

УДК 578.24

КАК ГИСТОНДЕАЦЕТИЛАЗА 3 КОНТРОЛИРУЕТ ЭКСПРЕССИЮ ГЕПСИДИНА И РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2023 г. А. С. Щербакова^а, С. Н. Кочетков^а, М. В. Козлов^а, *^аИнститут молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991 Россия

*e-mail: kozlovmavi@gmail.com

Поступила в редакцию 28.09.2022 г.

После доработки 25.11.2022 г.

Принята к публикации 25.11.2022 г.

Ключевую роль гистондеацетилаз (HDAC) в регуляции клеточного ответа на заражение вирусом гепатита С (HCV) впервые продемонстрировали в 2008 году. Изучая метаболизм железа в тканях печени больных хроническим гепатитом С, обнаружили, что в условиях окислительного стресса, вызванного вирусной инфекцией, в гепатоцитах заметно снижается экспрессия гена гепсидина (HAMP), гормона-регулятора экспорта железа. В схему регуляции экспрессии гепсидина оказались вовлечены HDAC, контролирующие уровень ацетилирования гистонов и транскрипционных факторов, прежде всего STAT3, ассоциированных с промотором *HAMP*. В настоящем обзоре обобщены современные данные о функционировании регуляторного контура HCV-HDAC3-STAT3-HAMP как пример хорошо охарактеризованного взаимодействия вируса и эпигенетического аппарата клетки-хозяина.

Ключевые слова: вирус гепатита С, репликация, STAT3, гепсидин, окислительный стресс, гистондеацетилаза 3, регуляция экспрессии

DOI: 10.31857/S0026898423030096, EDN: CHJNUP

ФОРМИРОВАНИЕ ПЕРВИЧНЫХ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О РЕГУЛЯТОРНОМ КОНТУРЕ HCV-HDAC-STAT3-HAMP

Вирус гепатита С (HCV) провоцирует развитие воспалительных процессов в организме с высвобождением провоспалительных цитокинов, в том числе одного из самых эффективных лейкоцитарных цитокинов – интерлейкина-6 (IL-6), содержание которого в сыворотке больных гепатитом С строго коррелирует с клиренсом вируса [1]. Транскрипционный фактор STAT3 служит сигнальным медиатором для IL-6, поэтому, когда в 2004 году Zhu и соавт. показали, что IL-6 ингибирует репликацию субгеномной РНК HCV в культуре клеток через активацию STAT3 и сигнальный путь ERK, это не стало большой неожиданностью [2]. В той же работе показано, что STAT3 играет важную роль в интерферон-индуцированном противови-

русном ответе. Совокупность полученных результатов убедительно свидетельствовала, что активная форма STAT3 инициирует внутриклеточные противовирусные механизмы.

Сигнальный путь IL-6/STAT3, наряду с BMP/SMAD и эритропоэтином, гликопротеиновым гормоном, стимулирующим выработку эритроцитов, контролирует содержание в крови гепсидина, известного также как LEAP-1 (Liver-Expressed Antimicrobial Peptide 1). Гепсидин, принадлежащий к семейству дефенсинов, обеспечивающих защитное действие врожденного иммунитета, секретируется клетками печени, а именно гепатоцитами, и циркулирует в плазме в комплексе с $\alpha 2$ -макроглобулином, также синтезируемом в гепатоцитах. Клиренс гепсидина происходит либо через почки, либо путем протеасомной деградации с ферропортином. Гепсидин – центральный регулятор гомеостаза железа – это пептид длиной 25 аминокислотных остатков, который образуется в результате протеолиза белка-предшественника и имеет структуру, жестко зафиксированную четырьмя внутримолекулярными дисульфидными связями остатков цистеина [3, 4].

В 2006 году Wrighting и соавт., используя технику формальдегидной сшивки с последующей иммунопреципитацией, впервые показали, что STAT3 контактирует с промотором *HAMP*, и это

Сокращения: BMP/SMAD – сигнальный путь, блокирующий экспрессию гепсидина; CHC – хронический гепатит С; ERK – сигнальные киназы семейства митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК), регулирующих базовые клеточные процессы; *HAMP* – ген гепсидина, белка семейства дефенсинов; HAT – гистонацетилтрансфераза; HCV – вирус гепатита С; HDAC – гистондеацетилаза; HepG2, Huh7, Huh7.5 – клеточные линии гепатоцеллюлярной карциномы человека; IFN – интерферон; IRES – 5'-концевой фрагмент вирусной РНК, инициирующий кеп-независимую трансляцию; OS – окислительный стресс; ROS – активные формы кислорода; TI – терапевтический индекс.

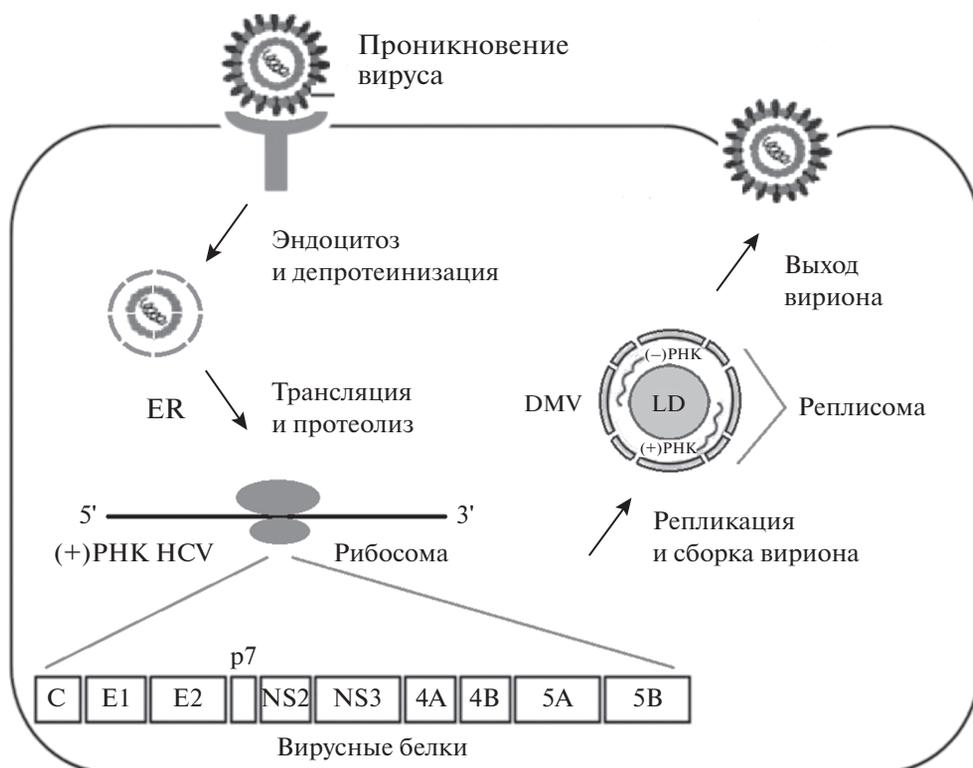


Рис. 1. Вирус гепатита С (HCV) представляет собой (+)РНК вирус, принадлежащий к роду *Hepacivirus* семейства *Flaviviridae*. Вирусный геном состоит из 9600 нуклеотидов и содержит единственную открытую рамку считывания. Вирусная РНК транслируется в шероховатом эндоплазматическом ретикулуме (ER), давая начало полипротеину, который ко- и посттрансляционно расщепляется на 10 белков. К ним относят следующие продукты расщепления (от N- к С-концу): кор-белок (С); структурные белки оболочки 1 (Е1) и 2 (Е2), которые образуют вирион; и семь неструктурных (NS) белков (р7, NS2, NS3, NS4А, NS4В, NS5А и NS5В), участвующих в репликации вирусной РНК, а также в сборке и высвобождении частиц HCV. Репликация РНК происходит в новообразованных органелла-подобных структурах — реплисомах, которые состоят из липидных капель (LD), декорированных двухмембранными везикулами (DMV), происходящими из ER [11]. Процесс завершается ассоциацией структурных вирусных белков с новосинтезированной (+)РНК с образованием вириона, окаймленного аполипопротеинами и биохимически напоминающего частицу липопротеинов низкой плотности (ЛПНП).

взаимодействие необходимо и достаточно для активации экспрессии гепсидина [5]. Годом позже установили, что такую стимуляцию обеспечивает STAT3-связывающий мотив промотора *HAMP*, локализованный в районе $-64/-72$ [6]. В то же время исследовали механизм, лежащий в основе гипоксического подавления экспрессии гепсидина, который оказался тесно связан с развитием в клетках окислительного стресса (OS) [7]. В условиях гипоксии уровень мРНК *HAMP* был снижен как в печени мышей, так и в клетках HepG2, при этом концентрация активных форм кислорода (ROS) была значительно повышена в обоих случаях, что согласуется с ролью OS в качестве активатора анаэробного гликолиза, необходимого для выживания клеток при гипоксии [8]. Показательно, что антиоксиданты предотвращали гипоксическое снижение экспрессии *HAMP*, а прооксиданты, наоборот, блокировали экспрессию даже в условиях нормоксии. Кроме того, гипоксия вызывала диссоциацию факторов транскрипции

C/EBP α и STAT3 от промотора *HAMP*, и этот процесс полностью обращался при добавлении антиоксидантов [7].

Перечисленные закономерности нашли свое объяснение в 2008 году в работе Miura и соавт., посвященной поиску взаимосвязей между репликацией HCV, OS и экспрессией *HAMP* [9]. В ходе исследования были получены клетки линии Huh7, экспрессирующие вирусный кор-белок или неструктурные белки (NS3–5) (рис. 1), а также клетки, поддерживающие размножение полноразмерного репликона HCV. Оказалось, что в клетках, содержащих кор-белок или репликон, интенсивно генерировались ROS и резко снижалась экспрессия гепсидина, причем восстановить экспрессию *HAMP* можно было добавлением антиоксидантов.

Главной заслугой авторов этой работы стало обнаружение прямой корреляции между HCV-индуцируемым OS и активностью ядерных гистондеацетилаз (HDAC) — ферментов, определяющих

состояние хроматина, путем каталитического удаления ацетильной группы с остатков ϵ -N-ацетилизина в молекулах гистонов и других белков-субстратов, что подробнее будет рассмотрено ниже. В частности, в условиях OS выявлено гипoaцетилирование гистона H3 в районе промотора *HAMP* с одновременным блокированием присоединения к промотору транскрипционных факторов C/EBP α и STAT3 и падением экспрессии *HAMP*. Наоборот, в присутствии антиоксидантов содержание мРНК *HAMP* в HCV-инфицированных клетках увеличивалось, как и при воздействии ингибитора трихостатина А (TSA), не избирательно блокирующего активность всех цинкзависимых HDAC (пан-HDAC-ингибирование). В присутствии TSA наблюдалось накопление ацетилированной формы гистона H3 (H3K9ac) и восстановление связывания C/EBP α и STAT3 с промотором гепсидина [9]. К сожалению, высокая токсичность TSA в отношении клеток гепатомы маскировала его антивирусное действие. Только через 5 лет в качестве агента, более селективно, чем TSA, блокирующего репликацию HCV в клеточной системе, был изучен другой мультипотентный (широкого спектра действия) ингибитор HDAC – вориностат (SAHA) [10]. Детально механизмы влияния OS на регуляцию экспрессии гепсидина рассмотрены ниже.

ВЗАИМОСВЯЗЬ СИГНАЛЬНОГО ПУТИ JAK/STAT3 И ПРОЛИФЕРАЦИИ HCV

Как и следовало ожидать, механизм антивирусной активности IL-6 тесно связан с его сигнальной функцией. Известно, что взаимодействие этого цитокина с рецепторными белками IL-6R α и gp130 приводит к образованию гексамерного трансмембранного комплекса (IL-6/IL-6R α /gp130)₂. На следующей стадии к комплексу со стороны цитозоля присоединяются две молекулы киназы JAK1/2, при этом происходит их сближение и трансактивация. Затем они фосфорилируют остатки тирозина в gp130 в составе комплекса, что вызывает присоединение молекул SHP-2 и STAT. Их последующее фосфорилирование киназами JAK1/2 запускает два основных gp130-зависимых сигнальных пути: SHP-2/ERK MAPK-каскад и STAT3 [12]. Чтобы оценить роль STAT3 в антивирусном ответе, Zhu и соавт. применили индуцибельную систему, в которой активация сигнального пути STAT3 происходила независимым от цитокинов и рецепторов образом [2]. Авторы использовали созданную ранее конструкцию слитого белка STAT3ER, в которой кодирующая последовательность STAT3 ассоциирована с последовательностью лиганд-связывающего домена рецептора эстрогена ER-LBD [13]. Такая конструкция позволяла активировать сигнальную функцию STAT3ER без участия киназ, но путем добавления синтети-

ческого лиганда 4-гидрокситамоксифена (4-НТ), после чего белок переставал регулироваться цитокинами и факторами роста [14].

Данный подход реализован на клетках линии FCA1, поддерживающих размножение репликаона HCV (родительская линия клеток Huh7) [15]. После трансфекции и отбора по устойчивости к пуромицину получили стабильную линию клеток FCA1-STAT3ER, экспрессирующую соответствующий слитый белок. Добавление 4-НТ к этим клеткам приводило к подавлению репликации вируса, тогда как в клетках исходной линии FCA1 уровень вирусной РНК оставался неизменным [2]. Работоспособность белка STAT3ER подтверждалась его димеризацией, необходимой для активации в ответ на добавление 4-НТ, а также повышением активности репортерной люциферазы, экспрессия которой находилась под контролем STAT3-связывающего мотива репортерной плазмиды. Кроме того, в клетках линии FCA1-STAT3ER наблюдалась прямая корреляция между STAT3-зависимой экспрессией мембранного IFN-чувствительного белка IFITM3/1-8U и антивирусным действием STAT3. Обнаруженная корреляция имела характер причинно-следственной связи, поскольку ранее показали, что сверхэкспрессия белка IFITM3/1-8U в клетках линии FCA1, трансфицированных соответствующим вектором, приводила к двукратному снижению уровня РНК HCV в сравнении с контролем [15].

В настоящее время описано несколько молекулярных механизмов антивирусного действия IFITM3/1-8U, наиболее важные из которых: (i) ингибирование IRES-опосредованной трансляции HCV [16]; (ii) нарушение клеточного гомеостаза холестерина, эфиры которого входят в состав липидных капель, формирующих вирусные реплисомы (рис. 1) [17]; и (iii) блокирование проникновения вируса в клетку [18]. Нельзя также исключить возможность ингибирования репликации HCV путем ранее установленного взаимодействия IFITM3/1-8U и трансмембранного белка VAPA [17, 19]. Дело в том, что гетеродимер двух родственных белков VAPA и VAPB играет важную роль в пролиферации HCV, принимая участие в позиционировании вирусного комплекса репликации на мембране липидного рафта клетки-хозяина за счет взаимодействия с неструктурными белками NS5A и NS5B [11, 20]. Следовательно, повышение экспрессии IFITM3/1-8U гипотетически может иметь следствием вытеснение VAPA из состава комплекса репликации на поверхности двухмембранных везикул реплисомы (рис. 1). Это тем более возможно, поскольку и IFITM3/1-8U, и VAPA изначально локализованы на мембране ER, где одинаково ориентированы в направлении цитозоля [18, 21]. Подобный механизм ингибирования репликации HCV описан

ранее у основного белка антивирусного клеточного ответа – вилперина [22].

На биологическую значимость STAT3-зависимых противовирусных механизмов в инфицированных гепатоцитах указывает также то, что вирус выработал эффективную стратегию уклонения от иммунного ответа, вызванного инфицированием или терапевтическим применением IFN- α . Так, еще в 2003 году Nosui и соавт. показали, что экспрессия кор-белка HCV в клетках печени мышей предотвращает фосфорилирование JAK1/2 и STAT3 и тем самым ингибирует STAT3-опосредованную транскрипцию, стимулированную IL-6 [23]. Оказалось, что кор-белок HCV способен связываться с JAK1/2, причем важную роль в этом процессе играет последовательность 79PGYPWP84 в кор-белке. Единичная замена P82A в кор-белке восстанавливала активирующее действие IL-6 на JAK/STAT-зависимую экспрессию репортерного гена люциферазы, что подтверждало роль взаимодействия кор-белка и JAK1/2 как фактора, определяющего блокирование работы сигнального пути. Позже аналогичные результаты получили на клетках гепатокарциномы человека, инфицированных клоном HCV генотипа 2a (J6/JFH1), продуцирующим вирусные частицы с высоким выходом [24]. Двойная замена остатков пролина в JAK-связывающем мотиве вирусного кор-белка (79AG-YAWP84) резко снижала инфекционность вируса, несмотря на эффективную репликацию его геномной РНК. Эти результаты убедительно свидетельствуют о том, что взаимодействие между кор-белком HCV и белком JAK необходимо для эффективного воспроизводства инфекционных вирусов.

Описан и другой механизм, согласно которому HCV блокирует JAK/STAT3-зависимый сигнал. Обнаружено, что содержание STAT3 в печени больных хроническим гепатитом С (СНС) значительно ниже контрольных значений. Такой же результат получен в клетках Huh7, трансфицированных полноразмерным вирусным репликоном. Показано, что сохранение эффективной репликации HCV в культуре клеток в присутствии иммуномодуляторов и цитокинов связано с нарушением передачи JAK/STAT3-зависимых сигналов [25]. Позднее были опубликованы данные о блокировании сигнального пути JAK/STAT3 как в первичных иммунных клетках, так и в гепатоцитах больных СНС, не прошедших стандартный курс лечения IFN- α /рибавирином [26]. Оказалось, что хотя у HCV-инфицированных пациентов содержание мРНК STAT1 и STAT3 во всех основных популяциях клеток оставалось на уровне контроля, содержание обоих факторов в виде белка было снижено. На примере инфекционной клеточной системы HCVcc, поддерживающей репликацию вируса штамма JFH-1 генотипа 2a на высоком уровне, удалось показать, что в HCV-инфицированных клетках суммарное количество

убиквитинированного белка выше, чем в контроле, имитирующем инфекцию. Оказалось, что в этих клетках STAT3 по большей части также убиквитинирован и подвергается протеасомной деградации, что, вероятно, и позволяет HCV формировать резистентность к терапии IFN- α .

УЧАСТИЕ ГЕПСИДИНА В КЛЕТОЧНОМ ОТВЕТЕ НА HCV-ИНФЕКЦИЮ

Как сказано выше, гепсидин – это центральный регулятор гомеостаза железа, причем единственной мишенью, связываясь с которой гепсидин контролирует этот процесс, является ферропортин (Fpn). Этот белок обеспечивает экспорт железа, располагаясь в мембранах абсорбтивных энтероцитов кишечника, макрофагов, гепатоцитов и плацентарных клеток. Fpn транспортирует Fe²⁺ совместно с медьзависимыми феррооксидазами (гефестин и церулоплазмин), которые облегчают экстракцию железа из ферропортинового канала и последующую нагрузку Fe³⁺ на трансферрин плазмы [3, 4]. Для изучения взаимодействия ферропортина с экзогенным гепсидином Nemeth и соавт. создали стабильную клеточную линию (HEK293-Fpn), в которой экспрессия химерного Fpn-GFP мыши находилась под контролем стероид-индуцируемого промотора [27]. Полученные данные указывали на то, что за связывание с ферропортином отвечает N-концевой фрагмент гепсидина, после чего происходит интернализация Fpn в цитоплазму клетки, его убиквитинирование и деградация в лизосомах. В результате выход Fe²⁺ в среду становится невозможным и наблюдается увеличение содержания железа внутри клетки. Позднее уточнили, что интернализация ферропортина возможна только в виде димерного комплекса (Fpn-НАМР)₂, в составе которого после присоединения и трансактивации двух киназ JAK2 происходит фосфорилирование остатков тирозина Y302 и Y303 в каждом из двух белков Fpn [28]. Важно отметить, что в культуре гепатоцитов, активно экспрессирующих Fpn, его деградацию равно вызывали и синтетический, и эндогенно секретируемый гепсидин, что позволило ясно идентифицировать гепатоциты как клеточную мишень данного дефенсина [29].

У 30–40% больных СНС в плазме крови повышено содержание железа, ферритина, а также увеличен уровень насыщения железом трансферрина [30]. В этой связи активно изучали механизмы, посредством которых HCV-инфекция провоцирует избыточное накопление железа в организме больного. В настоящее время признано, что воздействие вируса на метаболизм железа осуществляется путем снижения экспрессии гепсидина, что, в свою очередь, приводит к возрастанию активности Fpn в абсорбтивных энтероцитах ки-

щечника [31]. Однако имеет ли повышение уровня железа в организме больного какое-либо значение для репликации вируса или это просто одно из негативных последствий персистирующей инфекции, до сих пор остается невыясненным, поскольку данные на этот счет весьма противоречивы [30, 31]. Так, например, добавление экзогенных комплексных соединений Fe^{2+} ингибирует активность рекомбинантной вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы *in vitro*, а также резко подавляет размножение высокопродуктивного HCV генотипа 2a (JFH-1) в клеточной инфекционной системе [32, 33]. С другой стороны, анализ образцов биопсии печени пациентов с СНС, инфицированных вирусом генотипов 1b и 2b, выявил положительную корреляцию между уровнем железа, с одной стороны, и РНК HCV и мРНК фактора eIF3, необходимого для IRES-зависимой трансляции вирусного генома, с другой [34].

Неожиданным оказался тот факт, что не только размножение вируса подавляет экспрессию гепсидина, но и наоборот — добавление экзогенного гепсидина может снижать экспрессию вирусных белков и РНК [35]. Так, в клетках Huh7.5, инфицированных вирусом изолята JFH1 или химерой последнего — JC1, наблюдался сильный противовирусный эффект гепсидина, связанный с активацией STAT3, предположительно, через JAK-зависимое фосфорилирование. Дополнительные эксперименты по нокдауну STAT3 подтвердили важную роль этого фактора в индуцированной гепсидином противовирусной активности. Интересно, что инкубация с гепсидином вызывала значительное повышение его собственной мРНК в клетках Huh7.5, указывая на существование положительной обратной связи, возникающей за счет STAT3-зависимой активации экспрессии *HAMP* [5, 6]. Клинические исследования подтверждают строгую отрицательную корреляцию между содержанием гепсидина в крови больных СНС и вирусной нагрузкой. Такие результаты в свете всего сказанного можно трактовать как свидетельство анти-HCV-активности гепсидина *in vivo* [36].

Механизм, посредством которого гепсидин запускает фосфорилирование STAT3, необходимое для активации фактора, подробно изучен на примере макрофагов мыши, в которых с помощью цитрата Fe^{3+} индуцировали экспрессию *Fpn* [37]. Так, добавление гепсидина к макрофагам, активированным цитратом железа, вызывало ассоциацию *Fpn* с киназой JAK2, с ее последующей активацией, как описано ранее для клеток HEK293-*Fpn* [28]. Комплекс (JAK2-*Fpn*-*HAMP*)₂ рекрутировал в свой состав STAT3, что подтверждено совместной коиммунопреципитацией JAK2 и STAT3 с *Fpn* в присутствии гепсидина. Более того, фосфорилирование STAT3, связанного с комплексом по

остатку Y705, предполагает переход данного фактора в активное состояние. Таким образом, мембраносвязанный белок *Fpn* можно рассматривать как рецептор гормона гепсидина, при этом в результате связывания рецептора и гормона происходит активация сигнального пути STAT3 [3]. Действительно, глобальный анализ мРНК в макрофагах, экспрессирующих ферропортин, после обработки гепсидином выявил изменение уровня экспрессии широкого спектра генов, в первую очередь регулирующих цитокин-индуцированные воспалительные реакции, контролируемые STAT3.

РОЛЬ HDAC3 В ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ *HAMP*

HDAC образуют обширное семейство ферментов, осуществляющих эпигенетическую регуляцию экспрессии генов и контролирующих структурно-функциональную реорганизацию хроматина и цитоскелета. Выделяют цинкзависимые HDAC классов I, II и IV, которые гидролизуют амидные связи в ϵ -N-ацетиллизинных остатках белков-субстратов, а также HDAC класса III, обозначаемые как SIRT (сиртуины), использующие для деацетилирования кофермент NAD^+ [37]. Цинкзависимые HDAC могут локализоваться либо в ядре (HDAC1/2/3 класса I), либо в ядре и цитоплазме (HDAC8 класса I и HDAC4/5/7/9 класс IIa), либо в цитоплазме (HDAC6/10 класса IIb и HDAC11 класса IV). При этом HDAC класса IIa не обладают деацетилирующей активностью, но при перемещении в ядро связываются с HDAC3 в составе регуляторных комплексов, влияя таким образом на эффективность деацетилирования гистонов и факторов транскрипции [39].

В регуляции экспрессии гепсидина принимает участие HDAC3 (рис. 2), что впервые показали Pasricha и соавт. в 2017 году [40]. Первоначальное тестирование шести ингибиторов HDAC различной селективности обнаружило усиление экспрессии *HAMP* в клетках Huh7 только в присутствии селективного ингибитора HDAC3 (RGFP966), причем активность сигнального пути BMP/SMAD, также участвующего в регуляции гепсидина, оставалась на уровне контроля. К аналогичному результату приводили и встречные эксперименты по нокдауну HDAC3. Наоборот, в клетках, сверхэкспрессирующих HDAC3, наблюдалось снижение экспрессии *HAMP*, но не генов, регулируемых по BMP/SMAD-зависимому пути. Кроме того, ChIP-seq-анализ материала из печени мыши показал, что содержание HDAC3 в локусе гепсидина в районе старта транскрипции значительно выше, чем в области отрицательного контроля и является примерно таким же, как и в локусе *CDKN1*, взятом в качестве положительного контроля, учи-

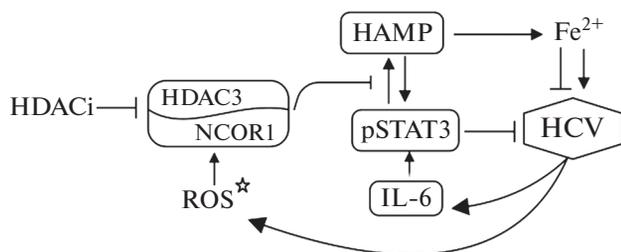


Рис. 2. Схематическое представление регуляторного контура HCV-HDAC3-STAT3-HAMP. Острая HCV-инфекция индуцирует IL-6/STAT3-зависимый противовирусный ответ. Активированный pSTAT3 регулирует экспрессию гепсидина (HAMP) по механизму положительной обратной связи ($\uparrow\downarrow$). На стадии хронической HCV-инфекции происходит ROS-зависимая стабилизация комплекса, образованного HDAC3 и корепрессором ядерных рецепторов 1 (NCoR1), что приводит к подавлению экспрессии HAMP и содействует персистенции вирусной инфекции. В свою очередь, фармакологическое ингибирование HDAC3 (HDACi) восстанавливает экспрессию HAMP и подавляет репликацию HCV. Влияние Fe^{2+} на размножение вируса имеет, вероятно, двунаправленный характер ($\uparrow\downarrow$) и его роль в репликации HCV ясна не до конца.

таявая прямое участие HDAC3 в регуляции экспрессии p21 [41].

Изучена также роль корепрессора NCoR1 в регуляции экспрессии HAMP в клетках Huh7. Нокадаун и NCoR1, и HDAC3 по отдельности повышал экспрессию гепсидина, а одновременный нокадаун обоих генов давал эффект синергии [41]. Таким образом, HDAC3 необходим, но недостаточен для эффективной репрессии транскрипции гена HAMP гепсидина. Совместное присутствие HDAC3 и NCoR1 в составе репрессорных комплексов описано еще в 2000 году [42]. Значение этого наблюдения возросло после того, как было показано, что взаимодействие HDAC3 с DAD-

меном NCoR1 резко повышает деацетилазную активность фермента *in vivo*, что во многом гарантирует эффективность репрессии транскрипции (рис. 2) [43].

Сложная структурно-доменная организация NCoR1 объясняется его центральной ролью в сборке и функционировании репрессорного комплекса. Так, за доменом DAD следует родственный ему домен HID, который непосредственно связывает N-концевые последовательности гистонов, предпочтительно деацетилированных, что дополнительно увеличивает силу репрессии [44]. Кроме того, в составе NCoR1 выделяют три домена RD, ответственных за взаимодействие с регуляторными белками, и три изолейцин-богатых домена RID, отвечающих за взаимодействие с ядерными рецепторами и факторами транскрипции, включая STAT3. Как правило, RID-домены корепрессоров присоединяются к той же области ядерных рецепторов, что и коактиваторы, что усиливает антагонизм их действия (рис. 3) [45].

В 2012 году Watson и соавт. показали, что инозитол-1,4,5,6-тетрафосфат (IP4) выполняет роль кофермента HDAC3 [46]. В ходе уточнения кристаллической структуры комплекса HDAC3-DAD, полученного в результате транзитной трансфекции в клетках HEK-293F, идентифицирована молекула IP4, внедренная в стык между HDAC3 и DAD-доменом. Связывание IP4 не только стабилизировало взаимодействие двух белков в качестве “межмолекулярного клея”, но и облегчало доступ ацетилированного субстрата к активному центру и повышало активность фермента. Мутации, разрушающие комплекс HDAC3-DAD, инактивировали HDAC3, подтверждая необходимость связывания с DAD-доменом для ферментативной активности. Однако мутации некоторых остатков DAD-домена, расположенных в районе сайта связывания IP4, существенно инактивиро-

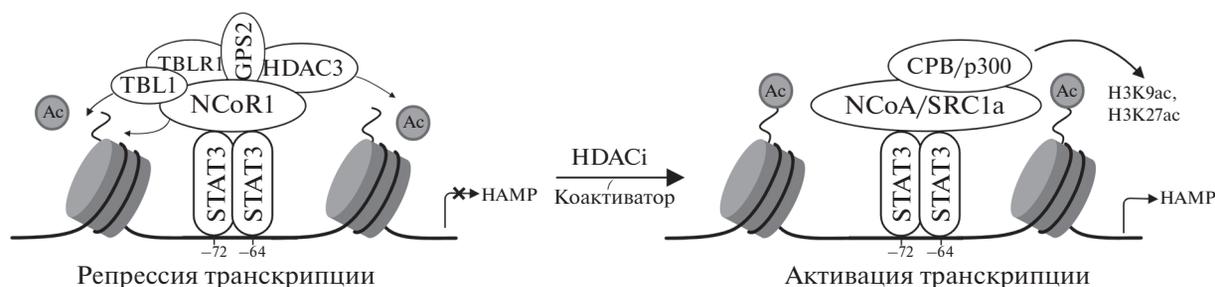


Рис. 3. Упрощенная схема активации экспрессии гепсидина (HAMP) при ингибировании активности гистондеацетилазы 3 (HDAC3). HDAC3 в комплексе с корепрессором NCoR1 связывается с димером STAT3 и способствует подавлению транскрипции гена HAMP за счет деацетилирования гистонов. Белки TBL1/TBLR1, стабильно присутствующие в комплексе, участвуют в репрессии транскрипции, в обмене корепрессора на коактиватор и в убиквитинировании и деградации NCoR1, в то время как молекулярная функция регуляторного белка GPS2 в составе комплекса не ясна. Связывание ингибитора фермента (HDACi) с HDAC3 дестабилизирует репрессорный комплекс, что облегчает присоединение коактиватора (NCoA/SRC1a) и гистон-ацетилазы (CPB/p300) к димеру STAT3 и обеспечивает тем самым транскрипцию гена HAMP в том числе и за счет ацетилирования гистонов.

вали HDAC3, не нарушая при этом белок-белковое взаимодействие. Эти результаты указывали на то, что присутствие IP4 способствует усилению деацетилазной активности. Дополнительные эксперименты *in vitro* с использованием рекомбинантных белков HDAC3 и SMRT (аналог NCoR1) показали, что IP4 увеличивает каталитическую эффективность комплекса HDAC3-SMRT против ацетилированного фрагмента гистона H4 АК12-18(K16ac) приблизительно в 2.5 раза (значение k_{cat}/K_m) [47].

ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС РЕГУЛИРУЕТ АКТИВНОСТЬ HDAC3

В ответ на развитие OS включается дополнительный механизм HDAC-зависимой регуляции экспрессии гепсидина, детали которого до сих пор не определены [9]. Однако мы полагаем, что этот механизм можно реконструировать с большей достоверностью, опираясь на современные данные. Дело в том, что взаимодействие HDAC3 с DAD-доменом NCoR1 необходимо, но недостаточно для максимальной активации деацетилирования, и конечная настройка работы комплекса происходит уже после его сборки.

В ответ на HCV-индуцированный OS происходит падение экспрессии *HAMP*, что соответствует повышению активности HDAC3 [9], однако мы не нашли никаких указаний на положительную корреляцию между уровнем ROS и содержанием IP4. С другой стороны, известно, что кофермент NADPH является ключевым кофактором антиоксидантной защиты. Он служит донором восстановительного потенциала глутатионредуктаз (GR) и тиоредоксинредуктаз (TrxR), превращающих окисленные формы глутатиона и тиоредоксинов в их исходное восстановленное состояние [48, 49]. Недавно обнаружена независимая от клеточного метаболизма функция NADPH в модуляции эпигенетического статуса и транскрипции. Оказалось, что снижение клеточного уровня NADPH вследствие нокдауна *ME1* или *ME2* (гены цитозольной или митохондриальной малатдегидрогеназы) снижает уровень общего ацетилирования гистонов и транскрипции в адипоцитах и в опухолевых клетках [50]. При этом введение в клетки NADPH с помощью системы X-tremeGENE, предназначенной для трансфекции ДНК, вызывало дозозависимое накопление ацетилированной формы гистонов H2B, H3 и H4.

Причиной наблюдаемых закономерностей была способность NADPH непосредственно взаимодействовать с HDAC3 и разрушать комплекс HDAC3-NCoR1 или HDAC3-SMRT, препятствуя, тем самым активации HDAC3. Существенно, что NADPH и IP4, по-видимому, связывались с одними и теми же доменами HDAC3, причем NADPH имел более высокое сродство к HDAC3,

чем IP4. Таким образом, в то время как IP4 способствовал образованию комплекса HDAC3-NCoR1, NADPH ингибировал его. В экспериментах с меченой Flag HDAC3, выделенной из клеток HEK293T, показано, что и IP4, и NADPH влияют на активность HDAC3 дозозависимым образом, при этом IP4 увеличивает активность, а NADPH — уменьшает. Ни одна из других форм кофермента (NADP⁺, NADH или NAD⁺) не влияла на ферментативную активность HDAC3, так как все они обладали в 100–200 раз меньшей аффинностью к ферменту, чем NADPH.

В ходе HCV-инфекции NADPH играет двоякую роль в регуляции промотированного вирусом OS. С одной стороны, кофермент, как обычно, обеспечивает восстановительную активность глутатион- и тиоредоксинредуктаз, а с другой, участвует в постоянном генерировании ROS NADPH-оксидазой 4 (NOX4), экспрессию которой индуцирует кор-белок HCV [51, 52]. Все вместе это может означать, что уровень NADPH в инфицированной клетке снижается, поскольку при осуществлении как антиоксидантной, так и прооксидантной активности кофермента, NADPH расходуется за счет окисления. Действительно, многочисленные клинические исследования показывают, что в тканях печени пациентов с СНС многократно снижено соотношение глутатиона и глутатионредуктазы, которое, сверх того, коррелирует с усилением перекисного окисления липидов и накоплением железа [53–55]. Таким образом, у нас есть все основания полагать, что в условиях OS снижение клеточной концентрации NADPH имеет результатом присоединение IP4 к вакантному сайту общего связывания с комплексом HDAC3-NCoR1 и его стабилизацию. В свою очередь, это приводит к усилению деацетилазной активности фермента и, следовательно, к подавлению экспрессии *HAMP*.

РОЛЬ HDAC3 В РАВНОВЕСИИ КОРЕПРЕССОР/КОАКТИВАТОР

Укоренившийся взгляд на то, что деацетилирование гистонов регулирует экспрессию генов прежде всего за счет изменения трехмерной структуры хроматина и компактизации ДНК, весьма односторонен и требует существенного уточнения. Такой механизм регуляции необходим в качестве своеобразного “шлагбаума”, перекрывающего доступ транскрипционного аппарата к протяженным кластерам молчащих генов гетерохроматина. Однако для регуляции экспрессии активных генов эухроматина HDAC должны реагировать на поступающие сигналы быстро и строго в границах соответствующих регуляторных районов или даже промоторов. Указанные требования обеспечиваются присутствием HDAC в составе репрессорных комплексов, и, наоборот, гистон-

ацетилтрансферазы (НАТ) рекрутируются в комплексы активации транскрипции [56, 57]. Ниже будут рассмотрены возможные механизмы переключения экспрессии *HAMP* из режима репрессии в режим активации в ответ на действие ингибиторов HDAC3 (рис. 3).

Самый универсальный механизм — присоединение к корепрессорному комплексу дестабилизирующих лигандов, в число которых входят гормоны, метаболиты или химические агенты со свойствами лигандов ядерных рецепторов [58, 59]. Как упоминалось выше, транскрипционный фактор STAT3 после активации путем фосфорилирования и димеризации связывается с соответствующим мотивом промотора *HAMP* [5, 6] и в зависимости от клеточного сигнала рекрутирует либо корепрессор NCoR1, либо коактиватор NCoA/SRC1a (рис. 3) [60]. Стоит заметить, что описанное в предыдущей главе угнетение ассоциации NCoR1 с HDAC3 в присутствии NADPH [50] можно рассматривать как действие лиганда-метаболита, назначение которого — активировать экспрессию целевого гена *HAMP* в условиях нормоксии.

Могут ли ингибиторы деацетилазной активности HDAC3 играть роль лигандов, дестабилизирующих корепрессорный комплекс HDAC3-NCoR1 — точно не известно [58]. Однако в случае фармакологического ингибирования HDAC4 достоверно показано, что связывание ингибитора (TFMK) с активным сайтом белка-мишени меняет его сродство к белкам-партнерам. Гетеродимер HDAC3-SMRT, действуя как каркас для сборки мультибелкового репрессорного комплекса, присоединял к себе HDAC4 в качестве регуляторного элемента. Данные кристаллографического анализа и встречного мутагенеза показывают, что RD3-домен SMRT взаимодействует с районом, примыкающим к активному центру HDAC4 [61, 62]. Как и следовало ожидать, после внедрения ингибитора в канал активного центра HDAC4 в этом сегменте белка происходили существенные конформационные изменения, которые снижали эффективность взаимодействия с RD3-SMRT [63].

Необходимо отметить, что ингибиторы HDAC прямо влияют на транскрипцию STAT-регулируемых генов, поскольку большинство факторов транскрипции этого семейства служат субстратами HDAC [64]. В 2005 году Yuan и соавт. показали, что под действием цитокинов в клетках рака молочной железы происходит опосредованное НАТ р300-ацетилирование STAT3 по остатку Lys685. Эта модификация была обратимой благодаря активности локализованных в ядре цинкзависимых HDAC класса I, главным образом HDAC3 [65]. В экспериментах с клеточной линией PC-3 рака предстательной железы человека, в которой экспрессировался мутантный STAT3, содержащий замену Lys685Arg, обнаружили, что ацетилирова-

ние Lys685 критично для формирования стабильного гомодимера STAT3 и усиления транскрипции генов прохождения клеточного цикла. Более того, TSA, пан-ингибитор HDAC, способствовал накоплению STAT3K685ac и индуцировал экспрессию циклина D1, но только в клетках, экспрессирующих STAT3 дикого типа.

Описан еще один механизм подавления сборки корепрессорного комплекса в зависимости от уровня ацетилирования гистонов. Как минимум, три белка в составе комплекса — NCoR1, TBL1 и TBLR1 — считывают гистоновый код, преимущественно связываясь со свободными остатками лизинов гистоновых “хвостов” (рис. 3). HD-домен NCoR1 или SMRT, как показано, выполняет несколько важных функций: (i) увеличивает аффинность части комплекса HDAC3-DAD к гистоновому субстрату, способствуя его деацетилации; (ii) увеличивает силу репрессии за счет высокого сродства к деацетилированным гистонам; (iii) блокирует НАТ-зависимое ацетилирование гистонов [66]. Домены RD1 и RD4 в составе NCoR1/SMRT взаимодействуют с N-концевой и C-концевой последовательностями белков TBL1 и TBLR1. Оба эти белка связывают гистоны H2B и H4, причем эффективность репрессии положительно коррелирует с силой их взаимодействия с гистонами [67]. Предложена модель, в которой деацетилирование, осуществляемое первоначальным набором нестабильных комплексов на базе NCoR1/SMRT через их взаимодействие с фактором транскрипции, например, рецептором тиреоидных гормонов, генерирует гистоновый код, который служит для сборки и стабилизации конечного репрессорного комплекса [68]. Очевидно, что фармакологическое ингибирование HDAC3 препятствует всем перечисленным взаимодействиям и, как следствие, не образуется стабильный репрессорный комплекс.

При нарушении сборки корепрессорного комплекса происходит конкурентное взаимодействие ДНК-связанного димера STAT3 с белком коактиватором NCoA/SRC1a и двумя паралогичными НАТ CPB/p300 (рис. 3). Анализ взаимодействия делеционных мутантов позволил установить, что стимулирующую транскрипционную активность коактиваторного комплекса обеспечивает НАТ CPB, контактирующая с центральным AD1-доменом NCoA/SRC1a [69]. Далее первичный коактиваторный комплекс рекрутирует многочисленные эпигенетические модуляторы, в том числе аргинин/лизинметилтрансферазы. Совместное действие рекрутированных ферментов приводит к ремоделированию структуры хроматина, что делает возможной сборку на промоторе общих факторов транскрипции и РНК-полимеразы II в единый мультибелковый функционально-активный транскрипционный комплекс [70].

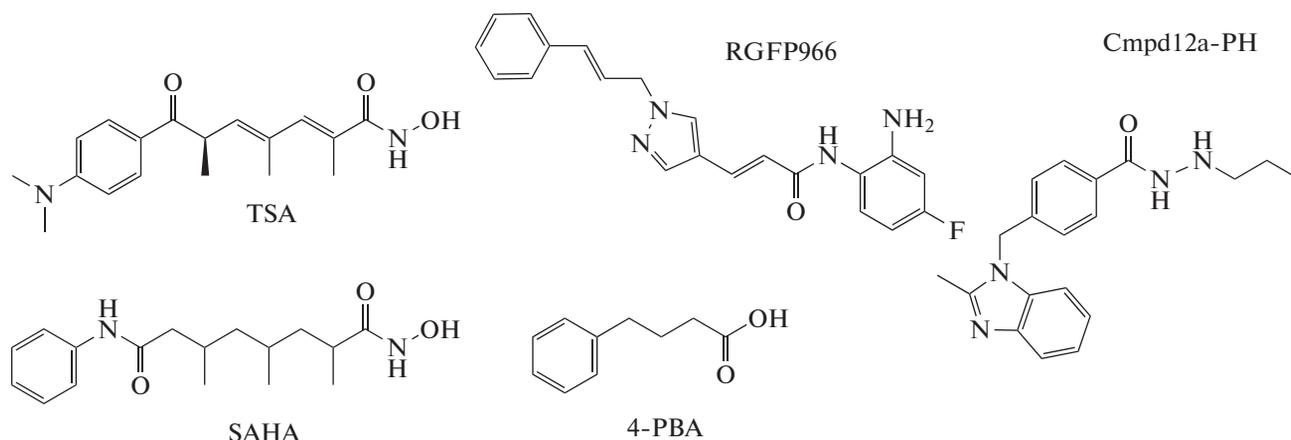


Рис. 4. Структура ингибиторов гистондеацетилаз – блокаторов репликации HCV – гидроксамовых кислот TSA и SAHA, орто-аминоанилида RGFP966, карбоновой кислоты 4-PBA и *N'*-пропилгидразида Cmpd12a-PH.

ИНГИБИТОРЫ HDAC3 КАК ПРОТИВОВИРУСНЫЕ АГЕНТЫ

Эпигенетические механизмы, по которым фармакологическое ингибирование HDAC может приводить к подавлению репликации HCV, впервые изучили на примере двух ингибиторов – TSA и вориностата (SAHA, рис. 4) [10]. ChIP-seq анализ клеток гепатомы человека после инкубации с SAHA указал на два ключевых гена, регулируемых HDAC. Выявлена сильная положительная регуляция гена остеопонтина (*OPN*) и сильная отрицательная – аполипопротеина A1 (*APOA1*). Важность белковых продуктов этих генов в репликации HCV подтверждена с помощью сверхэкспрессии *OPN* и нокаута *APOA1* – в обоих случаях репликация вируса тормозилась, о чем свидетельствовало резкое снижение люциферазного сигнала репликона. Авторы исключили ингибирующий механизм, связанный со специфической для печени микроРНК-122, которая в норме способствует пролиферации вируса [71], показав, что SAHA не влияет на ее экспрессию.

Через пять лет подробно разобрали механизм анти-HCV действия SAHA и селективного ингибитора HDAC3 RGFP966 [70]. Оба препарата эффективно подавляли пролиферацию HCV в системе клеточного репликона. Были подтверждены данные о влиянии ингибирования HDAC на экспрессию генов гепсидина (*HAMP*) и аполипопротеина A1 (*APOA1*) [9, 10]. Кроме того, впервые показано накопление ацетилированной формы STAT3 при инкубировании клеток в присутствии RGFP966. Основываясь на данных об активации с помощью RGFP966 экспрессии *HAMP in vivo* [40], на животных моделях установлено значение HDAC3 как перспективной мишени антивирусной терапии. С этой целью использовали восприимчивую к вирусу линию ген-модифицированных мышей с введенными генами человека CD81

(*TSPAN28*) и окклюдина (*OCLN*). Лечение HCV-инфицированных животных с помощью SAHA и RGFP966 показало высокую, приблизительно равную, эффективность обоих препаратов.

Другой пан-ингибитор HDAC, фармакологически ориентированный на гепсидин, – 4-фенилбутановая кислота (4-PBA, рис. 4) [73]. Интересно, что 4-PBA усиливала экспрессию *HAMP*, вызывая в соответствующем локусе модификацию гистона H3K27ac, а не H3K9ac, как описано ранее для TSA и RGFP966. Возможно, что это отличие имело следствием неожиданно сильную активацию сигнала IFN- α . Дополнительный вклад в антивирусное действие 4-PBA вносило ее деструктивное влияние на формирование HCV-реплисома – двухмембранных везикул (DMV), ассоциированных с вирусным комплексом репликации (рис. 1). Интересно, что противовирусная активность 4-PBA и в клеточной системе, и на животных моделях показана на одних и тех же клетках гепатомы человека Huh7.5-Con1, поддерживаемых в адгезионной культуре или пересаженных в печень мышей с иммунодефицитом.

Селективным ингибитором HDAC класса I и одновременно эффективным блокатором репликации HCV в клеточной системе оказался *N'*-пропилгидразид 4-замещенной бензойной кислоты (Cmpd12a-PH, рис. 4) [74]. Однако между сильной противовирусной активностью Cmpd12a-PH ($EC_{50} = 25$ нМ и $TI = 400$) и накоплением ацетилированных форм гистона H3K9/K14ac наблюдался значительный концентрационный разрыв. Нельзя исключить, что в присутствии Cmpd12a-PH, как и 4-PBA [73], накапливается H3K27ac, что и могло стать причиной наблюдаемого несоответствия. Это можно также объяснить существованием другой высокочувствительной антивирусной мишени. Следует заметить, что ингибиторы HDAC, в структуру которых в качестве

цинк-хелатирующей группы входит *N*-пропил-гидразидный остаток, проявляют максимальную селективность ингибирования в отношении HDAC3. Кроме того, они обладают повышенной устойчивостью к биотрансформации в отличие от гидроксаматов и *орто*-аминоанилидов (TSA, SAHA и RGFP966 соответственно) [75].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Если исходить из общих представлений, то удивителен сам факт эффективного подавления вирусной репликации ингибиторами HDAC при относительно низкой токсичности препаратов. Учитывая ключевую роль HDAC в регуляции экспрессии генов, интуитивно можно ожидать самых серьезных негативных последствий для организма пациентов. Однако в реальности это не происходит или, точнее, происходит не всегда.

Дело в том, что вирусная инфекция, в частности HCV, разнонаправленно меняет экспрессию многих генов, что позволяет вирусу репрограммировать гепатоциты в состояние перmissивности, причем экспрессия некоторых генов меняется многократно. Ингибиторы HDAC3 также действуют разнонаправленно, эффективно подавляя сверхэкспрессию “провирусных” генов (*APOA1*) и восстанавливая до нормы гипоэкспрессию “антивирусных” генов (*HAMP* и *OPN*). Заметим, что ингибиторы HDAC в качестве противоопухолевых препаратов аналогичным образом воздействуют на экспрессию онкогенов и генов-супрессоров соответственно.

Очевидно, что роль HDAC3 в устойчивой репликации HCV не ограничена модуляцией экспрессии трех генов, указанных выше. Вследствие того, что HDAC3 входит в состав корепрессорных комплексов с самыми разнообразными ядерными рецепторами, регулирующими, например, метаболизм печени или активность циркадных генов [57], закономерно ожидать появление новых генов-мишеней для анти-HCV-терапии с помощью подходов ингибиторов HDAC3. Кроме того, HDAC3 рассматривается в качестве перспективной мишени и для лечения поздних стадий СНС, когда требуется воздействовать одновременно на сложный патологический процесс в тканях печени – вирусную инфекцию, клеточное старение и злокачественную трансформацию [76].

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант 20-04-00504) и Российского научного фонда (грант 23-24-00542).

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов исследований.

Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Malaguarnera M., Di Fazio I., Romeo M.A., Restuccia S., Laurino A., Trovato B.A. (1997) Elevation of interleukin 6 levels in patients with chronic hepatitis due to hepatitis C virus. *J. Gastroenterol.* **32**, 211–215.
2. Zhu H., Shang X., Terada N., Liu C. (2004) STAT3 induces anti-hepatitis C viral activity in liver cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **324**, 518–528.
3. Hentze M.W., Muckenthaler M.U., Galy B., Camaschella C. (2010) Two to tango: regulation of mammalian iron metabolism. *Cell.* **142**, 24–38.
4. Roth M.P., Meynard D., Coppin H. (2019) Regulators of hepcidin expression. *Vitam. Horm.* **110**, 101–129.
5. Wrighting D.M., Andrews N.C. (2006) Interleukin-6 induces hepcidin expression through STAT3. *Blood.* **108**, 3204–3209.
6. Falzacappa V.M.V., Spasic V.M., Kessler R., Stolte J., Hentze M.W., Muckenthaler M.U. (2007) STAT3 mediates hepatic hepcidin expression and its inflammatory stimulation. *Blood.* **109**, 353–358.
7. Choi S.O., Cho Y.S., Kim H.L., Park J.W. (2007) ROS mediate the hypoxic repression of the hepcidin gene by inhibiting C/EBP α and STAT-3. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **356**, 312–317.
8. Shi D., Xie F., Zhai C., Stern J.S., Liu Y., Liu S. (2009) The role of cellular oxidative stress in regulating glycolysis energy metabolism in hepatoma cells. *Mol. Cancer.* **8**(1), 32.
9. Miura K., Taura K., Kodama Y., Schnabl B., Brenner D.A. (2008) Hepatitis C virus-induced oxidative stress suppresses hepcidin expression through increased histone deacetylase activity. *Hepatology.* **48**, 1420–1429.
10. Sato A., Saito Y., Sugiyama K., Sakasegawa N., Muramatsu T., Fukuda S., Yoneya M., Kimura M., Ebinuma H., Hibi T., Saito H. (2013) Suppressive effect of the histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) on hepatitis C virus replication. *J. Cell. Biochem.* **114**, 1987–1996.
11. Lee J.Y., Cortese M., Haselmann U., Tabata K., Romero-Brey I., Funaya C., Schieber N.L., Qiang Y., Bartenschlager M., Kallis S., Ritter C., Rohr K., Schwab Y., Ruggieri A., Bartenschlager R. (2019) Spatiotemporal coupling of the hepatitis C virus replication cycle by creating a lipid droplet-proximal membranous replication compartment. *Cell Rep.* **27**, 3602–3617.
12. Kamimura D., Ishihara K., Hirano T. (2003) IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* **149**, 1–38.
13. Littlewood T.D., Hancock D.C., Danielian P.S., Parker M.G., Evan G.I. (1995) A modified estrogen receptor ligand-binding domain as an improved switch for the regulation of heterologous proteins. *Nucl. Acids Res.* **23**, 1686–1690.
14. Matsuda T., Nakamura T., Nakao K., Arai T., Katsuki M., Heike T., Yokota T. (1999) STAT3 activation is sufficient to maintain an undifferentiated state of mouse embryonic stem cells. *EMBO J.* **18**, 4261–4269.
15. Zhu H., Liu C. (2003) Interleukin-1 inhibits hepatitis C virus subgenomic RNA replication by activation of extracellular regulated kinase pathway. *J. Virol.* **77**, 5493–5498.

16. Yao L., Dong H., Zhu H., Nelson D., Liu C., Lambiase L., Li X. (2011) Identification of the *IFITM3* gene as an inhibitor of hepatitis C viral translation in a stable STAT1 cell line. *J. Viral Hepat.* **18**(10), e523–e529.
17. Amini-Bavil-Olyae S., Choi Y.J., Lee J.H., Shi M., Huang I.C., Farzan M., Jung J.U. (2013) The antiviral effector IFITM3 disrupts intracellular cholesterol homeostasis to block viral entry. *Cell Host Microbe.* **13**, 452–464.
18. Narayana S.K., Helbig K.J., McCartney E.M., Eyre N.S., Bull R.A., Eltahlia A., Lloyd A.R., Beard M.R. (2015) The interferon-induced transmembrane proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 inhibit hepatitis C virus entry. *J. Biol. Chem.* **290**, 25946–25959.
19. Neefjes J., Cabukusta B. (2021) What the VAP: The expanded VAP family of proteins interacting with FFAT and FFAT-related motifs for interorganellar contact. *Contact.* **4**, 1–11.
20. Paul D., Hoppe S., Saher G., Krijnse-Locker J., Bartschlag R. (2013) Morphological and biochemical characterization of the membranous hepatitis C virus replication compartment. *J. Virol.* **87**, 10612–10627.
21. Bailey C.C., Kondur H.R., Huang I.-C., Farzan M. (2013) Interferon-induced transmembrane protein 3 is a type II transmembrane protein. *J. Biol. Chem.* **288**, 32184–32193.
22. Helbig K.J., Beard M.R. (2014) The role of viperin in the innate antiviral response. *J. Mol. Biol.* **426**, 1210–1219.
23. Hosui A., Ohkawa K., Ishida H., Sato A., Nakanishi F., Ueda K., Takehara T., Kasahara A., Sasaki Y., Hori M., Hayashi N. (2003) Hepatitis C virus core protein differentially regulates the JAK-STAT signaling pathway under interleukin-6 and interferon- γ stimuli. *J. Biol. Chem.* **278**, 28562–28571.
24. Lee C. (2013) Interaction of hepatitis C virus core protein with Janus kinase is required for efficient production of infectious viruses. *Biomol. Ther.* **21**, 97–106.
25. Larrea E., Aldabe R., Molano E., Fernandez-Rodriguez C., Ametzazurra A., Civeira M., Prieto J. (2006) Altered expression and activation of signal transducers and activators of transcription (STATs) in hepatitis C virus infection: *in vivo* and *in vitro* studies. *Gut.* **55**, 1188–1196.
26. Stevenson N.J., Bourke N.M., Ryan E.J., Binder M., Fanning L., Johnston J.A., John E. Hegarty J.E., Long A., O'Farrelly C. (2013) Hepatitis C virus targets the interferon- α JAK/STAT pathway by promoting proteasomal degradation in immune cells and hepatocytes. *FEBS Lett.* **587**, 1571–1578.
27. Nemeth E., Tuttle M.S., Powelson J., Vaughn M.B., Donovan A., Ward D.M. (2004) Hepcidin regulates cellular iron efflux by binding to ferroportin and inducing its internalization. *Science.* **306**, 2090–2093.
28. De Domenico I., Lo E., Ward D.M., Kaplan J. (2009) Hepcidin-induced internalization of ferroportin requires binding and cooperative interaction with Jak2. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **106**, 3800–3805.
29. Ramey G., Deschemin J.C., Durel B., Canonne-Hergaux F., Nicolas G., Vaulont S. (2009) Hepcidin targets ferroportin for degradation in hepatocytes. *Haematologica.* **95**, 501–504.
30. Georgopoulou U., Dimitriadis A., Foka P., Karamichali E., Mamalaki A. (2014) Hepcidin and the iron enigma in HCV infection. *Virulence.* **5**, 465–476.
31. Zou D.M., Sun W.L. (2017) Relationship between hepatitis C virus infection and iron overload. *Chin. Med. J.* **130**, 866–871.
32. Fillebeen C., Rivas-Estilla A.M., Bisailon M., Ponka P., Muckenthaler M., Hentze M.W., Koromilas A.E., Pantopoulos K. (2005) Iron inactivates the RNA polymerase NS5B and suppresses subgenomic replication of hepatitis C virus. *J. Biol. Chem.* **280**, 9049–9057.
33. Fillebeen C., Pantopoulos K. (2010) Iron inhibits replication of infectious hepatitis C virus in permissive Huh7.5.1 cells. *J. Hepatol.* **53**, 995–999.
34. Theurl I., Zoller H., Obrist P., Datz C., Bachmann F., Elliott R. M., Weiss G. (2004) Iron regulates hepatitis C virus translation via stimulation of expression of translation initiation factor 3. *J. Infect. Dis.* **190**, 819–825.
35. Liu H., Trinh T.L., Dong H., Keith R., Nelson D., Liu C. (2012) Iron regulator hepcidin exhibits antiviral activity against hepatitis C virus. *PLoS One.* **7**(10), e46631.
36. Wang R., Zhao S., Du J., Qiao J., Li W., Nan Y. (2021) A correlation analysis of the serum hepcidin concentrations and viral loads in HCV-infected patients. *Am. J. Transl. Res.* **13**, 6297–6304.
37. De Domenico I., Zhang T.Y., Koenig C.L., Branch R.W., London N., Lo E., Daynes R.A., Kushner J.P., Li D., Ward D.M., Kaplan J. (2010) Hepcidin mediates transcriptional changes that modulate acute cytokine-induced inflammatory responses in mice. *J. Clin. Invest.* **120**, 2395–2405.
38. Seto E., Yoshida M. (2014) Erasers of histone acetylation: the histone deacetylase enzymes. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **6**, a018713.
39. Martin M., Kettmann R., Dequiedt F. (2007) Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. *Oncogen.* **26**, 5450–5467.
40. Pasricha S.R., Lim P.J., Duarte T.L., Casu C., Oosterhuis D., Mleczko-Sanecka K., Suci M., Da Silva A.R., Al-Hourani K., Arezes J., McHugh K., Gooding S., Frost J.N., Wray K., Santos A., Porto G., Repapi E., Gray N., Draper S.J., Ashley N., Soilleux E., Olinga P., Muckenthaler M.U., Hughes J.R., Rivella S., Milne T.A., Armitage A.E., Drakesmith H. (2017) Hepcidin is regulated by promoter-associated histone acetylation and HDAC3. *Nat. Commun.* **8**(1), 403.
41. Wilson A.J., Byun D.S., Popova N., Murray L.B., L'Italien K., Sowa Y., Arango D., Velcich A., Leonard H., Augenlicht L.H., Mariadason J.M. (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J. Biol. Chem.* **281**, 13548–13558.
42. Li J., Wang J., Wang J.X., Nawaz Z., Liu J.M., Qin J. (2000) Both corepressor proteins SMRT and N-CoR exist in large protein complexes containing HDAC3. *EMBO J.* **19**, 4342–4350.
43. You S.H., Lim H.W., Sun Z., Broache M., Won K.J., Lazar M.A. (2013) Nuclear receptor co-repressors are required for the histone-deacetylase activity of HDAC3 *in vivo*. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **20**, 182–187.

44. Yu J., Li Y., Ishizuka T., Guenther M.G., Lazar M.A. (2003) A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J.* **22**, 3403–3410.
45. Mottis A., Mouchiroud L., Auwerx J. (2013) Emerging roles of the corepressors NCoR1 and SMRT in homeostasis. *Genes Dev.* **27**, 819–835.
46. Watson P.J., Fairall L., Santos G.M., Schwabe J.W.R. (2012) Structure of HDAC3 bound to co-repressor and inositol tetrakisphosphate. *Nature.* **481**, 335–340.
47. Watson P.J., Millard C.J., Riley A.M., Robertson N.S., Wright L.C., Godage H.Y., Cowley S.M., Jamieson A.G., Potter B.V., Schwabe J.W. (2016) Insights into the activation mechanism of class I HDAC complexes by inositol phosphates. *Nat. Commun.* **7**, 11262.
48. Fernandez-Marcos P.J., Nóbrega-Pereira S. (2016) NADPH: new oxygen for the ROS theory of aging. *Oncotarget.* **7**, 50814–50815.
49. Moreno-Sánchez R., Marín-Hernández Á., Gallardo-Pérez J.C., Vázquez C., Rodríguez-Enríquez S., Saavedra E. (2018) Control of the NADPH supply and GSH recycling for oxidative stress management in hepatoma and liver mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta – Bioenerg.* **1859**, 1138–1150.
50. Li W., Kou J., Qin J., Li L., Zhang Z., Pan Y., Xue Y., Du W. (2021) NADPH levels affect cellular epigenetic state by inhibiting HDAC3–Ncor complex. *Nat. Metab.* **3**, 75–89.
51. Boudreau H.E., Emerson S.U., Korzeniowska A., Jendrysik M.A., Leto T.L. (2009) Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J. Virol.* **83**, 12934–12946.
52. Smirnova O.A., Ivanova O.N., Bartosch B., Valuev-Elliston V.T., Mukhtarov F., Kochetkov S.N., Ivanov A.V. (2016) Hepatitis C virus NS5A protein triggers oxidative stress by inducing NADPH oxidases 1 and 4 and cytochrome P450 2E1. *Oxid. Med. Cell Longev.* **2016**, 1–10.
53. Barbaro G., Lorenzo G.D., Ribersani M., Soldini M., Giancaspro G., Bellomo G., Belloni G., Grisorio B., Barbarini G. (1999) Serum ferritin and hepatic glutathione concentrations in chronic hepatitis C patients related to the hepatitis C virus genotype. *J. Hepatol.* **30**, 774–782.
54. Venturini D., Simão A.N.C., Barbosa D.S., Lavado E.L., Narciso V.E.S., Dichi I., Dichi J.B. (2009) Increased oxidative stress, decreased total antioxidant capacity, and iron overload in untreated patients with chronic hepatitis C. *Dig. Dis. Sci.* **55**, 1120–1127.
55. Razaq Z., Malik A. (2014) Viral load is associated with abnormal serum levels of micronutrients and glutathione and glutathione-dependent enzymes in genotype 3 HCV patients. *Biochim. Biophys. Acta Clin.* **2**, 72–78.
56. Müller L., Hainberger D., Stolz V., Ellmeier W. (2018) NCoR1—a new player on the field of T cell development. *J. Leukoc. Biol.* **104**, 1061–1068.
57. Sun Z., Xu Y. (2020) Nuclear receptor coactivators (NCOAs) and corepressors (NCORs) in the brain. *Endocrinology.* **161**, 1–12.
58. Kong Y., Zhou W., Sun Z. (2020) Nuclear receptor corepressors in intellectual disability and autism. *Mol. Psychiatry.* **25**, 2220–2236.
59. Emmett M.J., Lazar M.A. (2019) Integrative regulation of physiology by histone deacetylase 3. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **20**, 102–115.
60. Wingelhofer B., Neubauer H.A., Valent P., Han X., Constantinescu S.N., Gunning P.T., Müller M., Moriggl R. (2018) Implications of STAT3 and STAT5 signaling on gene regulation and chromatin remodeling in hematopoietic cancer. *Leukemia.* **32**, 1713–1726.
61. Bottomley M.J., Lo Surdo P., Di Giovine P., Cirillo A., Scarpelli R., Ferrigno F., Jones P., Neddermann P., De Francesco R., Steinkuhler C., Gallinari P., Carfi A. (2008) Structural and functional analysis of the human HDAC4 catalytic domain reveals a regulatory structural zinc-binding domain. *J. Biol. Chem.* **283**, 26694–26704.
62. Park S.Y., Kim G.S., Hwang H.J., Nam T.H., Park H.S., Song J., Jang T.H., Lee Y.C., Kim J.S. (2018) Structural basis of the specific interaction of SMRT corepressor with histone deacetylase 4. *Nucl. Acids Res.* **46**, 11776–11788.
63. Park S.Y., Kim J.S. (2020) A short guide to histone deacetylases including recent progress on class II enzymes. *Exp. Mol. Med.* **52**, 204–212.
64. Zhuang S. (2013) Regulation of STAT signaling by acetylation. *Cell. Signal.* **25**, 1924–1931.
65. Yuan Z., Guan Y., Chatterjee D., Chin E. (2005) STAT3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science.* **307**, 269–273.
66. Yu J., Li Y., Ishizuka T., Guenther M.G., Lazar M.A. (2003) A SANT motif in the SMRT corepressor interprets the histone code and promotes histone deacetylation. *EMBO J.* **22**, 3403–3410.
67. Yoon H.G., Chan D.W., Huang Z.Q., Li J., Fondell J.D., Jun Qin J., Wong J. (2003) Purification and functional characterization of the human N-CoR complex: the roles of HDAC3, TBL1 and TBLR1. *EMBO J.* **22**, 1336–1346.
68. Yoon H.G., Choi Y., Cole P.A., Wong J. (2005) Reading and function of a histone code involved in targeting corepressor complexes for repression. *Mol. Cell. Biol.* **25**, 324–335.
69. Giraud S., Bienvenu F., Avril S., Gascan H., Heery D.M., Coqueret O. (2001) Functional interaction of STAT3 transcription factor with the coactivator NcoA/SRC1a. *J. Biol. Chem.* **277**, 8004–8011.
70. Xu J., Wu R.C., O’Malle B.W. (2009) Normal and cancer-related functions of the p160 steroid receptor coactivator (SRC) family. *Nat. Rev. Cancer.* **9**, 615–630.
71. Jopling C.L. (2008) Regulation of hepatitis C virus by microRNA-122. *Biochem. Soc. Trans.* **36**, 1220–1223.
72. Zhou Y., Wang Q., Yang Q., Tang J., Xu C., Gai D., Chen X., Chen J. (2018) Histone deacetylase 3 inhibitor suppresses hepatitis C virus replication by regulating Apo-A1 and LEAP-1 expression. *Viol. Sin.* **33**, 418–428.
73. Kim K., Lee Y., Jeong S., Kim D., Chon S., Pak Y. K., Kim S., Ha J., Kang I., Choe W. (2020) A small molecule, 4-phenylbutyric acid, suppresses HCV replication

- via epigenetically induced hepatic hepcidin. *Int. J. Mol. Sci.* **21**(15), 5516.
74. Kozlov M.V., Konduktorov K.A., Shcherbakova A.S., Kochetkov S.N. (2019) Synthesis of N'-propylhydrazide analogs of hydroxamic inhibitors of histone deacetylases (HDACs) and evaluation of their impact on activities of HDACs and replication of hepatitis C virus (HCV). *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **29**, 2369–2374.
75. McClure J.J., Zhang C., Inks E.S., Peterson Y.K., Li J., Chou C.J. (2016) Development of allosteric hydrazide-containing class I histone deacetylase inhibitors for use in acute myeloid leukemia. *J. Med. Chem.* **59**, 9942–9959.
76. Malikova A.Z., Shcherbakova A.S., Konduktorov K.A., Zemskaya A.S., Dalina A.A., Popenko V.I., Leonova O.G., Morozov A.V., Kurochkin N.N., Smirnova O.A., Kochetkov S.N., Kozlov M.V. (2021) Pre-senescence induction in hepatoma cells favors hepatitis C virus replication and can be used in exploring antiviral potential of histone deacetylase inhibitors. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4559.

How Histone Deacetylase 3 Controls Hepcidin Expression and Hepatitis C Virus Replication

A. S. Shcherbakova¹, S. N. Kochetkov¹, and M. V. Kozlov^{1, *}

¹Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia

*e-mail: kozlovmavi@gmail.com

The key role of histone deacetylases (HDACs) in the regulation of the cellular response to infection with the hepatitis C virus (HCV) was first demonstrated in 2008. Studying the metabolism of iron in the liver tissues of patients with chronic hepatitis C, the authors found that the expression of the hepcidin gene (*HAMP*), a hormone regulator of iron export, is markedly reduced in hepatocytes under conditions of oxidative stress caused by viral infection. HDACs were involved in the regulation of hepcidin expression through the control of acetylation level of histones and transcription factors, primarily STAT3, associated with the *HAMP* promoter. The purpose of this review is to summarize current data on the functioning of the HCV-HDAC3-STAT3-*HAMP* regulatory circuit as an example of a well-characterized interaction between the virus and the epigenetic apparatus of the host cell.

Keywords: hepatitis C virus, replication, STAT3, hepcidin, oxidative stress, histone deacetylase 3, expression regulation