

Механизмы регуляции апоптоза и антиапоптотическое действие онкогенных вирусов

А. А. Фильченков, З. А. Бутенко

Институт экспериментальной патологии, онкологии и радиобиологии им. Р. Е. Кавецкого НАН Украины
Ул. Васильковская, 45, Киев, 03022, Украина

В обзоре анализируются молекулярные механизмы индукции и блокирования апоптоза. Обсуждаются различные антиапоптотические эффекты онкогенных вирусов, что обеспечивает продление жизни инфицированных и злокачественно трансформированных клеток. Рассматриваются возможности применения противовирусных препаратов в комбинированном лечении онкологических больных.

Введение. Известно, что вирусный онкогенез представляет собой многостадийный процесс. В инициации и поддержании злокачественной трансформации клеток-мишеней участвуют особые гены опухолеродных вирусов, называемые онкогенами. При стабильной трансформации клетки онкоген закрепляется в геноме и находится в активированном состоянии, тогда как в случае abortивной трансформации онкогены функционируют, но при этом не обязательно происходит трансформация клетки. Трансформирующий эффект онкогенов обусловлен плейотропным действием кодируемых ими белковых продуктов. Это действие, в частности, может проявляться в стимуляции аномально интенсивного деления клеток и/или в блокировании процесса их гибели [1].

Еще в 1951 г. [2] было высказано предположение о том, что деструктивные процессы, несовместимые с жизнедеятельностью клеток в многоклеточном организме, могут развиваться не только при их некрозе, но и при физиологической смерти (апоптозе), когда активация специальных внутриклеточных механизмов приводит к самостоятельной элиминации клеток. Согласно современным представлениям, биологическое значение апоптоза как энергозависимого процесса гибели клеток, происходящего в нормальных и патологически измененных тканях эукариотических организмов, со-

стоит в поддержании тканевого гомеостаза путем устранения избыточных и/или функционально аномальных клеток, а его ингибирование может быть одним из важных механизмов онкогенеза [3—6].

Апоптоз инфицированных клеток может индуцироваться в результате непосредственного действия вирусных компонентов либо вследствие их распознавания клетками иммунной системы. В ходе эволюции выработаны многочисленные механизмы, позволяющие инфицированным клеткам выживать (особенно на ранних стадиях инфицирования), что способствует сохранению генетической информации онкогенных вирусов и обеспечивает их трансформирующее действие. Кроме того, ряд вирусных белков обладает способностью индуцировать апоптоз (например, белки E1A и E4 аденовируса, E2 и E7 вируса папилломы, апоптин вируса анемии кур и др. [7]), что может быть важным механизмом функционирования таких вирусов в организме при активации латентной инфекции.

Цель настоящей работы состояла в анализе современных данных о механизмах индукции апоптоза и антиапоптотического действия белков, кодируемых генами некоторых опухолеродных вирусов. В обзоре также рассматриваются возможности клинического использования противовирусных агентов, индуцирующих апоптоз опухолевых клеток.

Молекулярные механизмы апоптоза. На молекулярном уровне процесс апоптотической гибели

представляет собой сложный каскад реакций, связанных с экспрессией апоптозассоциированных генов и белков, с участием протеинкиназ, протеаз и эндонуклеаз, конечным результатом которого является нарушение структуры клетки с образованием апоптических телец.

Процесс апоптоза условно разделяют на: сигнальную фазу, во время которой клетка получает сигнал, инициирующий апоптоз; эффекторную фазу, когда активируются эффекторные внутриклеточные механизмы гибели, и фазу деградации, при которой происходят деградация ДНК и другие необратимые изменения. С помощью микровидео съемки клеточных культур показано, что деструкция клетки, приводящая к образованию апоптических телец, в среднем занимает не более 90 мин [8]. Важно отметить, что продолжительность сигнальной и эффекторной фаз превосходит по времени продолжительность фазы деградации.

Основные медиаторы апоптоза. Существуют многочисленные доказательства в пользу того, что апоптоз инициируется в результате действия как внутриклеточных, так и внеклеточных факторов. В индукции апоптоза наиболее изучена роль цитокинов, в частности, фактора некроза опухоли (ФНО) и Fas-лиганда. Их действие опосредуется специфическими рецепторами плазматической мембраны семейства ФНО. Показано, что пять рецепторных белков этого семейства участвуют в инициации апоптоза: рецептор ФНО I типа, Fas (CD95, APO-1), TRAMP (DR3, APO3), TRAIL-R1 (DR4) и -R2 (DR5) (цит. по [9]).

Лиганд-рецепторное взаимодействие приводит к образованию особого сигнального комплекса DISC (death-inducing signaling complex), состоящего из различных адаптерных белков. В случае Fas-лиганда специфический «домен смерти» (DD, death domain) рецептора Fas, находящийся в его цитоплазматическом участке, связывается с DD, входящим в состав адаптерного белка FADD (Fas-associated DD). Кроме DD, белок FADD содержит «эффекторный домен смерти» (DED, death effector domain), благодаря которому происходит связывание и аутоактивация одного из основных медиаторов апоптоза — каспазы 8. По своей структуре и функциям каспазы подобны цистеиновой протеиназе ICE (каспаза 1), расщепляющей предшественник интерлейкина- 1β вблизи аминокислотного остатка (а. о.) аспарагиновой кислоты. Активированная каспаза 8, в свою очередь, расщепляет зимогенную форму каспазы 3, что инициирует развитие апоптоза. Поскольку апоптоз, индуцированный активацией рецептора ФНО, развивается подобным образом (отличием является участие дополнитель-

ного адаптерного белка TRADD (TNF-R associated death domain), опосредующего взаимодействие рецептора ФНО с белком FADD), можно утверждать, что цитокины семейства ФНО индуцируют апоптоз путем активации эффекторных каспаз [10].

Апоптоз — процесс эволюционно консервативный и выявлен даже у плоского микроскопического червя *Caenorhabditis elegans*, гибель клеток которого во время морфогенеза регулируется продуктами генов *ced-3*, *ced-4*, *ced-9*, *egl-1* и *mac-1* [11, 12]. Белки *Ced-3* и *Ced-4* индуцируют гибель клеток *C. elegans*, тогда как *Ced-9* блокирует этот процесс. Функция белка *Egl-1* сводится к ингибированию антиапоптического действия белка *Ced-9*, тогда как белок *Mac-1*, связываясь с *Ced-4*, блокирует гибель клеток нематоды.

У млекопитающих также обнаружены гены, гомологичные *ced-3* [13], *ced-4* [14] и *ced-9* [11]. Оказалось, что ген, гомологичный *ced-3*, кодирует фермент из семейства описанных выше каспаз. Уже охарактеризованы 14 каспаз [15], нумерация которых соответствует хронологическому порядку их открытия. Во время апоптоза белки — предшественники каспаз активируются путем протеолиза или образования олигомерных комплексов. Поскольку в этом процессе активации также участвуют каспазы определенного типа, выделяют две их группы, согласно выполняемым функциям: инициаторы и эффекторы. Первые (каспазы 2, 8, 9 и, возможно, 10) активируют вторые (каспазы 3, 6 и 7), которые, в свою очередь, гидролизуют внутриклеточные субстраты.

Известно более 60 белковых субстратов каспаз, локализованных в ядре, цитоплазме и цитоскелете клеток. Расщепление ламин и белков ядерного матрикса вызывает дезинтеграцию ядерных пластинок и конденсацию хроматина; расщепление белков цитоскелета (актина и актинсвязывающих белков гельзолина и фодрина) способствует образованию клеточных выпячиваний и в дальнейшем — распаду клетки на апоптические тельца [16]. Еще одним субстратом каспаз является фермент поли(ADP-рибозо)полимераза (PARP), играющая важную роль в процессах репарации ДНК благодаря способности негативно регулировать активность Ca^{2+}/Mg^{2+} -зависимой эндонуклеазы, обеспечивающей межнуклеосомное расщепление ДНК. Недавно был расшифрован другой механизм активированной каспазами деградации ДНК [17]. Оказалось, что в цитоплазме клеток присутствует комплекс ДНКазы, ответственной за фрагментацию ДНК, с его ингибиторным белком ICAD. Такой комплекс обычно неактивен, однако расщепление белка ICAD под действием каспазы 3 приводит к активации

ции ДНКазы и последующей деградации ДНК клетки.

Таким образом, после активации «рецепторами смерти» или проапоптотическими медиаторами, проникающими из митохондрий (см. ниже), каспазы расщепляют свои специфические субстраты, что приводит к нарушению межклеточных взаимодействий, реорганизации цитоскелета, деградации ДНК и образованию апоптотических телец.

Bcl-2-подобные белки. Впервые ген *bcl-2* человека выделен из клеток фолликулярной В-клеточной лимфомы, что и нашло отражение в его названии (Bcl, B-cell lymphoma/leukemia) [18]. В геноме человека ген *bcl-2* локализован в области q21 18-й хромосомы и может транслоцироваться в область q32 14-й хромосомы, где находятся онкогенные элементы генов тяжелых цепей иммуноглобулинов. Вследствие такой транслокации происходят изменения, приводящие к злокачественной трансформации В-клеток и развитию неходжкинских лимфом. Поэтому ген *bcl-2* можно причислить к онкогенам, тем более, что его гиперэкспрессия наблюдается при некоторых других злокачественных новообразованиях, хотя она и не связана с транслокацией t(14;18) [19].

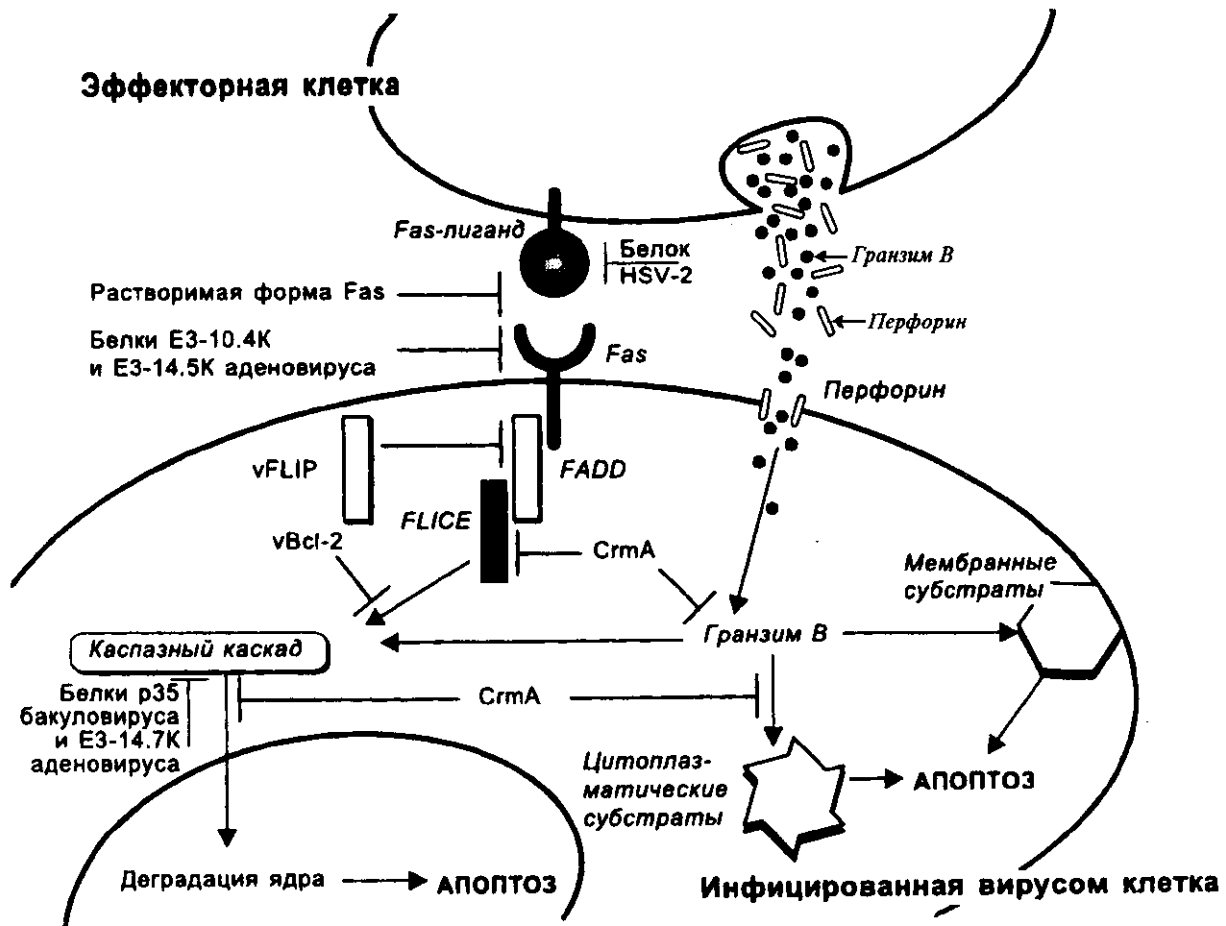
Семейство Bcl-2-подобных белков включает более 17 членов, являющихся основными модуляторами апоптоза. Некоторые из них (Bcl-x_L, Mcl-1, Bag, A1, Bcl-2) препятствуют развитию апоптоза, тогда как другие (Bcl-x_S, Bax, Bad, Bcl, Bk, Hrk, BNIP3, Bim, Bak, Bid и Diva), наоборот, служат промоторами этого процесса. Регуляторное действие Bcl-2-подобных белков может осуществляться с помощью различных механизмов [19]. Прежде всего, эти белки, используя специальные ВН-домены, могут образовывать гомо- и гетеродимеры. С помощью доменов ВН1 и ВН2 антагонисты апоптоза гетеродимеризуются с белком Bax и подавляют развитие апоптоза, тогда как агонисты апоптоза вместе с доменом ВН3 образуют гетеродимеры с белками Bcl-2 и Bcl-x_L, способствующими развитию этого процесса. Однако существуют механизмы апоптозрегулирующего действия Bcl-2-подобных белков, не связанные с их способностью образовывать гетеродимеры [20].

Большинство членов семейства Bcl-2 (кроме белков Bad и Bid) имеют трансмембранный домен, позволяющий им находиться в составе внутриклеточных мембран, преимущественно во внешней оболочке митохондрий, хотя они также выявляются в ядерной мембране и эндоплазматическом ретикулеуме. Показано, что взаимодействие белка Bax и зависимого от напряжения анионного канала (VDAC, voltage-dependent anion channel) вызывает

изменение проницаемости митохондриальной мембраны и способствует выходу из выделенных митохондрий цитохрома С [21] и других проапоптотических медиаторов (прокаспазы 2, 3, 9, апоптозиндуцирующий фактор и т. п.). Об этом же свидетельствуют результаты опытов, в которых избыток белка Bcl-x_L предотвращал образование пор в мембранах с участием белка Bax и ингибировал его проапоптотическую активность, связанную с высвобождением цитохрома С и последующей активацией каспаз [22]. Другими словами, проапоптотические белки семейства Bcl-2 способствуют открыванию митохондриальных каналов, тогда как антиапоптотические — их, наоборот, закрывают.

Кроме того, белок Bcl-2 может способствовать перемещению серин/треонин-специфической протеинкиназы Raf-1 к митохондриальной мембране, где она фосфорилирует белок Bad. После этого последний теряет возможность образовывать гетеродимеры с белком Bcl-2, и возникающие димеры Bcl-2/Bcl-x_L препятствуют развитию апоптоза [23]. Способность белка Bcl-2 взаимодействовать с кальциевыми насосами в мембранах эндоплазматического ретикулеума также может играть важную роль в его антиапоптотическом действии, поскольку такой механизм позволяет подавлять потоки ионов кальция в клетке [24]. Наконец, проапоптотический белок Diva может взаимодействовать с белком Araf-1 (аналог белка Ced-4 нематоды), участвующим в активации прокаспазы 9, и таким образом ингибировать связывание с белком Araf-1 антиапоптотического белка Bcl-x_L [25].

Белок p53. Белок p53, кодируемый одноименным геном — супрессором опухолевого роста, является регулятором многих клеточных функций, включая митотический цикл, репарацию поврежденной ДНК, дифференцировку клеток и апоптоз [26]. Он постоянно синтезируется клетками, но очень быстро расщепляется, поэтому его концентрация в большинстве нормальных клеток и тканей низка. Когда в клетке происходит повреждение ДНК, то содержание белка p53 резко повышается вследствие его стабилизации. При незначительном повреждении структуры ДНК p53 вызывает активацию генов *WAF1* и *GADD45*, белковые продукты которых участвуют в остановке клеточного цикла (в том числе ингибируя активность циклин-зависимых киназ). Такая «передышка» позволяет клетке репарировать поврежденную ДНК. В случае значительного повреждения ДНК белок p53 активирует экспрессию гена *bax*. Это способствует повышению уровня белка Bax, образующего гетеродимеры с антиапоптотическим белком Bcl-2, что вызывает гибель клетки путем апоптоза [27]. Гиперэкспрессия



Механизмы ингибирования вирусными белками проапоптических сигналов, инициированных системами Fas/Fas-лиганд и гранзим В/перфорин [83]. Обозначения: CrmA — белок вируса оспы; FADD — адаптерный белок, ассоциированный с Fas; FLICE — каспаза 8; HSV-2 — вирус простого герпеса 2-го типа; vBcl-2 — вирусные Bcl-2-подобные белки; vFLIP — вирусные ингибиторные белки, подобные Fas-ассоциированным «доменам смерти»

двух других p53-подобных белков — p51 и p73 — также способствует индукции апоптоза [28, 29]. Однако, в отличие от белка p53, в опухолевых клетках редко обнаруживаются мутантные формы белков p51 и p73.

Механизмы антиапоптического действия вирусных белков. Блокирование вирусными белками апоптического сигнала и его передачи внутрь клетки. Как уже отмечалось выше, функция «рецептора смерти» состоит в приеме экзогенного апоптического сигнала и его передаче внутрь клетки. Механизмы антиапоптического действия вирусных белков, направленного на блокирование такого сигнала, схематически представлены на рисунке. Аденовирусные белки E3-10.4K и E3-14.5K инду-

цируют быструю интернализацию рецептора Fas с поверхности инфицированных клеток и его деградацию в лизосомах [30]. В результате содержащие вирус клетки не подвергаются Fas-опосредуемому апоптозу, обусловленному действием цитотоксических Т-лимфоцитов и естественных киллерных клеток.

Существуют и внутриклеточные механизмы блокирования Fas-опосредуемого апоптического сигнала. Утрата клетками адаптерного белка FADD служит фактором выживания инфицированных вирусом клеток [31]. Некоторые γ -герпес-вирусы и вирус контактиозного моллюска индуцируют в таких клетках продукцию антиапоптических вирусных белков vFLIP (Fas-associated death-domain-

like IL-1 β -converting enzyme]-inhibitory protein), способных взаимодействовать с клеточным адаптерным белком FADD [32]. Выживание инфицированных вирусами клеток обеспечивает долговременность действия онкогенных вирусов, что в значительной мере повышает их трансформирующий потенциал. Кроме того, белки v-FLIP могут способствовать прогрессии опухолевого роста. Так, отмечено развитие быстрорастущих агрессивных опухолей у мышей только после пересадки им клеток лимфомы A20, гиперэкспрессирующих белок FLIP герпес-вируса, ассоциированного с саркомой Капоши (SKHV) [33].

Белок MC159 вируса контагиозного моллюска, являющегося природным патогеном для человека, способным индуцировать развитие рака кожи [34], также непосредственно взаимодействует с адаптерным белком FADD, который связан с N-терминальным продоменом каспазы 8 [35]. В результате такого взаимодействия блокируются активация каспазы 8 и развитие в инфицированных клетках апоптоза.

Аналогичным антиапоптотическим действием обладает аденовирусный белок E1B-19K, который способен препятствовать олигомеризации Fas-ассоциированного белка FADD [36]. Это наблюдение согласуется с данными о том, что белки Bcl-2 и E1B-19K предотвращают процессинг эффекторной каспазы 3 и протеолиз ее субстрата PARP, индуцированные аденовирусным белком E1A [37]. Поскольку активация адаптерного белка FADD и каспазы 8 (10) характерна для апоптотического сигнала, опосредуемого любым из известных «рецепторов смерти», по-видимому, вирусные белки семейства vFLIP служат универсальными блокаторами такого сигнала.

Ингибирование каспазной активности белками вирусных генов. В экспериментах по направленному мутагенезу бакуловируса *Autographa californica* получены его мутантные варианты, обладающие значительно меньшей вирулентностью и вызывающие апоптоз отдельных клеток у насекомых [38]. В указанных вариантах вируса обнаружены изменения в гене, кодирующем белок p35. Оказалось, что этот белок может ингибировать апоптоз не только в клетках насекомых, но и у млекопитающих. В последнем случае белок p35, связываясь с каспазами 1, 2, 3 и 4 [39, 40], подавляет их активность, индуцированную вирусной инфекцией [39]. В дополнение к антиапоптотическому действию белок p35 проявляет способность инициировать трансформацию нормальных фибробластов мыши, что подтверждено в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [41]. Другая группа бакуловирусных белков, коди-

руемых генами *iap*, также обладает антиапоптотическим действием, которое, в отличие от белка p35, реализуется за счет блокирования внутриклеточных сигналов, активирующих каспазу Ced-3 [42].

В работе [43] показано, что аденовирусный белок E3-14.7K может непосредственно взаимодействовать с каспазой 8, блокируя развитие апоптоза, опосредованное рецептором Fas [43]. Кстати, белок CgmA (cytokine response modifier A) вируса оспы, относящийся к семейству серпинов, также способен подавлять апоптоз, ингибируя активность каспазы 8 (и каспазы 1) [44].

Вирусные гомологи белка Bcl-2 с антиапоптотической активностью. Альтернативной антиапоптотической «стратегией» опухолеродных вирусов является использование белков — гомологов Bcl-2. Так, получены мутантные формы аденовируса, вызывающие быстрый лизис инфицированных клеток [45]. Такие вирусные мутанты не экспрессируют белка E1B-19K, являющегося функциональным гомологом белка Bcl-2 млекопитающих. При аденовирусной инфекции отмечена активация в клетке с-Jun-N-терминальной киназы, для которой необходим синтез вирусного белка E1B-19K [46]. С помощью такого механизма антиапоптотический белок E1B-19K осуществляет регуляцию с-Jun-зависимой транскрипции клеточных генов.

Онкогенный герпес-вирус саймири, связанный с развитием лимфом и лейкозием у приматов и трансформацией Т-клеток человека *in vitro* [47], кодирует белок ORF16 — функциональный аналог белка Bcl-2 [48]. Как оказалось, вирусный Bcl-2-подобный белок способен образовывать гетеродимеры с проапоптотическими белками Bak и Bax, в результате чего блокируется апоптоз, индуцированный гетерологичными вирусами.

Вирусный гомолог антиапоптотического белка Bcl-2 кодируется и лимфотропным SKHV [49]. Экспрессия этого белка выявлена в клетках саркомы Капоши и В-клеточных линиях, содержащих SKHV [49]. Показано, что антиапоптотический эффект указанного гомолога Bcl-2 также связан с блокированием проапоптотического действия белка Bax [49]. Авторы [50] выделили другой антиапоптотический белок (KSbcl-2), кодируемый SKHV. Как оказалось, этот белок, в отличие от других представителей семейства Bcl-2, не способен образовывать гетеродимеры с проапоптотическими белками Bax или Bak. Эти данные свидетельствуют о том, что антиапоптотическое действие белка KSbcl-2 не связано с блокированием функции белков Bax или Bak. Неспособность белка KSbcl-2 к гомодимеризации указывает также на то, что его антиапоптотическое действие реализуется через уникальный меха-

низм, который еще предстоит раскрыть. Интересно, что обработка клеток упомянутых линий фибробластным эфиром усиливает экспрессию в них белка KSBcl-2, что подтверждает его значение для репликации SKHV.

Установлены участие вируса Эпштейна-Барр (EBV) в развитии инфекционного мононуклеоза и его ассоциация с лимфопролиферативными заболеваниями, включая лимфому Беркитта, раком носоглотки и желудка (цит. по [51]). Показана причастность этого вируса и к развитию радиационно-ассоциированных лимфом [52]. EBV представляет собой лимфотропный герпес-вирус человека, способный превращать В-лимфоциты в иммортализованные клеточные линии *in vitro* [53]. Вирус может также трансформировать *in vivo* нормальные, находящиеся в покое В-клетки (в том числе циркулирующие В-лимфоциты), в иммунобласты [54]. Для клеток человека его трансформирующая (иммортализирующая) способность превышает возможности других известных трансформирующих вирусов [1]. В сложной цепи событий В-клеточного лимфомогенеза важное место занимает экспрессия генов EBV, кодирующих онкобелки LMP1 и EBV1. Последние могут инициировать трансформацию клеток и индуцировать экспрессию антиапоптотических клеточных генов (*bcl-2*, *mcl-1*, *A20* и др.). Недавно показано, что антисмысловые олигонуклеотиды против гена *LMP1* блокируют пролиферацию и стимулируют апоптоз EBV-иммортализованных В-лимфоцитов [55]. Другой кодируемый EBV белок BHRF1 является функциональным гомологом белка Bcl-2, способного ингибировать апоптоз, вызываемый ФНО или антителами против рецептора Fas [56].

Значение вируса EBV в формировании злокачественного фенотипа клеток лимфомы было недавно убедительно продемонстрировано Комано и соавт. [57]. Из EBV-положительной линии Akata клеток лимфомы Беркитта методом конечных разведений были отобраны клоны, не содержащие EBV, которые затем подвергали повторному заражению этим вирусом. Как оказалось, такие клоны (в отличие от неинфицированных вирусом EBV) способны расти в среде полужидкого агара и образовывать опухоли *in vivo*. При этом EBV-положительные клоны клеток лимфомы Беркитта проявляли значительно большую резистентность к апоптозу, чем EBV-негативные клоны. Поэтому авторы пришли к выводу о том, что для развития злокачественного фенотипа и устойчивости к апоптозу в клетках лимфомы Беркитта необходимо постоянное присутствие EBV.

Ингибирование проапоптотического действия

белка p53. Одним из белков, кодируемых ДНК вируса гепатита В (HBV), является продукт гена X, обладающий свойствами коактиватора транскрипции, который способен взаимодействовать с точными коактиваторами [58]. Показано, что белок HBx может образовывать комплексы с белком p53, ингибируя специфическое связывание последнего с ДНК *in vitro* и его транскрипционную активность *in vivo* [59]. Вирусный белок HBx прямо связывается с белком p53 в цитоплазме и, препятствуя его проникновению в ядро, ингибирует проапоптотическое действие белка p53 [60]. Таким образом, вирус HBV, подавляя апоптоз, может способствовать выживанию трансформированных клеток на ранних стадиях опухолевого процесса в печени.

Аденовирусный белок E1B-55K способен образовывать высокомолекулярный комплекс с белком p53 и белком WT1, кодируемым одноименным геном — супрессором опухолевого роста [61]. Образование указанного комплекса приводит к инактивации белков p53 и WT1, что препятствует развитию апоптоза в клетках остеосаркомы под действием белка WT1. Недавно доказано, что вирусный белок E1B-55K может образовывать комплекс с белком p53 и другим аденовирусным белком E4orf6, препятствующим накоплению белка p53 в клетках, инфицированных аденовирусами [62]. Интересно отметить, что стабильная коэкспрессия белка E4orf6 с белками E1A и E1B в клетках почки молодых крыс значительно повышает злокачественный потенциал этих клеток *in vivo* по сравнению с E1-трансформированными клетками [63]. Образование описанных выше комплексов аденовирусных белков с белком p53 предполагает существование сложного механизма, определяющего низкое содержание проапоптотического белка p53 в клетках, трансформированных аденовирусами.

Опухолеродное действие цитомегаловируса человека (HCMV) было недавно продемонстрировано *in vitro* в экспериментах с клетками первичной культуры почки крысят [64]. При этом вирусная ДНК не выявляется в клетках перевиваемых линий, полученных из трансформированных *in vitro* клеток первичной культуры. Авторы предположили, что продукты ранних генов *IE1* и *IE2* HCMV реализуют свое мутагенное действие на инфицированные клетки с помощью механизма «порази-и-беги». Доказано, что продукты генов *IE1* и *IE2* могут независимо друг от друга блокировать апоптоз [65]. IE-белки выполняют функцию факторов транскрипции, и антиапоптотическую активность белка IE2 связывают с активацией экспрессии циклина E (ответственного за переход клеток из G₁- в

S-фазу клеточного цикла) и подавлением транскрипционной активности белка p53 [66, 67].

Большой Т-антиген является ранним белком онкогена А вируса SV-40 (группа паповавирусов), контролирующим интеграцию вирусного генома с клеточным, завершающуюся злокачественной трансформацией. В клетках, иммортализованных температурочувствительными мутантами большого Т-антигена вируса обезьян SV-40 после их переноса в условия непермиссивной температуры, отмечено развитие апоптоза [68]. В экспериментах на трансгенных животных выявлено, что большой Т-антиген вируса SV-40 может блокировать только p53-зависимый апоптоз, образуя комплексы с белком p53 [69].

Авторы работы [70] недавно определили, что большой Т-антиген вируса SV-40 предупреждает развитие апоптоза, индуцированного после активации каспаз, и этот эффект прекращается под действием белка p53. Однако, как показано [71], антиапоптотическое действие Т-антигена вируса SV-40 связано не только с инактивацией белка p53. Форма этого антигена, утратившая способность связываться с белком p53, все равно предохраняет фибробласты от апоптоза. После инфицирования фибробластов человека вирусом SV-40 вирусный Т-антиген способствует увеличению продолжительности жизни клеток, но только немногие из них становятся иммортализованными [72]. Для иммортализации инфицированных клеток необходима инактивация недавно выявленного гена — супрессора опухолевого роста *SEN6*. Когда этот ген активен, отмечаются репликация вируса и гибель клетки. Важно отметить, что иммортализация клеток после их инфицирования вирусом SV-40 является лишь начальным этапом неопластической трансформации, и для приобретения такими клетками злокачественного фенотипа требуются дополнительные генетические изменения [73].

Персистентная инфекция вирусами папилломы человека (HPV) часто наблюдается в клетках половых органов и является этиологическим фактором развития плоскоклеточного рака шейки матки. Онкогенная активность характерна для генов *E6* и *E7* HPV. В экспериментах *in vitro* установлено, что для инициации и поддержания злокачественного фенотипа в клетках эпителия шейки матки требуется экспрессия трансформирующего белка *E6* HPV, который может инактивировать супрессорный белок p53 [74]. Как следствие, нарушаются механизмы индукции апоптоза. Клетки первичной культуры астроцитов также приобретают устойчивость к индукции апоптоза в условиях дефицита глюкозы или избытка перекиси водорода после

трансфекции клеток генами *E6* и/или *E7* вируса HPV 16-го серотипа [75].

Блокирование реакций противовирусного иммунитета. В процессе эволюции у млекопитающих возникло несколько защитных механизмов, отвечающих за элиминацию из организма хозяина инфицированных вирусами клеток. Один из них относится к естественному иммунитету и связан с филогенетически наиболее древней субпопуляцией цитотоксических лимфоцитов — естественных киллерных клеток, способных селективно лизировать инфицированные клетки без предварительной сенсибилизации антигеном. Другой — основан на специфической иммунной реакции организма, направленной против чужеродных вирусных белков. Такая реакция проявляется в цитотоксическом действии специальных иммунных клеток, что приводит к элиминации инфицированных вирусом клеток. Еще один защитный механизм связан с активацией вирусными белками клеточного цикла в инфицированных клетках. Такая активация, в отличие от индуцированной цитокинами, завершается гибелью клетки путем апоптоза [76].

Цитотоксические Т-лимфоциты и естественные киллерные клетки выполняют свои эффекторные функции с помощью двух основных механизмов: рецептор-опосредованного и рецепторнезависимого [10]. В первом случае лиганд-рецепторное взаимодействие (например, система Fas-лиганд/рецептор Fas) вызывает активацию «рецепторов смерти» и последующую инициацию каспазного каскада. Антиапоптотические эффекты вирусных белков, направленные на блокирование рецептор-опосредованного апоптотического сигнала, были проанализированы выше, поэтому остановимся здесь только на гранзим-перфориновом механизме индукции апоптоза.

Как известно, гранулы цитотоксических лимфоцитов содержат мембранолитический белок перфориин и сериновые протеазы, образующие семейство гранзимов [77]. Через поры, формирующиеся в плазматической мембране клеток-мишеней, гранзим В из цитотоксических лимфоцитов проникает в цитоплазму клеток-мишеней, где после активации каспазы 3 развитие каскада апоптотических событий становится необратимым [78] (рисунок). Как оказалось, описанный выше ингибитор каспаз *CttnA* вируса оспы коров также способен ингибировать проапоптотическую активность гранзима В [79]. Важно отметить, что если цитотоксическое действие естественных киллерных клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов реализуется, в основном, с помощью гранзим-перфоринового механизма, то для CD4⁺ Т-лимфоцитов характерна активация рецептор-опо-

средованного механизма индукции апоптоза инфицированных клеток [80].

Альтернативным антиапоптотическим механизмом, позволяющим вирусинфицированным клеткам «ускользнуть» из-под иммунного надзора, является секреция этими клетками растворимых рецепторов цитокинов или их вирусных гомологов [81]. Как известно, активированные клетки иммунной системы продуцируют ряд цитокинов, регуляторное действие которых опосредуется связыванием их со специфическими рецепторами [82]. Показано, что инфицирование клеток NPV 16-го серотипа индуцирует продукцию секретлируемой формы рецептора ФНО I типа [84]. Интересно, что в сыворотке крови больных раком носоглотки также отмечается повышение уровня секретлируемых форм рецептора ФНО, которое связывают с репликацией в опухолевых клетках EBV [85]. Ряд вирусных белков имеет гомологию с рецепторами цитокинов. Поскольку в структуре вирусных гомологов, как правило, отсутствует цитоплазматический домен, они продуцируются инфицированными клетками в секретлируемой форме. Так, ген *BARF1* EBV кодирует растворимую форму рецептора колониестимулирующего фактора 1 [86], а белок М-Т7 вируса миксомы является функционально активным гомологом секретлируемого рецептора γ -интерферона [87]. Понятно, что как клеточные, так и вирусные формы растворимых рецепторов цитокинов после связывания со своими лигандами блокируют их противовирусную активность.

Известен еще один механизм блокирования противовирусной активности клеток иммунной системы. Показано, что вирус простого герпеса (HSV) 2-го типа способен влиять на экспрессию Fas-лиганда [88]. При этом инфицирование Т-клеток HSV-2 приводит к тому, что Fas-лиганд удерживается внутри клетки и не экспрессируется на плазматической мембране. В результате такие клетки утрачивают цитотоксическую активность, реализующуюся путем Fas-опосредуемого апоптоза.

Перспективы использования противовирусных препаратов в онкологии. Можно выделить две основные предпосылки для использования противовирусных препаратов в терапии онкологических больных. С одной стороны, применение таких препаратов может способствовать спонтанной индукции апоптоза вирусосодержащих опухолевых клеток, а с другой — повышать их чувствительность к действию противоопухолевых химиотерапевтических средств. Известно, что антибластическая активность многих из этих лекарственных препаратов связана со способностью индуцировать апоптоз в клетках-мишенях. Вследствие генетических изме-

нений, происходящих во время онкогенеза, нарушаются механизмы активации апоптоза. В результате трансформированные клетки могут приобретать устойчивость к химио- и лучевой терапии [89].

Как отмечено нами ранее, устойчивость опухолевых клеток к индукции апоптоза, по-видимому, является одним из проявлений феномена множественной лекарственной устойчивости [90]. Наследственная и приобретенная лекарственная резистентность реализуется через множество различных механизмов, однако общим для них можно считать способность опухолевых клеток «уклоняться» от апоптоза, индуцированного химиопрепаратами.

Показано, что при длительном культивировании клеток нейробластомы, инфицированных HCMV, у них вырабатывается устойчивость к действию препаратов цисплатина и этопозиды [91]. Такая резистентность оказалась связанной с пониженной способностью опухолевых клеток подвергаться апоптозу (в результате гиперэкспрессии белка Bcl-2) и с постоянной репликацией вируса. Интересно, что подавление продукции вирусных частиц после обработки клеток препаратом ганцикловиром полностью восстанавливало их чувствительность к действию противоопухолевых цитостатиков. Клетки субклона 26L линии U937, инфицированные вирусом иммунодефицита человека HIV-1, приобретают резистентность к действию ДНК-повреждающих химиопрепаратов (тенипозид и камптотecin) [92]. Подобная устойчивость к действию указанных препаратов была характерна и для клеток сублинии U1, в которых содержался HIV-1 в латентной форме. Важно отметить, что эти клетки были резистентными к противоопухолевым препаратам только при репликации HIV-1 (после обработки клеток форболовым эфиром). Значение продуктов вирусных генов в развитии лекарственной резистентности подтверждено и в работе [55], авторы которой доказали, что антисмысловые олигонуклеотиды против гена *LMP1* EBV повышают чувствительность EBV-иммортиализованных В-лимфоцитов к действию химиотерапевтических препаратов.

Разработка новых противовирусных препаратов и детальный анализ спектра их действия позволили выявить группу соединений, проявляющих, кроме прочего, выраженный противоопухолевый эффект. Ациклические фосфонаты нуклеозидов (цидофовир, адефовир, PMEA и др.) являются аналогами монофосфатов деоксинуклеозидов с широким спектром противовирусного действия [93]. Так, цидофовир высокоэффективен против инфекции, вызванной герпес-вирусами, аденовирусами,

поксвирусами, вирусами папилломы и полиомы, тогда как адефовир — против инфекции, обусловленной герпес-вирусами, ретровирусами и гепадна-вирусами. Главный механизм противовирусного действия фосфонатов нуклеозидов связан с нарушением синтеза ДНК вирусов путем блокирования их ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы. Указанные препараты проявляют противовирусную и/или противоопухолевую активность пролонгированного действия, которая может сохраняться несколько недель после одноразового введения. Противоопухолевая активность фосфонатов нуклеозидов отмечена на модели хориокарциномы и гемангиомы у крыс, а также в случае папилломатозных новообразований у человека [93]. При тестировании действия препарата цидофовира на рост EBV-ассоциированной карциномы носоглотки у бестимусных мышей установлено, что этот препарат вызывает быструю индукцию апоптоза EBV-трансформированных эпителиальных клеток [94].

Каким же может быть механизм проапоптического действия фосфонатов нуклеозидов? Оказалось, что эти синтетические аналоги нуклеозидов влияют не только на активность вирусных ДНК-полимеразы и обратной транскриптазы, но способны также подавлять активность клеточной ДНК-полимеразы [95]. Ингибируя репликацию ДНК в S-фазе клеточного цикла, фосфонат нуклеозида PMEA в зависимости от природы опухолевых клеток индуцирует их дифференцировку или апоптоз. На другой клеточной модели показано, что низкая концентрация PMEA вызывает обратимое подавление роста лейкозных клеток, тогда как более высокая концентрация препарата индуцирует их апоптоз [96].

Новым этапом исследований противоопухолевой активности синтетических нуклеозидов стала разработка подхода, связанного с переносом гена тимидинкиназы HSV в опухолевые клетки и последующей их обработкой одним из указанных препаратов (чаще всего ганцикловиром). Этот подход оказался эффективным при тестировании на моделях опухолей молочной железы [97], щитовидной железы [98], предстательной железы [99], глиомы [100] и гепатомы [101]. Причем при таком воздействии наблюдали как остановку роста опухоли, так и ее регрессию. К важным преимуществам указанного метода лечения следует отнести его действенность независимо от наличия в опухолевых клетках белка p53 [97, 102]. Эта особенность позволяет использовать схему ген тимидинкиназы HSV/ганцикловир при воздействии на опухоли, клетки которых экспрессируют мутантную форму белка p53 (более 55 % всех опухолей).

Целесообразность лечения по схеме ген тимидинкиназы HSV/ганцикловир продемонстрирована и в клинических исследованиях. Так, например, показана эффективность и безопасность использования такого подхода для терапии больных с рецидивирующей глиобластомой, аденокарциномой предстательной железы или СПИД-ассоциированной лимфомой центральной нервной системы [103—105]. Данные экспериментальных и клинических исследований демонстрируют перспективность использования противовирусных препаратов для терапии больных как с вирус-ассоциированными новообразованиями, так и с опухолями невирусной природы (при лечении по схеме ген тимидинкиназы HSV/ганцикловир).

Заключение. Таким образом, анализ приведенных в обзоре данных свидетельствует о том, что различные белки, кодируемые вирусами, способны «вмешиваться» в пути передачи апоптического сигнала, блокируя его передачу от «рецепторов смерти», имитируя функции клеточного белка Bcl-2, ингибируя активность каспаз или блокируя противовирусный иммунитет. При этом различные антиапоптотические механизмы, используемые разными (а иногда одним и тем же) опухолеродными вирусами, фактически дополняют друг друга. Ингибирование онкогенными вирусами апоптоза способствует накоплению инфицированных клеток, что может ускорять развитие опухолевого процесса и/или способствовать поддержанию злокачественного фенотипа.

Наконец, ряд противовирусных препаратов, индуцирующих апоптоз вирус-инфицированных клеток, может быть использован в онкологической практике как с терапевтической, так и профилактической целью. При этом следует учитывать, что одни противовирусные препараты проявляют выраженный противоопухолевый эффект при инфицировании клеток ДНК-содержащими вирусами, другие — ретровирусами, а третьи — могут эффективно подавлять пролиферацию и индуцировать апоптоз клеток не только вирус-ассоциированных новообразований, но и опухолей, для которых онкогенные вирусы не являются этиологическим фактором трансформации клеток.

О. О. Фільченков, З. А. Бутенко

Механізми регуляції апоптозу і антиапоптотична дія онкогенних вірусів

Резюме

В огляді проаналізовано молекулярні механізми індукції та блокування апоптозу. Обговорюються різні антиапоптотичні ефекти онкогенних вірусів, що забезпечує продовження життя

інфікованих і злоякісно трансформованих клітин. Розглядаються можливості застосування противірусних препаратів у комбінованому лікуванні онкологічних хворих.

A. A. Philchenkov, Z. A. Butenko

Mechanisms of apoptosis regulation and antiapoptotic action of oncogenic viruses

Summary

Molecular mechanisms of the apoptosis induction and inhibition are analyzed. Different anti-apoptotic strategies employed by oncogenic viruses are discussed with the emphasis on their importance for viral oncogenesis. Potential therapeutic utility of antiviral agents in cancer treatment is reviewed.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Klein G., Klein E. Epstein-Barr virus and human lymphomas // The Lymphomas / Eds G. Canellos, T. Lister, J. Sklar.— Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998.—P. 63—73.
2. Glucksmann A. Cell death in normal and vertebrate ontogeny // Biol. Rev.—1951.—26.—P. 59—86.
3. Бутенко З. А. Онкогены — регуляторы апоптоза в механизмах лимфо- и лейкозогенеза // Эксперим. онкология.—1995.—17.—С. 165—171.
4. Бутенко З. А. Программированная клеточная смерть при злокачественных лимфомах // Докл. НАН Украины.—1999.—№ 1.—С. 185—188.
5. Хансон К. П. Апоптоз: текущее состояние проблемы // Изв. Акад. наук. Сер. биол.—1998.—№ 2.—С. 134—141.
6. Wilson W. H., Chabner B. A. Principles of chemotherapy for lymphomas // The Lymphomas / Eds G. Canellos, T. Lister, J. Sklar.—Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998.—P. 235—246.
7. Teodoro J. G., Branton P. E. Regulation of apoptosis by viral gene products // J. Virol.—1997.—71.—P. 1739—1746.
8. Messam C. A., Pittman R. N. Asynchrony and commitment to die during apoptosis // Exp. Cell. Res.—1998.—238.—P. 389—398.
9. Tschopp J., Irmier M., Thome M. Inhibition of Fas death signals by FLIPs // Curr. Opin. Immunol.—1998.—10.—P. 552—558.
10. Фільченков А. А., Стойка П. С. Апоптоз и рак.—К.: Морион, 1999.—184 с. (<http://www.onconet.kiev.ua/publ>).
11. Hengartner M. O. Programmed cell death in the nematode *C. elegans* // Recent Progr. Horm. Res.—1999.—54.—P. 213—222.
12. Wu D., Chen P. J., Chen S., Hu Y., Nunez G., Ellis R. E. *C. elegans* MAC-1, an essential member of the AAA family of ATPases, can bind CED-4 and prevent cell death // Development.—1999.—126.—P. 2021—2031.
13. Yuan J., Shaham S., Ledoux S., Ellis H. M., Horvitz H. R. The *C. elegans* cell death gene *ced-3* encodes a protein similar to mammalian interleukin-1beta-converting enzyme // Cell.—1993.—76.—P. 641—652.
14. Zou H., Henzel W. J., Liu X., Lutschg A., Wang X. Apaf-1, a human protein homologous to *C. elegans* CED-4, participates in cytochrome C-dependent activation of caspase-3 // Cell.—1997.—90.—P. 405—413.
15. Van de Craen M., Van Loo G., Pype S., Van Crielinge W., Van den Brande I., Molemans F., Fiers W., Declercq W., Vandenaebelle P. Identification of a new caspase homologue: caspase-14 // Cell. Death. Differ.—1998.—5.—P. 838—846.
16. Thornberry N. A., Lazebnik Y. Caspases: enemies within // Science.—1998.—281.—P. 1312—1316.
17. Enari M., Sakahira H., Yokoyama H., Okawa K., Iwamatsu A., Nagata S. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD // Nature.—1998.—391.—P. 43—50.
18. Tsujimoto Y., Cossman J., Jaffe E., Croce C. M. Involvement of the *bcl-2* gene in human follicular lymphoma // Science.—1985.—228.—P. 1440—1443.
19. Reed J. C. Bcl-2 family proteins: regulators of apoptosis and chemoresistance in hematologic malignancies // Semin. Hematol.—1997.—34 (Suppl 5)—P. 9—19.
20. Minn A. J., Kettlun C. S., Liang H., Kelekar A., Vander Heiden M. G., Chang B. S., Fesik S. W., Fill M., Thompson C. B. Bcl-x_L regulates apoptosis by heterodimerization-dependent and -independent mechanisms // EMBO J.—1999.—18.—P. 632—643.
21. Narita M., Shimizu S., Ito T., Chittenden T., Lutz R. J., Matsuda H., Tsujimoto Y. Bax interacts with the permeability transition pore to induce permeability transition and cytochrome C release in isolated mitochondria // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95.—P. 14681—14686.
22. Finucane D. M., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N. J., Cotter T. G., Green D. R. Bax-induced caspase activation and apoptosis via cytochrome C release from mitochondria is inhibitable by Bcl-x_L // J. Biol. Chem.—1999.—274.—P. 2225—2233.
23. Wang H. G., Reed J. C. Bcl-2, Raf-1 and mitochondrial regulation of apoptosis // Biofactors.—1998.—8.—P. 13—16.
24. Kuo T. H., Kim H. R., Zhu L., Yu Y., Lin H. M., Tsang W. Modulation of endoplasmic reticulum calcium pump by Bcl-2 // Oncogene.—1998.—17.—P. 1903—1910.
25. Inohara N., Gourley T. S., Carrio R., Muniz M., Merino J., Garcia I., Koseki T., Hu Y., Chen S., Nunez G. Diva, a Bcl-2 homologue that binds directly to Apaf-1 and induces BH3-independent cell death // J. Biol. Chem.—1998.—273.—P. 32479—32486.
26. Wiman K. G. p53: emergency brake and target for cancer therapy // Exp. Cell. Res.—1997.—237.—P. 14—18.
27. Mitry R. R., Sarraf C. E., Wu C. G., Pignatelli M., Habib N. A. Wild-type p53 induces apoptosis in Hep3B through up-regulation of bax expression // Lab. Invest.—1997.—77.—P. 369—378.
28. Jost C. A., Marin M. C., Kaelin W. G., Jr. p73 is a human p53-related protein that can induce apoptosis // Nature.—1997.—389.—P. 191—194.
29. Osada M., Ohba M., Kawahara C., Ishioka C., Kanamaru R., Katoh I., Ikawa Y., Nimura Y., Nakagawara A., Obinata M., Ikawa S. Cloning and functional analysis of human p51, which structurally and functionally resembles p53 // Nat. Med.—1998.—4.—P. 839—843.
30. Elsing A., Burgert H. G. The adenovirus E3/10.4K-14.5K proteins down-modulate the apoptosis receptor Fas/Apo-1 by inducing its internalization // Proc. Nat. Acad. Sci. USA.—1998.—95.—P. 10072—10077.
31. Suzuki A., Araki T., Miura M., Tsutomi Y. Functional absence of FADD in PLC/PRF/5 hepatoma cells: possible involvement in the transformation to hepatoma in HBV-infected hepatocytes // Proc. Soc. Exp. Biol. Med.—1999.—221.—P. 72—79.
32. Thome M., Schneider P., Hofmann K., Fickenscher H., Meink E., Neipel F., Mattmann C., Burns K., Bodmer J. L., Schroter M., Scaffidi C., Kramer P. H., Peter M. E., Tschopp J. Viral FLICE-inhibitory proteins (FLIPs) prevent apoptosis induced by death receptors // Nature.—1997.—386.—P. 517—521.
33. Djerbi M., Screpanti V., Catrina A. I., Bogen B., Biberfeld P., Grandien A. The inhibitor of death receptor signaling, FLICE-inhibitory protein defines a new class of tumor progression factors // J. Exp. Med.—1999.—190.—P. 1025—1032.

34. Gottlieb S. L., Myskowski P. L. Molluscum contagiosum // *Int. J. Dermatol.*—1994.—33.—P. 453—461.
35. Bertin J., Armstrong R. C., Otilie S., Martin D. A., Wang Y., Banks S., Wang G. H., Senkevich T. G., Alnemri E. S., Moss B., Lenardo M. J., Tomaselli K. J., Cohen J. I. Death effector domain-containing herpesvirus and poxvirus proteins inhibit both Fas- and TNFR1-induced apoptosis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 1172—1176.
36. Perez D., White E. E1B 19K inhibits Fas-mediated apoptosis through FADD-dependent sequestration of FLICE // *J. Cell. Biol.*—1998.—141.—P. 1255—1266.
37. Boulakia C. A., Chen G., Ng F. W., Teodoro J. G., Branton P. E., Nicholson D. W., Poirier G. G., Shore G. C. Bcl-2 and adenovirus E1B 19 kDa protein prevent E1A-induced processing of CPP32 and cleavage of poly(ADP-ribose) polymerase // *Oncogene.*—1996.—12.—P. 529—535.
38. Hershberger P. A., Dickson J. A., Friesen P. D. Site-specific mutagenesis of the 35-kilodalton protein gene encoded by *Autographa californica* nuclear polyhedrosis virus: cell line-specific effects on virus replication // *J. Virol.*—1992.—66.—P. 5525—5533.
39. Bertin J., Mendrysa S. M., LaCount D. J., Gaur S., Krebs J. F., Armstrong R. C., Tomaselli K. J., Friesen P. D. Apoptotic suppression by baculovirus p35 involves cleavage by and inhibition of a virus-induced CED-3/ICE-like protease // *J. Virol.*—1996.—70.—P. 6251—6259.
40. Bump N. J., Hackett M., Hugunin M., Seshagiri S., Brady K., Chen P., Ferenz C., Franklin S., Ghayur T., Li P. Inhibition of ICE family proteases by baculovirus antiapoptotic protein p35 // *Science.*—1995.—269.—P. 1885—1888.
41. Resnicoff M., Valentini B., Herbert D., Abraham D., Friesen P. D., Alnemri E. S., Baserga R. The baculovirus anti-apoptotic p35 protein promotes transformation of mouse embryo fibroblasts // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 10376—10380.
42. Manji G. A., Hozak R. R., LaCount D. J., Friesen P. D. Baculovirus inhibitor of apoptosis functions at or upstream of the apoptotic suppressor p35 to prevent programmed cell death // *J. Virol.*—1997.—71.—P. 4509—4516.
43. Chen P., Tian J., Kovacs I., Bruder J. T. Interaction of the adenovirus 14.7-kDa protein with FLICE inhibits Fas ligand-induced apoptosis // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 5815—5820.
44. Ekert P. G., Silke J., Vaux D. L. Inhibition of apoptosis and clonogenic survival of cells expressing crmA variants: optimal caspase substrates are not necessarily optimal inhibitors // *EMBO J.*—1999.—18.—P. 330—338.
45. Chiou S. K., Tseng C. C., Rao L., White E. Functional complementation of the adenovirus E1B 19-kilodalton protein with Bcl-2 in the inhibition of apoptosis in infected cells // *J. Virol.*—1994.—68.—P. 6553—6566.
46. See R. H., Shi Y. Adenovirus E1B 19,000-molecular-weight protein activates c-Jun N-terminal kinase and c-Jun-mediated transcription // *Mol. and Cell. Biol.*—1998.—18.—P. 4012—4022.
47. Broker B. M., Fickenscher H. Herpesvirus saimiri strategies for T cell stimulation and transformation // *Med. Microbiol. Immunol. (Berl.)*—1999.—187.—P. 127—136.
48. Nava V. E., Cheng E. H., Veliuona M., Zou S., Clem R. J., Mayer M. L., Hardwick J. M. Herpesvirus saimiri encodes a functional homolog of the human *bcl-2* oncogene // *J. Virol.*—1997.—71.—P. 4118—4122.
49. Sarid R., Sato T., Bohenzky R. A., Russo J. J., Chang Y. Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus encodes a functional *bcl-2* homologue // *Nat. Med.*—1997.—3.—P. 293—298.
50. Cheng E. H., Nicholas J., Bellows D. S., Hayward G. S., Guo H. G., Reitz M. S., Hardwick J. M. A Bcl-2 homolog encoded by Kaposi sarcoma-associated virus, human herpesvirus 8, inhibits apoptosis but does not heterodimerize with Bax or Bak // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 690—694.
51. Афанасьева Т. А., Гурцевич В. Э. Молекулярно-биологические аспекты канцерогенеза, ассоциированного с вирусом Эпштейна-Барр // *Молекуляр. биология.*—1998.—32.—С. 940—947.
52. Бутенко А. К., Смирнова И. А., Кишинская Е. Г. Определение генома вируса Эпштейна-Барр в клетках лимфатических узлов и крови больных злокачественными лимфомами из Чернобыльского региона // *Эксперим. онкология.*—1994.—16.—С. 164—168.
53. Miller G. Biology of Epstein-Barr virus // *Viral Oncology / Ed. G. Klein.*—New York: Raven press, 1980.—P. 713—738.
54. Yao Q. Y., Ogan P., Rowe M., Wood M., Rickinson A. B. Epstein-Barr virus-infected B cells persist in the circulation of acyclovir-treated virus carriers // *Int. J. Cancer.*—1989.—43.—P. 67—71.
55. Kenney J. L., Guinness M. E., Curiel T., Lucy J. Antisense to the Epstein-Barr virus (EBV)-encoded latent membrane protein 1 (LMP-1) suppresses LMP-1 and *bcl-2* expression and promotes apoptosis in EBV-immortalized B cells // *Blood.*—1998.—92.—P. 1721—1727.
56. Kawanishi M. Epstein-Barr virus BHRF1 protein protects intestine 407 epithelial cells from apoptosis induced by tumor necrosis factor alpha and anti-Fas antibody // *J. Virol.*—1997.—71.—P. 3319—3322.
57. Komano J., Sugiura M., Takada K. Epstein-Barr virus contributes to the malignant phenotype and to apoptosis resistance in Burkitt's lymphoma cell line Akata // *J. Virol.*—1998.—72.—P. 9150—9156.
58. Haviv I., Matza Y., Shaul Y. pX, the HBV-encoded coactivator, suppresses the phenotypes of TBP and TAFII250 mutants // *Genes Dev.*—1998.—12.—P. 1217—1226.
59. Wang X. W., Gibson M. K., Vermeulen W., Yeh H., Forrester K., Sturzbecher H. W., Hoeijmakers J. H., Harris C. C. Abrogation of p53-induced apoptosis by the hepatitis B virus X gene // *Cancer Res.*—1995.—55.—P. 6012—6016.
60. Elmore L. W., Hancock A. R., Chang S. F., Wang X. W., Chang S., Callahan C. P., Geller D. A., Will H., Harris C. C. Hepatitis B virus X protein and p53 tumor suppressor interactions in the modulation of apoptosis // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 14707—14712.
61. Maheswaran S., Englert C., Lee S. B., Ezzel R. M., Settleman J., Haber D. A. E1B 55K sequesters WT1 along with p53 within a cytoplasmic body in adenovirus-transformed kidney cells // *Oncogene.*—1998.—16.—P. 2041—2050.
62. Nevels M., Spruss T., Wolf H., Dobner T. The adenovirus E4orf6 protein contributes to malignant transformation by antagonizing E1A-induced accumulation of the tumor suppressor protein p53 // *Oncogene.*—1999.—18.—P. 9—17.
63. Querido E., Marcellus R. C., Lai A., Charbonneau R., Teodoro J. G., Ketner G., Branton P. E. Regulation of p53 levels by the E1B 55-kilodalton protein and E4orf6 in adenovirus-infected cells // *J. Virol.*—1997.—71.—P. 3788—3798.
64. Shen Y., Zhu H., Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins are mutagenic and mediate «hit-and-run» oncogenic transformation in cooperation with the adenovirus E1A proteins // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.*—1997.—94.—P. 3341—3345.
65. Zhu H., Shen Y., Shenk T. Human cytomegalovirus IE1 and IE2 proteins block apoptosis // *J. Virol.*—1995.—69.—P. 7960—7970.
66. Bresnahan W. A., Albrecht T., Thompson E. A. The cyclin E promoter is activated by human cytomegalovirus 86-kDa im-

- diate early protein // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 22075—22082.
67. Speir E., Modali R., Huang E. S., Leon M. B., Shawl F., Finkel T., Epstein S. E. Potential role of human cytomegalovirus and p53 interaction in coronary restenosis // *Science*.—1994.—265.—P. 391—394.
 68. Yanai N., Obinata M. Apoptosis is induced at nonpermissive temperature by a transient increase in p53 in cell lines immortalized with temperature-sensitive SV40 large T-antigen gene // *Exp. Cell. Res.*—1994.—211.—P. 296—300.
 69. McCarthy S. A., Symonds H. S., Van Dyke T. Regulation of apoptosis in transgenic mice by simian virus 40 T antigen-mediated inactivation of p53 // *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*.—1994.—91.—P. 3979—3783.
 70. Jung Y. K., Yuan J. Suppression of interleukin-1beta converting enzyme (ICE)-induced apoptosis by SV40 large T antigen // *Oncogene*.—1997.—14.—P. 1207—1214.
 71. Cenzen S. D., Snay C. A., Cole C. N. Identification of a novel antiapoptotic functional domain in simian virus 40 large T antigen // *J. Virol.*—1997.—71.—P. 4536—4543.
 72. Kim S. H., Banga S., Jha K. K., Ozer H. L. SV40-mediated transformation and immortalization of human cells // *Dev. Biol. Stand.*—1998.—94.—P. 297—302.
 73. Cook J. L., Routes B. A., Sompayrac L. Experimental tumour induction by SV40 transformed cells // *Dev. Biol. Stand.*—1998.—94.—P. 303—309.
 74. Swan D. C., Vernon S. D., Icenogle J. P. Cellular proteins involved in papillomavirus-induced transformation // *Arch. Virol.*—1994.—138.—P. 105—115.
 75. Lee J. E., Kim C. Y., Giaccia A. J., Giffard R. G. The E6 and E7 genes of human papilloma virus-type 16 protect primary astrocyte cultures from injury // *Brain Res.*—1998.—795.—P. 10—16.
 76. Eick D., Hermeking H. Viruses as pacemakers in the evolution of defense mechanisms against cancer // *Trends Genet.*—1996.—12.—P. 4—6.
 77. Edwards K. M., Davis J. E., Browne K. A., Sutton V. R., Trapani J. A. Anti-viral strategies of cytotoxic T lymphocytes are manifested through a variety of granule-bound pathways of apoptosis induction // *Immunol. Cell. Biol.*—1999.—77.—P. 76—89.
 78. Atkinson E. A., Barry M., Darmon A. J., Shostak I., Turner P. C., Moyer R. W., Bleackley R. C. Cytotoxic T lymphocyte-assisted suicide. Caspase 3 activation is primarily the result of the direct action of granzyme B // *J. Biol. Chem.*—1998.—273.—P. 21261—21266.
 79. Komiyama T., Quan L. T., Salvesen G. S. Inhibition of cysteine and serine proteinases by the cowpox virus serpin CrmA // *Adv. Exp. Med. Biol.*—1996.—389.—P. 173—176.
 80. Shresta S., Pham C. T., Thomas D. A., Graubert T. A., Ley T. J. How do cytotoxic lymphocytes kill their targets? // *Curr. Opin. Immunol.*—1998.—10.—P. 581—587.
 81. Barry M., McFadden G. Virus encoded cytokines and cytokine receptors // *Parasitology*.—1997.—115 (Suppl).—S89—100.
 82. Возианов А. Ф., Бутенко А. К., Зак К. П. Цитокины: биологические и противоопухолевые свойства.—К.: Наук. думка, 1998.—317 с.
 83. Smyth M. J., Trapani J. A. The relative role of lymphocyte granule exocytosis versus death receptor-mediated cytotoxicity in viral pathophysiology // *J. Virol.*—1998.—72.—P. 1—9.
 84. Malejczyk J., Malejczyk M., Breitbart F., Majewski S., Schwarz A., Expert-Besancon N., Jablonska S., Orth G., Luger T. A. Progressive growth of human papillomavirus type 16-transformed keratinocytes is associated with an increased release of soluble tumour necrosis factor (TNF) receptor // *Br. J. Cancer*.—1996.—74.—P. 234—239.
 85. Feng P., Chan S. H., Ooi E. E., Soo M. Y., Loh K. S., Wang D., Ren E. C., Hu H. Elevated blood levels of soluble tumor necrosis factor receptors in nasopharyngeal carcinoma: correlation with humoral immune response to lytic replication of Epstein-Barr virus // *Int. J. Oncol.*—1999.—15.—P. 167—172.
 86. Strockbine L. D., Cohen J. I., Farrah T., Lyman S. D., Wagener F., DuBose R. F., Armitage R. J., Spriggs M. K. The Epstein-Barr virus BARF1 gene encodes a novel, soluble colony-stimulating factor-1 receptor // *J. Virol.*—1998.—72.—P. 4015—4021.
 87. Lalani A. S., Graham K., Mossman K., Rajarathnam K., Clark-Lewis I., Kelvin D., McFadden G. The purified myxoma virus gamma interferon receptor homolog M-T7 interacts with the heparin-binding domains of chemokines // *J. Virol.*—1997.—71.—P. 4356—4363.
 88. Sieg S., Yildirim Z., Smith D., Kayagaki N., Yagita H., Huang Y., Kaplan D. Herpes simplex virus type 2 inhibition of Fas ligand expression // *J. Virol.*—1996.—70.—P. 8747—8751.
 89. Schmitt C. A., Lowe S. W. Apoptosis and therapy // *J. Pathol.*—1999.—187.—P. 127—137.
 90. Фильченков А. А. Современные представления о роли апоптоза в опухолевом росте и его значении для противоопухолевой терапии // *Эксперим. онкология*.—1998.—20.—С. 259—270.
 91. Cinatl J., Jr., Cinatl J., Vogel J. U., Kotchetkov R., Driever P. H., Kabickova H., Kornhuber B., Schwabe D., Doerr H. W. Persistent human cytomegalovirus infection induces drug resistance and alteration of programmed cell death in human neuroblastoma cells // *Cancer Res.*—1998.—58.—P. 367—372.
 92. Tanaka Y., Kameoka M., Ota K., Itaya A., Ikuta K., Yoshihara K. Establishment of persistent infection with HIV-1 abrogates the caspase-3-dependent apoptotic signaling pathway in U937 cells // *Exp. Cell. Res.*—1999.—247.—P. 514—524.
 93. De Clercq E., Andrei G., Balzarini J., Hatse S., Liekens S., Naesens L., Neyts J., Snoeck R. Antitumor potential of acyclic nucleoside phosphonates // *Nucleosides and Nucleotides*.—1999.—18.—P. 759—771.
 94. Neyts J., Sadler R., De Clercq E., Raab-Traub N., Pagano J. S. The antiviral agent cidofovir [(S)-1-(3-hydroxy-2-phosphonyl-methoxypropyl)cytosine] has pronounced activity against nasopharyngeal carcinoma grown in nude mice // *Cancer Res.*—1998.—58.—P. 384—388.
 95. Hatse S., Schols D., De Clercq E., Balzarini J. 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)-adenine induces tumor cell differentiation or cell death by blocking cell cycle progression through the S phase // *Cell Growth Differ.*—1999.—10.—P. 435—446.
 96. Franek F., Holy A., Votruba I., Eckschlager T. Acyclic nucleotide analogues suppress growth and induce apoptosis in human leukemia cell lines // *Int. J. Oncol.*—1999.—14.—P. 745—752.
 97. Li P. X., Ngo D., Brade A. M., Klamut H. J. Differential chemosensitivity of breast cancer cells to ganciclovir treatment following adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene transfer // *Cancer Gene. Ther.*—1999.—6.—P. 179—190.
 98. Soler M. N., Milhaud G., Lekmine F., Treilhou-Lahille F., Klatzmann D., Lausson S. Treatment of medullary thyroid carcinoma by combined expression of suicide and interleukin-2 genes // *Cancer Immunol. and Immunother.*—1999.—48.—P. 91—99.
 99. Hall S. J., Mutchnik S. E., Yang G., Timme T. L., Nasu Y., Bangma C. H., Woo S. L., Shaker M., Thompson T. C. Cooperative therapeutic effects of androgen ablation and

- adenovirus-mediated herpes simplex virus thymidine kinase gene and ganciclovir therapy in experimental prostate cancer // *Cancer Gene Ther.*—1999.—6.—P. 54—63.
100. Bouali-Benazzouz R., Laine M., Vicat J., Boisseau S., Remy C., Foulh N., Thomas F., Nissou M., Benabid A., Berger F. Therapeutic efficacy of the thymidine kinase/ganciclovir system on large experimental gliomas: a nuclear magnetic resonance imaging study // *Gene Ther.*—1999.—6.—P. 1030—1037.
101. Engelmann C., Panis Y., Bolard J., Diquet B., Fabre M., Nagy H., Soubrane O., Houssin D., Klatzmann D. Liposomal encapsulation of ganciclovir enhances the efficacy of herpes simplex virus type 1 thymidine kinase suicide gene therapy against hepatic tumors in rats // *Hum. Gene Ther.*—1999.—10.—P. 1545—1551.
102. Craperi D., Vicat J. M., Nissou M. F., Mathieu J., Baudier J., Benabid A. L., Verna J. M. Increased bax expression is associated with cell death induced by ganciclovir in a herpes thymidine kinase gene-expressing glioma cell line // *Hum. Gene Ther.*—1999.—10.—P. 679—688.
103. Herman J. R., Adler H. L., Aguilar-Cordova E., Rojas-Murtinez A., Woo S., Timme T. L., Wheeler T. M., Thompson T. C., Scardino P. T. *In situ* gene therapy for adenocarcinoma of the prostate: a phase I clinical trial // *Hum. Gene Ther.*—1999.—10.—P. 1239—1249.
104. Raetz L., Cabral L., Cai J. P., Landy H., Sfakianakis G., Byrne G. E., Jr., Hurley J., Scerpella E., Jayaweera D., Harrington W. J., Jr. Treatment of AIDS-related primary central nervous system lymphoma with zidovudine, ganciclovir, and interleukin 2 // *AIDS Res. Hum. Retroviruses.*—1999.—15.—P. 713—719.
105. Shand N., Weber F., Mariani L., Bernstein M., Gianella-Borradori A., Long Z., Sorensen A. G., Barbier N. A phase I—II clinical trial of gene therapy for recurrent glioblastoma multiforme by tumor transduction with the herpes simplex thymidine kinase gene followed by ganciclovir. GL1328 European-Canadian Study Group // *Hum. Gene Ther.*—1999.—10.—P. 2325—2335.

УДК 576.385; 616-006.6
Поступила в редакцию 29.11.99