

腺病毒 E4orf4 蛋白诱导的肿瘤特异性细胞死亡及其在癌症治疗中的应用

孙 婷, 罗砚曦, 阎 辉*
(浙江省医学科学院药物研究所, 杭州 310013)

摘要 腺病毒 E4orf4 蛋白由腺病毒早期第 4 转录区第 4 开放读码框编码, 为一种多功能调节蛋白质, 其活性包括下调早期病毒基因表达和下调影响病毒复制的细胞基因表达, 调控病毒基因的选择性转录后剪切以影响病毒感染进程等。当 E4orf4 脱离病毒环境单独表达时, 可诱导不依赖 p53 和胱天蛋白酶途径的癌细胞特异性细胞死亡, 而不影响原代细胞的正常生长。这表明 E4orf4 对癌细胞有特异性的杀伤作用。本文主要介绍了: (1) E4orf4 主要蛋白质伴侣(蛋白磷酸酶 2A 和 Src 家族激酶)对 E4orf4 细胞杀伤作用的贡献; (2) E4orf4 诱导的细胞死亡独特模式的基本机制及其特点; (3) 近年来利用 E4orf4 治疗癌症的研究。

关键词 腺病毒 E4orf4; 蛋白磷酸酶 2 A; Src 家族激酶; 肿瘤特异性细胞死亡; 癌症治疗

中图分类号 R37

Tumor-specific Cell Deaths Induced by the Adenovirus E4orf4 Protein and Its Application in Cancer Therapy

SUN Ting, LUO Yan-Xi, YAN Hui*
(Institute of Material Medical, Zhejiang Academy of Medical Sciences, Hangzhou 310013, China)

Abstract The adenovirus E4orf4 protein is encoded by the adenovirus early region 4 open reading frame 4. It is a multifunctional viral regulator that contributes to the down-regulation of viral and cellular genes expression, which affects viral replication and the alternative splicing of viral mRNAs. When expressed alone, E4orf4 induces nonclassical cancer-specific cell deaths that are caspase-independent and p53-independent in many transformed cells, indicating that E4orf4 may be exploited for cancer therapy. In this review, we overview the following points: (1) the contribution of E4orf4 interaction partners (protein phosphatase 2 A and the Src family kinase) to E4orf4-induced cell deaths in the nucleus and cytoplasm; (2) the unique mechanisms of E4orf4-induced cell deaths and its cancer specificity; (3) recent progress of E4orf4 in cancer therapy.

Key words adenovirus e4orf4 (E4orf4); protein phosphatase 2 A; Src family kinase; tumor-specific cell death; cancer therapy

人腺病毒(adenovirus, Ad)基因组早期第 4 转录区(E4)转录单元中至少包含 7 个开放读码框(open reading frame, ORF), 编码至少 6 种蛋白质(从 E4orf1 到 E4orf6/7)。其中, E4 第 4 开放读码框(ORF 4)编码产生 E4orf4 蛋白。

上世纪 90 年代, 大量研究报道, 腺病毒 E4orf4 蛋白能够在癌基因表达的情况下, 诱导高水平的非 p53 依赖性细胞死亡^[1, 2], 并且发现一种不能结合蛋白磷酸酶 2 A(protein phosphatase 2 A, PP2A)的 E4orf4 突变体。不能结合 PP2A 的 E4orf4 突变体不

收稿日期: 2018-02-05; 修回日期: 2018-04-08; 接受日期: 2018-04-27

国家自然科学基金面上项目(No. 81172137)

* 通讯作者 Tel: 0571-88215439; E-mail: jipei2006@163.com

Received: February 5, 2018; Revised: April 8, 2018; Accepted: April 27, 2018

Supported by National Natural Science Foundation of China (No. 81172137)

* Corresponding author Tel: +86-571-88215439; E-mail: jipei2006@163.com

仅没有杀伤细胞的能力,甚至还能提高细胞存活率^[1]。因此推断,PP2A 在 E4orf4 诱导的细胞死亡中扮演着非常重要的角色。近年来,学者们发现了更多的在 E4orf4 诱导细胞死亡中具有重要作用的分子伴侣,如 Src 家族激酶 (Src family kinases, SFKs)、泛素连接酶 (anaphase-promoting complex/cyclosome, APC/C) 等。并在研究中发现, E4orf4 诱导的细胞死亡具有癌细胞特异性,其对人类原代细胞不敏感^[3]。因此, E4orf4 蛋白有望成为一种新型抗癌药物。本文将重点讨论 E4orf4 诱导的独特细胞死亡模式,及其肿瘤特异性和其在抗肿瘤应用方面的研究,希望为肿瘤治疗提供新思路。

1 E4orf4 蛋白的结构与功能和其分子伴侣

1.1 E4orf4 蛋白的结构与功能

在 Ad2 和 Ad5 中, E4orf4 编码的蛋白质是由 114 个氨基酸残基组成的 14 kD 小分子多肽。E4orf4 蛋白一级序列与其它已知的非腺病毒蛋白质序列无同源性^[3]。但 E4orf4 多肽均含有一个高度保守的基本序列^[4]。然而,这一序列的功能尚不清楚。由于缺乏已知的同源性蛋白质为 E4orf4 构建模板,所以尚不清楚 E4orf4 蛋白的结构。但是, Horowitz 等^[5]利用计算机算法从头建模,对这 114 个碱基的多肽结构进行预测。预测结果表明, E4orf4 蛋白的核心可能是由 3 个 α -螺旋和 N 端与 C 端环结构域组成。

腺病毒 E4orf4 蛋白是一种多功能调节蛋白质,具有多种调节功能,并能调控基因的各级表达。它的作用包括下调影响 Ad 复制的细胞基因和早期病毒基因的表达^[6-10]、调控病毒基因的可变剪切^[11, 12]、病毒和细胞蛋白质的磷酸化,以及通过与哺乳动物雷帕霉素受体 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路的相互作用调节蛋白质翻译^[13]。

1.2 E4orf4 蛋白的主要分子伴侣

1.2.1 蛋白磷酸酶 2A 蛋白磷酸酶 2 A 是由 PPP2CA 基因编码的蛋白磷酸酶。PP2A 存在于很多组织中,为异三聚体,属于丝氨酸/苏氨酸磷酸酶,具有广泛的底物特异性和多种细胞功能。PP2A 通常是由一个结构亚基 A、催化亚基 C 和一个调节亚基 B 组成^[14]。大量研究证明,所有 E4orf4 的已知功能都需 E4orf4 与 PP2A 结合发挥作用^[4, 15, 16]。例如, E4orf4 与 PP2A 结合,有助于 E4orf4 调节腺病毒 mRNA 的选择性剪接; E4orf4 需要通过其与 PP2A 的 B55 亚基的结合来激活 mTOR 通路,调节蛋白质翻译。同时, E4orf4 与 PP2A 的 B55/Cdc55 亚基结合,是其诱导细胞死亡功能的必要条件^[4, 15]。并且, E4orf4-PP2A 结合,将抑制 PP2A (B55) 活性,导致剂量依赖性细胞死亡^[17]。尽管有文献报道, E4orf4 在哺乳动物细胞中能够同时和 B55、B56 亚基结合^[18],但只有与 B55 亚基结合能使 E4orf4 具有诱导细胞死亡的功能^[19]。降低 PP2A 的 B55 亚基表达,将抑制 E4orf4 诱导的细胞死亡而不影响 P53 诱导的细胞死亡^[20],而过表达 PP2A 的 B55 亚基将增强 E4orf4 诱导的细胞死亡^[5, 19]。

1.2.2 Src 家族激酶 Src 家族激酶是一类非受体酪氨酸激酶。通过酪氨酸残基的磷酸化修饰蛋白质,可以与细胞溶质、细胞核和膜蛋白相互作用。E4orf4 通过其富含 Arg 基序的 ARM 结构域 (66 ~ 75) (Fig. 1) 与 SFKs 的激酶 SH2 或 SH3 结构域连接^[21, 22],调控细胞质死亡途径^[23, 24]。被 Src 家族激酶磷酸化的 E4orf4 在细胞质和细胞膜上聚集,诱导双核肌动蛋白-肌球蛋白网络的组装重塑,最后引起细胞膜起泡,导致细胞死亡。

E4orf4 诱导的肌动蛋白重塑主要依赖于涉及 Rho GTP 酶的两条途径。一条途径是 Src-Rho 激酶 (Rho-associated protein kinase, ROCK) 信号通路,激活 c-Jun 氨基末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase,

1 MVLPALPAPP VCDSQNECVG WLGVAYSAVV DVIRAAAH EG VYIEPEARGR
51 LDALREWIYY NYYTERSKRR DRRRRSVCHA RTWWFCFRKYD YVRRSIWHDT
101 TTNTISVVSA HSVQ

Fig. 1 PP2 A- and Src-binding sites in the Ad5 E4orf4 protein sequence The Ad5 E4orf4 protein sequence is shown above. The Src-binding domain of E4orf4 is underlined and the tyrosines that are phosphorylated by Src kinases are in a larger font. Sequences marked in light gray include: (1) mutations that reduced association of E4orf4 with phosphatase by at least two-fold and impaired E4orf4-induced cell death (2) mutations that reduced the E4orf4-PP2A interaction less than two-fold, but were deficient in induction of cell deaths

JNK)磷酸化桩蛋白。桩蛋白磷酸化导致粘附动力学失调,并扰乱细胞内张力稳态^[25, 26]。第二条途径涉及 Cdc42、N-Wasp 和 Arp2/3 复合体,并促进内膜上肌动蛋白聚合和再循环内体(recycling endosome, RE)的动力学改变^[26, 27]。这两条途径,通过肌动蛋白重塑发挥作用,共同介导 E4orf4 的促细胞死亡作用。

2 E4orf4 蛋白介导的细胞死亡

2.1 机制

当 E4orf4 脱离病毒环境单独表达时,E4orf4 能够诱导一种呈剂量依赖性^[28, 29]且不依赖 p53 通路^[1, 2, 30]的细胞死亡。不同于凋亡素在细胞核内发挥其细胞毒性作用,E4orf4 在细胞核和细胞质中均能诱导细胞死亡。E4orf4 先在细胞核内表达,然后在膜起泡早期迅速积聚在细胞质中。

一些学者认为,E4orf4 在细胞核中主要影响细胞的细胞周期,导致细胞死亡^[31]。首先,E4orf4 在细胞核中直接与蛋白磷酸酶 2 A PP2A 的 Bα/ B55/ Cdc55 亚基结合,这是 E4orf4 发挥作用的必须条件^[32]。E4orf4-PP2A 复合体通过影响细胞转录、翻译、剪切等各个过程,诱导细胞死亡。细胞核内 ATP 依赖性染色质重塑因子(chromatin remodeling factor, ACF)将 E4orf4-PP2A 复合体靶向到染色质,引起染色质重塑。同时,E4orf4-PP2A 靶向到 APC/ C,导致 PP2A 失活,细胞周期阻滞于 G₂/M 期,引起活性氧簇(reactive oxygen species, ROS)大量积累、细胞死亡^[17, 31]。Li 等^[28]发现,E4orf4 诱导的细胞停滞最终将由 G₂/M 期进入 G₁ 期,导致有丝分裂灾难(mitotic catastrophe),最终引起细胞死亡。Cabon 等^[33]补充道,这些细胞可能是由于细胞周期阻滞、二倍体和四倍体累积,无法启动 DNA 合成,最后导致细胞死亡。

而在细胞质中,E4orf4 被 Src 家族激酶磷酸化,磷酸化的 E4orf4 在细胞质中聚集,受 Src 家族激酶调控,在细胞质途径的细胞死亡中起关键作用。磷酸化的 E4orf4 与 Src 家族激酶结合,竞争性抑制依赖 Src 家族激酶的粘着斑激酶(focal adhesion kinase, FAK)和桩蛋白的磷酸化,引起胱天蛋白酶(caspase)依赖途径的改变,诱导粘着斑和肌动蛋白细胞骨架的组装重塑,最后引起细胞膜起泡,导致细胞死亡^[26]。此外,Gingras 等^[24]观察到,未磷酸化的 E4orf4 也能诱导细胞凋亡。这表明,可能还存在一种非 Src 家族激酶依赖性机制。最近,Avital-

Shacham 等^[34]报道了 NTPDASE4 的基因产物高尔基体尿苷二磷酸酶(Golgi UDPase)能与 E4orf4 相互作用。敲除 NTPDASE4 将抑制 E4orf4 诱导的细胞死亡,而 NTPDASE4 过度表达可增强 E4orf4 诱导的细胞杀伤作用。同时研究结果表明,部分 E4orf4-NTPDase4 通路可以与 PP2A 结合,这可能为 E4orf4 诱导的细胞死亡机制提供了一种新的可能(Fig. 2)。

2.2 E4orf4 对癌细胞的特异性杀伤

多年以前,人们就已发现,原癌基因的表达使原代细胞对腺病毒 E4orf4 蛋白的细胞杀伤作用变得敏感。在大鼠原代胚胎成纤维细胞中,将 E4orf4 与各种癌基因共转染时,E4orf4 诱导高水平的细胞死亡。而与空载体共转染时,不诱导高水平的细胞死亡。因此,Shtrichman 等^[20]认为,癌基因的表达使组织培养的原代细胞对 E4orf4 的杀伤作用敏感。同时,失去结合 PP2A 能力的突变型 E4orf4 蛋白,也丧失了杀死癌基因转化细胞的能力^[20]。Branton 等^[3]在一篇综述中报道,E4orf4 在 40 种人类癌细胞中诱导细胞死亡,但在不同组织来源的几种人类原代细胞中均不诱导细胞死亡。

对于 E4orf4 诱导癌细胞特异性死亡的机制,众多学者提出了不同的想法。有人提出,可能是癌基因激活了潜在的凋亡信号,这些凋亡信号的激活为癌细胞的细胞死亡提供了较低的激发阈值^[36]。也有报道认为,存在着“癌基因成瘾(oncogene addiction)”现象^[37]。因此,E4orf4 蛋白只诱导“成瘾癌细胞”的死亡,而不诱导正常人类细胞死亡。另有人认为,癌细胞的细胞周期检查点在一定程度上是有缺陷的^[38],且其对 E4orf4 更敏感。当癌细胞受到 E4orf4 外来压力时,细胞停止生长并且启动细胞凋亡机制自毁。Pechkovsky 等^[29]则在果蝇模型系统中发现,E4orf4 可以抑制胱天蛋白酶依赖性和胱天蛋白酶非依赖性途径的细胞死亡。因此,他们提出一种新的假说,认为 E4orf4 对癌细胞具有特异杀伤性的原因可能是,E4orf4 在正常细胞中抑制细胞死亡,而在癌细胞中不抑制细胞死亡^[39]。

Brestovitsky 等^[40]对 E4orf4 诱导的癌细胞特异性细胞死亡的机制又提出了一种新的可能,他们认为 E4orf4 对癌细胞的特异性杀伤与 DNA 损伤应答(DNA damage response, DDR)有关。DNA 损伤应答是一组用于检测 DNA 损伤,并向细胞周期检查点和修复细胞器发出信号的通路。它能使细胞周期暂停并修复损伤,如果损伤严重,则触发细胞凋亡或衰老。DDR 通路受磷脂酰肌醇 3-激酶样蛋白激酶家

族 (phosphatidylinositol 3-kinase-like protein kinase family) (包括共济失调毛细血管扩张突变 (ataxia-telangiectasia mutated, ATM) 和 ATM 相关酶 (ATM-and Rad3-related, ATR) 调控。为了防止激活 DDR 通路,许多 DNA 病毒演变出了新的防御机制。其中,腺病毒 E4orf4 蛋白可以与 PP2A 结合,降低病毒感染和 DNA 损伤药物处理的细胞内 ATM 和 ATR 的磷酸化,导致 DNA 损伤物质在细胞内的积累。Brestovitsky 等^[40]认为,因为许多癌症具有 DDR 缺陷,所以 E4orf4 可能通过抑制 DDR 而导致 DNA 的自我修复功能失调,触发细胞凋亡,增强腺病毒复制效率和 E4orf4 杀伤癌细胞的能力。

但最近, Sriskandarajah 等^[41]利用实时成像技术观察到, E4orf4 能够诱导有丝分裂过程产生缺陷,使其分裂过程减慢,出现延迟或者有丝分裂失败。这解释了 E4orf4 能够诱导癌细胞特异性的原因,也是 E4orf4 诱导的细胞死亡中 G₁ 四倍体积累的原因。

2.3 E4orf4 蛋白抗肿瘤免疫提呈反应

治疗肿瘤方法之一的化疗药物治疗常因肿瘤特异性较差,在杀伤癌细胞的同时损害正常细胞,可导致严重毒副作用。因此,很多研究致力于开发能精准靶向恶性细胞的新药物,如具有抗癌特性的病毒蛋白质。理想的新型抗癌药物最好是具备双重功能:既能有效地杀死癌细胞且不影响正常细胞,又能够激发宿主免疫系统对癌细胞的抗肿瘤免疫反应。

在病毒感染的后期,当病毒数量超过阈值时,为了避免宿主的免疫反应和炎症反应,更好地促进有效的病毒释放和扩散,一些带有特殊基因的病毒通过编码参与诱导细胞凋亡的特定蛋白质,直接或通过激活参与凋亡启动的传感器来诱导感染细胞凋亡,以达到扩散病毒的目的^[42]。

腺病毒 E4orf4 基因可以编码 E4orf4 蛋白,诱导非胱天蛋白酶依赖性途径的细胞死亡^[23, 30, 35, 43]。非胱天蛋白酶依赖性的细胞死亡和胱天蛋白酶依赖性等其它细胞死亡途径,存在着许多共同的信号通路,导致上游非胱天蛋白酶依赖性的细胞死亡与凋亡坏死等程序性细胞死亡程序 (programmed cell death, PCD) 发生交互作用。根据细胞类型的不同,通过不同的死亡途径 (凋亡或坏死) 杀死癌细胞^[35]。例如,在 293T 细胞中, E4orf4 激活死亡受体 Fas,通过衔接蛋白 FADD / MORT1 聚集胱天蛋白酶-8,形成死亡诱导信号复合体 (death-inducing signaling complex, DISC),转导下游信号导致凋亡级联反应^[35];在 C-33 A 细胞中, E4orf4 与 Src 家族激

酶结合,诱导肌动蛋白重塑聚合,在钙蛋白酶的作用下引起线粒体功能障碍、DNA 片段化,通过 BH3 (Bcl-2 homology domain 3) 蛋白引起 Bax (Bcl-2-associated protein X) 蛋白移位到线粒体外膜并多聚化,形成膜通道,刺激线粒体释放细胞色素 C,细胞色素 C 通过 Apaf-1 因子的多聚化与胱天蛋白酶-9 形成凋亡小体,导致下游胱天蛋白酶的级联反应。导致线粒体途径凋亡^[23];而在 H1299 细胞中, E4orf4 导致细胞周期停滞在 G₂/M 和 G₁ 期,二倍体和四倍体细胞大量积累, DNA 合成受限,导致具有坏死形态特征的细胞死亡^[33, 44]。

同时,这些凋亡坏死的癌细胞能够释放肿瘤相关抗原 (tumor-associated antigens, TAAs),激活树突状细胞 (dendritic cells, DCs) 并使 DCs 呈递肿瘤相关抗原,最终激活细胞毒性 T 淋巴细胞 (cytotoxic T lymphocytes, CTLs) 系统,激发宿主免疫系统对癌细胞的抗肿瘤免疫反应,增强 E4orf4 抗癌细胞特性 (Fig. 3)^[45, 46]。

3 E4orf4 蛋白在肿瘤治疗方面的应用

相当多的人类肿瘤都是 p53 基因缺陷的^[8]。因此, E4orf4 能够诱导非 p53 依赖性的癌细胞死亡,而不影响人类正常细胞。所以,利用 E4orf4 诱导的细胞死亡杀伤癌细胞具有可观的应用前景。近年来,一些学者对于利用 E4orf4 治疗癌症的可行性进行了一些初步的探索。

最初, Mitrus 等^[47]先利用 MTT 和 TUNEL 实验证实了 E4orf4 能在体外诱导 COS-7、Renca 和 B16 (F10) 等细胞的凋亡。然后,在小鼠皮下接种 B16 (F10) 黑素瘤细胞,将表达 E4orf4 的质粒 DNA 和对照质粒通过几次连续的电穿孔分别注入到小鼠肿瘤内。结果发现, E4orf4 治疗期间实验组肿瘤生长速度与对照组相比,有所减缓,但停止治疗后肿瘤恢复生长。

Zhou 等^[48]将 E4orf4 与表皮生长因子 (epidermal growth factor, EGF) 融合,期望通过 EGF 将抗癌蛋白 E4orf4 靶向到 EGF 受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 高表达的癌细胞。共聚焦显微镜分析显示, EGF-E4orf4 可以通过 EGFR 内化显著抑制 BGC823 细胞的增殖。在动物实验中,分别在小鼠皮下注射 MDA-MB-231 细胞和 BGC823 细胞,待肿瘤生长至直径 3 ~ 4 mm,继续监测肿瘤体积 30 ~ 35 d 后,腹膜内注射 EGF-E4orf4。结果证明, EGF-E4orf4 以剂量依赖性方式抑制肿瘤

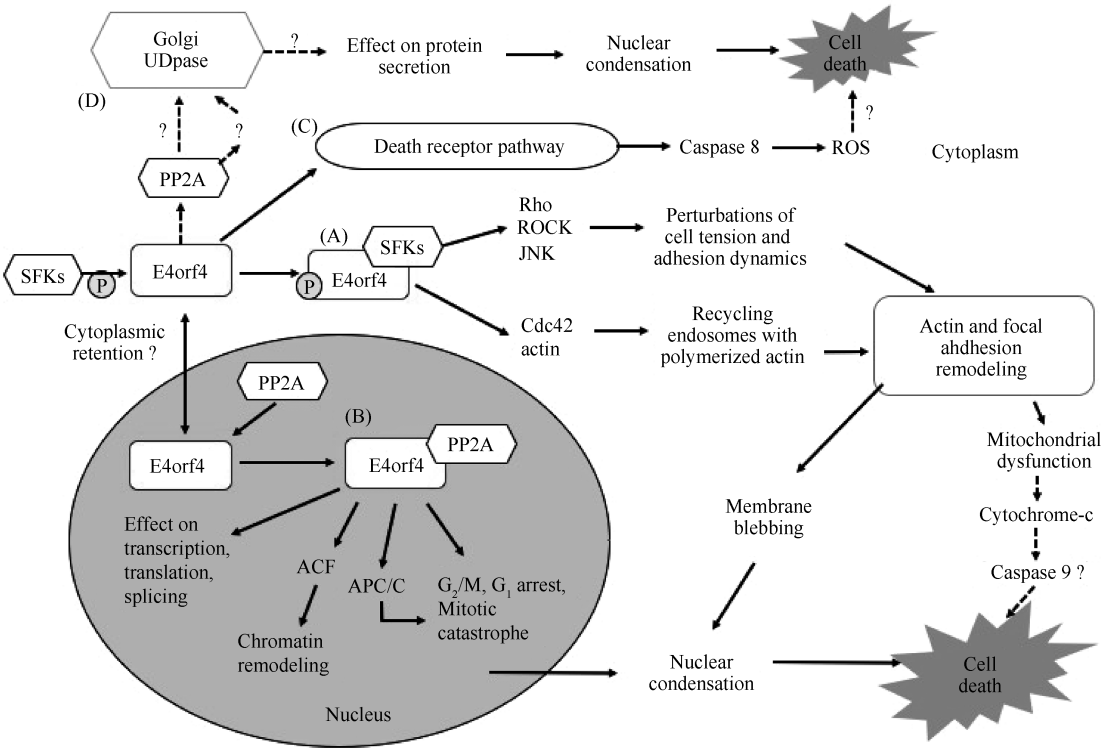


Fig. 2 A proposed model of E4orf4 (A) E4orf4 is phosphorylated by SFKs, which might contribute to its cytoplasmic accumulation. Phosphorylated E4orf4 associates with SFKs and this complex then causes phosphorylation of various cellular factors leading to remodeling of actin and focal adhesion molecules, resulting in CPE, membrane blebbing and finally cell deaths. It may also cause mitochondrial dysfunction, release of cytochrome c, caspase 9 and cell deaths; (B) In the nucleus, E4orf4 associates with PP2A and affects many critical processes such as transcription, splicing and translation. Also, it interacts with ACF to regulate chromatin remodeling and with APC to cause cell cycle arrest, mitotic catastrophe and finally cell deaths; (C) E4orf4 has also been reported to activate the death receptor pathway, though in a cell line-specific manner^[35]; (D) A recent study indicates that apart from SFKs, another cytoplasmic factor may also contribute to cell deaths. E4orf4 may interact with the Golgi UDPase and cause cell deaths through a pathway alternative to the E4orf4-Src pathway (discontinuous arrows indicate a possibility)

生长,对 MDA-MB-231 细胞生成的肿瘤体积产生 79% 的抑制,对 BGC823 细胞生成的肿瘤体积产生 49% 的抑制。并且小鼠在此期间体重未见减轻,肝和肾未见病理性改变。

第 3 种利用 E4orf4 杀伤细胞作用探索癌症治疗方法的研究,从犬腺病毒 E4orf4 蛋白提炼出位于 N 端 23 ~ 46 位的含有 PP2A 结合位点的短肽,将其与一种细胞穿透肽(DPT-sh1)结合,使其具有 α -螺旋结构并能够穿透细胞。结果表明,DPT-E4orf4 可以降低 5 种人类癌基因转化细胞的细胞存活率,但不影响人类未转化的成纤维细胞的存活。这项研究确定了 E4orf4 与 PP2A 的结合位点,以及 E4orf4-PP2A 复合物具有诱导肿瘤特异性细胞死亡的功能^[49]。

使用 E4orf4 治疗癌症的另一种尝试是将 E4orf4 基因连入溶瘤病毒载体中^[50, 51]。将表达单纯疱疹病毒胸苷激酶基因,并且 E1 缺失型的非复

制型腺病毒载体与仅表达 E4orf4 的 E4 缺失型腺病毒共转染,以便在病毒复制时产生反式互补病毒。用这种方法来实现复制能力能够降低病毒的危险性,提高一定的生物安全性。继而小鼠皮下接种人黑素瘤细胞,当肿瘤大小长至 400 mm³ 时,注射反式互补病毒,发现肿瘤消退,并且显著提高了中位生存期。

4 问题与展望

E4orf4 的研究在过去几年中有了显著的进展。例如,各项研究基本确定了 E4orf4 的 2 个主要分子伴侣(PP2A 和 SFKs)在 E4orf4 诱导细胞死亡中的作用。在凋亡进程中,由于 E4orf4 蛋白有一个富含精氨酸的核定位区域,因此优先聚集于细胞核中,与 PP2A 的 B α / B55/Cdc55 亚基结合,通过染色质重塑或有丝分裂灾难等方式导致细胞死亡。E4orf4 蛋白可以在胞质与胞核间穿梭,被 Src 磷酸化后则滞

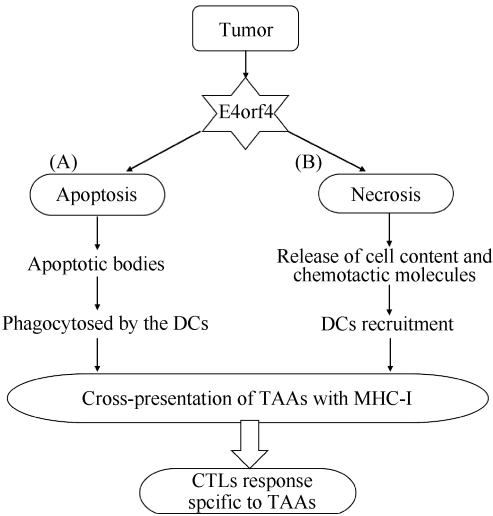


Fig.3 Antitumor immune response mechanisms (A) Apoptosis: apoptotic bodies are phagocytosed by the DCs, which present the TAA with MHC-I molecules resulting in the development of tumor antigen specific CTL responses; (B) Necrosis: dying cells release chemotactic factors, including HMGB-1, HSPs and uric acid, which attract the DCs. DCs in turn engulf the cells and after processing the TAA present the peptides with MHC-I molecules, thus generating tumor-specific CTLs

留在胞质^[45], E4orf4 蛋白与 Src 相互作用,诱导双核肌动蛋白-肌球蛋白网络的组装重塑,最后引起细胞膜起泡,导致细胞死亡。

但 E4orf4 作为一种新型抗癌药物,仍有许多问题有待进一步阐明。如 E4orf4 还存在着其他的分子伴侣,如 ACF、APC/C 和 Ynd1,他们在 E4orf4 诱导的癌细胞死亡中又起到什么样的作用? 近几年,我们逐渐了解了 E4orf4 通过 PP2A 和 Src 家族激酶途径诱导细胞死亡的下游通路,但整个 E4orf4 作用过程中仍存在许多尚不清楚的路径。比如, E4orf4-PP2A 复合物在染色质和 APC/C 中的直接靶点是什么? 它们如何影响 E4orf4 诱导的细胞死亡过程? E4orf4 通过 PP2A 和 Src 家族激酶诱导的细胞死亡之间有没有交错? 以及, E4orf4 在不同细胞系中诱导不同途径的细胞死亡的原因是什么? 这些问题都需要对 E4orf4 诱导细胞死亡的机制进行更深入的研究。对 E4orf4 诱导机制的不断深入理解,将促进其临床抗肿瘤应用的发展,为早日利用 E4orf4 治疗癌症奠定良好的基础。可望将 E4orf4 诱导肿瘤细胞死亡作为一种新的治疗肿瘤策略与其它肿瘤治疗手段相联用,针对不同的肿瘤,综合考虑,优化临床治疗方案,提高肿瘤治疗效果。

参考文献 (References)

[1] Shtrichman R, Kleinberger T. Adenovirus type 5 E4 open reading frame 4 protein induces apoptosis in transformed cells [J]. J Virol, 1998, **72** (4) :2975-2982

[2] Marcellus R C, Lavoie J N, Boivin D, *et al.* The early region 4 orf4 protein of human adenovirus type 5 induces p53-independent cell death by apoptosis [J]. J Virol, 1998, **72** (9) :7144-7153

[3] Branton P E, Roopchand D E. The role of adenovirus E4orf4 protein in viral replication and cell killing [J]. Oncogene, 2001, **20** (54) :7855-7865

[4] Marcellus R C, Chan H, Paquette D, *et al.* Induction of p53-independent apoptosis by the adenovirus E4orf4 protein requires binding to the Balph subunit of protein phosphatase 2A [J]. J Virol, 2000, **74** (17) :7869-7877

[5] Horowitz B, Sharf R, Avital-Shacham M, *et al.* Structure- and modeling-based identification of the adenovirus E4orf4 binding site in the protein phosphatase 2A B55alpha subunit [J]. J Biol Chem, 2013, **288** (19) :13718-13727

[6] Ben-Israel H, Sharf R, Rechavi G, *et al.* Adenovirus E4orf4 protein downregulates MYC expression through interaction with the PP2A-B55 subunit [J]. J Virol, 2008, **82** (19) :9381-9388

[7] Bondesson M, Ohman K, Manervik M, *et al.* Adenovirus E4 open reading frame 4 protein autoregulates E4 transcription by inhibiting E1A transactivation of the E4 promoter [J]. J Virol, 1996, **70** (6) :3844-3851

[8] Mannervik M, Fan S, Strom A C, *et al.* Adenovirus E4 open reading frame 4-induced dephosphorylation inhibits E1A activation of the E2 promoter and E2F-1-mediated transactivation independently of the retinoblastoma tumor suppressor protein [J]. Virology, 1999, **256** (2) :313-321

[9] Medghalchi S, Padmanabhan R, Ketner G. Early region 4 modulates adenovirus DNA replication by two genetically separable mechanisms [J]. Virology, 1997, **236** (1) :8-17

[10] Muller U, Kleinberger T, Shenk T. Adenovirus E4orf4 protein reduces phosphorylation of c-Fos and E1A proteins while simultaneously reducing the level of AP-1 [J]. J Virol, 1992, **66** (10) :5867-5878

[11] Estmer Nilsson C, Petersen-Mahrt S, Durot C, *et al.* The adenovirus E4-ORF4 splicing enhancer protein interacts with a subset of phosphorylated SR proteins [J]. EMBO J, 2001, **20** (4) :864-871

[12] Kanopka A, Muhlemann O, Petersen-Mahrt S, *et al.* Regulation of adenovirus alternative RNA splicing by dephosphorylation of SR proteins [J]. Nature, 1998, **393** (6681) :185-187

[13] O'Shea C, Klupsch K, Choi S, *et al.* Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication [J]. EMBO J, 2005, **24** (6) :1211-1221

[14] Haesen D, Sents W, Lemaire K, *et al.* The Basic Biology of PP2A in Hematologic Cells and Malignancies [J]. Front Oncol, 2014, **4** : 347

[15] Zhang Z, Mui M Z, Chan F, *et al.* Genetic analysis of B55alpha/Cdc55 protein phosphatase 2A subunits: association with the adenovirus E4orf4 protein [J]. J Virol, 2011, **85** (1) :286-295

[16] Sents W, Ivanova E, Lambrecht C, *et al.* The biogenesis of active protein phosphatase 2A holoenzymes: a tightly regulated process creating phosphatase specificity [J]. FEBS J, 2013, **280** (2) :644-661

[17] Mui M Z, Kucharski M, Miron M J, *et al.* Identification of the adenovirus E4orf4 protein binding site on the B55alpha and Cdc55 regulatory subunits of PP2A; Implications for PP2A function, tumor cell killing and viral replication [J]. PLoS Pathog, 2013, **9** (11) :e1003742

[18] Shtrichman R, Sharf R, Kleinberger T. Adenovirus E4orf4 protein interacts with both Balph and B' subunits of protein phosphatase 2A, but E4orf4-induced apoptosis is mediated only by the interaction with Balph [J]. Oncogene, 2000, **19** (33) :3757-3765

- [19] Roopchand D E, Lee J M, Shahinian S, *et al.* Toxicity of human adenovirus E4orf4 protein in *Saccharomyces cerevisiae* results from interactions with the Cdc55 regulatory B subunit of PP2A [J]. *Oncogene*, 2001, **20** (38) :5279-5290
- [20] Shtrichman R, Sharf R, Barr H, *et al.* Induction of apoptosis by adenovirus E4orf4 protein is specific to transformed cells and requires an interaction with protein phosphatase 2A [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1999, **96** (18) :10080-10085
- [21] Lavoie J N, Champagne C, Gingras M C, *et al.* Adenovirus E4 open reading frame 4-induced apoptosis involves dysregulation of Src family kinases [J]. *J Cell Biol*, 2000, **150** (5) :1037-1056
- [22] Champagne C, Landry M C, Gingras M C, *et al.* Activation of adenovirus type 2 early region 4 ORF4 cytoplasmic death function by direct binding to Src kinase domain [J]. *J Biol Chem*, 2004, **279** (24) :25905-25915
- [23] Robert A, Miron M J, Champagne C, *et al.* Distinct cell death pathways triggered by the adenovirus early region 4 ORF 4 protein [J]. *J Cell Biol*, 2002, **158** (3) :519-528
- [24] Gingras M C, Champagne C, Roy M, *et al.* Cytoplasmic death signal triggered by SRC-mediated phosphorylation of the adenovirus E4orf4 protein [J]. *Mol Cell Biol*, 2002, **22** (1) :41-56
- [25] Smadja-Lamere N, Boulanger M C, Champagne C, *et al.* JNK-mediated phosphorylation of paxillin in adhesion assembly and tension-induced cell death by the adenovirus death factor E4orf4 [J]. *J Biol Chem*, 2008, **283** (49) :34352-34364
- [26] Robert A, Smadja-Lamere N, Landry M C, *et al.* Adenovirus E4orf4 hijacks rho GTPase-dependent actin dynamics to kill cells; a role for endosome-associated actin assembly [J]. *Mol Biol Cell*, 2006, **17** (7) :3329-3344
- [27] Landry M C, Sicotte A, Champagne C, *et al.* Regulation of cell death by recycling endosomes and golgi membrane dynamics via a pathway involving Src-family kinases, Cdc42 and Rab11a [J]. *Mol Biol Cell*, 2009, **20** (18) :4091-4106
- [28] Li S, Brignole C, Marcellus R, *et al.* The adenovirus E4orf4 protein induces G2/M arrest and cell death by blocking protein phosphatase 2A activity regulated by the B55 subunit [J]. *J Virol*, 2009, **83** (17) :8340-8352
- [29] Pechkovsky A, Lahav M, Bitman E, *et al.* E4orf4 induces PP2A- and Src-dependent cell death in *Drosophila melanogaster* and at the same time inhibits classic apoptosis pathways [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2013, **110** (19) :E1724-1733
- [30] Lavoie J N, Nguyen M, Marcellus R C, *et al.* E4orf4, a novel adenovirus death factor that induces p53- independent apoptosis by a pathway that is not inhibited by zVAD-fmk [J]. *J Cell Biol*, 1998, **140** (3) :637-645
- [31] Kleinberger T. Mechanisms of cancer cell killing by the adenovirus E4orf4 protein [J]. *Viruses*, 2015, **7** (5) :2334-2357
- [32] Kleinberger T, Shenk T. Adenovirus E4orf4 protein binds to protein phosphatase 2A, and the complex down regulates E1A-enhanced junB transcription [J]. *J Virol*, 1993, **67** (12) :7556-7560
- [33] Cabon L, Sriskandarajah N, Mui M Z, *et al.* Adenovirus E4orf4 protein-induced death of p53 -/- H1299 human cancer cells follows a G1 arrest of both tetraploid and diploid cells due to a failure to initiate DNA synthesis [J]. *J Virol*, 2013, **87** (24) :13168-13178
- [34] Avital-Shacham M, Sharf R, Kleinberger T. NTPDASE4 gene products cooperate with the adenovirus E4orf4 protein through PP2A-dependent and -independent mechanisms and contribute to induction of cell death [J]. *J Virol*, 2014, **88** (11) :6318-6328
- [35] Livne A, Shtrichman R, Kleinberger T. Caspase activation by adenovirus e4orf4 protein is cell line specific and is mediated by the death receptor pathway [J]. *J Virol*, 2001, **75** (2) :789-798
- [36] Fearnhead H O, Rodriguez J, Govek E E, *et al.* Oncogene-dependent apoptosis is mediated by caspase-9 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998, **95** (23) :13664-13669
- [37] Weinstein I B, Joe A. Oncogene addiction [J]. *Cancer Res*, 2008, **68** (9) :3077-3080; discussion 3080
- [38] Williams G H, Stoerber K. The cell cycle and cancer [J]. *J Pathol*, 2012, **226** (2) :352-364
- [39] Pechkovsky A, Salzberg A, Kleinberger T. The adenovirus E4orf4 protein induces a unique mode of cell death while inhibiting classical apoptosis [J]. *Cell Cycle*, 2013, **12** (15) :2343-2344
- [40] Brestovitsky A, Nebenzahl-Sharon K, Kechker P, *et al.* The Adenovirus E4orf4 Protein Provides a Novel Mechanism for Inhibition of the DNA Damage Response [J]. *PLoS Pathog*, 2016, **12** (2) :e1005420
- [41] Sriskandarajah N, Blanchette P, Kucharski T J, *et al.* Analysis by live imaging of effects of the adenovirus E4orf4 protein on passage through mitosis of H1299 tumor cells [J]. *J Virol*, 2015, **89** (8) :4685-4689
- [42] Gupta S K, Gandham R K, Sahoo A P, *et al.* Viral genes as oncolytic agents for cancer therapy [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2015, **72** (6) :1073-1094
- [43] Marcellus R C, Teodoro J G, Wu T, *et al.* Adenovirus type 5 early region 4 is responsible for E1A-induced p53-independent apoptosis [J]. *J Virol*, 1996, **70** (9) :6207-6215
- [44] Li S, Szymborski A, Miron M J, *et al.* The adenovirus E4orf4 protein induces growth arrest and mitotic catastrophe in H1299 human lung carcinoma cells [J]. *Oncogene*, 2009, **28** (3) :390-400
- [45] Blachere N E, Darvell R B, Albert M L. Apoptotic cells deliver processed antigen to dendritic cells for cross-presentation [J]. *PLoS Biol*, 2005, **3** (6) :e185
- [46] Guernonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, *et al.* Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells [J]. *Annu Rev Immunol*, 2002, **20** :621-667
- [47] Mitrus I, Missol-Kolka E, Plucienniczak A, *et al.* Tumour therapy with genes encoding apoptin and E4orf4 [J]. *Anticancer Res*, 2005, **25** (2A) :1087-1090
- [48] Zhou Y, Chen H, Ma X L, *et al.* Fusion protein of adenovirus E4orf4 and human epidermal growth factor inhibits tumor cell growth [J]. *Int J Cancer*, 2009, **125** (5) :1186-1192
- [49] Galioot A, Godet A N, Maire V, *et al.* Transducing properties of a pre-structured alpha-helical DPT-peptide containing a short canine adenovirus type 2 E4orf4 PP2A1-binding sequence [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, **1830** (6) :3578-3583
- [50] Kleinberger T. Induction of cancer-specific cell death by the adenovirus E4orf4 protein [J]. *Adv Exp Med Biol*, 2014, **818** :61-97
- [51] Wolkersdorfer G W, Morris J C, Ehninger G, *et al.* Trans-complementing adenoviral vectors for oncolytic therapy of malignant melanoma [J]. *J Gene Med*, 2004, **6** (6) :652-662