



## El adenovirus que expresa E2F-1 mutante suprime el crecimiento tumoral *in vivo*

JORGE G. GÓMEZ GUTIÉRREZ\*, ARACELY GARCÍA GARCÍA\*\*, SAM ZHOU\*, KELLY MCMASTERS\*, ROBERTO MONTES DE OCA LUNA\*\*



El factor de transcripción E2F-1 (Ad-E2F-1) induce eficientemente a apoptosis en células de cáncer *in vitro* e *in vivo*.<sup>1-5</sup> Sin embargo, E2F-1 es también considerado un oncogén, por su habilidad de estimular el progreso del ciclo celular de la fase G1 a la fase S.<sup>6-7</sup> Así, el uso del gen E2F-1 tipo silvestre en la terapia génica es controversial por su potencial oncogénico. Para resolver esta controversia, eliminamos el dominio de transactivación del E2F-1 tipo silvestre y generamos una forma truncada de E2F-1 (E2Ftr; aminoácidos del 1 al 375). El E2F truncado deficiente en la transactivación no promueve el progreso del ciclo celular en comparación con su contraparte de tipo silvestre, pero aún es un potente inductor de apoptosis.<sup>8,9</sup>

Previamente reportamos que la expresión de E2Ftr, regulada por el promotor del CMV, puede ser tóxica para las células HEK-293 e inhibe la

replicación del adenovirus.<sup>10</sup> Por lo tanto, aplicamos el sistema de expresión regulado por la tetraciclina (*Tet-off*, por sus siglas en inglés)<sup>11</sup> para controlar la expresión de E2Ftr en los vectores adenovirales. En esta investigación demostramos que el sistema de expresión inducible en nuestros vectores resultó en altos niveles de expresión de E2Ftr en células de cáncer. En comparación con Ad-E2F-1, uno de nuestros vectores que expresa E2Ftr indujo a una mayor citotoxicidad en células de cáncer, pero mínima citotoxicidad en células normales. Además, AdTet-E2Ftr3 puede significativamente suprimir el crecimiento de tumores de origen humano en un modelo de ratón inmunodeficiente. Nuestros estudios indican que este nuevo adenovirus que expresa E2Ftr tiene un alto potencial para su aplicación clínica.

### Metodología

### Cultivo de células

Los meloncitos epidermales humanos se aislaron de piel de adulto ligeramente pigmentada (HEMA-

□ El presente artículo está basado en la investigación "Terapia génica antitumoral usando una versión de E2F-1 carente de su dominio de transactivación", galardonada con el Premio de Investigación UANL 2011, en la categoría de Ciencias de la Salud, otorgado en sesión solemne del Consejo Universitario, en septiembre de 2011.

\* Departamento de Cirugía, University of Louisville.

\*\*Departamento de Histología, Facultad de Medicina de la UANL.

LP, por sus siglas en inglés). La línea celular HS-27 de fibroblastos de piel humana, las líneas celulares de melanoma humano SK-MEL-2 (*p53* mutante), SK-MEL-28 (*p53* tipo silvestre), A2058, y DM6, las líneas celulares de cáncer de pulmón humano A549 (*p53* tipo silvestre) y H1299 (con ausencia parcial de *p53*) y la línea celular de riñón embrionaria humana HEK-293 se compraron en la compañía American Type Culture Collection (Rockville, MD).

Las células se cultivaron en sus respectivos medios. Todos los medios se suplementaron con 10% suero fetal bovino y penicilina/streptomycin (100 U/ml). Las células se cultivaron en una atmósfera a 5% de CO<sub>2</sub>, y en una incubadora a 37°C.

### Vectores adenovirales recombinantes

Seis vectores adenovirales deficientes para la replicación se usaron en este trabajo. Los vectores Ad5CMV-E2F-1 (Ad-E2F-1) y Ad5CMV-LacZ (Ad-LacZ) contienen los transgenes E2F-1 y *β*-galactosidasa, respectivamente, bajo el promotor del CMV, y se describieron previamente.<sup>2</sup> El AdTet-EGFP (que expresa la proteína verde fluorescente), AdTet-E2Ftr1, AdTet-E2Ftr2, y AdTet-E2Ftr3 fueron construidos por nosotros. Los tres vectores expresan el mismo gen E2Ftr (aminoácidos; 1 al 375).<sup>10</sup>

### Ensayo de Western blott

Los anticuerpos usados en este estudio se describen a continuación: anticuerpo monoclonal de ratón anti-E2F-1 humano (Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz, CA), anticuerpo monoclonal de ratón anti-caspasa-3/CPP32 humano (Transduction Laboratories, Lexington, KY), anticuerpo monoclonal de ratón anti-poli (ADP-ribosa) polimerasa (PARP) humano, anticuerpo policlonal de conejo anti-actina humana (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Anticuerpos antirratón o anticonejo se usaron para detectar los anticuerpos primarios (Amersham, Piscataway,

NJ). Los reactivos de electroquimioluminiscencia (ECL) se usaron para detectar las señales, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Amersham).

### Ensayo de viabilidad celular, análisis del ciclo celular y tinción con Annexin-V

La viabilidad celular se evaluó a las 72 hrs después de la infección, mediante la medición de la conversión de la sal tetrazolium (MTT, por sus siglas en inglés) a formazan, de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Boehringer Mannheim, Indianapolis, IN).

El análisis del ciclo celular se llevó a cabo en un citómetro de flujo (FACSscan; Becton Dickinson, San José, CA). La distribución del ciclo celular se analizó con el software Cell Quest (BD Biosciences, San Diego, CA).

La tinción con anexin-V se realizó de acuerdo a las instrucciones del fabricante (Annexin V-Pe Apoptosis Kit, Pharmingen, San Diego, CA) y como se describió previamente.<sup>12</sup> El porcentaje de apoptosis se determinó por citometría de flujo (Becton Dickinson) y con el software FlowJo (Tree Star Inc., Ashland, OR).

### Estudio antitumoral en ratones inmunodeficientes

Los tumores se formaron por la inyección subcutánea de 5×10<sup>6</sup> células de la línea celular de melanoma A2058 en los flancos de ratones machos atímicos de la cepa BALB/*c nu/nu* (de 6 a 8 semanas de edad; Charles River Laboratories, Wilmington, MA). Seis días después, tumores palpables se seleccionaron al azar para las inyecciones intratumorales, con AdTet-E2Ftr3 (1×10<sup>9</sup> unidades formadoras de placa pfu -siglas en inglés) o AdTet-EGFP (1×10<sup>9</sup> pfu; *n* = 6 por cada grupo).

Las inyecciones intratumorales se realizaron cada tres días, con un total de cuatro dosis. Cada inyección de adenovirus purificados se diluyó en un volumen total de 100 ml de una solución al

0.9% de NaCl. Los tumores se midieron cada tres días y el volumen del tumor se determinó por la medición externa en dos dimensiones con un vernier. El volumen (V) se determinó por la ecuación  $V = (L \times A^2)/2$ , en la que L es largo, A es ancho del tumor. Los experimentos con animales se realizaron de acuerdo con los estándares internacionales de bioética.

### Inmunohistoquímica de los tumores

Los tumores se retiraron a las 24 hrs después de la última inyección *in vivo*, y se fijaron en 10% formalina, después se embebieron en bloques de parafina, y se procesaron para el análisis histológico y para la detección de la expresión de E2Ftr y la caspasa-3 activada. Se utilizaron un anticuerpo de ratón anti-E2F-1 humano (KH95) sc-125 (Santa Cruz Biotechnology) y un anticuerpo de conejo anti-caspasa-3 activada humana (Asp175)(5A1E) mAb (Cell Signaling, Danvers, MA). Las fotografías se tomaron con el objetivo de 20, y se analizaron con el software NIS-Elements BR 3.0 (Nikon Instruments, Melville, NY).

### Análisis estadístico

Los resultados de los ensayos *in vitro* y de crecimiento de tumor en ratones de los dos grupos de tratamiento se analizaron por la prueba de análisis de varianza paramétrica, en una dirección ordinaria *t* de Student. Los valores de  $P < 0.05$  se consideraron estadísticamente significativos.

### Resultados

#### La alta expresión de E2Ftr aumenta la muerte de células cancerosas

Los vectores que expresan E2Ftr se evaluaron para determinar su habili-

dad para inducir muerte celular en la línea de melanoma SK-MEL-2. Se encontró que la citotoxicidad incrementó dependiendo de la dosis del virus en células de melanoma infectadas con AdTet-E2Ftr1, AdTet-E2Ftr2 y AdTet-E2Ftr3 (figura 1A). En contraste, células infectadas con el virus control AdTet-EGFP exhibieron poca citotoxicidad. La citotoxicidad de las células de cáncer se correlaciona con los niveles de expresión de E2Ftr (figuras 1A y B). Entre los vectores, AdTet-E2Ftr3 mostró la más alta citotoxicidad en células de cáncer, así como la más alta expresión de E2Ftr (figura 1B).

La inducción de apoptosis se confirmó por la detección de la ruptura de PARP; PARP es el sustrato de la caspasa-3, la cual está bien caracterizada como marcador de apoptosis.<sup>5,13</sup> No se detectó ruptura de PARP en las células infectadas con el control AdTet-EGFP o AdTet-

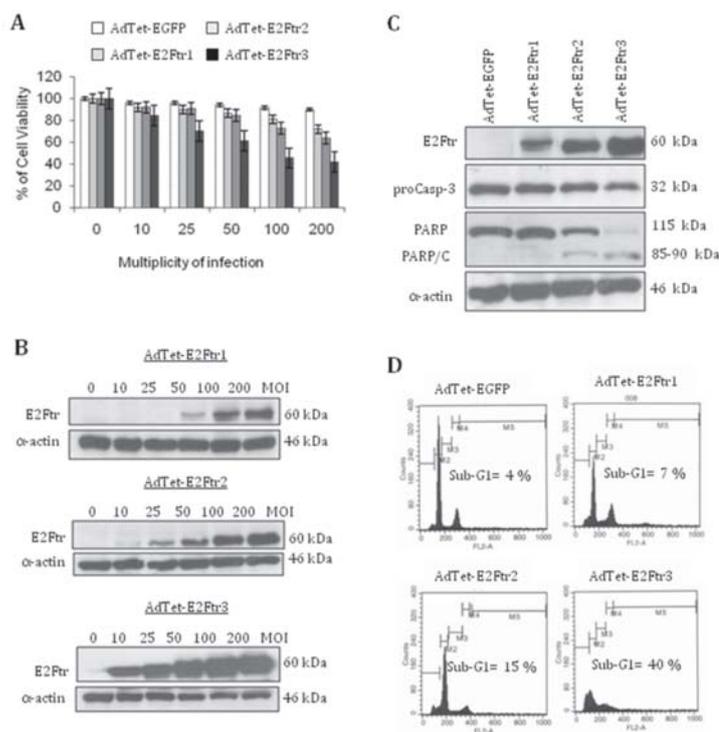


Fig. 1. Evaluación de los tres vectores adenovirales que expresan E2Ftr y determinación de su habilidad para destruir células de melanoma e inducir apoptosis. A) Ensayo de MTT, B) Western blot, C) Activación de las caspasas, D) Análisis del ciclo celular.

E2Ftr1, bajos niveles de la ruptura de PARP se detectaron en las células infectadas con AdTet-E2Ftr2, pero significativa ruptura de PARP se detectó en células infectadas con AdTet-E2Ftr3 (figura 1C). Un decremento en los niveles de la proenzima cisteina proteasa/caspasa-3 (CP)P32 se detectó en células infectadas con los vectores que expresan E2Ftr en comparación con el vector que expresa la EGFP. Entre los vectores AdTet-E2Ftr3, indujo el más significativo decremento de caspasa-3, y la más significativa ruptura de PARP.

Con el uso del citómetro de flujo observamos un incremento de la población en la fase sub-G1 del ciclo celular (lo cual es consistente con apoptosis) y se correlacionó con los niveles de expresión de E2Ftr. El AdTet-E2Ftr3 indujo el más alto porcentaje de la población en la fase sub-G1 (40%), mientras que AdTet-E2Ftr1 y AdTet-E2Ftr2 indujeron 7% y 15% de las células en sub-G1, respectivamente (figura 1D). Estos resultados muestran que la infección con AdTet-E2Ftr3 se asocia a la más potente reducción de la proliferación celular e inducción de apoptosis, las cuales se relacionan con los altos niveles de expresión de E2Ftr.

### E2Ftr induce apoptosis independientemente del estatus de p53

Las mutaciones en el gen p53 es uno de los eventos más frecuentes en la mayoría de los tumores.<sup>17</sup> En este experimento se investigó si el gen p53 jugaba un rol en la apoptosis inducida por E2Ftr. Para este fin las líneas celulares de melanoma, SK-

MEL-2 (mutante para p53) y SK-MEL-28 (p53 tipo silvestre), se infectaron con AdTet-E2Ftr3. Un ensayo de viabilidad celular reveló que AdTet-E2Ftr3 causó la muerte celular en ambas líneas celulares; en contraste, no se observó significativa citotoxicidad en células no infectadas o infectadas con Ad-LacZ (figura 2A). La activación de las caspas se confirmó por un Western blot (figura 2B).

La apoptosis se validó mediante la tinción con annexin-V. Las células SK-MEL-2 exhibieron 92% de apoptosis, mientras que las células SK-MEL-28 mostraron 88% de apoptosis a las 72 hrs posinfección con AdTet-E2Ftr3 (figura 2C). Pocas células en apoptosis se detectaron en células no infectadas (mock) o infectadas con Ad-LacZ en ambas líneas celulares (figura 2C). AdTet-E2Ftr también indujo apoptosis en las células de cáncer de pulmón A549 (p53 tipo silvestre) y H1299

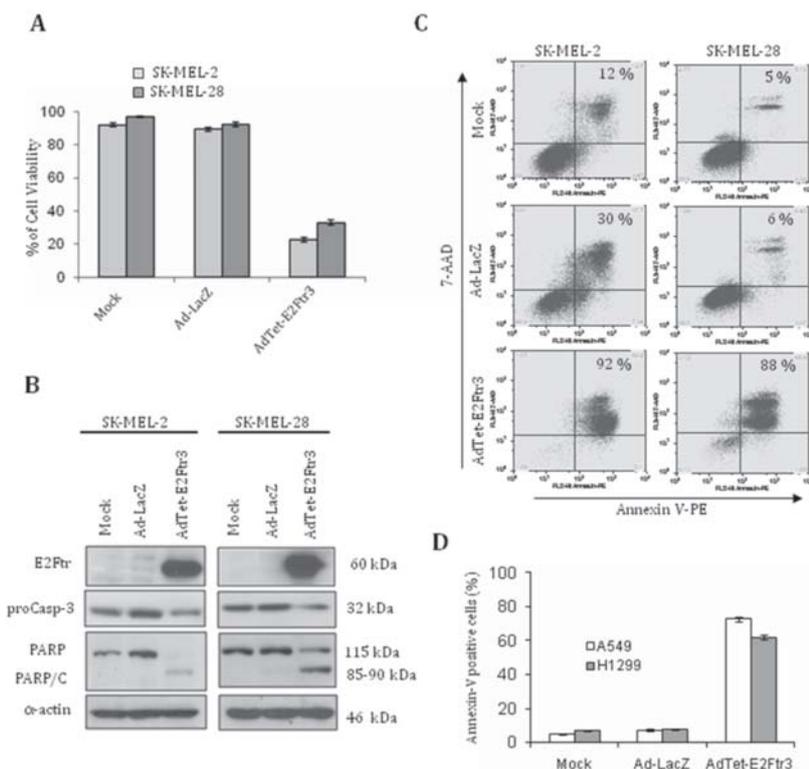


Fig. 2. Rol del estatus de p53 en la apoptosis inducida por E2Ftr. A) Ensayo de MTT, B) Western blot, C) y D) Porcentaje de apoptosis.

(2D). Estos resultados demuestran que la apoptosis inducida por E2Ftr no requiere del gen p53 funcional.

**La sobreexpresión de E2Ftr induce a la activación de caspasa-3 en tumores *in vivo***

El análisis inmunohistoquímico de los tumores reveló una fuerte expresión de E2Ftr en los tumores de ratones inyectados con AdTet-E2Ftr3, la cual se asoció con un significativo número de células positivas para la activación de la caspasa-3

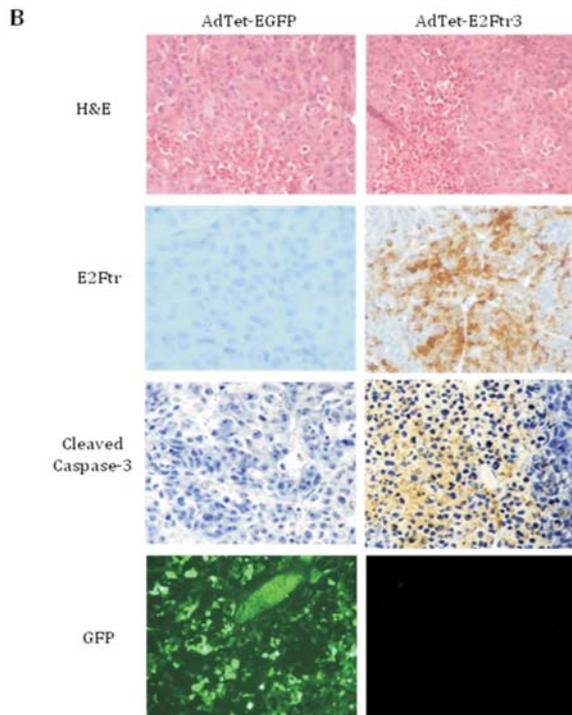


Fig. 3. Inmunohisquímica de tumor. Inmunohistoquímica de los tumores de melanoma a 24 hrs después del tratamiento con Ads.

(figura 3).

En contraste, no se observó expresión de E2Ftr, ni de la activación de caspasa-3 en los tumores de ratones inyectados con AdTet-EGFP. Sin embargo, el tratamiento con AdTet-EGFP resultó en altos niveles de expresión de EGFP en los tumores. Este resultado indica que AdTet-E2Ftr3 eficientemente transdujo la masa tumoral e indujo una fuerte activación de la caspasa-3.

**El AdTet-E2Ftr3 tiene una potente actividad antitumoral *in vivo***

La actividad antitumoral de AdTet-E2Ftr3 se evaluó *in vivo*. El protocolo del modelo tumoral de ratón descrito en la “Metodología” resultó en una significativa supresión de tumor en los seis ratones tratados (100%) con AdTet-E2Ftr3 al día 27 después de la primera inyección (figura 4A). La reducción del tamaño de tumor fue ~80% comparado con en virus control AdTet-EGFP, esta

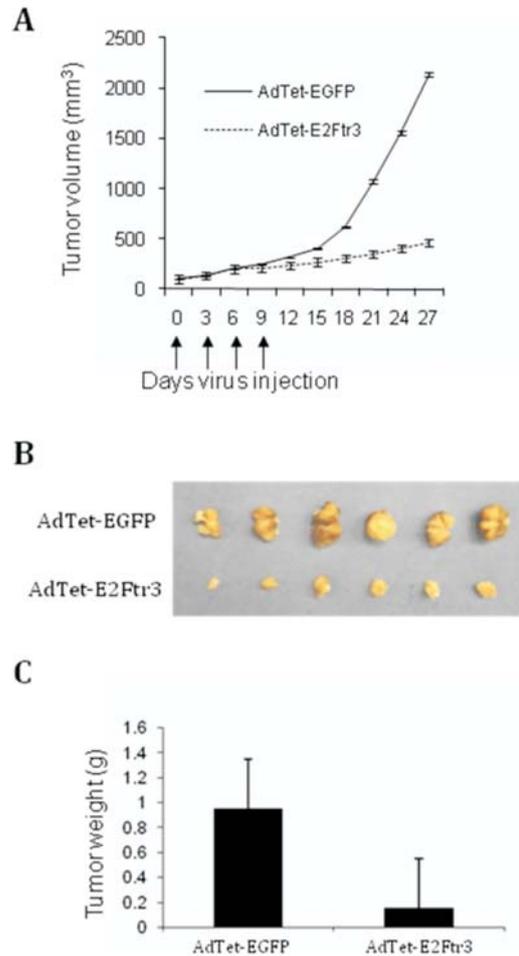


Fig. 4. Efecto antitumoral *in vivo* del tratamiento con un adenovirus que expresa E2Ftr. A) El volumen del tumor se graficó en contra del tiempo y se determinó por la ecuación  $V = (L \times A^2)/2$ , B) Masa relativa de los tumores, C) Peso de los tumores.

diferencia fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ). Al término del experimento (día 27), los tumores se extirparon y se fotografiaron. La fotografía muestra que los tumores de ratones tratados con AdTet-EGFP fueron significativamente más grandes que los tumores de ratones tratados con AdTet-E2Ftr3 (figura 4B). Los tumores del tratamiento con AdTet-EGFP pesaron  $1.2 \pm 0.4$  gr, mientras que los tumores del tratamiento con AdTet-E2Ftr3 pesaron  $0.2 \pm 0.04$  gr (figura 4C). El tratamiento con E2Ftr resultó en una significativa disminución en el tamaño del tumor; esta diferencia entre los dos tratamientos fue estadísticamente significativa ( $P < 0.05$ ).

### Discusión y conclusión

Aunque numerosos estudios muestran que E2F-1 tiene una potente actividad antitumoral *in vitro* e *in vivo*,<sup>1,2,4</sup> su uso en estudios clínicos aún es controversial por su potencial oncogénico.<sup>6,7</sup> Sin embargo hay fuerte evidencia que muestra que E2F-1 tiene dominio truncado, el cual carece de transactivación y no tiene propiedades oncogénicas.

Varios estudios mostraron que diferentes mutantes de E2F-1 que carecen del dominio de transactivación son incapaces de inmortalizar queratinocitos de piel humanos normales (NHFKs, por sus siglas en inglés) y células NIH-3T3, además inhiben la formación de colonia en agar suave.<sup>9</sup> Los mutantes de E2F-1 que contienen sólo el dominio de unión al ADN disminuyen los niveles de las proteínas ciclina A y D<sup>8</sup> e inducen apoptosis a un más alto porcentaje que E2F-1 en células de osteosarcoma SaOs-2.<sup>9</sup>

Por lo tanto, la controversia alrededor del potencial oncogénico de E2F-1 puede ser obviada por el uso de una forma truncada de E2F-1, tal como E2Ftr, que carece del dominio de transactivación asociado a la oncogenicidad. En este estudio reportamos un adenovirus que expresa que el gen E2Ftr significativamente induce a apoptosis en células de cáncer, y resulta en una significativa

supresión de tumor en ratones.

Previamente observamos que el tratamiento de ratones con Ad-E2F-1 redujo el tamaño del tumor  $\sim 37\%$ .<sup>2</sup> Aquí reportemos una reducción de  $\sim 80\%$  del tamaño de tumor en ratones tratados con AdTet-E2Ftr3 (figura 4A). Las inyecciones con AdTet-E2Ftr3 resultaron en altos niveles de expresión de E2Ftr y una fuerte inducción de la activación de la caspasa-3 en los tumores de los ratones (figura 3). Este resultado indica que AdTet-E2Ftr3 puede eficientemente activar la vía apoptótica e inhibir el crecimiento de la masa tumoral. Así pues, el AdTet-E2Ftr3 puede ser un vector más seguro y eficiente que Ad-E2F-1 para la terapia génica del cáncer.

### Resumen

El adenovirus que expresa el gen E2F-1 induce a apoptosis en células de cáncer *in vitro* e *in vivo*, pero su aplicación clínica es controversial, debido a su potencial oncogénico. En esta investigación construimos tres vectores adenovirales que expresan E2Ftr, el cual carece del dominio de transactivación y, por lo tanto, también carece de su capacidad oncogénica. El AdTet-E2Ftr3 indujo a apoptosis independientemente del estatus de p53, una potente actividad antitumoral, reduciendo el tamaño de tumor en  $\sim 80\%$ , en comparación con el grupo control. El AdTet-E2Ftr3 tiene una significativa actividad terapéutica y un alto potencial para su aplicación en la clínica.

**Palabras clave:** Adenovirus, E2F-1, E2Ftr, Cáncer apoptosis.

### Abstract

Adenovirus expressing E2F-1 induces apoptosis in cancer cell *in vitro* and *in vivo*. But its clinical application is controversial, since it oncogenic potential. In this investigation we constructed three adenoviral vectors expressing E2Ftr which lacks transactivation domain and oncogenic

capability. AdTet-E2Ftr induced apoptosis independently of p53 status, a potent antitumoral activity decreasing tumor size ~80% in comparison with control group. AdTet-E2Ftr3 has a significant therapeutic activity and a high potential to be applied in clinical trails.

**Keywords:** Adenovirus, E2F-1, E2Ftr, Cancer apoptosis.

### Referencias

- Dong Y.B., Yang H.L., Elliott M.J., *et al.* Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer efficiently induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer* 1999;86:2021-33.
- Dong Y.B., Yang H.L., Elliott M.J., McMasters K.M. Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer sensitizes melanoma cells to apoptosis induced by topoisomerase II inhibitors. *Cancer Res* 2002;62:1776-83.
- Elliott M.J., Dong Y.B., Yang H., McMasters K.M. E2F-1 up-regulates c-Myc and p14(ARF) and induces apoptosis in colon cancer cells. *Clin Cancer Res* 2001;7:3590-7.
- Vorburger S.A., Hetrakul N., Xia W., *et al.* Gene therapy with E2F-1 up-regulates the protein kinase PKR and inhibits growth of leiomyosarcoma in vivo. *Mol Cancer Ther* 2005;4:1710-6.
- Itoshima T., Fujiwara T., Waku T., *et al.* Induction of apoptosis in human esophageal cancer cells by sequential transfer of the wild-type p53 and E2F-1 genes: involvement of p53 accumulation via ARF-mediated MDM2 down-regulation. *Clin Cancer Res* 2000;6:2851-9.
- Johnson D.G., Schwarz J.K., Cress W.D., Nevins JR. Expression of transcription factor E2F1 induces quiescent cells to enter S phase. *Nature* 1993;365:349-52.
- Muller H., Helin K. The E2F transcription factors: key regulators of cell proliferation. *Biochim Biophys Acta* 2000;1470:M1-12.
- Fan J., Bertino J.R. Functional roles of E2F in cell cycle regulation. *Oncogene* 1997;14:1191-200.
- Bell L.A., O'Prey J., Ryan K.M. DNA-binding independent cell death from a minimal proapoptotic region of E2F-1. *Oncogene* 2006;25:5656-63.
- Gómez-Gutiérrez J.G., Rao X.M., García-García A., Hao H., McMasters K.M., Zhou H.S. Developing adenoviral vectors encoding therapeutic genes toxic to host cells: comparing binary and single-inducible vectors expressing truncated E2F-1. *Virology* 2010;397:337-45.
- Gossen M., Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:5547-51.
- Gómez-Gutiérrez J.G., Souza V., Hao H.Y., *et al.* Adenovirus-mediated gene transfer of FKHL1 triple mutant efficiently induces apoptosis in melanoma cells. *Cancer Biol Ther* 2006;5:875-83.
- Fernandes-Alnemri T., Litwack G., Alnemri E.S. CPP32, a novel human apoptotic protein with homology to *Caenorhabditis elegans* cell death protein Ced-3 and mammalian interleukin-1 beta-converting enzyme. *J Biol Chem* 1994;269:30761-4.
- Kuhn H., Liebers U., Gessner C., *et al.* Adenovirus-mediated E2F-1 gene transfer in nonsmall-cell lung cancer induces cell growth arrest and apoptosis. *Eur Respir J* 2002;20:703-9.
- Bauer T.W., Gutiérrez M., Dudrick D.J., *et al.* A human melanoma xenograft in a nude rat responds to isolated limb perfusion with TNF plus melphalan. *Surgery* 2003;133:420-8.
- Canter R.J., Zhou R., Kesmodel S.B., *et al.* Metaiodobenzylguanidine and hyperglycemia augment tumor response to isolated limb perfusion in a rodent model of human melanoma. *Ann Surg Oncol* 2004;11:265-73.

17. Hollstein M., Sidransky D., Vogelstein B., Harris C.C. p53 mutations in human cancers. *Science* 1991;253:49-53.
18. Molenaar J.J., Ebus M.E., Geerts D., et al. Inactivation of CDK2 is synthetically lethal to MYCN over-expressing cancer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2009;106:12968-73.
19. Sakaguchi M., Kataoka K., Abarzua F., et al. Overexpression of REIC/Dkk-3 in Normal Fibroblasts Suppresses Tumor Growth via Induction of Interleukin-7. *J Biol Chem* 2009;284:14236-44.
20. Tang W., Wang W., Zhang Y., Liu S., Liu Y., Zheng D. Tumour necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL)-induced chemokine release in both TRAIL-resistant and TRAIL-sensitive cells via nuclear factor kappa B. *Febs J* 2009;276:581-93.

*Recibido: 1 de septiembre de 2011*

*Aceptado: 1 de octubre de 2011*