

ТУДК 578.233.422

А. С. Полешко^{1,2}, Р. А. Катз², А. М. Скалка², А. Г. Покровский¹¹ Новосибирский государственный университет
ул. Пирогова, 2, Новосибирск, 630090, Россия² Онкологический центр Фокс Чейз (Fox Chase cancer center)
ул. Коттман, 333, Филадельфия, Пенсильвания, 19111, США
(333 Cottman Ave., Philadelphia, PA, 19111, USA)
E-mail: andrey.poleshko@gmail.com

МЕХАНИЗМЫ РЕТРОВИРУСНОГО ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОГО МОЛЧАНИЯ

Провирусная ДНК, интегрированная в геном клетки хозяина, является объектом для эпигенетической инактивации транскрипции, приводящей к отсутствию экспрессии как ретровирусных, так и терапевтических генов, кодируемых ретровирусными векторами. Возможные медиаторы такого молчания – семейство клеточных ферментов – гистоновых деацетилаз (HDAC). Ранее нами была получена субпопуляция клеток HeLa, несущих молчащий ретровирусный вектор, кодирующий ген зеленого флюоресцирующего белка (GFP). На основе методов РНК-интерференции мы разработали систему для идентификации специфических клеточных факторов, участвующих в эпигенетических процессах поддержания транскрипционного молчания. Результаты первичного исследования показали, что из всего семейства гистоновых деацетилаз только нокдаун деацетилазы 1 (HDAC1) приводит к специфической реактивации экспрессии репортерного GFP гена. Анализ различных векторных конструкций показал, что роль HDAC1 в обеспечении транскрипционного молчания ретровирусов независима от промотора, контролирующего репортерный ген. Кроме того, показано, что HDAC1 может являться частью клеточного антивирусного ответа. Экспрессия аденовирусного белка Gam1, известного антагониста HDAC1, приводит к реактивации экспрессии репортерного GFP гена.

В настоящем исследовании показана роль HDAC1 в поддержании эпигенетического молчания ретровирусов и участия ее в клеточном антивирусном ответе. Кроме того, результаты исследования предполагают, что малая интерферирующая РНК (миРНК) может быть использована в качестве агента для специфического нокдауна факторов, вовлеченных в процесс эпигенетического молчания, а также для создания новых скрининговых систем поиска неизвестных факторов, контролирующих эпигенетические процессы.

Ключевые слова: эпигенетическое молчание, ретровирус, РНК-интерференция, миРНК, гистоновые деацетилазы.

Эпигенетическим молчанием вирусной ДНК называют состояние интегрированного провируса, при котором наблюдается отсутствие транскрипционной активности вирусных генов, а также наследование такого состояния через многие циклы клеточного деления. Этот механизм можно рассматривать как активный ответ клетки на проникновение и интеграцию чужеродной ДНК [1; 2]. В то же время для ретровирусов эпигенетическое молчание может также являться преимуществом, давая возможность инфицированным клеткам избегать обнаружения организмом хозяина, за счет отсутствия вирусных антигенов на поверхности клетки [1]. Эпигенетическое молчание показано для многих ретровирусных систем,

в особенности, оно вносит вклад в постинтеграционное транскрипционное молчание, наблюдаемое при инфицировании вирусом иммунодефицита человека (ВИЧ).

Эпигенетическое молчание, как правило, наблюдается после трансфекции терапевтических или репортерных генов на основе ретровирусных конструкций и может сопровождаться их транскрипционной репрессией разной интенсивности [3; 4]. Различные параметры могут влиять на степень и частоту ретровирусного молчания. В число таких параметров входят: текущая стадия дифференцировки инфицированной клетки [3; 4], локализация сайта интеграции на хромосоме [5], структура ретровирусного репортерного гена [6], уровень экспрес-

сии различных клеточных факторов [7], а также наличие в ретровирусном векторе особых последовательностей, узнаваемых клеточными репрессорными комплексами [3; 4]. Биологические особенности нативного ретровируса, на основе которого была сделана конструкция, также как и дизайн вектора, могут сильно влиять на частоту возникновения эпигенетического транскрипционного молчания.

Эпигенетические процессы, участвующие в контроле ретровирусного молчания, в значительной степени перекрываются механизмами, регулируемыми экспрессию генов во время эмбрионального развития и клеточной дифференцировки [8]. Существует предположение, что система эпигенетического контроля изначально эволюционировала как защитный механизм для подавления мобильных генетических элементов [2]. Эпигенетическая регуляция опосредована двумя взаимодействующими системами: метилированием ДНК и посттрансляционной модификацией гистонов – клеточных белков, участвующих в упаковке молекул ДНК [8]. Комбинации различных модификаций гистонов представляют собой так называемый «гистонный код», который несет инструкции о транскрипционной активности гена и наследуется дочерними клетками после клеточного деления [9]. Данные посттрансляционные модификации включают в себя ацетилирование, метилирование, фосфорилирование, сумолирование и убикветинилирование и характерны для N-концевых аминокислотных остатков гистонов. Семейства хроматин-модифицирующих ферментов, а также ДНК метилтрансферазы – основные медиаторы эпигенетических процессов. Определение механизмов, объясняющих, каким образом эти ферментативные активности ориентированы на конкретные области хроматина, представляет значительный интерес. После того, как одним белковым комплексом сделана та или иная модификация, она может быть распознана другим комплексом, который, в свою очередь, будет либо способствовать, либо препятствовать экспрессии гена. Кроме того, наличие или отсутствие модификации может также влиять и на структуру гистонов, регулируя

доступность хроматина для транскрипционных факторов.

Из семейств ферментов, осуществляющих модификации гистонов, наиболее хорошо охарактеризованная пара – представители семейств гистоновых ацетилаз (НАТ), переносящих ацетильную группу на лизиновые аминокислотные остатки, и деацетилаз (HDAC), удаляющих данную модификацию. Наличие ацетилированных лизиновых остатков на N-концах гистонов характеризует транскрипционно-активные участки хроматина. Деацетилазы, в свою очередь, удаляют эти модификации и, в целом, представляют собой репрессоры транскрипции. Как правило, гистоновые ацетилтрансферазы и деацетилазы входят в состав больших коактиваторных и корепрессорных белковых комплексов соответственно [10].

Для процесса эпигенетического молчания характерно наличие нескольких стадий: инициация, поддержание молчания и реактивация транскрипции. Во время стадии инициализации эпигенетического молчания происходит изменение характера модификаций гистонов на заданном участке хроматина посредством привлеченных ферментов модификаторов. На стадии поддержания транскрипционного молчания существующие модификации гистонов сохраняются, а также возобновляются на новообразованном хроматине во время S-фазы клеточного цикла. Если же этап поддержания молчания прерван, то происходит реактивация транскрипционной активности гена. Например, активность представителей семейства гистоновых деацетилаз (классы 1 и 2) может быть заблокирована ингибиторами гистоновых деацетилаз (HDI). Обработка клеток млекопитающих ингибиторами гистоновых деацетилаз приводит к повсеместному ацетилированию гистонов и активации групп генов, для которых поддержание молчания происходит посредством белковых комплексов, включающих в себя гистоновые деацетилазы. Однако обработка ингибиторами гистоновых деацетилаз также может приводить и к репрессии специфических генов [11]. Показано, что большинство HDI имеют низкую специфичность для представителей классов 1 и 2 семейства гистоновых деацетилаз [11]. Тем не менее некоторые

ингибиторы имеют предпосылки для использования их в противоопухолевой терапии, поскольку могут применяться для реактивации транскрипции молчащих опухолевых супрессорных генов [11]. Кроме того, стратегия элиминирования клеток, несущих латентный вирус ВИЧ-1, может быть основана на способности ингибиторов гистоновых деацетилаз вызывать реактивацию транскрипции интегрированного провируса [12].

Стабильная клеточная линия HeLa поддерживает ранние этапы инфицирования для большого числа ретровирусных векторов. В настоящей работе использовался вектор на основе псевдотипированного вируса птичьей саркомы (ВПС), кодирующий репортерный ген – зеленый флюоресцирующий белок (GFP), экспрессия которого служила маркером для мониторинга ранних этапов инфицирования HeLa клеток. Поскольку распространение вируса ограничено в данной системе [13], экспрессия GFP возможна только в изначально инфицированных клетках. Используя данную систему, было обнаружено, что интегрированные репортерные гены GFP под контролем различных промоторов представляют собой потенциальный объект для эпигенетической репрессии [14]. Кроме того, молчащий репортерный ген GFP может быть активирован посредством обработки клеток ингибитором гистоновых деацетилаз – трихостатином А (TSA). Многоступенчатая стратегия сортировки HeLa клеток позволила нам получить популяцию клеток, несущих TSA-индуцируемый репортерный ген GFP в составе молчащего ретровирусного вектора [14]. Данная клеточная линия поддерживает свой GFP-негативный фенотип на протяжении многих пассажей, но способна приобретать GFP-положительный фенотип после обработки ингибиторами гистоновых деацетилаз и активации GFP гена.

Предыдущие исследования показали практическую возможность использования данной клеточной линии в скрининговых исследованиях, направленных на обнаружение различных клеточных факторов, участвующих в процессе поддержания ретровирусного эпигенетического молчания. Наш подход заключался в использовании малых интерферирующих РНК (миРНК) для нок-

дауна клеточных белков, потенциально способных участвовать в реализации эпигенетического молчания, и последующего измерения уровня реактивации репортерного гена GFP. Полученные нами данные показывают, что среди всего исследованного семейства клеточных гистоновых деацетилаз только нокдаун гистоновой деацетилазы 1 (HDAC1) приводит к значимой реактивации ретровирусного репортерного гена. Экспрессия в клетках вирусного белка Gam1, являющегося специфическим ингибитором HDAC1, также приводит к реактивации экспрессии репортерного гена GFP, что подтверждает результаты, полученные с использованием миРНК. Полученные данные также указывают на возможность использования метода скрининга на основе миРНК для поиска клеточных факторов, вовлеченных в процесс поддержания эпигенетического ретровирусного молчания.

Материал и методы

Культивирование клеток, сортировка и инфицирование. Популяция HeLa клеток, несущих молчащий ретровирусный репортерный ген, описана ранее [14].

Для создания клеточной линии с молчащим репортерным геном была использована стратегия многоступенчатой сортировки клеток. Клеточная линия HeLa была инфицирована вектором на основе вируса саркомы птиц, несущим репортерный ген зеленого флюоресцирующего белка (GFP). Инфицирование производилось при помощи инкубации клеток с вирусом в присутствии 10 мкг/мл DEAE-декстрана. В качестве вирус-продуцирующих клеток использовалась культура фибробластов куриного эмбриона DF1. Количество вируса, используемого для инфицирования клеточной популяции и дальнейшей сортировки, выбиралось с тем условием, чтобы уровень GFP-положительных клеток после инфицирования был не более 10–15 % с целью иметь не более одной копии интегрированного провируса на клетку. Определение количества GFP-положительных клеток проводилось через 48 ч после инфицирования методом проточной цитофлюорометрии [14].

После инфицирования были отсортированы клетки, обладающие GFP-негативным

фенотипом. Полученная популяция содержала неинфицированные клетки и клетки с молчащим репортерным GFP геном. Затем клетки инкубировались с 0,5 мМ трихостатином А (TSA) в течение 24 ч для реактивации молчащего гена GFP. Через 48 ч после начала обработки были отсортированы клетки, обладающие GFP-положительным фенотипом. Полученная популяция была пассирована в течение 10 дней, в ходе которых в большей части клеток произошло восстановление эпигенетической репрессии ретровирусного вектора или репортерного GFP гена. Затем, были снова отсортированы клетки, обладающие GFP-негативным фенотипом. После описанных трех этапов сортировки получена субпопуляция клеток HeLa, названная трихостатин А индуцируемой (ТИ), несущей интегрированный транскрипционно-молчащий репортерный GFP ген. Данная стратегия применена для создания субпопуляции HeLa клеток с репортерным GFP геном под контролем различных промоторов: hCMV (ТИ-С), нативного ретровирусного ASV LTR (ТИ-L), а также клеточного промотора EF1 α (ТИ-E) [14].

Анализ экспрессии белка GFP в клетках HeLa in vivo. Измерение уровня экспрессии GFP проводилось на проточном цитофлуориметре Becton Dickinson FACScan. Данные обрабатывались при помощи программы FlowJo («Tree Star Inc.», США).

Вестерн блот был сделан с применением стандартных методик описанных ранее [7]. Используются антитела против гистона H3 (ab7312, Abcam, США) и против ацетилированного гистона H4 (06-866, Upstate, США). В качестве вторичных антител применены антитела против иммуноглобулинов G кролика, конъюгированные с пероксидазой (31462, Pierce, США), а также хемилюминесцентный реагент (34080, Pierce, США).

В работе использованы *miRNA*: HDAC1 SMARTpool (M-003493-02), RISC+ control #1 (D-001210-01), RISC-free control #1 (D-001220-01), GAPDH duplex (D-001140-01) (Dharmacon, США), и HDAC1 (SI02663472), HDAC2, HDAC3 (SI00057-316), HDAC4 (SI02636536), HDAC5 (SI000-77735), HDAC6 (SI02663808), HDAC7A (SI00110845), HDAC8 (SI00122066), HDAC10 (SI00141736), HDAC11 (SI00137459) (QIA-

GEN, США). В качестве трансфекционного реагента применен реагент DharmaFECT 1 (Dharmacon, США). Трансфекция клеток проводилась согласно протоколу компании-производителя.

ПЦР в реальном времени. Суммарная клеточная РНК выделялась при помощи набора RNAqueous Kit (Ambion, США). Концентрация РНК измерялась при помощи Aligent 2100 BioAnalyzer в комбинации с RNA 6000 Nano LabChip. Реакция обратной транскрипции (ОТ) проводилась при помощи рекомбинантной обратной транскриптазы вируса мышиной лейкемии Молони (Ambion, США) и олиго dT праймеров. ПЦР в реальном времени проводилась на инструменте ABI 7900 HT. Праймеры и зонды сконструированы с использованием программы Primer Express version 1.5 (Applied Biosystems, США). ПЦР с использованием пары праймеров – прямой 5'-CCCAGTCCGCCCTGAG, обратный 5'-ACGAACTCCAGCAGGACCA, а также зонда 5'-(6FAM)CCCCAACGAGAAGCGCGATCA (BHQ1) проводилась в следующих условиях: денатурацию ДНК проводили в течение 15 мин при 95 °С, затем следовало 40 циклов (15 с при 95 °С, 60 с при 60 °С). Для количественного определения изменения уровня экспрессии был использован метод определения по пороговому циклу ($2^{-\Delta\Delta C^T}$, где C^T – пороговый цикл). Нормализация образцов проводилась по отношению к количеству мРНК гена PolR2F. Для каждого образца было подсчитано среднее значение и стандартное отклонение двух ПЦР с загрузкой разного количества кДНК, полученной в ходе реакций ОТ, при загрузке исходной тотальной РНК в количестве 100 и 20 нг.

Трансфекция клеток HeLa плазмидной ДНК. Плазмидные вектора для экспрессии нативного белка Gam-1 (Gam-1 wt) и его мутанта (Gam-1 mt) были любезно предоставлены Сьюзен Чиоккой. Трансфекция проводилась при помощи трансфекционного реагента Lipofectamine 2000 (Invitrogen, США) согласно протоколу изготовителя.

Результаты исследования и обсуждение

Ранее нами была получена популяция HeLa клеток, несущих молчащий ретровирусный репортерный ген GFP, который мо-

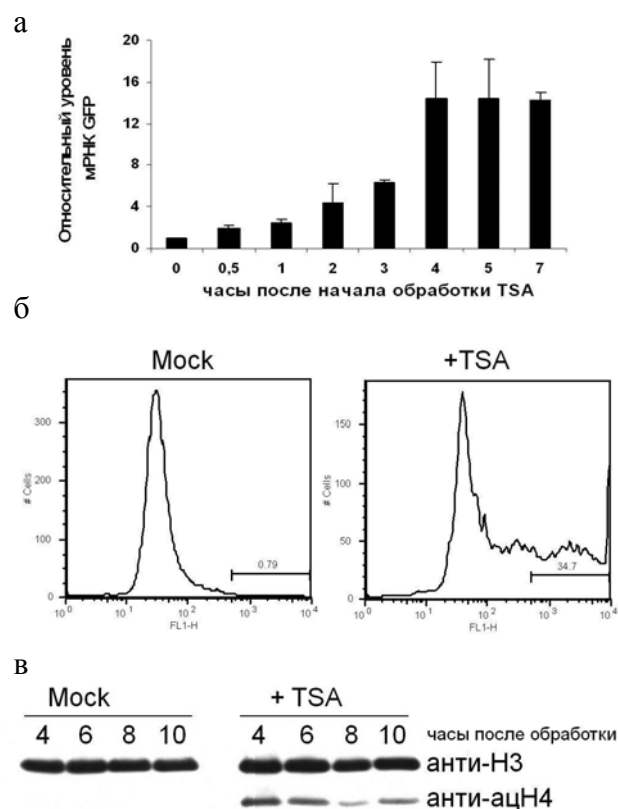


Рис. 1. Обработка клеток ингибитором гистоновых деацетилаз (трихостатином А) приводит к специфической реактивации экспрессии молчащего репортерного гена GFP:

а – относительный уровень мРНК гена GFP, результаты реакции ПЦР в реальном времени; *б* – оценка реактивации экспрессии молчащего репортерного гена GFP *in vivo* методом проточной цитофлуорометрии (показаны гистограммы интенсивности GFP-сигнала до обработки трихостатином А и через 48 ч после начала обработки); *в* – анализ количества ацетилированного гистона Н4 после обработки трихостатином А методом вестерн блоттинга, в качестве контроля нанесения использовалось суммарное количество гистона Н3

жет быть реактивирован при помощи различных ингибиторов гистоновых деацетилаз, в том числе TSA [14]. Мы обозначили эту клеточную линию как ТИ (трихостатин индуцируемая), кроме того были созданы конструкции с репортерным геном GFP под контролем промотора человеческого цитомегаловируса hCMV (ТИ-С), нативного вирусного ASV LTR (ТИ-L) промотора, а также клеточного EF1 α промотора (ТИ-Е) [14]. Известно, что ингибиторы гистоновых деацетилаз приводят к ацетилированию гистонов, вследствие чего активируется большое число генов. Для подтверждения того, что ингибирование гистоновых деацетилаз посредством обработки клеток TSA имеет прямой эффект на реактивацию экспрессии репортерного GFP гена, а не вторичный, опосредованный активацией других генов, регулирующих эпигенетические процессы, мы определяли изменение уровня мРНК гена GFP в HeLa клетках после обработки

трихостатином А с помощью реакции ПЦР в реальном времени. Уже через 30 мин после начала обработки ингибитором гистоновых деацетилаз происходит значительное увеличение уровня мРНК репортерного гена, что подтверждает участие гистоновых деацетилаз в процессе поддержания ретровирусного эпигенетического молчания (рис. 1, *а*). Также при помощи метода вестерн блот измеряли уровень ацетилирования гистона Н4 в разные промежутки времени после начала обработки клеток. Показано значительное увеличение количества ацетилированного гистона Н4 уже после 4 ч с момента добавления к HeLa клеткам TSA (рис. 1, *в*). После 48 часов с начала обработки мы измерили количество GFP-положительных клеток (рис. 1, *б*), в которых произошла реактивация экспрессии молчащего ретровируса и аккумуляция белка GFP до уровня, достаточного для детекции. Полученные данные подтверждают прямое участие предста-

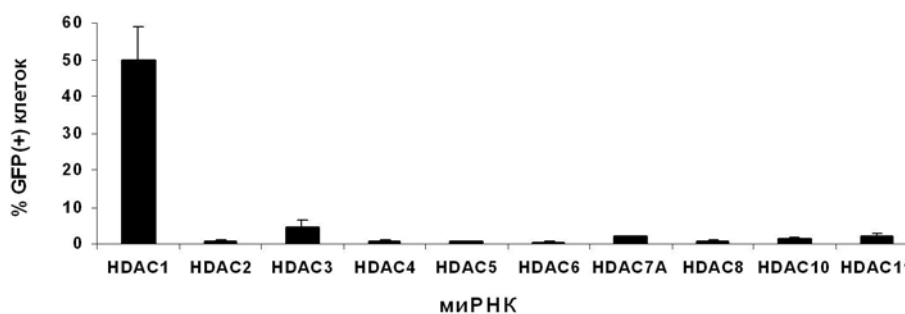


Рис. 2. Нокдаун гистоновой деацетилазы 1 приводит к реактивации молчащего ретровирусного репортерного гена GFP. Клеточная популяция HeLa ТИ-С была трансфицирована различными типами миРНК. Спустя 96 ч после начала трансфекции количество GFP-положительных клеток измерено с помощью проточной цитофлуориметрии

вителей семейства гистоновых деацетилаз в процессе поддержания эпигенетического молчания ретровирусов.

Ввиду того, что трихостатин А имеет широкий спектр ингибирования гистоновых деацетилаз 1 и 2 классов, мы использовали методы, основанные на РНК-интерференции, для специфического нокдауна различных представителей семейства гистоновых деацетилаз, так как нокдаун специфического фактора, вовлеченного в процесс поддержания эпигенетического молчания, с помощью малой интерферирующей РНК (миРНК), может повторять эффект ингибиторов. HeLa ТИ-С клетки были трансфицированы миРНК, специфической для представителей семейства гистоновых деацетилаз, в количестве 50 нМ. Только трансфекция клеток миРНК специфичной для гистоновой деацетилазы 1 (HDAC1) приводила к значительной реактивации экспрессии молчащего репортерного гена GFP, в то время как нокдаун других гистоновых деацетилаз не приводил к значимому эффекту (рис. 2). Ранее нами было показано, что после обработки ингибиторами гистоновых деацетилаз уровень реактивации репортерного GFP гена в HeLa ТИ клетках зависит от сайта интеграции, а также фазы клеточного цикла [14]. Мы предполагаем, что этот феномен способствует неполной реактивации (менее 100 %) наблюдаемой при нокдауне HDAC1.

Было показано, что введение миРНК в клетки может приводить не только к снижению уровня мРНК гена мишени, но и десятков других генов, имеющих схожие нуклеотидные последовательности, которые гомологичны данной миРНК. Кроме того,

трансфекция клеток может вызывать клеточный стресс, который в свою очередь приводит к неспецифической реактивации репортерного гена. Нами протестирована миРНК (Dharmacon, США), не имеющая гомологии с последовательностями клеточных мРНК, кроме того, несущая химические модификации, препятствующие ее взаимодействию с RISC комплексом, осуществляющим деградацию соответствующей мРНК. Данная миРНК использовалась в качестве контроля клеточного ответа на введение в клетку чужеродной РНК (RISC-контроль). Дополнительная контрольная миРНК, также не имеющая гомологий с последовательностями клеточных мРНК, однако способная взаимодействовать с RISC комплексом, служила контролем наличия потенциальной неспецифической реактивации экспрессии молчащего ретровируса (RISC+ контроль). Трансфекция HeLa ТИ-С клеток, несущих молчащий репортерный ген, контрольной миРНКой (RISC- и GAPDH) не вела к значимой реактивации экспрессии GFP (рис. 3, в). Также трансфекция RISC+ миРНК приводила лишь к незначительному повышению уровня GFP-положительных клеток. Данные результаты наглядно демонстрируют отсутствие неспецифической реактивации при трансфекции миРНК и в целом подтверждают возможность применения данного подхода для поиска факторов, участвующих в поддержании эпигенетического ретровирусного молчания.

В экспериментах, описанных ранее, молчащий TSA-чувствительный репортерный ген GFP был под контролем промотора hCMV. Для того чтобы определить, зависят ли

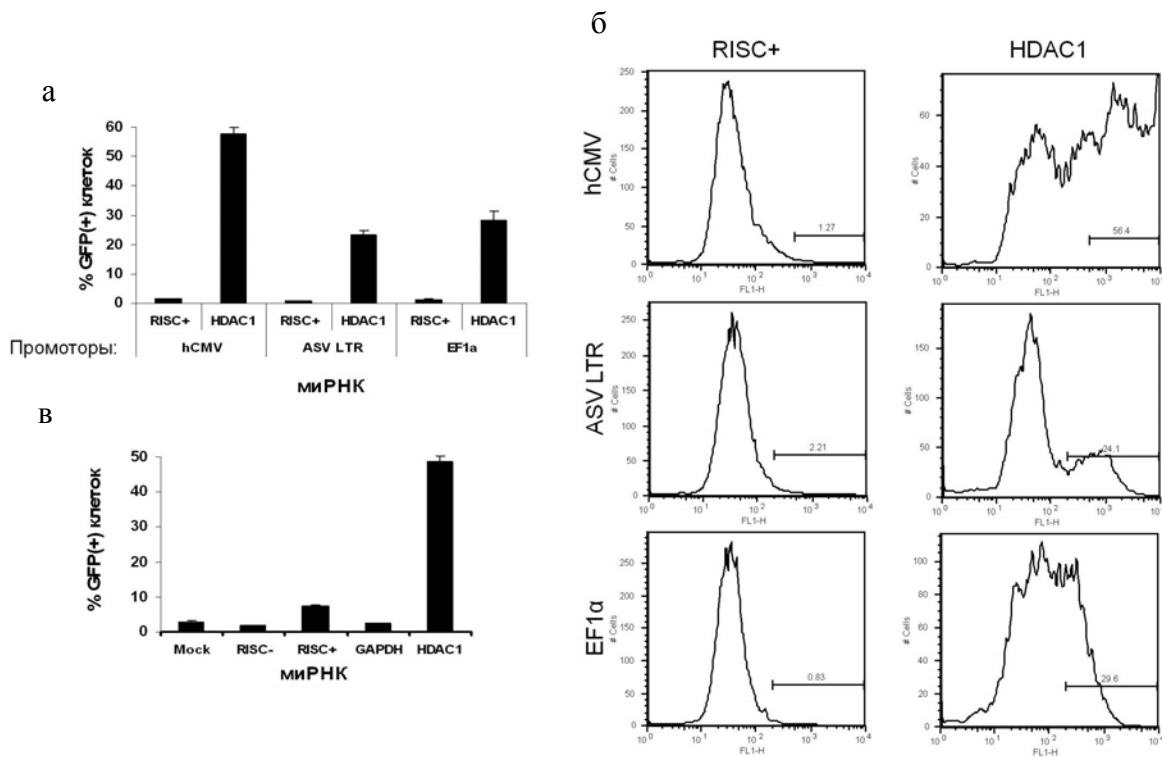


Рис. 3. Анализ популяции HeLa TI клеток, несущих молчащий репортерный ген GFP под контролем различных промоторов:

а – анализ количества GFP-положительных клеток после трансфекции клеточных линий контрольной миРНК (RISC+) и миРНК специфичной для гистоновой деацетилазы 1 (HDAC1) проводился методом проточной цитофлуориметрии; *б* – гистограммы интенсивности GFP-сигнала из эксперимента на панели А; *в* – отсутствие неспецифического клеточного ответа после трансфекции HeLa TI-С клеток различной контрольной миРНК RISC-, RISC+ и GAPDH

полученные результаты от типа промотора, мы протестировали другие клеточные популяции с ретровирусными векторами, в которых молчащий GFP ген был под контролем нативного ретровирусного ASV LTR промотора (ТИ-L) и клеточного промотора EF1α (ТИ-E). Клеточные линии HeLa TI с различными ретровирусными векторами были трансфицированы миРНК, контрольной миРНК и миРНК против HDAC1. Во всех случаях нокдаун HDAC1 приводил к значительной реактивации экспрессии ретровирусного репортерного гена GFP, что подтверждает участие HDAC1 в поддержании ретровирусного молчания независимо от промотора, непосредственно контролирующего репортерный ген (рис. 3, *а*). Разница в количестве GFP-положительных клеток в разных клеточных линиях может быть объяснена тем, что LTR и EF1α обладают меньшей транскрипционной активностью в отличие от промотора hCMV (см. рис. 3, *б*).

Известно несколько вирусных белков, которые связывают и ингибируют гистон-

вые деацетилазы [15]. Эти белки могут действовать как защитники вирусного генома от репрессии гистоновыми деацетилазами, потенциально участвующими в клеточном антивирусном ответе. Ранее было показано, что белок птичьего аденовируса Gam1 ингибирует человеческий HDAC1 [15]. Наличие экспрессии данного белка в клетках предполагает возникновение эффектов, схожих с таковыми в случае воздействия ингибиторов гистоновых деацетилаз, а также препятствие эпигенетическим механизмам репрессии транскрипции вирусного генома.

Трансфекция HeLa TI-С клеток плазмидой, кодирующей белок Gam1 дикого типа, приводила к значительной реактивации экспрессии молчащего ретровирусного репортерного гена GFP (рис. 4, *а*), в то время как трансфекция плазмидой, кодирующей мутантную форму белка, обладающего меньшей ингибирующей активностью по отношению к HDAC1, приводила лишь к незначительному эффекту (рис. 4, *б*).

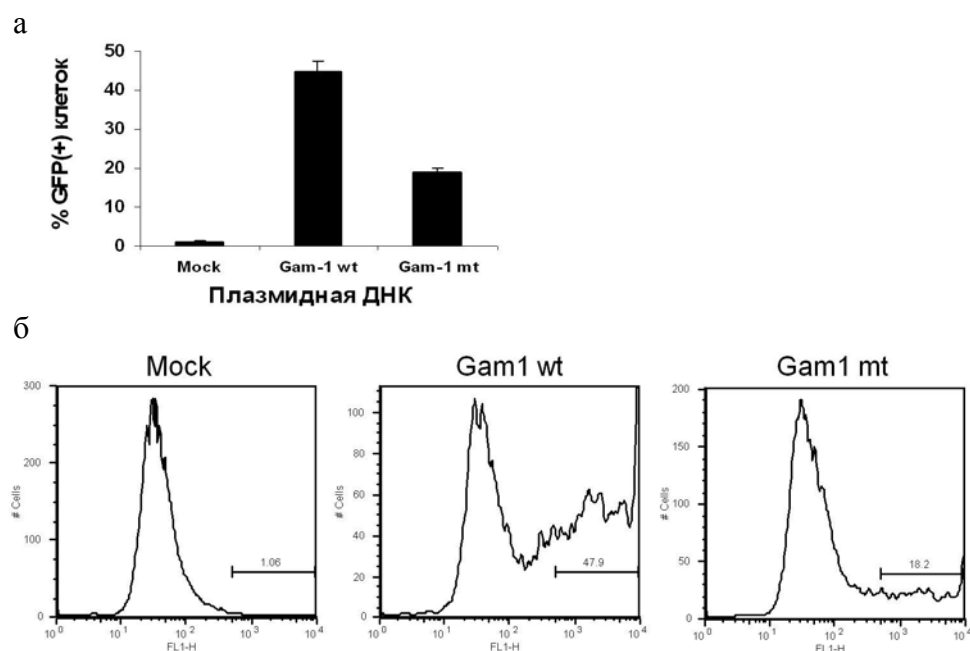


Рис. 4. Реактивация молчащего гена GFP после трансфекции вектором, несущим белок аденовируса птиц Gam1, антагонист HDAC1:

a – количество GFP-положительных клеток после трансфекции клеточной линии HeLa ТИ-С плазмидной ДНК, кодирующей дикий тип белка Gam1 wt и его мутантную форму Gam1 mt; анализ проводился методом проточной цитофлуорометрии через 48 ч после трансфекции; *б* – гистограммы интенсивности GFP-сигнала из эксперимента на панели А

Таким образом, поскольку экспрессия белка Gam1 оказалась подобна эффекту обработки клеток HeLa миРНК против HDAC1, данные результаты независимо подтверждают, что ингибирование HDAC1 достаточно для реактивации экспрессии молчащего ретровируса, а также демонстрируют исключительную роль HDAC1 в реализации клеточного антивирусного ответа.

Заключение

Показано, что полученная клеточная линия HeLa ТИ может использоваться для изучения механизмов поддержания эпигенетического молчания ретровирусов, в том числе с применением методов РНК-интерференции. Кроме того, нами обнаружено, что из всего семейства гистоновых деацетилаз только деацетилаза 1 участвует в поддержании эпигенетического молчания ретровирусов, а также продемонстрировано участие гитоновой деацетилазы 1 в реализации клеточного антивирусного ответа.

Список литературы

1. Mok H. P., Lever A. M. Chromatin, gene silencing and HIV latency // *Genome Biology*. 2007. Vol. 8, № 228.

2. Yoder J. A. et al. Cytosine methylation and ecology of intragenomic parasites // J. A. Yoder, C. P. Walsh, T. H. Bestor // *Trends in Genetics*. 1997. № 3. P. 335–340

3. Ellis J. Silencing and variegation of gammaretroviruses and lentivirus vectors // *Human Gene Therapy*. 2005. № 16. P. 1241–1246.

4. Swindle C. S., Klug C. A. Mechanisms that regulate silencing of gene expression from retroviral vectors // *J. Hematother. Stem Cell Research*. 2002. Vol. 11. P. 449–456.

5. *Genome-wide analysis of chromosomal features repressing human immunodeficiency virus transcription* / M. K. Lewinski, D. Bisgrove, P. Shinn et al. // *J. Virol*. 2005. Vol. 79. P. 6610–6619.

6. *eGFP reporter genes silence LCRbeta-globin transgene expression via CpG dinucleotides* / B. Dalle, J. E. Rubin, O. Alkan et al. // *Mol. Ther*. 2005. Vol. 11. P. 591–599.

7. *The cellular protein Daxx interacts with avian sarcoma virus integrase and viral DNA to repress viral transcription* / J. G. Greger, R. A. Katz, A. M. Ishov et al. // *J. Virol*. 2005. Vol. 79. P. 4610–4618.

8. Jaenisch R., Bird A. Epigenetic regulation of gene expression: how the genome inte-

grates intrinsic and environmental signals // *Nature Genetics*. 2003. Vol. 33. P. 245–254.

9. Kouzarides T. Chromatin modifications and their function // *Cell*. 2007. Vol. 128. P. 693–705.

10. Ruthenberg A. J. et al. Methylation of lysine 4 on Histone H3: intricacy of writing and reading a single epigenetic mark / A. J. Ruthenberg, C. D. Allis, J. Wysocka // *Molecular Cell*. 2007. Vol. 25. P. 15–30.

11. Bolden J. E. et al. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors / J. E. Bolden, M. J. Peart, R. W. Johnstone // *Nature Review Drug Discovery*. 2006. Vol. 5. P. 769–784.

12. Depletion of latent HIV-1 infection in vivo: a proof-of-concept study / G. Lehrman, I. B. Hogue, S. Palmer et al. // *Lancet*. 2005. Vol. 366. P. 549–555.

13. Barsov E. V., Hughes S. H. Gene transfer into mammalian cells by a Rous sarcoma virus-based retroviral vector with the host range of the amphotropic murine leukemia virus // *J. Virol*. 1996. Vol. 70. P. 3922–3929.

14. High-frequency epigenetic repression and silencing of retroviruses can be antagonized by histone deacetylase inhibitors and transcriptional activators, but uniform reactivation in cell clones is restricted by additional mechanisms / R. A. Katz, E. Jack-Scott, A. Narezkina et al. // *J. Virol*. 2007. Vol. 81. P. 2592–2604.

15. Histone deacetylase 1 inactivation by an adenovirus early gene product / S. Chiocca, V. Kurtev, R. Colombo et al. // *Current Biology*. 2002. Vol. 12. P. 594–598.

Материал поступил в редколлегию 02.03.2008

A. S. Poleshko, R. A. Katz, A. M. Skalka, A. G. Pokrovsky

Mechanisms of Retroviral Epigenetic Silencing

Retroviral DNA integrated in a cell host genome is subject to epigenetic gene silencing, resulting in loss of expression of viral genes as well as therapeutic genes encoded by retroviral vectors. Possible mediators of such silencing include the histone deacetylase (HDAC) family of cellular proteins. We previously isolated HeLa cell populations that harbored silent retrovirus-based vectors coding green fluorescent protein (GFP) that could be reactivated by treatment with HDAC inhibitors. Here, we developed a system based on RNA-interference methods to identify specific host factors that participate in the maintenance of transcriptional silencing. Results of preliminary experiments showed that knockdown of HDAC1, but not other HDACs, resulted in robust and specific GFP reporter gene reactivation. Analyses of diverse GFP vector constructs revealed that the role of HDAC1 in retroviral silencing is independent of the promoter controlling the silent GFP reporter gene. Furthermore, we showed that HDAC1 protein may act as part of cellular antiviral response. Expression of adenoviral protein Gam1, known «countermeasure» of HDAC1, resulted in the reactivation of GFP reporter gene expression.

This study has identified role for HDAC1 in maintenance of retroviral silencing and in cellular antiviral response. Moreover, our results indicate that siRNAs can be used as specific reagents to interrupt the maintenance of epigenetic silencing, and development of high-throughput screening systems for identifying new epigenetics factors.

Keywords: epigenetic silencing, retrovirus, RNA-interference, siRNA, histone deacetylases.