensitivities of Raptor- and Rictor-Containing Complexes // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2006. V. 103. № 38. P. 14182–14187.
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. USA. 2017. V. 114. № 49. P. E10586–E10595.
6. Mocarski E., Shenk T., Griffiths P.D., Pass F.R. Cytomegaloviruses / Knipe D.M., Howley P.M. (Eds.). Fields Virology. 6th ed. V. 2. Philadelphia, USA: Lippincott Williams & Wilkins, 2013. P. 1960–2014.
7. Spector D.H. Human Cytomegalovirus Riding the Cell Cycle // Med. Microbiol. Immunol. 2015. V. 204. № 3. P. 409–419.

**RESISTANCE OF THP-1 LEUKEMIA CELLS INFECTED
WITH CYTOMEGALOVIRUS TO ANTI-TUMOR ANTIBIOTIC
DOXORUBICIN AND RESTORATION THE SENSITIVITY BY INHIBITORS
OF THE MOLECULAR WAY PI3K/AKT/mTOR**

**Ya. Yu. Chernoryzh¹, N. E. Fedorova¹, K. I. Yurlov¹, R. A. Simonov¹, A. B. Kornev²,
D. S. Karpov³, N. F. Zakirova³, A. V. Ivanov³, A. A. Kushch¹,
Academician of the RAS A. L. Gintsburg^{1,4}**

¹*Gamaleya National Research Center for Epidemiology and Microbiology,
The Ministry of Health of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

²*Institute of Problems of Chemical Physics, Russian Academy of Sciences,
Chernogolovka, Moscow Region, Russian Federation*

³*Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences,
Moscow, Russian Federation*

⁴*The First Sechenov Moscow State Medical University under Ministry of Health
of the Russian Federation, Moscow, Russian Federation*

Received July 10, 2019

Results obtained showed that infection with HCMV prevented the death of THP-1 cells treated with DOX in both active and latent forms of infection. In the presence of mTOR inhibitors (rapamycin and Torin2), the sensitivity of the infected cells to DOX was restored. Rapamycin inhibited the expression of HCMV protein IE1-p72 and increased sensitivity to DOX. Molecular targets for the creation of new drugs for the treatment of leukemia in patients infected with HCMV have been determined.

Keywords: THP-1 leukemia cells, cytomegalovirus, doxorubicin resistance, latent infection, CMV protein IE1-p72, mTOR pathway inhibitors.