

Úloha de novo DNA metyltransferáz v transkripčnom umlčovaní retrovírusov a retrovírusových vektorov odvodených od vtáčieho sarkómového a leukózového vírusu

Abstrakt

Retrovírusové vektory odvodené od vtáčieho sarkómového a leukózového vírusu (ASLV) sa účinne replikujú vo vtáčích bunkách, ale k ich replikácii v cicavčích bunkách nedochádza. Integrácia vektorov odvodených od ASLV je nenáhodná, s nízkou preferenciou integrácie do oblastí bohatých na gény, transkripčných štartov, či CpG ostrovov. Okrem toho majú slabú preferenciu integrácie do blízkosti génov podporujúcich vznik tumorov. Preto vektory odvodené od ASLV sú pomerne bezpečné a výhodné pre použitie v génovej terapii a vakcinácii. Jednou z prekážok použitia vektorov odvodených od ASLV v génovej terapii je transkripčné umlčanie integrovaných provírusov. Postupné umlčanie vektoru veľmi úzko súvisí s epigenetickými zmenami vrámci dlhých repetitívnych sekvencií (LTR). V oblasti promotorov integrovaných provírusov bola detekovaná bohatá metylácia CpG dinukleotidov a histónové modifikácie, ktoré vedú k umlčaniu vektoru. Cieľom tejto diplomovej práce bolo zistiť vplyv de novo DNA metyltransferáz v transkripčnom umlčaní ASLV provírusov v kuracích a ľudských bunkách. V prvom rade sme chceli zistiť, či cicavčia DNMT3a ako holoenzým je schopná rozpoznať integrovaný vtáčí provírus a umlčať ho. Pre tento cieľ sme využili bunkovú líniu DF-1, v ktorej prostredníctvom zavedeného cicavčieho inducibilného systému dochádzalo k zvýšenej expresii cicavčej DNMT3a. Okrem metyltransferázy DNMT3a sme sa zaoberali vplyvom de novo DNMT3b na umlčovanie vektorov odvodených od ASLV. K tomu sme využili HCT116 bunkovú líniu divokého kmeňa a líniu deficientnú na DNMT3b, ktoré sú odvodené od ľudského kolorektálneho karcinómu. Pre zistenie stability a mechanizmu umlčania boli klony s umlčanými provírusmi reaktivované 5-aza-cytidínom (5-azaC) a trichostatinom A (TSA). Metylačný stav LTR sekvencií umlčaných provírusov bol analyzovaný bisulfitovou konverziou a sekvenáciou. Naše výsledky naznačujú že myšacia DNMT3a exprimovaná v kuracích bunkách línie DF-1 nie je schopná rozpoznať integrované provírusy a umlčať ich metyláciou DNA. Naše výsledky taktiež poukazujú na to, že DNMT3b hrá veľmi podstatnú úlohu v transkripčnom umlčaní provírusov a je esenciálnou komponentou umlčovacieho mechanizmu, ktorý je závislý na de novo metylácii. Provírusy klonov divokého kmeňa boli účinne reaktivované 5-azaC, pričom provírusy klonov DNMT3b deficientnej línie boli oveľa viac reaktivované TSA.