

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ  
ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ  
ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «ПЕРВЫЙ МОСКОВСКИЙ  
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ МЕДИЦИНСКИЙ  
УНИВЕРСИТЕТ имени И.М. СЕЧЕНОВА МИНИСТЕРСТВА  
ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ (СЕЧЕНОВСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ)»

*На правах рукописи*

**Костюшев Дмитрий Сергеевич**

**Принципы полной элиминации вируса гепатита В**

1.5.10. Вирусология

**ДИССЕРТАЦИЯ**

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Научный консультант:  
доктор медицинских наук,  
Чуланов Владимир Петрович

Москва – 2024

## ОГЛАВЛЕНИЕ

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ .....	6
ВВЕДЕНИЕ.....	7
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ .....	21
1. 1. Вирус гепатита В: молекулярно-эпидемиологические особенности .....	21
1.1.1 Структура вириона и организация генома вируса гепатита В	21
1.1.2. Современные особенности эпидемиологии гепатита В.....	22
1.1.3. Генетическая гетерогенность и квазивид вируса гепатита В .....	25
1.1.4. Эпигенетические особенности генотипов вируса гепатита В .....	26
1.1.5. Влияние генотипов на клиническое течение хронического гепатита В .....	30
1.1.6. Жизненный цикл вируса гепатита В и взаимодействие вируса с инфицированными клетками .....	31
1.1.7. Молекулярные детерминанты инфицирования гепатоцитов вирусом гепатита В.....	38
1.1.8. Abortивная репликация, образование двуцепочечной линейной ДНК и ДНК-интеграций вируса.....	40
1.1.9. Транскрипция и эпигенетическая регуляция кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В.....	44
1.1.10. Ре-инфекция и ре-циклирование кольцевой частично двуцепочечной ДНК вируса.....	47
1.1.11. Лечение хронического гепатита В .....	52
1.2. Манипуляция генетической информацией с помощью молекулярных инструментов CRISPR/Cas.....	58
1.2.1. Применение CRISPRa/i .....	65
1.2.2. Редактирование нуклеиновых кислот.....	68
1.2.2.1. Редактирование оснований ДНК с помощью инструментов dCas .....	68
1.2.2.2. Редактирование РНК с помощью инструментов dCas.....	69
1.2.2.3. Области применения систем CRISPR на основе dCas .....	70
1.3. Характеристики систем CRISPR/Cas .....	74
1.3.1. История открытия и основные принципы функционирования систем CRISPR/Cas.....	74
1.3.2. Краткая номенклатура систем CRISPR/Cas и их характеристики.....	74

1.3.2.1.	Системы класса 1.....	75
1.3.2.2.	Системы класса 2.....	75
1.4.	Взаимодействие вирусов с инфицированной клеткой.....	77
1.4.1.	Распознавание чужеродной ДНК сенсорами цитозольной и ядерной ДНК.....	77
1.4.2.	Подавление проникновения вирусов в клетку.....	78
1.4.3.	Нарушение трансляции вирусов.....	79
1.4.4.	Ограничение репликации вирусных нуклеиновых кислот.....	79
1.4.5.	Индукция воспалительного ответа.....	81
Глава 2.	МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	88
2.1.	Клеточные линии и условия культивирования.....	88
2.2.	Трансфекция и нуклеофекция.....	89
2.3.	Инфекция вирусом гепатита В.....	90
2.4.	Получение рекомбинантной ккзДНК вируса гепатита В и ее метилирование.....	91
2.5.	Получение лентивирусов и лентивирусная трансдукция.....	91
2.6.	Дизайн РНК-проводников.....	92
2.7.	Получение рекомбинантных белков StCas9 и dSaCas9-p300.....	93
2.8.	<i>In vitro</i> транскрипция РНК-проводников.....	93
2.9.	Дизайн и синтез аттенуированных РНК-проводников.....	94
2.10.	Дизайн кодирующих РНК-проводники для нуклеолитических CRISPR/Cas9 систем и систем активации транскрипции.....	94
2.11.	Реакция <i>in vitro</i> расщепления.....	94
2.12.	Оценка целевой и внецелевой активности.....	94
2.13.	Выделение нуклеиновых кислот.....	95
2.14.	ПЦР-анализ.....	95
2.15.	Проточная цитофлуориметрия.....	95
2.16.	Иммуноцитохимия и иммуногистохимия.....	95
2.17.	Низкомолекулярные соединения.....	96
2.18.	Флуоресцентная микроскопия.....	97
2.19.	Анализ пролиферации и жизнеспособности.....	97
2.20.	Анализ клеточного цикла.....	97
2.21.	Метод ДНК-комет.....	98
2.22.	Вестерн-блоттинг.....	98
2.23.	Саузерн-блоттинг.....	99

2.24. Исследования <i>in vivo</i> .....	99
2.25. Анализ фокусов $\gamma$ -H2AX и 53BP1.....	100
2.26. 3D-PCR.....	100
2.27. Синтез коротких шпилечных РНК.....	100
2.28. Бисульфитное секвенирование.....	101
2.29. Биоинформатический анализ данных.....	101
2.30. ChIP-ПЦР.....	101
2.31. Метод <i>microarray</i> .....	102
2.32. Определение контекста дезаминирования нуклеотидов.....	102
2.33. Конструкты CRISPR/Cas.....	102
2.34. Анализ апоптоза.....	103
2.35. Количественное и полуколичественное определение секретируемого HBsAg.....	103
2.36. Получение рибонуклеопротеиновых комплексов.....	103
2.37. Статистический анализ данных.....	104
РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.....	104
Глава 3. Разрушение основной формы генома вируса гепатита В при действии сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9.....	104
3.1. Разработка подходов по расщеплению генома вируса гепатита В генетически-модифицированными вариантами CRISPR/Cas9 нуклеаз .....	104
3.2. Переключение между путями NHEJ и MMEJ определяет судьбу ккзДНК ВГВ после расщепления системами CRISPR/Cas9.....	111
3.3. Исходом расщепления генома вируса гепатита В системами CRISPR/Cas9 является преимущественное разрушение ккзДНК вируса.....	124
3.4. Нарушение функционирования NHEJ индуцирует эффективную репарацию нуклеолитических разрывов в ккзДНК ВГВ с формированием сложного паттерна делеций.....	129
Глава 4. Ре-импорт кольцевой частично-двуцепочечной ДНК (кчдДНК) ВГВ обеспечивает персистенцию вируса и хронизацию инфекции....	133
4.1. Короткоживущие рибонуклеопротеиновые комплексы удаляют кольцевую ковалентно замкнутую ДНК вируса гепатита В при однократном использовании.....	133
4.2. Отсутствие внецелевой активности рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 в клетках человека.....	140

4.3. Восстановление вирусной репликации после действия CRISPR/Cas9 .....	141
4.4. Подавление обратной транскрипции вируса предотвращает реактивацию инфекции после действия CRISPR/Cas9 .....	142
4.5. Оценка комбинированного действия CRISPR/Cas9 и ингибитора обратной транскрипции вируса на моделях инфекции.....	144
Глава 5. Влияние метилирования ккзДНК ВГВ и НВх-белка на нуклеолитическое действие CRISPR/Cas9 и реактивацию вирусной инфекции.....	148
5.1. ДНК-метилтрансферазы подавляют транскрипцию и репликацию вируса гепатита В, но увеличивают пул кольцевой ковалентно замкнутой ДНК .....	148
5.2. ДНК-метилирование нарушает расщепление генома вируса гепатита В нуклеазой StCas9 <i>in vitro</i> .....	151
5.3. Особенности нуклеотидного состава генома ВГВ во взаимодействии CRISPR/Cas9 с метилированными участками вирусных геномов .....	153
5.4. Снижение противовирусного действия сайт-направленных нуклеаз при гиперметилировании ккзДНК ВГВ на моделях хронической репликации ВГВ <i>in vitro</i> .....	156
5.5. Повреждение генома клеток человека вызывает резкое усиление репликации вируса гепатита В .....	158
5.6. Реактивация вируса гепатита В при повреждении генома связана с транскрипционной активацией факторов ATM и ATR.....	164
5.7. Транскрипционно-инактивированная форма генома вируса гепатита В может реактивировать вирусную репликацию при участии белка НВх.....	171
5.8. Белок НВх потенцирует влияние ДНК-повреждающих агентов на репликацию и реактивацию метилированной и не метилированной ккзДНК вируса гепатита В.....	176
5.9. Эффекты НВх на действие сайт-направленных нуклеаз .....	181
Глава 6. Влияние факторов АРОВЕС/AID на репликацию вируса гепатита В и клетки человека .....	185
6.1. Усиление образования ккзДНК при подавлении транскрипции вируса гепатита В ассоциировано со снижением экспрессии противовирусных факторов .....	185
6.2. Базальные уровни экспрессии АРОВЕС3А и АРОВЕС3В ограничивают пополнение ккзДНК из формы-предшественника...	190

6.3. Особенности активации генов APOBEC/AID системой CRISPRa dCas9-p300 .....	195
6.4. CRISPR-активация APOBEC/AID вызывает разрушение эписомальной, но не интегрированной матрицы чужеродной ДНК	204
6.5. Динамика дезаминирования и профиль мутаций ккзДНК вируса гепатита В при действии APOBEC/AID .....	213
6.6. Токсические и мутагенные эффекты транзientной гиперэкспрессии APOBEC/AID зависят от уровней вирусной репликации .....	217
6.7. Разработка способа контроля экспрессии и противовирусной активности APOBEC/AID за счет использования аттенуированных РНК-проводников CRISPR/Cas .....	224
6.8. Использование рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPRa и аттенуированных РНК-проводников для элиминации токсических и мутагенных свойств APOBEC/AID .....	227
6.9. Эффекты транзientной гиперэкспрессии APOBEC/AID на моделях инфекции вируса гепатита В .....	229
ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ .....	233
БЛАГОДАРНОСТИ .....	234
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ .....	234

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ВГВ – вирус гепатита В

ккзДНК – кольцевая ковалентно замкнутая ДНК

кчдДНК – кольцевая частично двуцепочечная ДНК

LAM – (англ.) lamivudine

АРОВЕС/AID – (англ.) apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide/activation-induced cytidine deaminase

CRISPR/Cas – (англ.) clustered regularly interspaced short palindromic repeats/CRISPR-associated protein

РНП – рибонуклеопротеиновые комплексы

Att-РНК-проводник – аттенуированный РНК-проводник

A3A/APO3A – АРОВЕС3А

A3B/APO3B – АРОВЕС3В

A3G – АРОВЕС3G

CRISPRa – CRISPR-активация

ДЦР – двуцепочечные разрывы

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита В (ВГВ), представитель семейства *Hepadnaviridae*, при попадании в организм человека инфицирует клетки печени - гепатоциты и вызывает острый либо хронический гепатит В (ХГВ). Инфицирование ВГВ может происходить следующими способами: перинатально, в результате горизонтального трансфера через кровь, или при половом контакте. В случае острого гепатита происходит быстрый клиренс ВГВ-инфицированных клеток с установлением иммунологического контроля над клетками, в которых сохраняется остаточная вирусная репликация (геном ВГВ и вирусные интермедиаты могут оставаться в гепатоцитах печени в течение всей жизни человека). При ХГВ, инфекция переходит в хроническую форму, что главным образом связано с подавлением адаптивного и врожденного звеньев иммунитета и образованием стабильного «депо» вируса в ядрах инфицированных клеток в виде кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) вируса [1]. В ходе длительной персистенции ВГВ, происходит цитолиз гепатоцитов, что в конечном счете приводит к замещению погибших клеток фиброзной тканью с исходом в цирроз печени. ХГВ также является самой частой причиной рака печени в мире (около 50% всех случаев рака печени связаны с ВГВ-инфекцией).

Данные палеоэпидемиологии указывают на то, что ВГВ был широко распространен на территории Евразии в течение нескольких последних тысячелетий, по крайней мере с Бронзового Века. Следовательно, ВГВ – одна из наиболее древних хронических инфекций человека; ВГВ-инфекция распространена по всему земному шару, при этом распределение генотипов и субтипов вируса неравномерно, и зависит от географического региона. Барух Блумберг, открывший ВГВ у аборигенов Австралии, еще в 1986 году зарегистрировал вакцину, которая эффективно предотвращает вирусную инфекцию. В Российской Федерации разработана одна из наиболее эффективных программ вакцинации против ВГВ-инфекции. Однако, внедрение программы вакцинации привело к снижению только количества случаев острой инфекции, в то время как число хронически инфицированных лиц в Российской Федерации ежегодно остается на прежнем уровне в течение нескольких последних десятилетий. Распространенность ХГВ в Российской Федерации составляет ~2%. Всего в мире насчитывается свыше 290 миллионов пациентов, хронически инфицированных ВГВ, при этом большая часть случаев ХГВ приходится на страны Азиатско-Тихоокеанского региона, Африки и бассейна Амазонки; ежегодно около 900 тысяч человек в мире умирает от исходов ХГВ.

Разработка препаратов для лечения ХГВ – одно из приоритетных направлений исследований во всем мире. Для подавления вирусной репликации используются

ингибиторы обратной транскриптазы ВГВ – аналоги нуклеот(з)идов (ламивудин, энтекавир, адефовир, тенофовир и его производные и др.), препараты пегилированного интерферона и ингибитор проникновения ВГВ в клетки булевиртид. На различных этапах разработки находятся препараты, прерывающие/подавляющие практически каждый этап вирусной репликации. Однако, проблема ХГВ до сих пор не решена. В подавляющем большинстве случаев препараты необходимо принимать пожизненно (для аналогов нуклеот(з)идов), поскольку прекращение приема приводит к реактивации ВГВ-инфекции. Восстановление вирусной репликации связывают с высокой стабильностью и персистентностью внутриядерной кольцевой формы генома ВГВ – кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК), а также с многочисленными нарушениями иммунного ответа. Инактивацию и разрушение ккзДНК ВГВ рассматривают в качестве ключевого условия полной элиминации ВГВ-инфекции и выздоровления пациентов с ХГВ.

Среди существующих и перспективных лекарственных препаратов и молекулярных инструментов, системы сайт-направленных нуклеаз – единственные, способные напрямую взаимодействовать с целевыми последовательностями ккзДНК ВГВ, расщеплять и инактивировать вирусные геномы. К системам сайт-направленных нуклеаз относятся системы цинковых пальцев, мегануклеазы, нуклеазы TALEs и CRISPR/Cas. Последние считаются наиболее перспективными в связи с простотой их дизайна, программирования, а также возможностью всесторонней модификации компонентов CRISPR/Cas. Системы CRISPR/Cas – представляют из себя системы противовирусного иммунитета бактерий и архей. Впервые локусы CRISPR/Cas были описаны еще в 1960-х годах, но лишь в 2010-х годах было предложено использовать CRISPR/Cas для модификации последовательностей нуклеиновых кислот и редактирования генома. Работы по использованию CRISPR/Cas для расщепления и инактивации ккзДНК ВГВ ведутся с 2013 года. Несмотря на воодушевляющие результаты и инактивацию до 99% всех вирусных геномов в экспериментальных условиях полной элиминации ВГВ-инфекции из клеток с помощью CRISPR/Cas до сих пор не удалось достичь.

Помимо этого, в 2000-2020-х годах было продемонстрировано, что внутриклеточные факторы семейства цитидиндезаминаз APOBEC/AID могут оказывать противовирусное действие в отношении ВГВ по различным механизмам. Факторы APOBEC/AID на сегодняшний день представляют собой единственный пример внутриклеточных факторов, способных к селективному взаимодействию с геномами ВГВ и их инактивации. Цитидиндезаминазы APOBEC/AID связываются с ккзДНК ВГВ при участии вирусного белка HBs, и воздействуют на ряд этапов вирусной репликации. APOBEC/AID способны

дезаминировать цитидиновые нуклеотиды ДНК, вызывая образование мутаций по типу С→Т и G→A, а в случае обширного дезаминирования генома ВГВ запускать разрушение вирусных ДНК. В ранних работах была продемонстрирована способность АРОВЕС/AID подавлять этап обратной транскрипции ВГВ, формировать мутации в кольцевой частично двуцепочечной формы ДНК ВГВ, а также напрямую воздействовать на ккзДНК ВГВ с индукцией дезаминирования (мутационной инактивации) и расщепления геномов (при участии факторов UNG и, вероятно, ISG20). Гиперпродукцию АРОВЕС/AID с использованием кодирующих векторов в качестве противовирусного подхода реализовать невозможно в связи с токсичностью данных факторов при их длительной и/или высокой экспрессии. Действительно, гиперпродукция АРОВЕС/AID ассоциирована с развитием многочисленных видов онкологических заболеваний, поскольку АРОВЕС/AID являются, помимо факторов противовирусной защиты, важными драйверами онкотрансформации. Следовательно, для практического использования АРОВЕС/AID необходима разработка подходов по регулируемой и контролируемой продукции АРОВЕС/AID. Был предложен ряд индукторов и факторов увеличения противовирусной эффективности АРОВЕС/AID. В 2014 году АРОВЕС3А и АРОВЕС3В стали рассматриваться как основные кандидаты для обеспечения полной элиминации инфекции; было показано, что данные факторы действуют напрямую на ккзДНК и не действуют на геном инфицированных клеток. Однако, безопасная и эффективная активация АРОВЕС/AID до сих пор не реализована. Помимо этого, опубликован ряд свидетельств низкой эффективности действия АРОВЕС/AID непосредственно на ккзДНК. Следовательно, необходимо с одной стороны создание новых методов контролируемой регуляции активности АРОВЕС/AID и, с другой стороны, определение молекулярных детерминант, способных обеспечить эффективное противовирусное действие данных факторов с разрушением пула ккзДНК.

Несмотря на впечатляющие результаты при использовании указанных факторов и молекулярных инструментов, полной элиминации вирусной инфекции и ккзДНК ВГВ до сих пор добиться не удавалось. Причинами этого могут являться сложные и не полностью изученные механизмы персистенции и репликации вируса и особенности реактивации ВГВ, а также роль эпигенетических модификаций ккзДНК ВГВ в поддержании хронической инфекции.

**Целью** данной работы является определение ключевых компонентов жизненного цикла вируса гепатита В, имеющих значение для вирусной персистенции, репликации, хронизации и реактивации инфекции, разработка новых и эффективное использование существующих противовирусных препаратов для лечения хронического гепатита В.

Для достижения намеченной цели было необходимо решить следующие **задачи**:

В работе были поставлены и решены следующие задачи:

1) Определить роль различных форм генома ВГВ в персистенции и реактивации вируса. В рамках этой задачи были проведены:

- Изучение вирусной репликации при конститутивной экспрессии и кратковременном воздействии CRISPR/Cas9-нуклеаз, направленных к ккзДНК ВГВ.
- Анализ вирусного цикла в динамике при действии аналогов нуклеозидов и CRISPR/Cas9-нуклеаз.
- Оценка содержания различных форм генома ВГВ в инфицированных клетках с помощью Саузерн-блоттинга.

2) Разработать подход для наиболее эффективного расщепления ккзДНК ВГВ. В рамках этой задачи были проведены:

- Оценка влияния модификаций шпилек РНК-проводников и вариантов Cas9 белков на противовирусную активность CRISPR/Cas9 систем.
- Изучение влияния вирусного белка HBx и мутированных вариантов белка HBx на противовирусное действие CRISPR/Cas9 систем.
- Проведение анализа влияния низкомолекулярных соединений-ингибиторов путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК на противовирусное действие CRISPR/Cas9 систем.
- Разработка подхода по расщеплению ккзДНК ВГВ с помощью короткоживущих CRISPR/Cas9 рибонуклеопротеиновых комплексов.
- Изучение параметров репликации ВГВ на модели мышей *in vivo* при кратковременном воздействии противовирусными CRISPR/Cas9 комплексами.

3) Изучить исходы нуклеолитического расщепления ккзДНК ВГВ. В рамках этой задачи были проведены:

- Оценка влияния ингибиторов и энхансеров путей гомологичной рекомбинации и негомологичного соединения концов ДНК при действии CRISPR/Cas9 на уровни ккзДНК ВГВ.

- Исследование влияния модуляции путей репарации двуцепочечных разрывов ДНК при действии CRISPR/Cas9 на профиль мутаций в сайте нуклеолитического расщепления ккзДНК ВГВ.

4) Выяснить возможность полной элиминации ВГВ из инфицированных клеток. В рамках этой задачи были проведены:

- Изучение параметров вирусной репликации в ходе длительного наблюдения после кратковременного воздействия CRISPR/Cas9 и аналогом нуклеозидов ламивудином.

- Анализ вирусной персистенции на моделях вирусных репликонов и модели вирусной инфекции HepG2-NTCP.

5) Установить влияние метилирования ккзДНК на действие сайт-направленных нуклеаз CRISPR/Cas9. В рамках этой задачи были проведены:

- Изучение влияния метилирования ккзДНК на нуклеолитическое расщепление системой CRISPR/Cas9 в биохимической реакции *in vitro*;

- Определение влияния факторов CpG-метилирования, нуклеотидного контекста и расположения мишеней в вирусном геноме на изменение эффективности нуклеолитического действия CRISPR/Cas9 при метилировании ккзДНК.

- Исследование возможности преодоления эффекта метилирования ккзДНК за счет увеличения доз рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9.

6) Определить механизмы реактивации ВГВ-инфекции при действии ДНК-повреждающих агентов. В рамках этой задачи были проведены:

- Изучение особенностей реактивации ВГВ-инфекции при действии противоопухолевых препаратов с различным механизмом действия.

- Исследование влияния противоопухолевых препаратов на экспрессию факторов репарации повреждений ДНК.

- Анализ роли фактором ATM и ATR на репликацию ВГВ.

7) Установить возможность реактивации генома ВГВ из транскрипционно-инактивированного состояния. В рамках этой задачи были проведены:

- Оценка действия НВх дикого типа и мутированных форм на активность транскрипционно-инактивированной ккзДНК ВГВ.
- Определение влияния различных форм белка НВх на реактивацию ВГВ при действии противоопухолевых препаратов.

8) Разработать подход к контролируемой активации противовирусных генов АРОВЕС/AID. В рамках этой задачи были проведены:

- Разработка подхода по CRISPR-активации факторов АРОВЕС3А, АРОВЕС3В, АРОВЕС3G и AID.
- Изучение цито- и генотоксического действия CRISPR-активации АРОВЕС/AID.
- Создание подхода по контролируемой активации АРОВЕС/AID за счет создания аттенуированных РНК-проводников.
- Оценка влияния контролируемой активации АРОВЕС/AID на дезаминирование генома клеток человека в областях онкогенов.

9) Изучить влияние АРОВЕС/AID на различные этапы жизненного цикла ВГВ. В рамках этой задачи были проведены:

- Изучение влияния CRISPR-активации АРОВЕС/AID на уровни вирусных РНК, ДНК, вирусных белков и ВГВ-позитивных клеток.
- Оценка дезаминирования ккзДНК ВГВ факторами АРОВЕС/AID в динамике методом 3D-ПЦР.
- Определение возможности разрушения ккзДНК ВГВ цитидин-дезаминазами в опытах с ингибированием фермента UNG.
- Изучение профилей дезаминирования ккзДНК ВГВ факторами АРОВЕС/AID.

### **Научная новизна работы**

Исследованы исходы нуклеолитических разрывов в ккзДНК ВГВ при использовании CRISPR/Cas9 систем в норме и в условиях модуляции активности основных компонентов пути гомологичной репарации (RAD51) и пути негомологичного соединения концов ДНК

(DNA-PKcs). Продемонстрировано, что подавление активности фактора DNA-PKcs, основного фактора в пути негомологичного соединения концов ДНК, с помощью низкомолекулярного ингибитора NU7026 изменяет исходы репарации двуцепочечных разрывов в ккзДНК, способствуя формированию многочисленных и разнородных делеций нуклеотидов.

Установлено, что нуклеолитическое расщепление в подавляющей степени вызывает разрушение ккзДНК ВГВ. При этом использование соединения NU7026 нарушает процесс разрушения генома вируса и способствует преимущественной, крайне эффективной репарации ДНК по типу микрогомологичного соединения концов с образованием разнородных делеций в сайте нуклеолитического расщепления.

Предложен метод оценки эффективности CRISPR/Cas9 в отношении генома вируса гепатита В с использованием соединения NU7026. Разрушение генома вируса гепатита В при действии CRISPR/Cas9 ранее приводило к недооценке эффективности противовирусного действия сайт-направленных нуклеаз при измерении методом секвенирования целевой мишени. Обработка клеток, инфицированных ВГВ, раствором соединения NU7026 позволяет объективно оценивать нуклеолитическую и противовирусную активность сайт-направленных нуклеаз.

Продемонстрирована ключевая роль кольцевой частично двуцепочечной (кчдДНК) ВГВ в поддержании персистенции вируса и реактивации инфекции за счет ре-импорта в ядро и формирования ккзДНК de novo при полной (либо близкой к полной) элиминации пула ккзДНК. За счет создания высокоэффективных, короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 удалось добиться удаления >99% всех матриц ккзДНК из инфицированных клеток. При этом было выявлено восстановление вирусной репликации и пула ккзДНК de novo из оставшихся матриц кчдДНК ВГВ.

Сформулирована стратегия полной элиминации ВГВ из инфицированных клеток на основе клинически одобренных препаратов-аналогов нуклеот(з)идов, ингибиторов обратной транскриптазы ВГВ, и короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9. Показано, что предварительное использование аналогов нуклеот(з)идов (на примере препарата ламивудина) приводит к истощению кчдДНК ВГВ в инфицированных клетках и устраняет возможность восстановления вирусной репликации после разрушения ккзДНК ВГВ системами CRISPR/Cas9.

Впервые показано, что метилирование ккзДНК ВГВ нарушает нуклеолитическое и противовирусное действие систем CRISPR/Cas9. При этом значительную роль играет

расположение сайта нуклеолитического расщепления, а также принадлежность целевого сайта к островкам CpG. Выявлено, что эффект ДНК-метилирования зависит исключительно от биохимических особенностей реакции комплексов CRISPR/Cas9 с ДНК и может быть не связан с дополнительными гистоновыми и негистоновыми взаимодействиями.

Предложено использование высоких доз рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 для преодоления эффектов метилирования ккзДНК ВГВ. Продемонстрирована возможность нивелирования эффектов метилирования ккзДНК за счет действия более высоких соотношений комплексов CRISPR/Cas9 к ккзДНК ВГВ.

Выявлена ведущая роль факторов ATM и ATR в потенцировании вирусной репликации при использовании ДНК-повреждающих химиотерапевтических препаратов и генотоксических агентов. Повреждение генома клеток человека запускает сигнальные каскады ответа на повреждение ДНК, призванные восстановить целостность генома и сохранить жизнеспособность клеток. Сопутствующее увеличение уровней экспрессии ATM и ATR, двух ключевых киназ в каскадах репарации повреждений ДНК, усиливает вирусную репликацию, предположительно за счёт фосфорилирования НВсAg и ускорения упаковки прегеномной РНК в капсид.

Обнаружена возможность запуска репликации ВГВ из транскрипционно-инактивированного, гиперметилированного состояния ккзДНК за счет активности белка вируса НВх. Показано, что репликация вируса восстанавливается только при использовании НВх дикого типа, при этом восстановления не происходит при действии внутриядерного варианта НВх-белка (НВхNESM), содержащего мутацию в сигнале ядерного экспорта. Это указывает на то, что реактивация транскрипционно-инактивированной ккзДНК белком НВх не связана с его трансактивирующей активностью и прямым взаимодействием на ккзДНК. НВх-белок оказывает потенцирующее действие на вирусную репликацию при совместном использовании генотоксических агентов и химиопрепаратов. Препараты таргетной терапии не влияют либо слабо активируют репликацию ВГВ, при этом их совместное использование с НВх не приводит к возникновению потенцирующего эффекта.

Изучено влияние базальных уровней цитидин-дезаминаз в регуляции размера внутриклеточного пула ккзДНК ВГВ. Обнаружено, что APOBEC3A и APOBEC3B ограничивают пополнение пула ккзДНК на уровне базальной экспрессии. Нокдаун APOBEC3A/3B увеличивает внутриклеточный пул ккзДНК ВГВ в ~2-3 раза.

Разработан подход к кратковременной активации экспрессии цитидин-дезаминаз семейства APOBEC/AID и проведен всесторонний анализ эффектов APOBEC/AID на параметры вирусной репликации, формирование мутаций в вирусных геномах, цито- и генотоксические эффекты. Впервые предложен способ регуляции уровней активации APOBEC/AID с помощью аттенуированных РНК-проводников, которые позволяют титровать уровни активации целевых генов с сохранением противовирусных и устранением токсических свойств.

Показано, что мутагенное действие факторов APOBEC/AID на геном человека находится в обратной зависимости от вирусной нагрузки в инфицированных клетках. В условиях низкой репликации ВГВ APOBEC/AID индуцируют дезаминирование генома человека, в то время как при высокой вирусной внутриклеточной нагрузке ВГВ дезаминирования генома не происходит.

### **Практическая значимость работы**

В рамках работы был создан ряд методов, подходов и технологий, которые обеспечили возможность изучения ранее неизвестных компонентов персистенции ВГВ-инфекции. Впервые была предложена и реализована стратегия полного удаления ккзДНК ВГВ из инфицированных клеток на основе высокоспецифичных комплексов CRISPR/Cas9, состоящих из рекомбинантного белка StCas9 и *in vitro* транскрибированного РНК-проводника St10 [1]. Комплексы StCas9/St10 элиминируют свыше 99% внутриклеточного пула ккзДНК ВГВ в ходе однократной, кратковременной (комплексы разрушаются в течение 24 часов) внутриклеточной доставки. В результате действия StCas9/St10 происходит быстрое разрушение ккзДНК ВГВ, при этом, несмотря на непревзойденную эффективность действия, применение комплексов не приводит к образованию внецелевых эффектов, что связано с кратковременностью действия, рациональным дизайном РНК-проводника St10, а также особенностями белка StCas9. Комплексы StCas/St10 являются многообещающей основой для создания противовирусного препарата, способного устранять ккзДНК ВГВ в инфицированных клетках.

В результате проведенных исследований была обнаружена ранее неизвестная роль ккзДНК ВГВ в пополнении пула ккзДНК и реактивации вирусной инфекции даже в условиях удаления ккзДНК. С момента открытия, ккзДНК считалась главной мишенью для противовирусных препаратов, удаление которых должно обеспечить прерывание вирусной репликации и элиминацию вирусной инфекции. Полученные экспериментальные данные

свидетельствуют о возможности восстановления пула ккзДНК из его предшественника, кчдДНК. Предложена и реализована стратегия полной элиминации ВГВ из инфицированных клеток на основе одобренных для клинического использования препаратов-аналогов нуклеот(з)идов с однократным введением рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9. Разработанная стратегия перспективна для разработки и внедрения в клиническую практику подходов для лечения пациентов с хроническим гепатитом В и хроническим гепатитом В+D.

Разработан и апробирован новый, эффективный подход для активации внутриклеточных противовирусных факторов с помощью систем активации транскрипции CRISPRa. Предложенный подход по использованию аттенуированных РНК-проводников, содержащих несовпадения нуклеотидов между РНК-проводниками и ДНК-мишенью, позволяет сохранять противовирусную активность и, одновременно, устранять возможные токсические эффекты гиперактивации внутриклеточных факторов. Разработанный подход демонстрирует высокую эффективность и имеет широкие перспективы в области оперативного создания противовирусных подходов для лечения острых и хронических вирусных инфекций, в том числе при возникновении эпидемий/пандемий новых и возвращающихся вирусных инфекций, открывает новые возможности для разработок этиотропной терапии инфекционных заболеваний.

В результате проведенных исследований механизмических основ реактивации инфекции при действии ДНК-повреждающих агентов (химиотерапевтических препаратов, используемых для лечения коморбидностей у пациентов с ВГВ-инфекцией), продемонстрирована возможность реактивации инфекции из транскрипционно-инактивированного, гиперметирированного состояния. Выраженная внутриклеточная реактивация ВГВ-инфекции, в том числе из гиперметирированного состояния, наблюдается только при использовании ДНК-повреждающих химиопрепаратов, и не наблюдается при действии препаратов таргетной терапии. Полученные результаты имеют большое значение как в современной клинической практике для рационального назначения химиопрепаратов пациентам с историей острой/хронической ВГВ-инфекции, так и при использовании перспективных противовирусных препаратов и подходов, направленных на эпигенетическую инактивацию ккзДНК ВГВ.

## **Основные положения, выносимые на защиту**

1. Основная форма генома вируса гепатита В, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК, преимущественно разрушается при действии сайт-специфических комплексов нуклеаз CRISPR/Cas9.
2. Ре-импорт кольцевой частично-двухцепочечной ДНК вируса гепатита В из цитоплазмы в ядро клеток обеспечивает персистенцию вируса и хронизацию инфекции в условиях разрушения «депо» вируса в виде внутриядерного пула кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В.
3. Истощение уровней кольцевой частично двухцепочечной ДНК аналогами нуклеот(з)идов перед разрушением кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В способствует полному удалению вируса из инфицированных клеток.
4. Метилирование генома вируса гепатита В нарушает расщепление ДНК вируса сайт-направленными нуклеазами CRISPR/Cas9.
5. Факторы ATM и ATR, одни из основных факторов в ответе клетки на повреждение ДНК, потенцируют репликацию и вызывают реактивацию инфекции вирусом гепатита В при действии лекарственных препаратов, повреждающих ДНК.
6. Белок HBx реактивирует транскрипционно-инактивированный геном вируса, восстанавливает и потенцирует репликацию вируса гепатита В.
7. Внутриклеточные цитидин-дезаминазы на уровне базальной экспрессии ограничивают пополнение пула кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса из генома-предшественника.
8. При гиперэкспрессии цитидин-дезаминазы APOBEC/AID разрушают и гипермутируют кольцевую ковалентно замкнутую ДНК вируса гепатита В и вызывают мутации в геноме человека при снижении вирусной нагрузки в инфицированных клетках.
9. Противовирусная активность сохраняется при снижении уровней гиперэкспрессии APOBEC3A/3B, при этом не происходит дезаминирования генома клеток человека.

## **Степень достоверности полученных результатов обеспечивается следующим:**

Все экспериментальные работы были выполнены на прошедшем сертификацию современном оборудовании. Результаты экспериментов воспроизведены в достаточном количестве повторов, а также независимых экспериментах. Отдельные результаты в ряде ключевых статей были также независимо воспроизведены международными научным

коллективами, что подтверждается в цитирующих работы соискателя научных работах в ведущих мировых изданиях. Теория основана на всестороннем анализе современной литературы по теме исследования. В работе использованы современные клеточные, вирусологические, молекулярно-биологические методы анализа, адекватные биологические объекты и общепринятые методы статистической обработки данных.

### **Личный вклад автора**

Автор непосредственно участвовал в получении вышеперечисленных результатов, от постановки задач, планирования исследований, проведения экспериментов и анализа данных до интерпретации и обсуждения результатов, подготовки и опубликования исследовательских работ и патентов. Отдельные экспериментальные работы в рамках исследований были выполнены сотрудниками научных групп, взаимодействующими с группой, возглавляемой соискателем. Сотрудничество с научными коллективами происходило в рамках грантов Российского Фонда Фундаментальных Исследований, Российского Научного Фонда и Государственного задания лаборатории генетических технологий. При выполнении совместных исследовательских проектов вклад соискателя состоял в планировании и проведении основных экспериментов, руководстве научной деятельностью и кооперации взаимодействия научных групп, написании и рецензировании научных статей. Все указанные в диссертации исследования главным образом были выполнены научным коллективом, возглавляемым соискателем. Под руководством и при участии соискателя были подготовлены обзоры по теме диссертации. Разработки защищены патентами. Опубликована глава в международной монографии.

### **Апробация работы**

Основные результаты работы были доложены на международных и всероссийских конференциях и симпозиумах, включая HBV international meeting (2015, Bad Nauheim, Germany), HBV international meeting (2016, Seoul, Korea), HBV international meeting (2017, Washington, D.C., USA), Global hepatitis summit (2018, Toronto, Canada), Global hepatitis summit (2023, Paris, France), Cold Spring Harbor Laboratory Genome Engineering: CRISPR Frontiers (2020, CSHL, USA), International CRISPR and Gene Editing Symposium (2020, Virtual), HEP DART 2017 (2017, Kona, Hawaii, USA), Синтетическая биология и биофармацевтика (2022, Новосибирск, Россия), VI Всероссийский симпозиум «Инфекционные болезни в современном мире: эволюция, текущие и будущие угрозы»

(2021, Москва, Россия), III Объединенный научный форум физиологов, биохимиков и молекулярных биологов (2021, Сочи, Дагомыс, Россия), Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2018» (2018, Минск, Беларусь), Международная научно-практическая конференция «Молекулярная диагностика 2017» (2017, Москва, Россия), TechVac 2021 (2021, Virtual), TechVac 2020 (2020, Virtual), 47-я научно-практическая конференция ФБУН ЦНИИ Эпидемиологии Роспотребнадзора «Вирусные гепатиты в Российской Федерации: эпидемиология, диагностика и современные возможности лечения» (2018, Москва, Россия), The Asian Pacific Association for the Study of the Liver [APASL] (2019, Manila, Philippines), Молодёжный междисциплинарный телемост «Наука настоящего для медицины будущего» (2020, Москва, Россия), Геномное редактирование в медицинской генетике 2021 (Москва, Россия), NanoResCon2023 (2023, Rome, Italy), Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус. Биотех» (2023, Сочи, Россия), Global Hepatitis Summit 2023 (Париж, Франция), Международный Инфекционный Форум I (2022, Москва, Россия), Международный Инфекционный Форум II (2023, Москва, Россия), Актуальные вопросы инфекционной патологии юга России (2023, Краснодар, Россия), Актуальные вопросы инфекционной патологии Северо-Кавказского региона (2023, Нальчик, Россия).

## **Публикации**

По материалам диссертации опубликовано 16 оригинальных и 9 обзорных статей в рецензируемых отечественных и зарубежных журналах, зарегистрировано 2 патента, опубликовано 31 тезисов докладов на российских и международных конференциях, 1 глава в коллективной монографии.

## **Объем и структура работы**

Диссертационная работа изложена на 289 страницах, содержит 118 рисунка, 4 таблицы. Состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов исследования, главы, посвященной разрушению основной формы генома вируса гепатита В при действии сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9, главы по влиянию ре-импорта кольцевой частично-двуцепочечной ДНК вируса гепатита В в персистенции вируса и хронизации инфекции, главы по изучению влияния метилирования ккзДНК ВГВ и экспрессии НВх-белка на нуклеолитическое действие CRISPR/Cas9 и реактивацию вирусной инфекции,

главы по влиянию факторов АРОВЕС/AID на репликацию вируса гепатита В и клетки человека, заключения, выводов и списка литературы (503 наименования).

## ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

### 1. 1. Вирус гепатита В: молекулярно-эпидемиологические особенности

#### 1.1.1 Структура вириона и организация генома вируса гепатита В

Вирус гепатита В (ВГВ) является ДНК-вирусом с кольцевой частично двуцепочечной формой генома (кчДНК) в составе вириона. Геном ВГВ содержит 3200 пар нуклеотидов (п.н.), 4 перекрывающиеся открытые рамки считывания (ORF), включающие ORF полимеразы Р – белка, состоящего из трех субдоменов; ORF гена поверхностных белков HBsAg – большого, среднего и малого; ORF preC/C кодирует структурный кор-белок ВГВ (HBcAg) либо неструктурный HBeAg; и ORF X-белка (HBxAg), главного фактора регуляции транскрипции вируса (Рисунок 1) [2]. В геноме ВГВ выявлен ряд регуляторных элементов (промоторы и энхансеры, консенсусные мотивы связывания факторов транскрипции HIF1, HNF1a, HNF3, HNF4, и др.; два сигнала полиаденилирования An; упаковки [3].

Гепатоциты человека, инфицированные ВГВ, секретирует несколько видов вирусных частиц, такие как вирионы (сферические «частицы Дейна» размером 42-47 нм), филаменты (диаметр 20 нм) и сферические частицы диаметром 20 нм. Вирионы ВГВ представляют собой кчДНК, связанную с вирусной полимеразой, упакованную в икосаэдрический нуклеокапсид и белки оболочки [2,4].

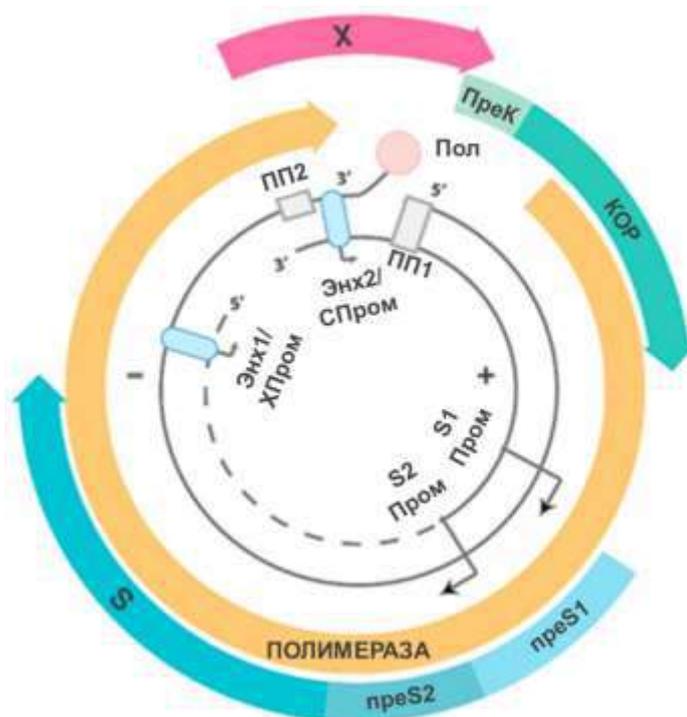


Рисунок 1. Геном вируса гепатита В с отмеченными на нем открытыми рамками считывания и регуляторными элементами. Всего у ВГВ 4 открытых рамки

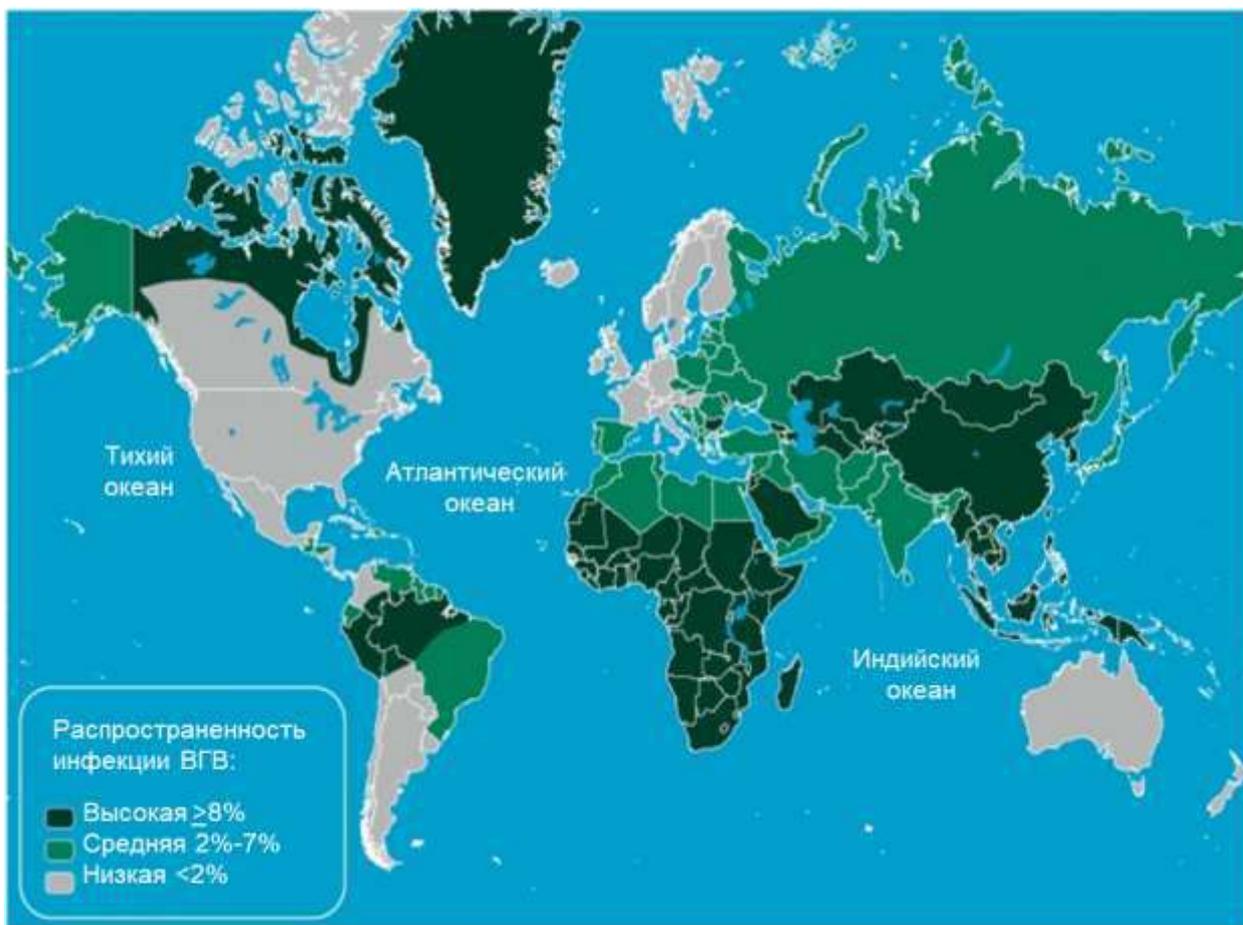
считывания (S, P, C, X). Также на рисунке отмечены регуляторные элементы ВГВ (промоторы (Pro), энхансеры (EN)). Области прямых повторов (DR1 и DR2) играют важную роль в вирусной репликации. Большая, средняя и малая формы HBsAg транслируются с ORF preS1 + preS2 + S, preS2 + S и S, соответственно. Pol транслируется с полимеразной ORF. Кор-антиген ВГВ (HBcAg) транслируется с C ORF. E-антиген ВГВ (HBeAg) образуется в результате отщепления транслируемого продукта от PreC/core ORF. Белок ВГВ X (HBx) транслируется с X ORF (адаптировано по материалам[5])

В структуре кчдДНК положительная (+) и отрицательная (-) цепи ДНК асимметричны; цепь с негативной полярностью полноразмерная и содержит вирусную полимеразу на 3'-конце, в то время как (+) цепь содержит всегда идентичный 5'-конец, но переменный 3'-конец. Прямые повторы – короткие участки на обеих цепях ДНК вируса, - играют ключевую роль в репликации вирусных геномов.

### **1.1.2. Современные особенности эпидемиологии гепатита В**

Эпидемиология ВГВ-инфекции существенно различается в разных странах, географических областях, а также в зависимости от возраста и пути инфицирования. Основные пути передачи ВГВ – через кровь и другие жидкости организма (главным образом сперму и вагинальные секреты). ВГВ может длительное время существовать вне организма, при этом демонстрируют исключительную устойчивость к высоким температурам, детергентам и ультрафиолетовому излучению. У инфицированных лиц ВГВ может выделяться со слюной, слезами, грудным молоком, потом, мочой, при этом риск заражения при контакте с указанными жидкостями в отсутствии следов крови отсутствует; также отсутствует риск передачи ВГВ-инфекции при грудном вскармливании [6,7].

Большая часть случаев ВГВ-инфицирования происходит при рождении путем перинатальной передачи, а также при горизонтальном трансфере через половые контакты или при использовании инъекционных наркотиков. Другие пути передачи могут включать использование продуктов крови человека, контаминированной ВГВ. Эпидемиология ВГВ обычно оценивается по параметру серопозитивности к HBsAg в популяции; современная классификация выделяет области с высокой (>8%), средней (2%-7%) и промежуточной распространенностью [6,7].

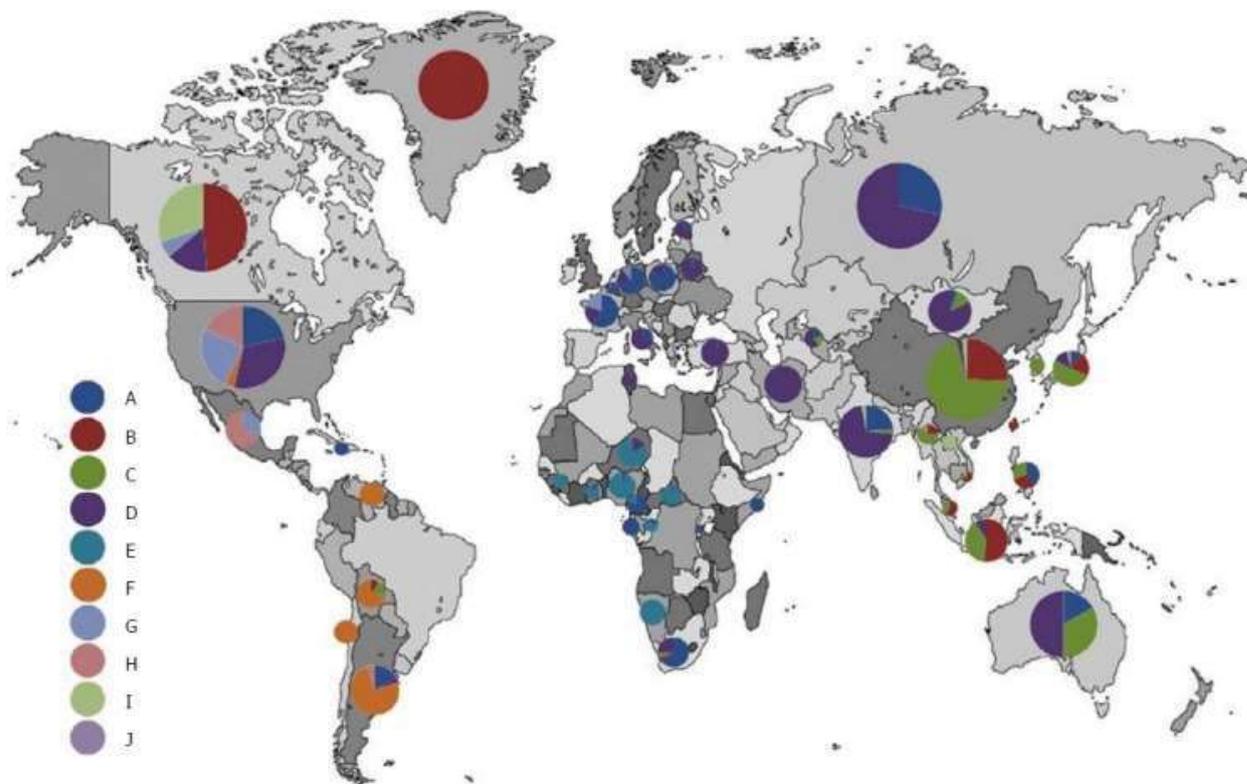


**Рисунок 2. Географическая распространенность хронического гепатита В.**

В странах с высоким уровнем распространения ВГВ в общей популяции, большинство случаев инфицирования, как правило, происходят при рождении либо в раннем детстве – времени максимальных рисков перехода инфекции в хроническую форму. К регионам с высокой распространенностью ВГВ относят Азиатско-Тихоокеанский регион, а также Африканские страны, расположенные к югу от Сахары. Около 45% всех хронически-инфицированных пациентов проживает в этой области. К регионам со средней распространенностью ВГВ относят Северную Африку и Ближний Восток, регионы Восточной и Южной Европы, Латинской Америки и Южной Азии (Рисунок 2). На долю данных регионов приходится около 40% всех ВГВ-инфицированных лиц. В данных регионах передача ВГВ-инфекции происходит примерно со схожей частотой перинатально либо горизонтально, с существенными различиями в особенностях передачи в зависимости от страны/региона. В Австралии, Азии, Северной и Западной Европе, Японии, Северной Америке и некоторых странах Южной Америки распространенность ВГВ составляет менее 2%. Около 12% всех ВГВ-инфицированных лиц приходится на указанные страны. В данных регионах случаи вертикальной и горизонтальной трансмиссии ВГВ в детстве редки; большинство случаев инфицирование происходит в подростковом либо взрослом возрасте

через половые контакты, при использовании инъекционных наркотиков либо иные контакты с инфицированной кровью [6].

Глобализация и массовая миграция населения вносит существенные изменения в распространенность ВГВ-инфекции, а также распространенность генотипов вируса в регионах мира. По современной классификации, выделяют 8 генотипов ВГВ (А-Н), а также два новых генотипа I и J. Генотипы ВГВ далее классифицируются на суб-генотипы вируса. Различия в нуклеотидном составе генотипов составляют около 8%, для субгенотипов – 4-8%. Охарактеризовано более 30 субгенотипов ВГВ. Генотипы и субгенотипы ВГВ важны в клинической практике, поскольку имеют значение в прогрессии ХГВ и ответе на противовирусную терапию [8]. В целом, генотипы ВГВ исторически имели четкое географическое распределение с преобладанием генотипа А в странах Африки и Северной Европе (Рисунок 3), генотипа В и С в странах Азии, генотипа D в России, странах Европы, Африке и Индии. В западной Европе и США обнаруживается также генотип G, тогда как генотип H детектируется в странах Центральной и Южной Америки. ВГВ генотипа I был впервые обнаружен во Вьетнаме и Лаосе; генотип J охарактеризован в Японии. Помимо наличия генотипов и субгенотипов вируса, известны рекомбинации между разными генотипами ВГВ [8].



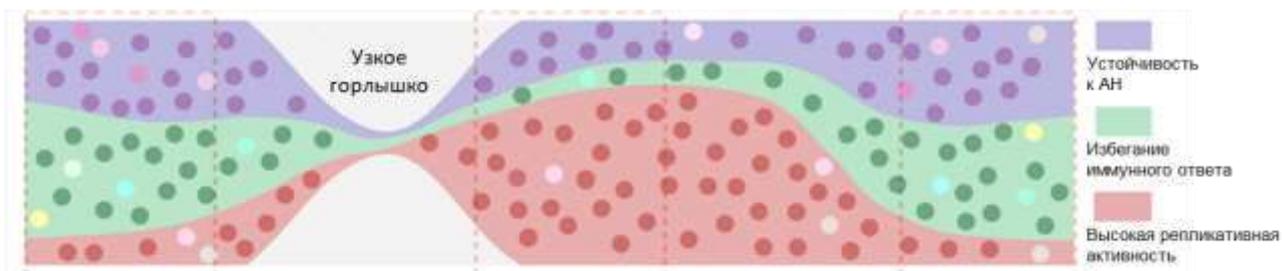
**Рисунок 3. Географическое распределение субгенотипов ВГВ.**

В отдельную категорию выделяют коренное население отдельных регионов с высоким распространением ВГВ. К ним относят аборигенов и жителей островов Торресова пролива в Австралии, коренной народ Новой Зеландии Маори, аборигенов Амазонки, Северной Америки, некоторые этнические группы Индии и Китая, а также Инуитов приполярных регионов, включая жителей Чукотки.

Исследования глобального бремени ВГВ-инфекции показали значительный рост распространения инфекции и смертности от исходов ВГВ во всем мире. Общее число смертей, связанных с ВГВ-инфекцией, возросло с 520 400 человек в 1990 году до 786 000 в 2010 году. По последним данным, около 870 000 человек погибает ежегодно из-за последствий ВГВ-инфекции [6].

### **1.1.3. Генетическая гетерогенность и квазивид вируса гепатита В**

Популяция ВГВ у пациентов с ХГВ состоит из генетически гетерологичных вариантов геномов, со-существующих в форме «квазивидов» (Рисунок 4). Предполагается, что квазивиды могут иметь значение в поддержании персистенции вируса и патогенезе вирусной инфекции. Квазивиды представляют собой большое число вариантов вируса с мутированными вариантами вирусных генов, которые служат резервуаром для селекции вируса под действием иммунного надзора, а также при приеме противовирусных препаратов [9]. Сложность квазивидов может различаться в зависимости от особенностей заболевания. Так, у лиц с ко-инфекцией вирусом иммунодефицита человека и ВГВ наблюдается низкое разнообразие квазивидов, тогда как у пациентов с острой печеночной недостаточностью, вызванной ВГВ, наблюдается высокое разнообразие квазивидов ВГВ в области preC/C. В ряде работ ранее было показано, что появление новых генетических вариантов ВГВ у одного пациента может приводить к острому ухудшению состояния печени. Некоторые мутации, такие как мутации A1762T/G1764A в области BCP (basal core promoter) и мутация G1896A в регионе preC ORF, могут усиливать репликацию ВГВ, нарушать экспрессию HBeAg вируса и, возможно, участвовать в прерывании фазы иммунной толерантности к ВГВ у ВГВ-инфицированных пациентов с развитием острой печеночной недостаточности. Некоторые варианты квазивидов также, вероятно, могут усиливать повреждение печени за счет оказания прямого цитопатического эффекта либо опосредованно, за счет индукции более выраженного иммунного противовирусного ответа с последующим разрушением гепатоцитов и нарушением функции печени [9].



**Рисунок 4. Динамика квазивидов ВГВ [10].**

Кроме того, описаны генетические варианты вируса, содержащие делеции в *preS*-регионе, которые нарушают высвобождение малого HBsAg ВГВ из клетки с аномально высокими уровнями накопления внутриклеточного вирусного белка. На моделях гидродинамической инъекции мышей *in vivo* было показано, что делеции/мутации в области *preS* ВГВ вызывают значительно более выраженный ответ со стороны иммунной системы: увеличенную выработку нейтрализующих антител и активацию цитотоксической функции Т-лимфоцитов [9,11]. Некоторые мутации в области С ORF усиливают репликацию вируса и вызывают преимущественно внутриядерное накопление кор-антигена ВГВ [12].

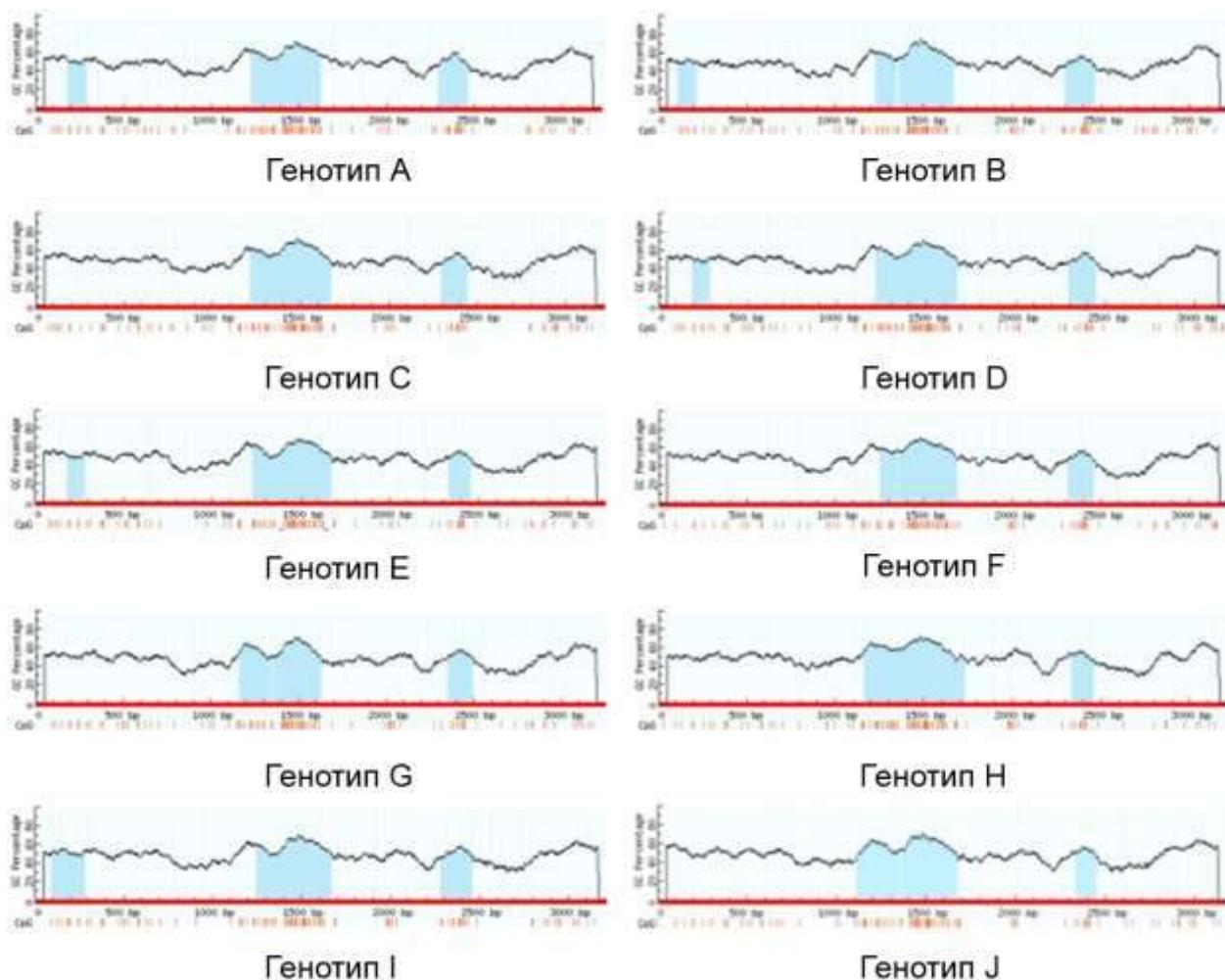
Помимо роли квазивидов в регуляции иммунного ответа, патофизиологии ВГВ-инфекции и возможности появления мутаций к противовирусным препаратам, квазивиды могут стимулировать избегание ответа на действие перспективных молекулярных инструментов, узнающих консервативные последовательности вируса. В частности, при использовании сайт-направленных нуклеаз мишенью, как правило является одна либо несколько нуклеотидных последовательностей в консервативных регионах ВГВ. Наличие вариантов ВГВ у одного пациента, следовательно, может являться барьером для расщепления и разрушения некоторых геномов ВГВ сайт-направленными нуклеазами [13].

#### **1.1.4. Эпигенетические особенности генотипов вируса гепатита В**

Процесс метилирования ДНК заключается в формировании 5-метилцитозина из цитозина. В метилировании ДНК принимают участие ферменты ДНК-метилтрансферазы (ДНМТ), включая ДНМТ1, ДНМТ2, ДНМТ3А, ДНМТ3В и ДНТМ3А [14]. ДНМТ1 поддерживает паттерн метилирования в ходе деления клеток и метилирует гемиметилированные CpG-островки [14,15]., в то время как ДНМТ3А и 3В метилируют не метилированные и гемиметилированные островки [14].; ДНМТ2 играет роль в метилировании структурных ДНК [16]. Как правило, метилирование ДНК в промоторных регионах генов подавляет экспрессию генов, поскольку 5-метилцитозин нарушает распознавание и связывание факторов транскрипции [14,17].

Метилирование интегрированных форм генома ВГВ было описано свыше 30 лет назад [18]. Впоследствии, метилирование ДНК ВГВ было также описано для эписомных форм генома вируса [19]. Геном ВГВ содержит 2-3 канонических и несколько неканонических CpG-островков, в зависимости от генотипа вируса (Рисунок 5, 6). Островки CpG расположены в ключевых регуляторных элементах генома ВГВ. CpG-I локализован в первом экзоне сайта инициации транскрипции S-гена, CpG-II находится в области второго энхансера и промотора прегеномной РНК, тогда как CpG-III расположен в сайте инициации транскрипции гена полимеразы [20]. ДНК вируса в составе вирионов не метилирована как в культуральной среде инфицированных клеток *in vitro*, так и в сыворотке крови пациентов с ХГВ. Однако, детектируется дифференциальное метилирование ккзДНК в ядрах клеток.

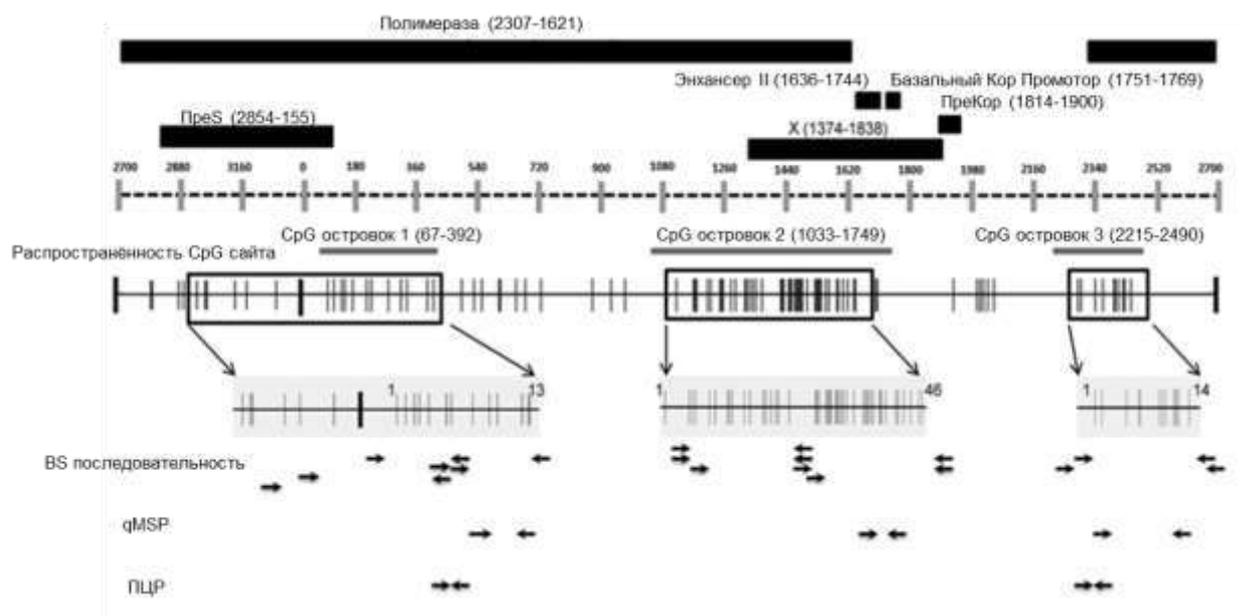
Метилирование ДНК ВГВ может существенно отличаться для разных генотипов вируса (Рисунок 5). Так, на группах пациентов из Азии (генотипы В и С) было продемонстрировано, что метилирование ккзДНК значительно изменяет репликацию вируса. В то же время, на ВГВ генотипов А и D было выявлено, что метилирование ДНК ВГВ – редкое событие у пациентов с ХГВ и оказывает слабое влияние на вирусную инфекцию [21].



**Рисунок 5. Распределение CpG- островков в ВГВ последовательностях генотипов HBV А–J.** На оси Y представлено процентное содержание GC, по оси X представлена последовательность генома ВГВ. Синие области представляют островки CpG I, II и III. Вертикальные красные линии обозначают динуклеотиды CpG.

Изучение содержания CpG-островков у различных генотипов ВГВ показало, что доля ВГВ-геномов, содержащих все три CpG островка, составляет 61.11% для генотипа А, 77.42% для генотипа В, 26.19% для генотипа С, 70.59% для генотипа D, 62.5% для генотипа Е, 0% для генотипа F, 8.33% (1/12) для генотипа G, 0% для генотипа Н, 100% для генотипа I, и 0% для генотипа J. Кроме того, были описаны новые, неканонические CpG-островки IV, V и VI, потенциальные мишени для ДНК-метилирования. Островок CpGIV присутствует у генотипов В, С и D, располагается между островками I и II (регионы S и P гена). Островок V (генотипы В, Н и F) картируется у энхансера II и кор-промотора (регион гена С). Островок CpG VI (генотип С) перекрывается с генами *preS1* и *P* [21]. Особенно высокие уровни метилирования ккзДНК (в особенности в области CpG II) были обнаружены у пациентов с раком печени, что связано с гиперэкспрессией ДНК-метилтрансфераз в гепатоцитах таких пациентов. В исследовании с исчерпывающим анализом профилей метилирования ккзДНК

в трех CpG островках и 73 сайтах CpG было показано, что метилирование CpG III происходит более выражено при раке печени.



**Рисунок 6. Схема генома ВГВ, показывающая расположение трех островков CpG относительно кодирующих и регуляторных последовательностей генома ВГВ [19].**

При ХГВ детектируются низкие уровни метилирования CpG-островков (6.6%, 6% и 17.5% для островков CpG I, CpG II и CpG III, соответственно), в то время как при циррозе печени ДНК ВГВ практически полностью не метилирована в островках CpG I (0%) и CpG II (0.8%); в островке CpG III также детектируется более низкий уровень метилирования (10.8%). При раке печени детектируются достаточно низкие уровни CpG-метилирования в островках I и II (16.1% и 8%, соответственно), при этом около 52.5% CpG-сайтов в островке III оказываются метилированными. При более детальном изучении не только общей популяции внутриклеточной ДНК ВГВ, а именно ккзДНК ВГВ выяснилось, что уровни ккзДНК и ДНК ВГВ значительно отличаются. Анализ ккзДНК ВГВ показал более высокие уровни CpG-метилирования (по крайней мере по островку CpG III) в сравнении с общей фракцией [19].

Островок CpG II перекрывается с геном X и ВСП-промотором, регулирующим транскрипцию пРНК, и оказывается в наименьшей степени метилирован. Следовательно, даже при прогрессии ХГВ ккзДНК ВГВ остается транскрипционно-активной и может поддерживать репликацию, несмотря на возрастающие уровни экспрессии ДНК-метилтрансфераз в клетках печени [3]. Известно, что высокие уровни метилирования CpG II коррелируют с низкими уровнями продукции HBsAg либо его исчезновением. Однако,

гиперметилирование CpG II также наблюдается у пациентов со скрытой ВГВ-инфекцией и у HBeAg-негативных пациентов с раком печени [3].

Тем не менее, данные по роли метилирования ДНК ВГВ в вирусной инфекции отчасти противоречивы. Несколько групп ранее сообщали о том, что метилирование ккзДНК может нарушать репликацию вируса и экспрессию вирусных генов [22–24]. Напротив, исследование на группе пациентов из Франции продемонстрировало, что геном ВГВ слабо метилируется в образцах печени [25]. В работе Kim с соавт. [24] на группе пациентов с циррозом, увеличение метилирования ккзДНК было связано с возрастом пациентов. Показано, что увеличение метилирования ккзДНК коррелирует с исчезновением HBeAg за счет подавления транскрипции с preC/C-промотора с последующим снижением вирусной репликации.

#### **1.1.5. Влияние генотипов на клиническое течение хронического гепатита В**

Существуют явные ассоциации между генотипом ВГВ с клиническим течением ХГВ и эффективностью лечения. При генотипах В и С ВГВ наблюдаются более высокие уровни внутриклеточной ДНК ВГВ, секретируемой ДНК ВГВ и секретируемого HBeAg в сравнении с генотипами А и D. Усиленная репликация и более высокий уровень ДНК ВГВ и вирусных белков может играть роль в повреждении гепатоцитов и, следовательно, в увеличении скорости прогрессии хронической инфекции. Кроме того, уровни HBeAg оказываются ниже при инфекции ВГВ генотипа С [26].

На клиническое течение и прогрессию ХГВ влияют многие факторы, включая различные внутриклеточные факторы, наличие либо отсутствие специфических мутаций в геноме вируса, вирусная нагрузка, уровни HBeAg, наличие либо отсутствие HBeAg, а также генотип ВГВ. Кроме того, при инфекции ВГВ разных генотипов наблюдаются различия в эффективности приема препаратов интерферона- $\alpha$  [27]. Ответ на препараты интерферона наиболее выражены при ВГВ генотипов А и В: отмечается наиболее быстрое снижение уровней секретируемого HBeAg, наилучший серологический ответ. Наименьшая эффективность интерферона показана для ВГВ генотипов С и D [28]. При этом, уровни хронизации при инфекции ВГВ генотипов А и D оказываются выше, чем при ВГВ генотипов В и С [29]. Генотип ВГВ также связан с рисками прогрессии ХГВ. В ходе мета-анализа ранее была показана выраженная корреляция между генотипом В и, в особенности, генотипом С и риском развития рака печени. [30]

### 1.1.6. Жизненный цикл вируса гепатита В и взаимодействие вируса с инфицированными клетками

ВГВ имеет сложный вирусный цикл, который состоит из стадий проникновения вируса в клетку, эндосомального выхода, транспорта кчдДНК в ядро, образования кчзДНК, транскрипции и трансляции вирусных белков, сборки вирионов и их высвобождения из клетки (Рисунок 7).

Взаимодействие ВГВ с гепатоцитами опосредовано неспецифическим связыванием вируса с гепарансульфат протеогликанами с последующим взаимодействием миристоилированного N-концевого домена preS1 большого HBsAg с рецептором NTCP [31]. Помимо этого, в интернализации ВГВ принимает участие рецептор эпидермального фактора роста EGFR [32]. Дополнительными ко-рецепторами NTCP являются SCCA1 (squamous cell carcinoma antigen 1) и FTL (ferritin light chain). Увеличенные уровни экспрессии FTL и SCCA1 усиливают эффективность ВГВ-инфекции в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [33,34].

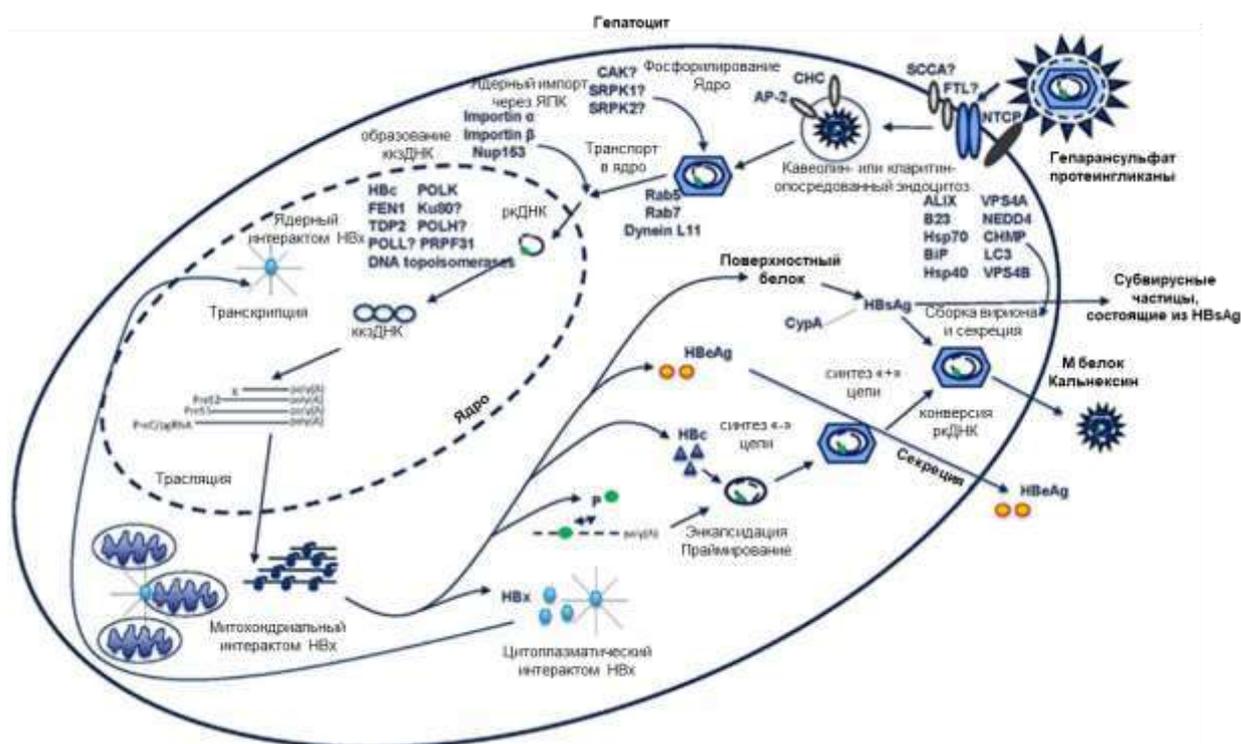


Рисунок 7. Жизненный цикл вируса гепатита В с факторами клетки-хозяина, необходимыми для вирусной инфекции и репликации [35].

ВГВ попадает в гепатоциты путем эндоцитоза через кавеолин-опосредованный эндоцитоз либо клатрин-опосредованный эндоцитоз [36]. Вслед за эндоцитозом, вирионы ВГВ транспортируются в клетке с помощью Rab-белков – гуанозинтрифосфатазы

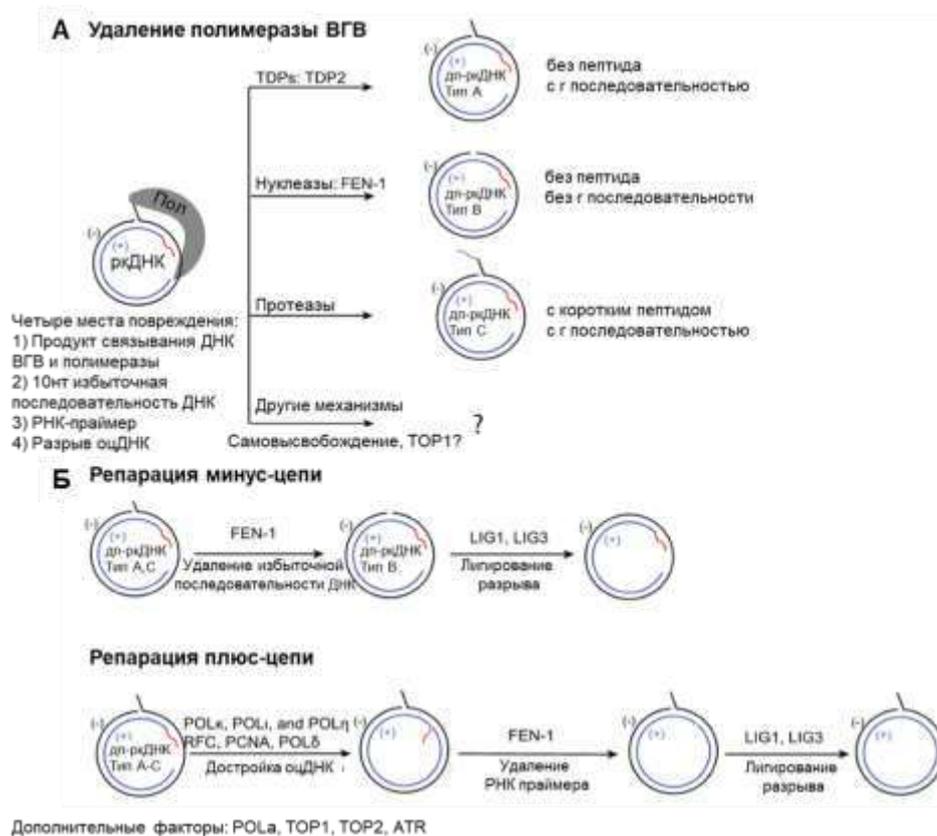
(GTPases). Подавление активности Rab5 и Rab7 нарушает прохождение ранних этапов ВГВ-инфекции [37]. Вслед за этим, происходит эндоцитоз вирионов и их транспорт в цитоплазму. Процесс эндосомального выхода вирионов ВГВ слабо изучен, но скорее всего является рН-зависимым [38].

Транспорт нуклеокапсида в ядро происходит при помощи сети микротрубочек и динеина L11 через прямое взаимодействие с нуклеокапсидом [39]. В ходе дезагрегации нуклеокапсида происходит фосфорилирование С-концевого домена НВс, что приводит к дестабилизации капсида и обеспечивает его связывание с импортинами  $\alpha$  и  $\beta$  ([40,41], [42]). В фосфорилировании НВс участвуют киназы САК (core associated kinase), SRPK1 (SR protein-specific kinase 1) и SRPK2 (SR protein-specific kinase 2)).

Процесс образования ккзДНК – сложный и многоступенчатый (Рисунок 8). Биогенез ккзДНК включает этап ядерного экспорта кчдДНК, репарацию кчдДНК и хроматизацию ккзДНК. Каждый этап связан со сложными взаимодействиями компонентов вируса и факторов инфицированных клеток. В процессе дезагрегации нуклеокапсида, кчдДНК в структуре капсида, составленного из кор-белка, связывается с комплексами импортина- $\alpha$  и импортина- $\beta$ . Взаимодействие импортинов с ВГВ происходит за счет сигналов ядерной локализации НВсAg. Вероятно, взаимодействие сигнала ядерной локализации с импортинами сопровождается частичной дезорганизацией капсида для экспонирования сигнала на поверхности. Помимо этого, вирусная полимераза также содержит двойной сигнал ядерной локализации, который может экспонироваться и фосфорилироваться киназой II (СКII), а также участвовать в импортин- $\alpha$ 2-зависимом транспорте кчдДНК в ядро клеток. В ядре происходит удаление вирусной полимеразы из кчдДНК и «репарация» кчдДНК с достройкой цепей и образованием ккзДНК вируса [43,44].

В удалении вирусной полимеразы с отрицательной цепи ДНК ВГВ принимают участие несколько ферментов клетки. Тирозинфосфодиэстераза TDP1 отщепляет Р с (-) цепи ДНК, нуклеаза FEN1 удаляет участок связывания ДНК с Р; в этом процессе также могут участвовать протеазы и другие механизмы самостоятельного освобождения полимеразы, либо механизмы TOP1-опосредованного высвобождения. Перечисленные механизмы приводят к формированию нескольких типов депротеинизированной кчдДНК. На следующем этапе происходит репарация положительной цепи кчдДНК, включающая стадию (1) завершения синтеза ДНК полимеразой клетки, (2) удаления РНК-прайма фактором FEN-1 и (3) лигирования разрыва в ДНК лигазами LIG1 и LIG3. Киназа ATR препятствует разрушению (-) цепи кчдДНК в ходе конверсии. Помимо этого, в конверсии

кчдДНК → ккзДНК участвует ряд других факторов, включая POL $\alpha$ , TOP1, TOP2 и др., однако их роль до конца не ясна [44].

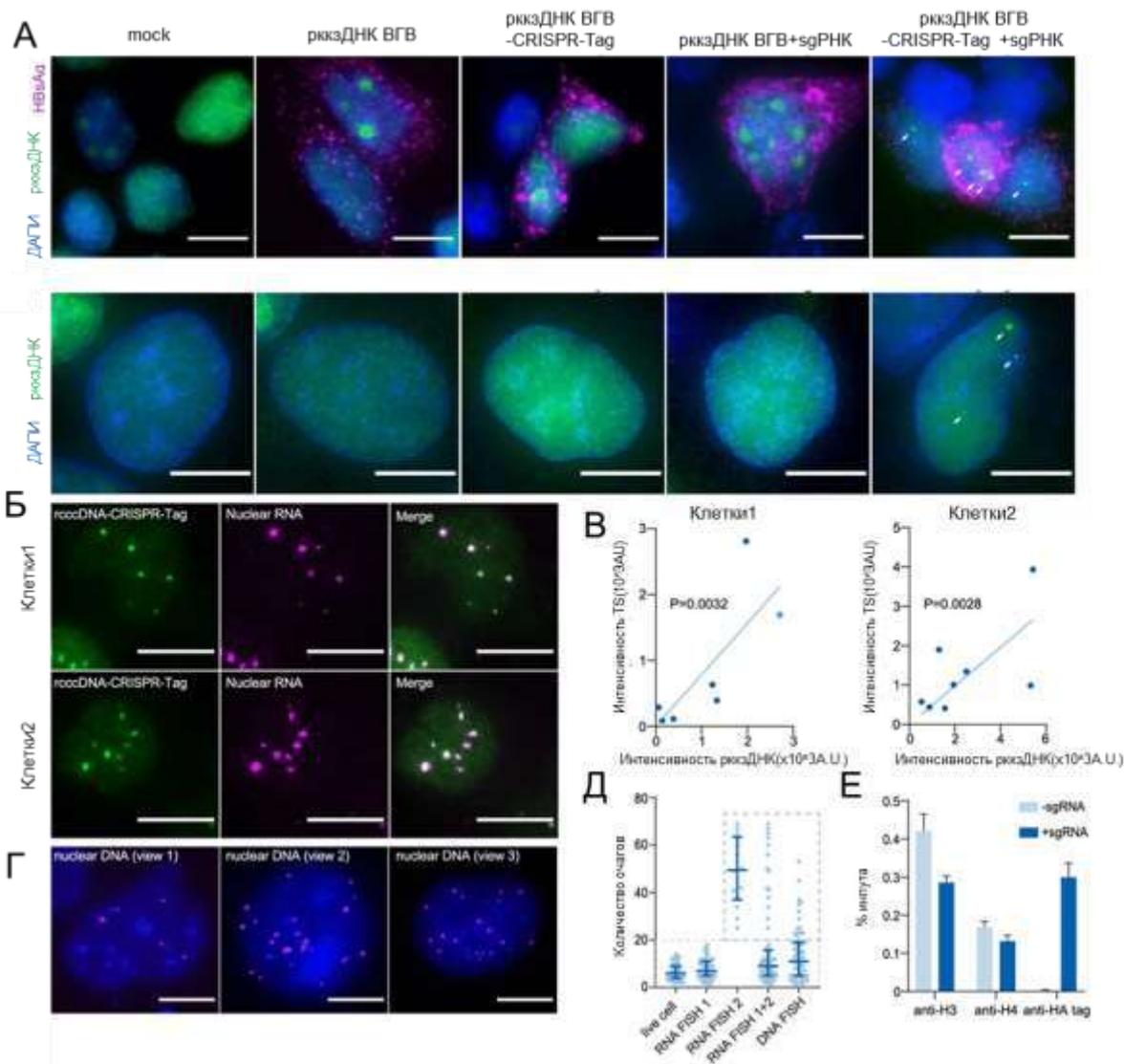


**Рисунок 8. Этапы образования ккзДНК из кчдДНК.** (А) Первый этап представляет из себя удаление полимеразы из кчдДНК. Это может достигаться при помощи (1) тирозилфосфодиэстераз (TDP), таких как TDP2; (2) нуклеаз, таких как FEN– 1; (3) протеаз; и (4) самовысвобождения POL или высвобождения, опосредованного TOP1. (Б) После удаления POL с минус– цепи ДНК избыточная последовательность удаляется с помощью FEN– 1 или других нуклеаз, разрыв лигируется LIG1 или LIG3. Далее происходит репарация плюс–цепи, которая включает в себя (1) достройку ДНК вируса ДНК–полимеразами хозяина; (2) удаление РНК–праймера с помощью FEN–1; (3) лигирование разрыва с помощью LIG1 и LIG3 [43].

Образовавшаяся минихромосома ккзДНК является источником всех вирусных мРНК, включая прегеномную РНК (пгРНК). Взаимодействие вирусной полимеразы с ( $\epsilon$ )-последовательностью на пгРНК инициирует формирование нуклеокапсида. Следом, происходит обратная транскрипция пгРНК и упаковка закольцованной пгРНК вместе с НВсAg в формирующемся вирусном капсиде. На следующих этапах вирусные капсиды могут связываться с белками оболочки и экскретироваться из клетки, формируя полноценные вирусные частицы, либо вступать на путь «внутриклеточной амплификации», ре-импортируясь в ядра клеток, и участвуя в пополнении пула ккзДНК [45,46].

Конверсия кчДНК в ккзДНК формирует персистентный пул вируса. Число копий ккзДНК в клетках человека составляет от 1 до 56 на клетку [47]. Период полужизни различается по нескольким сообщениям, и может составлять от 35 до 47 суток (Рисунок 9) [48,49]. Пул ккзДНК возрастает в течение 3 суток после инфекции, с последующей стабилизацией размера пула до 40 суток [50]. По другим сообщениям, у пациентов с ХГВ число копий ккзДНК может быть гораздо ниже, варьируя от 0.01 до 9 копий на клетку, но в то же время иметь гораздо более длительное время полужизни (от нескольких месяцев до года) [51–54]. Размер пула и время полужизни ккзДНК у пациентов с ХГВ может зависеть от антигенного статуса [55]. Так, уровни ккзДНК оказываются гораздо выше у HBeAg-позитивных, чем у HBeAg-негативных пациентов (около 0.002 копий на клетку).

Аналогично формированию хромосом клетки, минихромосома ккзДНК формируется за счет взаимодействия с гистонами клетки. Гистоны H2A, H2B, H3 и H4 вместе с HBe-белком ВГВ формируют стабильную основу для суперскрученной структуры ккзДНК ([56]).

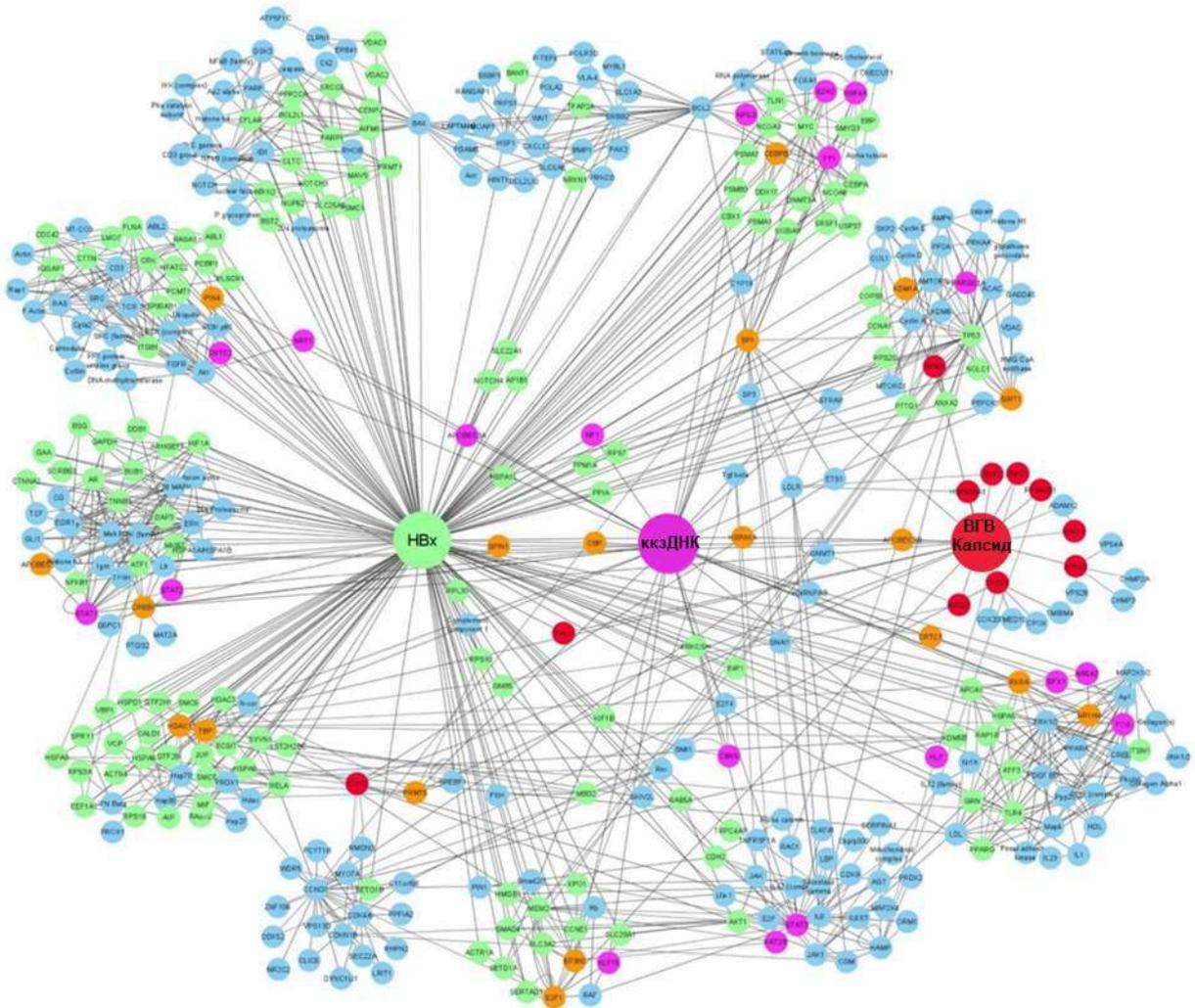


**Рисунок 9.** Анализ динамики рекомбинантной ккзДНК и ее транскриптов в клетке с помощью CRISPR– визуализации [57]. (А) Флуоресцентные изображения с детекцией рккзДНК системой CRISPR-Tag. (Б) Оценка ко-локализации рккзДНК и внутриядерной РНК ВГВ. (В) Интенсивность сигнала рккзДНК на линиях клеток. (Г) Детекция сигнала рккзДНК на разных положениях оси z. (Д) Сравнение количества очагов рккзДНК с помощью методов РНК- и ДНК-FISH. (Е) Оценка специфичности анти-НА антител при работе с системой CRISPR-Tag.

Ранние исследования показали, что пролиферация клеток вызывает потерю ккзДНК ВГВ. Используя новую систему визуализации ккзДНК CRISPR-Tag было продемонстрировано, что при делении клеток происходит случайное перераспределение молекул ккзДНК, выдерживающих деление клетки [57]. Значительная потеря либо случайный паттерн распределения ккзДНК может приводить к образованию дочерних клеток, лишенных ккзДНК. Эти данные подтвердили результаты ранних работ, согласно которым митоз инфицированных клеток может приводить к образованию клеток без ВГВ. Комбинирование системы визуализации ккзДНК CRISPR-Tag с мутантным вариантом

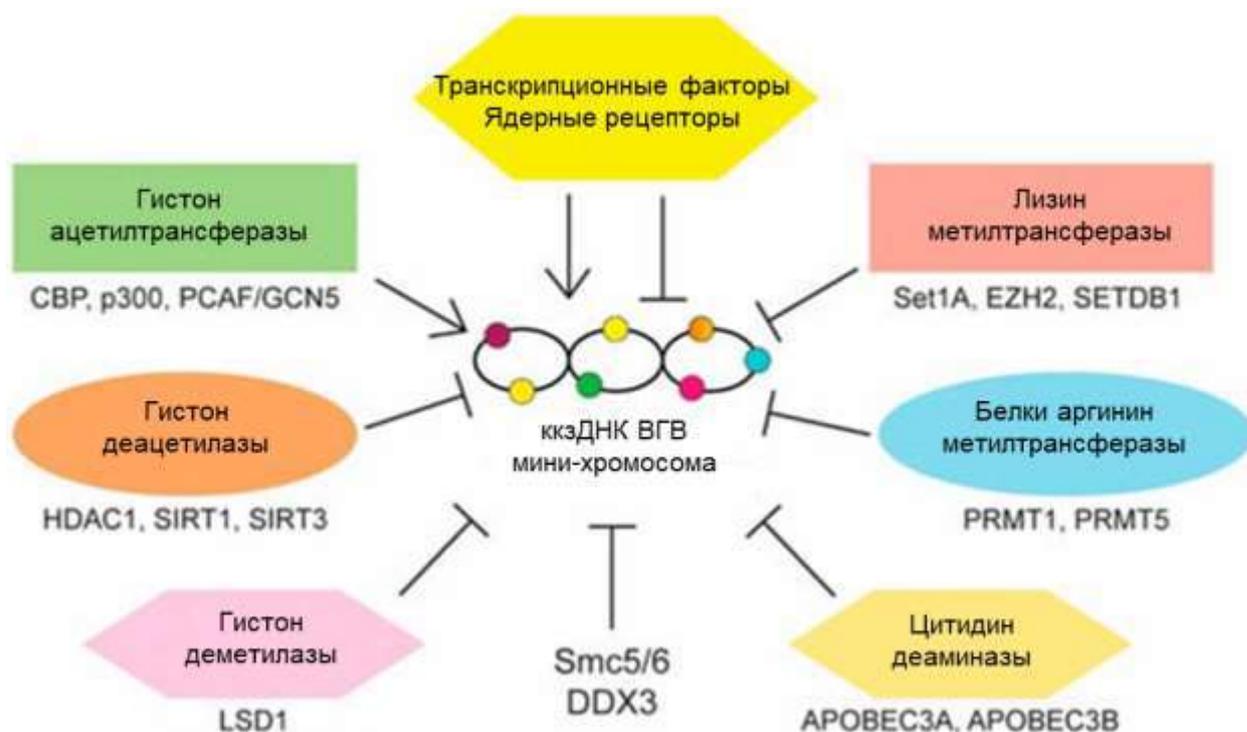
ккзДНК, не кодирующим НВсAg, было выявлено, что НВс не оказывает влияния на мобильность и, следовательно эпигенетическую регуляцию ккзДНК, как было описано Zhong [58]. Однако, удаление НВх, основного регулятора активности ккзДНК, также не влияет на мобильность ккзДНК в клетках.

Белок ВГВ НВх является главным регулятором транскрипции ккзДНК, в основном за счет привлечения факторов транскрипции (с/ЕВР, SMAD4, ATF/CREB, RXRR, RPB5, TFIIВ, ТВР, TFIIН), факторы ремоделирования хроматина (р300, PCAF, СВР, KDM5), а также за счет взаимодействия между НВх и DDB1 (DNA damage-binding protein 1) (Рисунок 10). НВх – единственный фактор инициации и поддержания транскрипции ВГВ. При взаимодействии с НВх происходит формирование эухроматина минихромосомы ккзДНК с релаксацией структуры ккзДНК и привлечением факторов транскрипции ВГВ. Взаимодействие НВх с DDB1 вызывает убиквитинирование комплекса белков SMC5/6 и вызывает протеасомное разрушение комплекса (Рисунок 11). Показано, что отдельные низкомолекулярные соединения можно использовать для транскрипционной блокады ккзДНК, при этом механизм их действия заключается в нарушении взаимодействия НВх-DDB1. Это приводит к восстановлению комплексов SMC5/6 на матрицах ккзДНК и блокаде вирусной транскрипции [59,60].



**Рисунок 10. Анализ взаимодействия клеточных белков с ккзДНК HBx, HBc и вирусным капсидом.** На рисунке белки, взаимодействующие только с HBx, обозначены зеленым, белки, взаимодействующие только с ккзДНК, показаны розовым, а белки, взаимодействующие только с HBc, показаны красным. Белки, которые взаимодействуют более чем с двумя элементами ВГВ показаны оранжевым цветом [35].

Интерактом HBx включает, помимо белков ядра клетки, также множество цитоплазматических белков, белков эндоплазматического ретикулума и митохондрий [61]; [62]. HBx участвует в развитии рака печени, нарушает регуляцию клеточного цикла, метаболизма глюкозы, вызывает окислительный стресс, процессы апоптоза и репарации ДНК [63]; [64]; [65]. Обнаружено не менее 250 внутриклеточных партнеров белка HBx. Вместе с модуляцией транскрипционного состояния ккзДНК, HBx также модулирует экспрессию многочисленных сигнальных путей клетки, включая AKT1 (AKT serine/threonine kinase 1), MAP-kinase (Ras-Raf-mitogen-activated protein), MAPK8/pSMAD3L, TβRI/pSMAD3C, NF-κB, STIM1 [66][67].



**Рисунок 11. Взаимодействие ккзДНК– минихромосомы с белками клетки-хозяина [68].**

Взаимодействуя с полимеразой ВГВ, белки-шапероны Hsp70 (heat shock protein 70), Hsp40 и Hsp90 обеспечивают обратную транскрипцию пгРНК в ккдДНК ([69]). В вирусный капсид могут также включаться клеточные факторы, такие как факторы инициации трансляции (eIF4E), цитидин-дезаминаза APOBEC3G и хеликаза DDX3 [70].

### **1.1.7. Молекулярные детерминанты инфицирования гепатоцитов вирусом гепатита В**

ВГВ – гепатотропный вирус, который инфицирует исключительно гепатоциты человека и шимпанзе [71]. Открытие NTCP-рецептора человека, специфически представленного на поверхности гепатоцитов человека, позволило определить главный детерминант гепатотропного действия ВГВ ([31,72–74]). Эктопическая экспрессия NTCP в первичных гепатоцитах свиней и макаков делает их чувствительными к инфекции ВГВ и ВГД (сателлит ВГВ, использующий белки оболочки ВГВ). Однако, продукция NTCP человека в гепатоцитах мышей, крыс и собак поддерживает инфекцию ВГД, но не вызывает внутриклеточную репликацию ВГВ. Эти данные указывают на общий механизм проникновения вирусов в клетку (по крайней мере на этапах прикрепления вирусов и эндоцитоза), но и на различия в вид-специфичных факторах клетки, которые не поддерживают установление цикла ВГВ и определяют видовой тропизм вируса.

Гепатоциты мыши не поддерживают формирование ккзДНК ВГВ (в том числе за счет внутриклеточной амплификации геномных молекул ВГВ), несмотря на способность

поддерживать эффективную экспрессию генов ВГВ, сборку нуклеокапсидов, синтез кчдДНК и секрецию вирионов [75]. В отличие от нормальных гепатоцитов мышей, иммортализованная линия мышей AML12 поддерживает эффективное формирование ккзДНК за счет внутриклеточной амплификации ([76]). Однако, уровни репликации ВГВ в клетках AML12 оказываются гораздо ниже, чем в клетках гепатомы человека, экспрессирующих NTCP-рецептор [77]. Способность линии клеток AML12 поддерживать формирование ккзДНК коррелирует с усиленной дестабилизацией зрелых нуклеокапсидов ВГВ. Именно неспособность мышинных гепатоцитов обеспечивать дезагрегацию нуклеокапсидов может быть связана с непермиссивностью гепатоцитов мышей к ВГВ-инфекции через рецептор NTCP человека [78]. Действительно, факторы репарации ДНК, участвующие в конверсии кчдДНК в ккзДНК, высококонсервативны в ходе эволюции, и могут поддерживать формирование ккзДНК из кчдДНК. Следовательно, было высказано предположение о ключевой роли этапа дезагрегации нуклеокапсида в гепатоцитах мыши в неспособности мышинных гепатоцитов поддерживать формирование и амплификацию пула ккзДНК [79].

НВсAg также может взаимодействовать с потенциальными факторами, обеспечивающими образование ккзДНК на поздних этапах вирусного цикла. Данные факторы, очевидно, являются видоспецифичными, но не гепатоцит-специфичными, поскольку клетки эмбриональной почки (НЕК293) поддерживают формирование ккзДНК [74]. Следовательно, гепатоцит-специфичные факторы не важны для дезагрегации нуклеокапсида. Несмотря на это, отличные от гепатоцитов линии клеток, хотя и способны образовывать ккзДНК, не могут поддерживать полноценный цикл репликации ВГВ, поскольку они не экспрессируют гепатоцит-специфичные факторы транскрипции, необходимые для транскрипции ккзДНК. Следовательно, гепатоцит-специфичные факторы служат еще одним детерминантом тропизма ВГВ [80]. Например, фибробласты NIH-3T3 не поддерживают синтез пгРНК и продукцию кчдДНК в отсутствие экзогенных гепатоцит-специфичных факторов HNF4, RXR $\alpha$  и PPAR $\alpha$ .

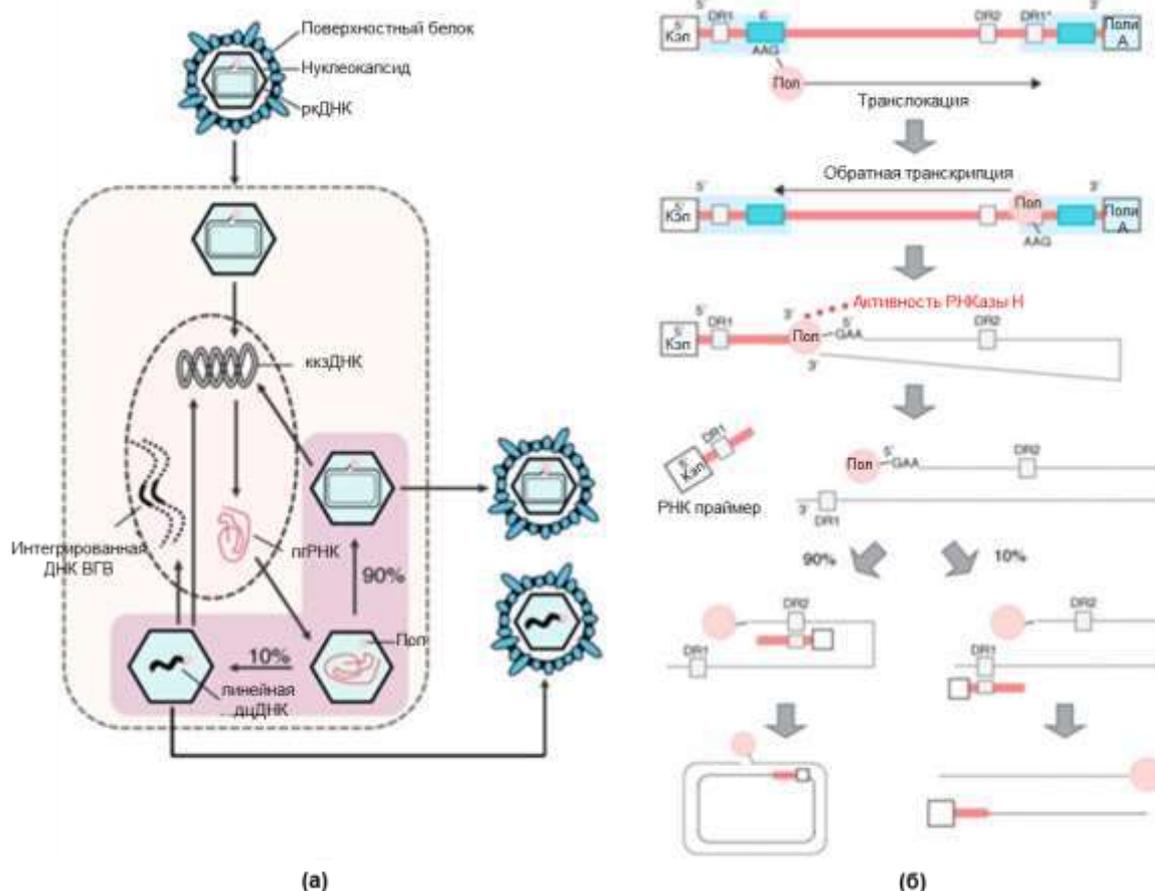
НВс является строительной единицей капсида ВГВ и играет ключевые роли на многих этапах цикла ВГВ. Уже несколько десятилетий известно о роли НВс в дезагрегации капсида, упаковке пгРНК и обратной транскрипции. В последние годы стало известно о влиянии НВс на этапы проникновения вируса в клетку, дезагрегации нуклеокапсида, формирование ккзДНК и продуктивную инфекцию. В последние годы опубликованы десятки работ, посвященных влиянию нуклеокапсида на процесс внутриклеточной

амплификации ккзДНК. Важными детерминантами тропизма ВГВ также являются гепатоцит-специфичные и видоспецифичные факторы, которые взаимодействуют с НВс.

### 1.1.8. Abortивная репликация, образование двуцепочечной линейной ДНК и ДНК-интеграций вируса

Особенность клеток, инфицированных ВГВ – это наличие интеграций ДНК вируса в геном человека. Интеграции ДНК вируса не участвуют в репликации и являются тупиковым этапом вирусной инфекции [5].

Интеграция ДНК ВГВ происходит на самых ранних этапах инфекции. На культурах клеток *in vitro* интеграция ДНК ВГВ происходит уже в течение 5 суток после ВГВ-инфекции. Предполагается, что ранняя интеграция ДНК ВГВ связана с важной ролью вирусных интеграций в экспрессии вирусных белков и поддержанием персистенции инфекции. Экспрессия вирусных белков с интегрированных форм ДНК ВГВ, вероятно, участвуют в подавлении адаптивного иммунного ответа (экспрессия НВсAg) и поддержании транскрипционно-активной ккзДНК (продукция НВх) [5].



**Рисунок 12. Репликация вируса гепатита В.** (А) Цикл репликации ВГВ с этапом интеграции вируса в ДНК клетки (Б) Схема обратной транскрипции ВГВ [5].

В редких случаях, при обратной транскрипции пгРНК в нуклеокапсидах ВГВ не происходит транслокации РНК-праймера, и обратная транскрипция начинается с прямого повтора 1 (DR1), приводя к образованию длДНК ВГВ. У пациентов частота образования длДНК в нуклеокапсидах составляет ~7%, варьируя от 3% до 36%. длДНК, как и ккзДНК ВГВ, может ре-импортироваться в ядро, либо секретироваться в составе вирионов. При конверсии длДНК в ккзДНК может происходить образование ккзДНК с делециями, которые не поддерживают синтез кчдДНК, но могут способствовать формированию крупного пула ккзДНК (~7%). Мутированная ккзДНК, образовавшаяся в результате конверсии из длДНК, может возвращаться в состояние ккзДНК дикого типа, вероятно, за счет процесса гомологичной рекомбинации [81].

Интеграция ДНК ВГВ может происходить в любом сайте образования двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) в геноме инфицированных клеток (Рисунок 12). Интеграции ДНК ВГВ длиной 200 п.н. встречаются наиболее часто [82]. Интеграции ДНК ВГВ распространены по всему геному, при этом «горячих сайтов» интеграции за несколько десятилетий исследований выявлено не было. Аналогично, у пациентов ХГВ не обнаруживаются достоверно схожие сайты интеграции ДНК ВГВ; однако, в тканях рака печени от пациентов с ХГВ детектируются отдельные сайты обогащения интеграций ДНК ВГВ [83,84]. Предполагается, что интеграции ДНК ВГВ в геном человека происходит в основном с помощью пути негомологичного соединения концов ДНК (NHEJ, non-homologous end-joining) (Рисунок 13) [85].

Производство всех вирусных ORF со вставок ДНК ВГВ в геноме человека всегда контролируется собственными промоторами, за исключением ORF HBsAg. Экспрессия ORF HBsAg может изменяться в зависимости от геномного контекста, демонстрируя значительные вариации в экспрессии с эписомы ккзДНК и интегрированных ORF HBsAg. Интегрированная длДНК, даже в полноразмерной форме, оказывается короче полноценной формы генома вируса, поэтому не способна продуцировать пгРНК и участвовать в образовании геномных интермедиатов [5,86].

Как правило, в случае интеграций ДНК ВГВ в основном происходит продукция HBsAg и HBx; ORF HBe/HBc, как правило, не экспрессируются в печени пациентов ХГВ. Однако, при развитии гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) может происходить активная продукция HBe/HBc за счет наличия вблизи ORF клеточных промоторов [5,86].

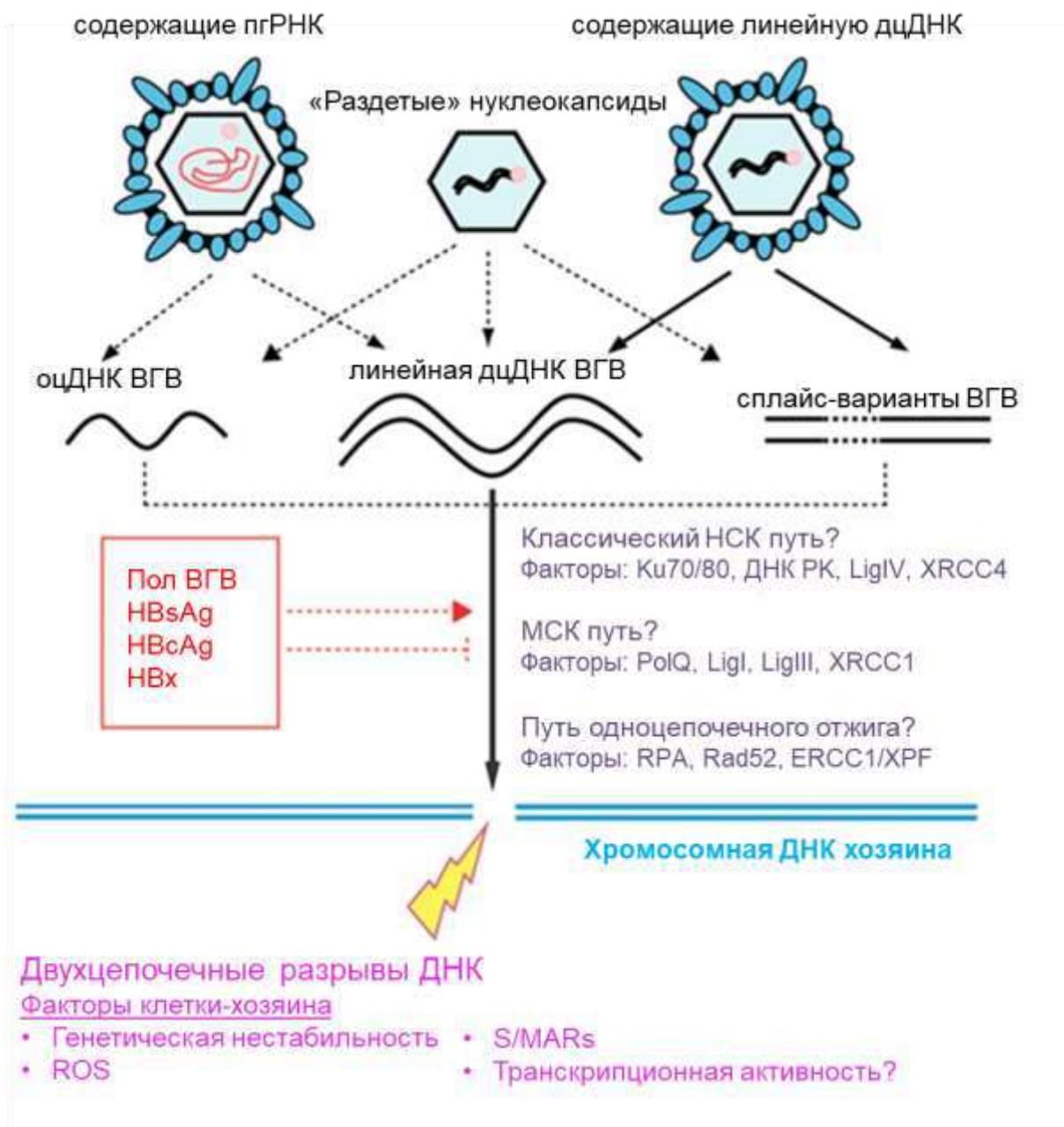
HBx ORF интегрируется, как правило, в делетированном состоянии (по крайней мере на 3 аминокислоты), однако остается функциональным и проявляет трансактивирующую

активность [87]. В связи с отсутствием стоп-кодона в интегрированной ORF, HBx может транскрибироваться в виде гибридной мРНК, слитой с клеточной мРНК. Обнаружены гибридные транскрипты HBx с элементом LINE1 (long interspersed nuclear element 1) [88] и MLL4 (mixed-lineage leukaemia 4) [89].

Особое значение придается роли интеграций ДНК ВГВ в прогрессии ХГВ и развитии ГЦК. К основным механизмам развития ГЦК за счет вирусных интеграций относятся: (а) цис-опосредованный инсерционный мутагенез генов, ассоциированных с ГЦК; (2) индукция хромосомных aberrаций; (3) экспрессия мутированных форм генов ВГВ [83].

Частота интеграций ДНК ВГВ при ГЦК оказывается значительно более высокой в кодирующих и регуляторных регионах генов, в сравнении с не-раковыми тканями [90][91][92]. До сих пор остается не выясненным, являются ли наблюдаемые изменения в частоте интеграций ДНК ВГВ в тканях ГЦК причиной либо следствием развития опухолевой трансформации клеток. В целом, клетки ГЦК демонстрируют более высокие уровни образования ДЦР и накопления мутаций, что может сопровождаться интеграцией ДНК ВГВ. Возможно, что процесс является кооперативным, и развитие ГЦК ускоряется за счет увеличения частоты интеграций ДНК ВГВ [93].

Несмотря на отсутствие «горячих сайтов» интеграции, известно о весьма редких (10-15% случаев ГЦК [94]) событиях интеграции ДНК ВГВ в гены, провоцирующие дальнейшую клональную экспансию гепатоцитов – одно из ключевых событий в развитии ГЦК. Shiraishi показал, что интеграции в сайты генов TERT (telomerase reverse transcriptase), CDK15 и MLL4 сопровождаются изменением в экспрессии генов, а также могут вызывать гиперпродукцию гибридных, слитых с вирусными мРНК, транскриптов [95]. Важно отметить, что интеграции в областях генов детектируются только на поздних этапах заболевания и, следовательно, связаны с прогрессией, а не с инициацией опухолевой трансформации и развития ГЦК. Интеграция в регион гена LINE1 в ~23% пациентов с ГЦК, причем только у пациентов ХГВ в Азиатских странах с ВГВ генотипа С, приводит к образованию слитого ВГВ-LINE1 транскрипта, который может действовать как длинная некодирующая РНК и активировать сигнальный путь Wnt/ $\beta$ -катенин, стимулируя развитие ГЦК [88].



**Рисунок 13. Модель интеграции ВГВ в геном клетки– хозяина.** Различные секретируемые формы ВГВ могут участвовать в процессе интеграции. Сплошными стрелками представлены пути интеграции, подтверждённые экспериментально; пунктирными стрелками представлены гипотетические пути интеграции ДНК ВГВ в геном клетки– хозяина. При интеграции вирус использует клеточные пути репарации [5].

Интеграции ДНК ВГВ также ассоциированы с геномной и хромосомной нестабильностью. Прослеживается обогащение интеграций ДНК ВГВ в ломких участках хромосом, областях повторяющихся последовательностей, CpG-островков и теломер [96]. Более, чем половина всех событий интеграции ДНК ВГВ происходит в межгенных регионах хромосом, а также в повторяющихся последовательностях, таких как LINEs, коротких перемежающихся ядерных элементах либо простых повторах (микросателлитах) [96]. Детектируются интеграции ДНК ВГВ в участки S/MAR (scaffold/matrix attachment regions),

в результате происходит нарушение регуляции экспрессии клеточных онкобелков и стимулируется онкогенез [97,98].

Другим механизмом онкогенного действия ДНК ВГВ является экспрессия мутированных форм белков ВГВ. Экспрессия мутированных либо укороченных поверхностных белков ВГВ ассоциировано с развитием стресса ЭПР и увеличением риска развития ГЦК [99,100], что в свою очередь усиливает пролиферацию гепатоцитов и способствует клональной экспансии. Гиперпродукция укороченного с С-конца НВх-белка с интеграций ДНК ВГВ индуцирует многочисленные изменения в гепатоцитах, вызывая онкотрансформацию, подавляя апоптоз и усиливая инвазию опухолей [101–104].

### **1.1.9. Транскрипция и эпигенетическая регуляция кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В**

Эпигенетические модификации – обратимые, наследуемые фенотипически изменения, которые не связаны с изменениями нуклеотидной последовательности ДНК и представляют собой химические сигнатуры на хромосомах. Эпигенетические модификации имеют ключевое значение для регуляции экспрессии генов и функционирования клетки. Эпигенетические метки могут вноситься напрямую в ДНК либо в связанные гистоны [105]. Метилирование цитозинов в динуклеотидах CpG – самая частая эпигенетическая метка, участвующая в регуляции транскрипции, геномном импринтинге и поддержании идентичности линий клеток [14]. Связывание ДНК с гистонами формирует конденсированные структуры хроматина с выступающими N-концевыми «хвостами» гистонов, которые могут подвергаться пост-трансляционным модификациям [106]. Ацетилирование гистонов и метилирование ДНК необходимы для формирования ккзДНК и регуляции репликации ВГВ [61].

КкзДНК ВГВ ассоциирована с гистонами клетки, которые формируют структуру «бусин на нитке», и участвуют в регуляции компактизации вирусного генома и экспрессии вирусных генов [107]. Пост-трансляционные модификации N-концевых участков гистонов включают ацетилирование, метилирование, убиквитинирование, фосфорилирование, SUMOилирование, ADP-рибозилирование и дезаминирование (Рисунок 14) [108]. Модификации гистонов могут не только напрямую, но и косвенно влиять на структуру хроматина, выступая в роли сайтов связывания и привлечения других регуляторных белков [109].

Ранее было показано, что гистоны, связанные с ккзДНК, могут подвергаться различным модификациям при участии гистоновых ацетилаз (HATs, histone acetyltransferases), деацетилаз (HDACs, deacetylases), лизин- и аргинин-метилтрансфераз (KMTs and PRMTs), деметилаз (HDMTs), киназ, фосфатаз, убиквитиновых лигаз и деубиквитинов (Рисунок 14) [110]. Эпигенетическое состояние ккзДНК во многом определяется экспрессией белков ВГВ, главным образом HBx-белка. HATs ацетилируют гистоны, связанные с ккзДНК, что способствует привлечению к ккзДНК факторов транскрипции, РНК-полимеразы II и усилению экспрессии генов [111]. Напротив, HDACs катализируют удаление ацето-групп из остатков лизина гистонов, индуцируют формирование гетерохроматина в минихромосоме ккзДНК, подавляя активность вирусных генов [112].

Транскрипция ВГВ регулируется уровнями ацетилирования гистонов H3 и H4, связанных с ккзДНК [113]. Привлечение к ккзДНК HDAC1 вызывает гипoaцетилирование H3 и H4, подавляет репликацию ВГВ и снижает уровни вирусной нагрузки *in vitro* и *in vivo* [112]. Изучение пост-трансляционных модификаций гистонов, связанных с ккзДНК, выявило высокие уровни триметилирования гистона H3 по лизину 4 (H3K4me3) и ацетилирование лизиновых остатков гистона H3 (H3K27ac и H3K122ac) [110], ассоциированных с активацией вирусной репликации.

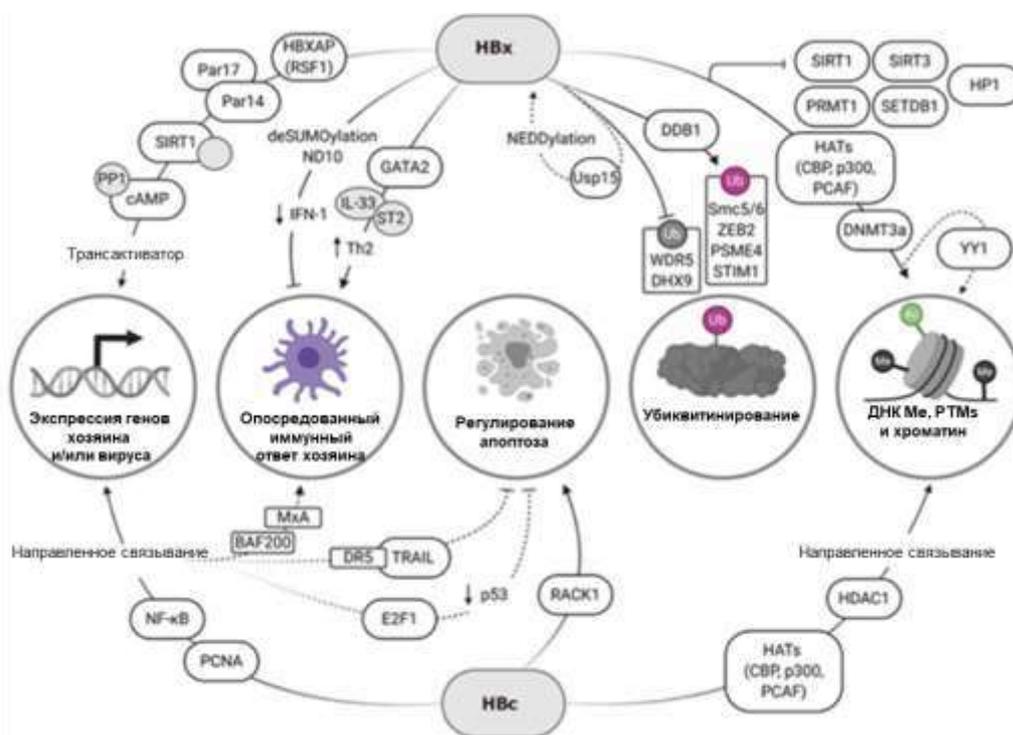


Рисунок 14. Клеточные факторы, участвующие в эпигенетической регуляции ккзДНК [114].

Вирусный белок HBx привлекает множество факторов транскрипции клетки и ко-активаторы для регуляции вирусной репликации и транскрипции ккзДНК, включая CREB, NF-κB, IL-6, SMAD4, RXRR и p53 [115]. Важным ко-активатором вирусной транскрипции является HBx-ассоциированный белок HBXAP (RSF1) [116]. Связывание белка HBx с белками парвулином 14 и парулином 17 (Par14 и Par17, соответственно) увеличивает внутриклеточную стабильность HBx и способствует транслокации HBx в ядро и митохондрии. Кроме того, привлечение Par14/Par17 к энхансерным и промоторным регионам ккзДНК усиливает вирусную транскрипцию, но только в присутствии HBx-белка [117]. Помимо участия HBx в стимулировании вирусной транскрипции, HBx-белок ВГВ также активно подавляет активность, блокирует и разрушает факторы противовирусной защиты клеток человека [118].

Вскоре после формирования пула ккзДНК, инициация транскрипции ВГВ происходит за счет взаимодействия HBx с NATs, включая CBP, p300 и PCAF [61]. При действии мутированного варианта HBx происходит привлечение HDAC1 и SIRT1 к ккзДНК, снижение ацетилирования гистона H4 и подавление транскрипции ккзДНК. По другим сообщениям, SIRT1, напротив, усиливает репликацию ВГВ за счет деацетилирования факторов PGC-1α и FXRα [119] и привлечения AP1 (activator protein 1) к С-промотору ВГВ [120]. В недавней работе на модели ВГВ-инфекции *in vitro* было выявлено, что SIRT1 образует комплекс с HBx, стабилизирует его, и способствует привлечению HBx и других ко-активаторов транскрипции к ккзДНК [121].

HBx также может взаимодействовать с метилтрансферазой PRMT1 и подавлять ее активность, тем самым усиливая репликацию ВГВ [122]. HBx также модулирует экспрессию ДНК-метилтрансфераз, что может вызывать гиперметилирование как промоторов генов человека, так и вирусных промоторов. Гиперметилирование промоторов генов SOCS-1, SUFU и TIRAP подавляет уровни их экспрессии, тем самым подавляя иммунный ответ при ХГВ [123]. Подавление экспрессии супрессоров опухолей – один из ключевых механизмов HBx-опосредованного развития ГЦК [124]. HBx участвует в подавлении интерферонового ответа I типа за счет эпигенетического ремоделирования хроматина инфицированных клеток [125]. HBx также привлекает к ккзДНК активатор транскрипции CREB и увеличивает время его полужизни [126]. Белок HBx также может моделировать состояние хроматина и транскрипционную активность ккзДНК, влияя на пространственную локализацию минихромосомы ккзДНК. В 2020 году было продемонстрировано, что HBx может взаимодействовать с фактором Yin-Yang 1 (YY1), тем самым привлекая ккзДНК к региону генома человека с высокоактивными энхансерными

элементами, что приводит к усилению вирусной репликации [127]. Другим важным механизмом увеличения транскрипции вируса при действии HBx является трансактивирующая способность HBx [128].

Косвенно HBx может изменять эпигенетическое состояние за счет индукции протеасомной деградации отдельных клеточных факторов, инактивации либо стабилизации клеточных факторов и ферментов, таких как ZEB2 [129], PSME4 [130], STIM1 [131]. Фактор DDB1, адаптор E3 лигазного комплекса CRL4, привлекает факторы DCAF, которые, в свою очередь, убиквитинируют и способствуют деградации белков [132]. HBx может взаимодействовать с DDB1 за счет сходства HBx с мотивом связывания DCAF, и использовать внутриклеточную систему убиквитинирования белков для поддержания активной вирусной репликации и персистенции [133].

С другой стороны, HBx может подавлять протеасомную деградацию, как было показано для белка WDR5 (WD repeat domain 5 protein), ключевой субъединицы H3K4-метилтрансферазного комплекса [134]. Стабилизация WDR5 стимулирует экспрессию вирусных генов. Усиление образования ДНК ВГВ также может происходить за счет подавления MDM2-опосредованной деградации противовирусной хеликазы DHX9 (DExH-box RNA helicase 9) [135]. Кроме того, сам HBx-белок может стабилизироваться за счет взаимодействия с деубиквитиновым ферментом Usp15. Увеличение стабильности HBx возможно и за счет NEDDилирования HBx ферментом HDM2 [136]. NEDDилирование снижает убиквитинирование и увеличивает стабильность HBx E3 лигазой Siah-1. Использование низкомолекулярного ингибитора NEDD8 (MLN4924) подавляет репликацию ВГВ за счет снижения уровней NEDDилирования HBx [136].

#### **1.1.10. Ре-инфекция и ре-циклирование кольцевой частично двуцепочечной ДНК вируса**

После взаимодействия с рецепторами, ко-рецепторами и ко-факторами на поверхности гепатоцитов, ВГВ интернализуется в гепатоциты и через ряд последовательных этапов формирует ккзДНК в ядре [44]. КкзДНК ВГВ продуцирует все вирусные транскрипты, включая пгРНК, которая упаковывается вместе с вирусной полимеразой в формирующиеся нуклеокапсиды и транскрибируется в кчдДНК. Зрелые нуклеокапсиды с кчдДНК формируют оболочку в ЭПР и секретируются через мультивезикулярные тельца. С другой стороны, нуклеокапсиды могут возвращаться обратно в ядро, высвобождать синтезированную кчдДНК и пополнять пул ккзДНК

(Рисунок 15) [2,137]. Этот процесс внутриклеточной амплификации можно подавлять ингибиторами обратной транскрипции либо аллостерическими модуляторами кор-белка ВГВ. Их использование нарушает формирование нуклеокапсидов с кчдДНК и терминирует биосинтез ккзДНК [138].

С другой стороны, поддержание пула ккзДНК может происходить за счет реинфекции гепатоцитов. В одной из ключевых работ в 2018 году был впервые проведен динамический анализ формирования всех интермедиатов ВГВ в ходе вирусной инфекции, включая проведение измерений динамики образования и пополнения пула ккзДНК. Саузерн-блот-анализ продемонстрировал, что ккзДНК формируется уже в течение 1-2 суток после инфекции; увеличение уровней ккзДНК происходило до 3 суток после инфекции, и далее оставалось на прежнем уровне [50]. Предшественник ккзДНК, РФ-кчдДНК (RF, protein free) детектировался до 1 суток после инфекции, после чего происходило падение уровней РФ-кчдДНК до недетектируемых значений. Это указывает на то, что после образования РФ-кчдДНК полностью расходуется на формирование пула ккзДНК. РФ-кчдДНК вновь детектировался через 12 суток после инфекции, когда значительные количества внутриклеточной кчдДНК уже были сформированы. Нозерн-блоттинг выявлял вирусные транскрипты уже через 3 дня после инфицирования клеток, с дальнейшим увеличением уровней вирусных транскриптов до 6 суток после инфекции. После 6 суток уровни пгРНК и субгеномных РНК практически не изменялись. Уровни капсид-ассоциированной внутриклеточной ДНК (кчдДНК и репликативных интермедиатов обратной транскрипции), а также секретируемой ДНК ВГВ возрастали с 3 до 12 суток после инфекции. В ходе инфекции также наблюдается возрастающая экспрессия внутриклеточного белка НВх, кор-белка и поверхностных белков, а также уровни секретируемых НВsAg и НВeAg. Уровни белков ВГВ выходили на плато к 12-15 суткам после инфекции [50].

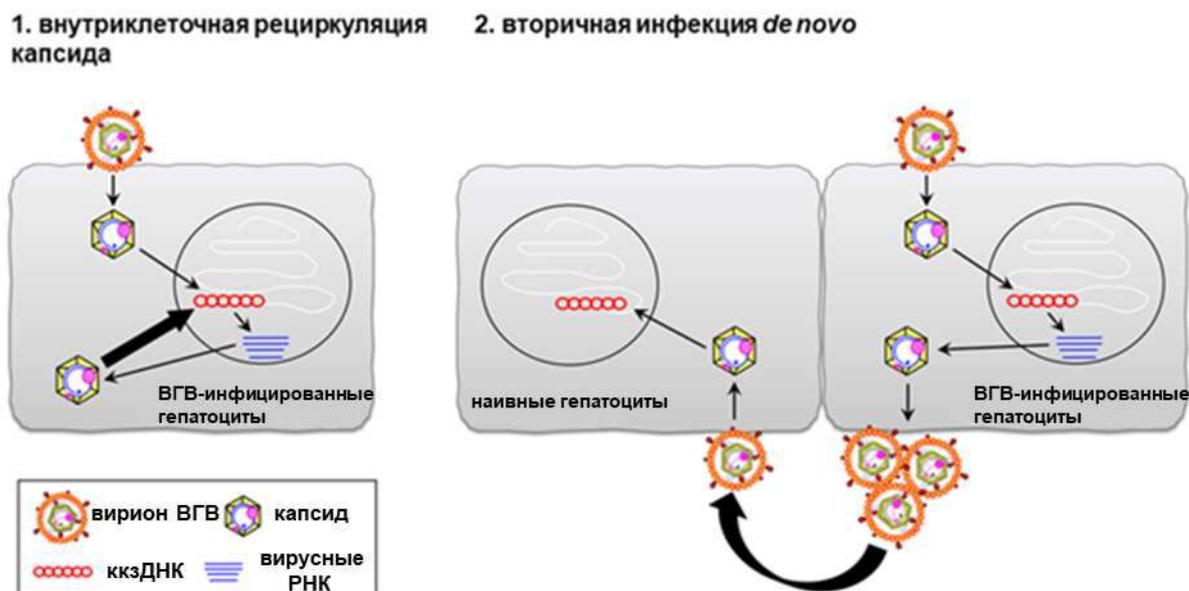
При культивировании высокопермиссивного клона клеток HepG2-hNTCP в течение 45 суток в присутствии 2.5% DMSO (для остановки клеточного цикла с целью предотвращения потери ккзДНК при митозе) было выявлено, что уровни ккзДНК незначительно возрастают со временем. При этом обработка клеток энтекавиром снижает уровни РФ-кчдДНК и уровни ккзДНК на 70% и 48% к 39 и 45 суткам после инфекции. Использование энтекавира препятствовало увеличению ккзДНК в ходе наблюдения. Продолжительная обработка ВГВ-инфицированных клеток также резко снижала уровни общей внутриклеточной ДНК ВГВ [50].

Для непосредственной оценки роли внутриклеточной амплификации в поддержании пула ккзДНК был использован геном ВГВ ВГВ1.3L- с делецией большого поверхностного антигена вируса L-HBsAg, необходимого для инфекции клеток человека. На данной модели было показано, что формирование ккзДНК за счет внутриклеточного ре-импорта – важный механизм пополнения ккзДНК. В данном исследовании также было получено значение времени полужизни ккзДНК в 40 и более суток; при этом в используемой модели образовывалось 1.4-9.6 копий ккзДНК на клетку, что составляет, с учетом нормализации на процент инфекции, 5-12.5 копий ккзДНК на инфицированную клетку [50].

Поскольку известно, что ккзДНК размывается и разрушается при митозе, очевидно, что в клетке должны существовать механизмы пополнения пула ккзДНК ВГВ. К таким механизмам относят (1) ре-инфекцию циркулирующими вирионами; (2) прямая передача вирионов/геномов ВГВ между клетками и (3) внутриклеточный ре-импорт зрелых нуклеокапсидов, содержащих кчдДНК, обратно в ядро с формированием ккзДНК за счет конверсии из кчдДНК.

В работе 2018 года подтверждается важная роль ре-инфекции ВГВ; при этом не было обнаружено свидетельств прямой передачи ккзДНК либо геномных предшественников между клетками при ко-культивировании NTCP-позитивных и ВГВ-негативных клеток. Тем не менее, возможность передачи ВГВ либо вирусных геномов между гепатоцитами не исключена *in vivo* и у пациентов с ХГВ. Наконец, при использовании L-HBsAg-дефицитного варианта ВГВ было продемонстрировано накопление ккзДНК и RF-кчдДНК в клетках, что можно объяснить только внутриклеточной амплификацией ккзДНК. Эти данные также указывают на перспективную возможность блокирования пути

внутриклеточной амплификации ккзДНК для лечения пациентов с ВГВ-инфекцией.



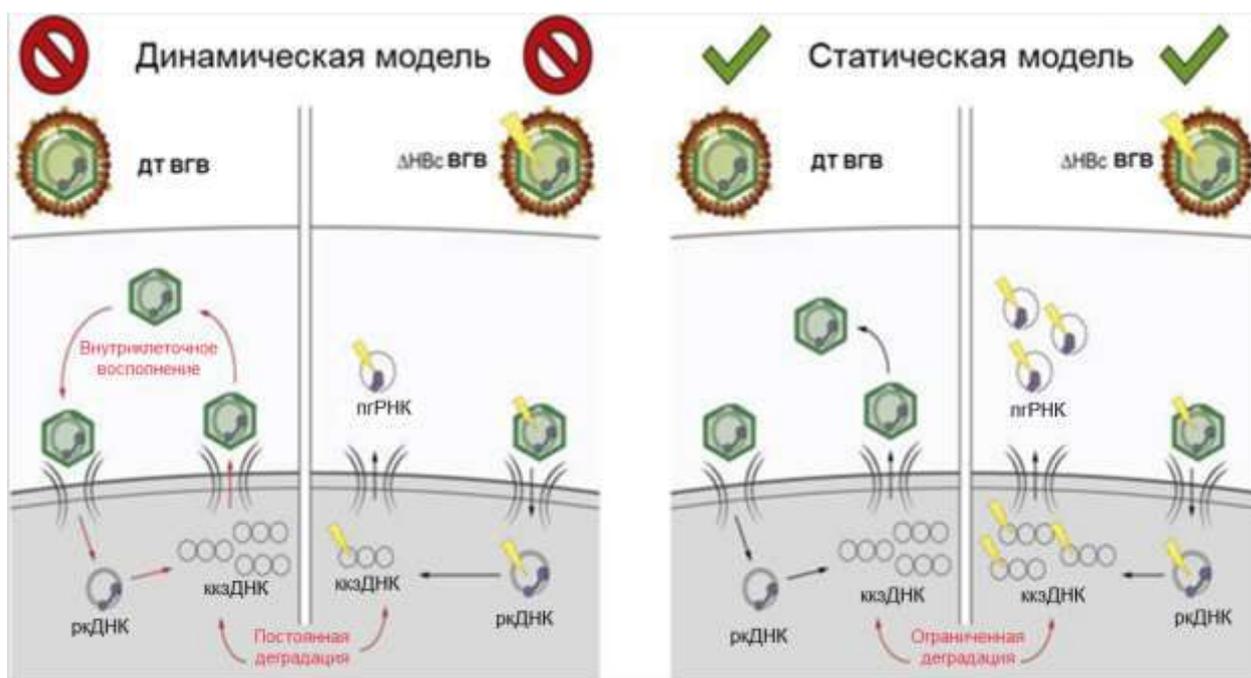
**Рисунок 15. Механизмы поддержания пула ккзДНК ВГВ.** Поддержание пула ккзДНК может происходить (1) за счет возвращения капсидов, содержащих ккзДНК, в ядро и (2) за счет вторичной инфекции *de novo* [50].

В другой работе Thomas Tu с соавт. был использован мутированный геном ВГВ с удалённым участком НВсАg. Делеция НВс делает формирование нуклеокапсидов невозможным, тем самым ДНВс ВГВ не может инициировать синтез нуклеокапсидов и формирование ккзДНК. В результате наблюдения за ВГВ-инфекцией в течение 9 недель авторы сделали выводы о том, что пул ккзДНК крайне стабилен в гепатоцитах и не требует постоянного пополнения за счет образованных *de novo* нуклеокапсидов. Исходя из этого, авторы полагают, что краткосрочное использование модуляторов капсидов и пути ре-импорта нуклеокапсидов может быть неэффективной стратегией для элиминации ккзДНК в хронически инфицированных гепатоцитах [139].

В результате проведенных экспериментов Tu с соавт. делают вывод о том, что (1) установление исходного пула ккзДНК происходит уже в первый раунд инфекции; (2) установившийся пул ккзДНК стабилен в течение >60 суток после инфекции и (3) поддерживает транскрипцию пгРНК и субгеномных РНК без необходимости пополнения пула ккзДНК за счет ре-инфекции и ре-импорта (Рисунок 16) [139]. Данная работа отчасти согласуется с ранее опубликованными исследованиями [140,141], в которых в течение 2 недель после инфекции на первичных гепатоцитах не наблюдалось роста уровней ккзДНК (2-5 копий на инфицированную клетку). Авторы вновь подтвердили, что пул ккзДНК резистентен к действию ингибиторов обратной транскриптазы и ингибиторов вирусной

инфекции; также, было высказано предположение, что внеклеточный и внутриклеточный механизм пополнения ккзДНК играет минорную роль *in vitro*. Кроме того, авторы указывают на то, что частота интеграций ДНК ВГВ (которая также зависит от ре-импорта длДНК) не изменяется при использовании НВс-делетированной формы ДНК ВГВ. Из этого следует, что как формирование стабильного пула ккзДНК, так и большая часть интеграций ДНК ВГВ в геном человека происходит на самом первом этапе установления вирусной инфекции.

Тем не менее, авторы допускают, что проведенные исследования не полностью исключают роль механизмов пополнения ккзДНК в поддержании пула ккзДНК в гепатоцитах ВГВ-инфицированных пациентов. Предполагается, что механизмы «спасения» вирусной персистенции могут скорее участвовать в восполнении случайно потерянной ккзДНК (в результате действия клеточных нуклеаз либо при митозе клеток), чем являться мощным механизмом, противодействующим деградации ккзДНК.



**Рисунок 16. Моделирование поддержания пула ккзДНК.** В динамической модели (левая панель) происходит непрерывная деградация и обновление пула ккзДНК с помощью *de novo* инфекции. В статической модели (правая панель) постоянного обновления не требуется; данная модель подразумевает стабильные молекулы ккзДНК с ограниченной скоростью деградации [139]

Volz с соавторами использовал гуманизированных мышей uPA/SCID, инфицированных ВГВ, и препарат булевирид (микрлюдекс В), ингибитор проникновения вируса в клетку, с 3 по 9 неделю после инфекции, и обнаружил, что уровни ккзДНК в печени мышей не отличались между группами, получавшими и не получавшими булевирид. Это

указывает на то, что внутриклеточный ре-импорт ккзДНК не увеличивает количество ккзДНК при уже установившейся инфекции. Вероятно, существуют механизмы ограничения числа копий ккзДНК в первичных гепатоцитах [142].

#### **1.1.11. Лечение хронического гепатита В**

При лечении пациентов с ХГВ современными противовирусными препаратами (аналогами нуклеот(з)идов либо интерферонами) выделяют несколько вариантов ответа на терапию: (1) серологический; (2) биохимический; (3) гистологический и (4) вирусологический. В то время как первые три ответа отражают функциональное состояние печени и иммунного ответа, последний – вирусологический – наиболее важный. Вирусологическим ответом считается устойчивый (наблюдаемый по крайней мере на протяжении полугода-года) уровень ДНК ВГВ в сыворотке крови <2,000 МЕ/мл [143]. Вскоре после открытия пгРНК в составе вирионов ВГВ (как результат терминированной обратной транскрипции), которые секретируются в больших количествах у пациентов, принимавших аналоги нуклеот(з)идов, появилось определение «функционального излечения». пгРНК ВГВ в составе вирионов было предложено использовать для оценки эффективности лечения ХГВ, а также в качестве маркера-предиктора ответа пациентов с ХГВ на противовирусную терапию. Транскрипционная инактивация ккзДНК ВГВ сопровождается прекращением транскрипции и секреции пгРНК в составе вирионов. Тем самым, значительное снижение либо недетектируемые уровни пгРНК в сыворотке крови косвенно говорит о функциональной инактивации ккзДНК ВГВ. При этом уровни ккзДНК в гепатоцитах печени могут практически не изменяться [144].

Вероятным и наиболее благоприятным исходом использования современных противовирусных препаратов является наступление так называемого «функционального излечения». Функциональное излечение определяют как достижение пациентами с ХГВ элиминации HBsAg с сероконверсией по HBsAg либо без сероконверсии. Риски цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы при функциональном излечении оказываются значительно сниженными. В достижении функционального излечения немаловажную роль, вероятно, играет развитие иммунологического контроля над гепатоцитами с остаточной репликацией ВГВ, и подавление за счет цитолитических и не цитолитических механизмов (за счет продукции цитокинов и индукции цитидин-дезаминаз) подавления распространения вирусной инфекции. Кроме того, в остановке распространения и прогрессии инфекции может играть роль эпигенетическая блокада ккзДНК ВГВ с нарушением либо полной блокадой транскрипции [145]. Тем не менее, доля пациентов, достигающих

функционального излечения с использованием современных противовирусных препаратов, не превышает 10% [146].

Традиционно использовались две группы препаратов для лечения ХГВ – прямого противовирусного действия, а именно аналоги нуклеот(з)идов и активаторы иммунного ответа (Рисунок 17). Наиболее эффективными и безопасными препаратами группы аналогов нуклеот(з)идов является энтекавир и тенофовир [147].

Препараты пегилированного интерферона- $\alpha$ , как правило, применяются у пациентов с низкой репликацией вируса (низкие уровни ДНК ВГВ и HBsAg в сыворотке крови), а также при лечении пациентов с генотипом А ВГВ [148]. Лечение препаратами интерферона также оправдано при высоких значениях ALT у пациентов [149]. Прием данных групп препаратов в редких случаях может привести к устойчивому вирусологическому ответу, однако как правило, такие препараты приходится принимать пожизненно; прекращение приема препаратов сопровождается реактивацией вирусной инфекции [148,149].

Предполагается, что одновременное использование нескольких препаратов, блокирующих разные этапы жизненного цикла вируса, сможет обеспечивать более высокий процент функционального излечения у пациентов с ХГВ. В клиническую практику, помимо препаратов-аналогов нуклеот(з)идов (ингибиторов обратной транскриптазы) и препаратов интерферона, уже вошел препарат-ингибитор рецептора ВГВ – NTCP (препарат Мирклюдекс В, или булевиртид) [150]. Кроме того, на поздних стадиях клинических исследований находятся препараты на основе технологии РНК-интерференции и ингибиторы сборки капсидов [138,148].

В ранних исследованиях на клетках *in vitro* и животных *in vivo*, препарат Мирклюдекс В показал высокую противовирусную эффективность. В I фазе клинических исследований была продемонстрирована хорошая безопасность и переносимость однократных внутривенных и подкожных доз препарата [148]. Не наблюдалось развития серьезных либо значимых побочных реакций, не наблюдалось развития иммунных воспалительных реакций даже при наивысшей исследуемой дозе препарата в 20 мг внутривенно. Изначально предполагалось, что Мирклюдекс В может негативно влиять на образование желчи, однако оказалось, что транспорт жирных кислот не меняется при использовании препарата в дозах до 47 нМ, при этом подавление вирусной инфекции достигается уже при 80 пМ [151].

При совместном использовании Мирклюдекса В с ингибитором обратной транскриптазы ВГВ тенофовиром не происходит изменения фармакокинетики тенофовира

[152]. Несмотря на высокую эффективность Мирклюдекса В в подавлении реинфекции ВГВ, препарат считается наиболее перспективным для лечения ко-инфекции ВГВ+ВГД. Вместе с этим, в недавней работе Allweiss с соавт. показали на моделях ВГВ-инфицированных клеток и трансгенных мышей, что при совместном использовании РНК-интерференции совместно с препаратами интерферона и Мирклюдексом В вызывает транскрипционную инактивацию ккзДНК за счет нарушения образования белка НВх ВГВ и связывания комплексов SMC5/6 с матрицами ккзДНК [153]. Следовательно, подобная терапевтическая стратегия может быть более эффективной, и состоит из двух одобренных для клинического применения препаратов, а также препарата на основе технологии РНК-интерференции, который находится в III-IV фазе клинических исследований. Эффективность подобной комбинации необходимо оценить в рамках клинических исследований.

На различных этапах клинических испытаний находятся ингибиторы образования ккзДНК (в частности, двузамещенные сульфонамиды CCC-0975 и CCC-0346), способные снижать уровни ккзДНК в инфицированных в клетках за счет нарушения этапа конверсии кчдДНК в ккзДНК (Рисунок 18) [147]. Ингибиторы сборки нуклеокапсида (белка НВсАg, который участвует в упаковке ДНК ВГВ, обратной транскрипции и ре-импорте кчдДНК в ядро) находятся уже на завершающих стадиях клинических исследований. Хорошую переносимость, безопасность и эффективность показали препараты-ингибиторы сборки нуклеокапсида NVR-3778 и JNJ56136379. Селективный ингибитор сборки нуклеокапсида морфотиадин GLS4 (препарат из группы гетероарилдигидропиримидинов) также продемонстрировал выраженную противовирусную активность, в том числе в отношении вариантов ВГВ, резистентных к некоторым аналогам нуклеот(з)идов [154]. Сборка нуклеокапсидов и репликация ВГВ эффективно подавляются при использовании препаратов аллостерической модификации НВсАg (СрАМs), в частности, при использовании препарата АВI-Н0731 эффективно снижаются уровни ДНК ВГВ, пгРНК, ккзДНК, НВеАg, НВsАg [155]. Ингибитор АВ-423 из группы сульфамойлбензамидов также эффективно нарушает инкапсидацию пгРНК и формирование ккзДНК de novo [156]. Тем не менее, в недавней работе Tu с соавт. из лаборатории Stephan Urban при использовании генома ВГВ с мутацией в НВсАg, которая полностью прекращает формирование НВсАg и сборку нуклеокапсидов, было выявлено, что уровни ккзДНК в неделящихся клетках оказываются высокостабильны, и не зависят от процесса ре-импорта кчдДНК в ядро либо процесса ре-инфицирования. Авторы выдвигают предположение, что процессы образования ккзДНК в делящихся клетках в основном зависят от ре-инфицирования, тогда

как внутриклеточная амплификация по пути ре-импорта кчдДНК в ккзДНК играет скорее вспомогательную роль. Следовательно, монотерапия ингибиторами НВсАg скорее всего не будет иметь преимуществ в сравнении с уже одобренными препаратами [139].

Транскрипты ВГВ – важные мишени для противовирусной терапии, в этой связи, препараты на основе технологии РНК-интерференции могут существенно улучшить эффективность лечения пациентов с ХГВ (Рисунок 18). Более десятка перспективных разработок на основе РНК-интерференции проходят различные этапы клинических исследований, включая препарат ARC-520 на основе 2 малых интерферирующих РНК, конъюгированных с холестерином [157], препарат ARB-1467 на основе 3 малых интерферирующих миРНК (к генам S и X) в составе липидных наночастиц [158], препарат второго поколения ARB1740 (с более высокой активностью) [159], препарат Alynlam ALN-HBV (нацелен на консервативный регион X-гена ВГВ) в составе стабильного конъюгата, улучшающего фармакокинетические свойства препарата [160]. Тем не менее, препараты на основе РНК-интерференции наверняка не будут использоваться в качестве монотерапии, их использование не улучшает частоту вирусологического ответа у пациентов с ХГВ. Кроме того, препараты на основе миРНК вводятся инъекционно, вызывают нежелательные побочные эффекты (включая воспалительные реакции) [158]. Поиск наиболее удачных комбинаций противовирусных препаратов совместно с миРНК необходимо для успешного внедрения данной группы лекарственных препаратов в клиническую практику.

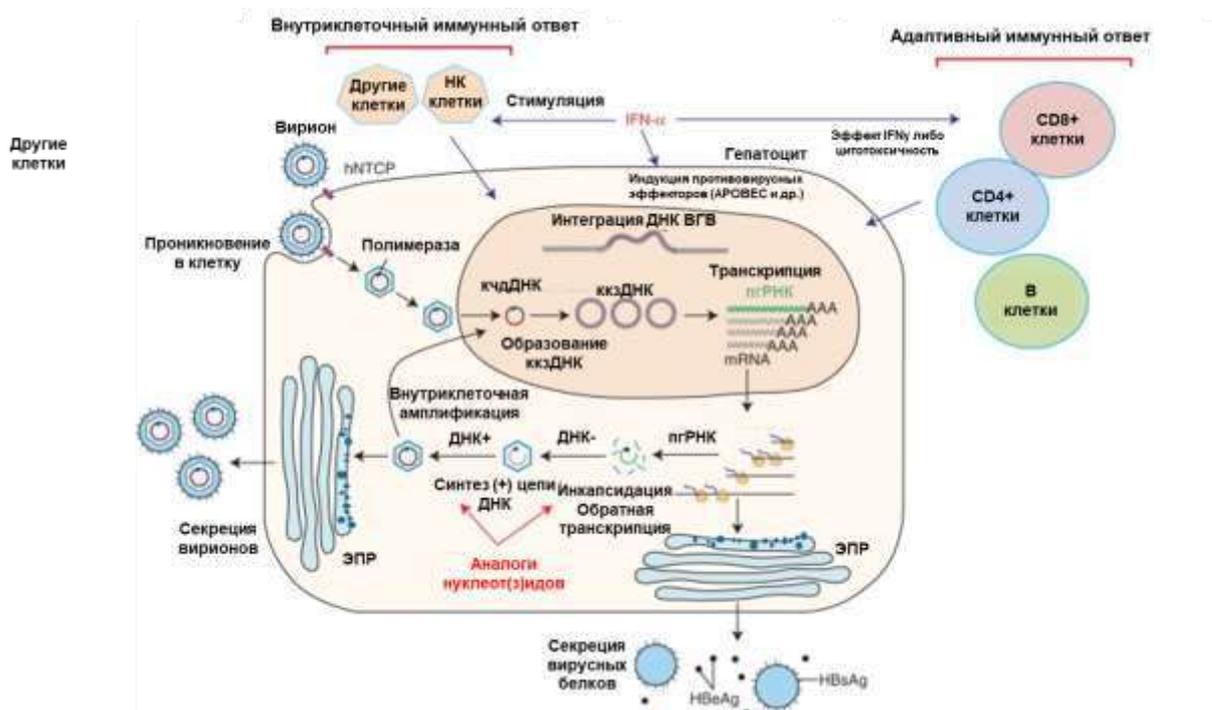


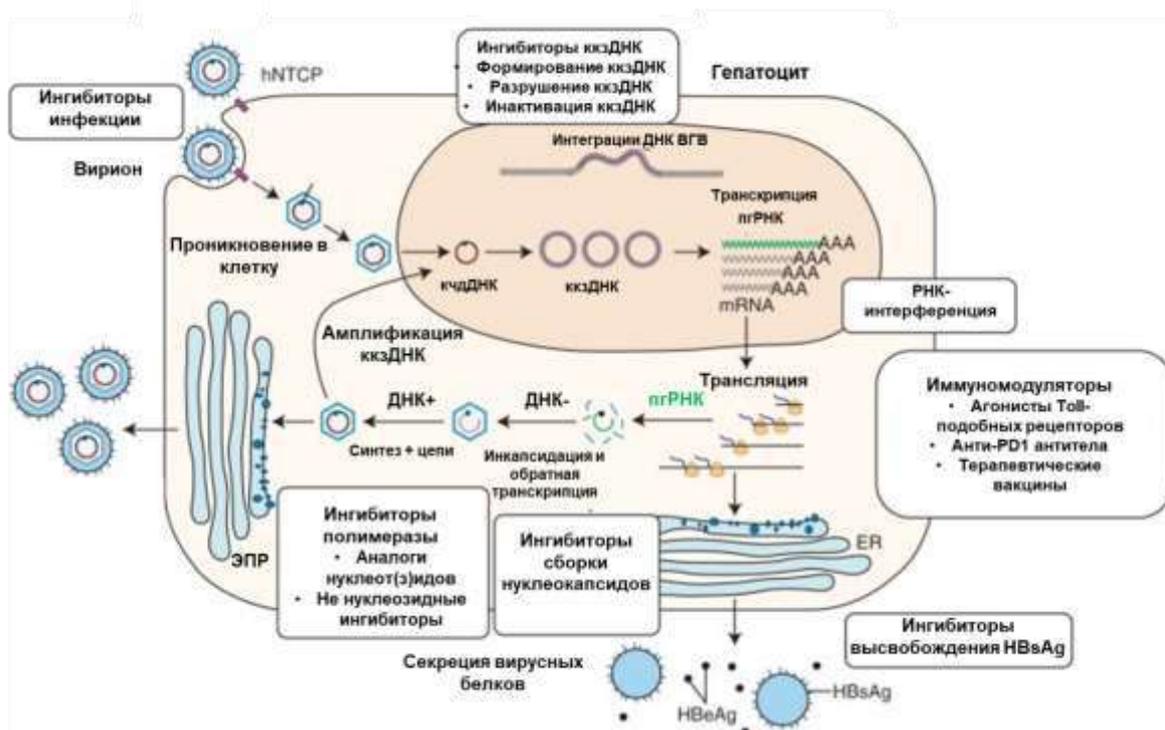
Рисунок 17. Схема противовирусного действия интерферона (IFN)– α и аналога нуклеозида (NA). NA блокируют синтез кчдДНК на матрице пгРНК, выступая в качестве

терминатора для вирусной полимеразы. IFN- $\alpha$  оказывает как прямое, так и косвенное действие на репликацию ВГВ *in vivo*. IFN  $\alpha$  стимулирует естественные киллеры и CD8+ клетки, вызывая цитоллиз инфицированных клеток, а также способствует подавлению репликации ВГВ за счет индукции цитидин-дезаминаз, факторов внутриклеточного противовирусного ответа и, следовательно, нецитолитическому удалению ВГВ из клеток [161]

Среди препаратов интерферона, интерферон- $\alpha$  (peg-IFN- $\alpha$ -2a и  $\alpha$ -2b) используется для лечения ХГВ уже в течение нескольких десятилетий (Рисунок 17, 18). В связи с парентеральным способом введения, а также индукцией тяжелых побочных реакций (грипп-подобные симптомы, нарушение функции щитовидной железы, нейтропения, нарушения ЖКТ) и слабого воздействия на репликацию ВГВ, препараты интерферона не являются препаратами выбора для лечения ХГВ [149]. Пегилированная форма интерферона имеет более длительный период полувыведения в сравнении со стандартным интерфероном; тем самым, при меньшей частоте дозирования удается достигнуть более устойчивого и выраженного подавления ВГВ-инфекции в сравнении со стандартным интерфероном. Несмотря на возникновение побочных эффектов, применение интерферона сопровождается высокой частотой сероконверсии по HBeAg и исчезновением HBsAg в сравнении с аналогами нуклеот(з)идов. Кроме того, при совместном использовании препаратов интерферона в сочетании с тенофовиром частота сероконверсии по HBsAg оказывается выше, чем при монотерапии пегилированным интерфероном либо тенофовиром [162].

В исследовании Phillips с соавт., была проведена оценка эффективности комбинированной терапии интерфероном- $\lambda$  с энтекавиром, и продемонстрирована более значительное снижение уровней ДНК ВГВ, HBsAg и HBeAg в сравнении с монотерапией энтекавиром [163]. Проводятся испытания иммуномодуляторов и иммуностимуляторов для лечения ХГВ. Так, на модели шимпанзе в 2013 году было продемонстрировано длительное подавление репликации ВГВ при использовании GS-9620, агониста Toll-подобного рецептора 7 (TLR7). В сочетании с аналогами нуклеот(з)идов препарат GS-9620 усиливает цитотоксическую активность Т-клеток и естественных киллеров, усиливая общий противовирусный ответ организма [164]. До сих пор остается предметом споров, могут ли препараты интерферона индуцировать разрушение и снижение уровней ккзДНК ВГВ. Тогда как в отдельных сообщениях уровни ккзДНК снижались при действии интерферона ([165,166]), в других работах уровни ккзДНК оставались неизменными ([167–169]). Также была опубликована работа по влиянию интерферона-альфа на транскрипционную инактивацию ккзДНК [170]. В последующем исследовании этот механизм действия

интерферона- $\alpha$  не подтвердился. В исследованиях лаборатории Ulrike Protzer было продемонстрировано, что сверхвысокие дозы интерферонов могут индуцировать гиперэкспрессию цитидин-дезаминазы АРОВЕС3А, что приводит к прямому взаимодействию АРОВЕС3А с ккзДНК, дезаминированию и разрушению вирусных ДНК [171]. В продолжении этой работы от той же научной группы Stadler с соавт. показали, что разрушение ккзДНК фактором АРОВЕС3А связано с активностью интерферон-стимулируемого гена ISG20 [172]. Тем не менее, группа Christoph Seeger с соавт. показала, что уровни мутации ккзДНК при гиперэкспрессии АРОВЕС3А могут быть очень низкими, при этом противовирусная активность АРОВЕС-дезаминаз может быть главным образом вызвана влиянием на ккдДНК [173].



**Рисунок 18.** Цикл репликации ВГВ и потенциальные мишени для противовирусных препаратов [174].

Важным новым направлением стала разработка подходов по восстановлению целостности комплексов SMC5/6, способных связываться с ккзДНК ВГВ и блокировать вирусную транскрипцию. При ВГВ-инфекции HBx белок вируса связывается с фактором DDB1, вызывает полиубиквитинирование и протеасомное разрушение компонентов комплекса SMC5/6. В ряде работ была показана возможность создания низкомолекулярных ингибиторов взаимодействия HBx с DDB1, что вызывало восстановление комплексов

SMC5/6 и транскрипционную блокаду вирусной транскрипции, по крайней мере на моделях *in vitro* [138].

Вместе с вышеизложенным, идут разработки по созданию препаратов-дестабилизаторов ккзДНК, иммунологические подходы на основе CAR-T клеток, разработка терапевтических вакцин, а также подходы по сайт-направленному разрушению и гипермутации ккзДНК ВГВ с помощью различных систем нуклеаз [138].

В совокупности, комбинация новых противовирусных препаратов может если не добиться полной элиминации вируса из организма, то по крайней мере увеличению частоты достижения устойчивого вирусологического ответа и функционального излечения.

## **1.2. Манипуляция генетической информацией с помощью молекулярных инструментов CRISPR/Cas**

Генетическое редактирование и манипуляции с ДНК, РНК, эпигеномом, эпитранскриптомом и трехмерной организацией генома стало возможно в последние годы в связи с адаптацией под нужды биологии и фундаментальной медицины систем противовирусного иммунитета бактерий и архей CRISPR/Cas. С их помощью возможно внесение в целевые, заданные последовательности генетической информации человека, млекопитающих, растений и пр., направленных модификаций с целью устранения патогенных мутаций либо внесения желаемых генетических изменений. С помощью CRISPR/Cas систем возможно создание новых штаммов-продуцентов в сфере биотехнологии, создание генно-модифицированных модельных животных, создание терапевтических подходов нового поколения для лечения прежде неизлечимых наследственных, онкологических и инфекционных заболеваний, а также (в последние годы) создание диагностических систем нового поколения, которые могут во многом заменить ПЦР-диагностику. Надежность, простота использования и возможность нацеливаться практически на любой участок ДНК или РНК сделали системы CRISPR/Cas ведущим инструментом редактирования генов и манипуляции с генетической информацией. CRISPR/Cas системы функционируют на простом принципе: возможности привлечения Cas белка к заданной области генетической информации с помощью направляющего РНК-проводника. Программирование CRISPR/Cas систем для взаимодействия с заданной областью является простым и эффективным, при этом важным аспектом является специфичность взаимодействия Cas белков с заданной областью, а не со схожими последовательностями в геноме. Специфичность взаимодействия определяется как

последовательностью мишени, так и, во многом, характеристиками используемых Cas белков, а также параметрами синтезированных РНК-проводников (наличие стабилизирующих химических модификаций, структур шпилек, дополнительных нуклеотидов и др.) [175].

Исторически первыми и, на данный момент, наиболее распространенными в практической биологии, являются системы CRISPR/Cas типа II. Первой системой CRISPR/Cas, адаптированной для редактирования генома, была система от организма *Streptococcus pyogenes* (Sp). Белок SpCas9 содержит два нуклеолитических домена RuvC и HNH, которые расщепляют нити двуцепочечной ДНК и формирует двуцепочечные разрывы – ДЦР [176]. На основе Cas белков созданы многочисленные дополнительные молекулярные инструменты, основанные на лишенном нуклеолитической активности Cas белке (за счет аннулирования доменов RuvC и HNH) и соединения Cas белков с функциональными доменами [177]. Такие белки получили название «нуклеолитические мертвые», или «dead» Cas; функциональные домены, соединенные с dCas белками через подвижные линкеры, могут представлять собой факторы ремоделирования хроматина, домены редактирования ДНК либо РНК, репортерные белки, домены обратной транскриптазы, факторы метилирования/деметилирования ДНК/РНК и др. [175].

При этом, в связи с уникальными свойствами этих систем (способность взаимодействовать с РНК либо наличие коллатеральной активности), широкое применение находят системы CRISPR/Cas типов V, VI и др.

Экспрессия генов во многом определяется эпигенетическими модификациями в областях регуляторных элементов – промоторах и энхансерах. Контроль процессов эпигеномного ремоделирования определяет транскрипцию генов. Белки dCas могут быть созданы для прямой модификации ДНК путем метилирования или деметилирования, а также для изменения эпигенетических меток в составе гистоновых белков путем их ацетилирования/деацетилирования, метилирования/деметилирования или привлечения факторов транскрипции. Ремоделирование эпигенома необходимо для изучения функции генов и регуляторных генетических элементов, а также для разработки новых терапевтических средств, которые, например, подавляют активность вирусного генома, модулируют иммунные реакции, подавляют активность онкогенов или при программировании стволовых клеток.

Стандартной системой для точечного метилирования ДНК является dCas9-ДНМТ3А, включающая домен ДНК-метилтрансферазы. Модификацией технологии на

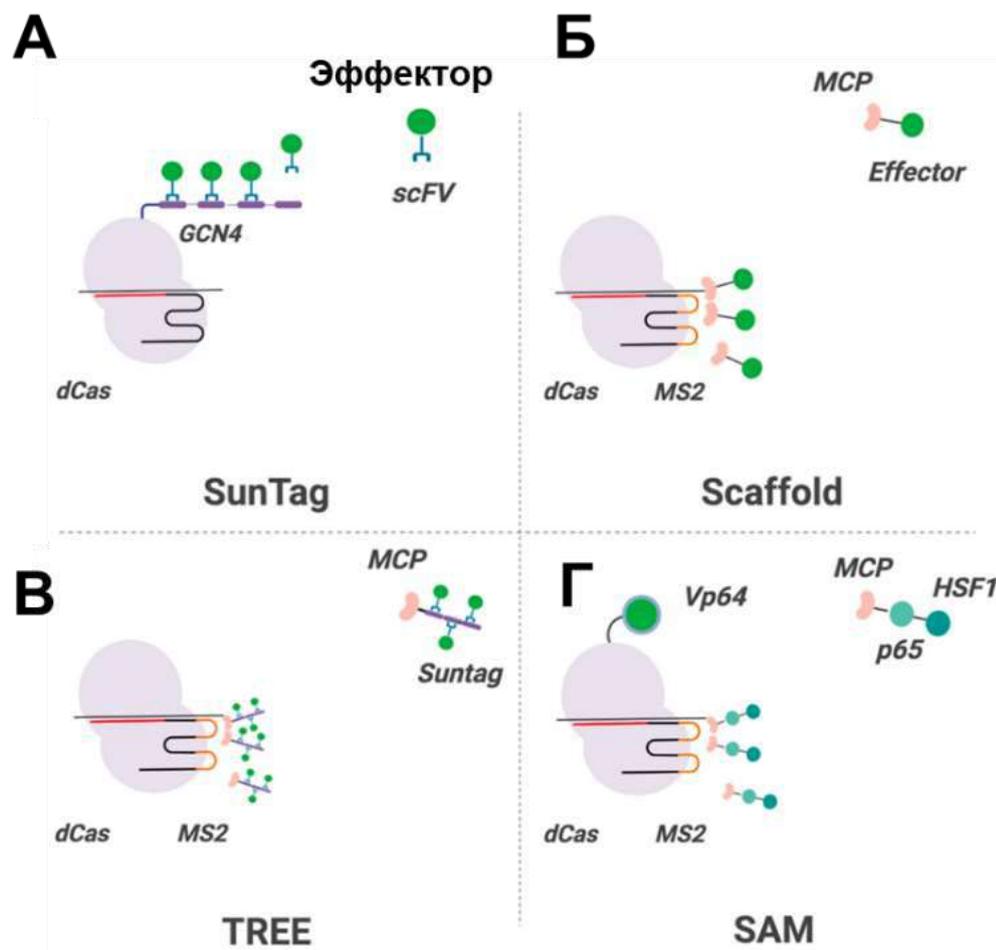
основе dCas, предназначенной для повышения эффективности метилирования, система SunTag, принцип которой заключается в присоединении пептидных повторов GCN4 к dCas белку и использовании эффекторных молекул с фрагментами scFv. Фрагменты scFv взаимодействуют с пептидами GCN4, при этом dCas9-GCN4 привлекается к заданной области генома с помощью РНК-проводника. Подобная трехкомпонентная система позволяет привлекать до 10 молекул эффектора, связанного с scFv, к одному dCas белку, содержащему повторы GCN4 [178]. Системы деметилирования были использованы для экспериментального лечения ряда патологических состояний, связанных с развитием инфаркта миокарда. Например, деметилирование энхансеров фосфолипидфосфатазы, при нарушении активности которой происходит кальцификация аортального клапана [175,179]. Проводятся также фундаментальные исследования по роли отдельных генетических элементов в развитии заболеваний человека [175]. В частности, с их помощью была выявлена роль метилирования промотора десмоплакина в патогенезе идиопатического фиброза легких [180].

Напротив, в случае злокачественных заболеваний часто необходимо провести деметилирование участков геномной ДНК, например, в областях опухолевых супрессоров. Деметилирование генома также необходимо при получении стволовых клеток. Технология деметилирования генома впервые была разработана на основе dCas9 белка, связанного с ДНК-деметиلاзой ТЕТ1. Наиболее эффективные варианты системы dCas9-ТЕТ1 деметилирования обеспечивают удаление СН<sub>3</sub>- меток с >90% участков ДНК-мишени [181–183].

С другой стороны, транскрипционно активный хроматин (эухроматин) характеризуется метилированными остатками гистонов H3K4 и H3K79 и ацетилированными остатками H3K9 и H3K27 [184,185]. Подавление активности целевых генов может осуществляться с помощью инструментов для CRISPR-интерференции (CRISPRi). Как dCas9-KRAB [186], так и dCas9-EZH2 [187] могут кратковременно снижать транскрипцию генов через подавление активности их регуляторных участков. Устойчивое подавление транскрипции возможно при сочетании систем (dCas9-KRAB/dCas9-EZH2) с системами метилирования ДНК dCas (dCas9-ДНМТ3А-3L [187–189] или dCas9-SunTag-ДНМТ3А [178]). В противоположность CRISPR-интерференции, метод индукции целевых генов с помощью модифицированных Cas-белков известен как CRISPR-активация (CRISPRa). Надежная индукция транскрипции генов при помощи указанных систем требует использования набора из нескольких РНК-проводников, нацеленных на протяженную область генома («мультиплекс»). Система VPR основана на белке dCas9,

связанном с белковым комплексом VP64-p65-Rta, где Rta — фактор транскрипции вируса Эпштейна-Барр. Трехкомпонентный комплекс VP64-p65-Rta обладает значительно более высокой эффективностью активации транскрипции, чем предыдущие системы CRISPRa, вызывая многократную активацию целевых генов в варианте с использованием одного РНК-проводника [190,191].

Системы CRISPRa, объединенные с технологией аффинного связывания, позволяют одновременно привлекать несколько доменов к целевому сайту. В этих условиях могут быть введены различные модификации CRISPRa. Данные технологии основаны на прикреплении к РНК-проводникам и Cas белкам последовательностей, которые взаимодействуют друг с другом по типу РНК-пептид. В частности, к таким технологиям относят технологии Scaffold и Casilio, технологию SunTag и др. Достоинством подобных систем является возможности привлечение многочисленных эффекторных молекул к сайту, заданному единственным РНК-проводником [192]. Подобные системы строятся либо на принципе взаимодействия пептидов GCN4 с элементами scFv (принцип SunTag) [193,194], либо на принципе взаимодействия аптамеров с аптамер-специфичными белками (Com-COM, PP7-PCR, MS2-MCP) (система Scaffold) [195]. В системе Casilio представлена более усовершенствованная технология, суть которой состоит в применении более коротких аптамеров Casilio [196]. В системе SAM функционируют белки dCas9 и технология Scaffold, что позволяет регулировать транскрипцию сразу на двух уровнях – на уровне транскрипционных dCas9 белка, и на уровне доменов, привлекаемых к аптамерам РНК-проводников [195,197]. В системе TREE находит воплощение объединение технологий SunTag и Scaffold, что позволяет привлекать к целевому сайту до 32 молекул VP64 или p65-HSF1 [198]. Принципы дизайна и примеры использования dCas9 систем представлены в Таблице 1.



**Рисунок 19. Модификация компонентов систем CRISPR для улучшения эпигенетической регуляции.** (А) Технология SunTag. К белку пришиты пептиды GCN4, которые взаимодействуют с любой эффекторной молекулой, содержащей одноцепочечные переменные фрагменты (scFV) (Б) Технология Scaffold. В Scaffold эффекторные молекулы рекрутируются в сайт-мишень посредством взаимодействия специфического белка MCP с короткой синтетической гНК, содержащей аптамер MS2. (В) Технология TREE сочетает в себе методы SunTag и Scaffold, обеспечивая дополнительное привлечение эффекторных молекул. (Г) Технология SAM основана на двухкомпонентном транскрипционном эффекторе (p65– HSF1), привлеченном к мишени посредством взаимодействия MS2– MCP. Кроме того, белок dCas связан с регулятором транскрипции (VP64) для усиления эффекта [175].

Еще одним вариантом CRISPRa является привлечение промотора цитомегаловируса (CMV) к мишени для активации регуляторных областей генов. Эта модификация CRISPRa основана на химерной РНК-проводника, объединенного с ДНК промотора цитомегаловируса [199].

**Таблица 1. Принципы дизайна РНК– проводников для методов CRISPRa и CRISPRi.**

Мишень	Тип модификации	Влияние на транскрипцию	Система	Эффективность
ДНК	Метилирование	Подавление	ДНМТ3А [183,200,201]	+
			ДНМТ3А-3L [202]	+++
			SunTag-ДНМТ3А [178]	+++
	Деметилирование	Активация	dCas9-TET1 [178]	+
			dCas9-SunTag-TET1 [182]	+++
			dCas9/MS2/MCP-TET1 [203]	+++
Хроматин	Деацетилирование гистонов	Подавление	dCas9-LSD1 [204]	++
	Ацетилирование гистонов	Активация	p300Core [205]	++
	Привлечение факторов транскрипции	Активация	VP64 [206–208]	+
			VP160/VP192 [209]	++

Мишень	Тип модификации	Влияние на транскрипцию	Система	Эффективность
			p65/p65-HSF1 [197,208]	+ / +++
			SunTag-VP64 [194]	+++
			VPR [190,191]	+++
			SunTag-p65-HSF1 [193]	++++
			SAM [195,197]	++++
			TREE [198]	++++
			Casilio [196]	+++
			Scaffold [195]	+++
		Подавление	dCas9-KRAB [210]	++
			dCas9-KRAB-MeCP2 [211]	+++
			dCas9-EZH2 [187]	++
	Привлечение экзогенного промотора		Активация	CMV [199]

### 1.2.1. Применение CRISPRa/i

CRISPRa и CRISPRi все чаще используются в биологических исследованиях и при разработке новых типов лекарственных препаратов. Эти подходы оказались чрезвычайно эффективными при экспериментальном лечении метаболических нарушений и заболеваний, связанных с нарушением работы генов, включая сахарный диабет, мышечную дистрофию Дюшенна, получение и дифференцировку стволовых клеток.

С целью подавления и активации энхансеров наиболее универсальными факторами являются KRAB и ацетилтрансфераза p300. Системы CRISPRi/a, основанные на KRAB и p300, могут использоваться для валидации предполагаемых дистальных регуляторных элементов и энхансеров [212,213]. На основе систем CRISPRi/a, в частности, разрабатываются противовирусные подходы. Были созданы системы CRISPR-активации транскрипции цитидин-дезаминаз APOBEC3B и APOBEC3G для подавления репликации вируса иммунодефицита человека [214], создан подход по индукции гибели ВИЧ-инфицированных клеток человека за счет резкого усиления вирусной репликации, токсической гибели клеток либо активации иммунной системы [215–218]. CRISPRa также можно использовать для идентификации новых противовирусных факторов на моделях клеток *in vitro* [219].

В онкологии системы CRISPRa/i могут использоваться для модуляции активности супрессоров опухолевого роста (PTEN, CHEK2 и др.), что может снижать жизнеспособность трансформированных клеток, снижать их пролиферацию и метастазирование [220–222]. Наиболее важные примеры приложений CRISPRa/i приведены в Таблице 2.

**Таблица 2. Применение инструментов CRISPRi и CRISPRa.**

Фундаментальные исследования		
Применение	Функциональный домен	Целевые регионы/гены
Экспериментальная валидация функции регуляторных элементов	KRAB/p300	энхансеры [212,213]

Изучение функции генов	VPR	Роль генов <i>Bdnf</i> , и <i>Reln</i> [223]
Изучение внутриклеточных сигнальных путей	Scaffold/SAM	Создание химерных рецепторов [224,225]
Полногеномный скрининг	SAM	Полногеномная библиотека CRISPRa [226]
Фундаментальные исследования в онкологии	SAM SunTag-VP64	Развитие опухолей с генами <i>Hells</i> [197,227], <i>lncRNAs</i> [228–230], <i>Myc</i> [231], <i>Kras</i> [232]
<b>Экспериментальные подходы к терапии</b>		
Применение	Функциональный домен	Целевые регионы/гены
Противовирусные подходы	SAM Scaffold	Активация анти-ВИЧ генов [214,233]
	p300	Активация цитидин-дезаминаз <i>APOBEC3A</i> и <i>APOBEC3B</i> [76]
	SunTag-VP64; dCas9-VPR; SAM [175]	Реактивация ВИЧ-инфекции [215–218]
Лечение метаболических нарушений	KRAB	Подавление активности гена <i>TNFR1</i> [234–236]
	SAM	Активация гена <i>Klotho</i> [237] – нефро- и нейропротективная функция [175]

воспалительных заболеваний	KRAB	Подавление активности гена <i>Pcsk9</i> [175,238]
Исправление мутаций при наследственных заболеваниях	SAM	Лечение DMD [239]
	VP64	Лечение ожирения [240]
	VP64	Лечение синдрома Драве [241]
Противоопухолевые подходы [175]	ДНМТ3А KRAB	Подавление протоонкогена <i>Granulin</i> [242]
	VPR	Активация онкосупрессоров <i>PTEN</i> [220], <i>CHEK2</i> [221,222]
	VP64	Удаление теломерных повторов [243]
	SAM	Активация генов, кодирующих факторы презентации клеткам иммунной системы [244]
Область получения и использования стволовых клеток [175]	VP64 SAM p300	Получение стволовых клеток за счет индукции факторов Яманаки [245–247]
	VPR	Получение стволовых клеток за счет активации гена <i>NANOG</i> [175,248]
	SAM	Получение из стволовых клеток жировой ткани [249], нейронов [250], клеток поджелудочной железы [251]
	SAM	Перепрограммирование нейрональных клеток за счет воздействия на гены <i>Neurog2</i> , <i>Ascl1</i> , <i>Neurod1</i> , и др. [193]

## **1.2.2. Редактирование нуклеиновых кислот**

Многие наследственные и онкологические заболевания связаны с существованием мутаций - однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) [252]. Исправление SNP белками-нуклеазами Cas связано с работой с гомологичными матрицами, при этом эффективность таких подходов зависит от сложных путей репарации ДНК и, как правило, оказывается неэффективным [253]. Простая коррекция SNP стала возможной благодаря системам dCas, слитым с факторами редактирования оснований нуклеиновых кислот.

### **1.2.2.1. Редактирование оснований ДНК с помощью инструментов dCas**

Системы редактирования оснований используют белки dCas, слитые с цитидин- или аденозиндеаминазами. Цитидиндеаминазы превращают цитозин в урацил (C→U), при этом возникающие в результате несовпадения U•G репарируются с образованием тимина (C→T) на целевой цепи и гуанина (G→A) в комплементарной цепи [254,255], тогда как аденозиндеаминазы дезаминируют A с образованием инозина (I). Недавно были описаны улучшенные редакторы адениновых оснований [256], полученные с помощью направленной эволюции, которые способны эффективно преобразовывать пары оснований A•T в пары оснований G•C в ДНК. rAPOBEC1 [256], APOBEC3A [257], AID и его гомологи [258–261] относятся к наиболее широко используемым цитидиндеаминазам. Дезаминирование аденина осуществляется аденозиндеаминазой TadA [262].

Эффективность редакторов оснований цитозина может быть довольно низкой из-за репарации отредактированных нуклеотидов эндогенными системами репарации ДНК, такими как фактор UNG. Более высокая эффективность редактирования оснований была показана для белков-никаз nCas9, в которых инактивирован один из двух нуклеолитических доменов. При этом сохранивший активность нуклеолитический обеспечивает возможность расщеплять одну из цепей ДНК. При ко-экспрессии с UGI, ингибитором UNG, эффективность редактирования резко увеличивается [256]. Блокирование UNG фактором UGI временно нарушает репарацию ДНК, и дезаминированные нуклеотиды не исправляются на корректные нуклеотиды. Белок nCas9, слитый с факторами редактирования оснований, дезаминирует нуклеотиды в цепи ДНК-мишени, и в то же время делает одноцепочечные расщепления ДНК на комплементарной цепи [256]. Затем системы репарации вырезают из поврежденной ДНК участок размером 2–12 нуклеотидов, удаляя матрицу для бесшовной репарации дезаминированного нуклеотида в цепи ДНК-мишени. Комбинация nCas9 с UGI представляет собой надежную платформу для редактирования оснований, эффективного и специфичного внесения либо исправления однонуклеотидных мутаций [256,261].

Исправление практически любой мутации в любом участке ДНК стало возможным благодаря использованию генно-инженерных белков dCas с оптимизированными (укороченными) мотивами PAM. Снятие ограничений с PAM последовательностей расширяет диапазон потенциальных сайтов для воздействия на них редакторами оснований, и предоставляет возможность исправлять многочисленные генетические нарушения, связанные с развитием заболеваний человека [263,264].

Потенциальной проблемой при использовании редакторов оснований dCas является возможность нецелевое редактирование РНК, как было описано для редакторов rAPOBEC1, TadA и APOBEC3A [265–267]. Направленный мутагенез деаминаз с изменением и улучшением их свойств, специфичности и активности, позволяет создавать более эффективные и безопасные аналоги редакторов оснований нуклеиновых кислот [265–268].

Среди цитидиндеаминаз наибольшей активностью обладает rAPOBEC1 [256], однако использование данного редактора для исправления мутаций в GC-богатых последовательностях является неэффективным [256]. Для работы с GC-богатых участках были разработаны специальные редакторы оснований: evoAPOBEC1-BE4max и evoFERNY [269]. Кроме того, редакторы на основе rAPOBEC1 и AID неэффективны при редактировании метилированной ДНК. Альтернативой является использование фермента APOBEC3A, который менее чувствителен к метилированным основаниям ДНК и, следовательно, может быть использован для редактирования гиперметилированных участков [257].

#### **1.2.2.2. Редактирование РНК с помощью инструментов dCas**

Эффекторные белки систем CRISPR/Cas типа VI могут напрямую взаимодействовать с РНК-мишенями независимо от наличия PAM последовательностей. В этой связи, белки VI типа используют для объединения с редакторами молекул РНК, что обеспечивает привлечение редакторов к заданным сайтам и исправления/внесения мутаций интереса.

Например, на основе белка dCas13b, соединенного через подвижный линкер с улучшенной формой фермента ADAR2, создана система редактирования РНК с возможностью конверсии нуклеотидов в двуцепочечной РНК по типу аденина на инозин. На базе данной системы, получившей название REPAIR создан ряд улучшенных аналогов с более точными вариантами белка ADAR2, которые также позволяют модифицировать цитозин с его конверсией в урацил. К таким системам относится система RESCUE [270,271].

Важным отличием систем редактирования РНК является отсутствие в необходимости действия факторов репарации повреждений нуклеиновых кислот, поскольку редактирование РНК происходит без участия систем репарации [270]. Как и в случае с редактированием ДНК, при редактировании РНК важным направлением исследований и разработок является минимизация внецелевого действия как на уровне связывания Cas белков, так и на уровне воздействия дезаминаз. И если на уровне Cas белков проблема, в целом, решается использованием белков-ортологов, а также направленной эволюцией Cas белков с отбором наиболее эффективных и специфичных вариантов, то на уровне создания улучшенных мутантных дезаминаз исследования ведутся в основном в направлении улучшения выбора контекста нуклеотидов дезаминазами и модификацией окон редактирования [261,263]. В улучшенном варианте системы REPAIRv2 за счет использования обоих подходов удалось достигнуть 900-кратного снижения уровней внецелевого редактирования РНК. Однако, вместе с этим, происходило также >2-кратное снижение эффективности целевого редактирования [270,272].

### **1.2.2.3. Области применения систем CRISPR на основе dCas**

Основными направлениями использования редакторов оснований (в основном на экспериментальном уровне) является исправление патогенных мутаций в РНК, связанных с развитием определенного заболевания (синтез дисфункционального белка), либо при полном нарушении функции гена. Действительно, с помощью системы CRISPR-Pass была показана возможность исправления стоп-кодона, нонсенс мутаций и патогенных мутаций с восстановлением функции генов [273].

Однако, системы редактирования также могут использоваться для направленного «выключения» генов за счет создания стоп-кодонов в первых экзонах генов, что приводит к синтезу коротких фрагментов белков. К таким системам относятся CRISPR-STOP и iSTOP [274,275]. В связи с тем, что главной опасностью при использовании CRISPR/Cas систем (в особенности, нуклеаз) является образование нуклеолитических разрывов в геноме клеток с образованием ДЦР, системы редактирования оснований считаются более безопасным способом «выключения» генов. Использование систем CRISPR-STOP/iSTOP, по предварительным анализам *in silico*, обеспечивает возможность редактирования ≈98% генов восьми видов эукариот, включая человека [275]. Комбинирование систем редактирования с технологиями SunTag, Casilio и пр., значительно усиливает эффективность целевого редактирования ДНК [276]. Основной областью применения этих технологий являются скрининговые исследования с изучения влияния потери функции генов на определенные физиологические и патологические процессы. Важной сферой

применения редакторов оснований является создание моделей заболеваний *in vitro* (линии клеток, устойчивые к действию цитотоксических препаратов, модельных линий наследственных и хронических заболеваний, таких как альбинизм, МДД и др., а также моделей онкологических заболеваний) [258,260,262,277–283], а также *in vivo*. Важной областью применения редакторов оснований является изучение сайтов сплайсинга. Для этих целей была создана система CRISPR-SKIP. Внесение мутаций в предполагаемые сайты сплайсинга может приводить к пропуску экзонов и синтезу измененных изоформ белков клетки [284].

Хотя технологии редактирования ДНК рассматриваются как одни из самых перспективных подходов для лечения генетических заболеваний, избытие разнообразных мутаций даже в рамках одной нозологии, делает возможность их широкого применения практически невозможной. Следовательно, редактирование мутаций можно рассматривать только в контексте персонализированной терапии. С использованием редакторов оснований была продемонстрирована возможность исправления мутаций, связанных с развитием атеросклероза, талассемии, фенилкетонурии и др. [285–289]. Более широкое применение редакторы оснований могут найти в сфере создания противовирусных инструментов для внесения мутаций в ДНК/РНК вирусов и, следовательно, нарушения репликации вирусов, таких как ВИЧ, ВГВ, и других ДНК- и РНК-содержащих вирусов. Действительно, на модели ВГВ-инфекции была продемонстрирована практически полная остановка репликации вируса, причем даже с прекращением продукции белков с вирусных интеграций [290]. Наиболее важные области применения и свойства редакторов на основе dCas9 перечислены в Таблице 3 и Таблице 4 соответственно.

Генная инженерия позволила целенаправленно модифицировать компоненты CRISPR для создания оптимизированных и высокоэффективных подходов к редактированию генов. Наиболее важным является создание мультиплексного подхода на основе белка Cas12a для одновременной модуляции нескольких генов (система мультиплекс) с возможностью модуляции активности множества генов, сигнальных и биологических процессов [291]. Помимо расщепления, внесения мутаций и интеграций последовательностей нуклеиновых кислот, CRISPR-системы в последние годы активно внедряются в практику для детекции нуклеиновых кислот, молекулярной диагностики, создания биосенсоров и др. [260,292–294].

Целевые интеграции ДНК в геном человека изначально проводили с использованием ДНК-матриц и нуклеаз CRISPR/Cas, однако эффективность данного подхода оказывается очень низкой (не более 1-10%), поскольку требует функционирования пути гомологичной

рекомбинации HR. Альтернативой этому подходу стали инструменты на основе dCas и ферментов-транспозаз, которые обеспечивают интеграцию ДНК-фрагментов различной длины в целевые последовательности генома [295,296].

Эпитранскриптомика является относительно новым направлением, которое изначально рассматривали исключительно в призме использования эпитранскриптомных модификаций в молекулярной диагностике и в их использовании в качестве прогностических маркеров. Однако, с появлением dCas инструментов стало возможно целенаправленное внесение и удаление эпитранскриптомных меток в молекулах РНК [297]. В частности, были созданы инструменты dCas, соединенные с мБА-метилтрансферазами Mett13 и Mett14 [297], а также с факторами удаления мБА модификаций при объединении dCas с фактором ALKBH5 [298].

Широкое применение находят системы на основе dCas с флуоресцентными репортерами, что позволяет использовать их для визуализации и трекинга последовательностей ДНК и РНК в живых клетках *in vitro* и *in vivo* [299–301]. Системы CAMERA и DOMINO обеспечивают съемку и наблюдение за распределением и накоплением сигнала в живых системах в ходе исследования сложных биологических процессов [302,303].

Как уже было упомянуто, одними из ключевых проблем для быстрого практического внедрения подходов на основе CRISPR/Cas в практику является (1) возможность внецелевого действия и (2) отсутствие эффективных инструментов для целевой доставки CRISPR/Cas *in vivo*. Считается, что исходами внецелевого расщепления генома могут быть (а) формирование делеций и вставок нуклеотидов с возможным нарушением рамки считывания и функционирования гена(ов); (б) образование гигантских делеций (длиной свыше нескольких тысяч нуклеотидов); (в) хромотрипсис; (г) внутри- и меж-хромосомная рекомбинация и (д) развитие прочих хромосомных aberrаций и рост нестабильности генома [304,305]. Снижение либо полное устранение внецелевой активности возможно, что уже продемонстрировано в десятках научно-исследовательских работ. Улучшения специфичности Cas белков удается достигнуть за счет создания улучшенных вариантов Cas белков, однако в большинстве случаев увеличение специфичности связано с некоторым (порой, существенным) снижением целевой активности. К 2023 году были созданы несколько десятков улучшенных вариантов Cas белков, включая eSpCas9 [306], evoCas9 [307], Нура-Cas9, Sniper-Cas9 [308], HiFi Cas9 [309], xCas9 [309,310], SuperFi-Cas9 [311], LZ3 Cas9 [312], SpartaCas [313], efSaCas9 [314] и др., а также белки с измененными параметрами распознавания PAM последовательностей, а также практически без-PAMный

Cas [315,316]. Устранение либо сокращение PAM последовательности, необходимой для распознавания мишени, существенно расширяет спектр возможных целевых сайтов. Другим подходом является увеличение специфичности редактирования за счет использования ортологичных Cas белков с длинными PAM последовательностями. Чем длиннее участок PAM, тем меньше число целевых и потенциальных внецелевых сайтов [13,317,318]. Увеличения специфичности можно также добиться за счет конструирования четырехкомпонентной системы с двумя белками Cas, соединенными с FokI нуклеазой, и РНК-проводниками, направляющими модифицированные Cas белки к обеим цепям ДНК. В результате, подобная система обеспечивает внесение разрыва с каждой цепи, что в результате дает возможность удаления двуцепочечной молекулы ДНК без образования двуцепочечных «тупых» концов [319].

С другой стороны, возможна модификация второго компонента системы – РНК-проводника с внесением химических модификаций, ДНК-последовательностей, внесением/удалением дополнительных последовательностей либо внесением измененных шпилек [320–324], а также рациональный дизайн РНК-проводников с предсказанием всех возможных потенциальных сайтов и выбор определенных РНК-проводников с минимальным количеством и самыми строгими параметрами внецелевого действия. Дизайн РНК-проводников осуществляется с помощью онлайн инструментов, таких как OFFinder, CROP-IT, E-Crisp и др. [175,325].

Значительного увеличения специфичности действия даже Cas белков с выраженной внецелевой активностью удастся добиться при использовании короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов (РНП). Их доставка в клетке обеспечивает функционирование CRISPR/Cas в течение <24 часов; в течение этого времени комплексы РНП разрушаются и перестают функционировать. Снижение внутриклеточных уровней CRISPR/Cas разительно снижает либо полностью устраняет внецелевую активность. Комбинация вышеупомянутых подходов позволяет практически с крайне высокой вероятностью предотвратить возникновения внецелевых мутаций.

Вместе с этим, внецелевая активность dCas при модуляции эпигенетического состояния, вероятно, не играет существенной роли, и может быть проигнорирована, поскольку эпигенетические метки являются, как правило короткоживущими, а их внесение вне регуляторных областей (что является редким совпадением и может быть предотвращено рациональным дизайном РНК-проводника) не влияет на активность генов [240]. В работу Matharu с соавт., было показано, что внецелевые эпигенетические

модификации не детектируются у мышей даже в ходе длительной продукции комплексов CRISPRa, введенных с помощью адено-ассоциированного вектора [240].

### **1.3. Характеристики систем CRISPR/Cas**

#### **1.3.1. История открытия и основные принципы функционирования систем CRISPR/Cas**

В 2016 г. системы CRISPR/Cas впервые были использованы для обнаружения нуклеиновых кислот для молекулярной диагностики [326]. К тому времени был изобретен ряд успешных подходов на основе CRISPR/Cas для обнаружения и диагностики инфекционных и неинфекционных заболеваний. Революция редактирования CRISPR/Cas может распространиться дальше в область молекулярной диагностики и заменить ПЦР во многих сферах. Средства диагностики на основе CRISPR/Cas характеризуются высокими чувствительностью и специфичностью, сравнимыми с традиционной ПЦР (или даже превосходящей ее), но не требуют сложного (и, следовательно, дорогого) оборудования и имеют очень низкую рассчитанную стоимость. Внедрение CRISPR/Cas в молекулярную диагностику может изменить профиль глобальных систем диагностики и здравоохранения [327]. Существующий разрыв между потребностью в быстрой диагностике и современными технологиями вполне может быть преодолен с помощью CRISPR-диагностики. Пандемия COVID-19, по общему признанию, добавила импульс для разработки новых, точных и чувствительных экспресс-тестов.

#### **1.3.2. Краткая номенклатура систем CRISPR/Cas и их характеристики**

Системы CRISPR/Cas были впервые описаны 30 лет назад в бактериальных геномах [328]. Было показано, что уникальные области ДНК, позже названные спейсерами, разделены короткими палиндромными повторами в бактериальных геномах. Небольшие кластеры генов Cas, кодирующих белки с нуклеолитической активностью, часто обнаруживались рядом с массивами повторов-спейсеров CRISPR [329]. Много лет спустя было показано, что эти палиндромные повторы и гены Cas действуют как естественная адаптивная иммунная система, обеспечивающая защиту от вирусных инфекций у бактерий и архей. Функция CRISPR/Cas зависит от эффекторных белков Cas и направляющих РНК CRISPR (crРНК) [330]. Системы CRISPR/Cas были адаптированы для работы в клетках человека и других млекопитающих. Они могут связываться и расщеплять практически любой участок нуклеиновой кислоты-мишени. Системы CRISPR/Cas подразделяются на 2 отдельных класса, которые кратко описаны ниже.

### 1.3.2.1. Системы класса 1

Системы CRISPR/Cas класса 1 включают 3 типа: I тип, III тип и IV тип. Системы класса I характеризуются множественными эффекторными белками.

Системы CRISPR/Cas типа I имеют общий эффекторный модуль Cascade, состоящий из белков Cas в комплексе с молекулой crPHK [331]. Комплекс Cascade распознает последовательности смежных мотивов протоспейсера (PAM) и денатурирует ДНК-мишень, тем самым позволяя crPHK взаимодействовать с комплементарной цепью ДНК. Распознавание сайта-мишени влечет за собой рекрутирование белка Cas3, который расщепляет цепь ДНК, не связанную комплексом Cascade [332].

Функционирование CRISPR/Cas типа III основано на мультисубъединичном комплексе, состоящем из crPHK, комплексов Csm в системах подтипа III-A и комплексов Cmr в системах подтипа III-B. Эти системы характеризуются белком Cas10. Недавно было показано, что Cas10 играет роль в активации неспецифических РНКаз Csm6 и Csx1. Распознавание сайта-мишени системами CRISPR/Cas типа III инициирует полимеразную активность белка Cas10 с последующей Cas10-опосредованной генерацией циклических олиго-(A)-нуклеотидов (сОА). Связывание сОА с помощью Csm6 активирует РНКазный домен Csm6, который разрушает как РНК-мишень (многие системы CRISPR/Cas типа III нацелены на РНК, а не на молекулы ДНК), так и на другие соседние молекулы РНК [333],[334]. Системы CRISPR/Cas типа IV обычно встречаются в плаزمиде, но их функция остается в значительной степени неизвестной [335].

### 1.3.2.2. Системы класса 2

Системы CRISPR/Cas класса 2 включают тип II и менее распространенные типы V и VI, каждая из которых обладает уникальными эффекторными белками [336–338]. Системы класса 2 характеризуются менее сложной организацией, так как эффекторный модуль состоит только из большого, многодоменного, многофункционального белка.

В настоящее время системы CRISPR/Cas класса 2 наиболее широко используются в генной инженерии благодаря их простоте и высокоэффективному редактированию генов. Белок Cas9 CRISPR/Cas типа II нацеливается на желаемый участок ДНК с помощью crPHK и трансактивирующей crPHK (tracrRNA) [176]. Jinek и др. создали химерную молекулу РНК (РНК-проводник), которая объединяет crRNA и tracrRNA и упрощает редактирование генома CRISPR/Cas за счет сокращения трехкомпонентной системы (белок Cas9, crRNA, tracrRNA) всего до 2 компонентов (белок Cas9 и РНК-проводник). Белок Cas9 привлекается

к целевому сайту с помощью РНК-проводника и создает двухцепочечные разрывы с тупыми концами в желаемом участке ДНК [339]. Белок Cas9 из *Streptococcus pyogenes* (SpCas9) является наиболее распространенным выбором в технологии редактирования генов благодаря его высокоэффективному целевому редактированию генов. Однако частая нецелевая активность SpCas9, определяемая как расщепление неспецифических геномных последовательностей ДНК, сходных с сайтом-мишенью, ограничивает его применение. Неспецифическая активность Cas9 основана на его способности игнорировать несоответствия между РНК-проводником и целевой ДНК, что вызывает образование ДЦР даже при значительном несовпадении между РНК-проводником и мишенью. Более специфичными и клинически безопасными вариантами систем CRISPR/Cas типа II являются генетически модифицированные или модифицированные с помощью направленной эволюции белки SpCas9 (усиленный SpCas9 или eSpCas9 [306]; высокоточный SpCas9-HF1 [340]; evoCas9 [341], НупаCas9 [342], Sniper-Cas9 [308]) и некоторые ортологичные белки Cas9 других видов [13,318,343,344]. Последние имеют более сложные последовательности РАМ и, таким образом, имеют меньше потенциальных нецелевых сайтов и обладают более низкой способностью денатурировать ДНК, не совпадающую с РНК-проводником [344–346].

Системы CRISPR/Cas типа V включают несколько подтипов (V-A, V-B и т. д.); Белки Cas12 (Cas12a, Cas12b и др.) являются сигнатурными белками этих систем [347]. Белки Cas12a и Cas12b расщепляют последовательности-мишени, оставляя липкие концы после расщепления ДНК. Cas12a, также известный как Cpf1, часто используется в геномной инженерии. Для систем CRISPR/Cas типа V требуется только белок Cas и crРНК для редактирования целевого сайта. Одним из преимуществ использования Cas12 вместо Cas9 для геномной инженерии является его меньший размер и меньшая толерантность к несовпадениям нуклеотидов между ДНК-мишенью и РНК-проводником [348]. Липкие концы, оставшиеся после Cas12-опосредованного расщепления ДНК, восстанавливаются с помощью гомологичной рекомбинации [349], которая является методом бесшовной репарации и не формирует мутации, что повышает точность редактирования генов. Совсем недавно были обнаружены белки Cas14, миниатюрные белки Cas (400–700 а.о.) систем CRISPR/Cas типа V [350]. Было показано, что Cas14 разрушает одноцепочечную ДНК, не требуя РАМ [350]. Некоторые белки Cas12 и Cas14 обладают так называемой коллатеральной активностью: после связывания с ДНК-мишенью белки начинают неспецифически разрушать любую соседнюю ДНК [347].

Системы CRISPR/Cas типа VI охватывают подтипы VI-A, VI-B, VI-C и VI-D (также известные как C2c2). Сигнатурным белком CRISPR/Cas типа VI является Cas13. Уникальным свойством этих систем является способность распознавать одноцепочечные молекулы РНК. Белки Cas типа VI связывают РНК-мишень, используя направляющую crРНК (без tracrRNA), вводят разрыв с тупыми концами и без разбора разрушают любую соседнюю одноцепочечную РНК [270,351].

Системы CRISPR/Cas чрезвычайно разнообразны, различаются механизмами действия, составом и строением их ключевых элементов [352]. Углубленный анализ и характеристика новых типов и классов систем CRISPR/Cas находятся на переднем крае мировой науки, прокладывая путь к созданию новых биологических и диагностических инструментов с перспективой коренным образом изменить наше представление о системах здравоохранения. В настоящее время почти каждый тип CRISPR/Cas тестируется для использования CRISPR-диагностики и различными способами с особым акцентом на системы CRISPR/Cas типа V и типа VI.

#### **1.4. Взаимодействие вирусов с инфицированной клеткой**

##### **1.4.1. Распознавание чужеродной ДНК сенсорами цитозольной и ядерной ДНК**

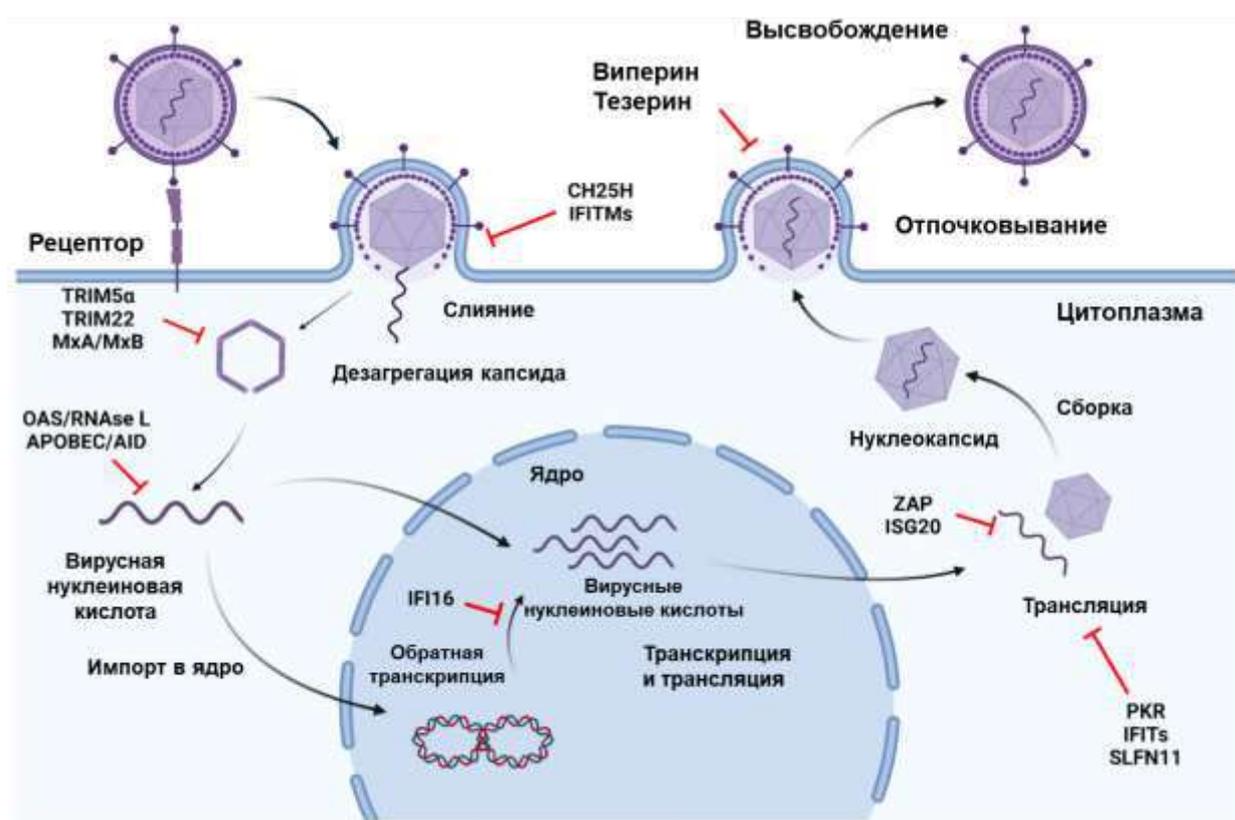
Сенсором чужеродной ДНК в цитоплазме клеток человека является GMP-AMP-синтаза (сGAS), которая взаимодействует с углеводно-фосфатным остовом ДНК либо распознавая Y-подобные структуры одноцепочечных ДНК, и вне зависимости от нуклеотидной последовательности [353–355].

При связывании с ДНК в цитозоле сGAS синтезирует из АТФ и ГТФ вторичный мессенджер цГАМФ [353,356], который, в свою очередь, активирует фактор STING. STING локализуется в эндоплазматическом ретикулуме, в мембране органеллы, закориваясь в мембране за счет четырех трансмембранных доменов. При взаимодействии с сGAS, происходят конформационные изменения в структуре STING, что приводит к транспорту STING в ядерный компартмент, активация путей TBK1 и IKK [357,358] и индукции экспрессии ИФН I типа и провоспалительных цитокинов [359].

Про проникновении чужеродной ДНК в цитоплазму также возможно образование инфламмосомы – многобелкового комплекса, который инициирует провоспалительный ответ посредством AIM2-подобных рецепторов (ALR) [360,361]. Распознавание

чужеродных ДНК вызывает димеризацию AIM2, взаимодействие со спек-подобных белком [362] и, наконец, вызывает индукцию апоптоза [363,364].

Тем не менее, большинство вирусов имеют этап жизненного цикла, связанный с проникновением в ядра клеток (Рисунок 20). Распознавание чужеродной ДНК в ядре долгое время оставалось неизученным, но в последние годы было идентифицировано множество потенциальных ядерных сенсоров чужеродной ДНК, включая белки семейства PYHIN, cGAS, IFI16, hnRNPA2B1, TLR7/9, DNA-PKcs, и т. д. [365–367]. Одними из наиболее известных является внутриядерный cGAS [368], фактор IFI16 [369], фактор распознавания и индукции противовирусного внутриклеточного иммунного ответа hnRNPA2B1 [370], а также DNA-PKcs, роль которого в распознавании внутриядерной чужеродной ДНК была недавно описана [371].



**Рисунок 20.** На рисунке представлена общая схема жизненного цикла вирусов, реплицирующихся в ядре. На каждом из этапов цикла отмечены противовирусные факторы (ИСГ), блокирующие этот этап. ИСГ, обладающие противовирусной активностью были описаны для таких этапов жизненного цикла, как связывание и проникновение вируса, разборка капсида, импорт в ядро, обратная транскрипция, репликация/транскрипция, экспорт в ядро, трансляция, сборка капсида, отпочковывание и высвобождение вирусных частиц [372].

#### 1.4.2. Подавление проникновения вирусов в клетку

Проникновение вируса обычно ингибируется такими ИСГ, как СН25Н, который превращает холестерин в 25-гидрохолестерин (25НС). 25НС изменяет состав клеточной мембраны и нарушает эндоцитоз и проникновение вируса в клетки [373]. Противовирусная активность СР25Н была продемонстрирована на целом спектре вирусных инфекций, включая инфекцию вирусом везикулярного стоматита, вируса Эбола, ВГС, ВИЧ, вируса Зика, коронавирусов и др. [372–376]. Белки из семейства IFITM (интерферон-индуцированные трансмембранные белки) также блокируют слияние с мембранами клеток при инфекции множества вирусов (вирусы гриппа, вирус западного Нила, коронавирусы, ВГС, ВИЧ и др.) [372,377–387]. Аналогично, интерферон-индуцированный фактор NCOA7 (коактиватор ядерных рецепторов человека 7) взаимодействует с вакуолярной V-АТФазой, стимулируя закисление цитоплазматических везикул и лизосомальное разрушение вирусов [388]. В начале пандемии SARS-CoV-2, с использованием библиотек кДНК, кодирующих противовирусные факторы, была выявлена роль белка LY6 в нарушении инфицирования и распространения инфекции вирусом SARS-CoV-2 [389].

#### **1.4.3. Нарушение трансляции вирусов**

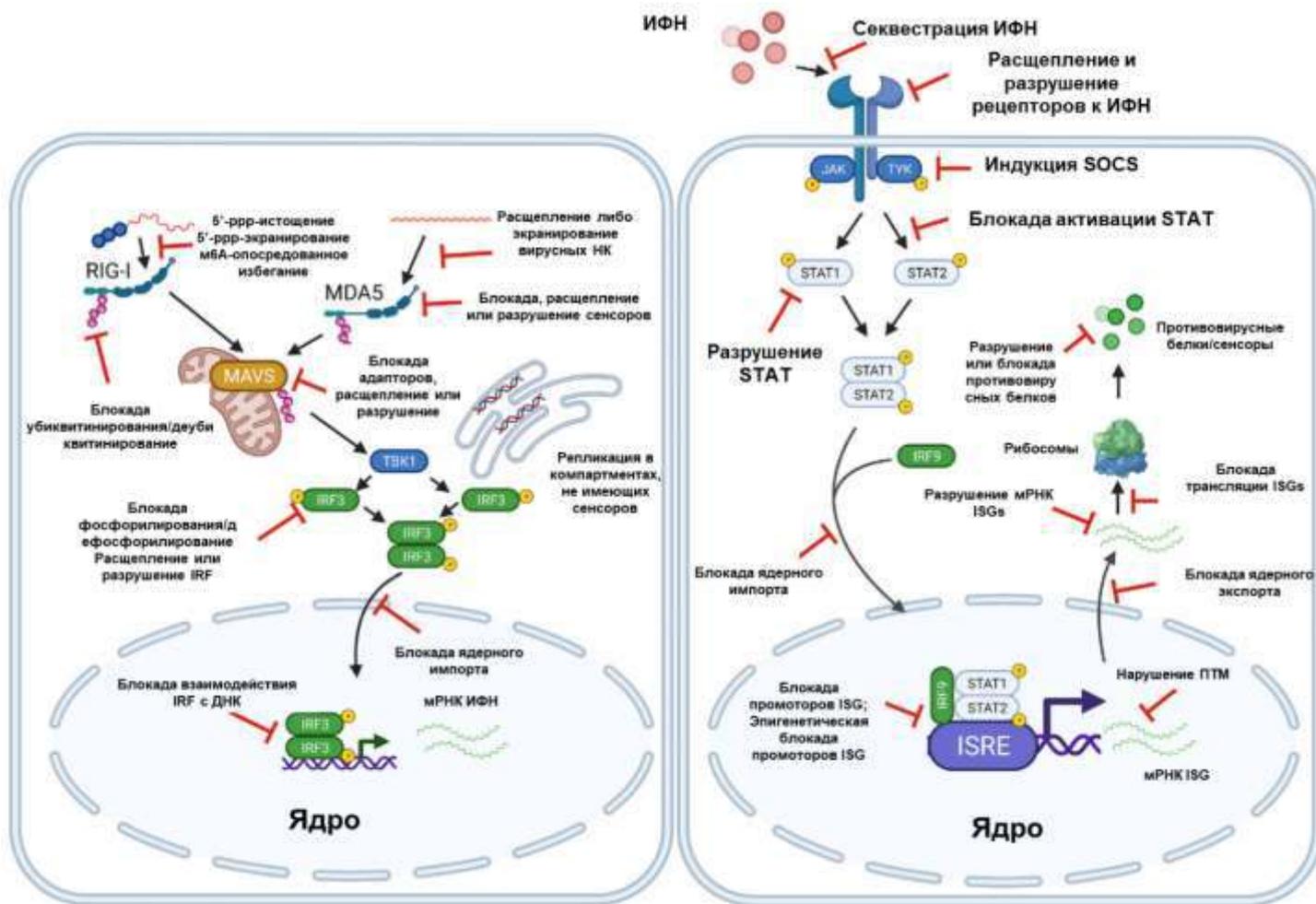
Многие интерферон-стимулированные гены нарушают репликацию вирусов на уровне трансляции вирусных белков. Система конъюгации вирусных белков интерферон-стимулированного гена 15 (ISG15) быстро связывает чужеродные белки в ходе трансляции и подавляет репликацию вирусов [390,391]. Факторы семейства IFIT и протеинкиназа PKR могут блокировать инициацию трансляции за счет взаимодействия с кэп-структурами мРНК [392], а также за счет усиленного связывания чужеродных РНК [393]. Фактор SLFN11 связывается и расщепляет кодоны тРНК II типа, которые используются вирусами для продукции вирусных белков [394]. Противовирусная активность SLFN11 показана на различных представителях семейства флавивирусов, и может заключаться не только в подавлении синтеза белка, но также в снижении стабильности вирусных РНК и белков [395–398]. Другой механизм действия характерен для фактора Shiftless, который подавляет сдвиг рамки считывания рибосом и способствует прочтению стоп-кодонов [399,400].

#### **1.4.4. Ограничение репликации вирусных нуклеиновых кислот**

Многие ИСГ могут ограничивать репликацию вируса (Рисунок 21). Интерферон-индуцируемый фактор вилперин (RSAD2) локализуется в эндоплазматическом ретикулуме и липидных каплях, обладает многоуровневым противовирусным действием, вызывая протеолитическую деградацию вирусных белков (при инфекции вирусом Зика) [401], разрушает липидные рафты при инфекции вирусом гриппа А, нарушая репликацию, а также липидный гомеостаз при инфекции ВГС (за счет взаимодействия с факторами IRAK1 и

TRAF6) [402]. Действие вперина на стабильность вирусных нуклеиновых кислот обусловлено индукцией их взаимодействия с сенсорами TLR7 и TLR9 [403]. Цитидин-дезаминаза APOBEC3G может влиять на различные этапы жизненного цикла вирусов, включая дезаминаз-зависимое и -независимое нарушение подавление репликации, мутацию вирусных РНК, подавление этапа обратной транскрипции, а также упаковки РНК в капсиды [404]. Транскрипция вируса Эбола нарушается при действии фактора RBBP6 [405]. Экспрессия IFI6 нарушает репликацию флавивирусов [406], подавляет репликацию ВГВ [407] и др.

Некоторые противовирусные факторы могут дестабилизировать и либо напрямую разрушать вирусные РНК. В целом, различают три основных механизма разрушения РНК, которые включают (1) общее разрушение, где на первом этапе происходит деаденилирование РНК при помощи факторов CCr-NOT, Calf1, PARN, затем следует удаление кэпа фактором Dcp1/2, и, вслед за этим, разрушение РНК с 3'- и 5'- концов деаденилированной и декэпированной РНК факторами Xrn1 и Dis3L2; (2) разрушение QC (NMD), которое включает расщепление РНК в ходе трансляции с последующей экзонуклеолитической деградацией РНК факторами Dis3L2 и Xrn1, также различают разрушение клеточных мРНК, вызванное вирусными ферментами. Разрушение вирусных РНК возможно по механизму NMD, а также с помощью РНК-интерференции (при участии белков-аргонавтов); возможно интерферон-индуцированное расщепление и деградация РНК, с помощью фактора ZAP либо олигоаденилатсинтетазы OAS. ZAP связывается с вирусными РНК, которые имеют в структуре ZAP-распознающий элемент, и привлекает факторы разрушения РНК, включая деаденилазу PARN, 3'-5'-направленный комплекс экзонуклеазы и ферменты декэпирования Dcp1/2. ZAP участвует в дестабилизации и разрушении множества вирусов, включая ВИЧ, вируса Синдбис и др. Эндонуклеаза ZAP может ингибировать репликацию вируса, предотвращая накопление мРНК в цитоплазме [408]. Было показано, что APOBEC3A, APOBEC3B [171] и AID [409] непосредственно дезаминируют и разрушают внутриядерный пул ккзДНК ВГВ, тем самым прокладывая путь для разработки новых терапевтических средств против ВГВ. OAS катализирует образование 2'-5'-связанных олигоаденилатов, которые активируют клеточную РНКазу L, и вызывают разрушение вирусных РНК [410,411]. ISG20 может препятствовать репликации вируса с помощью нескольких механизмов. ISG20 может нарушать синтез мРНК и трансляцию белков РНК-вирусов [412,413]. Потенциально ISG20 также может способствовать ограничению репликации ВГВ и деградации ккзДНК ВГВ с помощью APOBEC3A [172].



**Рисунок 21. Механизмы ускользания вирусов от иммунитета. (А) Ускользание от иммунного распознавания. (Б) Блокада передачи сигналов интерферона [372].**

#### 1.4.5. Индукция воспалительного ответа

Активация TLR приводит к созреванию и миграции иммунных клеток (включая антигенпрезентирующие клетки), усилению фагоцитоза и образованию активных форм кислорода (макрофагами и нейтрофилами), увеличению экспрессии костимулирующих молекул (например, В-клетками) и др. [414]. Активация TLR должна жестко регулироваться для адекватного иммунного ответа на проникновение вирусов. Нарушение регуляции передачи сигналов TLR связано с развитием хронических воспалительных заболеваний [415–417].

Действие множества интерферон-стимулированных генов в составе комплексного противовирусного ответа, как правило, более важно, чем действие каждого отдельного компонента. При этом многие факторы в целом не оказывают существенного значения на репликацию вирусов, и играют скорее дополняющую роль в индукции либо реализации противовирусных механизмов.

## 1.5. Механизмы избегания иммунного ответа при вирусных инфекциях

Несмотря на наличие сложных механизмов распознавания нуклеиновых кислот патогенов, при вирусных инфекциях индукции противовирусного ответа часто не происходит, что связано с развитием инструментов уклонения и блокады сенсоров чужеродных белков и нуклеиновых кислот.

Частыми мишенями для действия вирусов являются сенсоры нуклеиновых кислот MDA5 и RIG-I. Энттеровирусы способны расщеплять сенсоры MDA5 и RIG-I, тем самым нарушать передачу внутриклеточных сигналов. Такое действие описано для вируса гриппа, белок NS1 которого нарушает функционирование RIG-I [418], вирус Коксаки В3, у которой имеются протеазы 2А и 3С, разрушающие сенсоры РНК [419], ингибирование MDA5 за счет предотвращения дефосфорилирования белком V описано для вируса кори MV [420], белок LMP1 вируса Эпштейн-Барра стимулирует протеасомную деградацию сенсора RIG-I [421]. Нарушение распознавания РНК SARS-CoV-2 при COVID-19 связано с подавлением активности MDA5 белком коронавируса NSP8 [422]. Помимо прямого воздействия вирусов на MDA5 и RIG-I, при вирусных инфекциях может происходить нарушение активации RIG-I/MDA5 опосредованными механизмами, например, за счет блокады TRIM25, RIPLET и 14-3-3ε. TRIM25 может подвергаться протеасомной деградации под действием белка Е6 вируса папилломы человека [423,424], либо связываться белком NS1 вируса гриппа [425], вызывая сниженную выработку интерферонов. Активация RIG-I также нарушается под действием белка нуклеокапсида коронавирусов и NS1 белка респираторно-синцитиального вируса [426,427]. Частым причиной дисфункции путей MDA5/RIG-I является расщепление факторов RIPLET и 14-3-3ε вирусными протеазами, такими как NS3-4A ВГС и NS3 вируса Денге, вируса Западного Нила [428–430].

Как цитоплазматические, так и ядерные сенсоры чужеродной ДНК могут подавляться вирусными белками. Один из ключевых ядерных сенсоров IFI16 подвергается деградации в результате убиквитинирования белком ICP0 вируса простого герпеса [431,432] либо напрямую блокироваться вирусными белками, такими как белок pUL83 цитомегаловируса человека [433]. Другой белок вируса цитомегаловируса человека, UL41, действует на уровне транскрипции, подавляя экспрессию мРНК IFI16 и cGAS, тогда как UL31 может взаимодействовать с cGAS и вызывать диссоциацию комплекса cGAS с чужеродной ДНК [434–436]. Деградацию cGAS могут также вызывать белки Vp21 и UL37 вируса простого герпеса, ORF52 вируса саркомы Капоши и белок NS1 вируса Зика [437–440]. Напрямую подавлять активность cGAS могут белки LANA вируса саркомы Капоши и UL31 цитомегаловируса человека [435,436,441].

Путь внутриклеточного сигналинга cGAS-STING является классической мишенью многих вирусов. ДНК вирусы, такие как вирус папилломы человека, вируса саркомы Капоши, аденовирусы, подавляют путь cGAS-STING. Среди механизмов выявляют прямое воздействие на STING (показано для белков E1A аденовирусов и E7 вируса папилломы человека [442]), нарушение убиквитинирование STING [443] либо его расщепление. Функционирование пути может быть также нарушено на уровне киназы TBK1 и фактора транскрипции IRF3 [444]. Несмотря на то, что деятельность пути cGAS-STING связана с распознаванием чужеродной ДНК в цитоплазме клеток, многие РНК-вирусы также могут активировать cGAS-STING. Происходит это за счет распознавания чужеродной РНК иными сенсорами, запуском противовирусных ответов, которые приводят к нарушению целостности ядерной мембраны и мембраны митохондрий с протечками либо высвобождением ДНК в цитоплазму и, как следствие, активацией cGAS-STING. Подобный эффект наблюдается для белка NS4B ВГС, протеазы вируса Дэнге NS2B3, белка NS4B вируса желтой лихорадки и др. [445–447].

Расщепление факторов более низких уровней регуляции противовирусного ответа также является частым механизмом действия вирусных белков: NS3-4A ВГС расщепляет белок TRIF [448], протеаза NS2B3 вируса Дэнге блокирует белки MFN1/MFN2 (регуляторы MAVS) [449], сам MAVS также является мишенью для протеаз некоторых вирусов, например 2A и 3C риновирусов [450].

Адапторные киназы IKK $\epsilon$  и TBK1 в сигнальных путях MAVS и STING ингибируются при инфекции вирусом лихорадки Ласса, белками Vpr и Vif при ВИЧ-инфекции, при инфекции герпесвирусами и пр. [451–453]. Взаимодействие STING-TBK1 нарушается белком vIRF1 вируса герпеса человека-8. Тот же белок нарушает взаимодействие комплекса ацетилтрансфераз с фактором транскрипции IRF3, тем самым нарушая активацию интерферон-стимулированных генов, зависимых от IRF3 [454]. Интересным механизмом блокирования TBK1 является его «подмена» белком вируса саркомы Капоши ORF45, который имитирует TBK1 и конкурирует с ним за связывание с IRF3. Взаимодействие ORF45-TBK1 блокирует передачу сигнала на этапе связывания TBK1-IRF3 [455].

Факторы транскрипции в пути интерферонового ответа могут расщепляться вирусными протеазами либо ингибироваться вирусными белками, такими как 3Cpro энтеровируса 68 (расщепляет IRF7) [456], NS5 вируса Дэнге, который вызывает полиубиквитинирование и разрушение STAT2 [457–459], белками ORF3b, 6 и N коронавируса [460] и пр.

Трансляция интерферон-стимулированных генов может блокироваться белком NSP2 вируса чикунгунья [461]. Подобное действие продемонстрировано для полиовируса и других энтеровирусов, кодирующих протеазу 2A, которая расщепляет фактор инициации трансляции eIF4G и блокирует трансляцию мРНК клетки [462]. Некоторые вирусы могут разрушать целостность либо нарушать локализацию нуклеопоринов, тем самым нарушая процессы транспорта РНК и белков между ядром и цитоплазмой, которые играют важную роль в регуляции противовирусного ответа [463]. Передача противовирусного иммунного сигнала может блокироваться на уровне транспорта мРНК за счет расщепления вирусными протеазами нуклеопоринов Nup62, Nup98 и Nup153 [457,464]. В Таблице 3 представлен список факторов внутриклеточного иммунного ответа, которые могут блокироваться вирусами в ходе инфекционного процесса.

**Таблица 3. Список факторов внутриклеточного иммунного ответа, которые блокируются вирусами для уклонения от иммунного надзора [372].**

Мишень	Вирус	Вирусный белок	Механизм
	Вирус гриппа	NS1	Прямое взаимодействие, связывание TRIM и RIPLET
	Коксаки вирус В3	2Apro	Расщепление
	Вирус Эпштейн-Барра	LMP1	Разрушение в протеасомах
RIG-I	Коронавирусы	Белок нуклеокапсида	Связывание с TRIM25
	Респираторный синцитиальный вирус	NS1	Связывание с TRIM25
	Вирус папилломы человека	E6	Протеасомное разрушение TRIM25
	ВГС	NS3-4A	Расщепление RIPLET

<b>Мишень</b>	<b>Вирус</b>	<b>Вирусный белок</b>	<b>Механизм</b>
	Вирус Дэнге	NS3	Связывание 14-3-3ε
TLR9	Вирус коровьей оспы	A46R	Связывание с адаптором MyD88
TLR3	Цитомегаловирус человека	US7	Убиквитинирование TLR3
	ВИЧ	Нет данных	Подавление фосфорилирования IRF3, IRF7, STAT1, STAT3 [372]
MDA5	Вирус кори	V	Предотвращение дефосфорилирования MDA5
	Коронавирус SARS-CoV-2	NSP8	Нарушение полиубиквитинирования, связанного с K63
	Вирус Дэнге	NS3	Связывание с 14-3-3ε
IFI16	Вирус простого герпеса	ICP0/UL41	Полиубиквитинирование и разрушение, блокирование
	Цитомегаловирус	pUL83	Прямое блокирующее действие
cGAS	Вирус простого герпеса	UL41/UL37/Vp22	Подавление экспрессии либо нарушение ферментативной активности
	Цитомегаловирус человека	UL31/pp65	Прямое взаимодействие/подавление ферментативной активности

<b>Мишень</b>	<b>Вирус</b>	<b>Вирусный белок</b>	<b>Механизм</b>
	Вирус саркомы Капоши	ORF52/LANA	Прямое взаимодействие/подавление ферментативной активности
	Вирус Зика	NS1	Стабилизация каспазы 1
TRIF	ВГС	NS3-4A	Расщепление
MAVS	Вирус Дэнге	NS2B3	Связывание MFN1 и MFN2 белков
	Риновирусы	2A and 3C	Расщепление
STING	Аденовирусы	E1A	Связывание STING
	Вирус папилломы человека 18	E7	Связывание STING
	Вирус саркомы Капоши	vIRF1	Предотвращение взаимодействия STING с мишенями
	ВГВ	Pol	Предотвращение полиубиквитинирования STING
	ВГС	NS4B	Подавление прохождения сигнальных каскадов
	ВИЧ	Vpr	Антагонизм сGAS/STING-стимулированного сигналинга NF-κB

<b>Мишень</b>	<b>Вирус</b>	<b>Вирусный белок</b>	<b>Механизм</b>
	Вирус Дэнге	NS2B3	Подавление сигнальных каскадов
	Вирус желтой лихорадка	NS4B	Подавление сигнальных каскадов
IKKε	Вирус лихорадки Ласса	Nucleoprotein	Подавление аутокаталитической активности
	Вирус Эбола	Vp53	Прямое взаимодействие
TBK1	ВИЧ	Vpr and Vif	Прямое взаимодействие
	Вирус Эбола	Vp53	Прямое взаимодействие
	Герпесвирус человека 8	vIRF1	Взаимодействие с CBP/p300
	Вирус простого герпеса 1	ICP34.5	Связывание с TBK1
	Вирус саркомы Капоши	ORF45	Альтернативный субстрат для TBK1
IRF7	Энтеровирус 68	3Cpro	Расщепление
STAT2	Вирус Дэнге	NS5	Убиквитинирование
IRF3	Коронавирус	ORF3b, ORF6 и N	Подавление IRF-3

Белок Vif ВИЧ блокирует фактор APOBEC3G, одну из наиболее активных цитидин-дезаминаз, способных напрямую дезаминировать геномы, а также нарушать репликацию

ВИЧ [465]. Репликация ВИЧ может нарушаться под действием тетерина, который блокирует секрецию вирионов, однако белок Vpr ВИЧ способен связывать и подавлять активность тетерина [466].

Таким образом, существуют сложные и многоуровневые механизмы распознавания чужеродных, вирусных компонентов, и системы противодействия вирусной инфекции. Однако, практически каждый этап в том или ином виде является мишенью вирусов, и позволяет им в большинстве случаев успешно преодолевать иммунную защиту, обеспечивать репликацию и распространение вирионов. Каждый этап взаимодействия вируса с противовирусной защитой организма – потенциально, является мишенью для создания противовирусных лекарственных средств.

## **Глава 2. Материалы и методы исследования**

### **2.1. Клеточные линии и условия культивирования**

Клетки HepG2 и линии HepG2-1.1merВГВ и HepG2-1.5merВГВ (предоставленные проф. Дитером Глебе, Гиссенский университет, Германия), содержащие 1,1-мерный и 1,5-мерный геном ВГВ генотипа D под тет-он промотором цитомегаловируса (CMV) и промоторе дикого типа, соответственно. Клетки культивировали в среде DMEM, содержащей глюкозу в концентрации 4,5 г/л (Thermo Fisher Scientific, США), 10% фетальную бычью сыворотку (FBS, Gibco), пенициллин (100 ЕД/мл), стрептомицин (100 мкг/мл) и 2 мМ L-глутамин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Клетки высевали в 6-луночные планшеты с конfluenceностью 50%. На следующий день репликацию ВГВ активировали на модели HepG2-1.1merВГВ доксициклином (100 нг/мл) в течение 24 ч. Клетки трансдуцировали лентивирусами (MOI = 3.5), кодирующими Cas9-P2A-EGFP (плазида Addgene # 63592, предоставленная доктором Филом Шарпом и доктором Фенг Чжаном) и направляющий РНК-проводник под промотором U6 (плазида Addgene # 50662, предоставленная доктором Эриком Ландер и д-р Дэвид Сабатини) (MOI = 3,0) либо нецелевой РНК-проводник (контроль) в смеси с полибренном (8 г/мкл). Через 48 ч после трансдукции клетки обрабатывали растворами ингибиторов путей репарации, растворенными в диметилсульфоксиде (ДМСО). В качестве контроля клетки обрабатывали раствором ДМСО в полной среде DMEM. Инкубацию с низкомолекулярными соединениями проводили в течение 72 ч, среду с ингибиторами меняли каждые 24 ч. Клетки HepaRG-hNTCP культивировали в среде Williams E (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки FetalClone II, Glutamax (Thermo Fisher Scientific, США), 5 мкг/мл инсулина, 50 мкМ гидрокортизона, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл

стрептомицина. Клетки высевали на чашку с плотностью  $2 \times 10^6$  клеток (TPP, Швейцария) и выращивали до 90% плотности.

## 2.2. Трансфекция и нуклеофекция

Клетки HepG2 трансфицировали рекомбинантной ккзДНК (рккзДНК) или метилированной рккзДНК (мет-рккзДНК) и комплексами CRISPR/Cas9 РНП с использованием набора для трансфекции Lipofectamine CRISPRMAX (Invitrogen). Вкратце, рекомбинантный белок StCas9 смешивали с транскрибированным *in vitro* РНК-проводником в молярном соотношении 1:1 и добавляли рккзДНК/мет-рккзДНК в среде OptiMEM (Gibco), и инкубировали в течение 10 мин. Через 10 мин к комплексам StCas9/РНК-проводник добавляли реагент Cas9 Plus, перемешивали и инкубировали в течение 10 мин. Параллельно реагент CRISPRMAX смешивали со средой OptiMEM (Gibco) и оставляли на 10 мин. После этого, к комплексам Cas9/РНК-проводник добавляли смесь CRISPRMAX и инкубировали еще 10 мин. Конечную смесь добавляли к клеткам при 50% конфлуентности.

Клетки HepG2 трансфицировали плазмидой, кодирующей dCas9-p300 (pcDNA-dCas9-p300 Core или мутантной формой dCas9-p300 с инактивированной p300-ацетилтрансферазой pcDNA-dCas9-p300 Core [D1399Y]), ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник под контролем промотора U6, и рккзДНК ВГВ, полученной с использованием технологии мини-колец (описана в [467]). Через 48 часов среду для культивирования клеток удаляли, клетки дважды промывали в фосфатном буфере и культивировали в полной среде в течение следующих 72 часов. Аналогично, клеточные линии HepG2-1.1merВГВ и HepG2-1.5merВГВ трансфицировали с использованием реагента Lipofectamine3000 с плазмидой, кодирующей dCas9-p300/Blast, и ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник. Доксициклин добавляли к клеткам HepG2-1.1merВГВ на 24 часа, чтобы запустить репликацию вируса. Трансфекцию HepG2-1.1merВГВ проводили через 24 часа после добавления доксициклина. Все результаты были воспроизведены как минимум в 3 независимых экспериментах.

Клетки HepG2-hNTCP трансфицировали предварительно собранными комплексами StCas9/РНК-проводник с использованием LONZA Nucleofector в соответствии с инструкциями производителя с параметрами для HepG2. Вкратце, 1 миллион клеток ресуспендировали в растворе SF Nucleofector и Supplement 1, содержащей предварительно собранный белок StCas9 с РНК-проводником в молярном соотношении 1:1. На следующий день после нуклеофекции клетки промывали и добавляли полную среду.

### 2.3. Инфекция вирусом гепатита В

Клетки HepG2-hNTCP высевали на покрытые коллагеном 1 6-луночные планшеты в DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco) с добавлением 10% FBS (Biosera) при плотности  $6 \times 10^4$  клеток/лунку и выращивали до монослоя. После выдерживания дополнительных 3 дней в монослое без разделения среду заменяли аналогичной средой, содержащей 2% ДМСО (Sigma). Еще через 72 ч клетки инфицировали ВГВ. Вкратце, ВГВ добавляли в количестве 650 геномных эквивалентов на клетку в присутствии 4% полиэтиленгликоля 8000 (ПЭГ-8000) в среде Williams E (Gibco) с добавлением GlutaMAX, 50 мкМ гидрокортизона, 5 мкг/мл инсулина, 2% FetalClone II (Thermo Fisher Scientific), 50 единиц/мл пенициллина и 50 мкг/мл стрептомицина. Через 24 часа после инфицирования клетки промывали PBS (3 x 3 мл) и добавляли свежую среду без ПЭГ-8000. Через 3 дня после инфицирования к соответствующим образцам добавляли ламивудин до конечной концентрации 2 мкМ и каждые 3 дня меняли среду.

Очищенный ВГВ получали из клеток HepG2.2.15. Клетки высевали на 20 чашек Петри диаметром 10 см, покрытых коллагеном 1 из крысиных хвостов, с плотностью  $2 \times 10^6$  клеток/чашку в среде DMEM с добавлением 10% FBS (Biosera). Через три дня после образования монослоя добавляли 2% ДМСО для дифференцировки клеток. Еще через 48 ч среду заменяли средой DMEM-F12 (Gibco), содержащей 2,5% FetalClone II, кондиционированную среду собирали каждые 3 дня в течение 2 недель и хранили при 4°C. После этого аликвоты объединяли, вирус осаждали добавлением ПЭГ-8000 до конечной концентрации 4% с последующим легким встряхиванием в течение 18 ч и центрифугировали ( $3000 \times g$ , 1 ч, 4°C). Супернатант удаляли, а осадок ресуспендировали в 20 мл среды Вильямса E с GlutaMAX, 50 мкМ гидрокортизона, 5 мкг/мл инсулина, 2% FetalClone II и 50 ЕД/мл пенициллина/50 мкг/мл стрептомицина, делили на аликвоты и хранили при -70°C.

Сток вируса гепатита В получали из клеток HepG2.2.15. Клетки высевали в чашки диаметром 10 см (TRP, Швейцария), предварительно покрытые крысиным коллагеном I типа, в среде DMEM, содержащей 10% фетальной сыворотки. Клетки выращивали без деления в течение 3 сут после достижения монослоя с последующей заменой среды на среду DMEM-F12 с добавлением 2,5% FetalClone II и 2% ДМСО. Кондиционированную среду, содержащую вирионы, собирали каждые три дня в течение 2 недель. В среду добавляли NEPES (pH 7,4) до концентрации 10 мМ перед хранением при +4°C. Все аликвоты объединяли, фильтровали через фильтр 0,22 мкм, вирионы собирали осаждением 8% ПЭГ-8000 при осторожном встряхивании при +4°C в течение 24 ч с последующим

центрифугированием (4000 об/мин, 1 час, +4°C). Осадок из 20 чашек с клетками ресуспендировали в 15 мл DMEM-F12 с добавлением 2,5% FetalClone II и хранили аликвотами по 0,5 мл при -80°C. Титр вируса определяли путем измерения количества геномных эквивалентов, как описано в [468]. Клетки HepG2-hNTCP или HepaRG-hNTCP высевали на 12-луночные планшеты с плотностью  $1 \times 10^5$  клеток/лунку. После достижения монослоя клетки выдерживали 4 суток без диссоциации. После добавления ДМСО до концентрации 1,8% клетки инкубировали еще 3 дня, после чего добавляли тетрациклин до концентрации 1 мкг/мл. Через 24 часа клетки инфицировали ВГВ, как описано в [468].

#### **2.4. Получение рекомбинантной ккзДНК вируса гепатита В и ее метилирование**

рккзДНК получали с использованием технологии мини-колец, как описано ранее. Вкратце, геном ВГВ с последовательностью генотипа D клонировали в вектор, содержащий сайты рекомбинации attB и attP. Химически-компетентный штамм *E. Coli* ZYCY10P3S2T (System Biosciences) трансформировали полученной плазмидой. Отбирали клоны трансформированных клеток, и три колонии *E. coli* инкубировали в лизогенном бульоне (LB) с канамицином при 37°C в течение 4 ч. Затем 1 мл полученной клеточной суспензии инокулировали в 200 мл среды Terrific Broth и инкубировали при 37°C в течение ночи до OD600 6–8 и pH 7.0. После этого проводили смешивание 200 мл индукционной среды с 1 н. NaOH и 0,2% L-арабинозы в LB и инкубировали сначала 3 ч при 30°C, затем 1 ч при 37°C. рккзДНК выделяли из полученного бактериального осадка с помощью набора Plasmid Maxi Kit (Qiagen, Германия).

рккзДНК ВГВ метилировали CpG-метилтрансферазой M.SssI (СибЭнзим) в соответствии с протоколом производителя. Вкратце, 1 мг рккзДНК инкубировали с метилтрансферазой M.SssI CpG при 37°C в течение 30 минут, а затем очищали с помощью набора для очистки Qiagen PCR.

#### **2.5. Получение лентивирусов и лентивирусная трансдукция**

Клетки HEK293T культивировали в полной среде DMEM с содержанием глюкозы 4.5 г/л и 10% фетальной бычьей сыворотки. Клетки HEK293T рассаживали в T225 флаконы, трансфицировали с помощью полиэтиленimina плазмидами dHelp (Clontech), VSV-G (Clontech) и плазмидами Cas9-P2A-EGFP либо с лентивектором, содержащим U6-РНК-проводники. Через сутки после трансфекции, среду отбрасывали, к клеткам добавляли среду OptiMEM (Thermo Fisher Scientific) без дополнительных реагентов. Через 48 часов

среду OptiMEM, содержащую вирусные векторы, отбирали, центрифугировали, чтобы избавиться от открепившихся клеток при  $3,000 \times g$ , затем фильтровали через фильтры с диаметром пор 0.45 мкм (Corning) для удаления клеточного дебриса. Фильтрат наслаивали на стерильный раствор сахарозы (Sigma) в запаиваемых пробирках для ультрацентрифугировали, и проводили ультрацентрифугирование течение 2 часов при  $100\,000 \times g$  с использованием ротора SW28 и центрифуги LE-80K (Beckman Coulter). Полученный осадок вирусных частиц высушивали при комнатной температуре в стерильных условиях, затем ресуспендировали в полной среде DMEM и инкубировали ночь. На следующий день среду вновь ресуспендировали, делали аликвоты и хранили до однократного использования при  $-80^\circ\text{C}$ .

Клетки суспензионной культуры SupT1 использовали для определения титра полученных лентивирусов. В день трансдукции клетки SupT1, содержащиеся в среде RPMI-1640 (Thermo Fisher Scientific) с 2% фетальной бычьей сывороткой и 2 mM L-глутамина без антибиотиков, рассаживали в 48-луночные планшеты (не покрытые TC) по 100 000 клеток на лунку, добавляли серию разведений лентивируса в трехкратных технических повторностях, инкубировали клетки 24 часа с последующей отмывкой клеток фосфатным буфером, и анализировали процент GFP-позитивных клеток на проточном цитометре NovoCyte (ACEA Biosciences) через 4 суток. Количество единиц трансдукции оценивали, как описано ранее (протокол лентивирусной трансдукции Sigma Aldrich).

## 2.6. Дизайн РНК-проводников

Для активации транскрипции использовали плазмиду, кодирующую белок dCas9-p300 от организма *Streptococcus pyogenes*. Для активации факторов ATM и ATR проводили дизайн РНК-проводников, направленных на промоторы соответствующих генов, в онлайн-инструменте СНОРСНОР. Для активации ATM и ATR использовали последовательности-мишени РНК-проводников 5'-ACAGTTCGGAAGGCGAACGGG-3' и 5'-CGTGCGTCGGTCAAGTTTCC-3', соответственно. Плазмиду, кодирующую белок dCas9-p300mut с инактивированным доменом ацетилтрансферазы p300 (Addgene #61358), экспрессировали в клетках вместе с нецелевым РНК-проводником 5'-GGGGCCACTAGGGACAGGAT-3' в качестве отрицательного контроля. ПЦР-продукты, кодирующие РНК-проводник под контролем U6-промотора, синтезировали с использованием двухэтапной мутагенной ПЦР с высокоточной полимеразой Q5, и очищали с использованием набора для выделения из геля Qiagen (QIAGEN, Hilden, Germany). Клетки HepG2 трансфицировали плазмидами dCas9-p300/dCas9-p300mut и ПЦР-продуктами с использованием реагента Lipofectamine3000 со смесью, содержащей рекомбинантную

ккзДНК, синтезированной с использованием технологии мини-колец (System Biosciences, Пало-Альто, Калифорния, США).

## **2.7. Получение рекомбинантных белков StCas9 и dSaCas9-p300**

Белок экспрессировали в клетках рLysS штамма *E. coli* BL21 (DE3) (Novagen). Клетки выращивали в среде LB (с добавлением соответствующего антибиотика, 0,5% сахарозы, 0,5% глицерина, 1 мМ хлорида магния, 50 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 50 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> и 25 мМ (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>) при 30°C до OD<sub>600</sub> = 1.2. Экспрессию индуцировали инкубацией в течение еще 16 часов с 0,1 мМ изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозидом при 18°C. Белок очищали последовательно с помощью аффинной и ионообменной хроматографии. Клетки ресуспендировали в 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 1 мМ PMSF, 0,2% Triton X-100 и 0,1% Tween 20, обрабатывали ультразвуком на льду и центрифугировали при 15000×g в течение 40 мин. Осветленный лизат обрабатывали 0,05% полиэтиленимином в течение 30 мин при 4°C, полученную суспензию центрифугировали при 15000×g в течение 40 мин, осадок отбрасывали. Супернатант наносили на Ni-хелатирующую сефарозу (GE Healthcare). Смола тщательно промывали 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 500 мМ NaCl, 0,05%, и Igepal CA-630, и связанный белок элюировали буфером, содержащим 50 мМ Tris-HCl (pH 8,0), 150 мМ NaCl, 0,3М имидазола и 10% глицерина. Затем белок связывали с SP-сефарозой (GE Healthcare) в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), 150 мМ NaCl, 0,01% Triton X-100 и 2 мМ DTT, элюируя линейным градиентом от 150 мМ до 1 М NaCl. Далее добавляли глицерин до 50% и белок хранили при -20°C.

## **2.8. *In vitro* транскрипция РНК-проводников**

Продукт ПЦР, кодирующий соответствующую последовательность РНК-проводника под контролем промотора T7, синтезировали с использованием полимеразы Q5 на основе продукта U6-PCR, как описано ранее, с праймерами *ultramerT7\_f* и *ultramerSt1\_r*. Затем продукт ПЦР, содержащий промотор T7, использовали в качестве матрицы для реакции транскрипции *in vitro* (IVT) с использованием набора для синтеза РНК HiScribe Quick T7 High Yield RNA (NEB) в соответствии с протоколом производителя. Реакцию IVT инкубировали в течение ночи, а затем обрабатывали ДНКазой I (NEB) в течение 15 мин при 37°C с последующей очисткой изопропанолом. Вкратце, к реакционной смеси добавляли изопропанол и 0,5 М NaCl и центрифугировали в течение 30 мин. Далее осадок последовательно дважды промывали 70% и 95% этанолом. Высушенный на воздухе осадок ресуспендировали в воде без РНКаз и хранили при -80°C.

## **2.9. Дизайн и синтез аттенуированных РНК-проводников**

Дизайн аттенуированных РНК-проводников были произведён с использованием алгоритма, описанного Jost et al. [469]. Синтез ПЦР-продукта, кодирующего каждый РНК-проводник, выполняли, как описано ранее [470,471], с использованием двухстадийной мутагенной ПЦР. ПЦР-продукты, плазмиду, экспрессирующую dCas9-p300, и рккзДНК трансфицировали в клетки НерG2 с использованием липофектамина 3000. Немодифицированные РНК-проводники, нацеленные на промоторы APOBEC/AID, и нецелевые РНК-проводники служили в качестве положительного и отрицательного контроля соответственно.

## **2.10. Дизайн кодирующих РНК-проводники для нуклеолитических CRISPR/Cas9 систем и систем активации транскрипции**

Были оценены мишени генома ВГВ и потенциальные нецелевые сайты, а гРНК была разработана с использованием открытого веб-инструмента Broad Institute Genetic Perturbation Platform и онлайн-калькулятора CCTop CRISPR/Cas9.

## **2.11. Реакция *in vitro* расщепления**

Рекомбинантный Cas9 смешивали с транскрибированным *in vitro* РНК-проводником в молярном соотношении 1:1 в буфере NEB3.1 и инкубировали в течение 10 мин для сборки рибонуклеопротеиновых комплексов, после чего к смеси добавляли 300 нг целевой рккзДНК/мет-кккзДНК. Реакцию *in vitro* инкубировали в течение 1 ч при 37°C с последующей стадией инактивации при 98°C в течение 2 мин. Результаты визуализировали с помощью гель-электрофореза с использованием 0,8% геля.

## **2.12. Оценка целевой и внецелевой активности**

Для анализа нецелевой активности использовали экспериментальные группы из двух разных лунок для выделения геномной ДНК. Четыре экспериментальные группы (St3, St4, Sp20 и Sp9) с соответствующими негативными контролями использовали для амплификации геномных участков с наиболее вероятным предсказанным нецелевым расщеплением. Целевые и внецелевые мишени амплифицировали с использованием полимеразы Q5; ампликоны очищали из геля и выделяли с помощью набора для гель-экстракции Qiagen. Количество ПЦР-продуктов оценивали количественно с помощью флуорометра Qubit 2.0 (Life Technologies). Затем лигировали адаптеры для секвенирования Illumina. Библиотеки секвенировали с парными прочтениями длиной 250 нт с использованием инструмента MiSeq (Illumina). Программное обеспечение FASTQC и программное обеспечение Geneious использовали для оценки качества, выравнивания на референсную последовательность, отбрасывания некачественных прочтений и расчета частоты мутаций.

### **2.13. Выделение нуклеиновых кислот**

Среду для культивирования клеток удаляли, а клетки дважды промывали PBS перед лизисом в лизирующем буфере AmpliSens Riboprep. Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора AmpliSens Riboprep (AmpliSens Biotechnologies) в соответствии с инструкциями производителя. Для выделения РНК нуклеиновые кислоты обрабатывали ДНКазой I, свободной от РНКазы (NEB), в течение 30 мин при 37°C, очищали от фермента с помощью набора AmpliSens Riboprep и подвергали обратной транскрипции с помощью AmpliSens Reverta-FL. ккзДНК ВГВ выделяли с помощью процедуры HIRT, как описано Cai et al [472], с последующей обработкой ДНКазой PSAD (Epicentre) в течение 12 ч при 37°C и инактивацией фермента при 72°C в течение 15 мин либо ферментом T5-экзонуклеазой (NEB) в течение часа по протоколу производителя.

### **2.14. ПЦР-анализ**

Концентрации пгРНК и S-РНК ВГВ измеряли с нормализацией на мРНК GAPDH. Уровни общей внутриклеточной ДНК ВГВ и ккзДНК нормализовали по отношению к геномному  $\beta$ -глобину. Все ПЦР проводились с определенными наборами праймеров и зондов. Относительные уровни экспрессии рассчитывали методом ddCt.

### **2.15. Проточная цитофлуориметрия**

Эффективность трансфекции и нуклеофекции анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии на микроскопе Olympus IX73. Для определения эффективности трансфекции и нуклеофекции с помощью проточной цитометрии клетки дважды промывали фосфатным буфером и снимали в растворе трипсина/ЭДТА. Снятые клетки ресуспендировали в полной среде и центрифугировали при 500×g в течение 5 мин. Супернатант удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в фосфатном буфере и снова центрифугировали, как указано выше. Полученный осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл фосфатного буфера и использовали для анализа методом проточной цитометрии на канале FITC. Анализ методом проточной цитометрии проводили на приборе Novocyte3000 (ACEA Biosciences, Inc) либо на приборе Beckman Coulter Cytoflex. Результаты анализировали в программе Novocyte.

### **2.16. Иммуноцитохимия и иммуногистохимия**

Клетки высевали на покровные стекла, трансфицировали реагентом Lipofectamine3000 и фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 10 мин в конечной точке. Затем покровные стекла промывали 3 раза в Трис-НСl (50 мМ, рН 8,0) и инкубировали в течение 30 мин с блокирующим буфером (0,02 % Тритона X-100, 10 % лошадиной сыворотки и 150 мМ NaCl в Трис-НСl [50 мМ, рН 8,0]). Затем покровные стекла инкубировали с первичными кроличьими антителами к НВс (ab115192) или кроличьими

антителами к 53BP1 (ab21083) и мышинными антителами к  $\gamma$ H2AX (ab26350) при комнатной температуре в течение 1 ч, промывали 3 раза по 5 мин в промывочном буфере (0,02% Triton X-100 и 200 мМ NaCl в трис-HCl [50 мМ, pH 8,0]) и инкубировали со вторичными козьими антителами Alexa Fluor 488 против кроличьего IgG (ab150077) и козьими антимышиными IgG, меченными Alexa Fluor 594 (ab150116) с Hoechst33342 (1:10 000) при комнатной температуре в течение 1 часа. В экспериментах по CRISPR-активации APOBEC/AID клетки окрашивали антителами против A3A (Abcam ab38641), против A3B (ab104759), против A3G (ab194581) или против AID (ab59361). В экспериментах по оценке внутриклеточной локализации белка StCas9 и оценке противовирусного действия по маркеру HBcAg клетки инкубировали с первичными козьими поликлональными антителами к 6XHis-tag для детекции белка StCas9-6XHis-tag (ab9136, Abcam) и с мышинными моноклональными антителами к HBc (ab8637, Abcam) при комнатной температуре в течение 1 ч. Покровные стекла промывали 3 раза по 5 мин в промывочном буфере и заключали в реагент Fluoroshield (ab104135). Изображения были получены на микроскопе Leica DMI6000 с иммерсионным объективом 20 $\times$  и 63 $\times$ .

## **2.17. Низкомолекулярные соединения**

Стоковые растворы NU7026, B02, L755507 и 3-аза замораживали в ДМСО и хранили при -80 $^{\circ}$ C до использования, после чего аликвоты оттаивали при комнатной температуре в течение часа, после чего растворы разбавляли в среде для культивирования клеток. Конечные концентрации низкомолекулярных соединений были следующими: NU7026 – 7,5 мкМ; B02 – 3 мкМ; L755507 – 5 мкМ; и 3-аза – 5 мкМ. Клетки инкубировали с низкомолекулярными соединениями в течение 72 часов. В качестве отрицательного контроля использовали клетки, трансфицированные Cas9-кодирующими плазмидами и продуктом ПЦР и обработанные ДМСО. К клеткам добавляли раствор NU7026 в конечной концентрации 7,5 мкМ в полной среде DMEM. Среду, содержащую NU7026, меняли каждые 1–2 дня до сбора урожая. ДМСО использовали в качестве контроля в экспериментах с NU7026. Ламивудин (LAM) добавляли к клеткам в конечной концентрации 2 мкМ в смеси с полной средой DMEM. Клетки инкубировали с LAM в течение 6 дней и каждые 2 дня добавляли свежую среду с LAM. Все химические вещества сначала добавляли к клеткам за 1 день до трансфекции. Доксорубин (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) растворяли в ДМСО (Sigma Aldrich, Сент-Луис, Миссури, США) и аликвоты хранили при -80  $^{\circ}$ C. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (3% раствор в воде) хранили при комнатной температуре.

## **2.18. Флуоресцентная микроскопия**

Эффективность трансфекции и нуклеофекции анализировали с помощью флуоресцентной визуализации клеток, экспрессирующих EGFP, на микроскопе Olympus IX73 (канал FITC).

## **2.19. Анализ пролиферации и жизнеспособности**

Пролиферацию клеток HepG2-1.1merBГВ под действием низкомолекулярных соединений оценивали колориметрически при 450 нм с использованием набора BrdU Cell Proliferation Kit (Abcam Biochemicals) путем включения BrdU в делящиеся клетки. Динамику пролиферации клеток HepG2-1.1merBГВ и их жизнеспособность оценивали с помощью набора Cell Cytotoxicity Assay (Abcam Biochemicals) по протоколу производителя по запатентованной технологии восстановления флуоресцентного субстрата путем деления клеток. Эксперименты проводились в 96-луночных планшетах; клетки высевали при слиянии 30% в восьми повторах. Флуоресцентные сигналы регистрировали на планшетном спектрофотометре iMark (Bio-Rad Laboratories, США).

Клетки высевали при 30% конfluентности и обрабатывали низкомолекулярными соединениями отдельно или после липофекции плазидами, кодирующими системы CRISPR/Cas9. Жизнеспособность клеток оценивали с помощью набора Cell Cytotoxicity Kit (Abcam) в соответствии с инструкциями производителя.

## **2.20. Анализ клеточного цикла**

Для анализа клеточного цикла клетки HepG2-1.1 окрашивали раствором DRAQ5 (Abcam, Кембридж, Великобритания) в соответствии с протоколом производителя. Содержание ДНК во всех экспериментальных условиях оценивали следующим образом: полную среду для культивирования клеток удаляли, клетки дважды промывали 1×PBS, трипсинизировали и осторожно ресуспендировали в среде, содержащей FBS. Снятые клетки центрифугировали (500×g в течение 5 мин), супернатанты удаляли, а осадок клеток ресуспендировали в 300 мкл PBS, содержащего 5 мкМ DRAQ5. Анализ распределения клеточного цикла проводили на проточном цитометре FACScalibur (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) с помощью Flowing Software 2.5.1 в канале PE-Cy7-A; сигналы строились в линейном режиме. Используемые ворота включали области G0/G1, S и G2/M. Для анализа эффективности нуклеофекции клетки HepG2-1.1, нуклеофицированные 2 мкг рMAX-GFP, собирали через 48 ч, как описано выше, и анализировали на проточном цитометре FACScalibur. Процент клеток, экспрессирующих GFP, рассчитывали по сравнению с зараженными вектором контрольными клетками HepG2-1.1 в канале FITC-A с использованием Flowing Software 2.5.1.

### 2.21. Метод ДНК-комет

Потенциальную генотоксичность измеряли с помощью набора для анализа Comet SCGE (Enzo Life Sciences). Вкратце, клеточные линии HepG2 или HepG2-1.5merВГВ снимали через 4 или 5 дней после трансфекции; 2000 клеток ресуспендировали в расплавленной LTM-агарозе при 37°C, 75 мкл суспензии наносили на подготовленные предметные стекла и оставляли застывать при комнатной температуре. Затем стекла инкубировали в буфере для лизиса в течение 45 мин, а затем переносили в щелочной буфер (pH > 13) на 50 мин. Слайды дважды промывали по 5 мин в TBE-буфере, а затем переносили в камеру для электрофореза с TBE-буфером (1 В/см в течение 50 мин). После электрофореза стекла погружали дважды по 5 мин в 70%-й этанол и сушили на воздухе. Ядра клеток на стеклах окрашивали SybrGreen в течение 30 мин, дважды промывали в деионизированной воде и сушили при 37°C. Визуализацию комет проводили с помощью канала FITC флуоресцентного микроскопа Olympus IX71.

### 2.22. Вестерн-блоттинг

Трансфицированные клетки HepG2 снимали из 6-луночных планшетов, лизировали на льду в 100 мкл ледяного буфера RIPA в течение 10 мин, смешивали со 100 мкл 2×буфера Лэммли и выдерживали на льду в течение 10 мин. Далее образцы нагревали при 95°C в течение 10 мин. Образцы хранились при температуре -20 °C до использования. Белки разделяли с помощью электрофореза SDS-PAAG и переносили на мембраны PVDF Hybond-P (Amersham GE Healthcare). Мембраны блокировали 5% обезжиренным сухим молоком в буфере PBS-T (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 100 mM NaCl, 0,1% Tween-20) при комнатной температуре в течение 1 ч или при 4°C в течение ночи. После этого мембраны инкубировали с первичными антителами анти-A3A (Abcam ab38641), анти-A3B (ab104759), анти-A3G (ab194581) или анти-AID (ab59361) или с кроличьими антителами анти-53BP1 (ab21083), мышинными антителами к  $\gamma$ H2AX (ab26350) или кроличьими антителами против H2AX (ab11175) при 4°C в течение ночи при осторожном встряхивании. Затем образцы промывали 3 раза в течение 10 минут PBS-T и инкубировали со вторичными козьими антителами к кроличьим IgG H&L (HRP) (ab205718, разбавленный до 1:10 000) или вторичными козьими анти-мышинными IgG (ab6789, разбавленный до 1:10 000) антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Мембраны промывали 3 раза PBS-T; сигнал проявляли с помощью реагента ECL (Thermo Fisher Scientific) и регистрировали с помощью G:box Chemi XX6 (Syngene) с использованием программного обеспечения Genesis (Syngene) или с помощью рентгеновских пленок. Затем мембраны отмывали с использованием буфера для отмывки в мягких условиях (1,5 % глицина, 0,1 % SDS и 1 % Tween-20 [pH 2,2]) и повторно окрашивали первичными мышинными моноклональными

антителами против  $\beta$ -актина (Sigma, A5441, 1:10 000). ) или против  $\alpha$ -тубулин (Sigma, T6199, 1:10 000) в течение 1 ч при комнатной температуре. Для обнаружения сигнала образцы промывали 3 раза PBS-T и инкубировали со вторичными козьими анти-мышинными IgG (ab6789, 1:10000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Результаты были проанализированы с использованием программного обеспечения ImageJ.

### **2.23. Саузерн-блоттинг**

Различные формы ДНК ВГВ выделяли из клеток с помощью набора RiboPrep (Amplisense Biosciences) и определяли с помощью Саузерн-блоттинга, как описано ранее с модификациями. Вкратце, изоляты ДНК нагревали при 85°C в течение 5 минут, подвергали электрофорезу в 1,2% агарозном геле и переносили на мембрану HybondTM-N+ (GE Healthcare). Мечение биотином смеси ВГВ-специфических ДНК-зондов выполняли с использованием набора для мечения ДНК North2South Biotin Random Prime Labeling Kit (Thermo Fisher Scientific). После предварительной гибридизации при 55°C в течение 30 мин в гибридизационном буфере набора North2South Chemiluminescent Detection Kit (Thermo Fisher) меченые зонды с концентрацией 30 нг/мл гибридизовали при 55°C в течение 48 ч в гибридизационном буфере. Гибриды ДНК-зонд-ккзДНК визуализировали с использованием конъюгатов стрептавидин:HRP с раствором перекиси/люминола с использованием субстрата максимальной чувствительности SuperSignal West Femto (Thermo Fisher Scientific).

### **2.24. Исследования *in vivo***

Оценку противовирусного действия рибонуклеопротеиновых комплексов StCas9 проводили на модели гидродинамической инъекции 4 мкг плазмиды, кодирующей 1.1mer геном вируса гепатита В, в хвостовую вену мышей линии BALB/c (самцы, 6-8 недель, по 3 особи на каждую группу). Раствор в объеме 8% массы тела животного вводился в хвостовую вену в течение 5-8 секунд. Через 6 часов после гидродинамической инъекции вводили рибонуклеопротеиновые комплексы StCas9 с РНК-проводником St10 либо некодирующим РНК-проводником Stnc в смеси с реагентом Lipofectamine 3000 в соотношении 3,15 мкг белка к 0,63 мкг РНК-проводника на животное. Оценку противовирусного действия и доставки StCas9 белка в клетки печени проводили на 48 час после начала эксперимента. Эвтаназию мышей проводили в парах изофлурана с дислокацией шейных позвонков; далее проводили эксплантацию органов, забор крови и отделение плазмы. Печень мышей замораживали в среде О.С.Т (Scigen) в жидком азоте и хранили при -80°C.

## 2.25. Анализ фокусов $\gamma$ -H2AX и 53BP1

Изображения были получены с использованием микроскопа Leica DMI6000 с иммерсионными объективами 100 $\times$ . Фокусы окрашивания  $\gamma$ H2AX и 53BP1 подсчитывали визуально или с помощью ImageJ (NIH, Bethesda, MD, USA). Фокусы количественно определяли не менее чем для 200 клеток в каждой экспериментальной группе. Результаты представлены в виде среднего количества фокусов на клетку в случайно выбранных областях из трех независимых экспериментов (каждая точка соответствует среднему количеству очагов в выбранной области).

## 2.26. 3D-PCR

Обогащенные CpG-области ккзДНК или области генома клеток человека амплифицировали с парой специфических праймеров с использованием полимеразы TaqF; ампликоны очищали из геля и выделяли с использованием набора для выделения из геля Qiagen. Очищенные продукты ПЦР в равных количествах использовали для гнездовой ПЦР с полимеразой TaqF на различных температурах денатурации (95–82 $^{\circ}$ C), а затем использовали для гель-электрофореза и NGS. Альтернативно, 3D-ПЦР выполняли полуколичественно с красителем SYBRGreen. Для проведения NGS, ампликоны 3D-ПЦР, полученные при 87 $^{\circ}$ C, 84 $^{\circ}$ C или 82 $^{\circ}$ C, очищали из геля и выделяли с помощью набора для выделения из геля Qiagen, количественно определяли с помощью флуорометра Qubit 2.0 (Life Technologies) и объединяли в эквимольных соотношениях. Затем лигировались адаптеры для секвенирования Illumina. Библиотеки секвенировали с использованием парных прочтений длиной 250 нт с использованием прибора MiSeq (Illumina). Программное обеспечение FASTQC и Geneious использовались для оценки качества, выравнивания на референс, отбрасывания некачественных прочтений и расчета количества мутаций. Скрипты Python использовались для анализа количества мутаций и анализа контекста мутаций.

## 2.27. Синтез коротких шпилечных РНК

Промотор U6 человека, амплифицированный с помощью ПЦР на матрице плазмиды pLX-sgRNA (плазида AddGene #60662), и олигонуклеотиды, кодирующие короткие шпилечные РНК, клонировали в вектор pGEM-T Easy (Promega, Мэдисон, Висконсин, США). Мишенями кшРНК были (1) ATM: 5'-TAGTGTTAGTGATGCAAACGA-3'; (2) ATR: 5'-TACTGACCAATTGAAACTCTA-3'; и (3) нецелевой контроль: 5'-CSTAAGGTAAAGTCGCCCTCG-3'. Эффективность нокдаунов с помощью коротких шпилечных РНК и их влияние на ВГВ анализировали на клетках HEK293T, а также на клетках HepG2-1.1merВГВ, HepG2-1.5merВГВ и клетках HepG2 с помощью трансфекции реагентом Lipofectamine3000 (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с

инструкциями производителя. Клетки трансфицировали, дважды промывали фосфатным буфером через 2 дня после трансфекции и отбирали на анализ через 5 дней после трансфекции.

### **2.28. Бисульфитное секвенирование**

Неметилированные цитозины в выделенной ДНК были преобразованы в урацилы с использованием набора EpiTect 96 Bisulfite Kit (Qiagen) в соответствии с инструкциями производителя. Один микрограмм ДНК подвергали протоколу ПЦР с бисульфитной конверсией. ПЦР-амплификацию выбранных маркеров проводили с использованием праймеров, разработанных с помощью программного обеспечения PyroMark Assay Design 1.0 (Qiagen). Реакции ПЦР проводили в общем объеме 25 мкл, содержащем по 0,2 мкМ каждого из праймеров, 20 нг матричной ДНК и смесь ПЦР с полимеразой TaqF, буфером для ПЦР и дНТФ (AmpliSens Biotechnologies). Программа амплификации состояла из начальной стадии денатурации при 95°C в течение 10 мин, за которой следовали пять циклов, включающих: денатурацию (95°C в течение 45 с), отжиг (60°C в течение 90 с) и удлинение (72°C в течение 90 с). 2 мин), затем 25 циклов денатурации (95°C, 45 с), отжига (60°C, 90 с), удлинения (72°C, 90 с) и конечного удлинения 72°C, 10 мин. Отрицательные контроли ПЦР включали в каждую амплификацию ПЦР. Пиросеквенирование проводили с использованием реагентов PyroMark Gold Q24 (Qiagen) на вакуумной рабочей станции PyroMark Q24 и приборе PyroMark Q24 в соответствии с инструкциями производителя. Аликвоту 10 мкл продукта ПЦР иммобилизовали на 2 мкл стрептавидин-сефарозы High Performance (GE Healthcare). Отжиг проводили в течение 2 мин при 80°C с 25 мкл 0,3 мМ с помощью праймера для секвенирования. Полученные следы Pyrogram были автоматически проанализированы с помощью программного обеспечения для анализа PyroMark версии 2.0.8 (Qiagen).

### **2.29. Биоинформатический анализ данных**

Программное обеспечение FASTQC и программное обеспечение Geneious использовались для оценки качества, выравнивания на референс, отбрасывания некачественных прочтений/нуклеотидов и расчета количества замен, вставок и делеций нуклеотидов. Показатели качества прочтений каждой последовательности во всех группах превышали 30.

### **2.30. ChIP-ПЦР**

Клетки HepG2 высевали в чашки Петри диаметром 150 мм при 50% конfluence и трансфицировали с использованием реагента Lipofectamine3000 с рккзДНК ВГВ, плазмидой, экспрессирующей dCas9-p300, и продуктом ПЦР, кодирующим

соответствующий РНК-проводник под промотором U6. Через 48 часов после трансфекции клетки промывали фосфатным буфером, снимали с использованием трипсина и подсчитывали. На одну реакцию ChIP использовали  $9 \times 10^6$  клеток. Клетки фиксировали в 1% параформальдегиде и лизировали с использованием реагентов ChIP Kit (ab500, Abcam). Хроматин расщепляли на фрагменты размером 200–1000 п.н. с помощью ультразвукового дезинтегратора Branson Sonifier 250. Аликвоту фрагментированного хроматина замораживали при  $-80^{\circ}\text{C}$  для ПЦР-нормализации результатов теста. После этого фрагменты хроматина инкубировали с антителами к ацетилованному гистону H3 (acH3) (06-599; Merck) в течение ночи при  $4^{\circ}\text{C}$ . В качестве положительного контроля, проводили инкубацию хроматина с антителами к гистону H3 (ab1791; Abcam). Связанный хроматин выделяли с использованием гранул для аффинной очистки (ab500, Abcam). Полуколичественный ПЦР-анализ с праймерами, амплифицирующими области промоторов APOBEC/AID, использовали для оценки обогащения acH3 в областях-мишенях системы dCas9-p300 либо dCas9-p300mut. Дизайн праймеров для ChIP-ПЦР проводили с использованием UCSC Genome Browser и онлайн-инструмента Primer-BLAST.

### **2.31. Метод microarray**

Суммарную мРНК выделяли с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen). кДНК получали с использованием набора для синтеза кДНК RT2 PreAMP (Qiagen) и амплифицировали с использованием мастер-миксов RT2 SYBR Green qPCR Mastermixes (Qiagen). Изменения в экспрессии генов, участвующих в репарации ДНК, оценивали с помощью RT2 Profiler PCR Array Human DNA Damage Signaling Pathway на амплификаторе CFX96 в реальном времени (BioRad) в соответствии с инструкциями производителя.

### **2.32. Определение контекста дезаминирования нуклеотидов**

Скрипты Python использовались для анализа частоты мутаций и анализа нуклеотидного контекста мутаций.

### **2.33. Конструкты CRISPR/Cas**

Дизайн РНК-проводников к промоторам целевых генов A3A, A3B, A3G, AID проводили с помощью веб-инструмента Broad Institute Genetic Perturbation Platform. Продукты U6-ПЦР, кодирующие РНК-проводники, синтезировали с помощью двухэтапной мутагенной ПЦР с использованием полимеразы Q5; с последующей очисткой с использованием набора для гель-экстракции Qiagen. Для получения U6-ПЦР продукта использовали в качестве матрицы плазмиду pLX-sgRNA (плазмида AddGene #50662, получена от доктора Эрика Ландера и доктора Дэвида Сабатини). dSaCas9-p300 был получен из плазмиды pJEP303-pAAV-CMV-dSaCas9-VP64-pA (AddGene #113678, получена

от доктора Джонатана Пლოსки) методом клонирования dSaCas9 в плазмиду pcDNA-dCas9-p300 Core. РНК-проводник dSaCas9 получали при помощи плазмиды pSaGuide (Addgene #64710; получена от доктора Киран Мусунуру).

#### **2.34. Анализ апоптоза**

В конечной точке эксперимента клетки дважды промывали фосфатным буфером и снимали раствором трипсин/ЭДТА. Вслед за этим, клетки инкубировали в течение 7 минут в среде Hoechst33342 (10 мг/мл) при 37 °С и окрашивали пропидия йодидом (2,5 мг/мл). Образцы выдерживали в темноте на льду в течение 15 минут, затем сразу анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI6000 при 20-кратном увеличении, помещая образцы на покровные стекла. В анализе использовали не менее 400 клеток на группу.

#### **2.35. Количественное и полуколичественное определение секретируемого HBsAg**

Содержание секретируемого антигена HBsAg ВГВ в культуральной среде оценивали количественно с использованием набора Architect HBsAg (Abbott Laboratories). Перед анализом культуральную среду пропускали через фильтры (Corning, 0,2 мкм) для удаления мертвых клеток и клеточного дебриса. Количество HBsAg выражали в международных единицах на мл (МЕ/мл) с учетом количества клеток в образце на момент сбора культуральной среды.

Аналогично, полуколичественное определение HBsAg проводили с помощью колориметрического ИФА метода с использованием тест-системы ДС-ИФА-HBsAg-0,01 согласно инструкции производителя (НПО Диагностические системы, Нижний Новгород, Россия).

#### **2.36. Получение рибонуклеопротеиновых комплексов**

Рекомбинантный белок dSaCas9-p300 смешивали с *in vitro* транскрибированным с помощью T7 полимеразы РНК-проводником в молярном соотношении 1:1 в среде OptiMEM (Gibco) и инкубировали в течение 10 мин для сборки РНП с последующим добавлением 300 нг целевой рккзДНК. Клетки HepG2 трансфицировали смесью РНП и рккзДНК с использованием набора для трансфекции Lipofectamine CRISPRMAX (Invitrogen). Вкратце, реагент Cas9 Plus добавляли к смеси РНП и рккзДНК, перемешивали и инкубировали в течение 10 мин. Параллельно реагент CRISPRMAX смешивали с OptiMEM (Gibco) и инкубировали в течение 10 мин. Затем к комплексам РНП/ккзДНК добавляли смесь CRISPRMAX и инкубировали еще 10 мин. Конечную смесь добавляли к клеткам при 50% конфлуентности.

### **2.37. Статистический анализ данных**

Значения были выражены как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение (SD) трех повторных экспериментов в программном обеспечении SPSS (SPSS 21.0.0.0). Односторонний ANOVA и t-критерий Стьюдента с апостериорным критерием HSD Тьюки использовались для сравнения переменных и расчета P-значений для определения статистически значимой разницы в средних значениях. Для определения значимости внецелевого действия в каждом конкретном регионе при анализе данных высокопроизводительного секвенирования использовали расчёт значения параметра P с использованием точного критерия Фишера.

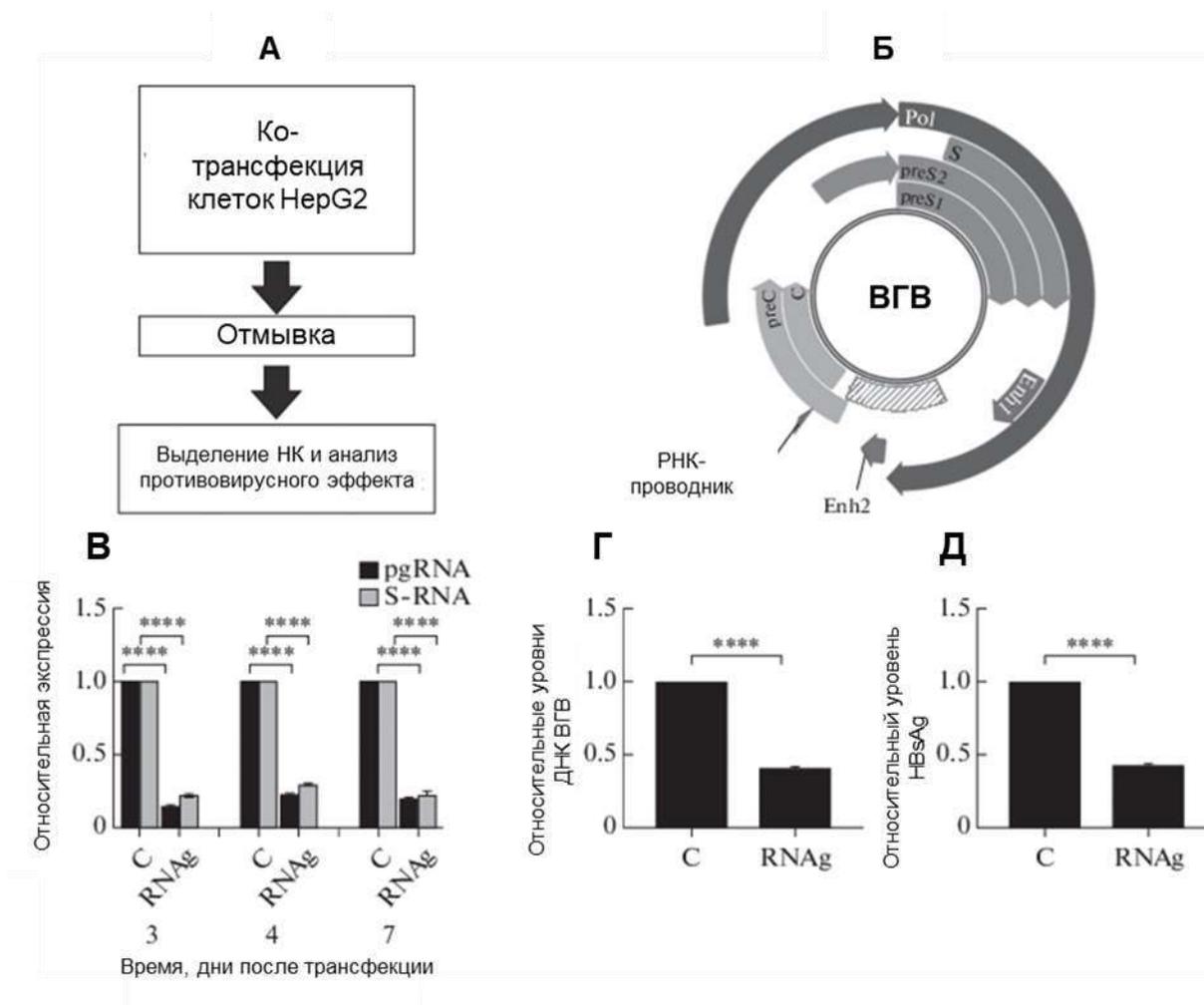
## **РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

### **Глава 3. Разрушение основной формы генома вируса гепатита В при действии сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9**

#### **3.1. Разработка подходов по расщеплению генома вируса гепатита В генетически-модифицированными вариантами CRISPR/Cas9 нуклеаз**

В самых ранних работах, опубликованных вскоре после первых исследований по адаптации CRISPR/Cas9 систем для редактирования генома, было продемонстрировано, что сайт-специфические нуклеазы CRISPR/Cas могут использоваться для расщепления вирусных геномов по целевым локусам [473]. В работах Lin с соавт., а также Seeger и Sohn 2013-2014 гг. была впервые продемонстрирована возможность расщепления ДНК ВГВ, что приводило к ранее недостижимому снижению уровней всех форм генома ВГВ вскоре после трансфекции систем CRISPR/Cas9. Несмотря на высочайшую эффективность действия и, впервые, возможность напрямую расщеплять и снижать уровни ккзДНК в период краткосрочного воздействия, были очевидны недостатки действия CRISPR/Cas9, в том числе связанные с остаточными матрицами ккзДНК ВГВ, сохранением репликативно-активных интермедиатов вируса и, вероятно, сохранением возможности реактивации инфекции после прекращения действия CRISPR/Cas9. На модели ко-трансфекции генома ВГВ HepG2-1.1merВГВ системой CRISPR/Cas9 было продемонстрировано резкое снижение (до 80-90%) всех изученных параметров репликации ВГВ к 3-7 суткам после трансфекции (Рисунок 22). В ходе пилотных исследований было показано, что остаточные матрицы могут содержать мутации со сдвигом рамок считывания генома ВГВ, что блокирует активность ккзДНК, но также остаются неизмененные, интактные последовательности вируса. Важно отметить, что «истинная» ккзДНК ВГВ, наблюдаемую у пациентов с ХГВ, со схожими эпигенетическими характеристиками, схожим ответом клетки на вирус, а также схожим либо близким количеством копий ккзДНК образуется только на моделях инфекции клеток человека ВГВ. Прочие модели не повторяют основные

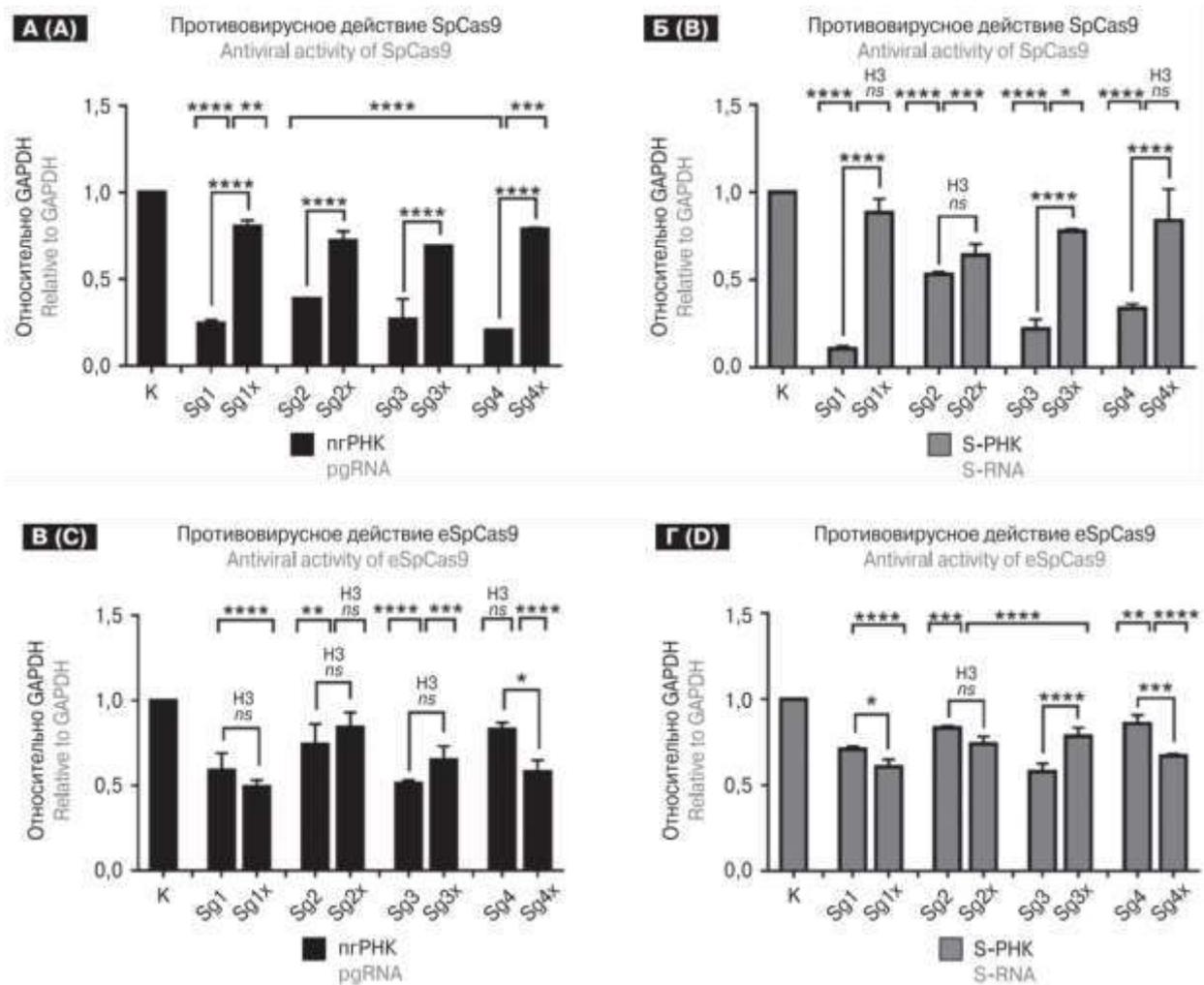
этапы вирусного цикла, число копий ккзДНК может значительно отличаться. Считается, что ккзДНК существует в виде минихромосомы, связанной с гистоновыми и негистоновыми белками и модифицированной эпигенетически [61,112]. Кроме того, ккзДНК может персистировать в транскрипционно неактивном, гиперметилированном состоянии [23].



**Рисунок 22. Влияние системы CRISPR/Cas9 на транскрипцию и трансляцию ВГВ в клетках HepG2.** (А) Схема эксперимента. (Б) Карта генома ВГВ, с отмеченной на ней мишенью РНК-проводника: Pol – ген полимеразы, preC/C – гены областей кора и прекора; EnhI/EnhII, участки энхансеров I и II. (В) Уровни пгРНК ВГВ и S-мРНК на 3, 4 и 7 дни после трансфекции систем CRISPR/Cas9. Уровни пгРНК и S-мРНК нормализованы относительно уровней экспрессии мРНК Cas9 в трансфицированных клетках. Уровни экспрессии секретируемой ДНК ВГВ (Г) и белка HBsAg (n = 3) (Д) на четвертые сутки после трансфекции. Относительные уровни рассчитывали методом  $\Delta\Delta Ct$ . Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [391].

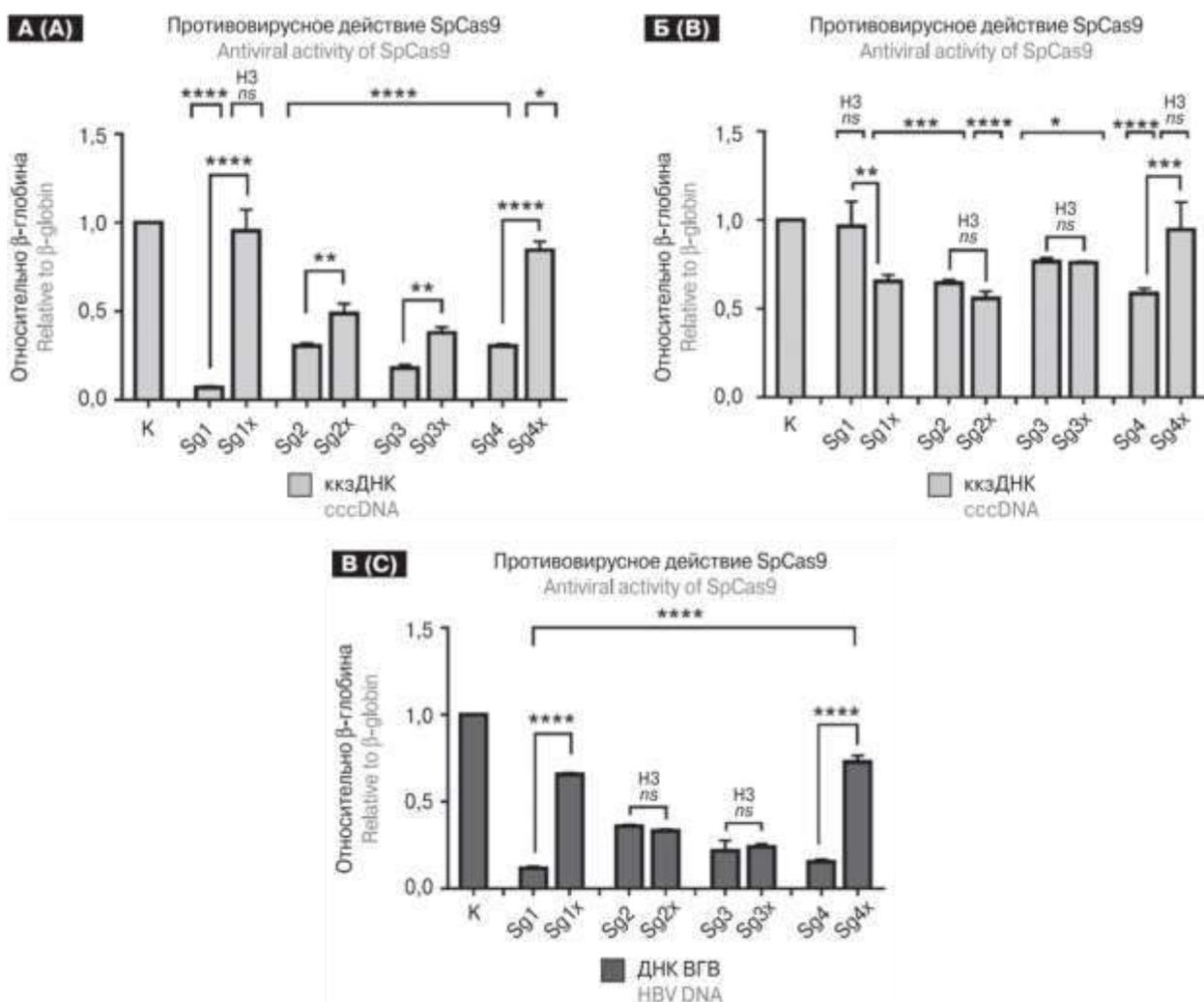
С целью оценки возможности усиления противовирусного действия CRISPR/Cas9 был предложен способ увеличения активности системы за счет генетической модификации шпильки РНК-проводника, которая участвует в распознавании Cas9 белком целевой

последовательности мишени. Вероятно, более высокая активность модифицированных РНК-проводников связана с усилением сродства Cas9 белков к ДНК-мишеням. Был проведен дизайн, синтез и испытания 24 РНК-проводников с различной исходной активностью в отношении вирусных ДНК-мишеней. Из них 18 модифицированных РНК-проводников расщепляли вирусные мишени и оказывали более выраженное противовирусное действие. Вместе с этим, проводили анализ влияния генетических модификаций РНК-проводников как с системой CRISPR/Cas9 дикого типа, так и с улучшенным вариантом системы eSpCas9. Белок eSpCas9 является более специфичным аналогом белка дикого типа SpCas9 (Рисунок 23). Со всеми РНК-проводниками белок eSpCas9 оказался менее эффективен по сравнению с белком дикого типа SpCas9. Модификации РНК-проводников в случае с низкоактивными РНК-проводниками слабо усиливали противовирусное действие CRISPR/Cas9, тогда как с высокоактивными – существенно снижали ее. Действительно, неизменные РНК-проводники вскоре после трансфекции снижали уровни ккзДНК ВГВ на 70-96%; при этом модифицированные РНК-проводники вызывали снижение на 65%, 33%, 23% и 72%, тогда как те же немодифицированные РНК-проводники приводили к снижению на 89%, 18%, 20% и 54%, соответственно (Рисунок 23) [474]. Методом оценки продукции HBsAg и секретируемой ДНК ВГВ было также показано, что для всех исходных РНК-проводников, не подвергшихся генетическим модификациям, противовирусная активность оказывается гораздо более высокой, на уровне 89%. Исходя из полученных результатов, сделан вывод о достаточности действия исходно активных РНК-проводников и слабом либо негативном влиянии использованных генетических модификаций на противовирусное действие систем CRISPR/Cas9.



**Рисунок 23.** Эффекты систем CRISPR/Cas9 на транскрипцию ВГВ. (А–Б) Снижение уровней пгРНК (А) и S–РНК (Б) после действия SpCas9 либо уровни (В) пгРНК и (Г) S–мРНК после действия eSpCas9 с модифицированными либо не модифицированными РНК-проводниками. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , H3 — незначимые отличия [474].

Также было продемонстрировано, что более безопасный вариант Cas9-белка eSpCas9, содержащий мутации в структуре полости белка, которая участвует в стабилизации ДНК цепи при гибридизации РНК-проводника и ДНК-мишени, не только ослабевает внецелевое взаимодействие, но и существенно снижается целевая активность (Рисунок 24). Модификация РНК-проводников также не восстанавливает анти-ВГВ активность eSpCas9 до уровня, сопоставимого с белком дикого типа [474].

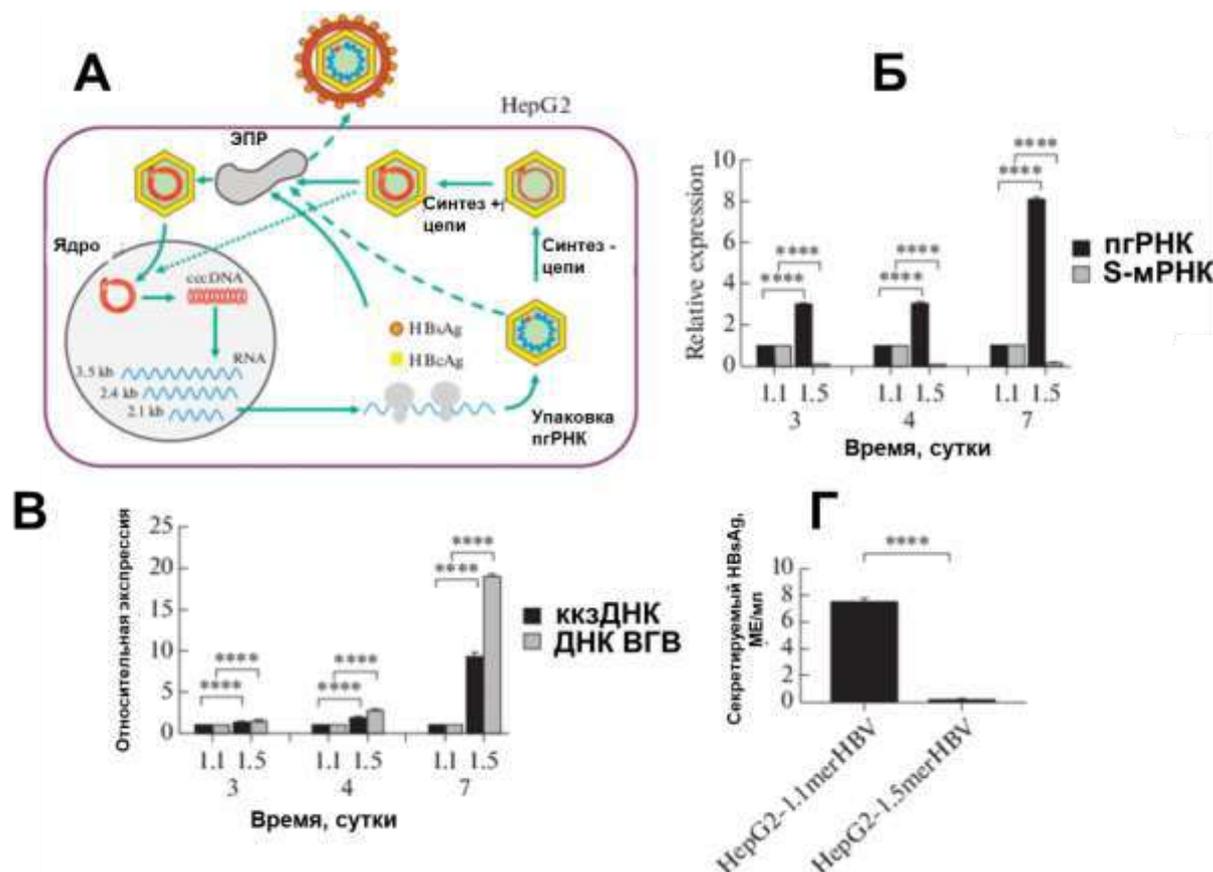


**Рисунок 24. Действие CRISPR/Cas9 на ккзДНК и ДНК ВГВ.** (А) Уровни ккзДНК после действия SpCas9 либо (Б) eSpCas9 с модифицированными либо немодифицированными РНК-проводниками. Уровни секретируемой ДНК ВГВ после действия (В) SpCas9 с модифицированными либо немодифицированными РНК-проводниками. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ нормализованы относительно ДНК плазмид SpCas9/eSpCas9. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , H3 — не значимые отличия [474].

Для оценки влияния длительной экспрессии CRISPR/Cas9 на противовирусную активность на модели ВГВ, был проведен ряд последовательных экспериментов: (1) проведено сравнительное изучение двух моделей ВГВ репликации – HepG2-1.1merВГВ и HepG2-1.5merВГВ; (2) отработаны условия для эффективной лентивирусной трансдукции CRISPR/Cas9 в линии клеток гепатомы с ВГВ; (3) проведен анализ противовирусного действия CRISPR/Cas9, экспрессируемых с лентивекторов (Рисунок 25).

Эксперименты проводили с клетками 1.5, конститутивно продуцирующими ВГВ, а также в ходе 24-часовой активации транскрипции ВГВ с цитомегаловирусного промотора в клетках 1.1 при помощи инкубации в среде с доксициклином. Вирусный цикл

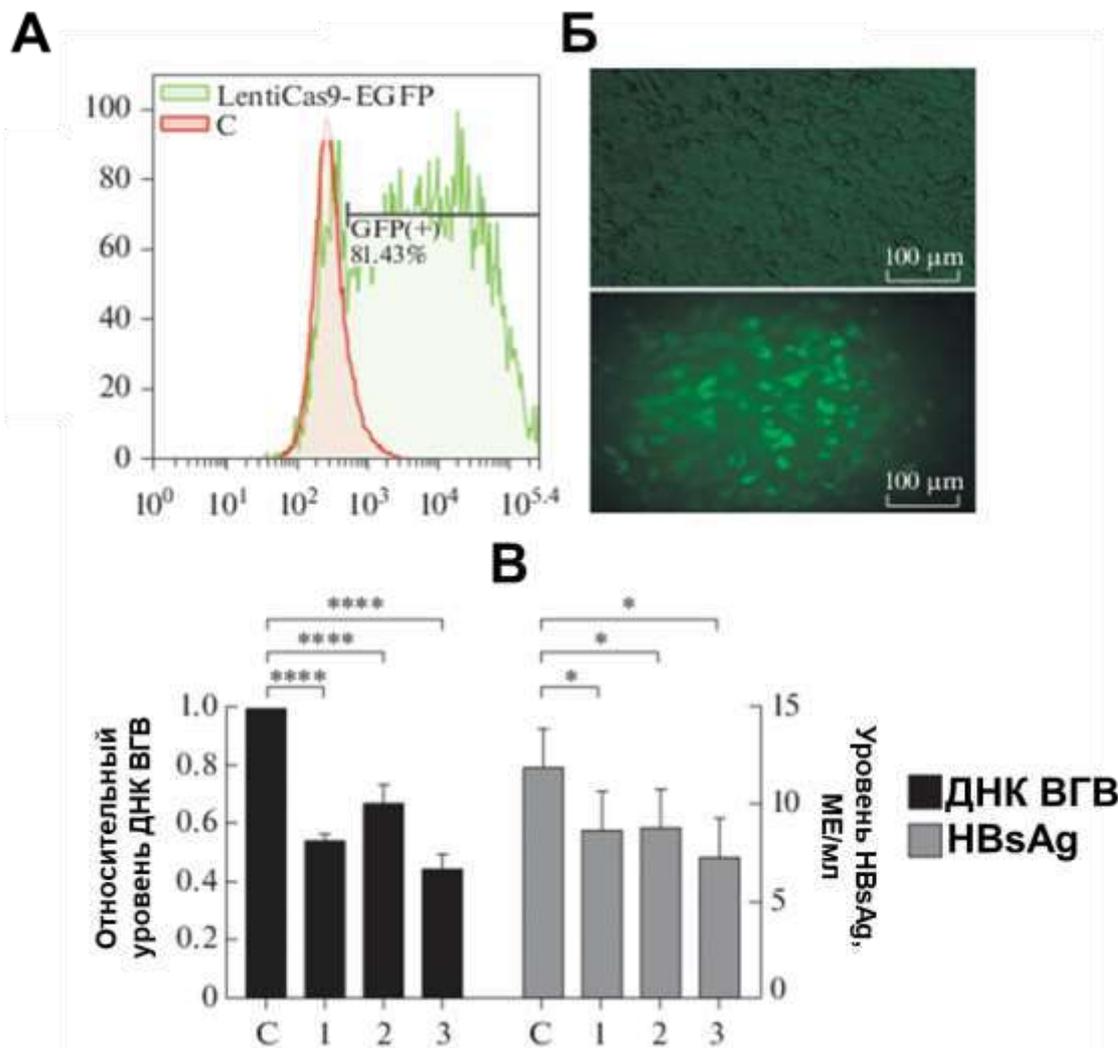
анализировали на 3, 4 и 7 сутки после добавления доксициклина в клетки 1.1 В результате было показано, что уровни транскрипции и репликации ВГВ оказываются в разы (в десятки раз – для ккзДНК и ДНК ВГВ) выше на модели HepG2-1.5merВГВ (1.5) в сравнении с HepG2-1.1merВГВ (1.1), при этом HBsAg секретируется более активно на модели 1.1 (Рисунок 25 Б, В, Г) [391].



**Рисунок 25.** Сравнение уровней транскрипции и репликации ВГВ на моделях клеточных линий HepG2-1.1merВГВ (1.1) и HepG2-1.5merВГВ (1.5). (А) упрощенная иллюстрация жизненного цикла ВГВ. (Б) Уровни транскрипция прРНК и S-мРНК на клетках 1.1 и 1.5 на 3, 4 и 7 дни после трансфекции CRISPR/Cas9. (В) Изменение уровней ДНК ВГВ и ккзДНК в клетках 1.1 и 1.5. (Г) Уровни экспрессии НВсАг на линиях 1.1 и 1.5. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [391].

Обработка клеток HepG2-1.1mer/1.5merВГВ лентивирусами, кодирующими белок SpCas9 и РНК-проводники, приводила к трансдукции около 80% клеток, что показано методом проточной цитофлуориметрии (Рисунок 26А, Б). При этом происходило 2-кратное снижение параметров ВГВ (ДНК ВГВ и НВсАг) (Рисунок 26В). Менее выраженное влияние CRISPR/Cas9 в случае вирусной трансдукции в сравнении с ко-трансфекцией может быть объяснено двумя причинами: (1) низкой эффективностью ко-трансдукции двух лентивирусов либо (2) менее активной экспрессией компонентов CRISPR/Cas9 либо иной

динамикой продукции компонентов CRISPR/Cas9 с лентивекторов. Тем самым, было показано, что лентивирусная трансдукция с более длительной внутриклеточной экспрессией компонентов CRISPR/Cas9 оказывается менее эффективной, чем краткосрочная гиперэкспрессия CRISPR/Cas9 с кодирующих плазмид [391].



**Рисунок 26. Оценка противовирусного действия при трансдукции лентивекторов с CRISPR/Cas9.** (А) Гистограмма распределения клеток при анализе не трансдуцированных клеток (красный цвет) и клеток, трансдуцированных лентивирусом LentiCas9-EGFP, продуцирующим EGFP белок. (Б) Микрофотографии трансдуцированных клеток в светлом поле (верх) и зеленом канале (низ) при 10-кратном увеличении. (В) Оценка противовирусного действия по параметрам секретируемой ДНК ВГВ и HBsAg при добавлении различных MOI лентивирусов с анти-ВГВ CRISPR/Cas9 системой. С – контроль, 1 – MOI=3, 2 – MOI=6, 3 – MOI=9 [391].

Таким образом, были разработаны подходы к расщеплению ккзДНК ВГВ с помощью систем CRISPR/Cas9, и продемонстрирована выраженная противовирусная активность CRISPR/Cas9 на ряде моделей ВГВ-инфекции клеток человека.

### 3.2. Переключение между путями NHEJ и MMEJ определяет судьбу ккзДНК ВГВ после расщепления системами CRISPR/Cas9

Одной из причин существования остаточных матриц ккзДНК после действия сайт-направленных нуклеаз может являться образование мутированных вариантов ккзДНК либо бесшовное восстановление целостности ккзДНК после индукции нуклеолитического разрыва. Для оценки роли основных путей репарации двуцепочечных разрывов (ДЦР) в восстановлении целостности и мутационной инактивации ккзДНК после действия CRISPR/Cas9, а также для анализа возможности потенцирования действия CRISPR/Cas9, были проведены эксперименты по индукции ДЦР в условиях подавления/активации путей репарации. С этой целью были использованы наиболее эффективные варианты системы CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus pyogenes*, а также набор низкомолекулярных ингибиторов путей репарации ДЦР.

Расщепление ккзДНК ВГВ с помощью системы CRISPR/Cas9 с одним РНК-проводником лишь незначительно снижает пул ккзДНК: более 30% от общего количества ккзДНК остается в клетках через 3 недели после трансдукции CRISPR/Cas9, и 10% через 5 недель после трансдукции. В исследовании Seeger с соавт. при инфицировании клеток HepG2-NTCP, продуцирующих CRISPR/Cas9 под промотором tet-on, происходило образование очень частых мутаций в мишенях вирусной ДНК (SNP и небольшие вставки и делеции нуклеотидов), и только небольшая часть геномов ВГВ сохраняла свою исходную последовательность [173,391]. Следует отметить, что геномы ВГВ с целевыми мутациями могут избегать действия CRISPR/Cas9 и не подвергаются повторному расщеплению из-за ограниченной толерантности CRISPR/Cas к несоответствию нуклеотидов между ДНК-мишенью и РНК-проводником. Одиночные несовпадения в области мишени, вставки нуклеотидов или менее 6 несовпадений в дистальных областях РНК-проводника хорошо переносятся большинством систем CRISPR/Cas9 типа II, тогда как делеции и вставки нуклеотидов обычно блокируют активность систем CRISPR/Cas9. Таким образом, мутированная ккзДНК ВГВ (способная или не способная к репликации) может оставаться в клетках после нуклеолитического расщепления. Однако в исследовании Seeger с соавт. системы CRISPR/Cas9 экспрессируют до момента инфекции ВГВ, что невозможно представить в реальных условиях [173]. С другой стороны, при экспрессии CRISPR/Cas9 в уже зараженных ВГВ клетках, большая доля геномов ккзДНК оставались интактными. Учитывая очень высокую нуклеолитическую активность CRISPR/Cas9 в отношении входящих геномов ВГВ, причинами такого несоответствия в расщеплении ккзДНК могут быть то, что часть ккзДНК недоступна для белков Cas9 (например, эпигенетически

молчащая ккзДНК) или что ккзДНК расщепляется CRISPR/Cas9, но восстанавливается с помощью HR без целевого мутагенеза.

Хотя клетки млекопитающих обладают сложными механизмами восстановления поврежденной ДНК, предполагается, что ДЦР ДНК с тупыми концами (DSB) разрушаются или восстанавливаются двумя основными конкурирующими путями: подверженным ошибкам каноническим негомологичным соединением концов (NHEJ), или гомологичной рекомбинацией (HR). NHEJ является доминирующей формой репарации ДЦР ДНК в клетках человека. NHEJ активен во всех фазах клеточного цикла. С другой стороны, HR может функционировать только в поздние фазы S и G2 клеточного цикла. В каноническом пути NHEJ индукция ДЦР вызывает привлечение гетеродимер KU70/80 к концам поврежденной ДНК, и их взаимодействие с фактором DNA-PKcs на двух разорванных концах ДНК с образованием холофермента DNA-PK [391,471]. DNA-PK представляет собой каркасный белок, который соединяет разорванные концы вместе для их успешного процессирования и ре-лигирования. Вслед за этим, происходит резекция одноцепочечных выступающих концов и лигирование ДНК комплексом белков, состоящим из лигазы IV, XRCC4 и XLF13. Путь NHEJ является мутагенным, и завершается образованием вставок либо делеций нуклеотидов в сайте ДЦР [391,471].

Путь HR функционирует только при условии наличия гомологичной ДНК-матрицы, которая используется системой репарации для достройки разорванного участка, приводя к восстановлению исходной последовательности нуклеотидов ДНК [391,471]. В сравнении с NHEJ, регуляция HR является более сложным процессом. На первом этапе происходит распознавание концов ДНК комплексом белков MRE11-RAD50-NGS1, который обрезает концы и формирует 3'-выступы одноцепочечной ДНК. Белки RPA стабилизируют одноцепочечные концы ДНК и предотвращают формирование вторичных структур. Вслед за этим, белок RAD51 замещает RPA и формирует нуклеопротеиновые филаменты – они имеют решающее значение для поиска гомологичной матрицы и обмена цепями [391,471].

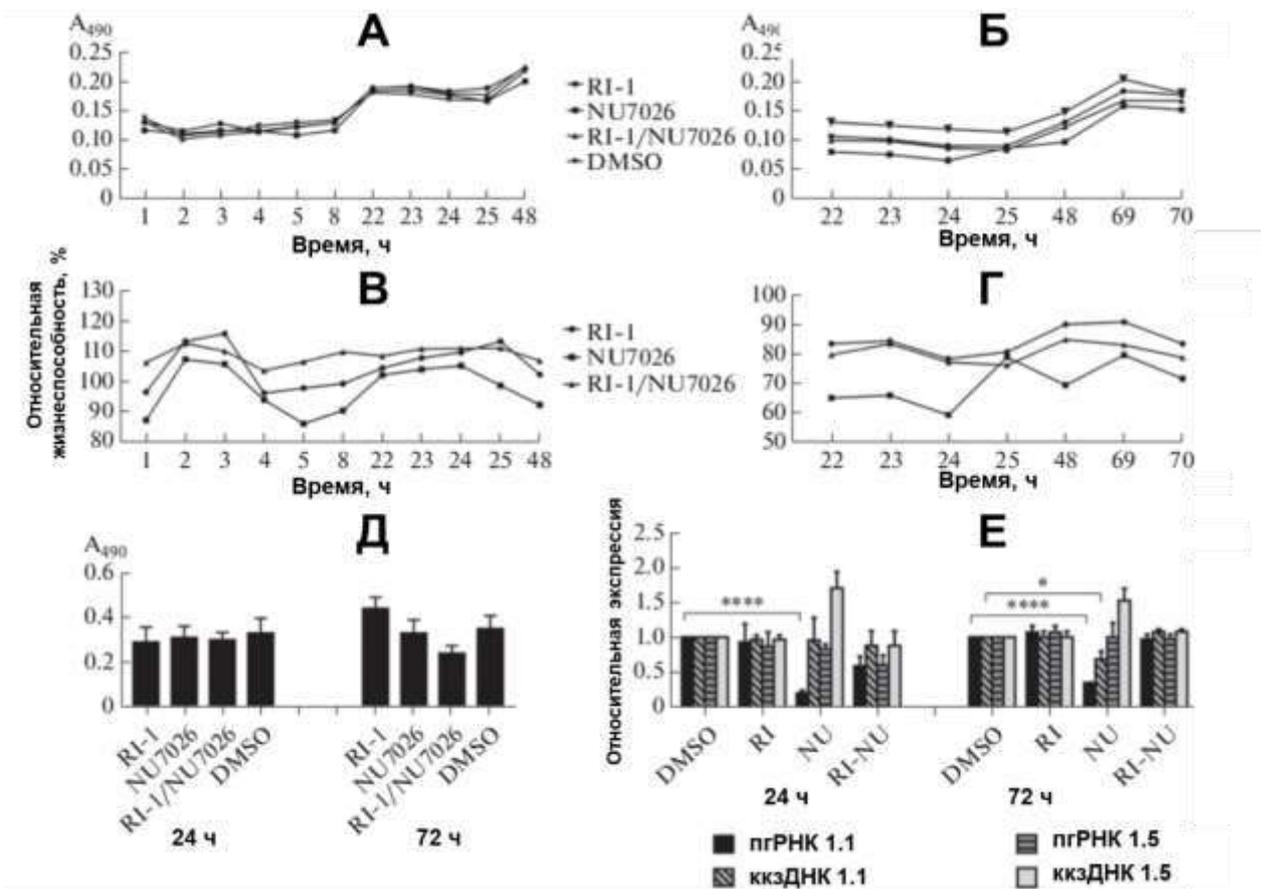
Хотя репарация HR в ккзДНК после расщепления CRISPR/Cas9 возможна, до настоящего времени она не подтверждена. Наиболее частыми исходами репарации является образование мутаций по типу вставок и делеций нуклеотидов (связанные с работой NHEJ), которые могут нарушать рамку считывания, образование одонуклеотидных полиморфизмов, либо разрушение ккзДНК.

В определенных обстоятельствах другие резервные пути, такие как микрогомологически опосредованное соединение концов (ММЕJ)/неканонический NHEJ или одноцепочечный отжиг (SSA), могут быть вовлечены в репарацию ДЦР [475].

Следовательно, пути NHEJ/HR участвуют в репарации ккзДНК, регулируют уровни образования и типы мутаций в результате нуклеолитического разрыва. Предположительно, изменение активности NHEJ/HR может вносить вклад в разрушение ккзДНК ВГВ в результате Cas9-индуцированного ДЦР. С целью изучения роли путей репарации ДЦР NHEJ/HR в исходах Cas9-индуцированных разрывов в геноме ВГВ, был использован ряд ингибиторов и энхансеров активности NHEJ/HR. На первом этапе были проведены исследования по изучению роли NU7026, необратимого ингибитора фактора DNA-ПКcs в пути NHEJ, и соединения RI-1, ингибитора сборки филаментных структур в пути HR, на активность CRISPR/Cas9. С этой целью проводили лентивирусную трансдукцию CRISPR/Cas9 в клетки с репликацией ВГВ. Клетки культивировали с ингибиторами NHEJ/HR по крайней мере за 1 сутки до лентивирусной трансдукции (Рисунок 27).

Выбранные концентрации RI-1 и NU7026, а также их комбинация не оказывали цитотоксического действия на клетки HepG2-1.1merВГВ. Этот факт был продемонстрирован тремя различными тестами, включая анализ клеточной пролиферации и анализ жизнеспособности клеток при инкубации с этими соединениями в течение 24 и 72 часов. Во все сроки исследуемые параметры достоверно не отличались от контрольных значений (Рисунок 27) [391].

Ранее было показано, что ВГВ использует сигнальные пути, активируемые двух- и одноцепочечными разрывами, для собственной репликации. Мы изучили токсичность, а также влияние ингибиторов DNA-ПКcs (NU7026) и RAD51 (RI-1) на уровень ккзДНК и экспрессию пгРНК на обеих клеточных линиях. Показано, что ингибиторы сами по себе либо в комбинации не оказывают цитотоксического действия на модели клеток 1.1 и 1.5 (Рисунок 27). В выбранных условиях RI-1 практически не влиял на инфекционный цикл ВГВ, тогда как NU7026 снижал экспрессию пгРНК в клетках HepG2-1.1merВГВ на 80% ( $p < 0,001$ ) через 24 ч и на 65% ( $p < 0,001$ ) через 72 ч. Обработка клеток HepG2-1.1merВГВ препаратом Nu7026 приводила к незначительному снижению уровня ккзДНК через 72 ч [391].



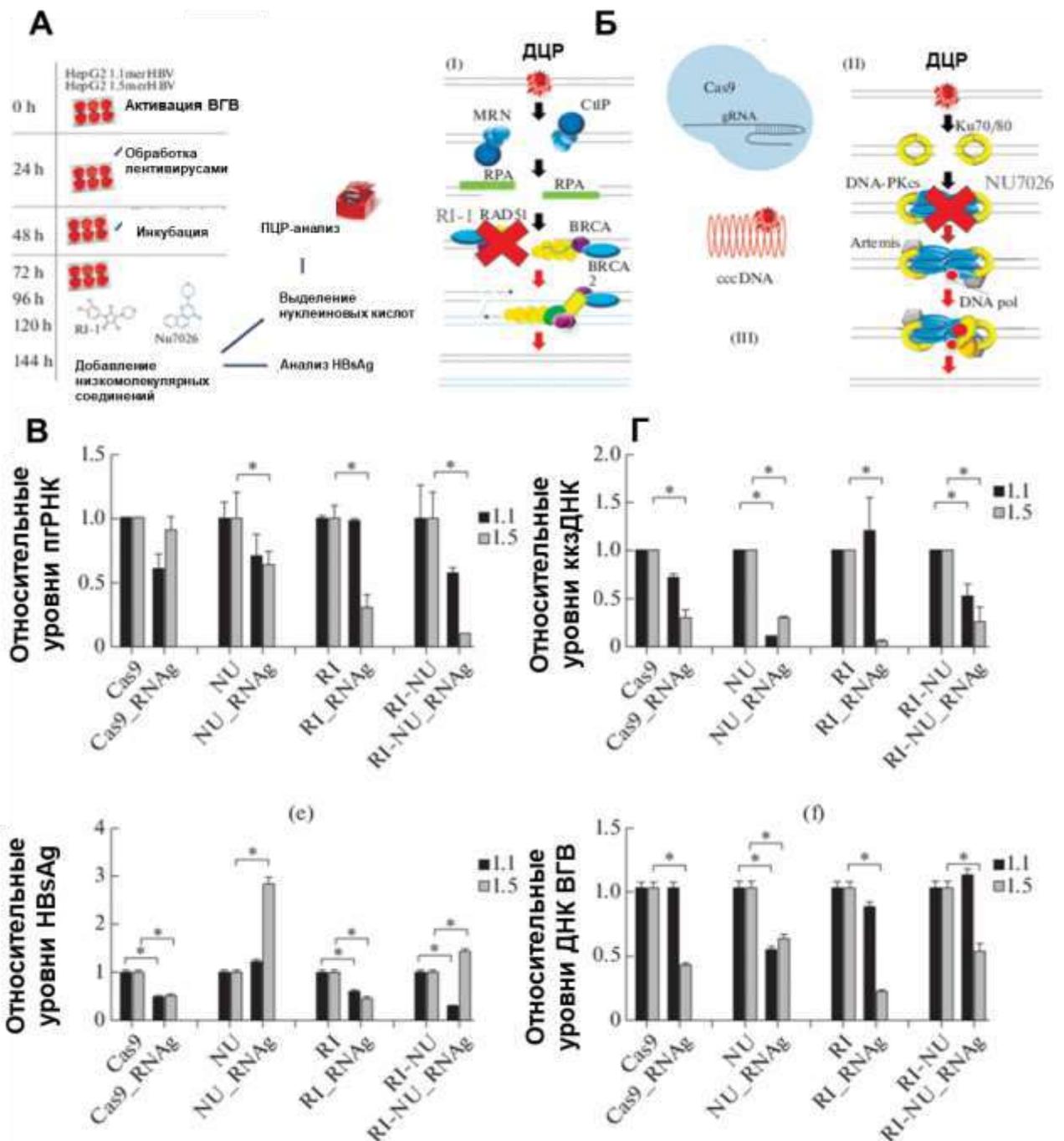
**Рисунок 27. Анализ цитотоксичности низкомолекулярных соединений RI-1 и NU7026 и их действия на репликацию ВГВ.** Пролиферация клеток HepG2-1.1merВГВ после обработки RI-1 (10 мкМ), NU7026 (20 мкМ) или их комбинацией (RI-1/NU7026 в концентрации 10 мкМ/20 мкМ) в течение 48 ч (А) и 72 ч (Б). Контрольные клетки обрабатывали ДМСО. Жизнеспособность клеток HepG2-1.1merВГВ относительно контрольного образца при обработке RI-1, NU7026 или RI-1/NU7026 в течение 24 ч (В) и 72 ч (Г). (Д) Пролиферация клеток HepG2-1.1merВГВ при обработке RI-1, NU7026 или RI-1/NU7026 в течение 24 и 72 часов. Контрольные клетки обрабатывали ДМСО. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. Различия считали достоверными при  $p < 0,05$ . (Е) Клетки HepG2-1.1merВГВ и HepG2-1.5merВГВ обрабатывали RI-1, NU7026 или RI-1/NU7026 в течение 24 и 72 часов. Репликацию ВГВ оценивали по экспрессии пгРНК и уровню ккзДНК. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0,05$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  [391].

Для анализа влияния исследуемых ингибиторов проводили лентивирусную трансдукцию CRISPR/Cas9 с обработкой клеток HepG2-1.1merВГВ и HepG2-1.5merВГВ соединениями RI-1 и NU7026 в выбранных концентрациях через 48 ч после трансдукции. Каждые сутки культуральную среду заменяли на свежую с теми же концентрациями ингибиторов. Инкубация происходила в течение трех дней с последующим анализом HBsAg в культуральной среде. Клетки промывали фосфатным буфером и лизировали с последующим анализом компонентов жизненного цикла ВГВ [391].

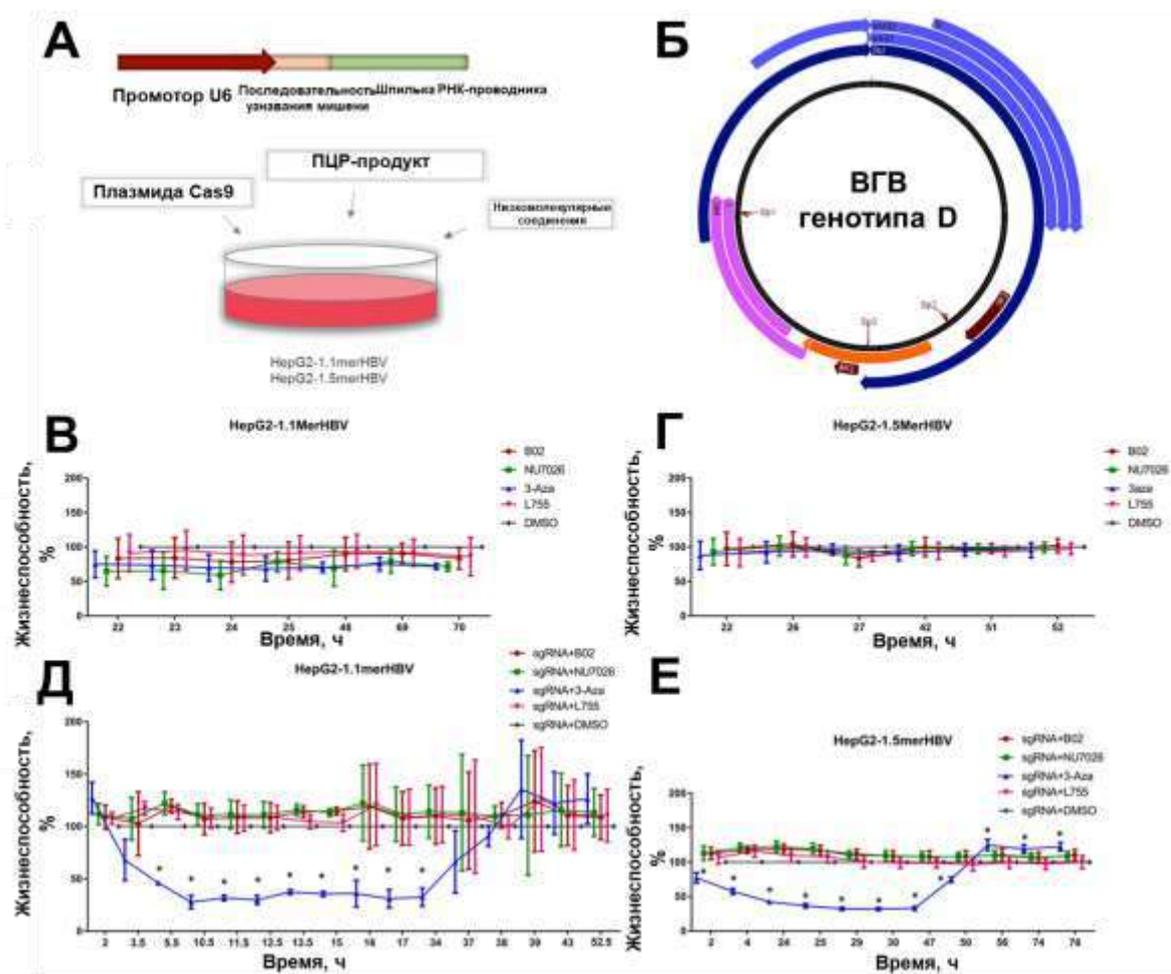
В условиях эксперимента лентивирусная трансдукция клеток линий клеток 1.1 и 1.5 снижала уровни всех изученных маркеров ВГВ. Обработка клеток 1.1 и 1.5 реагентом NU7026 значительно снижала уровни ккзДНК на 89% и 70%, соответственно (Рисунок 28). Более того, использование NU7026 в клетках 1,5 приводило к статистически значимому снижению пгРНК. Напротив, уровни HBsAg незначительно повышались (в 1,22 и 2,83 раза) при совместном действии CRISPR/Cas9 и NU7026 на клетках 1,1 и 1,5 соответственно. Обработка клеток 1.5 соединением RI-1 усиливала действие CRISPR/Cas9 на ккзДНК и пгРНК, уровень которых снижался на 94% и на 69%, соответственно. Следует отметить, что уровни пгРНК и HBsAg в клетках 1.1 практически не отличались от контроля с некодирующим РНК-проводником с ДМСО. Обработка клеток комбинацией ингибиторов RI-1/NU7026 приводила к неоднозначному эффекту. Экспрессия пгРНК снижалась на 42% и 89% в клетках 1,1 и 1,5; уровень ккзДНК снижался на 47 и 74 % соответственно, а содержание HBsAg снижалось на 70 % в клетках 1,1 и увеличилось в 1,43 раза в клетках 1.5 по сравнению с контрольными клетками. В целом, изменения уровней секретируемой ДНК ВГВ соответствовали влиянию CRISPR/Cas9 на уровни ккзДНК в тех же клетках.

Следовательно, при длительной продукции CRISPR/Cas9 в клетках с репликацией ВГВ, в целом, происходит увеличение противовирусной активности при блокаде NHEJ/HR [391].

Ранее в исследованиях были проведены скрининги тысяч химических соединений, в результате были обнаружены низкомолекулярные ингибиторы и активаторы путей NHEJ и HR. В работе Yu с соавт. [476], было показано, что L755507 (L755), частичный агонист  $\beta$ 3-адренергических рецепторов, усиливает активность HR и увеличивает эффективность редактирования генома с гомологичной ДНК-матрицей. Также было выявлено, что 3'-азидо-3'-дезокситимидин (3-аза), ингибитор обратной транскриптазы ВИЧ-1 первых поколений, усиливает активность пути NHEJ. Более того, ингибирование DNA-РКсс низкомолекулярными ингибиторами NU7441 и KU-0060648 резко снижало частоту NHEJ за счет увеличения частоты HR [471]. Помимо этого, было показано, что разрушение лигазы IV аденовирусным белком E1B (Ad4E1B) значительно увеличивает скорость HR за счет блокирования пути NHEJ. В наших работах использовали наиболее эффективные соединения из ранее опубликованных работ (низкомолекулярные ингибиторы L755, 3-аза, аналог NU7441 и KU-0060648 – NU7026, белок Ad4E1B), а также мощный ингибитор HR B02 [471].



**Рисунок 28. Влияние низкомолекулярных соединений RI-1 и NU7026 на противовирусную активность CRISPR/Cas9.** (А) Схема эксперимента (Б) Схематическое изображение механизмов действия RI-1 и NU7026 на пути репарации HR (I) и NHEJ (II) (В) Экспрессия пгРНК ВГВ после трансдукции клеток HerG2-1.1merВГВ (1.1) и HerG2-1.5merВГВ (1.5) лентивирусами с Cas9 и контрольным РНК-проводником и с Cas9 и целевым РНК-проводником с последующей обработкой NU7026, RI-1 или NU7026/RI-1. (Г) Уровень ккДНК (Д) Уровень секретируемого HBsAg (Е) Уровни секретируемой ДНК ВГВ. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0,05$  [391].



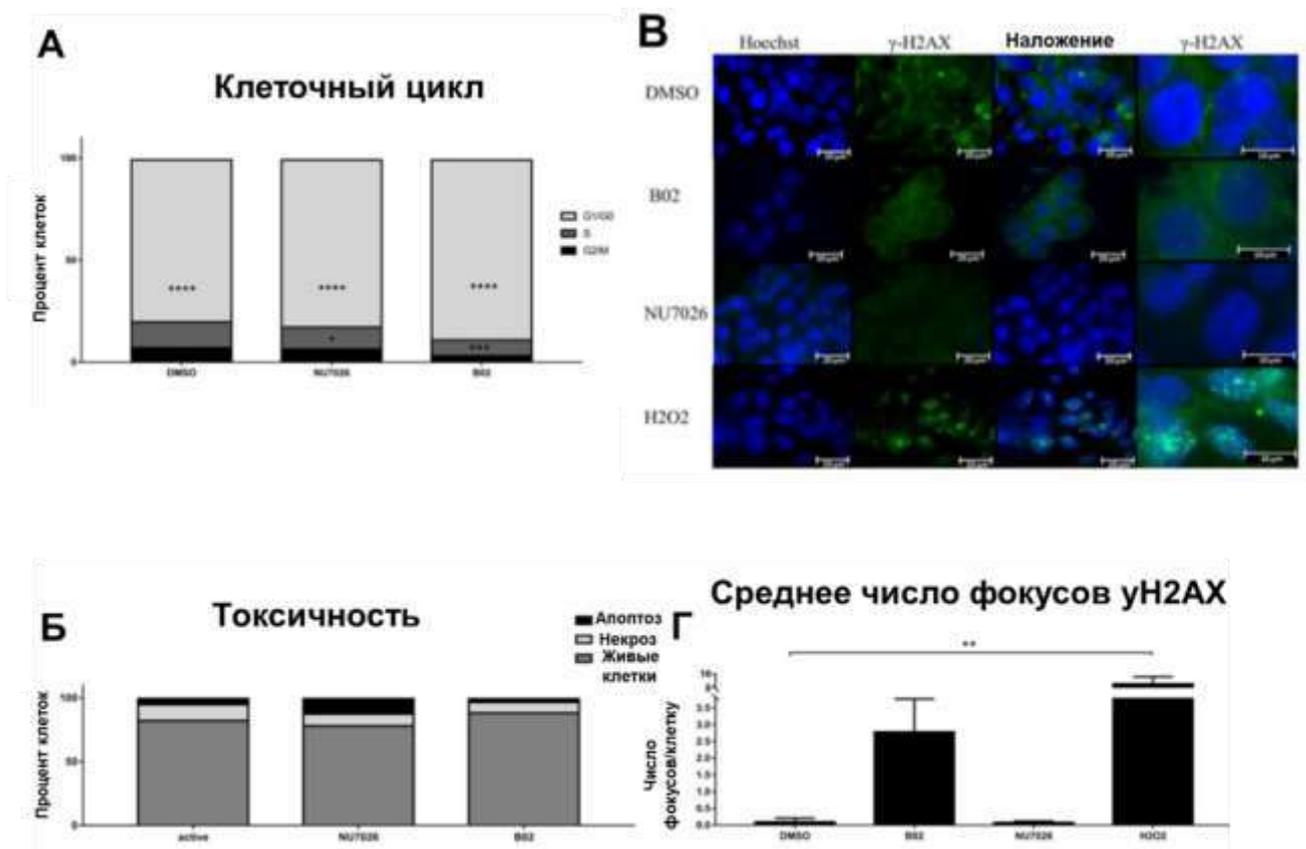
**Рисунок 29.** Анализ токсичности выбранных концентраций низкомолекулярных соединений с и без систем CRISPR/Cas9. (А) Схема эксперимента по трансфекции CRISPR/Cas9 системы и обработке клеток растворами низкомолекулярных соединений. (Б) Карта генома ВГВ с отмеченными РНК-проводниками. Влияние низкомолекулярных соединений на жизнеспособность клеток в клеточных линиях (В) HepG2–1.1merВГВ или (Г) HepG2–1.5merВГВ, обработанных растворами низкомолекулярных соединений в течение 72 часов и наблюдаемых в течение указанного периода времени. Влияние низкомолекулярных соединений на (Д) клетки HepG2–1.1merВГВ или (Е) клетки HepG2–1.5merВГВ через 3 дня после трансфекции CRISPR/Cas9 и обработки малыми молекулами. Звездочками отмечены статистически значимые различия. \* $p < 0.05$  [471].

Прежде чем анализировать влияние низкомолекулярных соединений на CRISPR/Cas9-опосредованную активность против ВГВ, был проведен анализ потенциальных цитотоксических и генотоксических эффектов. Концентрации соединений и продолжительность обработки были выбраны на основании опубликованных работ. Линии клеток с ВГВ рассаживали в 96-луночные планшеты и трансфицировали системами CRISPR/Cas9. Вслед за этим, проводили обработку клеток растворами низкомолекулярных соединений. В качестве контроля использовали обработку ДМСО, а также клетки, не

трансфицированные системой CRISPR/Cas9. В выбранных концентрациях ни одно из соединений не влияло на жизнеспособность клеток *per se* (Рисунок 29).

При трансфекции CRISPR/Cas9 значительное снижение жизнеспособности на обеих линиях клеток наблюдалось в течение первых 34-50 ч после трансфекции, при этом жизнеспособность возвращалась к значению контроля к конечным точкам эксперимента. Вероятно, токсическое действие 3-aza совместно с CRISPR/Cas9 связано с внецелевым действием CRISPR/Cas9 и индукцией токсических эффектов 3-aza в условиях многочисленных ДЦР. Известно, что 3-aza и L755 безопасны для использования на человеке, поэтому дальнейший, более детальный анализ токсичности, с этими соединениями не проводили. Для оценки действия ингибитора HR B02 и ингибитора NHEJ NU7026 на клетки проводили анализ влияния на клеточный цикл. Показано, что большая часть исследованных клеток (около 80%) была остановлена в фазе G1/G0, что характерна для инфекции ВГВ [477]. Обработка клеток растворами соединений NU7026 либо B02 снижала процент клеток в фазе S и G2/M (Рисунок 30). Возможную индукцию апоптоза соединениями NU7026 и B02 оценивали по методу морфологической оценки окрашивания клеточных ядер, который значимых отличий между экспериментальными группами не выявил. Генотоксичность анализировали с помощью иммуноцитохимического окрашивания на фосфорилированную форму гистона H2AX ( $\gamma$ H2AX). В то время как в контрольных клетках, обработанных DMSO, детектировались отдельные фокусы  $\gamma$ H2AX, инкубация с B02 вызывала образование небольших и редких фокусов  $\gamma$ H2AX (частота  $78 \pm 0,98$  на клетку), в то время как NU7026 не оказывал влияния на индукцию  $\gamma$ H2AX.

Инкубацию с H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, мощным генотоксическим соединением, в течение 1 ч использовали в качестве позитивного контроля (Рисунок 30) [471]. Следовательно, обработка B02 оказывает генотоксическое действие на геном клеток человека в выбранной концентрации.



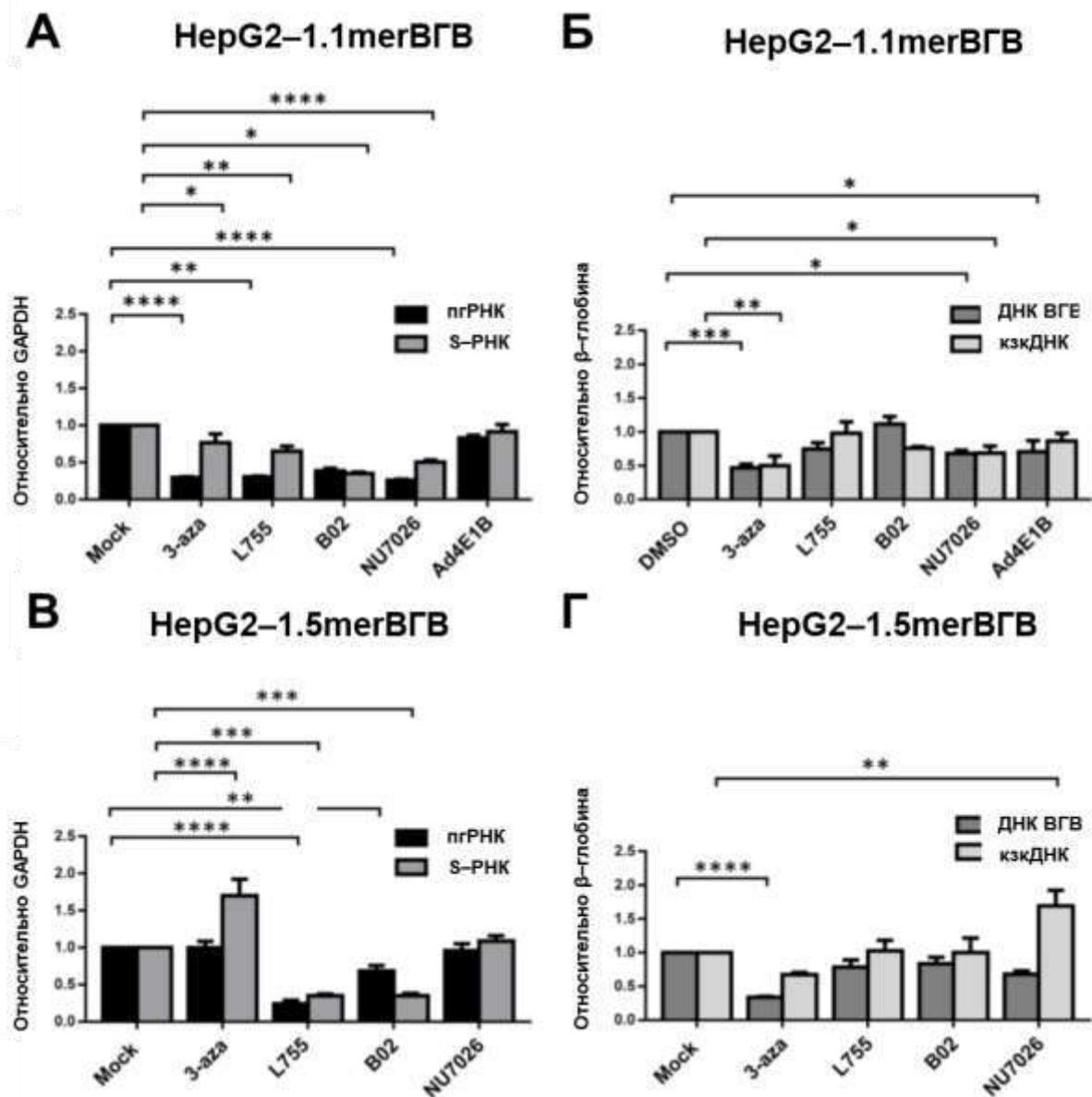
**Рисунок 30. Анализ влияния NU7026 и B02 на клеточный цикл, индукцию апоптоза и образование фокусов  $\gamma$ H2AX.** (А) Влияние NU7026 и B02 на клеточный цикл. Клетки HepG2–1.1merВГВ обрабатывали растворами низкомолекулярных соединений в течение 24 ч, затем инкубировали с красителем DRAQ5. Анализ клеточного цикла проводили с помощью проточной цитометрии. (Б) Влияние NU7026 и B02 индукцию апоптоза. Клетки обрабатывали растворами соединений NU7026, B02 либо контрольным ДМСО в течение 24 часов, затем фиксировали в параформальдегиде и окрашивали смесью пропидия йодида и красителя Hoechst33342. Процент апоптотических, некротических и живых клеток в каждой группе оценивали по двойному окрашиванию ядер. (В, Г) Генотоксическое действие соединений NU7026 и B02. Клетки HepG2–1.1merВГВ культивировали с растворами низкомолекулярных соединений в течение 24 ч, фиксировали и окрашивали антителами к  $\gamma$ H2AX. Обработку H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в течение 1 ч использовали в качестве положительного контроля. В анализе использовали не менее 100 клеток. Звездочками отмечены статистически значимые различия. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  [471].

Далее был проведён анализ влияния низкомолекулярных соединений на жизненный цикл ВГВ на клеточных линиях HepG2-1.1merВГВ и HepG2-1.5merВГВ (Рисунок 31). Уровни пгРНК и S-РНК ВГВ снижались на обеих клеточных линиях при обработке L755 или B02, при этом уровни ккзДНК ВГВ и ДНК ВГВ не изменялись под действием L755 и B02. Экспрессия белка Ad4E1В также не влияла на репликацию ВГВ. 3-aza снижал уровни всех изученных форм ВГВ, что может быть связано с общетоксическим действием.

Вместе с этим, использование NU7026 снижало транскрипцию ВГВ в >2 раза, тогда как уровни ккзДНК и ДНК ВГВ значимо не изменялись. Таким образом, использование низкомолекулярных соединений-модуляторов пути NHEJ/HR в целом нарушает репликацию ВГВ, однако эти эффекты не выражены, и отличаются в зависимости от клеточной линии [471].

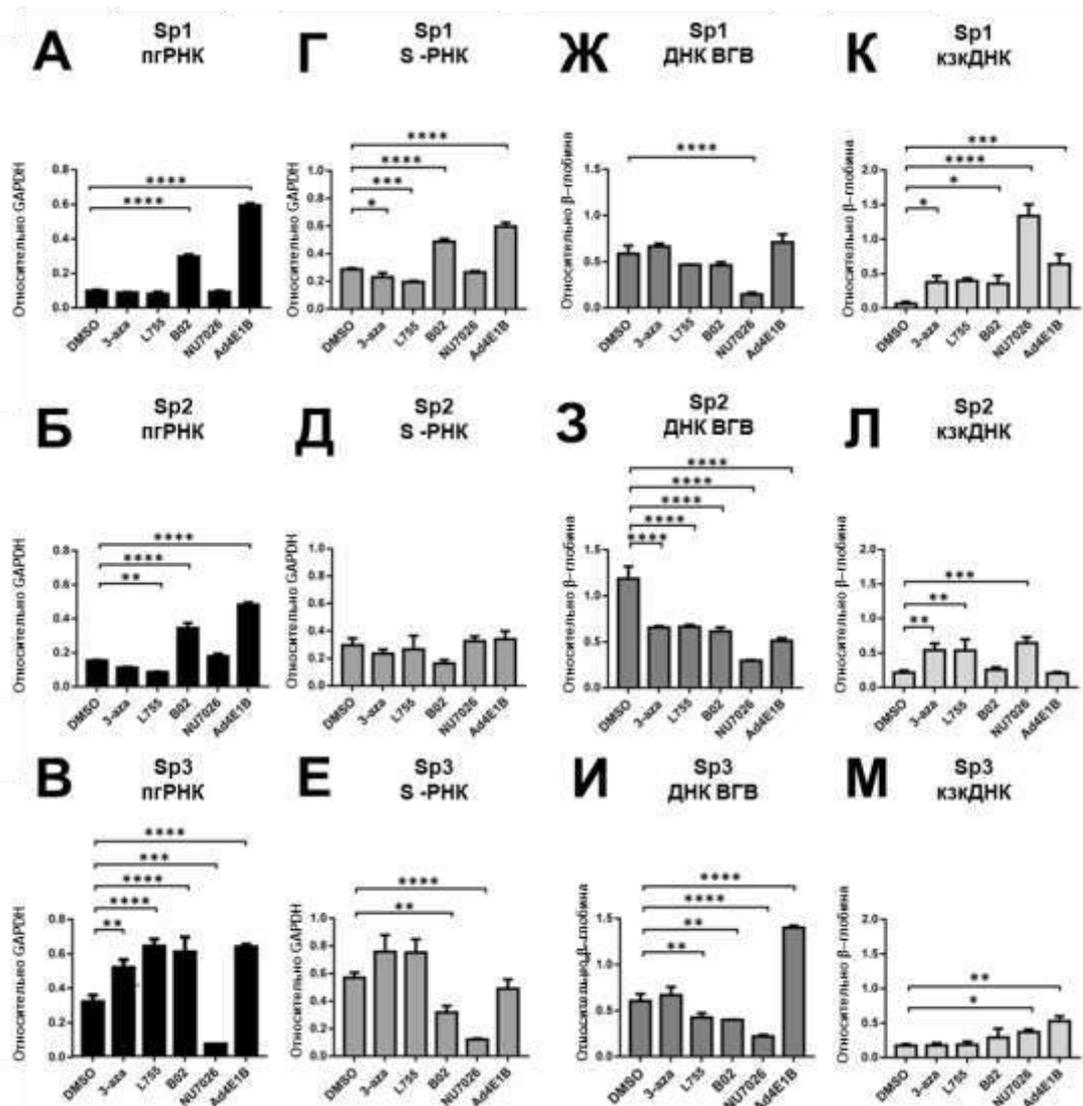
Трансфекция систем CRISPR/Cas9, нацеленных на ВГВ, в клетки HepG2-1.1merВГВ, приводила к значительному подавлению транскрипции ВГВ: уровни пгРНК снижались более, чем на 60–70%, наблюдалось двукратное снижение уровней S-РНК (Рисунок 31, 32). Наряду с выраженным подавлением транскрипции ВГВ, CRISPR/Cas9 значительно снижали уровни внутриклеточной ДНК ВГВ и ккзДНК. Таким образом, системы CRISPR/Cas9 оказались крайне эффективными при расщеплении эписомальной ккзДНК ВГВ и интегрированного генома ВГВ, который транскрибирует S-РНК независимо от системы Tet-on [471].

Обработка трансфицированных клеток соединениями 3-аза или L755 последовательно увеличивала или незначительно ингибировала CRISPR/Cas9-опосредованную анти-ВГВ-активность. Подавление активности HR с помощью B02 не оказывало влияния на противовирусную активность CRISPR/Cas9. Ко-экспрессия Ad4E1B, ингибирующего NHEJ, приводила к менее выраженному подавлению ВГВ, чем при действии только Cas9 [471]. Напротив, при добавлении NU7026, уровни внутриклеточной ДНК ВГВ резко снижались по сравнению с группой, обработанной ДМСО, увеличивая противовирусную эффективность в 2,85–3,97 раза (Рисунок 31, 32). Эффекты на транскрипцию были схожими между группами с ДМСО и с NU7026 [471]. Однако, относительные уровни ккзДНК ВГВ либо оставались на уровне контроля при использовании РНК-проводника Sp1, либо были значительно выше по сравнению с группой, обработанной ДМСО (Sp2 и Sp3). Подобно клеткам HepG2-1.1mer, обработка NU7026 CRISPR/Cas9-трансфицированных клеток HepG2-1.5merВГВ предотвращала разрушение ккзДНК ВГВ с помощью CRISPR/Cas9, тогда как уровни ДНК ВГВ были постоянно ниже при обработке NU7026. NU7026 не оказывал существенного влияния на уровни пгРНК и S-РНК ВГВ.



**Рисунок 31.** Изменение репликации ВГВ под действием ингибиторов и энхансеров NHEJ/HR. Оценка (А) транскрипции (уровни pgRNA и S-pRNA) и (Б) внутриклеточных уровней ккзДНК и ДНК ВГВ на клетках HepG2-1.1merВГВ и (В, Г) HepG2-1.5merВГВ, соответственно. Уровни вирусных РНК нормализовали на уровни мРНК GAPDH, уровни ДНК ВГВ и ккзДНК – относительно β-глобулина. Звездочками отмечены статистически значимые различия. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  [471].

Таким образом, среди всех протестированных ингибиторов и энхансеров NHEJ/HR, только соединение NU7026 значительно влияло на CRISPR/Cas9-опосредованную активность против ВГВ [471].



**Рисунок 32.** Влияние низкомолекулярных соединений и белка Ad4E1B на противовирусное действие CRISPR/Cas9 в клетках HepG2-1.1merBGB. (А–В) Действие низкомолекулярных соединений и CRISPR/Cas9 на уровни pgRNA, (Г–Е) S-мRNA, (Ж–И) внутриклеточной ДНК ВГВ и (К–М) ккзДНК в клетках HepG2-1.1merBGB, с одним из 3 РНК-проводников (Sp1, Sp2, Sp3). Звездочками отмечены статистически значимые различия. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  [471].

Далее была проведена амплификация и высокопроизводительное секвенирование коротких участков ккзДНК ВГВ, фланкирующих мишени CRISPR/Cas9 в ккзДНК ВГВ, с целью анализа исходов репарации ДЦР (Рисунок 33). В экспериментальных условиях мутации выше РАМ были обнаружены только в группе трансфекции Sp2; частота мутаций не отличалась от контрольной группы. Эти результаты не согласуются с наблюдаемым снижением промежуточных продуктов ВГВ и уровней транскрипции и могут быть вызваны предпочтительной деградацией ккзДНК. Среди всех протестированных низкомолекулярных соединений только NU7026 оказывал влияние на образование вставок и делеций нуклеотидов. Обработка клеток NU7026 привела к образованию многочисленных

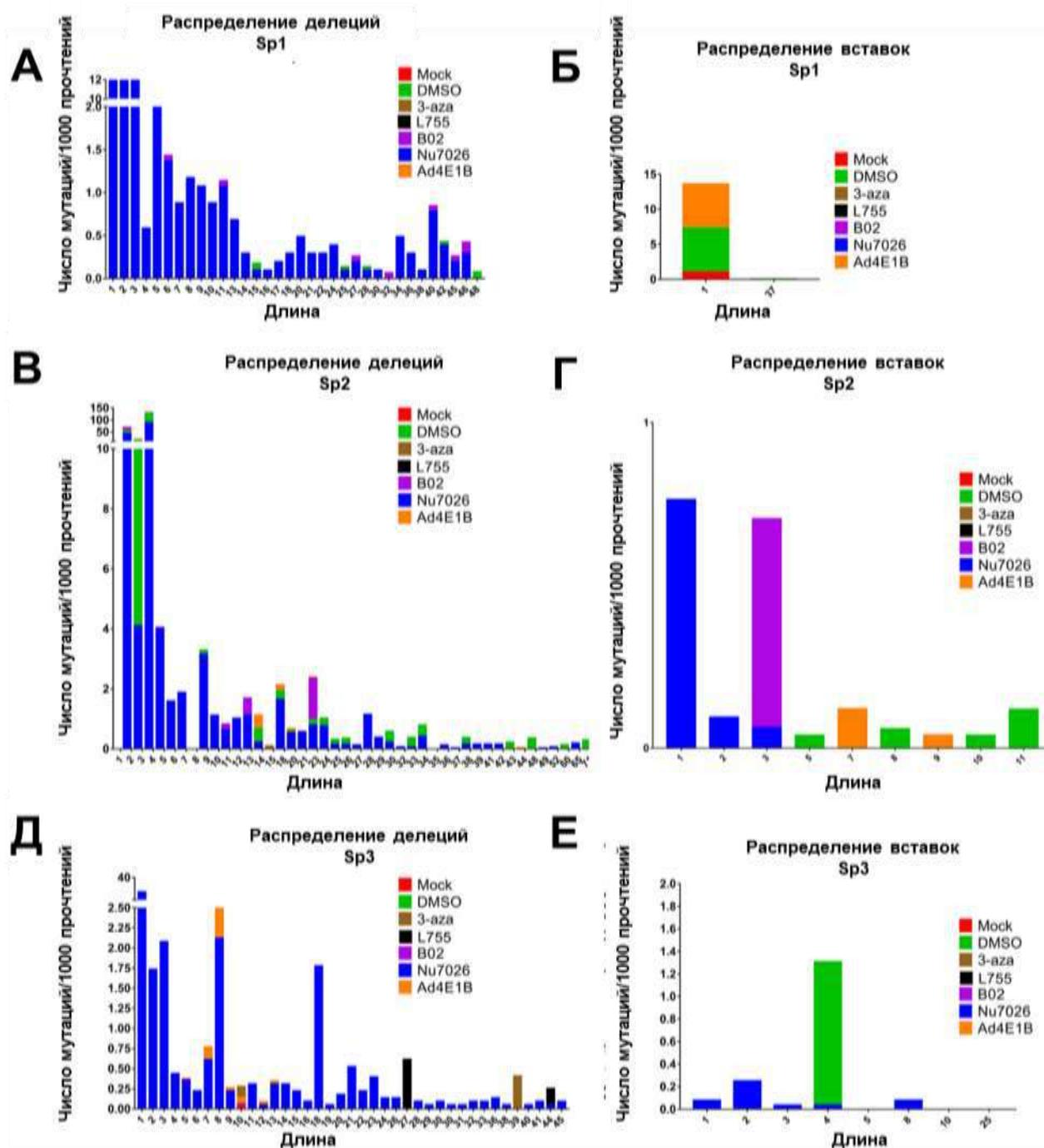
делений с типичным паттерном распределения вокруг сайта расщепления в 3-6 нуклеотидах от PAM. По сравнению с контрольными группами с ДМСО, NU7026 усиливал образование делеций при трансфекции CRISPR/Cas9 до 180–200 на 1000 прочтений (Рисунок 33).

Детальный анализ делеций нуклеотидов продемонстрировал, что при обработке NU7026 происходит образование частых и коротких делеций длиной до 60 нуклеотидов.

Модулирование путей NHEJ/HR с помощью ранее идентифицированных энхансеров низкомолекулярных соединений CRISPR/Cas9 не оказывает значительного влияния на противовирусную эффективность CRISPR/Cas9 [471]. NU7026, мощный ингибитор DNA-PKcs, является единственным из изученных соединений, который значительно усиливает противовирусную активность CRISPR/Cas9. Особенностью действия NU7026 на ккзДНК является предотвращение деградации нуклеолитически расщепленной ккзДНК [471]. Раствор соединения NU7026 можно использовать для оценки уровней деградации ккзДНК под действием CRISPR/Cas9 и, следовательно, дифференцировать снижение уровней ккзДНК, связанное со снижением вирусной репликации, и снижение, вызванное разрушением установленного пула ккзДНК.

Важно отметить, что эффекты NU7026 на уровни ккзДНК значительно отличались на моделях экспрессии CRISPR/Cas9 с лентивекторов и при трансфекции кодирующих плазмид. Как позднее выяснилось, это было связано с динамикой экспрессии CRISPR/Cas9 комплексов при различных вариантах их внесения в клетку, и уровнями продукции компонентов CRISPR/Cas9.

Стоит отметить, что вместе с гипермутацией ккзДНК после расщепления нуклеазами CRISPR/Cas9, низкомолекулярный ингибитор NU7026 также значительно увеличивал выраженность противовирусной действия нуклеаз по параметрам транскрипции, секреции HBsAg и уровням ДНК ВГВ [471]. Эти результаты были позднее независимо подтверждены группой ученых из Университета Осаки (Японии). Mugaï с соавт. на продвинутых моделях ВГВ инфекции показал, что подавление активности NHEJ при блокировании активности LIG4, важной для соединения концов ДНК в пути NHEJ, значительно усиливает противовирусную активность CRISPR/Cas9 [478].



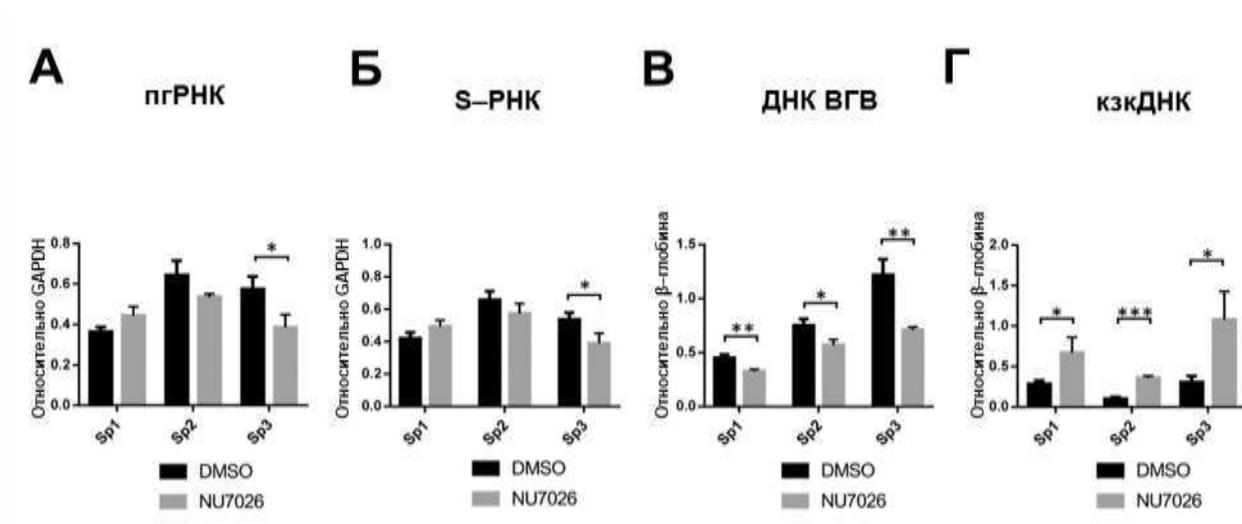
**Рисунок 33.** Распределение вставок и делеций нуклеотидов в геноме ВГВ при расщеплении CRISPR/Cas9. Анализ вставок (А, В, Д) /делеций (Б, Г, Е) после действия систем CRISPR/Cas9 совместно с низкомолекулярными соединениями. На рисунке представлены данные секвенирования нового поколения в сайтах–мишенях в геноме ВГВ РНК для РНК–проводников Sp1, Sp2, или Sp3 [471].

### 3.3. Исходом расщепления генома вируса гепатита В системами CRISPR/Cas9 является преимущественное разрушение ккзДНК вируса

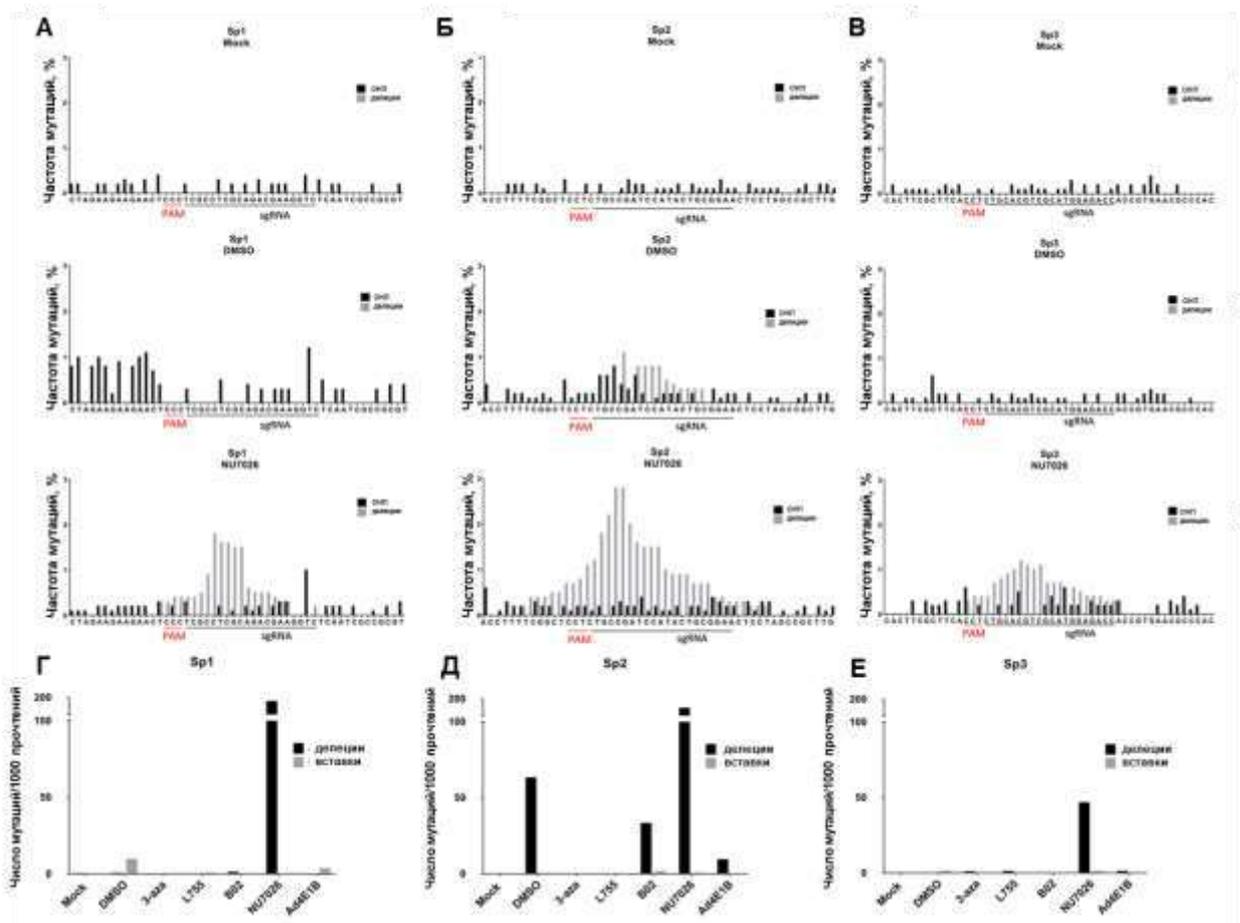
Пул ккзДНК ВГВ формируется на начальной стадии инфекции; количество молекул ккзДНК колеблется от 30–50 копий на клетку в инфицированных гепатоцитах и до <1–9

копий на клетку в линиях клеток гепатомы с предполагаемым периодом полужизни в 40 дней. ккзДНК не реплицируется по полуконсервативному механизму, поэтому при митозе клеток ккзДНК размывается или частично разрушается. Пул ккзДНК пополняется за счет рециркуляции ккзДНК обратно в ядро и ее конверсии в ккзДНК, а также в результате реинфекции. В неделящихся клетках ккзДНК может существовать неограниченно долго. Удаление ккзДНК из инфицированных клеток считается важным шагом на пути к излечению инфекции ВГВ. Seeger и Sohn заразили ВГВ клеточную линию, продуцирующую CRISPR/Cas9, и наблюдали редактирование 91% ккзДНК ВГВ. Однако часть (7%) вставок не сдвигала рамку считывания и не нарушала ккзДНК ВГВ. В других экспериментах использовались лентивирусные векторы и методы транзientной трансфекции ДНК. Из-за несоответствия между резким снижением промежуточных уровней ВГВ и низким уровнем делеций результаты этих экспериментов позволяют предположить, что ккзДНК ВГВ не только мутационно инактивируется CRISPR/Cas9, но и то, что значительная часть вирусных геномов разрушается после нуклеолитического расщепления. Было высказано предположение, что деградация ккзДНК ВГВ происходит не только при использовании нескольких РНК-проводников, нацеленных на ВГВ (мультиплексное нацеливание), но также и с одним РНК-проводником, поскольку даже один ДЦР, внесенный Cas9, может привести к разрушению вирусного генома. Однако, в то время деградация ккзДНК экспериментально не была продемонстрирована. В 2019 году мы впервые показали, что ккзДНК ВГВ действительно разрушается при расщеплении белком Cas9, и что использование низкомолекулярных ингибиторов пути NHEJ (NU7026) предотвращает деградацию ккзДНК ВГВ. В наших исследованиях трансфекция Cas9 с одним из трех РНК-проводников в клетки, продуцирующие ВГВ, заметно снижала уровни промежуточных продуктов ВГВ и ккзДНК, но секвенирование областей-мишеней продемонстрировало редкие делеции при использовании только одного РНК-проводника, что не объясняет резкого подавления репликации вируса. Обработка клеток NU7026 повышала противовирусные свойства CRISPR/Cas9, о чем свидетельствует более выраженное снижение уровней вирусной ДНК и РНК (50–90%), но ослабляла снижение уровней ккзДНК ВГВ (снижение на 70–90% в группах, трансфицированных Cas9 и обработанных ДМСО, по сравнению с 0–60% в группах, обработанных NU7026, трансфицированных Cas9) (Рисунок 34). При анализе уровней ккзДНК ВГВ в этих образцах и секвенировании целевых регионов, были обнаружены частые делеции в сайтах-мишенях (Рисунок 35). Из этого следует, что ккзДНК ВГВ, расщепленная Cas9 белком, более эффективно восстанавливается при ингибировании NHEJ. Анализ целевых мутаций показал, что ингибирование NHEJ сдвигает тип делеций с преимущественно 2-

нуклеотидных (> 90%) на редкие делеции от 3–70 нуклеотидов до более крупных, начиная от часто встречающихся 1–46 нуклеотидов и заканчивая менее распространенными крупными делециями (Рисунок 35-37). Был сделан вывод, что ккзДНК ВГВ преимущественно разрушается с помощью CRISPR/Cas9, а ингибирование NHEJ может предотвратить деградацию ккзДНК. Остается неясным, почему единственное расщепление в ккзДНК не восстанавливается после нуклеолитического расщепления, и почему ккзДНК ВГВ восстанавливается более эффективно, если NHEJ – основной путь, ответственный за восстановление DSB, инактивирован [471].



**Рисунок 34. Влияние NU7026 на противовирусную активность CRISPR/Cas9 в клетках HepG2–1.5merВГВ.** (А–Г) Различия в уровнях интермедиатов ВГВ после трансфекции CRISPR/Cas9 и обработки либо ДМСО, либо NU7026. Уровни пгРНК ВГВ и S–РНК измеряли относительно уровней мРНК GAPDH; ДНК ВГВ и ккзДНК измеряли относительно уровней β–глобина [471].



**Рисунок 35. Глубокое секвенирование целевых сайтов расщепления CRISPR/Cas9. (А–В) Частота мутаций и профили результатов репарации двуцепочечных разрывов в областях–мишенях кзкДНК ВГВ. Секвенировали участки, содержащие сайты–мишени, и рассчитывали частоты вставок/делеций для РНК–проводников Sp1 (Г), Sp2 (Д) и Sp3 (Е) в клетках, обработанных 3–аза, L755, B02 и Ad4E1B по сравнению с контрольной группой и контрольной группой с ДМСО. Количество вставок/делеций нуклеотидов на 1000 прочтений подсчитывали для всех экспериментальных групп с соответствующими РНК–проводниками [471].**

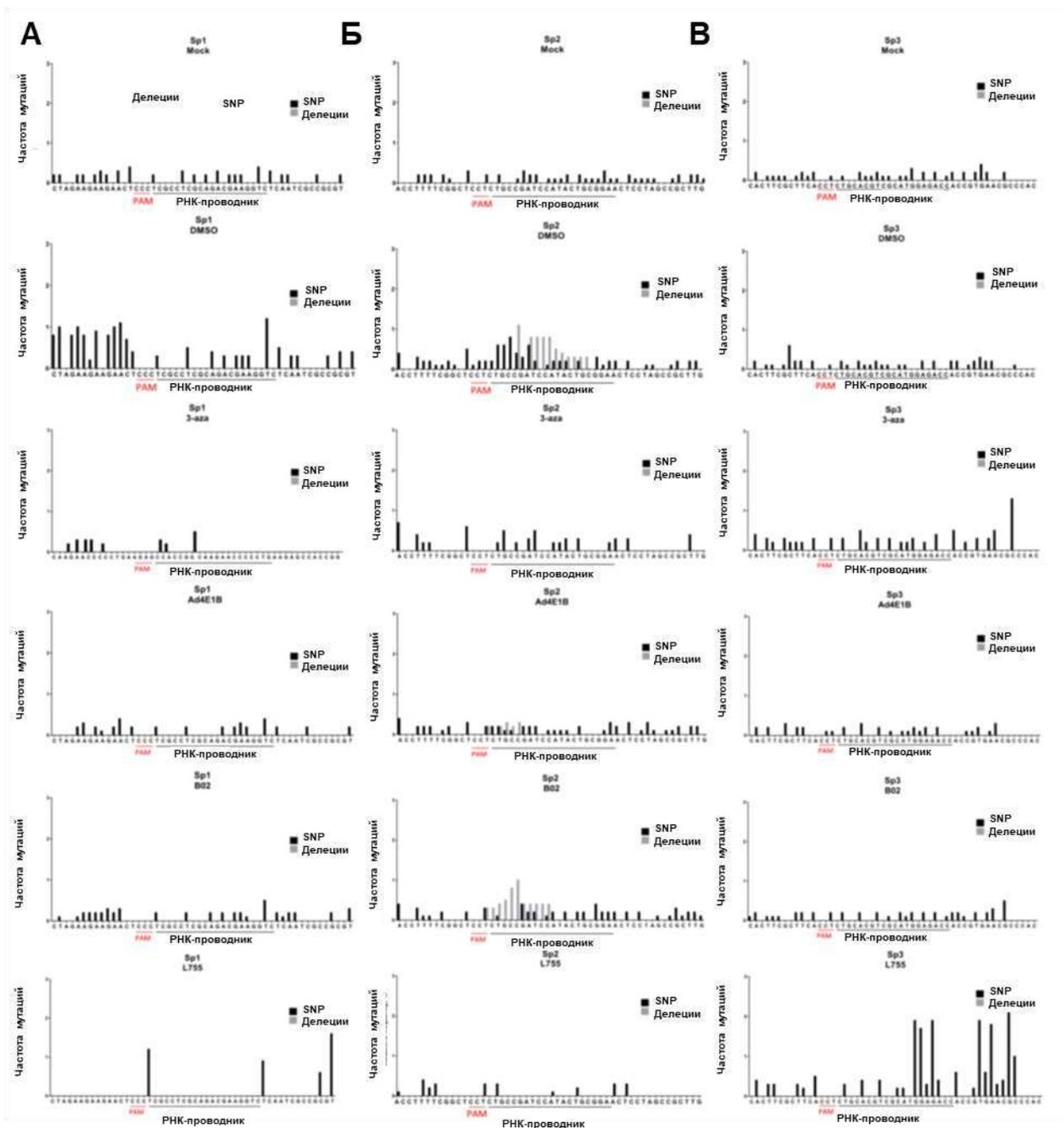
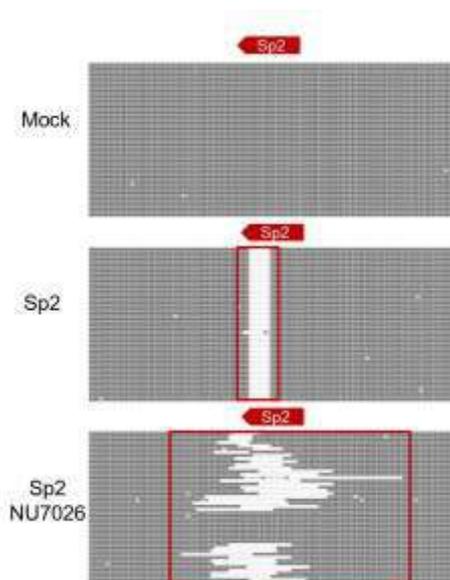


Рисунок 36. Распределение вставок и делеций в участках распознавания системами CRISPR/Cas9 [471].



**Рисунок 37. Пример результатов глубокого секвенирования участков распознавания CRISPR/Cas9 [471]. Mock – контрольный образец.**

### **3.4. Нарушение функционирования NHEJ индуцирует эффективную репарацию нуклеолитических разрывов в ккзДНК ВГВ с формированием сложного паттерна делеций**

Что вызывает деградацию ккзДНК или плазмидной ДНК ВГВ после одиночного ДЦР? Повреждения ДНК, вызванные Cas9, отличаются от канонических (физиологических или вызванных облучением) повреждений ДНК. Репарация ДЦР в геноме человека обычно занимает 1–3 ч и не вызывает мутаций, в то время как репарация Cas9-индуцированных ДЦР существенно медленнее (более 4–15 ч) и неточна, вызывая частые мутации по типу вставок и делеций нуклеотидов. Cas9, по-видимому, остается прочно связанным с одним или обоими концами ДНК после расщепления в течение 2 часов, предотвращая доступ факторов репарации к концам ДНК и приводя к более медленной ошибочной репарации [479]. Результаты репарации ДЦР также зависят от структуры поврежденной ДНК, локального окружения хроматина, прикрепления различных белков Cas к тупым концам и физиологии клеток. Пока неясно, какие из этих факторов играют важную роль в балансировании репарации и деградации ккзДНК, а какие факторы (вероятно, клеточные экзонуклеазы) разрушают расщепленную ккзДНК. Основным путем восстановления DSB является канонический NHEJ (c-NHEJ), который действует преимущественно в фазе G1, но эффективен на протяжении всего клеточного цикла. c-NHEJ приводит к небольшим вставкам в местах нуклеолитического расщепления. Первоначально c-NHEJ является основным путем, участвующим в репарации ДЦР, но через несколько часов, если повреждение не устраняется, начинается резервный путь соединения концов, опосредованный микрогомологией (MMEJ). MMEJ работает с меньшей частотой и с отсроченным началом репарации, формируя более крупные вставки в более поздние моменты времени. Факторы обоих путей не могут связаться с концами ДНК в большинстве

расщепленных ккзДНК, но причина этого еще не определена. Напротив, ингибирование DNA-PKcs, ключевой молекулы пути с-NHEJ, связывает белки MMEJ с ДЦР, вызывая более крупные и более вариабельные вставки. Мы предполагаем, что при избытии Cas9-индуцированных ДЦР нити ккзДНК не могут быть эффективно повторно лигированы с-NHEJ, а затем и MMEJ, возможно, из-за небольшого размера и своеобразной архитектуры мини-хромосом ВГВ и ограниченного доступа к повреждениям ДНК. При ингибировании с-NHEJ MMEJ выполняет репарацию с низкой точностью и воссоединяет расщепленные концы ккзДНК. Используя NU7026, можно приблизительно оценить процент ккзДНК, расщепленной специфическими нуклеазами в целевом сайте (Рисунок 38).

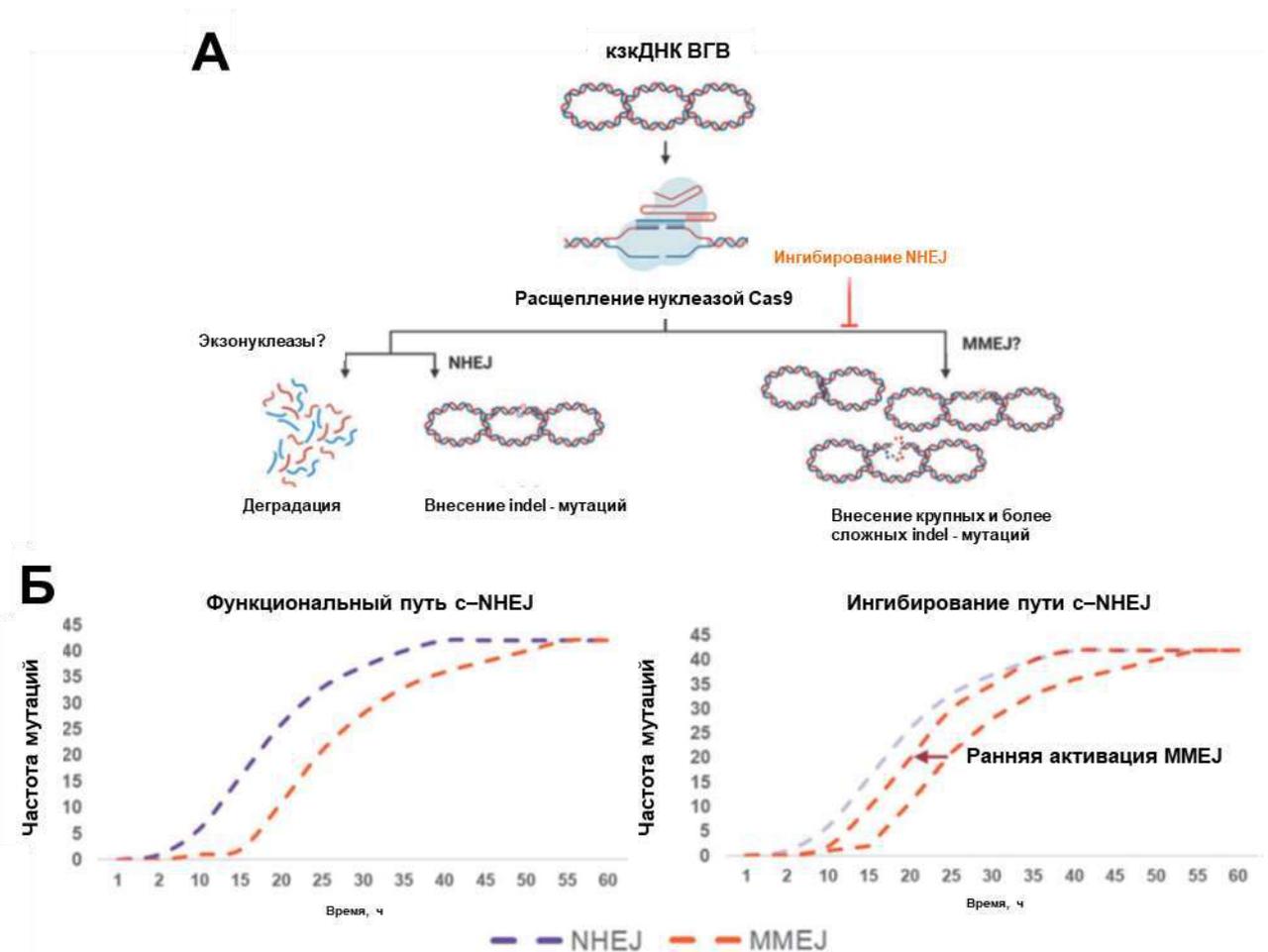
### 3.5 Влияние дозы и кинетики CRISPR/Cas9 на результаты расщепления ккзДНК ВГВ

Чем объясняются различия между процентом инсерций/делеций и скоростью деградации ккзДНК в опубликованных исследованиях? Одной из причин могут быть различия в дозировке и стехиометрии компонентов CRISPR/Cas9, доставляемых в клетки с помощью лентивирусных векторов, невирусных методов [РНК, рибонуклеопротеины (РНП)] и транзientной трансфекции ДНК. Действительно, кинетика экспрессии Cas9/РНК-проводника и профили вставок/делеций нуклеотидов сильно зависят от способа доставки (Рисунок 39). Клеточные линии гепатомы HepG2 bF4, несущие геномы ВГВ, распространенные модели репликации ВГВ, трудно трансфицировать. Таким образом, большинство ранних исследований основывались на лентивирусной доставке CRISPR/Cas9, что приводило к экспрессии CRISPR/Cas9 в >80% трансформированных клеток, которые впоследствии были подвержены селекции с соответствующими антибиотиками. В экспериментальных условиях интеграция лентивирусов является полезным инструментом для эффективной внутриклеточной доставки и долгосрочного производства CRISPR/Cas9. Однако, интегрирующиеся лентивирусы непригодны для терапевтического применения и связаны с инсерционным мутагенезом. Напротив, неинтегрирующиеся лентивирусные векторы не обладают инсерционным мутагенезом и демонстрируют низкую иммуногенность, большую емкость упаковки и временную экспрессию трансгенов, что делает их перспективными носителями для доставки CRISPR/Cas9 *in vivo*. Когда лентивирусы трансдуцируются в инфицированные клетки, уровни Cas9 и РНК-проводник постепенно увеличиваются, обычно достигая пика через 5–6 дней после трансдукции. Множественность инфекции также влияет на внутриклеточные уровни компонентов CRISPR/Cas9. Таким образом, при использовании лентивирусных векторов компоненты CRISPR/Cas9 постепенно продуцируются в инфицированных клетках и приводят к увеличению количества событий редактирования генов без

деградации ккзДНК или с ее низкой деградацией. длительное производство (более 14-36 дней) Cas9/РНК-проводника лентивирусными векторами приводит к мутациям в 70-98% вирусной ккзДНК и >90-98% снижению количества вирусных промежуточных продуктов. Напротив, временная трансфекция ДНК генерирует только 1–15% соответствующих целевых мутаций с аналогичной противовирусной эффективностью. В свою очередь, невирусная доставка Cas9/РНК-проводник в виде мРНК/РНК-проводника или, особенно, РНП приводит к кинетике, подобной взрыву, с немедленным быстрым распознаванием и расщеплением доступных мишеней. Более высокие локальные концентрации приводят к более эффективному нуклеолитическому действию комплексов Cas9/РНК-проводник. Цзян и др. вводили мРНК/РНК-проводник Cas9, загруженные в липосомальные наночастицы, мышам и наблюдали быстрое снижение параметров ВГВ (50–70%) на следующий день после инъекции. Однако, это исследование не позволяет определить процент деградации ккзДНК ВГВ. Влияние доставки РНП CRISPR/Cas9 на мутационную инактивацию и деградацию ккзДНК ВГВ в основном неизвестно. Потенциально РНП Cas9/РНК-проводник могут разрушить большую часть ккзДНК ВГВ из-за высоких доз и взрывоподобной кинетики с минимальной нецелевой активностью, но это необходимо определить экспериментально. В совокупности, мы предлагаем модель результатов расщепления ккзДНК ВГВ, основанную на типе доставки CRISPR/Cas9, дозировке и кинетике.

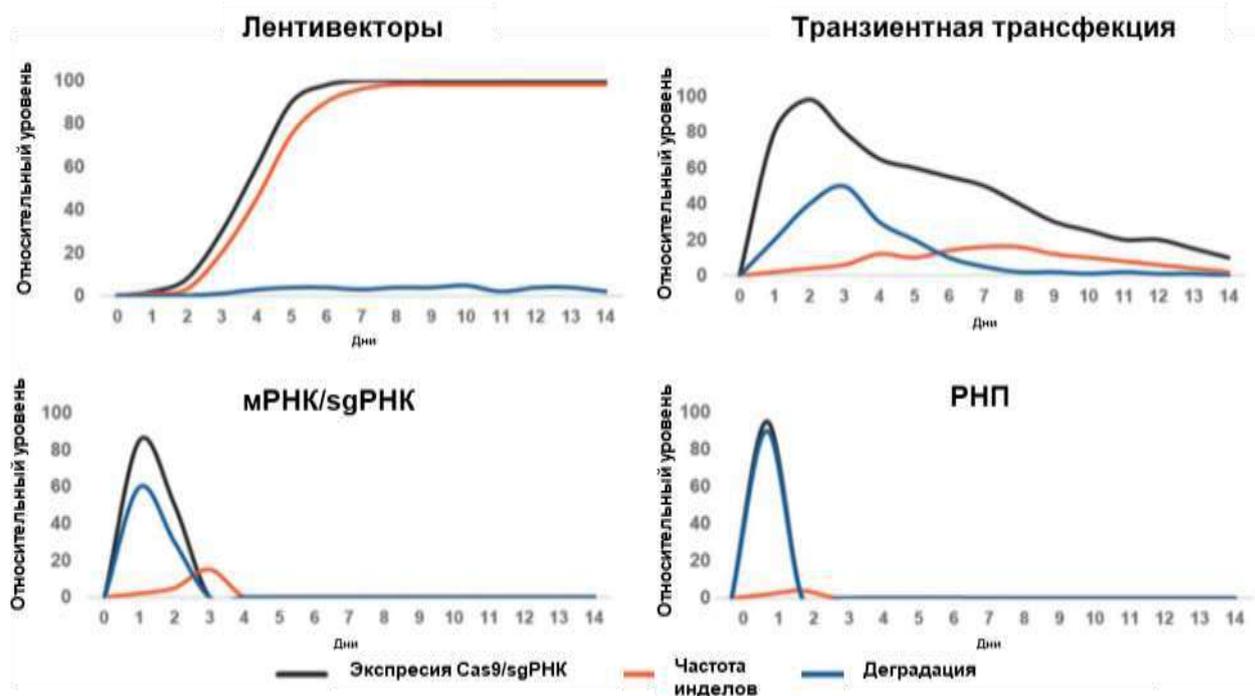
Исходы расщепления ккзДНК ВГВ системой CRISPR/Cas9 в настоящее время не установлены. В ранних исследованиях наблюдалась как мутационная инактивация, так и деградация ккзДНК ВГВ. Позднее, нашим коллективом было выявлено, что ккзДНК ВГВ в основном разрушается при действии CRISPR-Cas9. При использовании короткоживущих РНП CRISPR/Cas9 >98% целевой ккзДНК подвергается деградации. Напротив, Martinez с соавт. недавно утверждали, что при нацеливании CRISPR/Cas с помощью двух РНК-проводников, ккзДНК ВГВ довольно склонна к образованию новых эписомных, транскрипционно активных вариантов ккзДНК [481].

Авторы объясняют это несоответствие нефизиологическими уровнями ккзДНК ВГВ в некоторых ранее использовавшихся системах *in vitro*, которые могут находиться за пределами возможностей репарации путей репарации ДНК. Однако, ккзДНК ВГВ ранее изучалась в инфекционных системах.



**Рисунок 38. Результаты расщепления ккзДНК ВГВ системами CRISPR/Cas9 в стандартных условиях и в условиях модуляции путей репарации. (А) Схематическое изображение результатов восстановления ккзДНК ВГВ. В стандартных условиях расщепление ккзДНК ВГВ приводит к образованию небольших indel-мутаций и замен в результате активации пути репарации NHEJ. Часть ккзДНК ВГВ разрушается после расщепления Cas9, возможно, из-за активности клеточных экзонуклеаз. При ингибировании с-NHEJ ккзДНК ВГВ менее склонна к деградации, но репарация проходит с помощью более мутагенного пути репарации (потенциально, MMEJ). (Б) Взаимодействие между с-NHEJ и MMEJ в естественных условиях и в условиях ингибирования пути с-NHEJ [480].**

Более того, перегрузка систем репарации ДНК маловероятна, поскольку возможности механизмов репарации ДНК очень высоки; сотни ДЦР на клетку восстанавливаются при индуцировании облучением, лазерными лучами или химической обработкой. Для понимания феномена деградации ДНК даже при однократном нуклеолитическом расщеплении важно отметить кинетику репарации Cas9-индуцированных ДЦР [482].



**Рисунок 39.** Влияние кинетики комплексов Cas9/РНК–проводник на исходы репарации ккзДНК ВГВ [480].

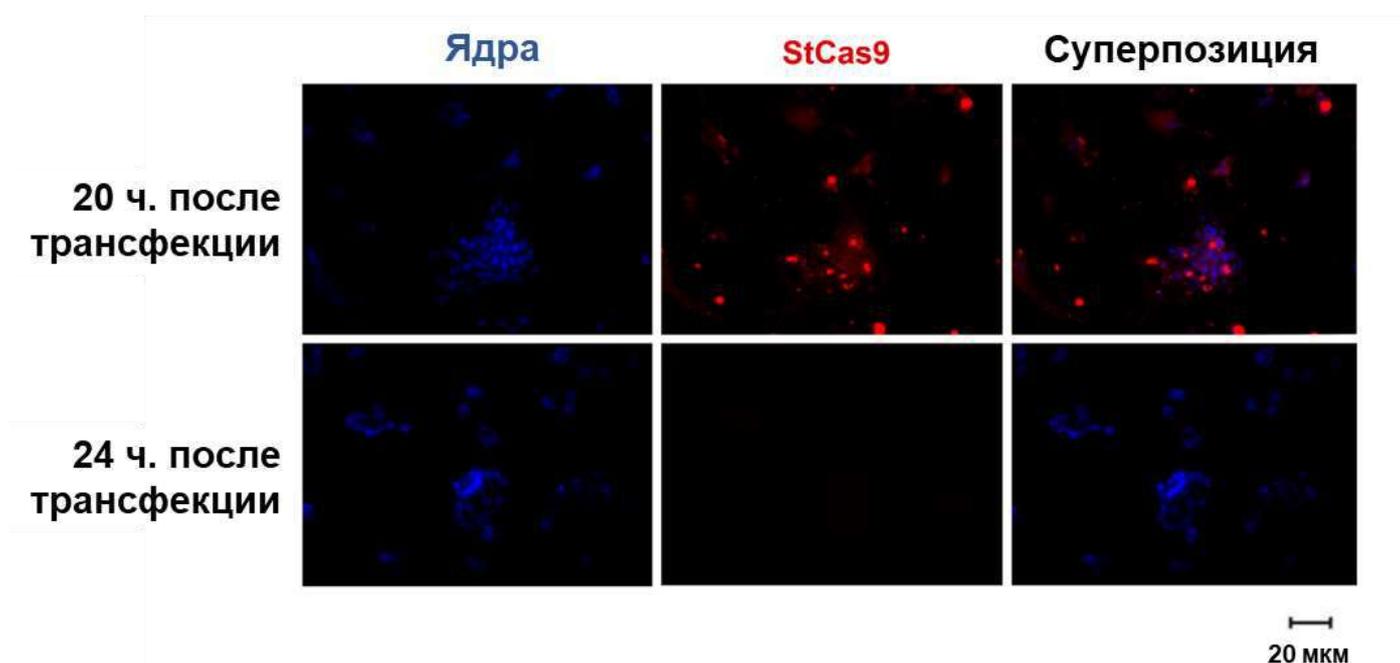
В отличие от физиологических ДЦР, факторы ответа на повреждение ДНК не привлекаются непосредственно к Cas9-индуцированным ДЦР, поскольку Cas9 остается прочно связанным с одним или обоими концами ДНК. Это приводит к более медленной и более ошибочной репарации, и может привести к потере геномных сайтов, образованию больших делеций либо, когда мишень мала (например, ккзДНК ВГВ), потенциально может привести к ее деградации под действием клеточных нуклеаз. Другим объяснением может быть то, что доза, тип системы CRISPR/Cas9 и сайт-мишень, структура поврежденного и локального хроматина и тип клеток сами по себе могут потенциально влиять на результаты расщепления ккзДНК ВГВ, можно предположить, что исходы расщепления ккзДНК ВГВ могут контролироваться различными дозами комплексов редактирования генов [482].

#### **Глава 4. Ре-импорт кольцевой частично-двухцепочечной ДНК (кчдДНК) ВГВ обеспечивает персистенцию вируса и хронизацию инфекции**

##### **4.1. Короткоживущие рибонуклеопротеиновые комплексы удаляют кольцевую ковалентно замкнутую ДНК вируса гепатита В при однократном использовании**

РНП CRISPR/Cas9 быстро редактируют ДНК-мишень вскоре после доставки. Менее чем через 24 часа после доставки, РНП в значительной степени разрушаются эндогенными нуклеазами и протеазами и больше не функционируют. Ограниченное время жизни и взрывообразная кинетика РНП приводят к очень высокой активности в отношении мишени и заметному снижению мутагенеза вне мишени. Мы использовали ВГВ-специфические

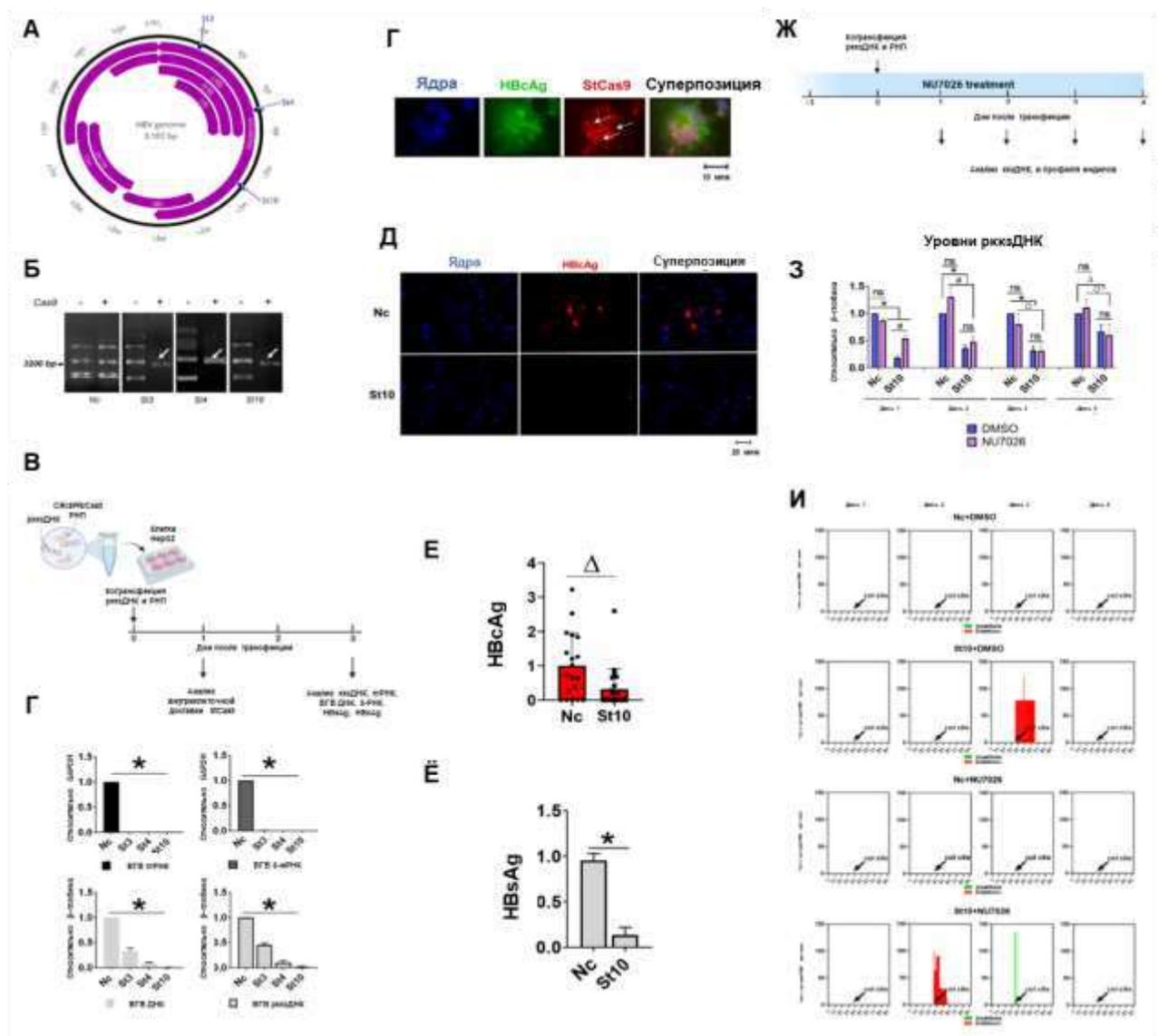
одиночные направляющие РНК (РНК-проводники) (St3, St4 или St10) и провели биохимический анализ расщепления *in vitro* с рекомбинантной ккзДНК (рккзДНК). Используя любой из трех РНК-проводников, StCas9 эффективно расщеплял рккзДНК ВГВ, о чем свидетельствует образование одиночной полосы на гель-электрофорезе, соответствующей линейной рккзДНК. При трансфекции рккзДНК ВГВ в клетки HepG2, РНП снижали уровни вирусной транскрипции ВГВ (уровни прегеномной РНК [pgRNA] и S-мРНК) и репликации (снижение уровней ДНК ВГВ и рккзДНК). РНК-проводник St3 был наименее эффективным, вызывая снижение уровней рккзДНК примерно на 50%, в то время как St10 демонстрировал самую высокую противовирусную активность с падением уровня рккзДНК более чем на 98% [482]. Успешная внутриядерная доставка StCas9 была подтверждена иммуноцитохимическим методом через 20 ч после трансфекции (Рисунок 40). Нуклеофицированный StCas9 распадался и не детектировался через 24 часа после трансфекции. Вслед за этим, было продемонстрировано, что РНП StCas9/St10 вызывали снижение либо полностью удаляли ядерный антиген гепатита В (HBcAg) и поверхностный антиген (HBsAg) (Рисунок 41) [482].



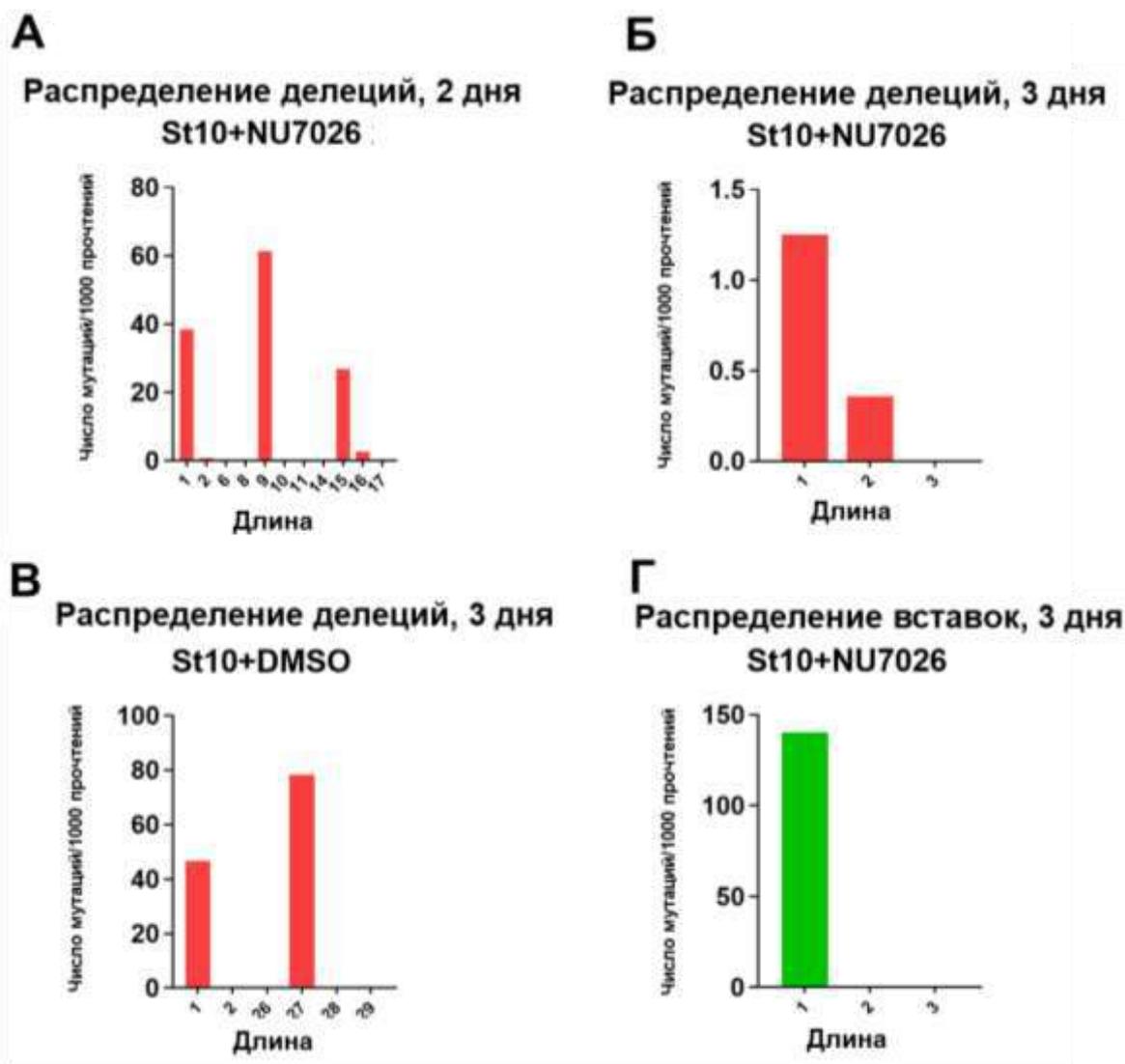
**Рисунок 40. Деградация белка StCas9 через 24 часа после трансфекции в клетках HepG2.** РНП StCas9, нацеленные на рккзДНК ВГВ, конуклеофицировали в клетки HepG2 и анализировали с помощью иммуноцитохимического анализа через 20 и 24 часа после трансфекции. Клетки HepG2 окрашивали на белок StCas9–His с использованием анти–His–антител (красные); ядра клеток окрашивали красителем Hoechst33342 (синий) [482].

После расщепления CRISPR/Cas9 системами, ркккДНК ВГВ может либо восстанавливаться путем негомولوجичного соединения концов (NHEJ), либо по

альтернативным путем с образованием мутаций со сдвигом или без сдвига рамки считывания, либо подвергаться нуклеолитической деградации. Как мы показали в ранних работах, ингибитор NHEJ NU7026 препятствует деградации рккзДНК ВГВ и может использоваться для оценки скорости деградации рккзДНК. Чтобы определить результаты расщепления рккзДНК ВГВ после обработки РНП CRISPR-Cas9, проводили эксперименты с NU7026 и без него и анализировали мутации в ккзДНК в разные моменты времени (Рисунок 41). В клетках HepG2, трансфицированных StCas9/St10 РНП и обработанных только ДМСО, количество ркккДНК ВГВ было снижено более чем на 90% с последующим устойчивым увеличением количества ркккДНК ВГВ на 4-й день после трансфекции. Обработка клеток, трансфицированных РНП, с помощью NU7026 значительно ослабляла снижение ркккДНК ВГВ на 1-й день после трансфекции, что согласуется с нашими предыдущими наблюдениями о том, что NU7026 предотвращает деградацию ккзДНК ВГВ. Таким образом, мы обнаружили различную кинетику восстановления рккзДНК ВГВ в нормальных и измененных (обработанных NU7026) условиях. Большая часть рккДНК ВГВ подвергалась быстрому разрушению. Оставшиеся кккДНК ВГВ подвергались интенсивному редактированию с образованием делеций разного размера (Рисунок 42). Вставки нуклеотидов отсутствовали или были крайне редки. Напротив, высокая частота делеций была обнаружена уже через 2 дня после трансфекции в месте нуклеолитического расщепления при использовании NU7026 с последующим переключением на частые вставки на мишени на 3-й день после трансфекции. Вставки и делеции нуклеотидов не детектировались в группе St10 + NU7026 через 4 дня после трансфекции. Это согласуется с эффектами ингибиторов NHEJ на кинетику репарации ДЦР, которые изменяют результат расщепления ДНК и приводят к более быстрой репарации ДЦР альтернативными путями [482].

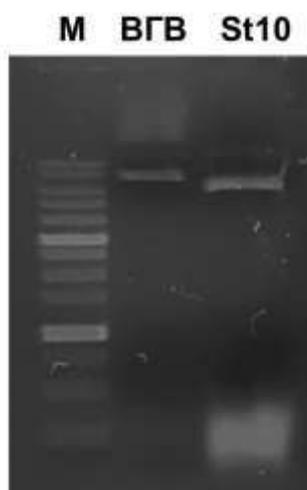


**Рисунок 41. Действие РНП CRISPR/Cas9 на ВГВ.** (А) Мишени РНК–проводников в геноме ВГВ. (Б) Анализ расщепления рккзДНК ВГВ *in vitro* с помощью РНП комплексов. (В) Схема трансфекции РНП CRISPR–Cas9. (Г) Противовирусная активность CRISPR–Cas9. Измеряли уровни пгРНК и S–мРНК ВГВ, ДНК ВГВ и рккзДНК. (Д) Эффективность доставки белка StCas9. HBcAg (зеленый) и белок StCas9 (красный); ядра клеток окрашивали красителем Hoechst 33342 (синий) (Е) Анализ экспрессии HBcAg, (Ж и З) количества (И) HBcAg–позитивных клеток и (К) секреции HBsAg. (Л) Схема эксперимента по обработке NU7026. (М) ПЦР–анализ уровней ккзДНК ВГВ с обработкой NU7026 и без нее (Н) Уровень инделов в ккзДНК.  $op < 0,05$ ,  $Дp < 0,01$ ,  $#p < 0,001$ ,  $*p < 0,0001$ ; нс, нет статистической значимости [482].



**Рисунок 42.** Характеристика целевых мутаций в ккзДНК после действия StCas9/St10. (А) Распределение делеций по длине через 2 дня после трансфекции в изоляте St10+NU7026. (Б) Распределение делеций (вверху) и вставок (внизу) через 3 дня после трансфекции в изоляте St10+NU7026. (В) Распределение делеций через 3 дня после трансфекции в изоляте St10+DMSO [482].

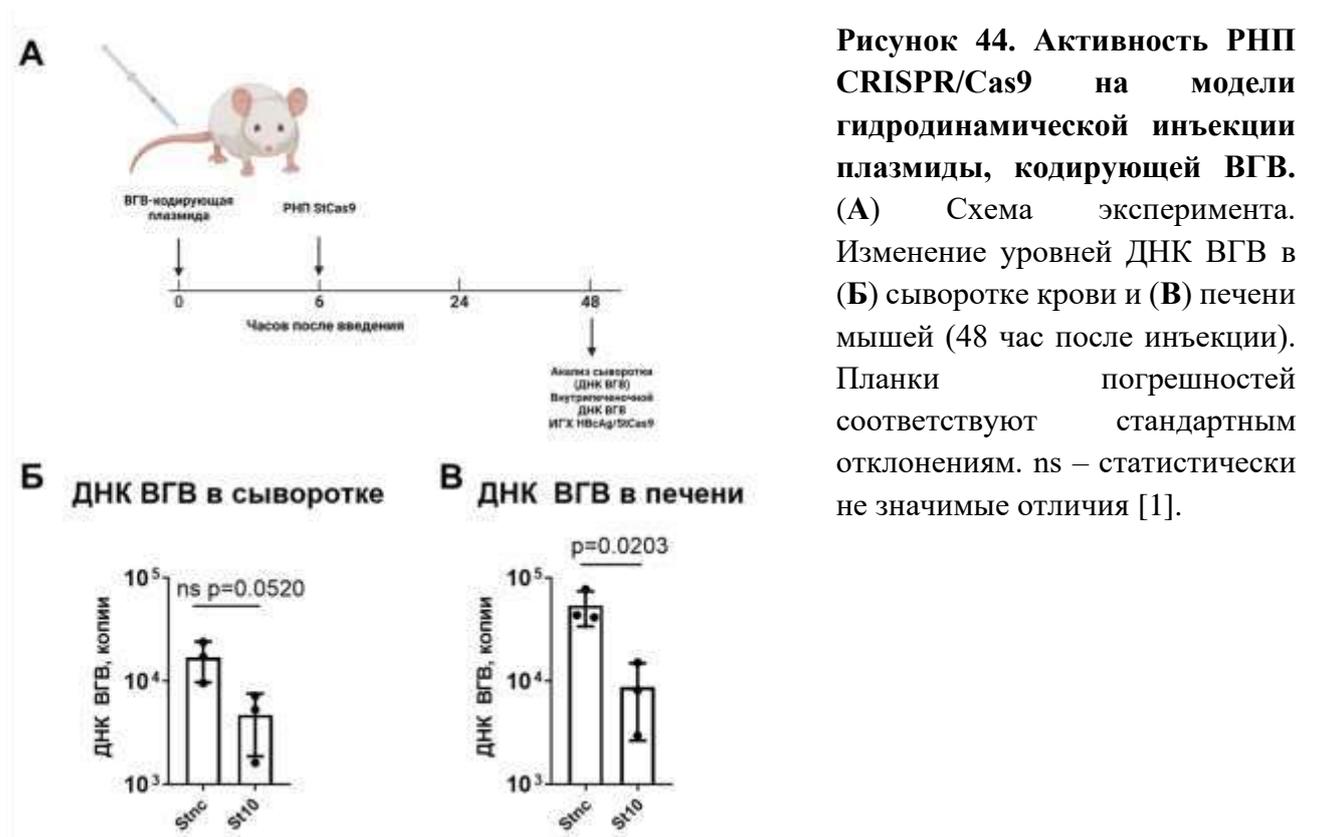
Активность РНП CRISPR/Cas9 далее оценивали *in vivo* на модели гидродинамической инъекции плазмиды, кодирующей геном ВГВ длиной 1.1mer. Сперва нуклеолитическую активность РНП CRISPR/Cas9 оценивали в биохимической реакции *in vitro* при инкубации с плазмидой 1.1mer ВГВ (Рисунок 42). Инкубация плазмиды ВГВ с РНП CRISPR/Cas9 в течение 1 часа при 37 °С вызывала эффективное расщепление ДНК-мишени, о чем свидетельствовало изменение электрофоретической подвижности линейаризованной плазмиды.



**Рисунок 43. Нуклеолитическое действие РНП StCas9 с РНК–проводником St10 с ВГВ– кодирующей плазмидой. M – маркер длин; ВГВ – ВГВ– кодирующая плазида; St10 – ВГВ– кодирующая плазида, расщепленная комплексом StCas9 с РНК–проводником St10 [1].**

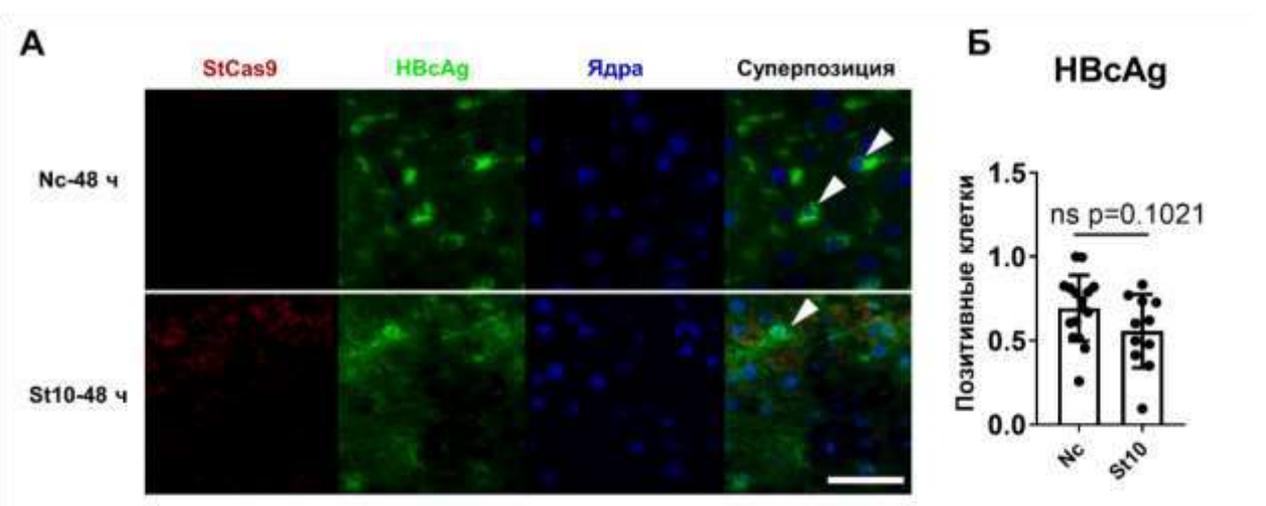
Далее, на модели гидродинамической инъекции 1.1 mer ДНК ВГВ мышам BALB/c *in vivo* проводили оценку действия РНП CRISPR/Cas9 (Рисунок 44). В качестве контроля использовали РНП с Cas9-белком и нетаргетирующим РНК-проводником Stnc. Параметры вирусной репликации анализировали на 48 час после начала экспериментом по измерению уровней ДНК ВГВ в сыворотке крови и в ткани печени. Кроме того, проводили иммуногистологическое окрашивание печени на маркер вирусной инфекции, HBcAg. С этой целью использовали анти-FLAG антитела для детекции FLAG-меченного Cas9-белка и антитела к HBcAg для подсчета ВГВ-позитивных клеток (Рисунок 45). Однократное введение РНП CRISPR/Cas9 в 10 раз снижало вирусную нагрузку по ДНК ВГВ в сыворотке крови и ткани печени [1].

Иммуногистологический анализ продемонстрировал статистически не значимое, слабое снижение числа HBcAg-позитивных клеток. С одной стороны, это указывает на эффективную доставку ВГВ-кодирующих плазмид в гепатоциты и, с другой, указывает на высокую персистенцию ВГВ в гепатоцитах мышей. Анализ сигнала от Cas9 белка не выявил клеток с внутриядерной локализацией Cas9-белка. Отсутствие Cas9-белка в ядрах гепатоцитов может указывать на быстрое разрушение короткоживущих РНП CRISPR/Cas9, как показано на клетках *in vitro*.



**Рисунок 44. Активность РНП CRISPR/Cas9 на модели гидродинамической инъекции плазмиды, кодирующей ВГВ.** (А) Схема эксперимента. Изменение уровней ДНК ВГВ в (Б) сыворотке крови и (В) печени мышей (48 час после инъекции). Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ns – статистически не значимые отличия [1].

В заключение, впервые была продемонстрирована практически полная элиминация ВГВ-инфекции на модели клеток *in vitro* и выраженное (>10-кратное) снижение вирусной нагрузки на модели мышей *in vivo* [1].



**Рисунок 45. Анализ белков ВГВ и StCas9 в печени мышей.** (А) Иммуногистохимическое окрашивание срезов печени мышей через 48 ч после гидродинамической инъекции с антителами, направленными к StCas9 и HbcAg (Б) Количественный подсчет клеток, позитивных по HBcAg [1]

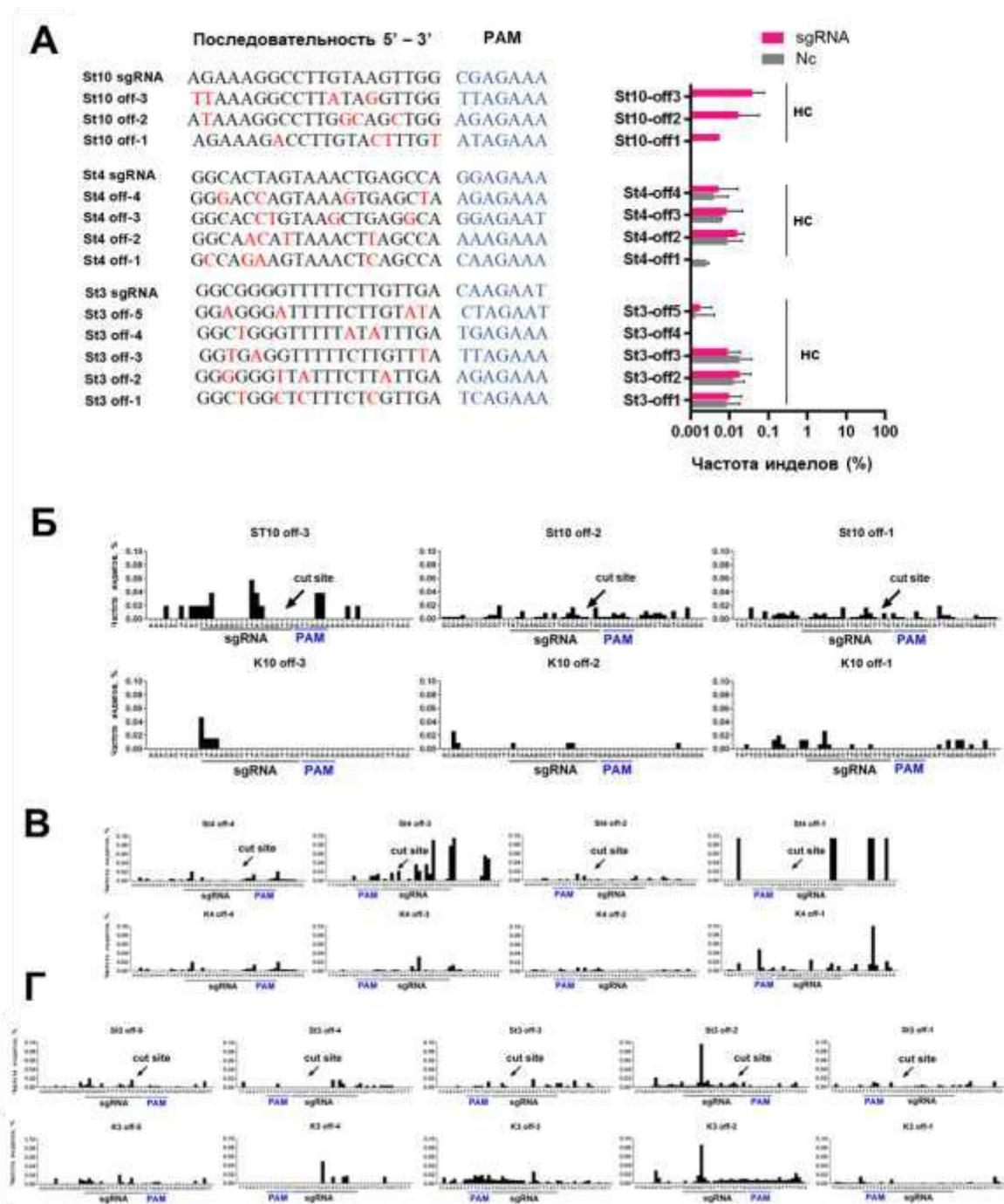
При оценке нуклеолитического действия CRISPR/Cas9 в остаточных матрицах ДНК ВГВ в гепатоцитах мышей методом высокопроизводительного секвенирования детектировались редкие мутации в сайте целевого расщепления. В образцах, полученных от контрольных мышей с комплексами CRISPR/Cas9 с РНК-проводником Stnc, мутации по типу делеций и вставок нуклеотидов в сайте расщепления St10 не обнаруживаются (Таблица 4) [1].

**Таблица 4. Оценка уровней мутагенеза во внутрипеченочной ДНК ВГВ на 1000 прочтений [1]**

Тип мутаций	Контроль	ST10
Делеции	0	0,319693
Вставки	0	0,155376

#### **4.2. Отсутствие внецелевой активности рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 в клетках человека**

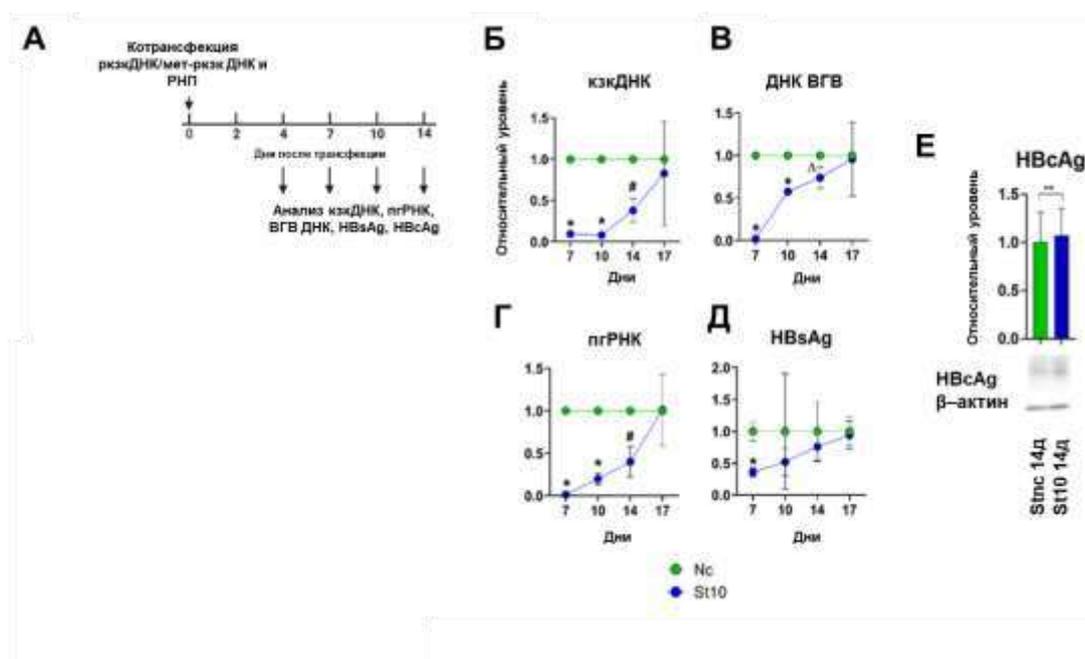
Нецелевой мутагенез CRISPR/Cas9 представляет собой серьезную проблему, которая может препятствовать их клиническому использованию. Тщательный дизайн РНК-проводников и использование высокоточных вариантов Cas9 сводит к минимуму риск нецелевого мутагенеза. Ранее полученные данные показывают, что StCas9 гораздо более специфичен, чем классические нуклеазы CRISPR/Cas9 [18]. Хотя считается, что использование РНП, которые разрушаются в течение 24 часов, также снижает нецелевой мутагенез, впечатляюще высокая нуклеолитическая и противовирусная активность используемых РНП требует тщательного изучения потенциального нецелевого расщепления. В наших работах было проведено глубокое секвенирование массива из 12 нецелевых участков генома хозяина с наибольшей вероятностью расщепления. Ни в одном из этих сайтов не было обнаружено значимого увеличения количества мутаций по сравнению с контрольными РНП (Рисунок 46). Частота вставок нуклеотидов во всех локусах колебалась от 0% до 0,1%. Анализ распределения вставок нуклеотидов выявил фоновые мутации, которые не образовывали паттерн, типичный для CRISPR/Cas9-индуцированного мутагенеза (Рисунок 46). Эти результаты показывают, что разработанные РНП не только обладают высочайшей противовирусной активностью, но и не оказывают нецелевого действия на геном человека.



**Рисунок 46. Оценка внецелевого действия РНК St CRISPR/Cas9.** (A) 5' → 3' нуклеотидные последовательности St3, St4 и St10 РНК-проводников и потенциальные внецелевые сайты в геноме человека. Несовпадающие нуклеотиды окрашены в красный цвет. Последовательности PAM окрашены в синий цвет. Красные столбцы обозначают частоты делеций с целевым РНК-проводником; серые столбцы указывают на частоту мутаций в контрольных группах с незначимым РНК-проводником. Наблюдаемые различия не были статистически значимыми (nc). (Б) Графики распределения делеций для анализа внецелевого действия РНК-проводников St1, St2, St3 (B, C, D) [482]

#### 4.3. Восстановление вирусной репликации после действия CRISPR/Cas9

Чтобы оценить влияние однократного введения РНП StCas9/St10 на репликацию ВГВ, мы исследовали уровни рккзДНК ВГВ, внутриклеточной ДНК ВГВ, пгРНК, уровни секретируемого HBsAg и клеточного HBcAg в течение 14 дней после начала эксперимента (Рисунок 47). К четвертому дню после трансфекции все протестированные параметры ВГВ все еще были значительно ( $> 90\%$ ) снижены (Рисунок 47); однако уровни ркккДНК, внутриклеточной ДНК ВГВ, пгРНК, секретируемых HBsAg и клеточного HBcAg постепенно достигли контрольных уровней к 14-му дню. Это указывает на то, что репликация ВГВ восстанавливается после почти полной эрадикации РНП StCas9/St10. Это позволяет предположить, что восстановление пула ккзДНК ВГВ связано либо с активностью не расщепленной рккзДНК, либо с кчдДНК, продуцируемой из транскрибированной пгРНК.

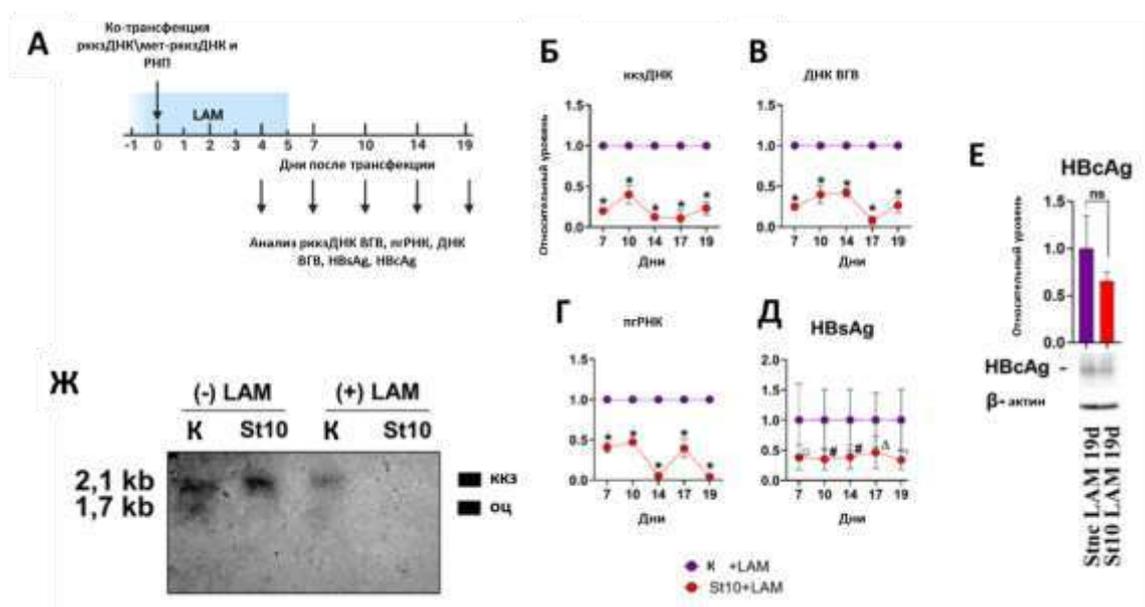


**Рисунок 47. Восстановление репликации ВГВ после трансфекции CRISPR–Cas9 РНП в динамике длительного наблюдения.** (А) Схема эксперимента (Б – Е) Изменения в уровнях (Б) ккзДНК ВГВ, (В) внутриклеточной ДНК ВГВ, (Г) пгРНК (Д) HBsAg и (Е) уровнях HBcAg на поздние сутки наблюдения.  $op < 0,05$ ,  $\Delta p < 0,01$ ,  $\#p < 0,001$ ,  $*p < 0,0001$ ; нс, не статистически значимых отличий [482].

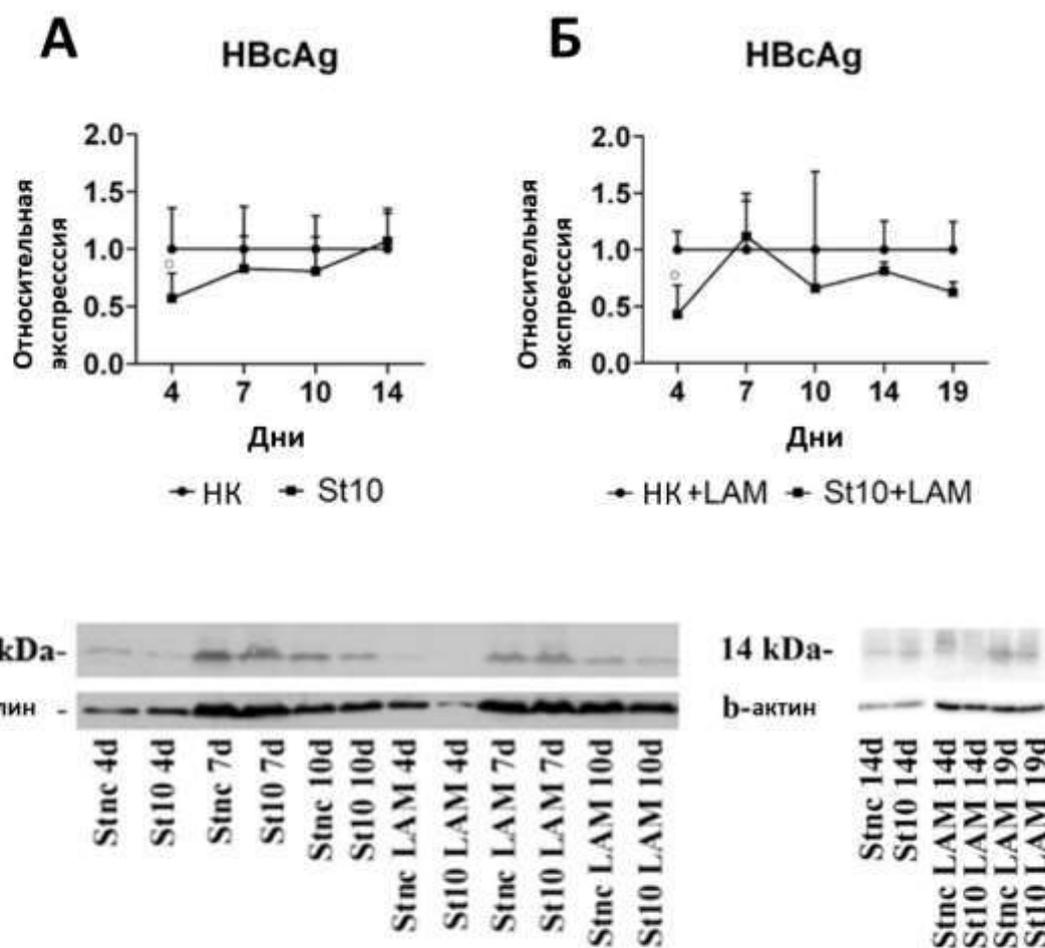
#### 4.4. Подавление обратной транскрипции вируса предотвращает реактивацию инфекции после действия CRISPR/Cas9

Чтобы изучить роль кчдДНК в восстановлении цикла ВГВ, мы предварительно обрабатывали клетки HepG2 ламивудином (LAM), ингибитором обратной транскриптазы, за 1 день до трансфекции и сохраняли их в культуральной среде в течение следующих 6 дней, пополняя среду свежим LAM каждые 2 дня (Рисунок 48) [482]. LAM предотвращает образование кчдДНК; кчдДНК практически отсутствовала в клетках, а сохранявшийся

LAM препятствовал образованию ккзДНК de novo. На 5-е сутки LAM удаляли из культуральной среды и измеряли параметры ВГВ в течение следующих 14 дней (до 19-го дня после трансфекции для оценки влияния истощения ккзДНК на восстановление цикла ВГВ. Следовательно, периоды наблюдения в экспериментах с LAM и без LAM были идентичными. ккзДНК ВГВ, внутриклеточная ДНК ВГВ, pgRNA и секретируемый HBsAg оставались практически на тех же остаточных уровнях (Рисунок 48), а уровень HBsAg, демонстрирующий процент клеток с остаточными вирусными белками, статистически значимо не изменялся (Рисунок 49) [482]. Саузерн-блоттинг подтвердил восстановление репликации ВГВ после трансфекции РНП и продемонстрировал значительное снижение уровней ДНК ВГВ после истощения ккзДНК с помощью LAM (Рисунок 48) [482]. В целом эти результаты показывают, что даже при близкой к полному разрушению ккзДНК происходит реактивация ВГВ-инфекции, а также указывает на то, что блокирование этапа обратной транскрипции ВГВ и образования ккзДНК необходимо и достаточно для полной остановки цикла ВГВ и элиминации вируса из инфицированных клеток.



**Рисунок 48. Восстановление репликации ВГВ после трансфекции CRISPR–Cas9 РНП и способы его предотвращения.** (А) Дизайн эксперимента (Б – Е) Изменения в уровнях (Б) ккзДНК ВГВ, (В) внутриклеточной ДНК ВГВ, (Г) pgRNA, (Д) HBsAg и (Е) уровнях HBsAg (Ж) Саузерн–блот анализ уровней ккзДНК.  $\circ p < 0,05$ ,  $\Delta p < 0,01$ ,  $\#p < 0,001$ ,  $*p < 0,0001$ ; ns, нет значимых отличий [482].



**Рисунок 49. Динамика экспрессии белка HBV Ag.** (А) Экспрессия белка HBV Ag в клетках трансфицированных РНП StCas9/Nc (Nc), и клетках, трансфицированных РНП StCas9/St10 (St10). (Б) Экспрессия HBV Ag в клетках, обработанных LAM в течение 7 дней и трансфицированных РНП StCas9/Nc (Nc+LAM), и клетках, обработанных LAM в течение 7 дней и трансфицированных РНП StCas9/St10 (St10+LAM)  $p < 0,05$  [482]

#### 4.5. Оценка комбинированного действия CRISPR/Cas9 и ингибитора обратной транскрипции вируса на моделях инфекции

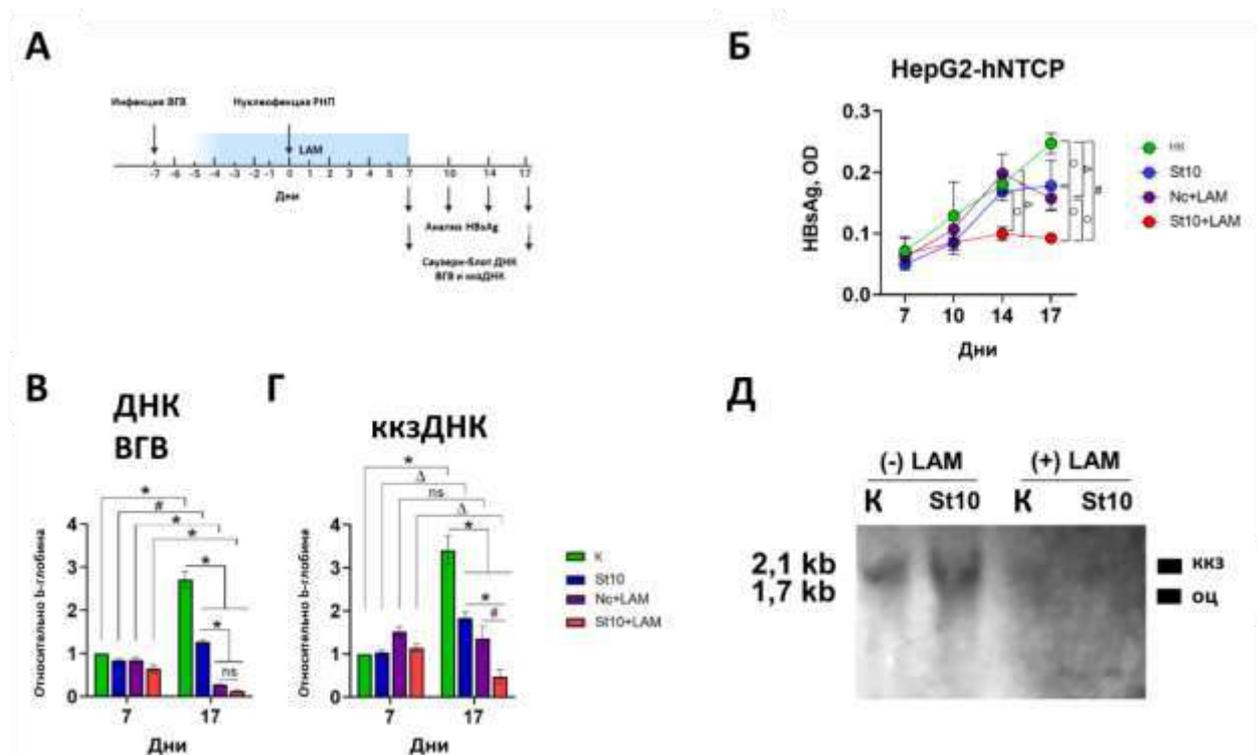
Первоначально мы использовали модель ко-трансфекции, чтобы обеспечить максимальную скорость совместной доставки рккзДНК ВГВ и РНП CRISPR/Cas9 в клетки HepG2, которые трудно трансфицировать. Однако (1) эта модель не поддерживает полный цикл репликации ВГВ, (2) репликация, управляемая рккзДНК, снижается во времени из-за деления клеток, и (3) рккзДНК имитирует ккзДНК, поскольку истинная форма ккзДНК ВГВ образуется только в инфекционной системе [482]. В связи с этим, были проведены эксперименты по нуклеофекции РНП CRISPR/Cas9 в ВГВ-инфицированные клетки HepG2-

hNTCP с предварительной обработкой LAM либо контрольной обработкой DMSO, как показано на Рисунке 50А.

В этой модели все проанализированные промежуточные продукты ВГВ были значительно снижены (~95% для внутриклеточной ДНК ВГВ, ~86% для ккзДНК ВГВ и ~60% для секретируемого HBsAg) после нуклеофекции CRISPR/Cas9 РНП с предварительной обработкой LAM (группа St10 + LAM) к 17 дню после нуклеофекции, тогда как в контрольной группе (Nc) репликация ВГВ усиливалась. Примечательно, что в группе St10 + LAM уровни ВГВ не только не повышались к 17-му дню после нуклеофекции, но и постоянно снижались по сравнению с 7-м днем после нуклеофекции (Рисунок 50 Б, В).

Эффект РНП CRISPR/Cas9(St10) без обработки LAM отсутствовал уже к 7-м суткам после нуклеофекции (Рисунок 50 Б, В). К концу наблюдения уровни ДНК ВГВ, ккзДНК и HBsAg повышались, но были все еще значительно ниже по сравнению с группой Nc [482]. Предварительная обработка инфицированных ВГВ клеток LAM (Nc + LAM) заметно снижала внутриклеточную ДНК ВГВ (Рисунок 50В) и уровни секретируемого HBsAg (Рисунок 50Б) [482]. Рост уровней ккзДНК ВГВ был заблокирован обработкой ингибитором LAM (Рисунок 50 Б, В), что подтверждается анализом на 17-е сутки после нуклеофекции, и указывает на этап конверсии кчдДНК в ккзДНК как на основной механизм, который поддерживает образование ккзДНК de novo в клетках HepG2-hNTCP. Влияние на ДНК и ккзДНК ВГВ было подтверждено с помощью Саузерн-блоттинга (Рисунок 50Д). Отсутствие значительного снижения параметров ВГВ, наблюдаемое через 7 дней после нуклеофекции, может быть связано с исходно низкими уровнями ккзДНК ВГВ, образующимися в клетках HepG2-hNTCP вскоре после инфекции ВГВ [482].

Эти данные, полученные на наиболее совершенной модели инфекции ВГВ, подтверждают наш главный вывод о том, что конверсия кчдДНК ВГВ → ккзДНК является важным шагом, поддерживающим персистенцию ВГВ после инактивации ккзДНК ВГВ с помощью CRISPR/Cas9. Разработанная стратегия блокирует амплификацию ВГВ и приводит к постепенному разрешению ВГВ-инфекции.



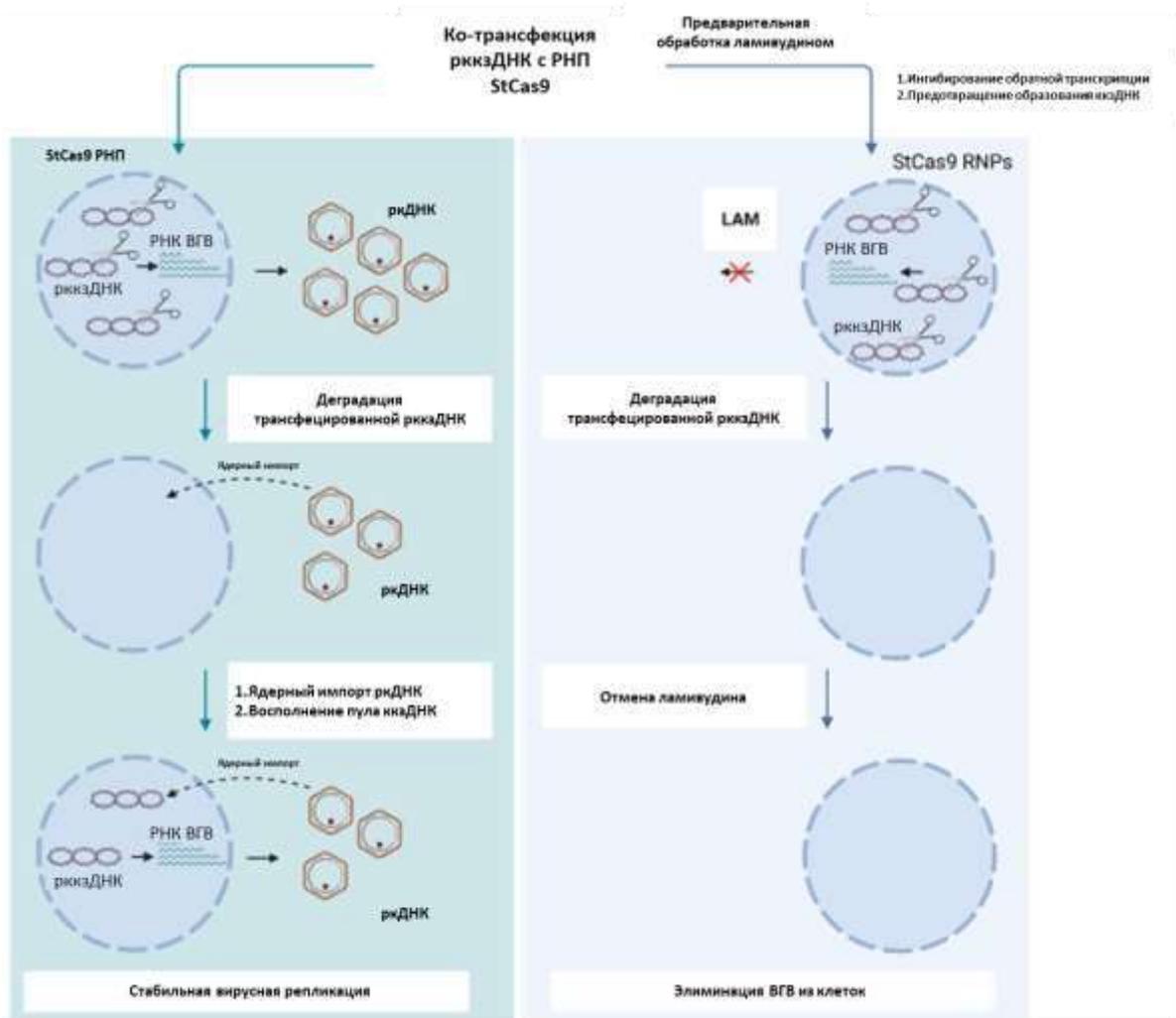
**Рисунок 50. Эффекты CRISPR–Cas9 РНП и LAM на модели инфекции HepG2–NTCP.** (А) Дизайн эксперимента (Б–Г) Противовирусная активность РНП CRISPR–Cas9: измерение уровней (Б) HBsAg, (В) ДНК ВГВ и (Г) ккзДНК. (Д) Саузер–блот–анализ в конечной точке.  $\circ p < 0,05$ ,  $\Delta p < 0,01$ ,  $\#p < 0,001$ ,  $*p < 0,0001$ ; нс, нет статистически значимых отличий [482].

Вопрос полного излечения ХГВ занимает центральное место в исследованиях в области ВГВ. Новые препараты и их комбинации могут воздействовать практически на каждый этап репликации ВГВ, но все же не могут полностью элиминировать ВГВ из организма. Системы CRISPR/Cas9 очень эффективно расщепляют целевые локусы в ккзДНК ВГВ, подавляя репликацию вируса. Однако в большинстве предыдущих исследований для подавления ВГВ использовалась непрерывная экспрессия компонентов CRISPR/Cas9. Неконтролируемая гиперэкспрессия CRISPR/Cas9 может вызывать нецелевой мутагенез и оказывать токсическое действие на клетки. Краткосрочная доставка систем CRISPR/Cas9 в форме РНП является наиболее безопасной формой использования генетических редакторов, и обеспечивает быстрое редактирование последовательностей-мишеней, что может удалить ккзДНК ВГВ из инфицированных клеток и способствовать элиминации вируса. Хотя мы наблюдали заметное снижение уровней ккзДНК ВГВ с помощью РНП CRISPR/Cas9, они не смогли элиминировать ВГВ, что сопровождалось восстановлением пула ккзДНК ВГВ и репликацией вируса. Было обнаружено, что ккзДНК ВГВ, промежуточный продукт, способный рециркулировать в ядро, является причиной восстановления репликации вируса (Рисунок 51) [482].

Важным моментом является то, что даже краткосрочной предварительной обработки LAM было достаточно, чтобы заметно улучшить анти-ВГВ-активность РНП CRISPR/Cas9 и способствовать разрешению инфекции. Оставшиеся интермедиаты ВГВ могут быть связаны с частью клеток, в которые не попали комплексы РНП. С другой стороны, исходя из последних результатов Martinez с соавт. [481], при действии РНП CRISPR/Cas9 после расщепления ккзДНК могут возникать транскрипционно-активные либо -неактивные варианты с делетированными участками генов.

Наши результаты подчеркивают роль этапа конверсии кчдДНК в ккзДНК в персистенции ВГВ-инфекции и демонстрируют, что данный этап является ключевым барьером к полной элиминации вируса системами сайт-направленных нуклеаз (Рисунок 51). Понимание роли конверсии кчдДНК ВГВ → ккзДНК в сохранении инфекции ВГВ в других, нетрансформированных клеточных линиях, таких как первичные гепатоциты человека, а также у пациентов с ХГВ *in vivo*, необходимо для разработки стратегий «стерилизующего» лечения [482].

Методы лечения пациентов с ХГВ препаратами на основе РНК-интерференции (РНК-интерференция) быстро внедряются в клиническую практику, демонстрируя мощную противовирусную активность за счет уменьшения уровней всех основных вирусных РНК [482]. Несмотря на многообещающие результаты, терапия методом РНК-интерференции вряд ли станет методом монотерапии ВГВ. В настоящее время РНК-интерференция изучается в сочетании с традиционными аналогами нуклеотидов, пегилированным интерфероном- $\alpha$  и ингибиторами проникновения вируса в клетку для улучшения результатов терапии и достижения полного либо функционального излечения или устойчивого контроля репликации ВГВ после лечения. В свете наших результатов использование РНК-интерференции может иметь преимущества по сравнению с аналогами нуклеотидов за счет эффективной дестабилизации пгРНК и противодействия образованию ккзДНК ВГВ *de novo*.



**Рисунок 51. Предобработка ламивудином для элиминации ВГВ из клеток с помощью CRISPR/Cas9 [482].**

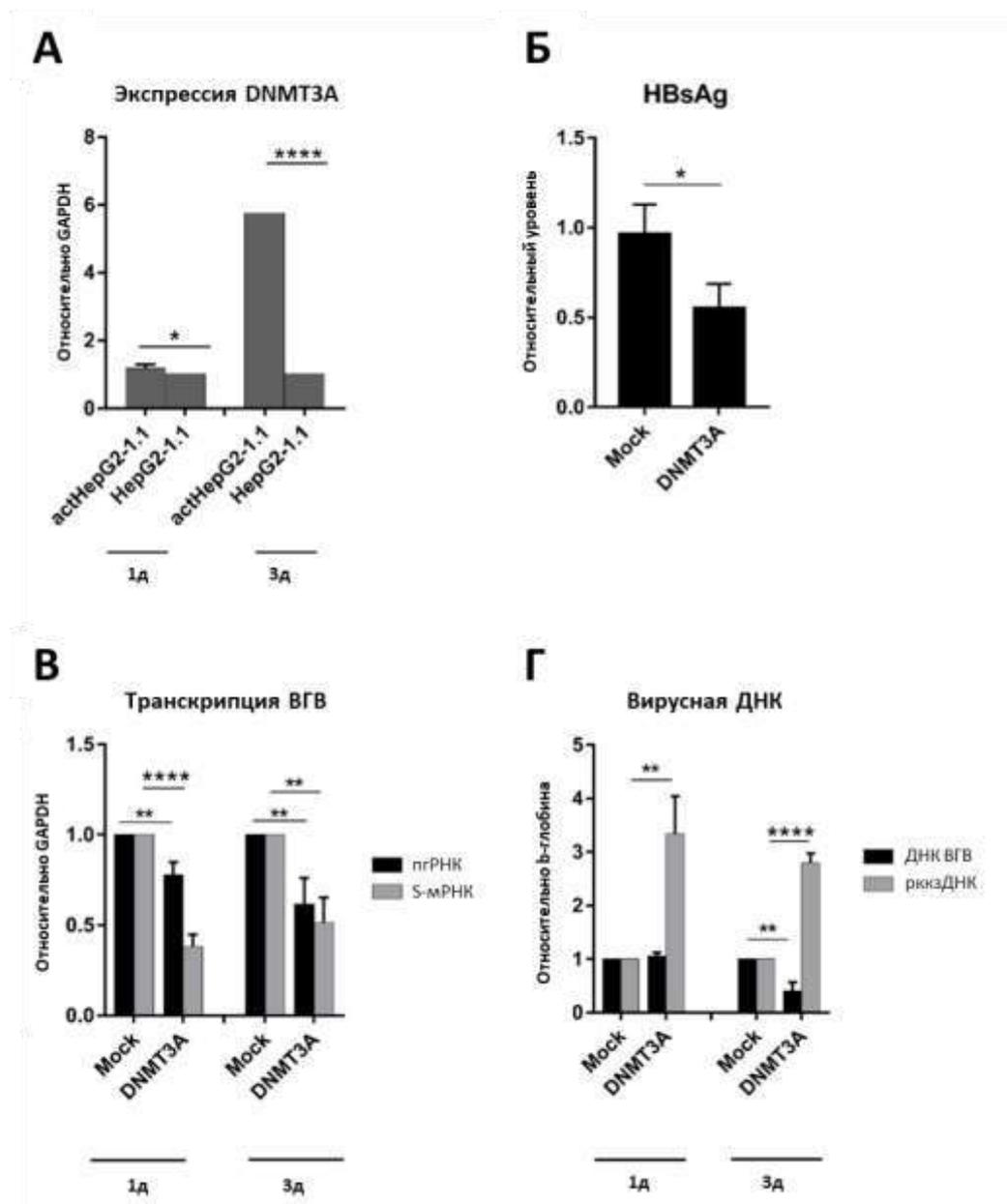
## Глава 5. Влияние метилирования ккзДНК ВГВ и HBx-белка на нуклеолитическое действие CRISPR/Cas9 и реактивацию вирусной инфекции

### 5.1. ДНК-метилтрансферазы подавляют транскрипцию и репликацию вируса гепатита В, но увеличивают пул кольцевой ковалентно замкнутой ДНК

Ранее было показано, что инфекция и репликация ВГВ повышают клеточные уровни ДНК-метилтрансфераз (ДНМТ). ДНМТ, а именно метилтрансфераза *de novo* ДНМТ3А, эпигенетически подавляют ккзДНК ВГВ и ограничивают транскрипцию и репликацию вируса.

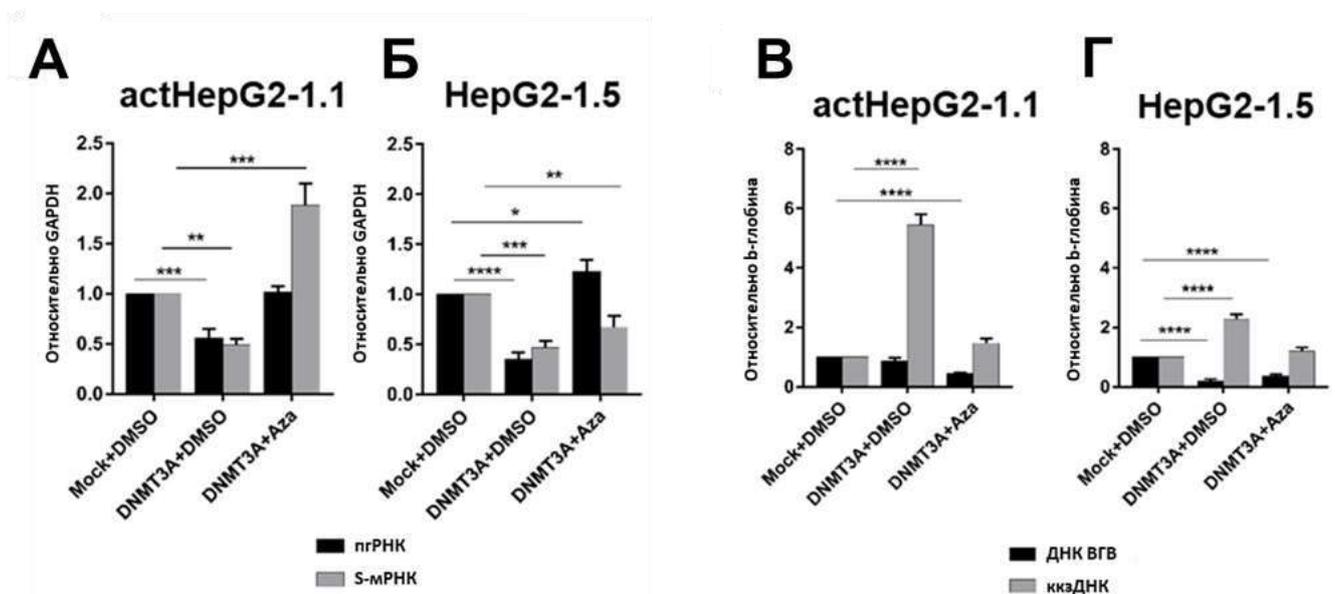
Действительно, в наших экспериментах продемонстрировано, что увеличение экспрессии ДНМТ3А при добавлении доксисиклина, который активирует репликацию ВГВ в клеточной линии HepG2-1.1. Чтобы выяснить, может ли повышенная экспрессия ДНМТ3А снижать репликацию ВГВ, мы гиперэкспрессировали ДНМТ3А в клетках HepG2-1.1 и проанализировали влияние на репликацию ВГВ. В результате, секреция HBsAg,

уровни промежуточных продуктов репликации ВГВ (пгРНК, мРНК S-ORF (S-мРНК) и общая внутриклеточная ДНК ВГВ значительно снижались, в то время как уровни ккзДНК ВГВ, напротив, возрастали (Рисунок 52).



**Рисунок 52. Влияние DNMT3A на цикл репликации ВГВ.** (А) Активация цикла ВГВ индуцирует экспрессию мРНК DNMT3A в HepG2-1.1. (Б) Снижение уровней секретируемого HBsAg на 3-й день после гиперэкспрессии DNMT3A в клетках actHepG2-1.1. (В) Подавление транскрипции ВГВ при гиперэкспрессии DNMT3A в клетках actHepG2-1.1 (пгРНК: черные столбцы; S-мРНК: серые столбцы). (Г) Снижение общей внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) одновременно с увеличением внутриклеточной ккзДНК ВГВ (серые столбцы) при гиперэкспрессии DNMT3A в клетках actHepG2-1.1. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [483].

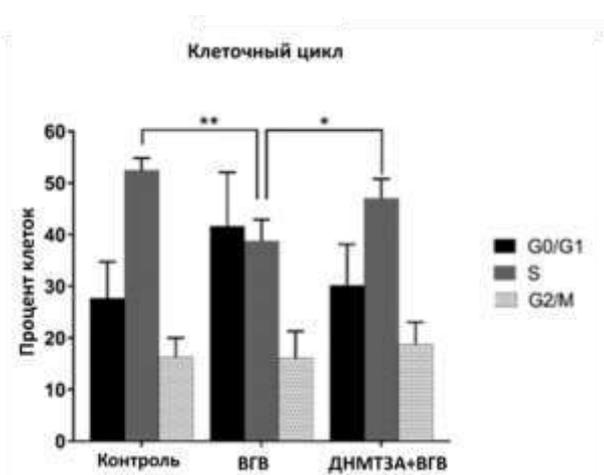
Поскольку в предыдущих работах эффекты ДНМТ на пул ккзДНК ВГВ не изучались либо влияние ДНМТ на ккзДНК выявлено не было, мы исследовали, действительно ли наблюдаемое увеличение уровней ккзДНК ВГВ было связано с повышенной экспрессией ДНМТ3А. Чтобы проверить это, была проведена гиперэкспрессия ДНМТ3А в ВГВ-продуцирующих клеточных линиях actHepG2-1.1 и HepG2-1.5 с обработкой клеток 5-азациитидином (Aza), ингибитором ДНМТ. Обработка Aza восстанавливала экспрессию пгРНК ВГВ даже в условиях гиперэкспрессии ДНМТ3А, что свидетельствует об ингибировании ДНМТ3А (Рисунок 53). В свою очередь, при ингибировании ДНМТ3А не происходило значимого увеличения уровней ккзДНК ВГВ. В совокупности, проведенные эксперименты по гиперэкспрессии и инактивации ДНМТ3А указывают на роль ДНМТ3А в увеличении уровней ккзДНК ВГВ в условиях подавленной транскрипции ВГВ.



**Рисунок 53. Влияние 5-азациитидина на цикл репликации ВГВ при гиперэкспрессии ДНМТ3А.** Изменения (А, Б) транскрипции ВГВ и (В, Г) общей внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) и ккзДНК (серые столбцы) в actHepG2-1.1 и HepG2-1.5 клетки. Звездочками отмечены статистически значимые различия. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [483].

Поскольку ккзДНК ВГВ не реплицируется полуконсервативным путём, пул ккзДНК разбавляется, когда инфицированные клетки быстро делятся, и увеличивается, когда клетки остаются в состоянии покоя. Таким образом, мы предположили, что избыточная экспрессия ДНМТ3А может вызывать остановку клеточного цикла, так что покоящиеся клетки накапливают ккзДНК ВГВ, особенно учитывая, что конверсия ккдДНК в ккзДНК происходит преимущественно во время фазы G0/G1.

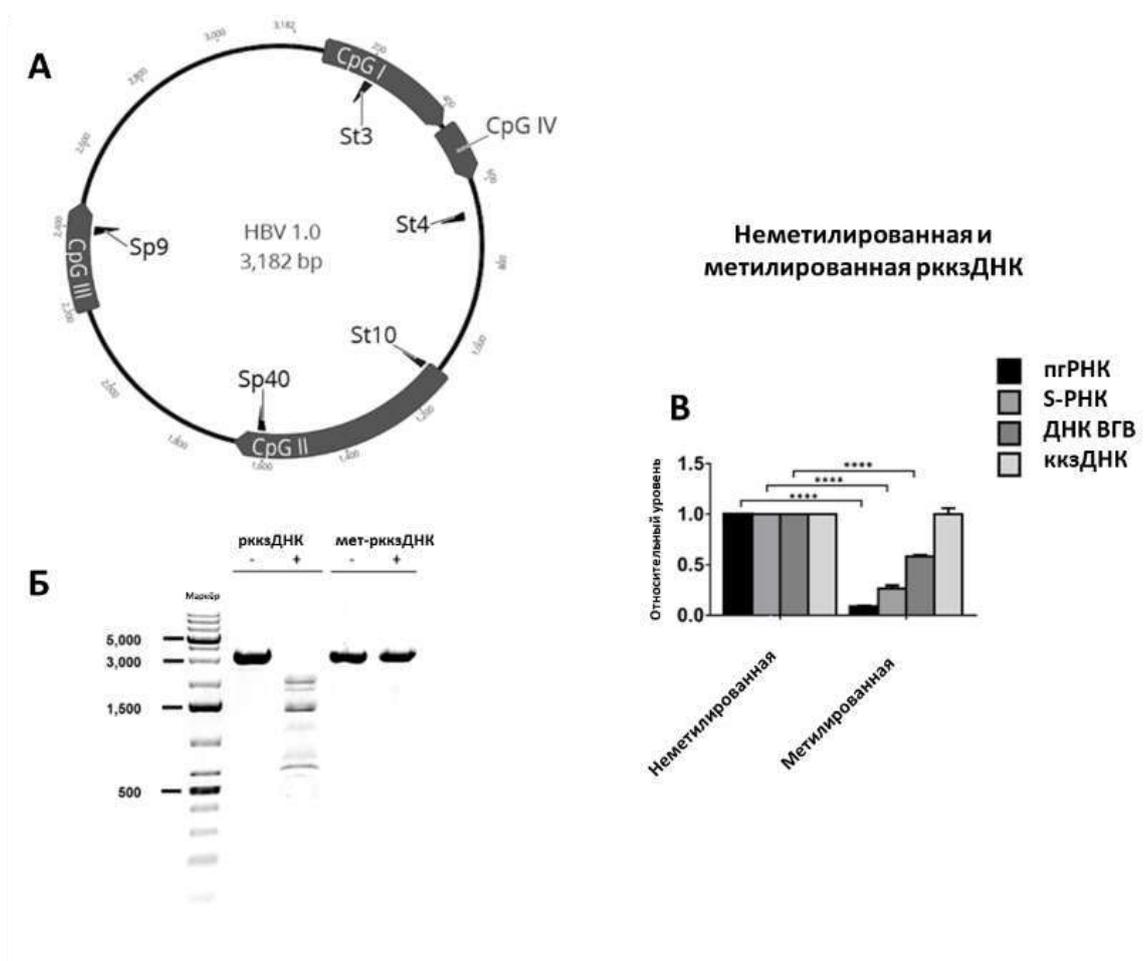
Как сообщалось ранее, инфекция ВГВ связана с остановкой клеточного цикла G0/G1, но мало что известно о роли экспрессии ДНМТ3А в этом процессе. Влияние ДНМТ3А на клеточный цикл изучали с помощью окрашивания красителем DRAQ5 и проточной цитофлуориметрии. В результате проведенных экспериментов было показано, что репликация ВГВ, ожидаема, приводила к остановке клеток в фазе G0/G1. Однако, при трансфекции ДНМТ3А происходило усиление репликации клеток, о чем свидетельствует увеличение клеток в S-фазе клеточного цикла. Вероятно, это действие ДНМТ3А связано с подавлением репликации ВГВ и, соответственно, устранению влияния ВГВ на остановку в фазе G0/G1 (Рисунок 54).



**Рисунок 54. Анализ клеточного цикла при гиперэкспрессии ДНМТ3А.** На графике представлен процент клеток HepG2–1.1 в разных фазах клеточного цикла: G0/G1 (черные столбцы), S (серые столбцы) и G2/M (пунктирные столбцы). Звездочками отмечены статистически значимые различия. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  [483].

## 5.2. ДНК-метилирование нарушает расщепление генома вируса гепатита В нуклеазой StCas9 *in vitro*

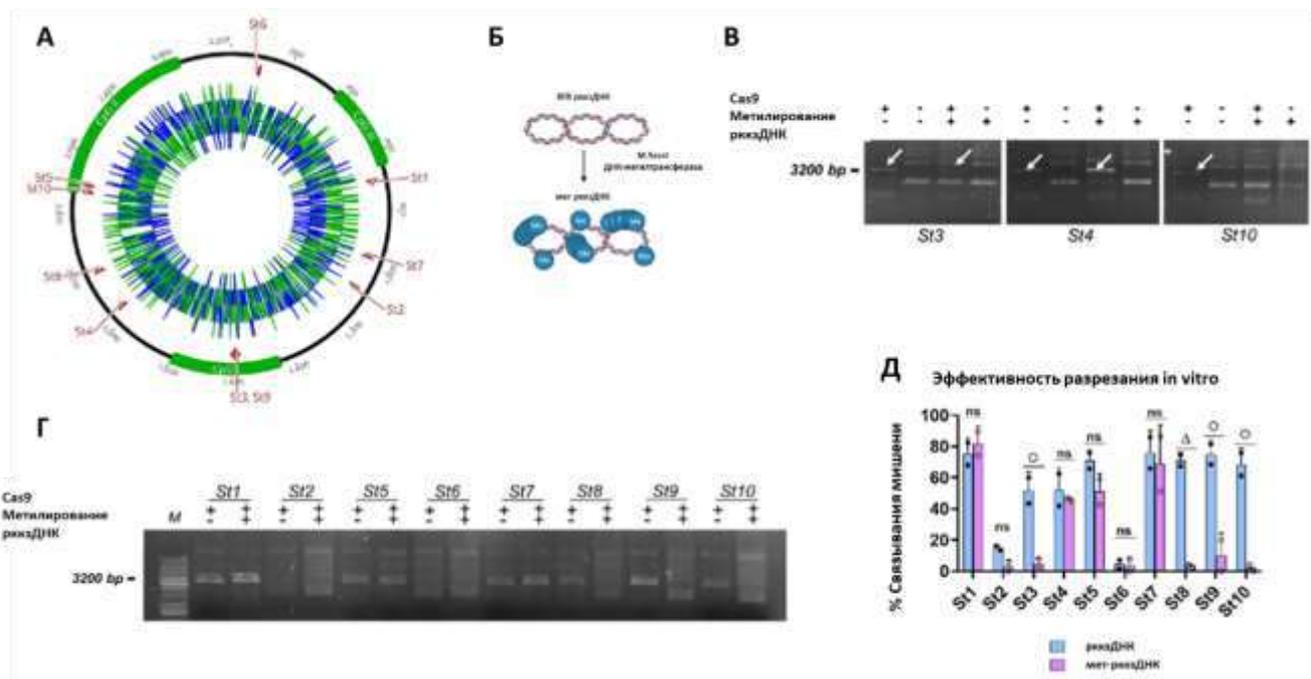
Метилирование ккзДНК представляет собой защитный механизм клетки, направленный на подавление транскрипции вируса. Три канонических и несколько неканонических CpG-островков и CpG сайтов в геноме ВГВ подвергаются метилированию. Различные генотипы ВГВ содержат различные CpG-островки, которые оказываются метилированы в разной степени. Степень метилирования ккзДНК ВГВ коррелирует с прогрессированием ХГВ. Метилирование ДНК изменяется от пациента к пациенту и между генотипами ВГВ, может меняться при прогрессировании заболевания и лечении и, возможно, способно снижать нуклеолитическую активность систем CRISPR/Cas9. Чтобы выяснить влияние метилирования рккзДНК ВГВ на активность РНП, мы создали гиперметилированную рккзДНК (мет-рккзДНК) (Рисунок 55).



**Рисунок 55. Анализ метилирования рккзДНК ВГВ.** (А) Канонические CpG–островки в геноме ВГВ и РНК–проводники, направленные к геному вируса (Б) Рестрикционный анализ линейаризованной рккзДНК. Неметилированная рккДНК (+) расщепляется чувствительным к метилированию ферментом Hpa II, тогда как метилированная рккДНК (ккзДНКмет (+)) остается интактной. (В) Транскрипционная активность метилированной рккзДНК по сравнению с неметилированной рккзДНК. \*\*\*\* $p < 0,0001$  [470].

Анализ расщепления *in vitro* показал, что метилирование рккзДНК резко снижает расщепление матрицы рккзДНК белком StCas9 с РНК-проводником St3 (~91% рккзДНК по сравнению с ~47% мет- рккзДНК) и с РНК-проводником St10 (~86% рккзДНК по сравнению с ~16% мет-рккзДНК), сайты-мишени которых расположены на островках CpG I и CpG II соответственно. Активность StCas9 с РНК-проводником St4, который нацелен на сайт за пределами CpG-островков, не изменилась (Рисунок 56). Чтобы дополнительно охарактеризовать влияние метилирования рккзДНК на активность РНП StCas9, были созданы комплексы РНП StCas9 со всеми возможными РНК-проводниками к геному ВГВ, и проведен анализ расщепления мишеней *in vitro*. Из десяти РНК-проводников StCas9 восемь расщепляли рккзДНК с эффективностью >50%; St2 и St6 расщепляли менее 20% рккзДНК и в дальнейшем не использовались в анализе. В дополнение к St3 и St10, действие

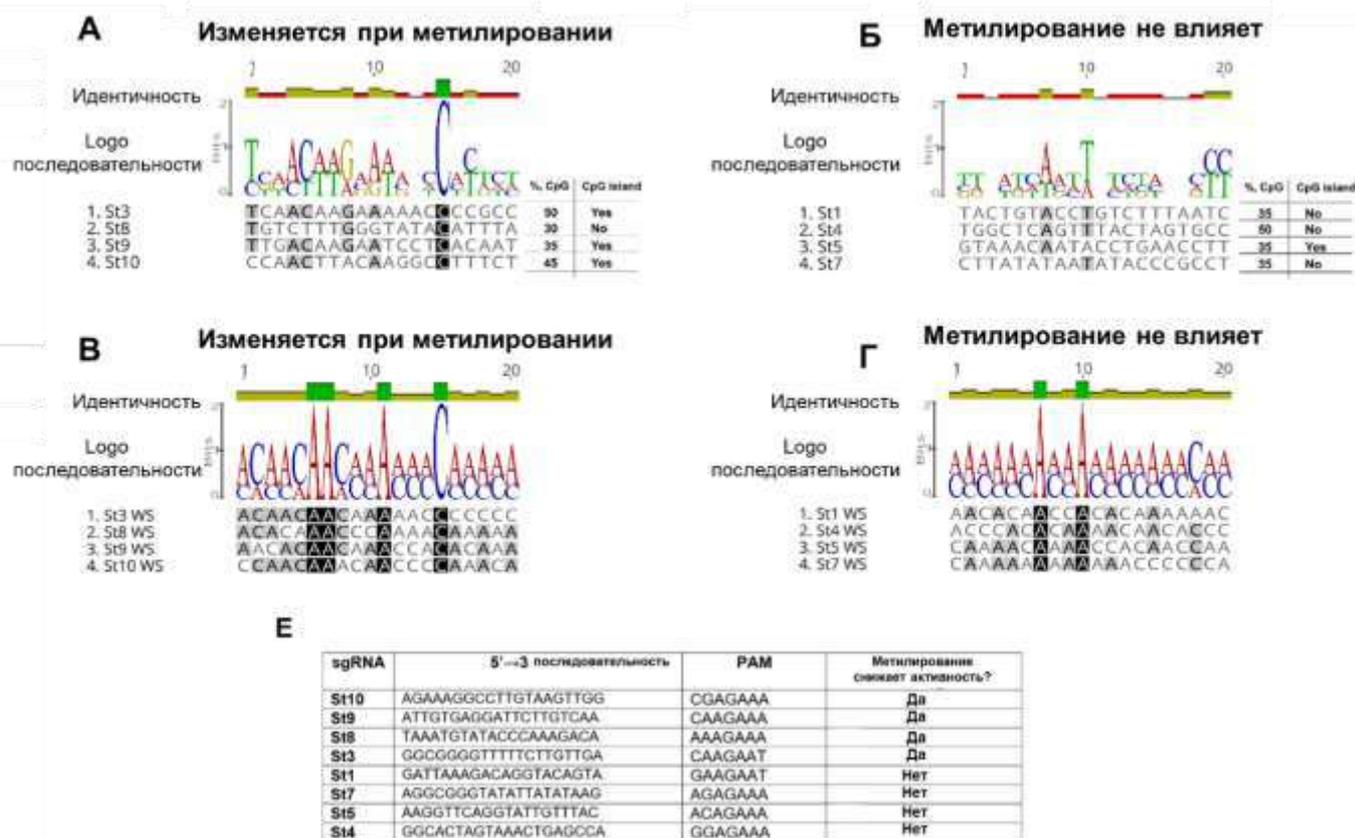
РНК-проводников St8 и St9 блокировалось метилированием. Наряду с St4, активность РНК-проводников St1, St5 и St7 не изменялась при метилировании рккзДНК.



**Рисунок 56. Влияние метилирования рккзДНК ВГВ противовирусную активность CRISPR–Cas9 РНП.** (А) Распределение островков CpG (I–III) Мишени РНК–проводников St1–St10 показаны на карте генома ВГВ. (Б) Схема метилирования рккзДНК ВГВ ДНК–метилтрансферазой M.SssI (В и Г) Реакция расщепления рккзДНК и мет–рккзДНК *in vitro* с помощью РНП StCas9 (Д) Относительные уровни расщепления рккзДНК и мет–рккзДНК с помощью StCas9 РНП.  $\circ p < 0,05$ ,  $\Delta p < 0,01$ ,  $\#p < 0,001$ ,  $*p < 0,0001$  [482].

### 5.3. Особенности нуклеотидного состава генома ВГВ во взаимодействии CRISPR/Cas9 с метилированными участками вирусных геномов

Анализ последовательностей-мишеней РНК-проводников показал, что нуклеотидный состав целевого сайта и содержание CpG не оказывали существенного влияния на расщепление метилированной рккзДНК, хотя РНК-проводники, нацеленные на области за пределами CpG-островков, в целом более эффективно расщепляли рккзДНК независимо от метилирования ДНК (Рисунок 57). Метилирование в основном затрагивало мишени РНК-проводников внутри CpG-островков.



**Рисунок 57. Влияние целевого сайта РНК–проводника и содержания CpG на уровни расщепления метилированной ккзДНК.** Анализ нуклеотидной последовательности, содержания CpG и локализации в островке CpG для (А–Г). (Д) Характеристики РНК–проводников [482].

Отсутствие сильной зависимости эффектов метилирования ДНК от последовательности нуклеотидов-мишеней может быть связано с разной эффективностью метилирования рккзДНК в определенных положениях. Действительно, рккзДНК ВГВ, синтезированная *in vitro*, была повсеместно метилирована, о чем свидетельствует бисульфитное секвенирование, но полнота метилирования варьировалась от 65% до 91% (Рисунок 58, 59) [482].

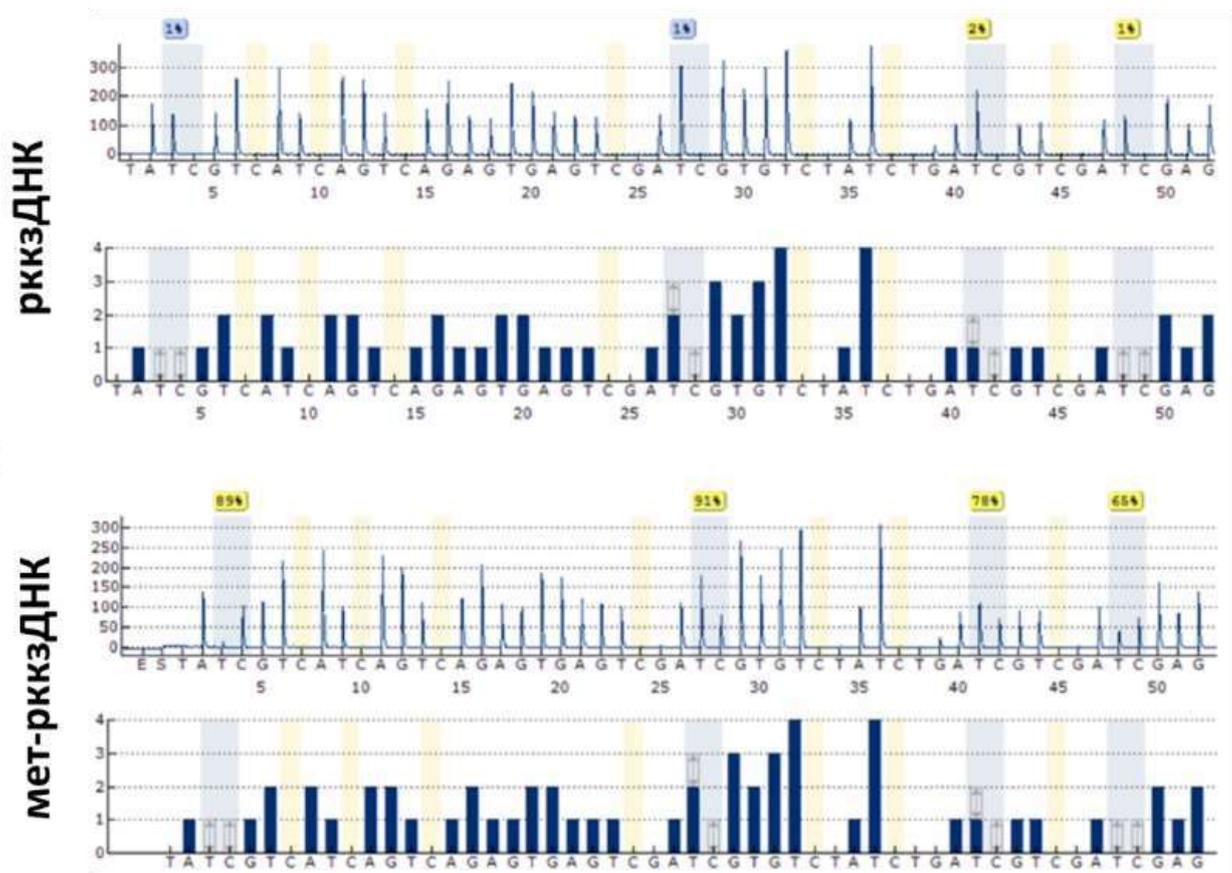


Рисунок 58. Бисульфитное секвенирование рккзДНК и метилированной рккзДНК. Анализ метилирования рккзДНК CpG-островке I [482].

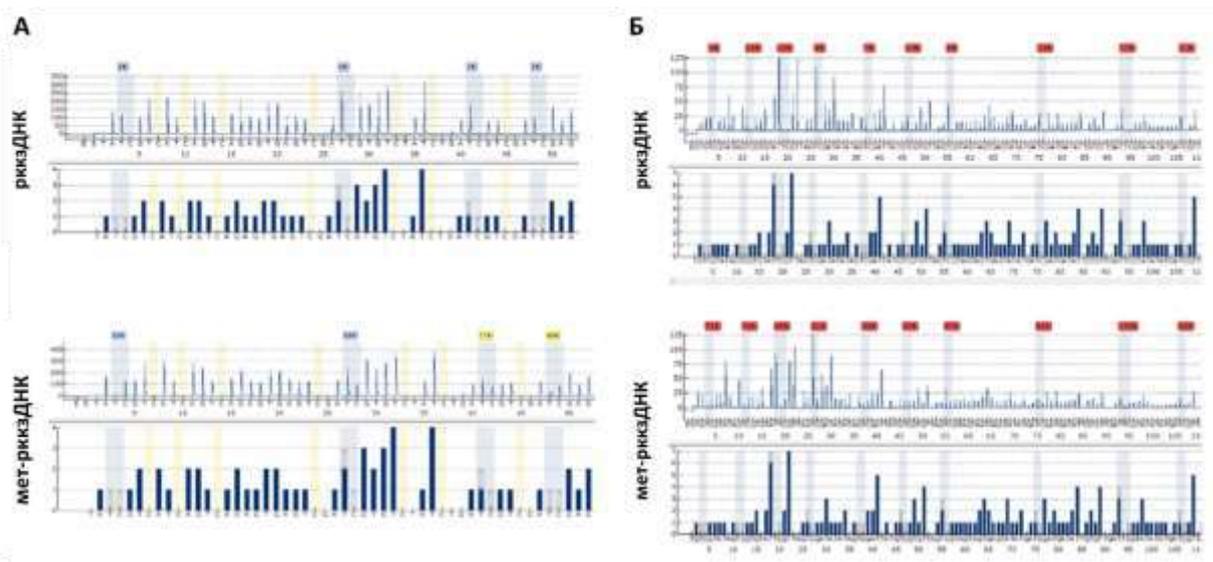
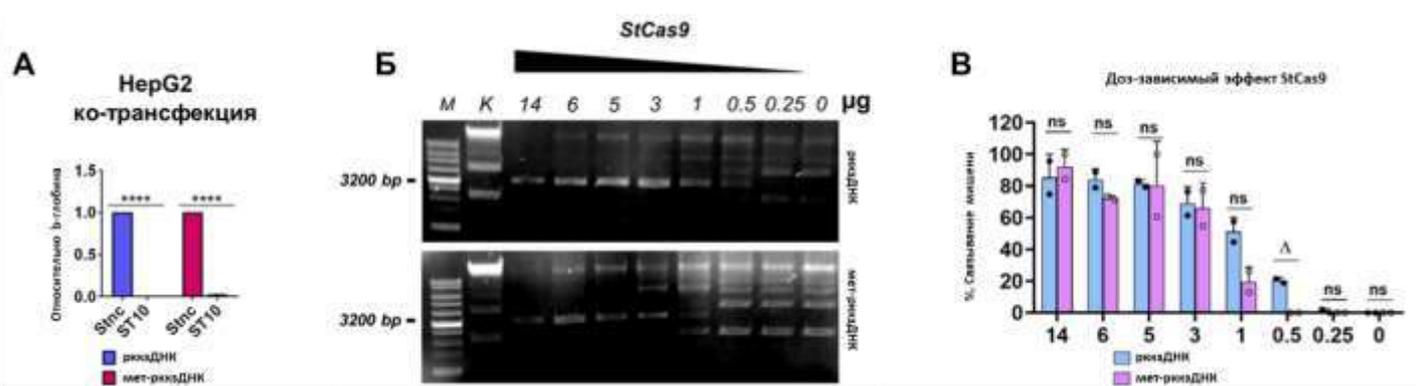


Рисунок 59. Бисульфитное секвенирование рккзДНК и метилированной рккзДНК. Анализ метилирования рккзДНК на островках (А) CpG I и (Б) CpG II островках [482].

Следовательно, потенциальная роль деметилирования рккзДНК может быть исключена. Различие между биохимическими анализами и экспериментами с клеточными

культурами можно объяснить более высокими дозами РНП, используемыми при трансфекции HepG2 в биохимическом анализе. Таким образом, мы провели анализы биохимического расщепления *in vitro* с одинаковыми количествами рккзДНК и мет-рккзДНК, но с разными количествами белка StCas9 (в диапазоне 0,25–14 мкг на реакцию) (Рисунок 60) [482]. При более низких дозах (0,25 мкг и 1 мкг на реакцию) метилирование рккзДНК сильно снижало активность РНП, в то время как увеличение количества белка StCas9 преодолело метилирование ДНК и эффективно расщепило мишень. Из этих результатов мы впервые демонстрируем, что метилирование ДНК ВГВ препятствует расщеплению рккзДНК с помощью StCas9, хотя этот эффект преодолевается увеличением дозы РНП (Рисунок 60).

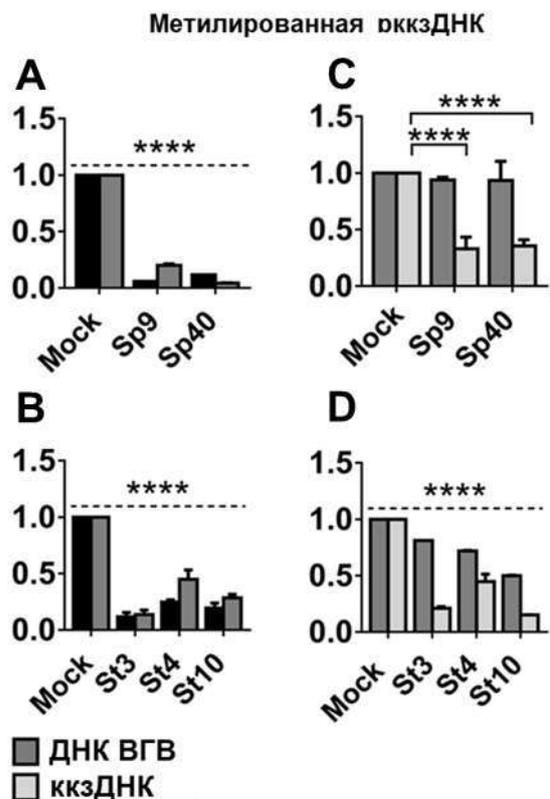


**Рисунок 60.** Увеличение концентрации РНП StCas9/РНК-проводник преодолевают эффекты метилирования ДНК. (А) Гель-электрофорез реакций *in vitro* расщепления ДНК-мишени. (Б) Полуколичественный анализ эффективности расщепления ДНК-мишени.

#### 5.4. Снижение противовирусного действия сайт-направленных нуклеаз при гиперметилировании ккзДНК ВГВ на моделях хронической репликации ВГВ *in vitro*

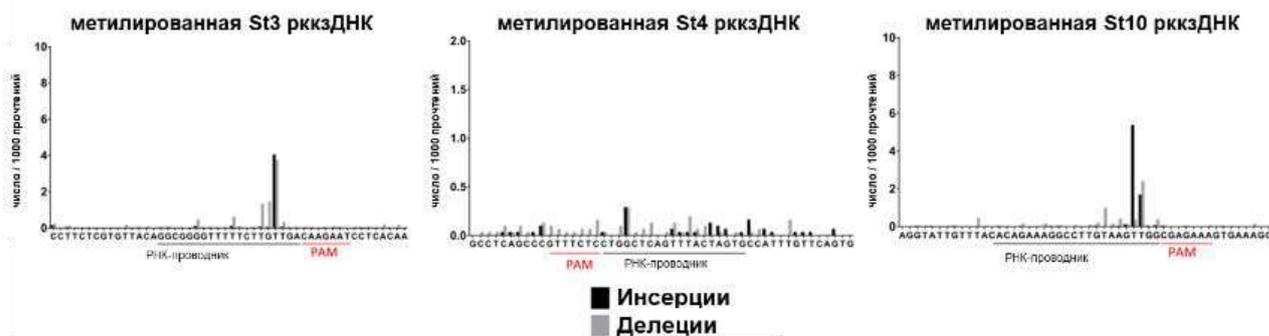
Ранее сообщалось, что высококонденсированные области генома человека расщепляются со стабильно меньшей эффективностью, чем геномные области, связанные с эухроматином. Более того, сложная структура хроматина значительно подавляет расщепление ДНК с помощью CRISPR/Cas9. ккзДНК ВГВ структурно напоминает архитектуру геномной ДНК: ккзДНК связана с гистоновыми и негистоновыми белками, подобно геномной ДНК человека. Предполагается, что эпигенетические модификации ккзДНК ВГВ могут ограничивать разрушение ккзДНК, в частности, под действием деаминаз АРОВЕС. Таким образом, было решено рассмотреть влияние метилирования

ккзДНК ВГВ, частого явления у пациентов с хроническим гепатитом В, связанного с транскрипционно-неактивным состоянием, на анти-ВГВ-активность StCas9 и SpCas9.



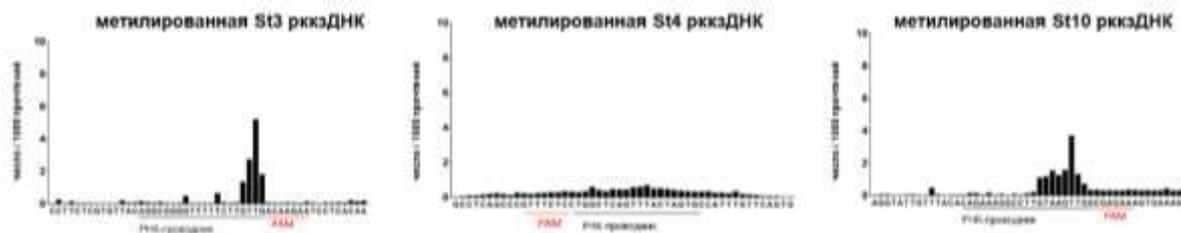
**Рисунок 61. Противовирусная активность CRISPR/Cas9 и влияние мБА-метилирования на противовирусную активность.** Противовирусная активность StCas9 и SpCas9 с различными РНК-проводниками на модели метилированной рккзДНК (А–D). Звездочками отмечены статистически значимые различия. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  [470].

Для нацеливания на метилированную рккзДНК были выбраны наиболее эффективные SpCas9/РНК-проводники, которые нацелены на CpG-островки в рккзДНК: Sp9, который расщепляет рккзДНК на CpG-островке III, и Sp40, который расщепляет CpG-островок II (Рисунок 61). Также использовали РНК-проводник St3, который нацелен на CpG-островок I, и St10, который нацелен на островок II, а также St4, который нацелен на рккзДНК за пределами CpG-островков, но был одним из наиболее эффективных РНК-проводников для системы StCas9. При трансфекции с мет-рккзДНК система SpCas9 снижала уровни пгРНК и S-РНК на  $>90\%$  и мет-рккзДНК на  $>90\%$ . Трансфекция StCas9 привела к снижению транскрипции ВГВ более чем на 80%, снижению рккзДНК на 90% и уменьшению уровней ДНК ВГВ на 40% (Рисунок 61). В связи с тем, что на модели метилированной рккзДНК детектируются очень редкие транскрипты, наиболее надежным маркером для сравнения нуклеолитической активности CRISPR/Cas9 является внутриклеточный уровень рккзДНК. Метилирование рккзДНК не влияло на анти-ВГВ-активность St3, St10, Sp9 и Sp40 (Рисунок 61).



**Рисунок 62. Высокопроизводительное секвенирование целевых сайтов в метилированной и неметилированной ккзДНК [470].**

Однако, St4 снижал уровни метилированной рккзДНК менее выражено, чем неметилированной. Секвенирование рккзДНК в клетках, обработанных CRISPR/Cas с РНК-проводником St4, показало, что частота целевых мутаций была почти в два раза ниже в метилированной, чем в неметилированной рккзДНК (Рисунок 62, 63). Хотя St10 вызывал идентичное снижение уровней неметилированной и метилированной рккзДНК, частота мутаций в метилированной рккзДНК была более чем на 50% ниже по сравнению с неметилированной рккзДНК. Напротив, анти-ВГВ-активность St3 не зависела ни от метилирования, ни от частоты мутаций рккзДНК [470]. Вставки и делеции нуклеотидов обнаруживались с более высокой частотой в неметилированной рккзДНК.



**Рисунок 63. Распределение делеций по секвенированному участку целевой ДНК при действии CRISPR/Cas9 на неметилированной и метилированной рккзДНК ВГВ [470].**

### 5.5. Повреждение генома клеток человека вызывает резкое усиление репликации вируса гепатита В

Частым явлением у пациентов с ХГВ, находящихся на лечении коморбидностей, является реактивация вирусной инфекцией с резким увеличением вирусных биомаркеров и маркеров повреждения печени при приеме определенных лекарственных препаратов. Реактивация ВГВ при действии отдельных препаратов варьируется от 50% до 70%.

Возможность реактивации ВГВ известна для пациентов, получающих терапию иммуносупрессорами, препаратами группы антрациклинов (доксорубин, эпирубин), препаратов, разрушающих В-клетки, при действии ингибиторов ФНО- $\alpha$ , ингибиторов кальцинейрина, тирозинкиназ, контрольных точек иммунного ответа, а также при использовании антиметаболитов [148]. Считается, что основными механизмами реактивации ВГВ при действии различных групп препаратов является подавление иммунного ответа и активация про-вирусных внутриклеточных каскадов. Серологическими факторами риска реактивации ВГВ-инфекции являются уровни анти-НВс антител  $\geq 6,41$  МЕ/мл, либо высокие уровни серологических биомаркеров ВГВ (наличие НВsAg, НВеAg, уровни ДНК ВГВ в сыворотке крови  $>10,000$  МЕ/мл) [148].

Препараты, вызывающие реактивацию ВГВ, можно разделить на несколько основных групп в зависимости от механизма их действия, а именно: (1) вызывающие повреждение ДНК, (2) ингибирование TNF- $\alpha$ , (3) истощение В-клеток, (4) ингибирование гистондеацетилазы, (5) ингибирование хемокинов или ИФН, (6) ингибирование тирозинкиназ и протеасомное ингибирование [148]. Точные механизмы реактивации ВГВ при введении различных агентов остаются в значительной степени неизвестными, но во всех случаях они связаны либо с нарушением иммунного ответа (ингибиторы TNF- $\alpha$ , средства, разрушающие В-клетки, ингибиторы хемокинов и ИФН, ингибиторы киназ, ингибиторы протеасом), либо с активацией транскрипции ккзДНК ВГВ (ингибиторы гистоновой деацетилазы). Ряд свидетельств указывают на то, что реактивация ВГВ может быть связана с окислительным стрессом, повреждением ДНК/реакцией на повреждение ДНК и взаимосвязанными изменениями внутриклеточной передачи сигналов, а также нарушениями в прохождении клеточного цикла [148].

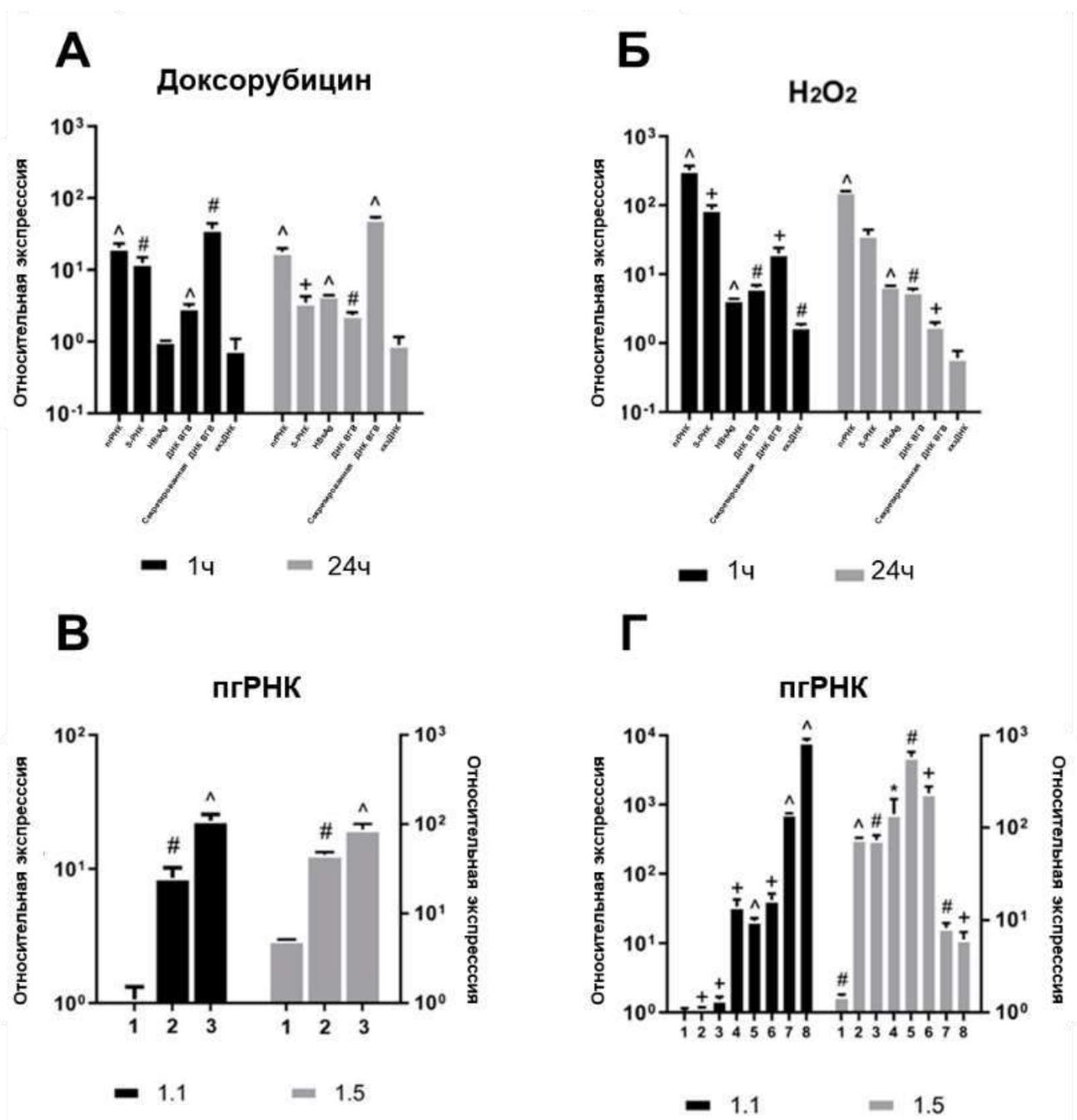
Пути ответа на повреждение ДНК (DDR) включают этап активации ряда киназ, включая фосфатидилинозитол-3-киназоподобные киназы (PIKK), мутантную атаксию-телеангиэктазию (ATM), ATM- и RAD3-связанную (ATR) и каталитическую субъединицу ДНК-зависимую протеинкиназу (DNA-PKcs). Фосфорилирование белков-мишеней PIKK приводит к образованию фосфорилированных очагов H2AX или  $\gamma$ H2AX; очагов p53-связывающего белка (53BP1, один из ключевых белков репарации двухцепочечных разрывов ДНК [DSB]); фосфорилированного ATM; и накопления p53 в ядре [148,484,485]. Активированные ATM и ATR фосфорилируют свои субстраты Chk2 и Chk1, соответственно, что, в свою очередь, влияет на различные биохимические пути клетки, такие как клеточный цикл и транскрипция генов. DDR включает распознавание, инициацию, амплификацию и реализацию клеточных ответов на повреждение ДНК, что в

конечном итоге приводит либо к репарации поврежденной ДНК, либо к старению и гибели клеток.

Для репликации некоторых вирусов требуется активация механизмов DDR. Они могут привлекать ATM, ATR и каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs) и их зависимые белки, а также другие белки DDR, включая MRE11A и RAD51 [486]. Белки DDR являются важными факторами в транскрипции и репликации ВГВ. Клетки печени у пациентов с ХГВ и с ко-инфекцией вирусами гепатита В и гепатита D содержат очаги  $\gamma$ H2AX, маркер активированного DDR. Исследования *in vitro* показали, что инфекция ВГВ активирует DDR и приводит к повышению уровней ATR и фосфорилированной Chk1 [486]. Нокаут ATR снижает транскрипцию и репликацию ВГВ, в основном из-за снижения фосфорилирования Chk1. Кроме того, сообщалось, что DDR повышает активность промоторов ккзДНК ВГВ как *in vitro*, так и *in vivo*. Важно отметить, что цитоплазматический белок ВГВ X (HBx), ключевой фактор транскрипции ккзДНК ВГВ, индуцирует стресс эндоплазматического ретикулума (ER) и повреждение ДНК, активируя сигнальный каскад ATM-checkpoint kinase 2 (Chk2), что приводит к усилению транскрипции и репликации ВГВ. Напротив, ингибиторы киназ ATM и ATR (кофеин и теофиллин) или Chk1 (UCN01) подавляют репликацию ВГВ и патогенез, связанный с ВГВ. Эти данные свидетельствуют о важной роли передачи сигналов DDR в естественном жизненном цикле ВГВ. В соответствии с этим химиотерапевтические агенты, которые индуцируют повреждение ДНК и активируют DDR, такие как доксорубицин и цисплатин, запускают передачу сигналов p53, p21, ATR и Chk1 и могут вызывать реактивацию инфекции ВГВ [486].

Несмотря на имевшиеся данные, точные механизмы реактивации ВГВ при повреждении ДНК, а также роль отдельных компонентов DDR в репликации ВГВ оставались в значительной степени неизвестными [486]А.

Обработка клеток HepG2-1.1merВГВ либо доксорубицином, либо  $H_2O_2$  быстро увеличивает транскрипцию и репликацию ВГВ. Транскрипция ВГВ увеличилась в 15–20 раз при обработке доксорубицином и более чем в 100–300 раз при действии  $H_2O_2$  (Рисунок 64А, Б). Транскрипция ВГВ сопровождается повышением уровня внутриклеточной и секретируемой ДНК ВГВ и HBsAg. Уровни промежуточных соединений ВГВ увеличиваются уже через 1 час после обработки и остаются повышенными через 24 часа после удаления химических веществ [486].



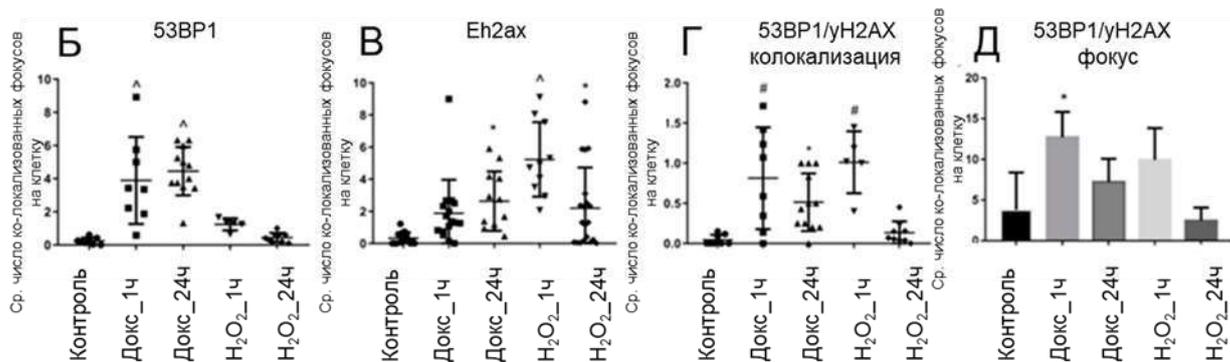
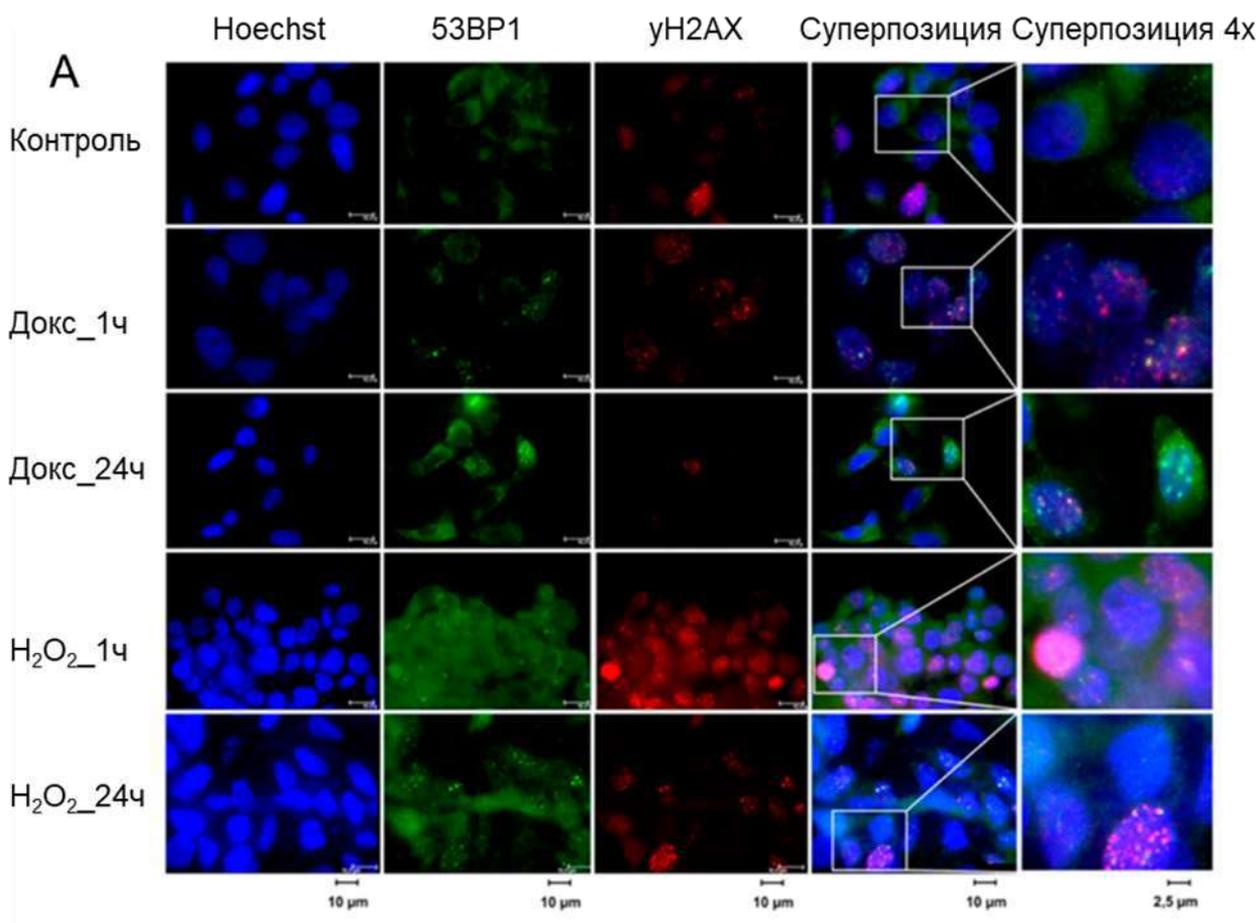
**Рисунок 64. Активация репликации ВГВ под действием ДНК-повреждающих агентов.** Изменения уровней ВГВ (pgRNA, S-РНК, внутриклеточной ДНК ВГВ, секретируемой ДНК ВГВ и секретируемой HBsAg) при обработке (А) доксорубицином и (Б) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в клетках HepG2-1.1merVGV. Влияние высоких доз (В) доксорубицина и (Г) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на уровни pgRNA в клетках HepG2-1.1merVGV (1.1) и клетках HepG2-1.5merVGV (1.5). Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях по сравнению с контролем. \* p < 0,05, + p < 0,01, # p < 0,001, ^ p < 0,0001 [486].

Затем было изучено влияние различных доз доксорубицина и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> на уровни pgRNA ВГВ в ВГВ-реплицирующих клеточных линиях HepG2-1.1merVGV и HepG2-1.5merVGV

(Рисунок 64В, Г). Самая высокая испытанная доза доксорубицина (0,5 мкМ, таблица 1) индуцировала 20-100-кратную активацию транскрипции ВГВ в обеих клеточных линиях. Низкие концентрации  $H_2O_2$  в 2–4 мМ увеличивали уровни пгРНК ВГВ до 8000 раз по сравнению с необработанными клетками. Однако, в клетках HepG2-1.1merВГВ применение  $H_2O_2$  в концентрациях выше 7 мМ приводило к снижению уровней пгРНК ВГВ [486].

Доксорубицин и  $H_2O_2$  индуцируют повреждение ДНК, а DDR приводит к образованию очагов  $\gamma H2AX$  и 53BP1 [486]. Для оценки активации DDR в клетках HepG2-1.1merВГВ при действии доксорубицина либо  $H_2O_2$  проводили иммуноцитохимическое окрашивание (ИЦХ) на маркеры DDR  $\gamma H2AX$  и 53BP1 (Рисунок 65). Для этого клетки обрабатывали доксорубицином и  $H_2O_2$  в течение 1 ч и анализировали методом ИЦХ сразу или через 24 ч после обработки. Обработка клеток доксорубицином и  $H_2O_2$  вызывала серьезное повреждение клеточной ДНК, о чем свидетельствует образование множественных очагов  $\gamma H2AX$  и 53BP1 (Рисунок 64). Доксорубицин индуцировал образование множественных очагов  $\gamma H2AX$  и 53BP1 уже через 1 ч после обработки; среднее количество очагов  $\gamma H2AX$  и 53BP1 увеличилось через 24 часа. Очаги  $\gamma H2AX$  и 53BP1 были локализованы совместно. Последний является общепринятым маркером индукции двухцепочечных разрывов ДНК (ДЦР), подтверждающим более ранние результаты. В отличие от доксорубицина,  $H_2O_2$  индуцировал образование множественных отдельных очагов  $\gamma H2AX$ , не ко-локализованных с 53BP1. Эти данные показали, что  $H_2O_2$  в основном вызывает одноцепочечные разрывы ДНК (SSB). Удаление  $H_2O_2$  приводило к исчезновению значительной доли фокусов  $\gamma H2AX$  и 53BP1 уже через 24 ч после обработки, что свидетельствует о репарации ДНК [486].

Формирование фокусов  $\gamma H2AX$  и 53BP1 происходит вскоре после повреждения ДНК и связано с активностью РИКК, а именно ATM, ATR и DNA-РКcs (Рисунок 66, 67). С помощью полуколичественной ПЦР был проведен анализ транскрипции ATM, ATR и DNA-РКcs, а также RAD51 (фактор DDR) и фактора, участвующего в распознавании повреждения ДНК, MRE11A. Было обнаружено, что обработка клеток доксорубицином и  $H_2O_2$  значительно увеличивала уровни мРНК ATM и ATR, в то время как транскрипция других факторов DDR оставалась практически неизменной [486]. Доксорубицин и  $H_2O_2$  индуцировали более чем 10-кратное усиление транскрипции ATM и ATR.



**Рисунок 65. Изучение факторов репарации двуцепочечных разрывов в ответ на обработку доксорубицином и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в модели репликации ВГВ. (А) Детекция фокусов 53BP1 (зеленый) и  $\gamma$ H2AX (красный) через 1 ч и 24 ч после обработки доксорубицином (dox) или H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. Ядра клеток окрашивали красителем Hoechst33342 (синий). Количественный анализ (Б) фокусов 53BP1 и (В)  $\gamma$ H2AX, (Г) среднее число всех ко-локализованных фокусов 53BP1/ $\gamma$ H2AX на клетку и (Е) процент ко-локализованных фокусов 53BP1/ $\gamma$ H2AX, рассчитанный как отношение ко-локализованных фокусов к общему числу фокусов обоих типов [486].**

### 5.6. Реактивация вируса гепатита В при повреждении генома связана с транскрипционной активацией факторов ATM и ATR

Чтобы выяснить роль DDR в реактивации и репликации ВГВ, мы проанализировали репликацию ВГВ в клетках после повреждения ДНК, вызванного доксорубицином - препаратом, повреждающим ДНК и используемым для лечения различных злокачественных новообразований, либо перекисью водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), классическим генотоксическим агентом. В результате было показано, что доксорубицин и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> вызывают масштабное повреждение ДНК, что, в свою очередь, усиливает транскрипцию ATM и ATR и стимулирует репликацию ВГВ [486].

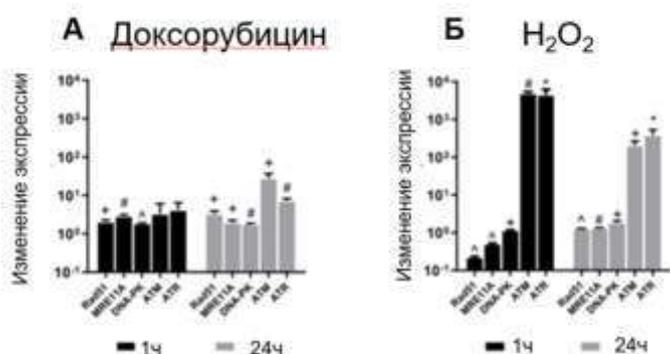


Рисунок 66. Изменение уровней экспрессии факторов DDR при действии ДНК-повреждающих агентов доксорубицина и пероксида водорода после 1 ч и 24 ч обработки [486].

ДНМТ3А является одним из многих факторов, участвующих в развитии НСС, вызванного ВГВ [38]. Как сообщалось нами и другими, репликация ВГВ сама по себе значительно увеличивает повреждение ДНК, распознаваемое по увеличению  $\gamma$ H2AX, фосфорилированной формы гистона H2A.X, традиционно считающегося маркером повреждения ДНК. Одним из ключевых механизмов прогрессирующей нестабильности генома, вызванной ДНМТ3А, является подавление генов, участвующих в контроле клеточного цикла и репарации ДНК [486].

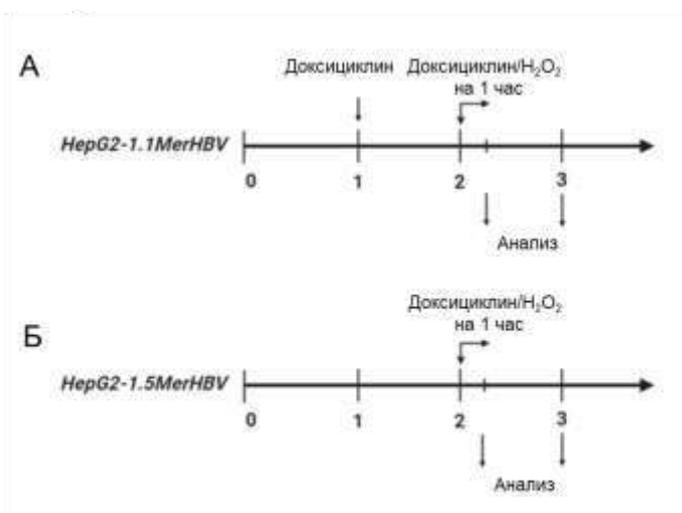
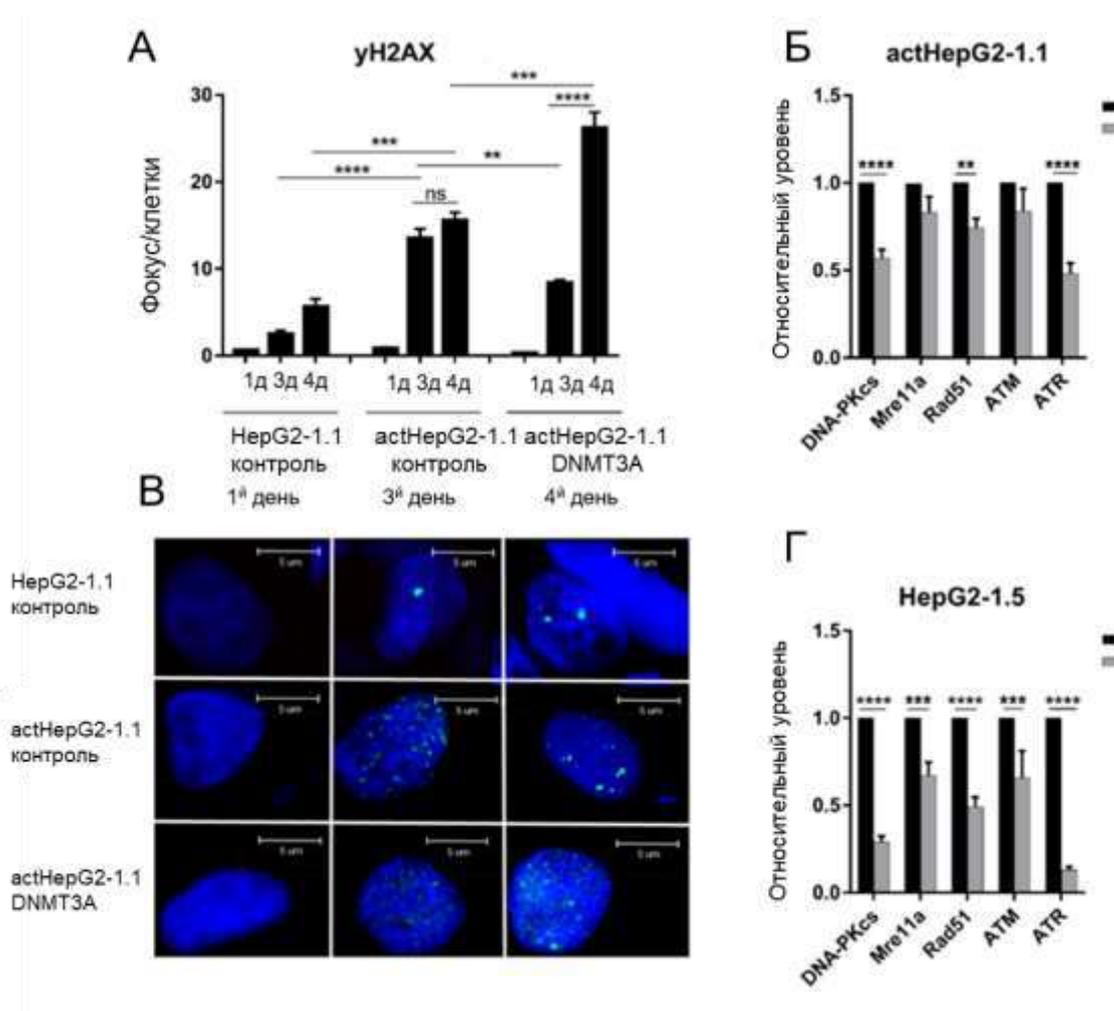


Рисунок 67. Схема эксперимента обработки клеток доксорубицином и H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> [486].

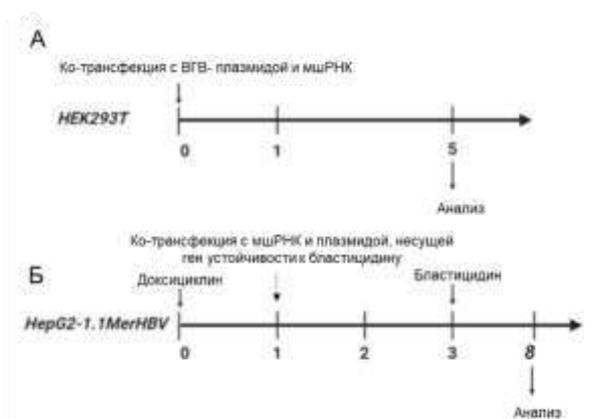
В нашем исследовании мы наблюдали образование многочисленных очагов  $\gamma$ H2AX, образующиеся в клетках с активированной репликацией ВГВ (Рисунок 68, 69). Спонтанные очаги  $\gamma$ H2AX наблюдались в неактивированных клетках HepG2-1.1 без доксициклина, но их количество было значительно ниже по сравнению с клетками с активной репликацией ВГВ (actHepG2-1.1). Затем проводили исследование влияния сверхэкспрессии ДНМТ3А на количество очагов  $\gamma$ H2AX. Сверхэкспрессия ДНМТ3А приводила к значительно большему количеству очагов  $\gamma$ H2AX. Повышенное образование очагов  $\gamma$ H2AX в клетках со сверхэкспрессией ДНМТ3А может быть связано с aberrантной экспрессией факторов репарации повреждений ДНК (DDR) [486].



**Рисунок 68. ВГВ и ДНМТ3А вызывают повреждение ДНК.** (А) Фокусы  $\gamma$ -H2AX в клеточных линиях ВГВ и клетках, сверхэкспрессирующих ДНМТ3А. (Б) иммуноцитохимия  $\gamma$ -H2AX. Клетки окрашивали на  $\gamma$ -H2AX (зеленый); ядра клеток окрашивали красителем Hoechst33342 (синий). (В, Г) Изменения в уровнях экспрессии факторов репарации двуцепочечных разрывов в клетках при гиперэкспрессии ДНМТ3А. Уровни мРНК измеряли относительно мРНК GAPDH. Относительные уровни экспрессии рассчитывали с использованием метода  $\Delta\Delta$ CT. Звездочками отмечены статистически значимые различия. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  [486].

Восстановление повреждений ДНК может быть нарушено метилированием промоторных областей в генах DDR с помощью ДНМТ3А, что приводит к подавлению экспрессии факторов DDR. Чтобы проанализировать различия в экспрессии DDR в наших условиях, проводили измерения уровней экспрессии факторов DDR DNA-РКcs, RAD51, MRE11A, ATM и ATR в actHerG2-1.1 и HerG2-1.5, трансфицированных или не трансфицированных плазмидой ДНМТ3А. Некоторые из этих факторов также участвуют в репликации и реактивации ВГВ [486]. Конститутивная экспрессия ДНМТ3А снижала уровни DNA-РКcs, RAD51 и ATR на обеих клеточных линиях (Рисунок 68Б, Г). Примечательно, что ДНМТ3А может снижать репликацию ВГВ не только эпигенетически, но и за счет снижения уровней ATM/ATR [486].

В заключение, экспрессия ДНМТ3А, по-видимому, способствует нестабильности генома, индуцируя aberrantную экспрессию факторов DDR.

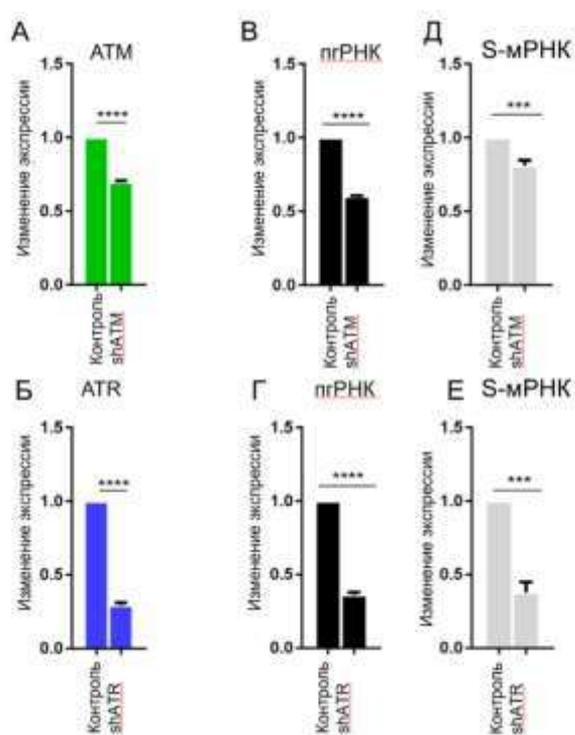


**Рисунок 69. Схемы экспериментов по нокдауну факторов ATM и ATR в клетках HEK293T и HerG2 [486].**

Вслед за этим, проводили нокдаун факторов ATM и ATR в клеточной линии HerG2-1.1merВГВ. Первоначально миРНК тестировали в клетках HEK-293T, трансфицированных миРНК и плазмидой, экспрессирующей ВГВ (Рисунок 70). Клетки HEK-293T экспрессируют большой Т-антиген SV40 (SV40LT), который может маскировать DDR, тем не менее, они представляют собой удобную систему для первичной оценки эффектов миРНК на репликацию ВГВ. миРНК против ATM (shATM) снижал уровень экспрессии ATM на 20%, тогда как shRNA против ATR (shATR) полностью блокировал транскрипцию ATR. Интересно, что частичный нокдаун транскрипции ATM снижал пгРНК ВГВ более чем на 40% и S-РНК на 10%, в то время как отмена транскрипции ATR снижала ее примерно на 50–60% [486].

Трансфекция shATM или shATR снижала транскрипцию целевого гена примерно на 80% (Рисунок 71, 72). Отключение ATM также немного снижало уровни транскрипции ATR и MRE11A (Рисунок 71А, Б), тогда как отключение ATR значительно снижало экспрессию

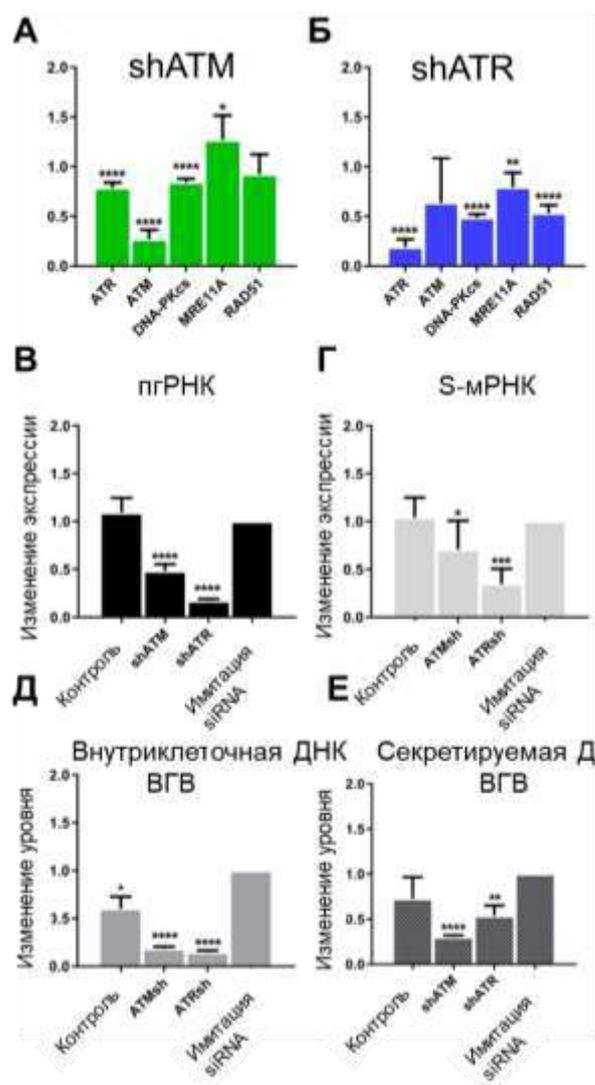
мРНК ATM, DNA-PKcs и RAD51. Как shATM, так и shATR снижали уровни пгРНК ВГВ (Рисунок 71В), S-РНК ВГВ (Рисунок 71Г), внутриклеточной ДНК ВГВ (Рисунок 71Д) и секретируемой ДНК ВГВ (Рисунок 71Е)). ShATR также снижал внутриклеточные уровни ДНК ВГВ, секретируемой ДНК ВГВ и пгРНК на 50–85%.



**Рисунок 70. При снижении уровней транскрипции факторов ATM и ATR происходит снижение транскрипции ВГВ.** Снижение транскрипции гена-мишени в клетках НЕК-293Т, трансфицированных siRNA, нацеленных на (А) ATM и (В) ATR. Влияние подавления экспрессии ATM (А) и ATR (Б) на уровни ВГВ (В, Г) и S-РНК (Д, Е). Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях по сравнению с контролем. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [486].

Точно так же shATM снижал уровни внутриклеточной и секретируемой ДНК ВГВ примерно на 80% и уровни пгРНК примерно на 50%. Влияние кшРНК на экспрессию S-РНК было менее выраженным. Эти данные показывают, что ATM и ATR играют важную роль в репликации ВГВ *in vitro* [486].

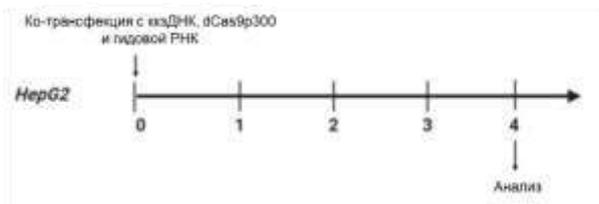
Вслед за этим, изучили обратный эффект – влияние активации транскрипции ATM и ATR на репликацию ВГВ (Рисунок 73). Провели дизайн РНК-проводников, нацеленных на регуляторные элементы генов ATM и ATR, и трансфицировали комплексы для CRISPR-активации транскрипции в клетки НерG2. Трансфекция CRISPRa повышала уровни ATM более, чем в 600 раз, и уровни ATR более, чем в 4 раза, по сравнению с отрицательным контролем. В клетках НерG2, ко-трансфицированных CRISPRa и рекомбинантной ккзДНК ВГВ (Рисунок 73А). CRISPRa-опосредованная активация транскрипции ATM или ATR индуцировала репликацию ВГВ. Сверхэкспрессия ATM приводила к 40–140-кратному увеличению транскрипции ВГВ, ~4-кратному увеличению уровней внутриклеточной ДНК ВГВ и ~2-кратному увеличению уровней секретируемой ДНК ВГВ (Рисунок 73В-Д).



**Рисунок 71. Подавление репликации ВГВ после нокдауна факторов АТМ и АТР.** Изменения в уровнях транскрипции факторов репарации двуцепочечных разрывов в клетках HepG2–1.1merВГВ, трансфицированных (А) shRNA АТМ и (Б) shRNA АТР. Подавление АТМ (shATM) и АТР (shATR) снижает (В) pRPA ВГВ, (Г) S–РНК ВГВ, (Д) уровни внутриклеточной ДНК ВГВ и (Е) уровни секретируемой ДНК ВГВ. Результаты были воспроизведены как минимум в 3 независимых экспериментах. Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях по сравнению с контролем. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [486].

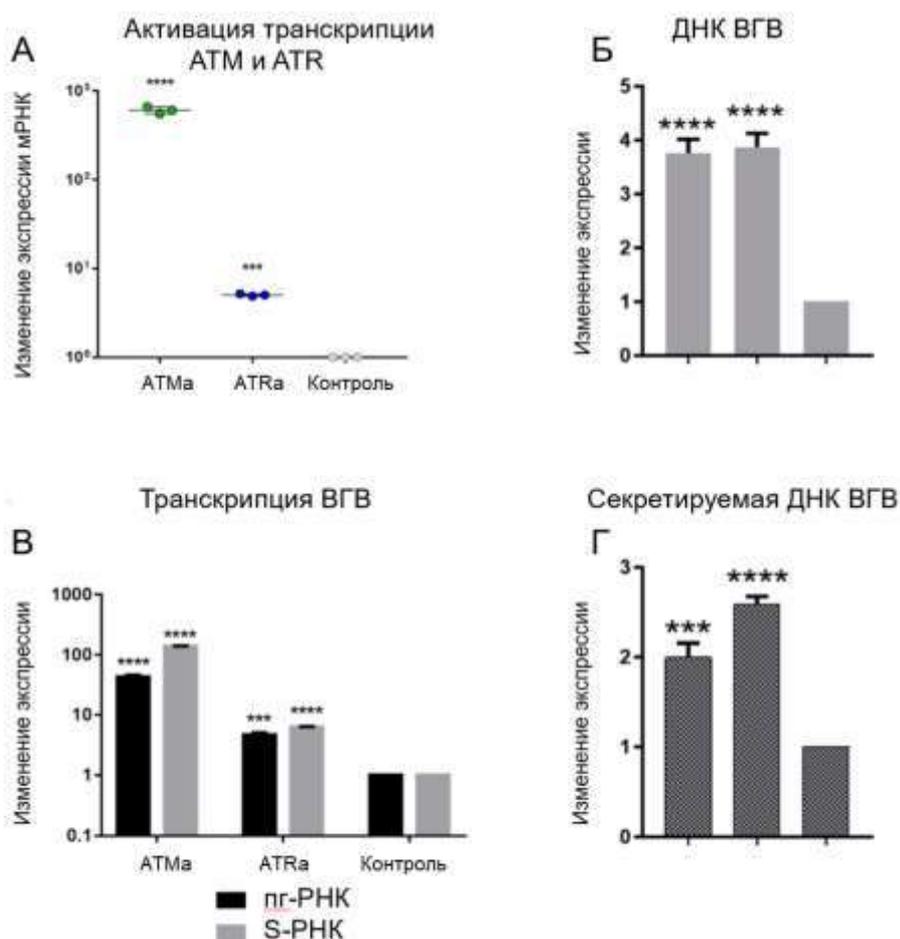
Гиперэкспрессия АТР также была связана с повышенной репликацией ВГВ, хотя и в меньшей степени, чем гиперэкспрессия АТМ. Это привело к примерно 6-кратному увеличению транскрипции ВГВ, ~ 4-кратному увеличению внутриклеточной ДНК ВГВ и уровням секретируемой ДНК ВГВ. Эксперименты с кшРНК показали, что АТР сильнее влияет на репликацию ВГВ, чем АТМ. Меньшее увеличение репликации ВГВ из-за активации транскрипции АТР по сравнению с АТМ могло быть связано с более низкой эффективностью первого [486].

Более ранние исследования показали, что репликация ВГВ в клетках человека приводит к повреждению ДНК, вызванному несколькими независимыми механизмами. Тридцать лет назад Саровilla А и соавт. продемонстрировали, что Х-белок ВГВ связывается с поврежденной ДНК и повышает чувствительность клеток печени к ультрафиолетовому облучению [486,487].



**Рисунок 72.** Схема эксперимента по активации целевых генов ATM и ATR в клетках HepG2 с использованием системы dCas9-r300 на модели рекомбинантной ккзДНК ВГВ[486].

Дальнейшие исследования показали, что он препятствует репарации клеточной ДНК, ингибируя восстановление удаленных нуклеотидов. Пути DDR, по-видимому, используются ВГВ для репликации и реактивации. Ключевыми киназами, активируемыми в ответ на повреждение ДНК, являются ATM и ATR. Чжао Ф и др. показали, что инфекция ВГВ запускает передачу сигналов DDR ATR, в то время как подавление экспрессии ATR снижает репликацию ВГВ. Несмотря на это открытие, фактическая роль ATM, ATR и других факторов DDR в репликации и реактивации ВГВ остается в значительной степени неизвестной [486].



**Рисунок 73.** Активация транскрипция ATM и ATR усиливает репликацию ВГВ. (А) уровни мРНК ATM или ATR при активации транскрипции ATM (ATMa) или ATR (ATRa). Влияние ATMa и ATRa на (Б) транскрипцию ВГВ и уровни (В) внутриклеточной и (Г)

секретируемой ДНК ВГВ. Результаты были воспроизведены как минимум в 3 независимых экспериментах. Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях по сравнению с контролем. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [486].

Доксорубин и  $H_2O_2$  вызывают повреждение ДНК. В данном исследовании, при изучении влияния повреждения ДНК на репликацию ВГВ, с помощью подобранных концентраций генотоксических агентов, удалось индуцировать схожее повреждение генома клеток человека, что подтверждается результатами ИЦХ по числу фокусов окрашивания на маркеры  $\gamma H2AX$  и 53BP1. Оба соединения значительно усиливают транскрипцию ATM и ATR, в то время как относительные уровни транскрипции других факторов DDR, таких как DNA-PKcs, MRE11A или RAD51, остаются неизменными [486]. Доксорубин и  $H_2O_2$  вызывают повреждения ДНК разных типов. Доксорубин индуцирует ДЦР ДНК, характеризующиеся ко-локализованными фокусами  $\gamma H2AX$  и 53BP1, которые запускают передачу сигналов ATM.  $H_2O_2$  редко индуцирует ДЦР, но генерирует многочисленные одноцепочечные разрывы в ДНК, характеризующиеся множественными фокусами  $\gamma H2AX$  и редкими фокусами 53BP1, которые запускают передачу сигналов ATR. Оба типа повреждения ДНК значительно повышали репликацию ВГВ. Однако повреждение, вызванное  $H_2O_2$ , активирует транскрипцию ATM и ATR более эффективно и приводит к более высоким уровням интермедиатов ВГВ, чем ДЦР, индуцированные доксорубином [486]. Эти результаты демонстрируют роль факторов различных повреждений ДНК на передачу сигналов ATM и ATR и реактивацию ВГВ.

Предыдущие крупномасштабные исследования показали, что киназы ATM и ATR фосфорилируют сотни субстратов и инициируют обширные изменения в функционировании клеток. После повреждения ДНК, ATM и ATR быстро перепрограммируют транскрипционные и посттранскрипционные профили поврежденных клеток [148,486]. Имеются данные о том, что ATM/ATR может участвовать в ремоделировании эпигенома (HDAC1/4, EZH2), передаче сигналов контрольных точек клеточного цикла, регуляции транскрипции генов, контроле стабильности РНК и других процессах. Эти события лежат в основе роли передачи сигналов ATM и ATR в вирусной репликации, продемонстрированной для герпесвирусов, папилломавирусов и полиомавирусов [148,486]. Наши данные показывают, что передача сигналов ATM и ATR является важным фактором хозяина, участвующим в репликации ВГВ, особенно в запуске реактивации ВГВ. Молекулярный механизм (механизмы) провирусной активности ATM и передачи сигналов ATR для ВГВ, а также для других вирусов еще предстоит выяснить. В последнем работе, опубликованной Loboova с соавт., была рассмотрена роль киназ ATM/ATR в фосфорилировании белка НВс и жизненном цикле ВГВ. Белок НВс ВГВ

фосфорилируется по остатку 170 серина по пути ATM-Chk, вызывая увеличение уровней внутриклеточного Hbc антигена и секретируемого HBe в культуральной среде. Фосфорилирование Hbc по пути ATM-Chk2 наблюдается при действии ДНК-повреждающих агентов, включая этопозид и пероксид водорода. В этой работе были воспроизведены результаты наших исследований и подтверждена более выраженная роль ATM в потенцировании репликации ВГВ.

В эпоху противовирусных препаратов прямого действия реактивацию ВГВ можно успешно контролировать в клинической практике. Тем не менее, реактивация инфекции часто оказывается смертельной для пациентов с ХГВ или скрытой инфекцией ВГВ и онкопатологией. Реактивация ВГВ зависит от многих факторов, таких как иммунный статус пациентов, мутации ВГВ, коинфекция другими вирусами и/или дополнительные методы лечения, такие как те, которые назначаются пациентам с онкологическими заболеваниями [148,486]. Наши результаты по взаимосвязи уровней экспрессии ATM/ATR с репликацией и реактивацией ВГВ в ответ на повреждение ДНК указывает на необходимость тщательного выбора препаратов, назначаемых пациентам, инфицированным ВГВ, чтобы избежать реактивации инфекции.

В заключение, репликация ВГВ тесно связана с DDR, а именно с передачей сигналов ATM и ATR. Активация последних агентами, повреждающими ДНК, может способствовать реактивации ВГВ. В этой связи, необходимы дальнейший анализ передачи сигналов DDR на уровне белка и тестирование известных лекарств и новых соединений на способность влиять на передачу сигналов ATM/ATR и репликацию ВГВ.

### **5.7. Транскрипционно-инактивированная форма генома вируса гепатита В может реактивировать вирусную репликацию при участии белка HBx**

В редких случаях, при сероконверсии по HBsAg, может происходить подавление вирусной репликации с развитием иммунологического контроля над вирусной инфекцией и функциональным излечением ХГВ. Считается, что помимо иммуно-опосредованного контроля за распространением инфекции и внутриклеточной репликацией, происходит эпигенетическая блокада/подавление вирусной репликации. Ряд противовирусных препаратов на ранних этапах разработки направлены на эпигенетическое ремоделирование ккзДНК ВГВ с блокированием транскрипции ВГВ. В частности, перспективные препараты, нацеленные на белок HBx ВГВ и взаимодействие HBx с факторами эпигенетической регуляции (SMC5/6, KAT2A, HMGB1), могут вызывать стабильное подавление активности ккзДНК ВГВ (транскрипционная блокада вирусной репликации) [488–491]. Снижение/блокада транскрипции с ккзДНК блокирует вирусную репликацию, существенно

снижает риски прогрессии ХГВ и наступление исходов ХГВ – рака и цирроза печени. Внутри ядра НВх белок может эпигенетически ремоделировать состояние хроматина ккзДНК, привлекая гистоновые деацетилазы HDAC1, Sirt1, факторы транскрипции E2F1, и гистоновые ацетилтрансферазы, такие как p300, CBP и др. [492] Кроме того, усиление транскрипции ккзДНК ВГВ может происходить за счет цитоплазматической фракции белка НВх; НВх содержит С-концевой регион, имеющий тропность к мембранам митохондрий. Экспрессия НВх в цитоплазме клеток индуцирует образование активных форм кислорода, повреждающих структуру генома инфицированных клеток за счет внесения одноцепочечных и двуцепочечных разрывов [493]. Активация путей репарации в ответ на повреждение ДНК (DNA damage response signaling, DDR) вызывает сопутствующее усиление жизненного цикла вируса, воздействуя на разные этапы репликации ВГВ, в том числе транскрипцию ккзДНК.

Вместе с этим, при использовании ряда препаратов в случае лечения коморбидностей у пациентов с ХГВ либо скрытой формой ХГВ может происходить реактивация инфекции, которая проявляется в виде резкого увеличения уровней вирусной репликации, подъемом уровней АЛТ (повреждение печени) и, в некоторых случаях, наступления фульминантной формы вирусного гепатита с декомпенсацией функции печени и гибелью пациентов.

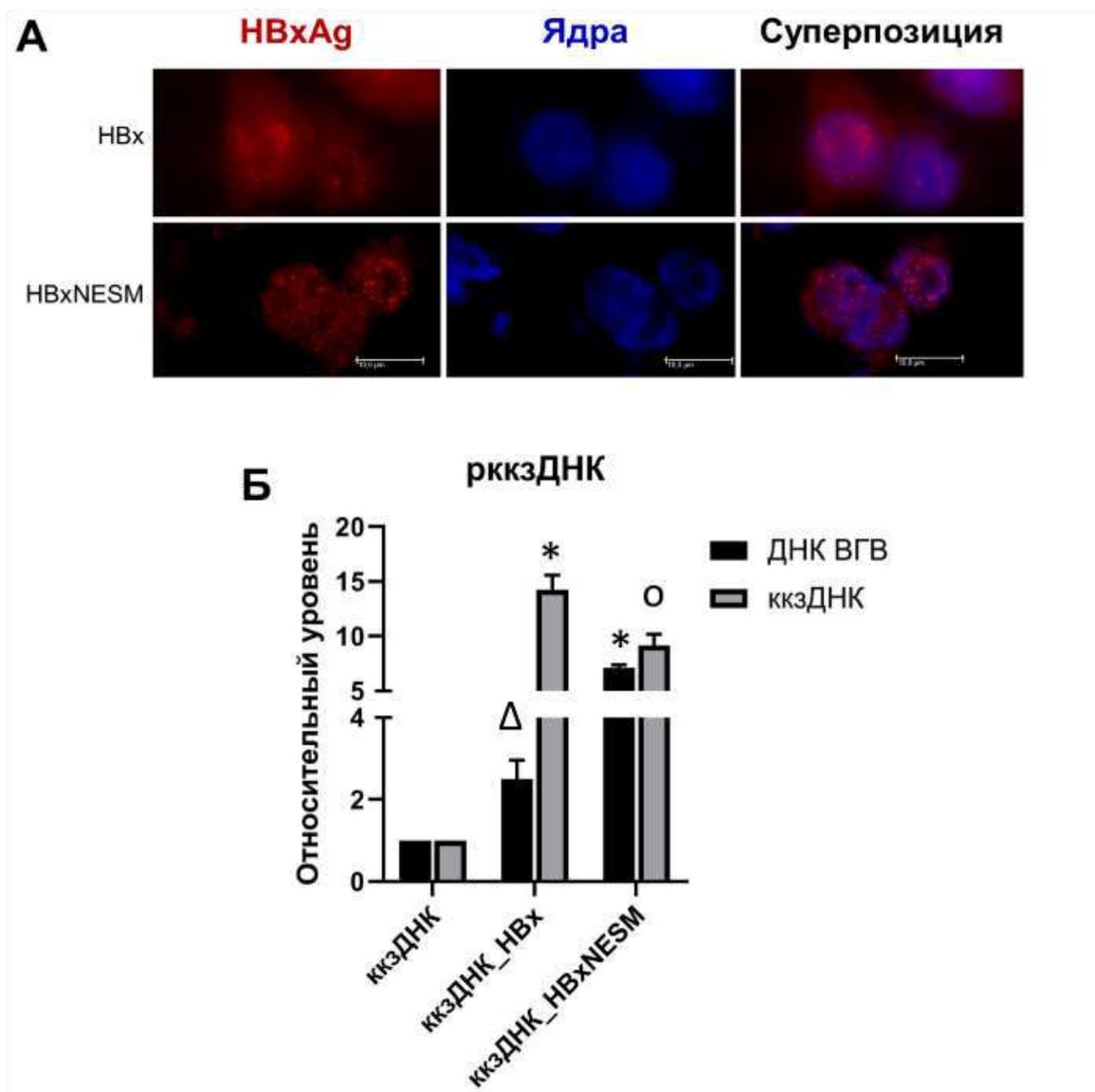
Выделяют два основных механизма реактивации ВГВ-инфекции при действии лекарственных препаратов: за счет иммуносупрессии – как показано для препаратов кортикостероидов, ритуксимаба и др., а также за счет активации про-вирусных внутриклеточных каскадов (доксорубин, винкристин, цисплатин и пр.).

Белок ВГВ НВх – основной регулятор транскрипции и репликации ВГВ в инфицированных клетках. НВх продуцируется вскоре после инфекции, и необходим для запуска транскрипции остальных мРНК ВГВ. Белок НВх локализуется в ядре и цитоплазме клеток. В ядре НВх, как правило, контролирует транскрипцию ккзДНК ВГВ, нарушает функционирование механизмов противовирусной защиты и проявляет трансактивирующую активность, участвуя в трансформации клеток. Цитоплазматическая фракция НВх вызывает образование активных форм кислорода, воздействует на клеточное дыхание, что приводит к индукции повреждений геномной ДНК, включая образование двуцепочечных разрывов. Локализация НВх-белка в клетке во многом определяется уровнями внутриклеточной продукции НВх; при низких уровнях экспрессии НВх локализуется главным образом в ядре клеток [494,495]. При повышении уровней НВх происходит выравнивание уровней НВх в ядре и цитоплазме; при гиперэкспрессии НВх

распределяется преимущественно в цитоплазму клеток [495,496]. Трансактивация ккзДНК ВГВ белком НВх может регулироваться как за счет прямого воздействия НВх на ккзДНК, так и за счет модификации, привлечения факторов транскрипции либо блокирования взаимодействия эпигенетических факторов с ккзДНК.

В последние несколько лет появилось множество свидетельств того, что пути ATM и ATR играют важную роль в положительной регуляции репликации ВГВ. ATM и ATR принадлежат к семейству киназ, родственных фосфоинозитид-3-киназе (PI3K) класса IV (PIKK), наряду с мишенью рапамицина млекопитающих (mTOR) и ДНК-зависимой протеинкиназой (DNA-PK). Они являются ключевыми регуляторами реакции на повреждение ДНК (DDR) и поддерживают целостность генома в эукариотических клетках. ATM/ATR действуют на разнообразные мишени, такие как CHK1, CHK2 (checkpoint kinase 1, 2), p53, H2AX, NBS1, BRCA1 и др. Активируемые мишени влияют на различные клеточные пути, включая контрольные точки клеточного цикла и транскрипцию генов. Типичными субстратами ATM и ATR являются белки с остатками серина или треонина, а также глутамина. Как упомянуто выше, ATM и ATR участвуют в различных этапах репликации ВГВ, включая этап конверсии кчдДНК в ккзДНК, а также увеличение транскрипции и репликации ккзДНК ВГВ. Роль НВх-белка в реактивации ВГВ-инфекции из инактивированного состояния до исследований нашей лаборатории оставались полностью не изученными [497,498].

В рамках изучения роли НВх в регуляции экспрессии сигнальных путей ATM и ATR были получены белок НВх дикого типа и белок НВх с мутацией в сигнале ядерного экспорта (NES) (НВх-NESM), которая нарушает экспорт НВх из ядра в цитоплазму. Методом иммуноцитохимического окрашивания была подтверждена исключительно внутриядерная локализация НВх-NESM (белок не детектируется в цитоплазме), а также распространение НВх дикого типа по всей клетке, в ядре и цитоплазме (Рисунок 74А). Контранфекция рекомбинантной ккзДНК ВГВ с вариантами НВх-кодирующих плазмид продемонстрировала, что НВх дикого типа и НВх-NESM оба повышают уровни вирусных интермедиатов в клетке, при этом НВх дикого типа главным образом увеличивает уровни ккзДНК, тогда как НВх-NESM в меньшей степени повышает как внутриклеточное содержание ккзДНК, так и кчдДНК (Рисунок 74Б). Следовательно, оба варианта белка НВх усиливают внутриклеточные уровни интермедиатов ВГВ, однако в разной степени влияют на параметры вирусной репликации.

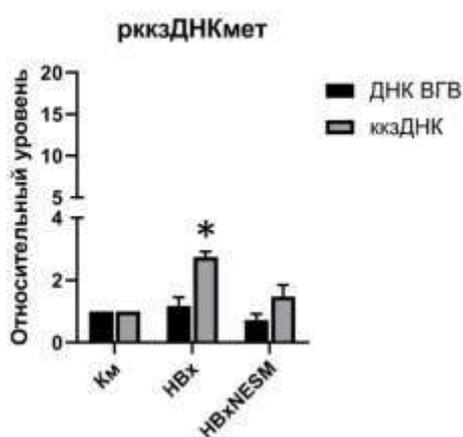


**Рисунок 74. Влияние HBx и HBxNESM на уровни репликацию ВГВ.** (А) Иммуноцитохимическое окрашивание на белок HBx. Ядра окрашивали красителем Hoescht33324 (Б) Уровни внутриклеточной ДНК ВГВ (чёрные столбцы) и ккзДНК ВГВ (серые столбцы) при действии HBx либо HBxNESM. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. Уровни значимости: + $p < 0,05$ ;  $\Delta p < 0,01$ ;  $\circ p < 0,005$ ; \* $p < 0,001$  [148].

Известно, что геном ВГВ может существовать в виде гетерогенного пула, состоящего из матриц ккзДНК в различном эпигенетическом состоянии. Изучение различных эпигенетических вариантов ккзДНК особенно актуально в связи с созданием новых противовирусных препаратов, действующих на эпигенетическое состояние вирусных геномов, а также в связи с высокими рисками реактивации ВГВ у лиц с анти-HBc антителами (маркером контакта с ВГВ-инфекцией). При разрешении острой ВГВ-инфекции ккзДНК может пожизненно сохраняться в гепатоцитах человека, что связывают с

иммунологическим контролем инфекции и подавлением активности ВГВ как на системном, так и на клеточном уровне. При использовании иммуносупрессантов, ряда лекарственных препаратов, а также у лиц с иммунодефицитом (например, у ВИЧ-инфицированных пациентов), частым явлением является реактивация ВГВ-инфекции.

ккзДНК ВГВ содержит 4 канонических и несколько неканонических островков CpG (в зависимости от генотипа вируса), а также множество динуклеотидов CpG. Известно, что ккзДНК может метилироваться клеточными ДНК-метилтрансферазами по островкам CpG; этот механизм задействован при сероконверсии по HBeAg у HBeAg-положительных пациентов с ХГВ. Кроме того, метилирование ккзДНК приводит к снижению вирусной репликации. При прогрессии ХГВ, в особенности в гепатоцеллюлярную карциному, происходит выраженное увеличение активности ДНК-метилтрансфераз с сопутствующим увеличением метилирования ккзДНК ВГВ и подавлением вирусной инфекции. В серии работ наш коллектив впервые провел оценку действия различных факторов, включая лекарственные препараты и варианты белка HBx ВГВ, на репликацию ВГВ в состоянии *in vitro*, биохимически гиперметилированной ккзДНК.



**Рисунок 75.** Влияние HBx на репликацию неактивной транскрипционно рккзДНК. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0,001$  [148].

Возможное влияние HBx на реактивацию инактивированной ккзДНК имеет важное значение в определении механизмов усиления вирусной репликации. С целью изучения потенциальной возможности реактивации ккзДНК из неактивного состояния, была получена гиперметилированная форма ккзДНК. На модели гиперметилированной ккзДНК была проведена оценка уровней интермедиатов вируса при ко-трансфекции плазмид, кодирующих HBx дикого типа, HBx-NESM либо контрольной плазмиды. В результате, было выявлено, что только белок HBx дикого типа вызывает увеличение уровней ккзДНК ВГВ, в то время как HBxNESM не оказывает значимого влияния на образование интермедиатов ВГВ из транскрипционно инактивированного состояния ккзДНК (Рисунок 75). Это свидетельствует о том, что взаимодействие HBx с ккзДНК не играет роли в

реактивации гиперметилированной ккзДНК; вместо этого, очевидно, в реактивации ккзДНК участвуют факторы, индуцированные НВх в цитоплазме.

### **5.8. Белок НВх потенцирует влияние ДНК-повреждающих агентов на репликацию и реактивацию метилированной и не метилированной ккзДНК вируса гепатита В**

Вслед за этим, было проведено изучение влияния вариантов белка НВх (НВх дикого типа и НВхNESM) на возможность и выраженность реактивации ВГВ при действии генотоксических агентов, а именно доксорубина и пероксида водорода, и препаратов таргетной терапии (сунитиниба и бортезомиба) (Рисунок 76, 77). Влияние НВх на реактивацию ВГВ было изучено в том числе для препаратов таргетной терапии, механизм действия которых кардинально отличается от ДНК-повреждающих соединений, и состоит в блокаде отдельных сигнальных путей. Препараты таргетной терапии нашли широкое применение в лечении различных онкологических заболеваний.

Среди препаратов таргетной терапии средний риск реактивации ВГВ-инфекции у пациентов с ХГВ либо историей контакта с ВГВ (1-10%) показан для ингибиторов протеасом и ингибиторов тирозинкиназ. В качестве модельных препаратов таргетной терапии были выбраны известные лекарственные препараты сунитиниб и бортезомиб. Сунитиниб – ингибитор тирозинкиназ широкого профиля, действующий на рецепторы фактора роста эндотелия сосудов, колониестимулирующего фактора роста, а также FLT3 (FMS-like tyrosine kinase 3), также подавляет активность c-kit и оказывает миелосупрессивное действие. До настоящего времени реактивацию ВГВ при действии сунитиниба связывали с общим иммуносупрессивным действием. Сунитиниб также может повреждать ДНК в клетках человека и незначительно усиливать уровни мРНК факторов ATM и ATR. Одним из механизмов про-вирусного действия сунитиниба также является способность сунитиниба останавливать клеточный цикл в фазе G1/S, что может способствовать накоплению ккзДНК в инфицированных клетках.

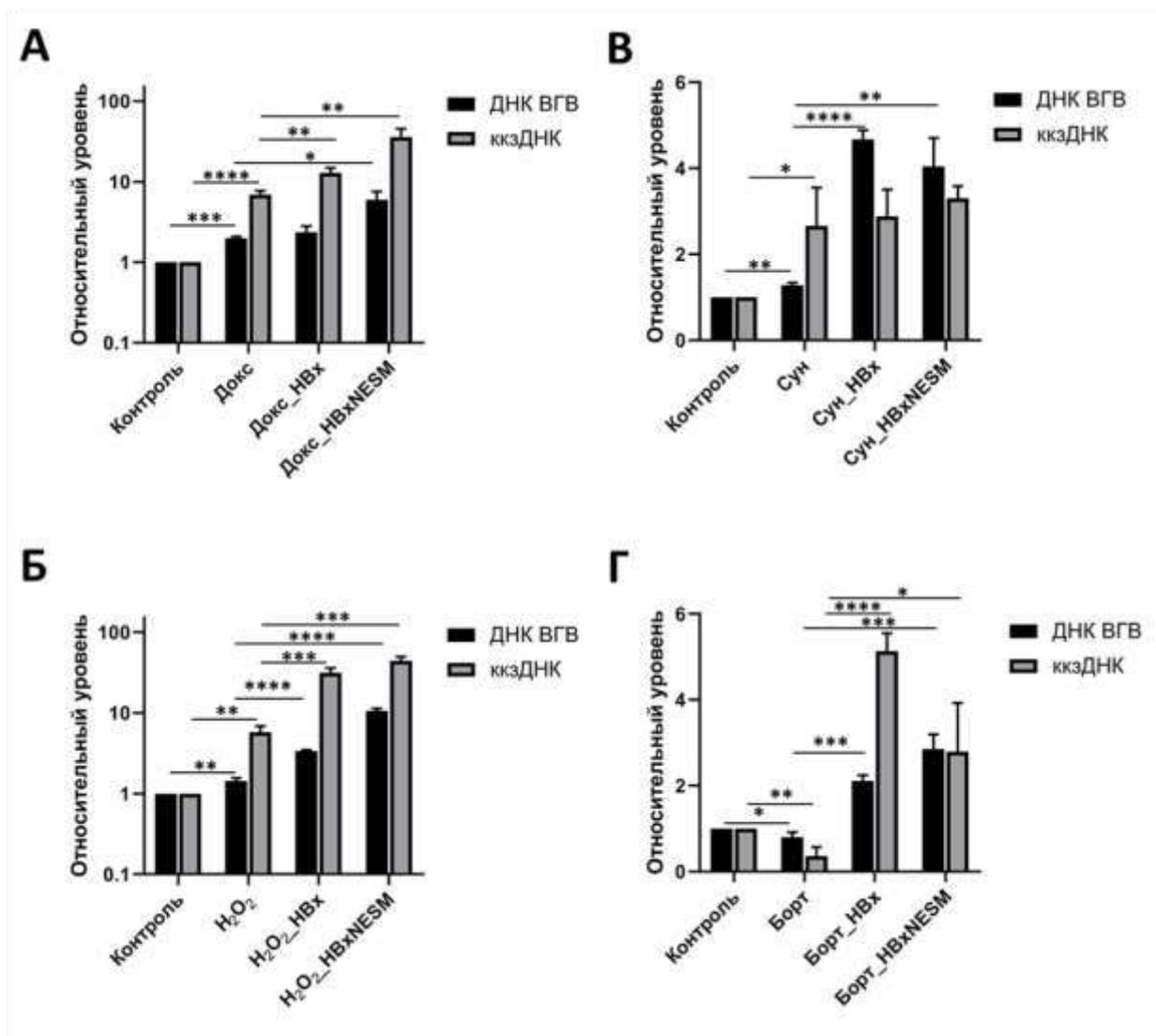
Бортезомиб – антинеопластический агент, ингибитор протеасом, используется в онкологии при лечении множественной миеломы и различных видов лимфом. Помимо действия на трансформированные клетки, бортезомиб может угнетать функцию иммунных клеток (В-клеток и плазматических клеток), способствуя вирусной репликации. Тем не менее, на модели трансгенных мышей при действии бортезомиба происходило снижение параметров вирусного цикла более, чем на 90%. При этом был выявлен доз-зависимый эффект бортезомиба: дозы в 1 мг/кг ингибировали репликацию ВГВ, тогда как при дозе в 5 мг/кг наблюдалось усиление вирусной репликации. В ряде других работ, при

использовании ингибиторов протеасом, происходило увеличение уровней НВх (за счет нарушения протеасомной деградации вирусных белков) с увеличением всех параметров жизненного цикла ВГВ.

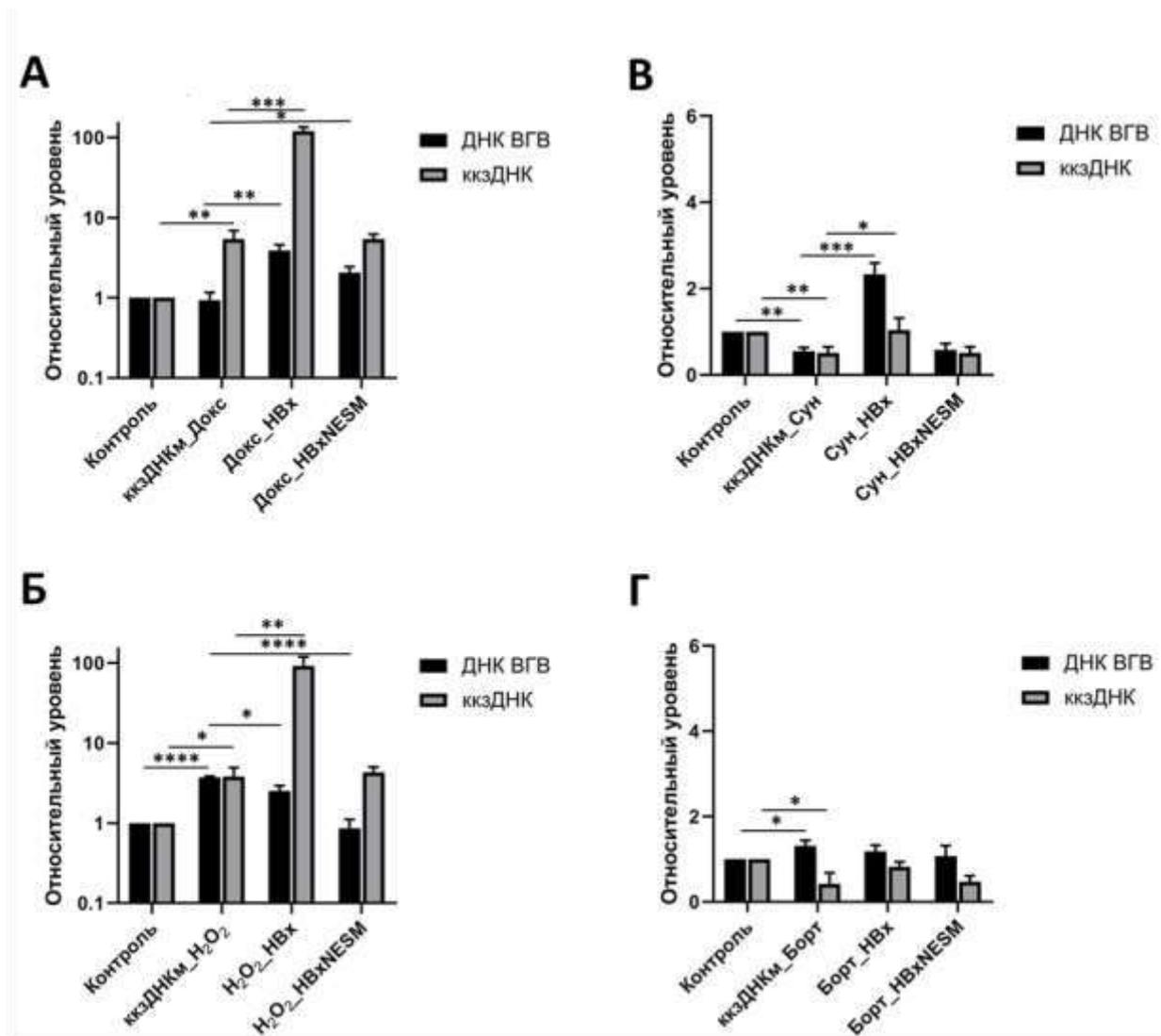
В условиях эксперимента проводили анализ уровней интермедиатов ВГВ на модели ко-трансфекции рекомбинантной ккзДНК ВГВ с плазмидами, кодирующими НВх, НВхNESM либо некодирующей плазмидой. Трансфицированные клетки обрабатывали растворами ДНК-повреждающих соединений либо препаратов таргетной терапии (бортезомибом либо сунитинибом), а также диметилсульфоксидом (DMSO) в качестве контроля.

Ожидаемо, доксорубин и пероксид водорода вызывали выраженное (до 10 раз) увеличение уровней общей внутриклеточной ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ. При этом ко-трансфекция НВх дикого типа значительно усиливал эффекты доксорубина и пероксида водорода. Использование НВхNESM приводило к воспроизводимому, значимому увеличению уровней ДНК ВГВ (до 10 раз в сравнении с контролем) и ккзДНК ВГВ (до 100 раз в сравнении с контролем). Следовательно, оба варианта НВх потенцируют реактивацию ВГВ при действии ДНК-повреждающих агентов. Однако, НВхNESM оказывает более выраженное влияние на реактивацию ВГВ; это указывает на трансактивирующую активность НВх как на ведущий механизм потенцирования вирусной реактивации (Рисунок 76).

Среди препаратов таргетной терапии, только сунитиниб вызывал незначительное (до 2-3 раз), но значимое увеличение уровней ккзДНК при обработке трансфицированных клеток, в то время как бортезомиб снижал вирусную репликацию. При ко-трансфекции с вариантами НВх репликация ВГВ возрастала в ~4-5 раз, что сопоставимо с действием НВх/НВхNESM с ДМСО в контрольной группе. Это указывает на отсутствие либо слабую реактивирующую способность препаратов таргетной терапии [148].



**Рисунок 76. Влияние белков HBx на реактивацию ВГВ–инфекции при действии генотоксических агентов и препаратов для таргетной терапии. Репликация ВГВ при действии (А) доксорубина, (Б) пероксида водорода, (В) сунитиниба и (Г) бортезомиба. Анализ проводился по оценке параметров ДНК ВГВ и ккзДНК с помощью ПЦР в реальном времени. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,005$ ; \*\*\*\* $p < 0,001$  [148]**



**Рисунок 77. Реактивация метилированной ккзДНК ВГВ.** Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ при обработке клеток с метилированной рккзДНК (А) доксорубицином, (Б) пероксидом водорода, (В) сунитинибом и (Г) бортезомибом. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ ; \*\*\* $p < 0.005$ ; \*\*\*\* $p < 0.001$  [148].

Впервые при изучении действия различных групп препаратов *per se* и совместно с вариантами белков НВх выявлена возможность реактивации ккзДНК ВГВ из транскрипционно инактивированного, гиперметилированного состояния (Рисунок 77). Продемонстрировано, что генотоксические агенты вызывают реактивацию репликации ВГВ: доксорубин увеличивал уровни ккзДНК ВГВ в ~5,5 раз, обработка раствором пероксида водорода увеличивала уровни внутриклеточной ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ в ~4 раза (Рисунок 77А, Б). Препараты таргетной терапии не оказывали существенного влияния на появление репликативных интермедиатов ВГВ (Рисунок 77В, Г).

В отличие от транскрипционно-активной ккзДНК, когда при действии генотоксических препаратов и НВхNESM происходила наиболее выраженная (до 100-кратного увеличения) реактивация репликации ВГВ, на модели транскрипционно-инактивированной ккзДНК только вариант НВх дикого типа потенцировал жизненный цикл вируса. Это соответствует первичным данным по исключительной роли НВх дикого типа, но не НВхNESM, в реактивации ВГВ из гиперметилированного состояния. Уровни репликации ВГВ при ко-трансфекции НВхNESM не отличались от монообработки генотоксическими соединениями. Монообработка либо совместное действие препаратов таргетной терапии с вариантами НВх также не выявили реактивации ВГВ.

В рамках данных исследований впервые была выявлена возможность дополнительного потенцирования про-вирусного действия генотоксических агентов вариантами белка НВх, при этом НВхNESM вызывал наиболее выраженную реактивацию ВГВ. Вместе с этим, наблюдается практически полное отсутствие про-вирусного действия препаратов таргетной терапии (сунитиниба и бортезомиба) и отсутствие аддитивного эффекта при ко-трансфекции вариантов НВх.

Впервые была выявлена возможность реактивации ВГВ из транскрипционно-инактивированного состояния (состояние гиперметилирования), но только при действии НВх дикого типа. Косвенно это указывает на то, что в данном случае реактивация происходит не за счет прямого взаимодействия НВх с матрицами ккзДНК, а за счет активации про-вирусных каскадов в цитоплазме клеток. Важно отметить, что генотоксические агенты в варианте монотерапии также способны реактивировать гиперметилированную форму ккзДНК ВГВ, при этом НВх дикого типа может потенцировать этот эффект [148].

Белок НВх в нормальных условиях вирусной репликации необходим для инициации транскрипции и поддержания персистенции ВГВ. Обычно НВх локализован как в ядре, так и в цитоплазме, при этом локализация НВх может меняться в различных условиях и зависеть от уровней репликации вируса. В ядре НВх может напрямую взаимодействовать с ккзДНК, а также привлекать различные про-вирусные факторы (факторы транскрипции, факторы формирования эухроматина, факторы регуляции эпитранскриптома). В цитоплазме НВх локализуется в мембраны митохондрий, вызывает индукцию образования активных форм кислорода и активирует пути DDR, пути выживания клеток, пролиферации клеток и др., модулирует пути метаболизма и транскрипции. Протеомный анализ показал, что НВх является партнером >100 различных белков инфицированной клетки. В данной работе впервые выявлены отличия в действии двух форм белка НВх на репликацию ВГВ, а

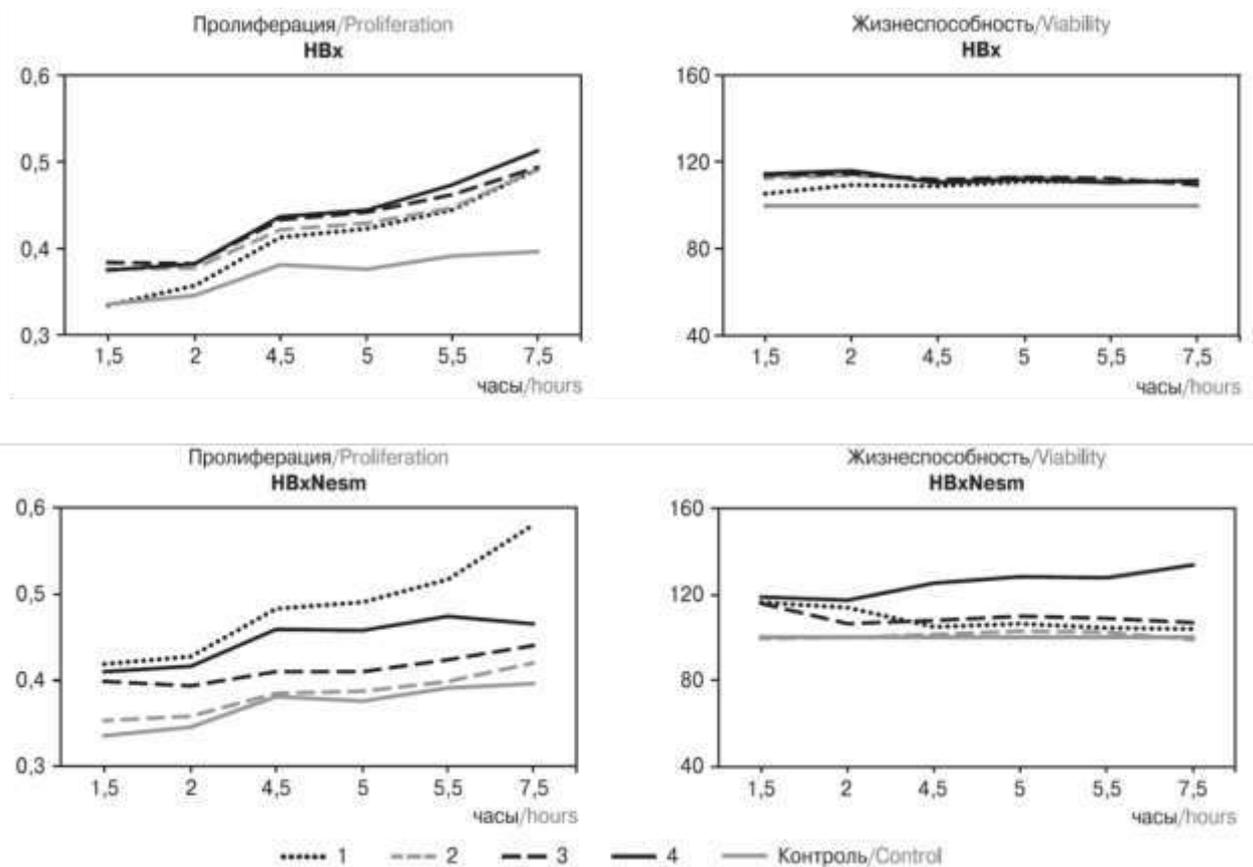
также определены особенности действия НВх на активную и инактивированную формы генома вируса.

### **5.9. Эффекты НВх на действие сайт-направленных нуклеаз**

ккзДНК ВГВ существует в виде хромосомы. Считается, что эпигенетическая модификация ккзДНК ВГВ (эу- либо гетерохроматизация) может влиять на доступность ккзДНК сайт-специфическим нуклеазам и другим противовирусным факторам. Потенциально, одной из причин, по которым матрицы ккзДНК не подвергаются расщеплению, является существование ккзДНК в суперскрученном либо эпигенетически экранированном состоянии [499]. Существование подобных форм минихромосом ккзДНК может не распознаваться либо слабо распознаваться и расщепляться системами CRISPR/Cas9. Действительно, Cas9 белок проявляет сниженную способность расщеплять ДНК в областях гетерохроматина.

В 2022 году было продемонстрировано, что при делеции гена НВх (фактора инициации транскрипции ккзДНК ВГВ), мутированная ккзДНК расщепляется CRISPR/Cas9 менее эффективно, чем ккзДНК дикого типа. В 2019 году нашим коллективом впервые было изучено влияние про-вирусного фактора НВх на действие сайт-направленных нуклеаз. При этом были изучены НВх дикого типа, а также мутированные варианты НВх: (1) НВхmut (не взаимодействует с про-апоптотическими факторами Bcl2/Bcl-xL) и (2) НВхNESM (с мутацией, блокирующей ядерный экспорт белка; исключительно внутриядерная локализация НВхNESM препятствует образованию активных форм кислорода в цитоплазме клеток). В серии экспериментов с раститровкой плазмид, кодирующих НВх белки, был изучен доз-зависимый эффект НВх на противовирусное действие CRISPR/Cas9. Также впервые было проведено сравнение эффектов различных вариантов НВх на жизнеспособность и пролиферацию клеток НерG2 с ВГВ.

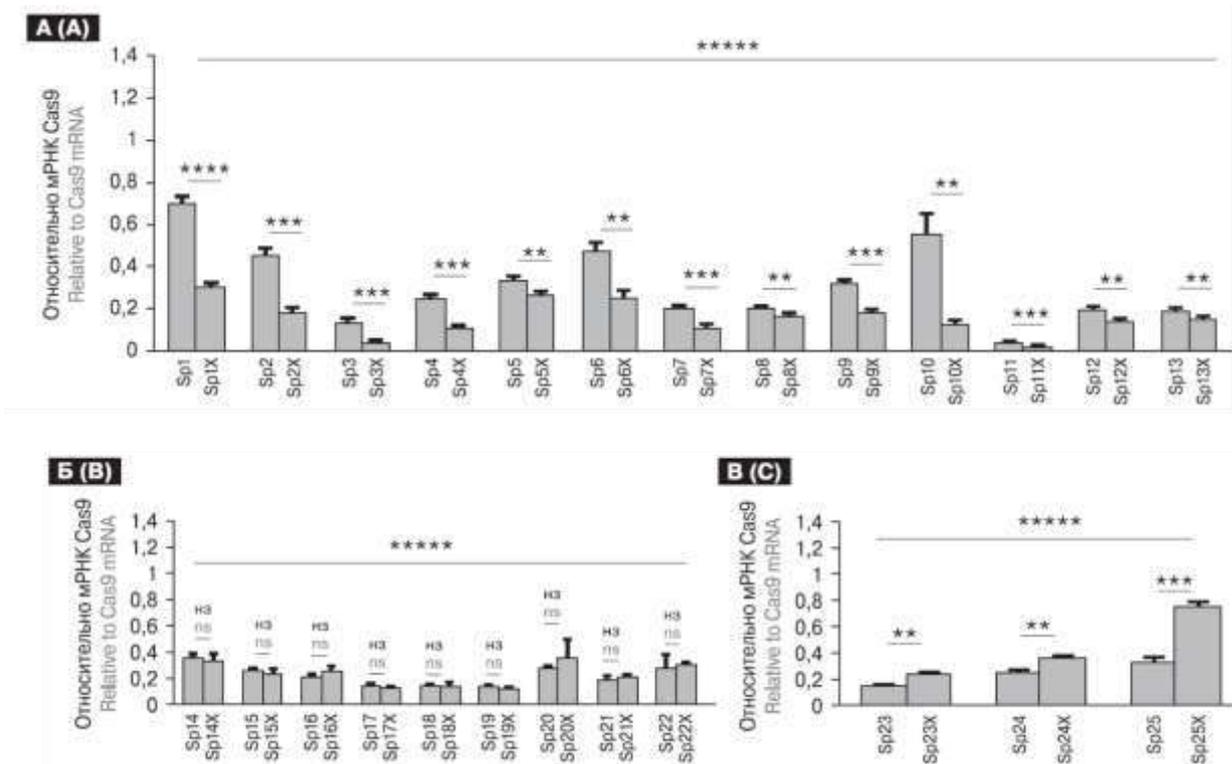
При оценке действия вариантов НВх в дозах 0,05 мг, 0,25 мг, 0,45 мг и 0,65 мкг на пролиферацию клеток НерG2 выяснилось, что даже в минимальной дозе происходит увеличение пролиферации. Все варианты белков НВх схоже увеличивали пролиферацию клеток НерG2 при увеличении дозы кодирующих плазмид, однако НВхNESM в дозе 0,65 мг вызывал резкое, наиболее выраженное увеличение пролиферации клеток. Жизнеспособность клеток при действии всех вариантов НВх не изменялась (Рисунок 78).



**Рисунок 78. Влияние HBx белков ВГВ без мутаций (дикого типа) и мутированных форм (HBxmut, HBxNESM) на пролиферацию и жизнеспособность клеток HepG2 [500].**

Влияние HBx на противовирусное действие CRISPR/Cas9 (система от организма *Streptococcus pyogenes*) оценивали при использовании РНК-проводников, нацеленных на 25 регионов в геноме ВГВ (1-25) (Рисунок 79). Все 25 РНК-проводников изначально было отобраны в ходе масштабного скрининга, и демонстрировали эффективное подавление цикла ВГВ со снижением уровней пгРНК на 29–96%. В качестве контроля использовали системы CRISPR/Cas9 с некодирующей плазмидой вместо HBx-кодирующих вариантов плазмид. При использовании HBx и CRISPR/Cas9 с нетаргетирующим РНК-проводником наблюдалась существенное увеличение вирусной репликации по уровням пгРНК (увеличение в  $6,12 \pm 1,02$  раз). При таргетировании 9 регионов ккзДНК ко-трансфекция HBx не вызывала статистически значимых изменений противовирусной активности CRISPR/Cas9. Для 3 регионов эффективность CRISPR/Cas9 снижалась на 9-42%. Однако, при таргетировании более, чем половины всех регионов (13 мишеней) ко-трансфекция плазмидой HBx значительно усиливала эффективность противовирусного действия CRISPR/Cas9 (дополнительное снижение уровней пгРНК ВГВ на 2-42%). Комбинация HBx с РНК-проводником Sp11 обеспечивало снижение уровней пгРНК ВГВ на 98% (Рисунок 79).

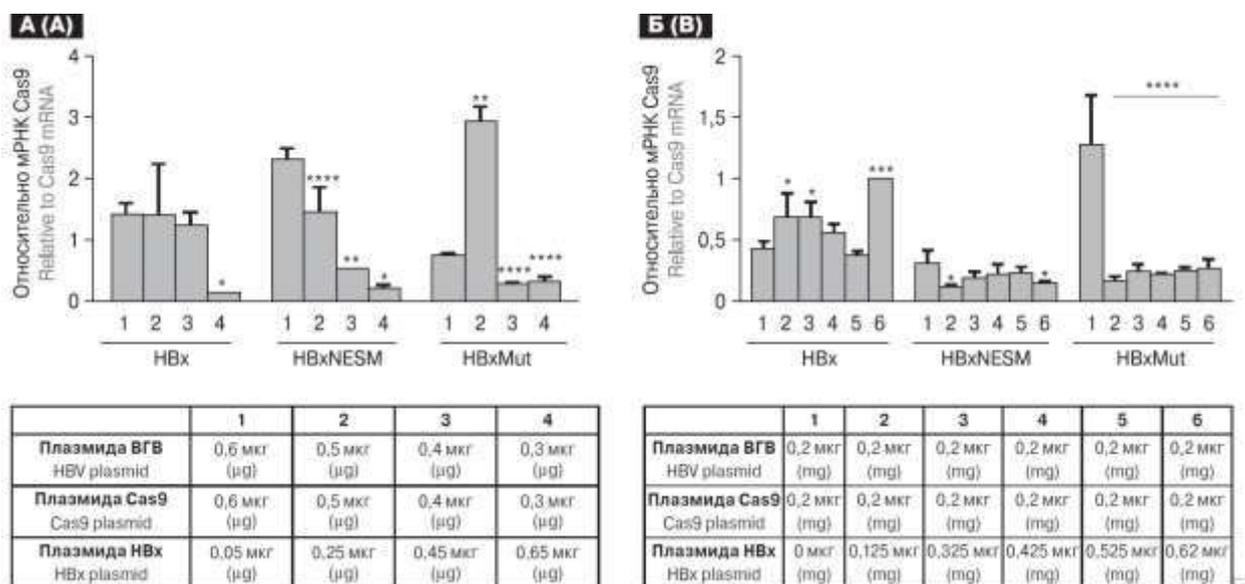
Важно отметить, что наиболее заметное улучшение противовирусной активности CRISPR/Cas9 за счет НВх происходило с РНК-проводниками, в нормальных условиях слабо влияющими на репликацию ВГВ. Действительно, более, чем 2-х кратное увеличение противовирусной активности наблюдалось с малоэффективными (снижающими уровни пРНК ВГВ на 20-40%) РНК-проводниками Sp1, Sp2, Sp6 и Sp10. Это может указывать на то, что причиной низкой противовирусной активности данных РНК-проводников могут быть участки гетерохроматина, которые неэффективно распознаются и расщепляются системами CRISPR/Cas9 [500].



**Рисунок 79.** Эффект гиперпродукции НВх белка ВГВ на противовирусное действие CRISPR/Cas9. (А) Уровни экспрессия прегеномной РНК после действия системы *S. ruogenes* CRISPR/Cas9 и котрансфекции с белком НВх (Б–В) РНК-проводники, эффективность которых не изменяется (Б) снижается (В) при котрансфекции НВх дикого типа. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \*\* $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ , нз — незначимые отличия [500]

Для сравнения действия различных вариантов НВх на анти-ВГВ активность CRISPR/Cas9 были использованы 2 РНК-проводника – Sp9, мишенью которого является высококонсервативный регион ккзДНК ВГВ, идентичный у самых распространенных генотипов ВГВ А, В, С и D, а также Sp11, продемонстрировавший самую выраженную

противовирусную активность [499]. В первую очередь были определены оптимальные соотношения плазмид Cas9, HBx и ВГВ, необходимые для достижения максимального противовирусного эффекта (Рисунок 80). Выявлено, что минимальные количества Cas9/ВГВ и максимальные – HBx, необходимы для наиболее эффективного противовирусного действия системы. Вслед за этим, была проведена раститровка концентраций плазмид HBx, HBxNESM и HBxmut (0 мкг, 0,125 мкг, 0,325 мкг, 0,425 мкг, 0,525 мкг и 0,62 мкг). Выяснилось, что HBxmut и HBxNESM уже в минимальной дозе резко усиливают противовирусную эффективность CRISPR/Cas9, при этом увеличение дозы не приводит к дальнейшему росту противовирусной активности. Для белка HBx дикого типа наблюдалось доз-зависимое увеличение противовирусной эффективности CRISPR/Cas9 [500].



**Рисунок 80. Эффекты мутированных белков HBx и белка HBx дикого типа в различных концентрациях на противовирусное действие CRISPR/Cas9. (А) Подбор оптимальных соотношений плазмид, кодирующих Cas9, HBx или мутантных форм HBxmut, HBxNESM и ВГВ с РНК-проводником Sp11 (Б) Определение доз-зависимых эффектов HBx белка дикого типа и мутантных форм HBx на противовирусное действие CRISPR/Cas9 систем [500].**

Ремоделирование эпигенетического состояния ккзДНК ВГВ потенциально может способствовать увеличению эффективности распознавания, нуклеолитической и противовирусной активности систем CRISPR/Cas9. Действительно, в ряде работ было продемонстрировано, что эффективности расщепления геномных локусов в областях гетерохроматина значительно снижена для систем CRISPR/Cas9. В рамках исследований нашим коллективом были использованы различные варианты белка HBx, основного

инициатора и активатора транскрипции ВГВ, и определена возможность увеличения противовирусной эффективности действия систем CRISPR/Cas9. Был проведен анализ влияния НВх на противовирусную активность сайт-направленных нуклеаз при таргетировании 25 регионов ВГВ. Более, чем в половине всех регионов, активности CRISPR/Cas9 значительно увеличивалась при использовании НВх. Более того, в случае использования низкоэффективных РНК-проводников, трансфекция НВх ВГВ наиболее выразительно повышала противовирусную активность CRISPR/Cas9, что указывает на роль эпигенетических модификаций в ограничении эффективности действия CRISPR/Cas9. Кроме того, с одним из самых эффективных РНК-проводников Sp11 ко-трансфекция НВх позволяла достичь 98% эффективности снижения уровней пРНК ВГВ [500].

Основными выводами данных исследований являются следующие: (1) низкая эффективность действия CRISPR/Cas9 в отдельных регионах связана с особенностями компактизации ккзДНК ВГВ; (2) использование НВх позволяет усилить противовирусное действие CRISPR/Cas9, направленных на отдельные регионы вирусного генома; (3) усиление противовирусной активности происходит при использовании любых вариантов НВх белка, но наиболее выражено для НВхmut и НВхNESM.

## **Глава 6. Влияние факторов АРОВЕС/AID на репликацию вируса гепатита В и клетки человека**

### **6.1. Усиление образования ккзДНК при подавлении транскрипции вируса гепатита В ассоциировано со снижением экспрессии противовирусных факторов**

Внутриклеточные противовирусные системы распознавания и удаления чужеродной ДНК являются фундаментальными защитными механизмами, необходимыми для функционирования клеток человека. ДНК патогенных организмов (например, геномы микроорганизмов и вирусов), а также непатогенная ДНК (например, утечки ДНК из ядра и т.д.) представляют угрозу для клеток млекопитающих и должны быть удалены механизмами врожденного иммунитета. Чужеродная ДНК может распознаваться различными цитоплазматическими и внутриядерными рецепторами, включая Toll-подобные рецепторы (TLR), или независимым от TLR способом. Открытие TLR и их роли в распознавании вирусных, бактериальных и других чужеродных ДНК стало важным шагом в понимании механизмов функционирования врожденного иммунитета. За последние десять лет было открыто множество сенсоров нуклеиновых кислот. Ключевая роль в распознавании внутриклеточной ДНК и реагировании на экзогенную ДНК отводится сигнальному каскаду cGAS/STING, который распознает ДНК в цитоплазме клеток.

Защитный ответ cGAS/STING основан на том факте, что ДНК отсутствует в цитоплазме в нормальных физиологических условиях; иными словами, любая цитоплазматическая ДНК может быть расценена клеткой как сигнал опасности.

Кроме того, утечка ДНК может происходить при повреждении ядер, митохондрий или лизосом. Эти события указывают на значительное повреждение целостности клетки, что сигнализирует о необходимости запуска механизмов защиты или гибели клетки. При появлении ДНК в цитоплазме, происходит быстрое связывание ДНК молекулами cGAS с последующим образованием димеров STING. Оба компонента являются ключевыми сигнальными молекулами в пути cGAS/STING. Димеры STING способствуют активации TBK-1 и IRF-3, двух главных факторов транскрипции, которые вызывают широко распространенную активацию экспрессии факторов врожденного иммунного ответа. Помимо cGAS, в распознавании цитозольной ДНК принимает участие ряд других факторов, в том числе absent in melanoma 2 (AIM2); семейство белков с доменом пирин и HIN (PYHIN); ДНК-зависимый активатор IRF (DAI); белок 41 бокс-хеликазы DExD/H (DDX41); DNA-PK; и IFN-индуцируемый белок 16 (IFI16). Наряду с открытием сенсоров цитозольной ДНК, в последние годы появляются сообщения о существовании многочисленных сенсоров ДНК внутри ядра. В отличие от цитоплазматической ДНК, присутствие которой почти всегда указывает на патологию, геном клеток эукариот находится в ядре. Таким образом, распознавание чужеродной ДНК внутри ядра — нетривиальная задача. Распознавание, например, вирусной ДНК в ядре становится возможно только в том случае, если геном человека и вируса разительно различаются по структуре, длине либо другим характеристикам. Ранее распознавание чужеродной ДНК внутри ядра было описано для таких факторов, как AIM2, cGAS, DAI/ZBP1, IFI16, TLR7/9, ZCCHC3 и РНК-полимеразы III. В 2019 г. было обнаружено, что hnRNPA2B1 является основным фактором в сигнальном каскаде распознавания ДНК вируса простого герпеса в ядре клеток. Механизмы распознавания цитоплазматической и ядерной чужеродной ДНК и факторы, участвующие в выведении чужеродной внутриклеточной ДНК, до сих пор остаются мало изучены.

Ранее было показано, что белки APOBEC являются факторами рестрикции чужеродной ДНК, которые могут напрямую дезаминировать цитидиновые нуклеотиды в одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, что приводит к гипермутации C-to-T и/или G-to-A, образованию делеций и распад чужеродной ДНК. Локус APOBEC3 человека представляет собой кластер из семи генов на хромосоме 22, кодирующих белки APOBEC3A (A3A), APOBEC3B (A3B), APOBEC3DE, APOBEC3C, APOBEC3F, APOBEC3G и APOBEC3H. Восходящие механизмы, регулирующие экспрессию белка APOBEC3, в

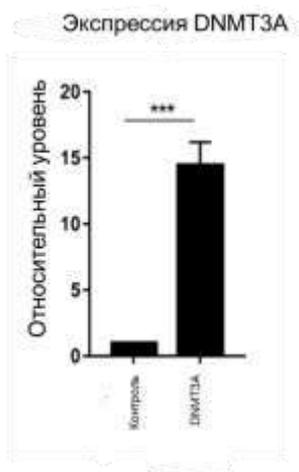
значительной степени неизвестны. Экспрессию АРОВЕС3 можно индуцировать интерферонами (IFN) или другими цитокинами, образующимися после обнаружения чужеродной ДНК. Наиболее хорошо охарактеризованными индукторами АРОВЕС3 являются IFN- $\alpha$  (участвует в индукции транскрипции А3А, А3G и А3F), IFN- $\gamma$  (повышает уровни мРНК А3G и А3F) и IFN- $\lambda$  (индуцирует экспрессию А3А, А3В и А3G) [15]. Помимо IFN, важную роль в регуляции врожденных ответов и индукции АРОВЕС3 играет передача сигналов NF- $\kappa$ B [16]. Другие стимулы также могут регулировать экспрессию АРОВЕС3 напрямую (например, IL-27,  $\beta$ -эстрадиол) или косвенно (через TLR-лиганды, хемокины и др.). Новые данные свидетельствуют о том, что экспрессия АРОВЕС3 индуцируется p53-зависимым образом при генотоксическом повреждении и репликационном стрессе. Действительно, было показано, что все АРОВЕС3 факторы активируются белком p53.

Противовирусные свойства АРОВЕС3 активно изучались в течение нескольких последних десятилетий, включая их противовирусную активность в отношении ретровирусов (например, вируса иммунодефицита человека 1 (ВИЧ-1), вируса Т-клеточного лейкоза человека), гепаднавирусов (например, вируса гепатита В, ВГВ), флавивирусов (например, вирус гепатита С), папилломавирусов (например, вирус папилломы человека, ВПЧ), герпесвирусов (например, вирус простого герпеса 1 и вирус Эпштейна-Барр), и др., включая их дезаминазозависимую и -независимую активность. В частности, было показано, что А3А и А3В непосредственно дезаминируют ключевую форму ВГВ, не проявляя токсичности в отношении генома инфицированных клеток, и способствуют удалению ДНК ВГВ из клеток человека; тогда как ограничение инфекции ВИЧ-1 с помощью А3G не связано с дезаминирующей активностью данной цитидин-дезаминазы.

Однако, в эволюционной гонке вооружений между вирусами и эукариотическими клетками, вирусы значительно выигрывают с точки зрения скорости и вариативности выработки механизмов для противодействия врожденному иммунитету; к их числу относятся нарушения распознавания цитозольных и ядерных сенсоров, предотвращения запуска врожденных иммунных ответов (например, димеризации STAT) и прямое ингибирование эффекторных противовирусных белков (например, ингибирование А3G белком ВИЧ-1 Vif). Активация белков АРОВЕС3 в значительной степени сложна и зависит от типа клеток и требует сложно регулируемого каскада реакций, которые могут способствовать успешному устранению чужеродной ДНК как угрозы для клетки-хозяина или, при нарушении регуляции, генетической нестабильности, мутациям и развитию рака.

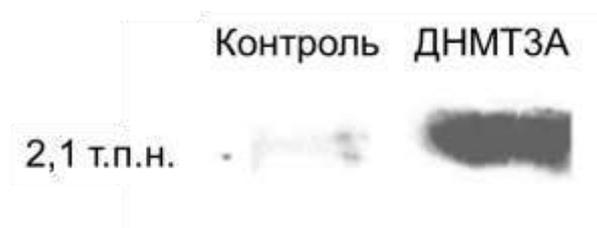
В целом, APOBEC3/AID представляют собой семейство важных молекул врожденного иммунного ответа, которые защищают клетки человека от чужеродной ДНК. Своевременная разработка стратегий точного регулирования экспрессии APOBEC3 важна для создания новых противовирусных препаратов и изучения фундаментальных аспектов взаимодействия врожденного иммунитета с вирусными инфекциями. В данной серии исследований мы использовали новый подход, основанный на каталитически инактивированной форме Cas9-белка (dCas9) (так называемый подход по активации транскрипции CRISPR или CRISPRa), чтобы напрямую трансаktivировать экспрессию A3A и A3B и оценить их влияние на эписомальную и интегрированную чужеродную ДНК. Результаты исследования демонстрируют, что APOBEC3 можно напрямую активировать с помощью CRISPRa, вызывая разрушение значительной доли (> 80%) эписомальной ДНК и инактивацию чужеродных генов, богатых GC, путем дезаминирования. Однако, CRISPRa генов A3A и A3B не оказывает значимого влияния на состояние интегрированной ДНК. Таким образом, использование систем CRISPRa для управления экспрессией APOBEC3 может стать важным шагом на пути к разработке новых терапевтических подходов к борьбе с вирусными и микробными инфекциями, уничтожению опасных для клетки форм ДНК и использованию CRISPRa для изучения взаимодействия клеточного ответа на чужеродные нуклеиновые кислоты.

В недавних работах было выдвинуто предположение, что пул ккзДНК ВГВ может быть не таким стабильным и стойким, как считалось ранее. Фактором дестабилизации ккзДНК ВГВ может являться система врожденного противовирусного иммунитета, которая нарушает репликацию ВГВ и образование/поддержание стабильного пула ккзДНК. Поскольку было продемонстрировано, что ДНМТ3А метилирует промоторы генов, участвующих в противовирусной защите клеток человека, нашей группой была исследована роль экспрессии ДНМТ3А в транскрипции факторов врожденной иммунной системы в ходе репликации ВГВ. В первую очередь было показано, что трансфекция плазмиды, кодирующей ДНК-метилтрансферазу 3А (ДНМТ3А), вызывает многократное (до 15 раз) увеличение экспрессии ДНМТ3А в клетках человека (Рисунок 81).



**Рисунок 81. Относительная экспрессия белка ДНМТ3А в клетках HepG2–1.1merVGV.** \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$  [483].

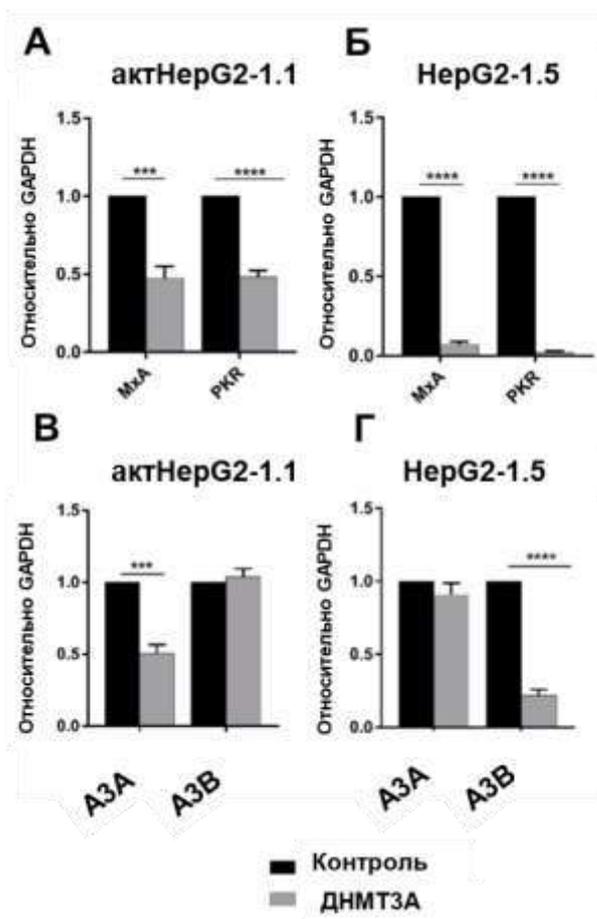
Влияние гиперэкспрессии ДНМТ3А на репликацию ВГВ было изучено по изучению размера пула ккзДНК ВГВ методом Саузерн блоттинга (Рисунок 82). Показано, что гиперэкспрессия ДНМТ3А вызывает значительное увеличение пула ккзДНК ВГВ.



**Рисунок 82. Саузерн–блот–анализ ккзДНК ВГВ из клеток HepG2–1.1merVGV.**

Поскольку ДНМТ3А *per se* не может оказывать влияние на рост пула ккзДНК ВГВ, далее была изучена экспрессия факторов рестрикции ВГВ, которые могут разрушать/нарушать образование ккзДНК ВГВ (т. е. АРОВЕС3А (АРО3А) и АРОВЕС3В (АРО3В) – факторы дезаминирования и разрушения ккзДНК, а также МхА и РКР, которые участвуют в распознавании ВГВ и активации анти-ВГВ каскадов).

Сверхэкспрессия ДНМТ3А в клетках actHepG1-1.1 и HepG2-1.5 значительно подавляла транскрипцию почти всех проанализированных факторов рестрикции хозяина. Относительные уровни МхА и РКР были снижены с 52% до 98%, в зависимости от используемой клеточной линии (Рисунок 83). Примечательно, что изменения в экспрессии АРОВЕС также зависели от типа клеток. Уровни АРО3А были снижены наполовину в клетках actHepG2-1.1, но не изменились в клетках HepG2-1.5 [486]. Напротив, АРО3В оставался на контрольных уровнях в клетках actHepG2-1.1, но был резко снижен в клетках HepG2-1.5. Поскольку клеточные линии различаются по скорости репликации ВГВ, наблюдаемые различия могут быть связаны с воздействием ВГВ на клетки.

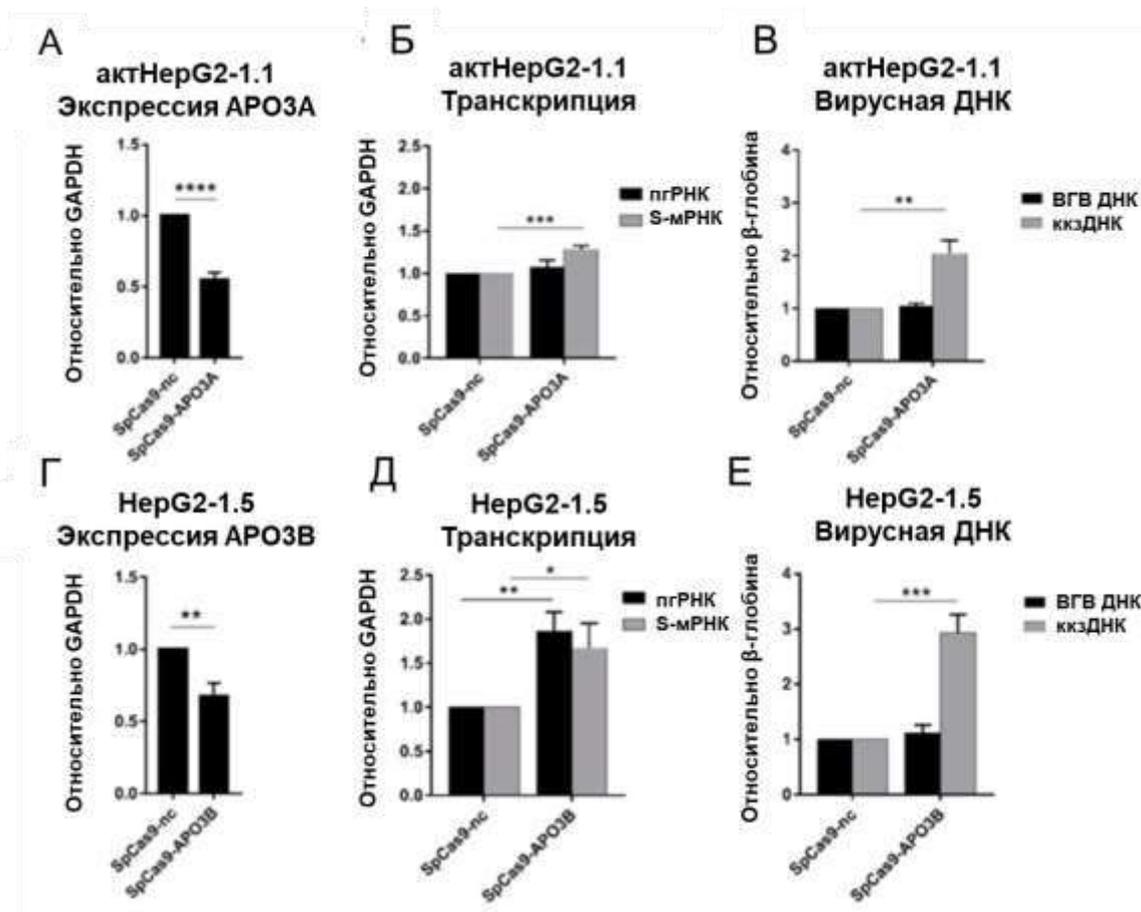


**Рисунок 83. Подавление факторов рестрикции клетки – хозяина с помощью ДНМТ3А.** Экспрессия (А, Б) МхА и PKR и (В, Г) АРОВЕС3А (АРО3А) и АРОВЕС3В (АРО3В) в клетках HepG2–1.1 и HepG2–1.5. Уровни мРНК измеряли относительно мРНК GAPDH. Относительные уровни экспрессии рассчитывали с использованием метода ΔΔСТ. Значения выражены как среднее значение ± стандартное отклонение. Звездочками отмечены статистически значимые различия. \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . Данные анализировали с помощью t–критерия [483].

## 6.2. Базальные уровни экспрессии АРОВЕС3А и АРОВЕС3В ограничивают пополнение ккзДНК из формы-предшественника

А3А и А3В являются одними из немногих эффекторных белков, которые непосредственно мутируют и разрушают ккзДНК ВГВ. Lucifora и др. показали, что даже низкие уровни АРОВЕС3 могут дезаминировать матрицы ккзДНК в различных системах инфекции ВГВ человека и приматов. Аналогично, Nair и Zlotnick продемонстрировали, что до 25% ккзДНК ВГВ в супернатанте клеток HepG2-2.15 содержат мутации, вызванные базальной экспрессией факторов АРОВЕС3. Для анализа влияния базальных уровней экспрессии АРО3А и АРО3В на репликацию ВГВ и уровни ккзДНК, мы использовали CRISPR/Cas9-опосредованный подход по нокдауну генов (разрушение промоторов генов с индукцией ДЦР ДНК), чтобы отключить ген А3А в клетках actHepG2-1.1 и ген А3В в клетках HepG2-1.5. Выбор факторов А3А/А3В был обусловлен тем, что их экспрессия снижалась наиболее выражено при гиперэкспрессии ДНМТ3А. Система CRISPR/Cas9 (SpCas9) снижала базовые уровни АРО3А на 45% в клетках HepG2-1.1 (Рисунок 84). Нокдаун А3А с использованием CRISPR/Cas9 в actHepG2-1.1 слабо влиял на транскрипцию ВГВ, в то время как уровни ккзДНК ВГВ увеличивались примерно в 2 раза; это указывает на то, что базальный уровень А3А не оказывает существенного влияния на транскрипцию

ВГВ, а скорее влияет на образование и накопление ккзДНК. В свою очередь, индуцированное системой CRISPR/Cas9 разрушение промотора гена АЗВ в клетках НерG2-1.5 снижало уровни АЗВ, что приводило к двукратному повышению транскрипции ВГВ и ~3-кратному увеличению уровней ккзДНК ВГВ. Соответственно, исходные уровни АЗА и АЗВ слабо влияли на транскрипцию и репликацию ВГВ, но значительно ограничивали образование/накопление ккзДНК ВГВ [483].



**Рисунок 84. CRISPRi генов АРО3А и АРО3В повышает уровень ккзДНК ВГВ.** Влияние (А) сайленсинга АРО3А на (Б) транскрипцию ВГВ (pgRNA: черные столбцы; S-mRNA: серые столбцы) и (В) уровни общей внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) и ккзДНК (серые столбцы) в клетках актHerG2-1.1. Влияние (Г) сайленсинга АРО3В на (Д) транскрипцию ВГВ (pgRNA: черные столбцы; S-mRNA: серые столбцы) и (Е) уровни внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) и ккзДНК (серые столбцы) в НерG2-1.5 клетки. Звездочками отмечены статистически значимые различия. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$ , \*\*\*\*  $p < 0,0001$  [483].

ВГВ индуцирует внутриклеточную гиперэкспрессию de novo ДНК-метилтрансферазы ДНМТ3А. Во множестве исследований было показано, что сверхэкспрессия ДНМТ ограничивает транскрипцию и репликацию ВГВ. В наших исследованиях впервые было выявлено постоянное и воспроизводимое увеличение уровней ккзДНК ВГВ наряду с подавлением транскрипции ВГВ при сверхэкспрессии ДНМТ3А. При

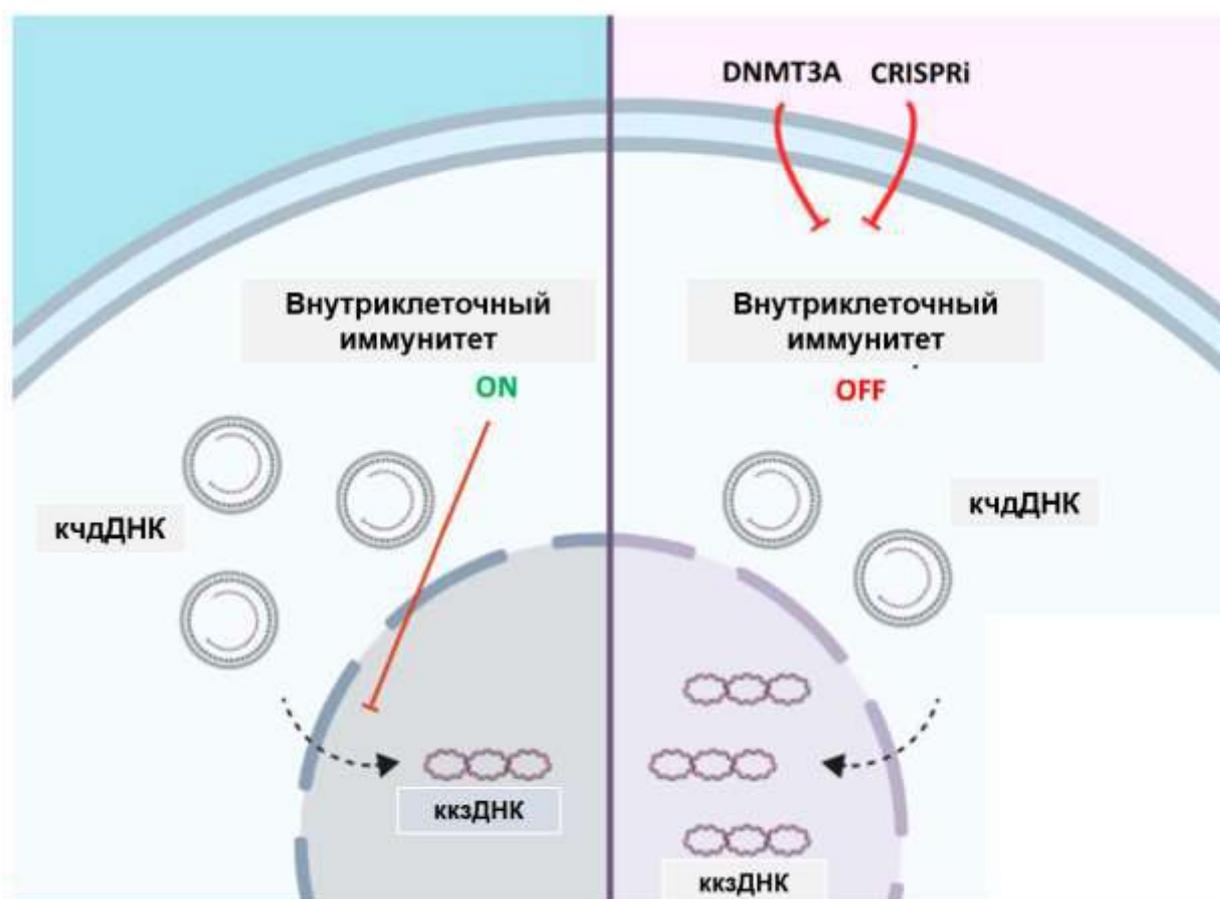
этом механизм усиления образования ккзДНК ВГВ в условиях снижения вирусной транскрипции и репликации оставался неясен.

Наиболее разумным объяснением повышенных уровней ккзДНК ВГВ в клетках со сверхэкспрессией ДНМТ3А, по-видимому, является замедление клеточного цикла и, как следствие, уменьшение разбавления и повышенное накопление ккзДНК ВГВ в клетках. Однако анализ клеточного цикла с использованием метода проточной цитофлуориметрии показал повышенную пролиферацию клеток при гиперэкспрессии ДНМТ3А. Действительно, при ВГВ-инфекции вирусные белки способствуют остановке клеточного цикла с арестом в фазе G0/G1, что усиливает накопление вируса в клетках. Однако, гиперэкспрессия ДНМТ3А снижала продукцию вирусных белков и восстанавливала пролиферацию клеток.

Хотя две клеточные модели, использованные в нашем исследовании, воспроизводят репликацию ВГВ и образование ккзДНК, в них отсутствует рецептор NTCP, и они не поддерживают процессы инфицирования и реинфекции [483]. Кроме того, ВГВ является медленно реплицирующимся вирусом, тогда как в HepG2-1.1merВГВ (под промотором CMV) и HepG2-1.5merВГВ (под промотором ВГВ дикого типа) транскрипция и репликация ВГВ очень активны. Жизненный цикл вируса более активен в клетках HepG2-1.1merВГВ по сравнению с клетками HepG2-1.5merВГВ, которые имитируют более естественную инфекцию. В данном исследовании повышение уровня ккзДНК ВГВ при гиперэкспрессии ДНМТ3А наблюдалось на обеих клеточных линиях.

Также рассматривалось влияние исходных факторов врожденного иммунитета на образование и поддержание ккзДНК ВГВ. ВГВ — это «скрытый вирус», который не вызывает сильного врожденного иммунного ответа; например, он остается интактным при сильном врожденном иммунном ответе, индуцированном вирусом гепатита С. Тем не менее, несколько факторов распознают и нейтрализуют ккзДНК ВГВ, включая АРОЗА и АРОЗВ. В наших исследованиях ДНМТ3А продемонстрировал эффекты, зависящие от клеточной линии, на экспрессию АРОВЕС: АРОЗА преимущественно подавлялся в клетках astHepG2-1.1, а АРОЗВ подавлялся в клетках HepG2-1.5. Причины этих различий неясны, но они могут свидетельствовать о различных врожденных иммунных реакциях и функциях клеток с разной активностью жизненного цикла ВГВ. После обработки доксициклином клетки HepG2-1.1 продуцируют большое количество вирусной пгРНК из искусственного, индуцируемого tet-on промотора CMV и постоянно сверхэкспрессируют S-мРНК и HBsAg из внутренних промоторов ВГВ, тогда как клетки HepG2-1.5 конститутивно продуцируют пгРНК из дикого промотора.

Хорошо известно, что ккзДНК ВГВ восполняется путем преобразования кчдДНК в ккзДНК, где кчдДНК может возникать либо из кДНК, образованной из пгРНК, либо в результате инфицирования *de novo* частицами ВГВ, содержащими кчдДНК. Индукция системами CRISPR/Cas9 нокдаун генов АРО3А и АРО3В незначительно влияла на вирусную транскрипцию, но приводила к существенному увеличению уровней ккзДНК ВГВ [483]. В предыдущих исследованиях базальные уровни эндогенных АРО3А и АРО3В не оказывали существенного влияния на установившийся пул ккзДНК ВГВ в инфицированных клетках. Вместо этого, было показано, что факторы АРОВЕС в основном воздействуют на кчдДНК, дезаминируя вирусные геномы. В нашем исследовании впервые было продемонстрировано, что подавление продукции АРО3А и АРО3В (за счет нокдауна либо гиперэкспрессии ДНМТ3А) приводит к увеличению пула ккзДНК ВГВ (Рисунок 85). Один из сценариев заключается в том, что эти факторы могут нейтрализовать часть кчдДНК, тем самым снижая количество кчдДНК (предшественника ккзДНК), способной конвертироваться в ккзДНК. Другим возможным сценарием является прямое воздействие АРО3А/АРО3В на процессы конверсии кчдДНК в ккзДНК ВГВ [483].



**Рисунок 85. Роль врожденного иммунитета в образовании и поддержании ккзДНК ВГВ на моделях репликации ВГВ *in vitro*.**

Несмотря на то, что в наших исследованиях при гиперэкспрессии ДНМТ3А происходило увеличение уровней ккзДНК ВГВ, и это совпадало с подавлением экспрессии А3А и А3В, а снижение А3А/А3В приводило к соизмеримому увеличению уровней ккзДНК ВГВ, нельзя исключить, что А3А/А3В являются не единственными и даже не основными факторами, которые могут участвовать в увеличении уровней ккзДНК ВГВ при подавлении ВГВ транскрипции и гиперпродукции ДНМТ3А. Можно предположить, что и иные факторы врожденного внутриклеточного иммунитета и дополнительные факторы инфицированной клетки могут ограничивать на базальном уровне продукцию образование ккзДНК ВГВ, в том числе за счет нарушения конверсии кчдДНК в ккзДНК. В частности, Li с соавт. наблюдали снижение уровней ккзДНК при использовании тенофовира (ингибитора обратной транскрипции ВГВ) в первые дни эксперимента с последующим резким падением уровней ккзДНК. Авторы предположили, что подобная динамика изменения уровней ккзДНК (медленное снижение уровней ккзДНК в первые дни эксперимента) может быть связана с превращением упакованной в капсиды кчдДНК в ккзДНК, причем возможно, что данный механизм происходит при участии киназ и фосфатаз клеток человека, которые обеспечивают модификацию вирусных белков и усиленный транспорт капсидов ВГВ в ядро. В наших исследованиях, связанных с изучением роли базальных уровней внутриклеточных факторов в вирусной репликации, такой сценарий маловероятен, поскольку ДНМТ3А наряду с подавлением вирусной транскрипции, также главным образом нарушает транскрипцию клеточных РНК. Скорее всего, наблюдаемое увеличение ккзДНК ВГВ вызвано нарушением функционирования факторов инфицированных клеток, в норме, на уровне базальной экспрессии, ограничивающих образование ккзДНК *de novo* (за счет пути внутриклеточной амплификации).

Выяснение механизмов наблюдаемого феномена важно для понимания фундаментальных особенностей взаимодействия ВГВ и клетки-хозяина, что может дать фундаментальное представление о биологии ВГВ или потенциально определить новые терапевтические мишени для лечения ВГВ. Стоит отметить, что выявленная нами при использовании рибонуклеопротеиновых анти-ВГВ комплексов CRISPR/Cas роль этапа внутриклеточной амплификации ккзДНК в поддержании хронической инфекции ВГВ указывает на ключевое значение методов и подходов для блокирования этого пути в создании подходов по полной элиминации вирусной инфекции.

Помимо этого, в наших исследованиях изучалось влияние ВГВ и избыточной экспрессией ДНМТ3А на стабильность генома клетки. Хорошо известно, что ДНМТ3А может вызывать гиперметилирование генома клетки-хозяина, изменять эндогенную

экспрессию факторов DDR и, таким образом, нарушать стабильность генома. Сама ВГВ-инфекция вызывает повреждение ДНК, о чем свидетельствует повышенное образование очагов  $\gamma$ H2AX, в то время как гиперэкспрессия ДНМТ3А дополнительно усугубляет повреждение ДНК [483,486]. Генерация очагов  $\gamma$ H2AX в клетках с активным жизненным циклом ВГВ в основном объясняется вирусологическими эффектами; гиперэкспрессия ДНМТ3А подавляет репликацию ВГВ (что на ранних сутках исследований приводит к снижению повреждения генома), но в дальнейшем индуцирует более выраженное повреждение генома клеток человека. Мы предполагаем, что это может происходить из-за aberrантной экспрессии факторов DDR, как описано в нашем исследовании [483,486].

### **6.3. Особенности активации генов APOBEC/AID системой CRISPRa dCas9-p300**

Распространенным механизмом защиты хозяина от вирусных инфекций является активация внутриклеточных иммунных ответов, которые могут включать тысячи генов. Важным барьером для репликации вирусов в клетках человека является семейство белков, принадлежащих к семейству ферментов, редактирующих мРНК аполипопротеина В, каталитических полипептидоподобных/индуцируемых активацией цитидиндеаминаз (APOBEC/AID). Эти факторы дезаминируют остатки цитозина нуклеиновых кислот, что приводит к мутациям C→T и G→A и, в некоторых случаях, к деградации вирусных геномов. Многие вирусы разработали сложные механизмы для ингибирования деаминаз APOBEC/AID. На сегодняшний день в геноме человека охарактеризовано одиннадцать белков APOBEC/AID. Большинство белков APOBEC/AID (за исключением APOBEC2 и APOBEC4) дезаминируют нуклеиновые кислоты, что приводит к гипермутации, образованию делеций и распаду чужеродных нуклеиновых кислот. Факторы семейства APOBEC/AID участвуют в противовирусной защите клеток человека. Например, показана роль факторов APOBEC/AID в защите от инфекции ВИЧ-1, ВГВ, HPV и др. Множество факторов APOBEC/AID играет роль в разрушении чужеродной ДНК, которая возникает при повреждении митохондрий, лизосом и ядра клеток человека. В частности, известно, что цитидин-деаминаза A3A гипермутирует и разрушает чужеродную ДНК при трансфекции в клетки человека. До сих пор гиперэкспрессии APOBEC/AID в клетках человека за счет использования индукторов ряда сигнальных каскадов, в основном связанных с интерферонами и NF- $\kappa$ B. Однако, пути передачи сигнала обычно нарушаются при вирусной инфекции; в результате, индукторы сигнальных путей часто оказываются неэффективны, и не вызывают усиления экспрессии APOBEC/AID. Другим фактором является активная роль

цитидин-дезаминаз АРОВЕС/АID в онкотрансформации, развитии и прогрессии многочисленных онкологических заболеваний.

Ранее было показано, что сверхэкспрессия АРОВЕС/АID подавляет репликацию ВГВ путем редактирования ккзДНК ВГВ, подавления вирусной транскрипции, ингибирования этапа упаковки вирусной пгРНК в капсиды и этапа обратной транскрипции, а также за счет разрушения ккзДНК ВГВ. А3А, А3В и АID занимают особое место среди противовирусных факторов, поскольку одни из немногих могут напрямую взаимодействовать с ккзДНК ВГВ, причем взаимодействие опосредуется вирусным белком НВсАg, и вызывать дезаминирование и разрушение ккзДНК ВГВ. А3G считается наиболее мощным фактором, дезаминирующим геномы ВГВ, при этом действие А3G происходит во время обратной транскрипции ВГВ. А3G не действует на ккзДНК ВГВ. Важно отметить, что А3А, А3В и АID не вызывают токсичности в ВГВ-инфицированных клетках человека, поскольку НВсАg, один из основных белков ВГВ, препятствует стохастическому действию АРОВЕС/АID на геном человека. Это особенно важно, поскольку долговременная сверхэкспрессия АРОВЕС/АID токсична для клеток, приводит к частому дезаминированию генома клеток человека и хромосомным абберациям. Действительно, АРОВЕС/АID являются известными факторами развития различных онкологических заболеваний человека.

Таким образом, основной проблемой при разработке лекарств от ХГВ на основе АРОВЕС/АID является их безопасная и кратковременная активация. Неконтролируемая сверхэкспрессия АРОВЕС/АID при использовании кодирующих векторов неизбежно повреждает ДНК. Следовательно, создание методов настраиваемой активации генов АРОВЕС/АID может позволить деактивировать ккзДНК ВГВ и безопасно элиминировать ВГВ из инфицированных клеток.

Для определения возможности элиминации ккзДНК ВГВ и подавления вирусного цикла из клеток за счет активации противовирусных факторов были разработаны инструменты и подходы для контролируемой активации транскрипции генов АРОВЕС/АID. Кроме того, были изучены вирусологические и молекулярные особенности активации АРОВЕС/АID в ВГВ-инфицированных клетках, взаимодействия АРОВЕС/АID с геномом ВГВ и геномом инфицированных клеток. Для непосредственной активации интересующих генов был разработан набор точных инструментов на основе модифицированных систем CRISPR/Cas9, которые в совокупности называются инструментами активации dCas9 (CRISPRa). CRISPRa состоит из белка dCas9, слитого с активатором транскрипции, таким как каталитическая субъединица р300 acetyltransferase

(универсальный регулятор транскрипции генов). Короткая одиночная направляющая РНК (РНК-проводник) может нацеливать dCas9-p300 на регуляторные элементы гена-хозяина, активируя транскрипцию. Ранее было показано, что привлечение dCas9-p300 к промоторам генов-мишеней или проксимальным/дистальным энхансерам с помощью РНК-проводников приводит к выраженному ацетилированию гистонов и активации транскрипции генов-мишеней. Для большинства систем CRISPRa уровень трансактивации транскрипции целевого гена зависит от множества одиночных РНК-проводников, нацеленных на регуляторные участки генов. Система dCas9-p300 CRISPRa является упрощенным подходом, действующем за счет высокоэффективной активации транскрипции генов даже с помощью одного РНК-проводника.

Среди многочисленных преимуществ CRISPRa основным является то, что индуцированная сверхэкспрессия генов-мишеней является более физиологичной, поскольку она управляется эндогенными регуляторными элементами. Ранее было показано, что подходы на основе CRISPRa безопасны и эффективны для коррекции генетических дефектов, подавления ВИЧ-инфекции и т. д.

В рамках данной серии исследований были разработаны системы CRISPRa для индукции экспрессии всех основных факторов APOBEC/AID, известных своей активностью в отношении ВГВ. Было проведено всестороннее исследование противовирусных и потенциальных токсических эффектов CRISPRa опосредованной активации генов APOBEC/AID. Сверхэкспрессия генов APOBEC/AID значительно (>98%) снижала репликацию ВГВ, но в то же время индуцировала дезаминирование генома инфицированных клеток, в том числе связанных с развитием онкологических заболеваний. Примечательно, что дезаминирование генома клеток человека происходило только в клетках с низким уровнем репликации ВГВ, тогда как при высоких вирусных нагрузках мутагенеза хозяина не наблюдалось. Чтобы решить проблему мутагенной активности APOBEC/AID, мы воспользовались преимуществами систематически аттенуированных РНК-проводников (att-РНК-проводников, несущих несовпадения в определенных положениях) для контроля уровней активации CRISPR генов-мишеней. Это позволило сохранить выраженную противовирусную активность и устранить внецелевой мутагенез и токсичность генов, индуцированных CRISPRa.

Гены A3A и A3B лежат в тандемном кластере генов на хромосоме 22 вместе с остальными генами APOBEC3. Прежде всего, нами был разработан набор РНК-проводников, нацеленных на промоторы A3A и A3B (Рисунок 86). РНК-проводники были разработаны с использованием CCTop CRISPR/Cas9 онлайн-предиктора мишеней и

геномного браузера UCSC. РНК-проводники были разработаны с учетом чувствительности к ДНКазе I, наличия кластеров ДНКазы и положения относительно сайта начала транскрипции (TSS), как показано в работе Hilton с соавт. [501]. Сайты чувствительности к ДНКазе I служат точками связывания факторов транскрипции и факторов ремоделирования хроматина. Сайты-мишени для РНК-проводников в регуляторных элементах генов А3А- и А3В показаны на рисунке. Хорошо известно, что Spycas9 обладает низкой устойчивостью к несоответствию нуклеотидов и связывается с сайтами ДНК, которые отличаются от РНК-проводника всего на 4-5 нуклеотидов. Среди РНК-проводников с подходящими характеристиками были выбраны те, у которых минимальное количество предсказанных нецелевых сайтов с учетом несовпадения ДНК:РНК-проводник составляло до 4 нуклеотидов. Количество предполагаемых нецелевых сайтов для каждого РНК-проводника, нацеленного на А3А и А3В, представлено на Рисунке 86. Поскольку эффективность РНК-проводника А3А была относительно низкой, были рассмотрены дополнительные РНК-проводники, нацеленные на промотор А3А, с наилучшими прогнозируемыми характеристиками [502].



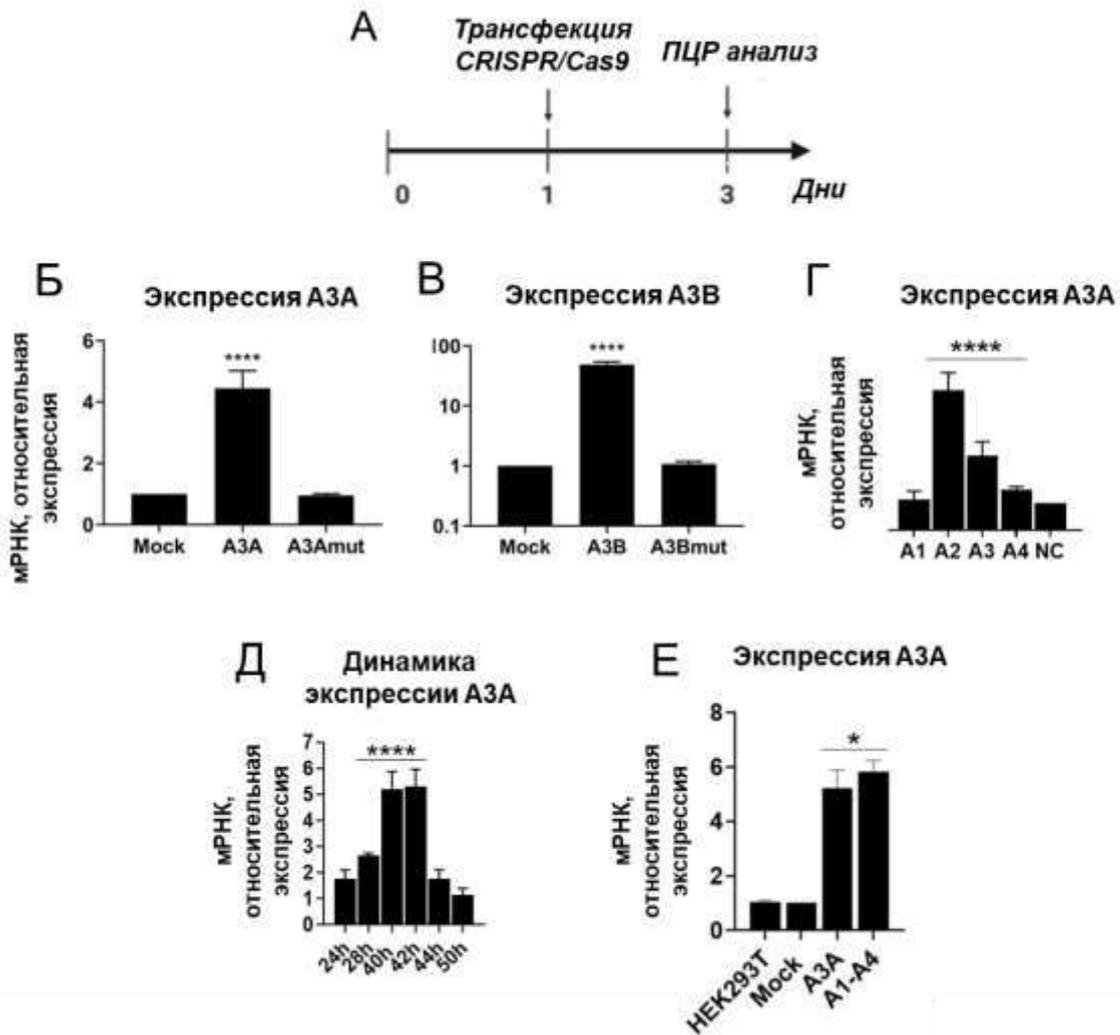
**Рисунок 86. Дизайн РНК-проводников для активации факторов АРОВЕС3А/АРОВЕС3В.** Локусы (А) АРОВЕС3А (А3А1-4) и (Б) АРОВЕС3В (А3В) на хромосоме 22 показаны вместе с сайтами-мишенями РНК-проводников и регуляторными элементами ENCODE в клеточных линиях (В) Характеристики (эффективность и

внецелевые эффекты) РНК-проводников, нацеленных к промоторам А3А (А3А1–А3А4) и А3В

В рамках эксперимента плазида, кодирующая белок dCas9-p300 была ко-трансфицирована с каждым из РНК-проводников; вслед за этим, проводили анализ уровней А3А и А3В на 2-й день после трансфекции. В качестве контроля трансфицировали либо плазмиду, экспрессирующую dCas9-p300, с нетаргетирующим, контрольным РНК-проводником (РНК-проводник, который не имеет мишеней в геноме человека), либо плазмиду, экспрессирующую dCas9-p300 с мутацией D1399Y в домене ацетилтрансферазы, блокирующей ацетилтрансферазную активность (dCas9-p300mut). Привлечение dCas9-p300 с помощью РНК-проводника к регуляторным элементам генов А3А и А3В значительно повышало экспрессию А3А и А3В (до 4 и 50 раз, соответственно) (Рисунок 87А-В), по сравнению с контрольными значениями. Напротив, dCas9-p300mut не влиял на уровни экспрессии мРНК АРОВЕС. Поскольку повышение транскрипции А3А было относительно низким при использовании системы CRISPRa, был проведен дизайн, синтез и анализ дополнительных РНК-проводников, нацеленных на промотор гена А3А (А3А1, А3А3 и А3А4). РНК-проводники А3А3 и А3А4 также повышали уровни мРНК А3А, но менее значимо по сравнению с А3А2. РНК-проводник А3А1 не влиял на уровни мРНК гена А3А (Рисунок 87Г, Д). Таким образом, в дальнейших экспериментах использовали РНК-проводник А3А2 [502].

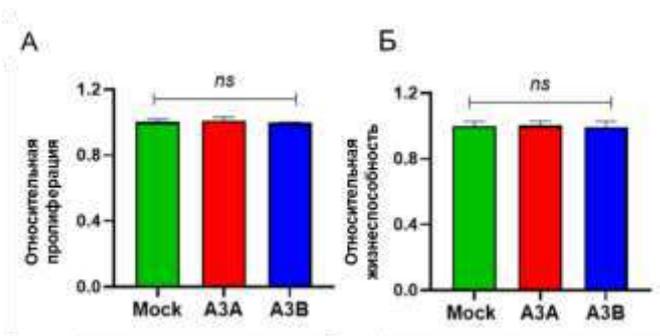
В связи с тем, что даже с наилучшими РНК-проводниками уровни активации транскрипции А3А, тем не менее, не превышали 5-кратного увеличения в сравнении с контролем, была предпринята попытка мультиплексной активации – использования набора РНК-проводников для усиления активации транскрипции одного гена. В то время как данный подход обычно приводит к аддитивному увеличению уровней активации транскрипции целевых генов при использовании таких систем, как dCas9-(VP16)<sub>n</sub>, Hilton с соавт. показал, что мультиплексная активация не вызывает более выраженного увеличения транскрипции в случае системы dCas9-p300 [501]. Предполагается, что это связано с пределом факторов транскрипции, которые могут быть привлечены к ацетилированной области в геноме.

В соответствии с ранее опубликованными работами, использование мультиплексного подхода со всеми 4 РНК-проводниками, направленными на промоторную область гена А3А (А3А1-4) не приводило к значительному увеличению уровней активации целевого гена в сравнении с единственным, наиболее эффективным РНК-проводником (Рисунок 87Е).



**Рисунок 87.** Активация факторов А3А и А3В с помощью систем CRISPRa. (А) Дизайн эксперимента (Б) Уровни экспрессии мРНК А3А и (В) А3В при CRISPRa (Г) Повышение транскрипции А3А при CRISPRa с различными РНК-проводниками (А3А1–А3А4). Динамический анализ уровней мРНК (Д) А3А. (Е) Измерение базальных уровней экспрессии А3А и А3В. (Ж) Влияние мультиплексной постановки CRISPRa на уровни активации экспрессии гена А3А. Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

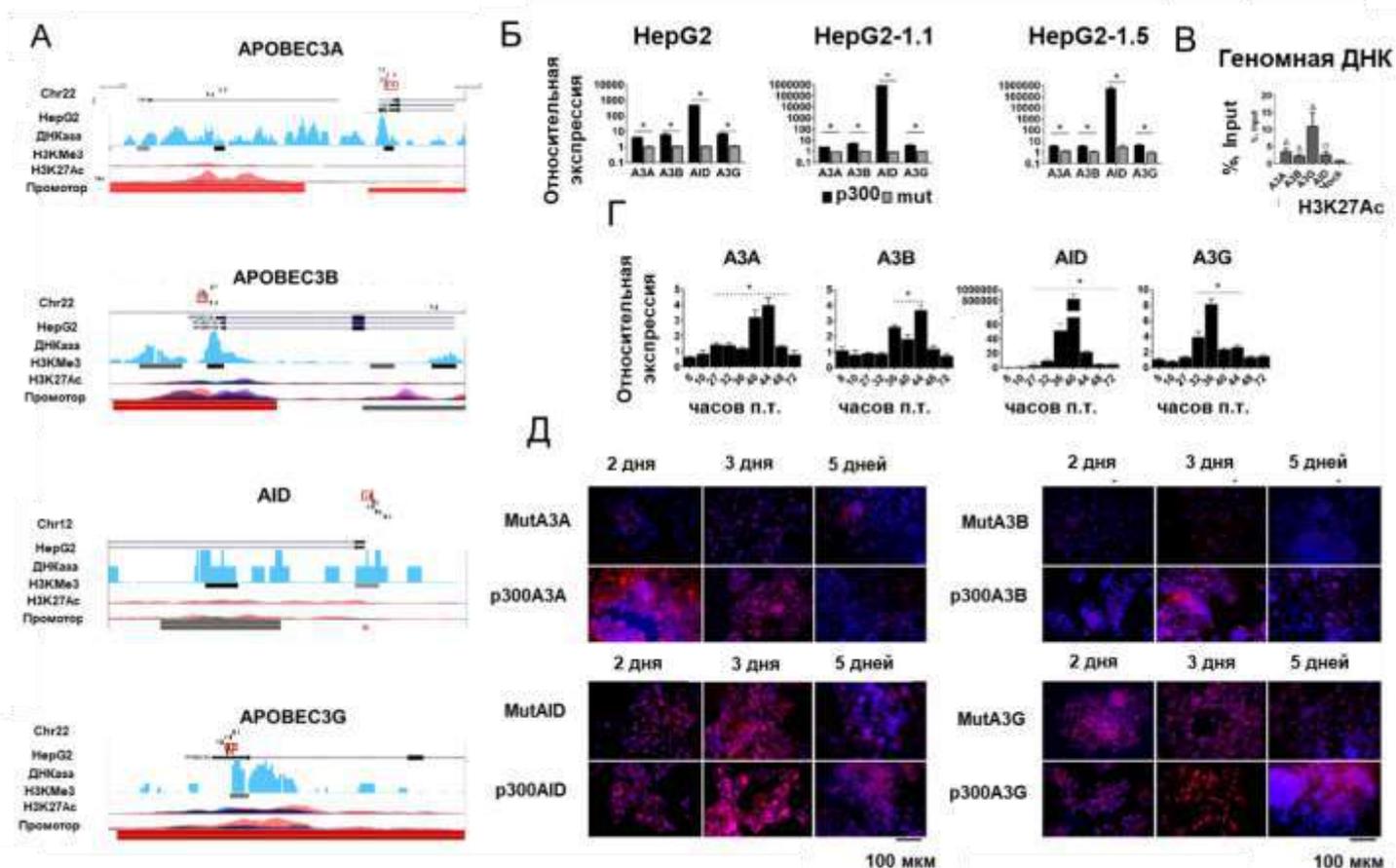
При изучении токсичности и влияния на пролиферацию клеток HEK293T, негативного влияния CRISPR-активированных генов А3А и А3В выявлено не было (Рисунок 88).



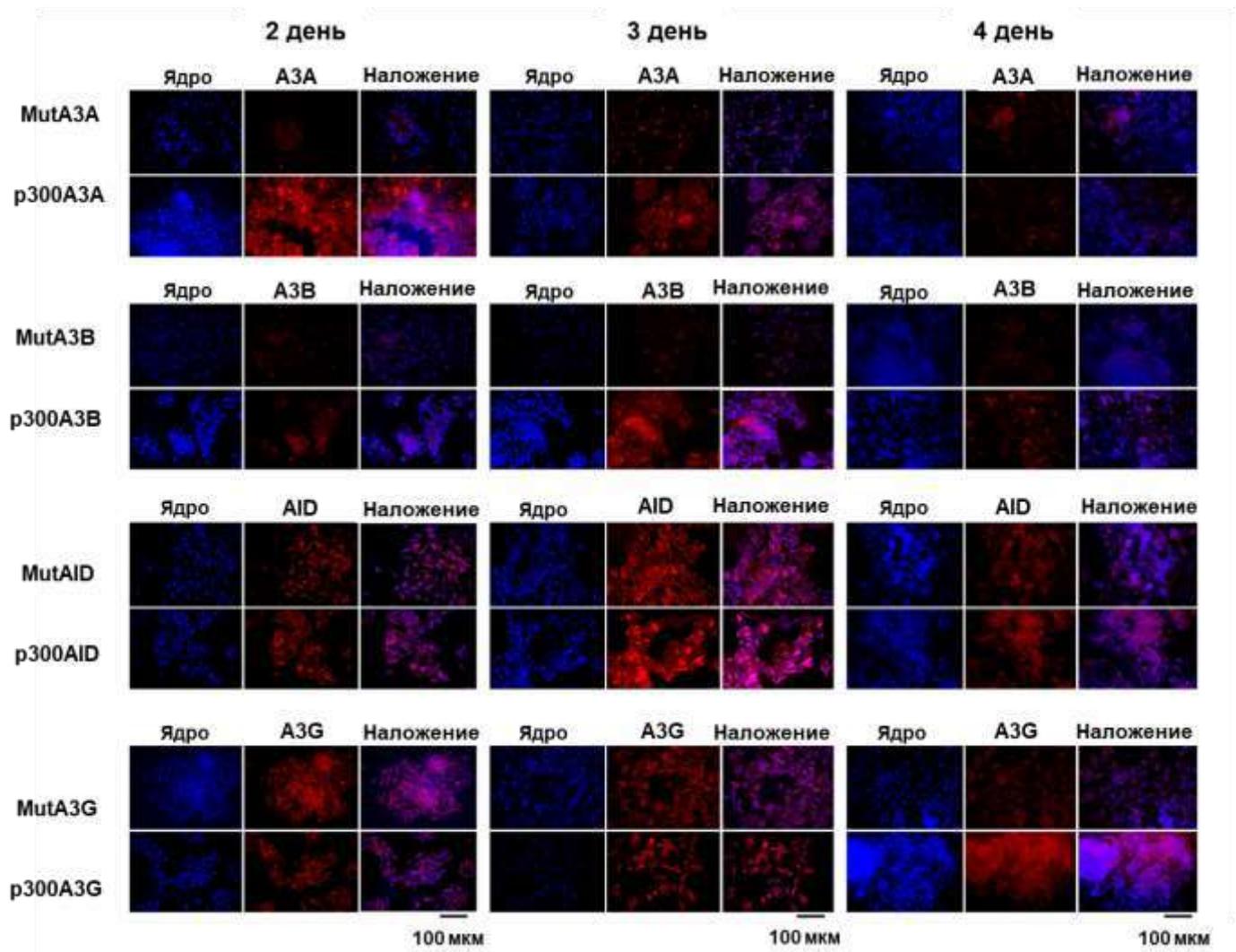
**Рисунок 88.** Оценка уровней пролиферации и жизнеспособности клеток после CRISPRa факторов А3А и А3В [502].

Разработав и протестировав на модели клеток человека экспериментальный подход по активации генов А3А и А3В, мы сконцентрировали усилия на создании подхода и изучении параметров активации всех ключевых противовирусных генов семейства АРОВЕС/АID. Первыми объектами семейства АРОВЕС/АID стали гены А3А, А3В, А3G и АID. Учитывая особенности, выявленные в ходе пилотных исследований на модели НЕК293Т, был разработан набор из 5 РНК-проводников, нацеленных на промоторы и энхансеры каждого гена, и определены наилучшие РНК-проводники, которые вызывали наиболее выраженное увеличение транскрипции целевых генов и трансляцию соответствующих белков (Рисунок 89-91). С помощью системы CRISPRa на основе dCas9-r300 удалось добиться >4-100,000-кратной активации целевых генов на изученных моделях клеток человека НерG2, НерG2-1.1 и НерG2-1.5 (Рисунок 89А, Б). Была изучена динамика активации целевых генов и выявлено, что вскоре после роста уровней целевых мРНК к 32-40 часу после трансфекции с пиком в районе 36-44 часов, уже к 48 часам уровни транскрипции возвращались к базальным значениям (Рисунок 89В, Г). Из этого следует, что трансфекция систем CRISPRa вызывает значительное, но кратковременное увеличение транскрипции целевых генов. При этом выявлены индивидуальные различия в активации целевых генов [503]. В целом, повышенные уровни мРНК гена-мишени наблюдались в течение примерно 12–20 часов. Эпигенетические метки, модифицированные р300, нестабильны и быстро реверсируются из-за эффекта эпигенетической памяти, возвращая транскрипцию генов к исходным уровням. Ацетилирование гистона H3K27 в промоторных областях генов АРОВЕС/АID подтверждали с помощью ChIP-ПЦР (Рисунок 89В). Индукция уровней мРНК АРОВЕС/АID сопровождалась повышением уровней транслируемых белков на 2–3 день после трансфекции (Рисунок 89Д, 90, 91). Уровни экспрессии белков возвращались к контрольным значениям на более поздних сроках эксперимента. После активации, белки семейства факторов АРОВЕС/АID демонстрировали типичное для данных факторов распределение по клетке, включая цитоплазматическое и внутриядерное распределение; наблюдалось более интенсивное окрашивание на целевые белки в группах с CRISPR-активацией транскрипции целевых генов. Увеличение

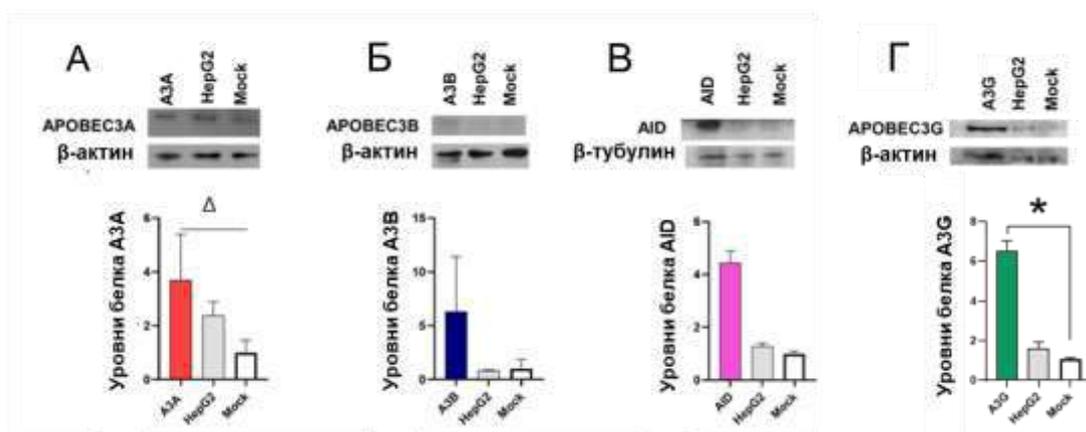
экспрессии целевых белков было подтверждено методом вестерн-блоттинга. Таким образом, было продемонстрировано, что CRISPRa может эффективно индуцировать транскрипцию генов АРОВЕС/AID в ВГВ-положительных и отрицательных клеточных линиях, что приводит к временному повышению уровня мРНК и белка [503].



**Рисунок 89. Активация экспрессии генов семейства АРОВЕС/AID с помощью CRISPRa.** (А) Мишени РНК-проводников в промоторах генов (Б) Уровни мРНК АРОВЕС/AID в клеточных линиях, трансфицированных CRISPRa (черные столбцы) или CRISPRa с мутантной формой р300 (серые столбцы). (В) ChIP-PCR для анализа обогащения промоторных областей АРОВЕС/AID на уровни H3K27Ac (Г) Динамический анализ уровней мРНК АРОВЕС/AID после трансфекции систем CRISPRa в клетках HepG2–1,5merВГВ. (Д) Динамический анализ уровней экспрессии АРОВЕС/AID с помощью иммуноцитохимии в клетках HepG2.  $\circ p < 0,05$ ;  $\Delta p < 0,01$ ;  $\#p < 0,001$ ;  $* p < 0,0001$  [503]



**Рисунок 90. Иммуноокрашивание на факторы АРОВЕС/АИД.** Mut – клетки, трансфицированные мутантной формой dCas9–p300 и P300 – клетки, трансфицированные dCas9–p300. Клетки HepG2 окрашивали на соответствующий белок АРОВЕС/АИД в; ядра клеток окрашивали Hoechst33342 (синий) [503].

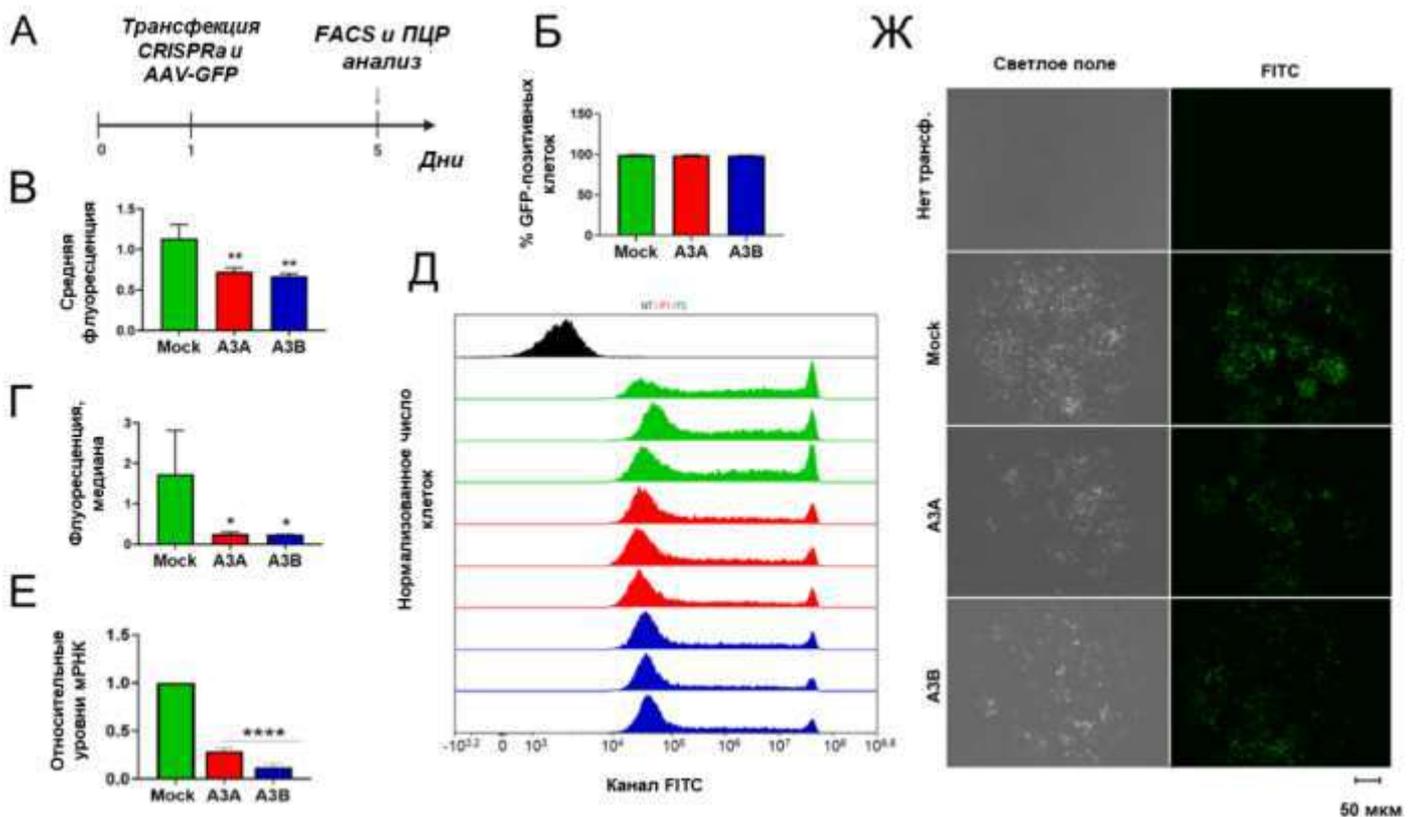


**Рисунок 91. Вестерн–блот анализ экспрессии уровней АРОВЕС/АИД.** Экспрессия белка (А) А3А, (Б) А3В, (В) АИД и (Г) А3Г. Вестерн–блот анализ проводили через 42 часа после трансфекции. Δр < 0,01, \*р < 0,0001 [503].

#### **6.4. CRISPR-активация APOBEC/AID вызывает разрушение эписомальной, но не интегрированной матрицы чужеродной ДНК**

Новые платформы по регуляции транскрипции на основе молекулярных инструментов CRISPR (CRISPR-интерференции либо CRISPR-активации) позволяют прицельно модулировать активность генов. Подобные системы основаны на слиянии нуклеолитически-инактивированного белка Cas9 (dCas9) с регуляторами транскрипции. Привлечение химерных белков dCas9, соединенных с регуляторами транскрипции, обеспечивает изменение в экспрессии генов. Системы CRISPR-регуляции активности генов также активно используются для изучения жизненного цикла вирусов и разработки новых противовирусных подходов. В частности, ряд систем CRISPR-активации транскрипции (CRISPRa) использовали для реактивации латентного провируса ВИЧ-1 в инфицированных Т-клетках человека. Этот подход может быть использован для усиления естественного противовирусного ответа иммунной системы человека и элиминации ВИЧ-инфекции. Vogerd с соавт., показал, что CRISPR-активация генов A3A и A3G существенно снижает уровни РНК ВИЧ-1. Аналогично, CRISPR-активация гена тизерина BST-2 ингибирует репликацию и продукцию белков ВИЧ-1 *in vitro*.

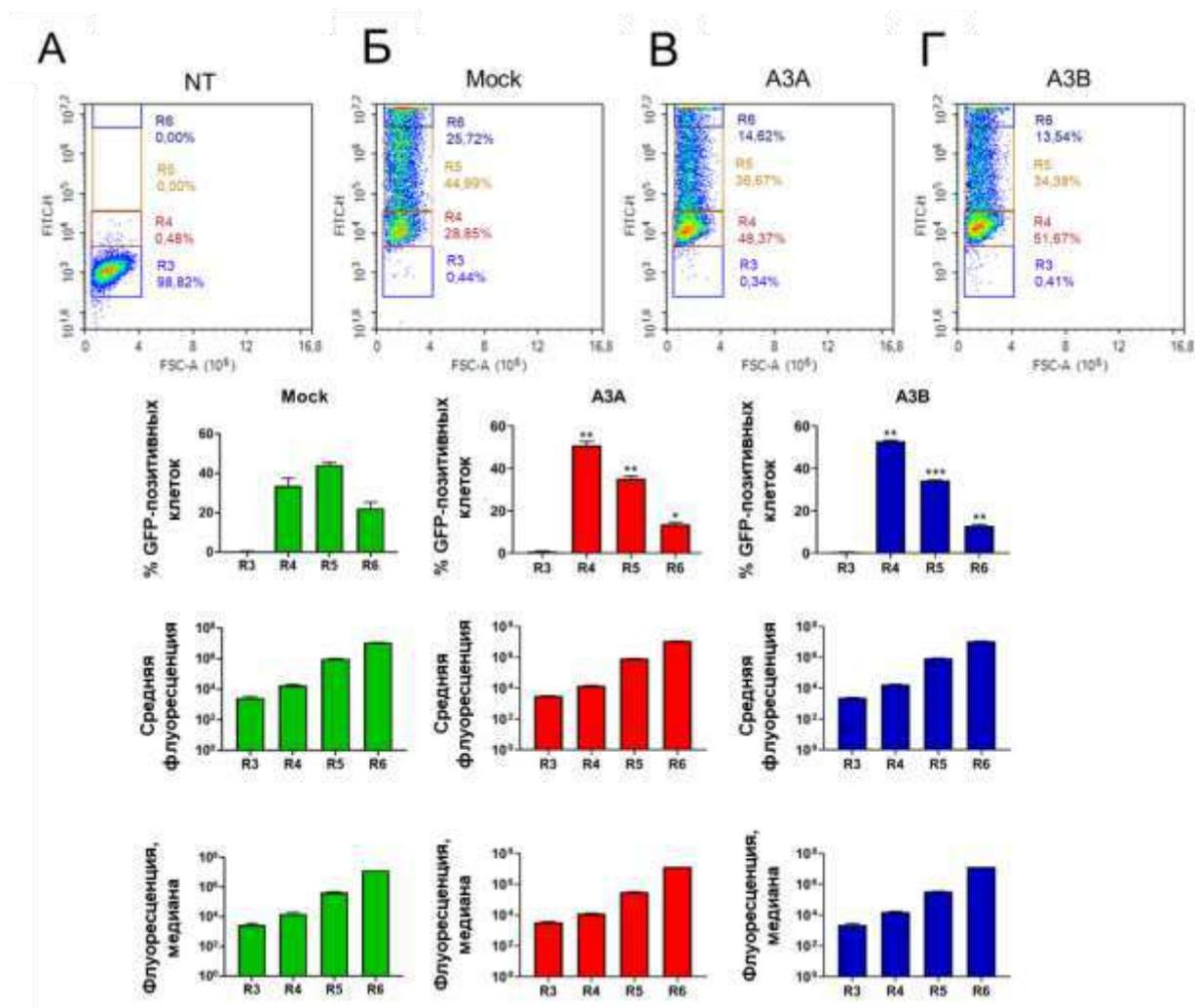
В рамках наших исследований, прежде всего была изучена способность кратковременно активированных факторов A3A и A3B влиять на стабильность и целостность чужеродной ДНК при использовании эписомы либо интегрированного в геном человека конструкта, кодирующего репортерный белок GFP. Для этого была проведена трансфекция CRISPR-активирующих комплексов к генам A3A и A3B, и анализ флуоресценции GFP на 5-й день после трансфекции с использованием проточной цитофлуориметрии и флуоресцентной микроскопии. Трансактивация A3A и A3B не изменяла процент GFP-позитивных клеток, но существенно снижала интенсивность флуоресценции GFP по сравнению с контролем, обработанным плацебо, на что указывают данные FACS, ПЦР-анализа уровней мРНК GFP и флуоресцентная микроскопия. Действительно, анализ распределения клеток по флуоресценции GFP продемонстрировал уменьшение количества клеток с высоким сигналом GFP и увеличение доли клеток с более низким уровнем экспрессии GFP.



**Рисунок 92. CRISPRa A3A и A3B снижает GFP-сигнал от эписомальной плазмиды.** (А) Дизайн эксперимента. Клетки НЕК-293Т ко-трансфицировали плазмидой, экспрессирующей GFP, и CRISPRa, нацеленным либо на A3A, либо на A3B, и анализировали через 5 дней после трансфекции (Б) Гистограмма, представляющая процент GFP-положительных клеток в экспериментальных группах (В) Средняя и (Г) средняя интенсивность флуоресценции трансфицированных клеток. (Д) Репрезентативные графики проточной цитофлуориметрии для нетрансфицированных клеток (черная гистограмма) и клеток, экспрессирующих GFP, ко-трансфицированных CRISPRa и нецелевым РНК-проводник (зеленая гистограмма) (Е) Полуколичественный ОТ-ПЦР анализ РНК GFP после CRISPRa генов A3A и A3B. (Ж) Флуоресцентные изображения нетрансфицированных, и CRISPRa-трансфицированных клеток. Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях. \* p < 0,05, \*\* p < 0,01, \*\*\*\* p < 0,0001 [502]

Дальнейший анализ популяций клеток, экспрессирующих GFP, выявил существенное сокращение популяций с высоким (R6; 22,2% ± 3,11% в группе контроля, 13,67% ± 0,83% в группе A3A и 12,86% ± 0,62% в группа A3B) и средним уровнем экспрессии GFP (R5; 44,24% ± 1,27% в макете, 35,16% ± 1,31% в A3A и 34,45% ± 0,1% в A3B), а также соразмерное увеличение популяции клеток с низкой интенсивностью флуоресценции сигнала GFP в популяции R4 (33,16% ± 3,74% в контроле, 50,47% ± 1,83% в A3A и 52,22% ± 0,57% в A3B) (Рисунок 92, 93). Тем не менее, CRISPRa-трансактивация

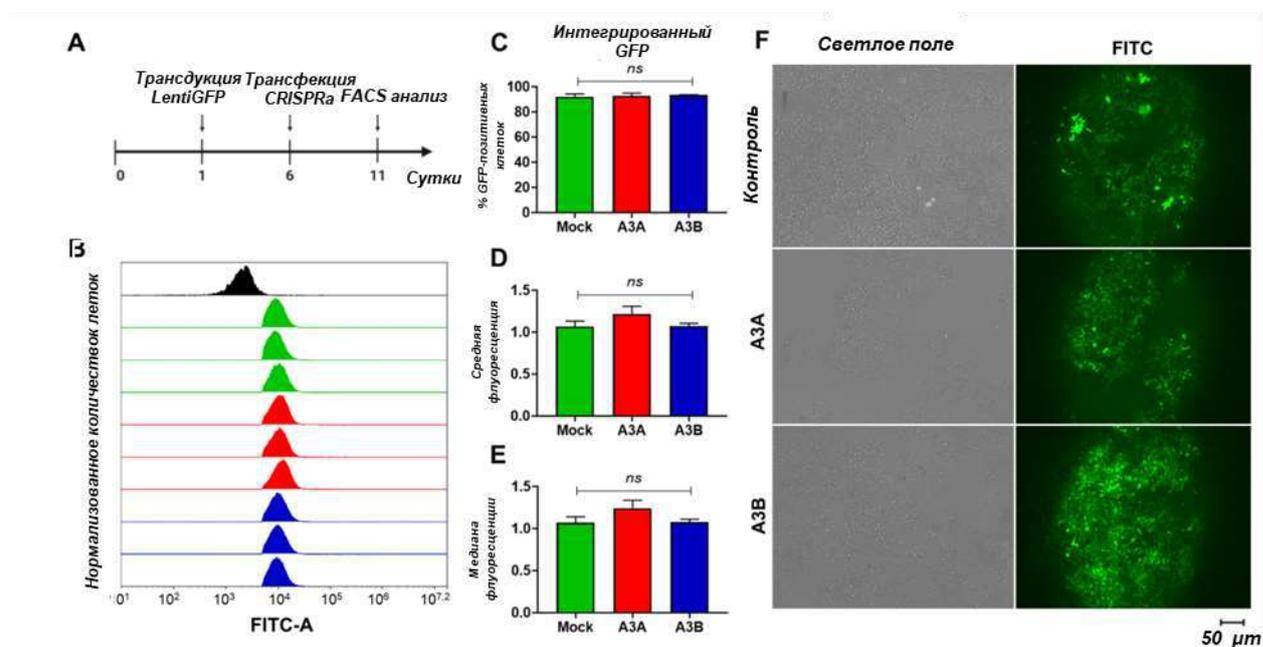
А3А и А3В не удаляла ДНК GFP даже из небольшой доли клеток: процент клеток, не содержащих GFP, изменялся только на 0,3–0,4% в различных группах. Скорость затухания флуоресценции GFP была схожей в группах А3А и А3В CRISPRa.



**Рисунок 93. Анализ эписомальной флуоресценции GFP в клетках, трансфицированных CRISPRa.** Гистограммы флуоресценции GFP в популяциях с низким (R3) и высоким сигналом (R6) (А) нетрансфицированными (NT), (Б) трансфицированными некодирующим РНК-проводником, (В) А3А-индуцированными и (Г) А3В-индуцированными группами. Полуколичественный анализ % GFP-положительных клеток, а также среднего и медианного значения флуоресценции GFP в (Д) контрольных группах, (Е) А3А-индуцированных и (Ж) А3В-индуцированных группах. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ , \*\*\*  $p < 0,001$  [502]

Гиперэкспрессия А3А и А3В, индуцированная CRISPRa, очевидно, приводит к распаду эписомально-экспрессируемого GFP. Однако, предыдущие исследования показали, что факторы АРОВЕС могут не влиять на геномную ДНК. Чтобы непосредственно оценить влияние CRISPRa-индуцированных А3А и А3В на экспрессию ДНК GFP, интегрированной в геном человека с помощью лентивирусного вектора, была проведена трансфекция клеток

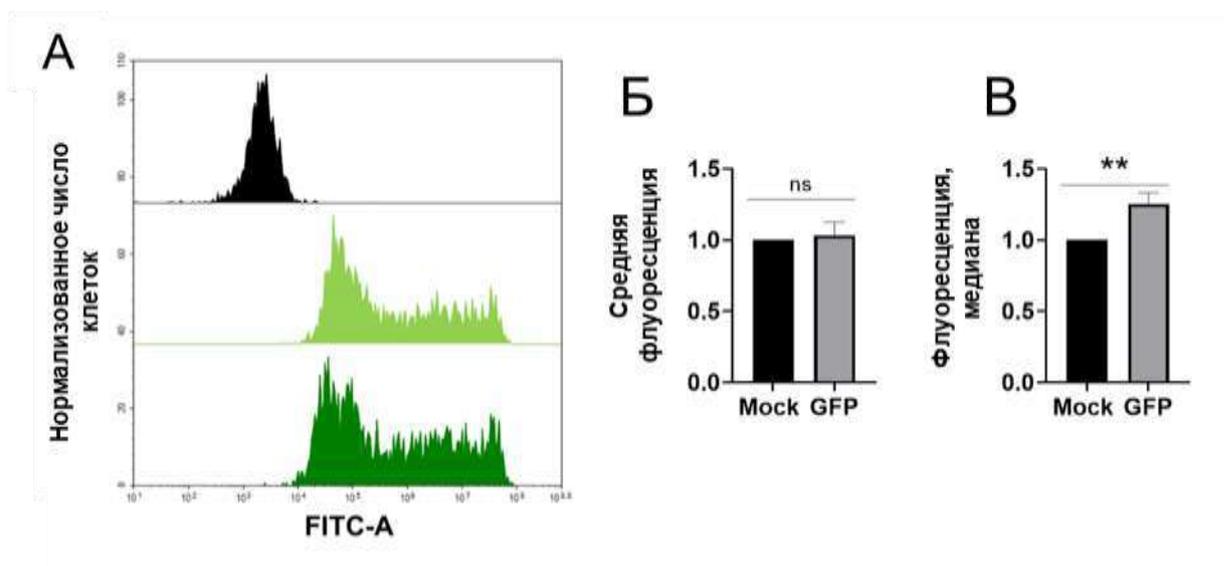
НЕК293Т, стабильно экспрессирующих ген GFP, и анализ параметров светимости GFP и уровней мРНК GFP. На 5-й день после трансфекции клетки анализировали с помощью FACS и флуоресцентной микроскопии (Рисунок 94, 95). В отличие от экспериментов с ко-трансфекцией эписомных конструкторов GFP с CRISPRa, при стабильной экспрессии интегрированной ДНК, кодирующей GFP, не наблюдалось снижения флуоресцентного сигнала GFP в клетках при активации А3А либо А3В. Действительно, процент клеток, экспрессирующих GFP, а также средняя и медианная интенсивность флуоресценции, не отличались от контрольного образца. Таким образом, был сделан вывод, что эндогенная гиперэкспрессия цитидин-дезаминаз А3А/А3В гипермутирует и подавляет экспрессию эписом чужеродной ДНК, но не влияет либо менее эффективно влияет на стабильность и экспрессию интегрированной чужеродной ДНК.



**Рисунок 94. CRISPRa-активированные А3А и А3В не влияют на экспрессию интегрированного GFP.** (А) Дизайн эксперимента. Клетки НЕК–293Т трансдуцировали лентивекторами, экспрессирующими GFP, через 5 дней трансфицировали системами CRISPRa и анализировали на экспрессию GFP с помощью проточной цитофлуориметрии на 11-й день. (Б) Репрезентативные графики проточной цитофлуориметрии. Гистограммы, представляющие (В) процент GFP-положительных клеток, (Г) среднюю и (Д) медианную интенсивность флуоресценции в экспериментальных группах. (Е) Флуоресцентные изображения CRISPRa-трансфицированных клеток [502].

CRISPRa-активированные А3А и А3В не влияют на экспрессию интегрированного GFP. (А) Экспериментальный дизайн. Клетки НЕК-293Т трансдуцировали лентивекторами, экспрессирующими GFP, через 5 дней трансфицировали системами CRISPRa и анализировали на экспрессию GFP с помощью FACS на 11-й день. (Б) Репрезентативные

графики FACS для нетрансдуцированных (черная гистограмма) и трансдуцированных GFP клеток - трансфицированы CRISPRa и нецелевой РНК-проводник (зеленая гистограмма), А3А-направленной РНК-проводник (красная гистограмма) или А3В-направленной РНК-проводник (синяя гистограмма). Гистограммы, представляющие (С) процент GFP-положительных клеток, (D) среднюю и (E) медианную интенсивность флуоресценции в экспериментальных группах. (F) Флуоресцентные изображения контрольных и CRISPRa-трансфицированных клеток. ns: статистически не значимо.



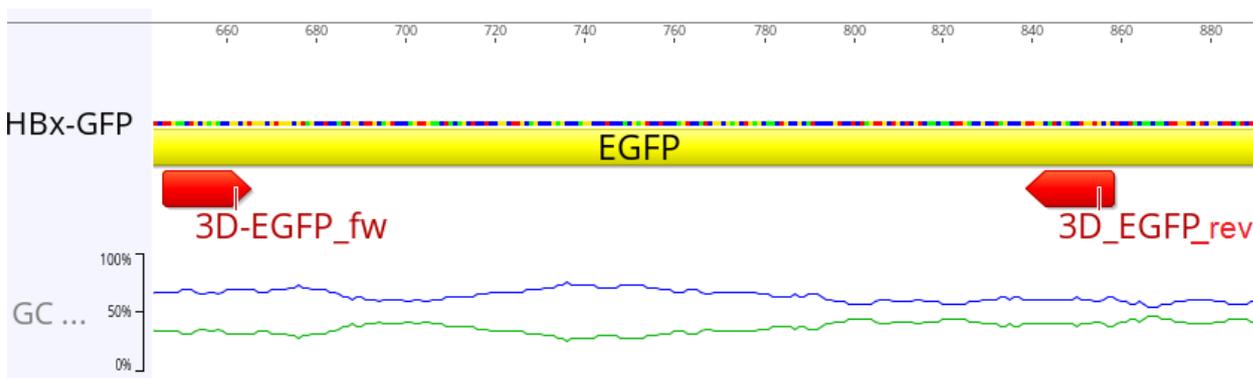
**Рисунок 95. Сравнительный анализ контрольных образцов, трансфицированных плазмидой GFP с и без имитации действующей системы CRISPRa [502].**

Вслед за этим, был изучен механизм снижения флуоресценции GFP при активации А3А/А3В. С этой целью была проведена оценка уровней ДНК GFP и дезаминирования ДНК GFP (Рисунок 96, 97). Полуколичественный ПЦР анализ показал, что уровни ДНК эписом, экспрессирующих GFP, снижались на >86% и >78% при активации А3А и А3В, соответственно (Рисунок 97А). Снижение стабильности и деградация ДНК-мишени при действии факторов АРОВЕСs может быть вызвано дезаминированием цитозинов с образованием урацила, субстрата для факторов репарации с последующим вырезанием поврежденных нуклеотидов и мутациям по типу G → A. Формирование комплементарной пары между уридином и аденином вызывает типичные для цитидин-дезаминаз мутации на комплементарной цепи по типу C → T. Дезаминированные нуклеотиды в GC-обогащенных локусах могут вырезаться с образованием делеций, и, при большой частоте мутаций на протяженному участке ДНК – разрушению чужеродных нуклеиновых кислот. Действительно, CRISPRa-активация транскрипции А3А и А3В приводит к значительному дезаминированию матриц GFP, о чем свидетельствует 3D-ПЦР (Рисунок 97Б). Несмотря на то, что к 5-му дню после трансфекции, более 80% ДНК GFP в группах А3А и А3В уже было

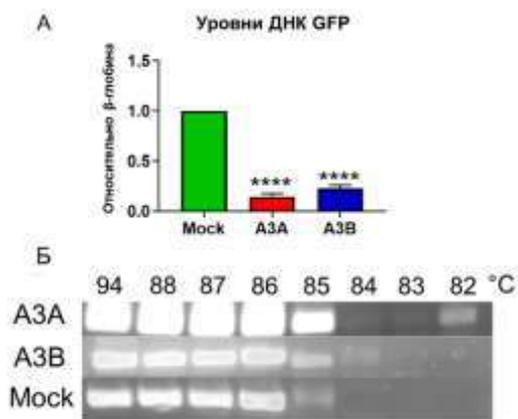
разрушено, при температуре 84 °С происходила амплификация продукта в группах А3А и А3В, что указывает на обширное дезаминирование ДНК [502].

В заключение, эписомы чужеродной ДНК эффективно разрушаются и инактивируются при транзientной гиперэкспрессии А3А и А3В, о чем свидетельствуют снижение уровней ДНК (разрушение ДНК), дезаминирование ДНК (3D-PCR анализ), а также нарушение экспрессии GFP-репортерного конструкта (снижение уровней экспрессии мРНК и флуоресценции белка).

Поскольку А3А и А3В являются известными промутагенными факторами, которые могут дезаминировать собственную ДНК, вызывать мутации, нарушать стабильность генома человека и вызывать образование двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) [502], была также изучена возможность дезаминирования чужеродных последовательностей нуклеиновых кислот, интегрированных в геном человека. Дезаминирование подобных сайтов и образование ДЦР, следовательно, могут указывать на возможность токсического действия факторов АРОВЕС. На модели интегрированной формы ДНК GFP было продемонстрировано, что А3А и А3В не влияют на экспрессию ДНК GFP и не вызывают образование мутаций в проанализированных GC-богатых участках с помощью высокочувствительного анализа 3D-PCR. Помимо этого, на обеих использованных моделях было показано, что трансактивации экспрессии А3А и А3В не влияет на жизнеспособность клеток человека [502].

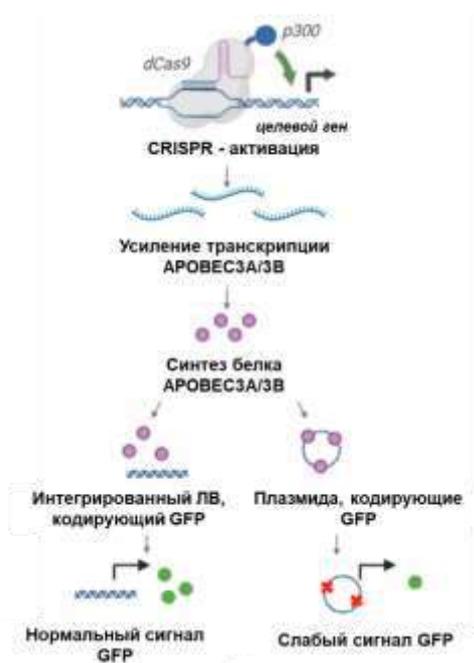


**Рисунок 96.** Схематическое изображение локуса GFP (EGFP). Синяя линия указывает на состав GC; зеленая линия – на состав AT. На рисунке отмечены праймеры, использованные для 3D PCR (3D-EGFP\_fw/3D-EGFP\_rev) [502].



**Рисунок 97. Разрушение и дезаминирование чужеродной ДНК посредством CRISPRa-опосредованной активации A3A и A3B.** (А) Снижение уровней GFP-кодирующей плазмиды при активации транскрипции A3A (красные столбцы) и A3B (синие столбцы) с помощью CRISPRa. \*\*\*\*  $p < 0,0001$ . (Б) Дезаминирование ДНК GFP, опосредованное A3A и A3B, измеренное с помощью анализа 3D-ПЦР [502].

В ходе работы впервые выявлено, что даже очень кратковременная (менее 24 часов) активация экспрессии мРНК A3A или A3B приводит к существенному, но не полному, снижению уровней и дезаминированию чужеродной эписомной ДНК. Следовательно, был сделан вывод о том, что непродолжительной, кратковременной гиперэкспрессии факторов АРОВЕС может быть достаточно для существенного подавления уровней репликации отдельных вирусов. Активация отдельных факторов, оказывающих влияние на репликацию ВГВ, может быть перспективным подходом для разработки новых терапевтических препаратов на основе CRISPRa для лечения хронической инфекции (Рисунок 98). К основным практическим проблемам при использовании подходов на основе CRISPRa для подавления репликации вирусов относят: (а) отсутствие эффективных методов доставки систем CRISPR/Cas; (б) кратковременный характер активации CRISPRa при использовании транзientной трансфекции и (в) потенциальное токсическое действие активируемых факторов.

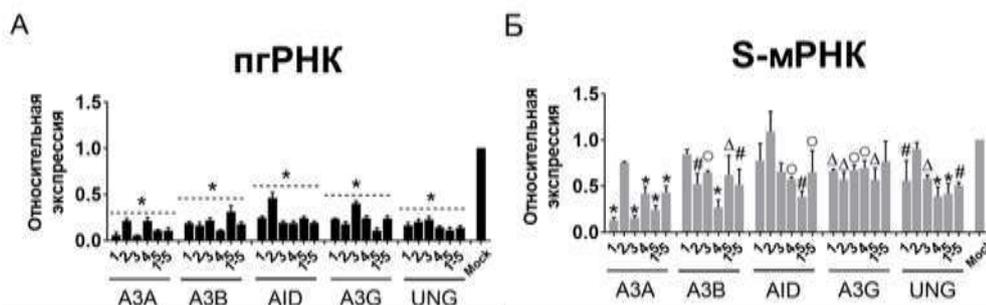


**Рисунок 98. Механизм действия АРОВЕС3А/3В на интегрированные и эписомальные матрицы [502].**

В результате проведенных исследований были сделаны выводы о том, что кратковременная CRISPRa-опосредованная активация генов АРОВЕС может быть успешно использована для нейтрализации чужеродной ДНК. Приоритетными мишенями для подхода по CRISPR-активации факторов АРОВЕС могут быть ДНК ВГВ, интермедиаты ВИЧ-1, вирусы папилломы и полиомы человека, герпес вирусы. В целом подход по CRISPRa отдельных или комплекса противовирусных генов может быть более эффективным, перспективным и безопасным в сравнении с иными иммуномодулирующими подходами/препаратами, поскольку (а) при CRISPRa не затрагиваются сигнальные пути, которые могут быть блокированы при вирусной инфекции; (б) CRISPRa усиливают транскрипцию гена напрямую, независимо от сочетанных сигнальных путей, активация которых может приводить к развитию воспаления и программ гибели клеток.

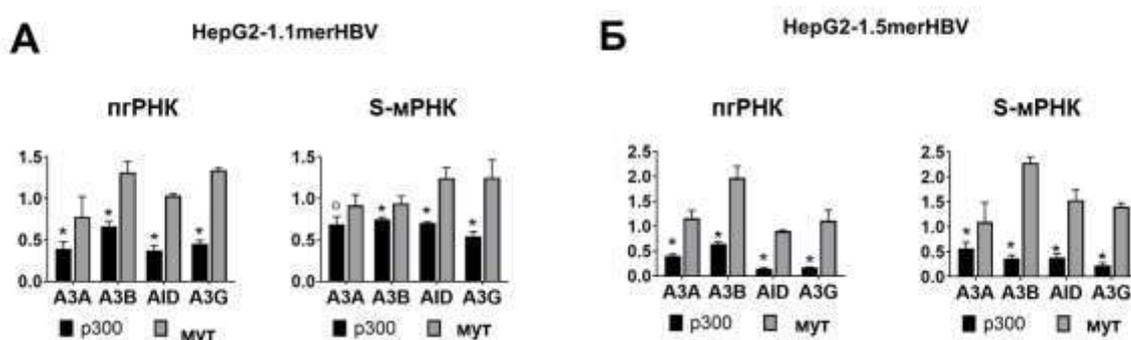
### 6.5. Транзистентная активация АРОВЕС/AID подавляет репликацию вируса гепатита В

В рамках следующего этапа исследований был разработан подход по наиболее эффективной активации анти-ВГВ факторов А3А, А3В, А3G и AID, и проведена оценка их влияния на репликацию ВГВ. Была проведена оценка действия CRISPRa с набором из 5 РНК-проводников с использованием индивидуальных РНК-проводников либо их комбинаций. Анализ проводили по измерению уровней прегеномной РНК ВГВ (пгРНК) (Рисунок 99А), основного транскрипта вируса, и S-мРНК (молекулы мРНК, кодирующие поверхностные антигены ВГВ) (Рисунок 99Б). В экспериментах с ко-трансфекцией ВГВ генома показано, что при CRISPRa факторов АРОВЕС/AID снижение транскрипции ВГВ происходит примерно на 50–80%. В дальнейших исследованиях использовали РНК-проводники, продемонстрировавшие наибольшие уровни снижения вирусных транскриптов, а также по параметрам их потенциальной внецелевой активности (наименьшее число внецелевых сайтов в кодирующих и регуляторных областях генов).



**Рисунок 99. Скрининг противовирусной активности РНК-проводников.** Противовирусная активность РНК-проводников, нацеленных к генам А3А, А3В, AID, А3G и UNG, измеренная по уровням (А) пгРНК и (Б) S-мРНК. РНК ВГВ представлена относительно мРНК GAPDH. ○  $p < 0,05$ , Δ  $p < 0,01$ , #  $p < 0,001$ , \*  $p < 0,0001$  [503]

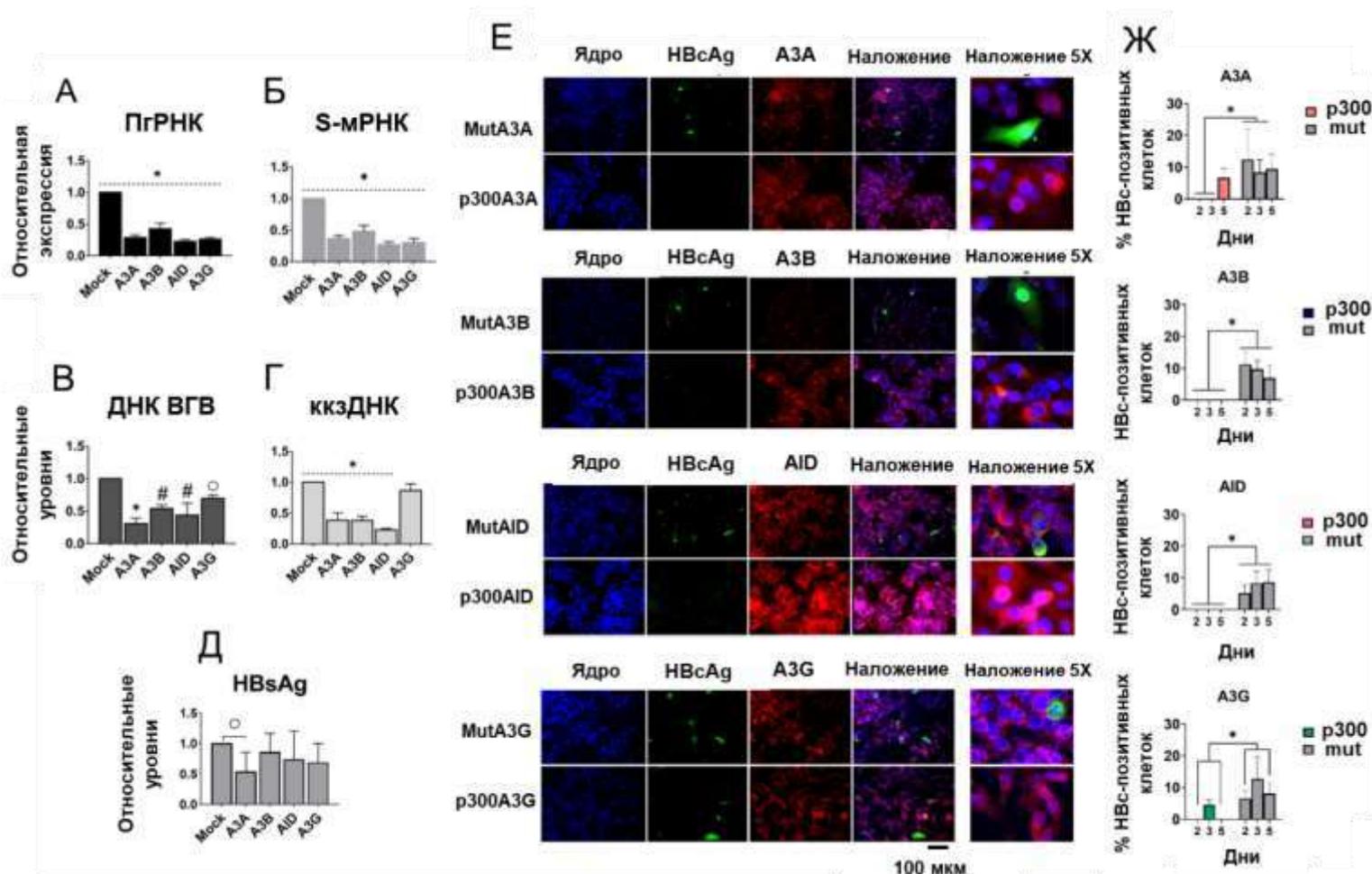
Далее проводили анализ противовирусного действия CRISPRa с выбранными РНК-проводниками на моделях клеток HepG2-1.1merHBV, HepG2-1.5merHBV (Рисунок 100А, Б) и трансфекции рккзДНК в клетки HepG2 (Рисунок 101). В клетках HepG2-1.1merHBV гиперэкспрессия А3G снижала образование ккзДНК ВГВ de novo, тогда как в клетках HepG2-1.5merВГВ со стабильной экспрессией ВГВ А3G не влияла на предварительно установленные уровни ккзДНК ВГВ. Остальные гены (А3А, А3В, А1D) во всех случаях снижали уровни ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ. Очевидно, что фактор А3G не влияет на установившийся пул ккзДНК, в то время как при индукции репликации ВГВ в клетках HepG2-1.1merHBV гиперэкспрессия А3G нарушает/ограничивает образование ккзДНК ВГВ de novo.



**Рисунок 100. Подавление репликации ВГВ с помощью CRISPRa в стабильных клеточных линиях.** Противовирусную активность анализировали на (А) клетках HepG2–1.1merВГВ с репликацией ВГВ, индуцированной с промотора tet–on de novo путем добавления доксициклина в течение 24 часов, и (Б) на клетках HepG2–1.5merВГВ, где ВГВ конститутивно продуцируется с промотора дикого типа.  $\circ p < 0,05$ ,  $\Delta p < 0,01$ ,  $\# p < 0,001$ ,  $*p < 0,0001$ .

На модели рккзДНК CRISPR-активация всех выбранных генов, за исключением А3G, снижала уровни ккзДНК (А3G не воздействовал на уже сформированный пул ккзДНК) (Рисунок 101А-Г). Кроме того, активация всех изученных факторов подавляла транскрипцию (по уровням тРНК и S-мРНК) и уровни внутриклеточной ДНК ВГВ. Снижение параметров ВГВ при активации любого из изученных факторов составляло 50–80%. Вместе с этим, уровни секретируемого HBsAg практически не изменялись при CRISPR-активации АРОВЕС/А1D, что может быть связано с длительным временем полужизни HBsAg (Рисунок 101Д). Количественный анализ HBsAg-положительных клеток показал полную элиминацию экспрессии HBsAg при CRISPRa, тогда как в контрольных группах (с мутированным вариантом dCas9-p300 белка без каталитической, ацетилтрансферазной активности) детектировалось ~ 10% HBsAg-положительных клеток (Рисунок 101Е,Ж). В целом эти результаты показывают, что даже кратковременная

активация АРОВЕС/AID значительно подавляет транскрипцию и репликацию ВГВ и (за исключением А3G) снижает уровни ккзДНК ВГВ.



**Рисунок 101. Противовирусная активность АРОВЕС/AID при действии CRISPRa.**

Оценка противовирусной активности по уровням (А) пгРНК, (Б) S-мРНК, (В) общей внутриклеточной ДНК ВГВ, (Г) ккзДНК и (Д) HBsAg. (Е) Снижение экспрессии HBcAg ВГВ при действии CRISPRa. (Ж) Полуколичественный анализ экспрессии HBcAg ВГВ в экспериментальных группах при активации отдельных факторов АРОВЕС/AID. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК представлены относительно уровней β-глобина; Уровни пгРНК и S-мРНК - относительно мРНК GAPDH. Mock, dCas9-p300 с нецелевой РНК-проводник. Результаты представляют собой среднее значение по крайней мере 3 экспериментов ± стандартное отклонение.  $\circ p < 0,05$ ;  $\Delta p < 0,01$ ;  $\#p < 0,001$ ;  $* p < 0,0001$ .

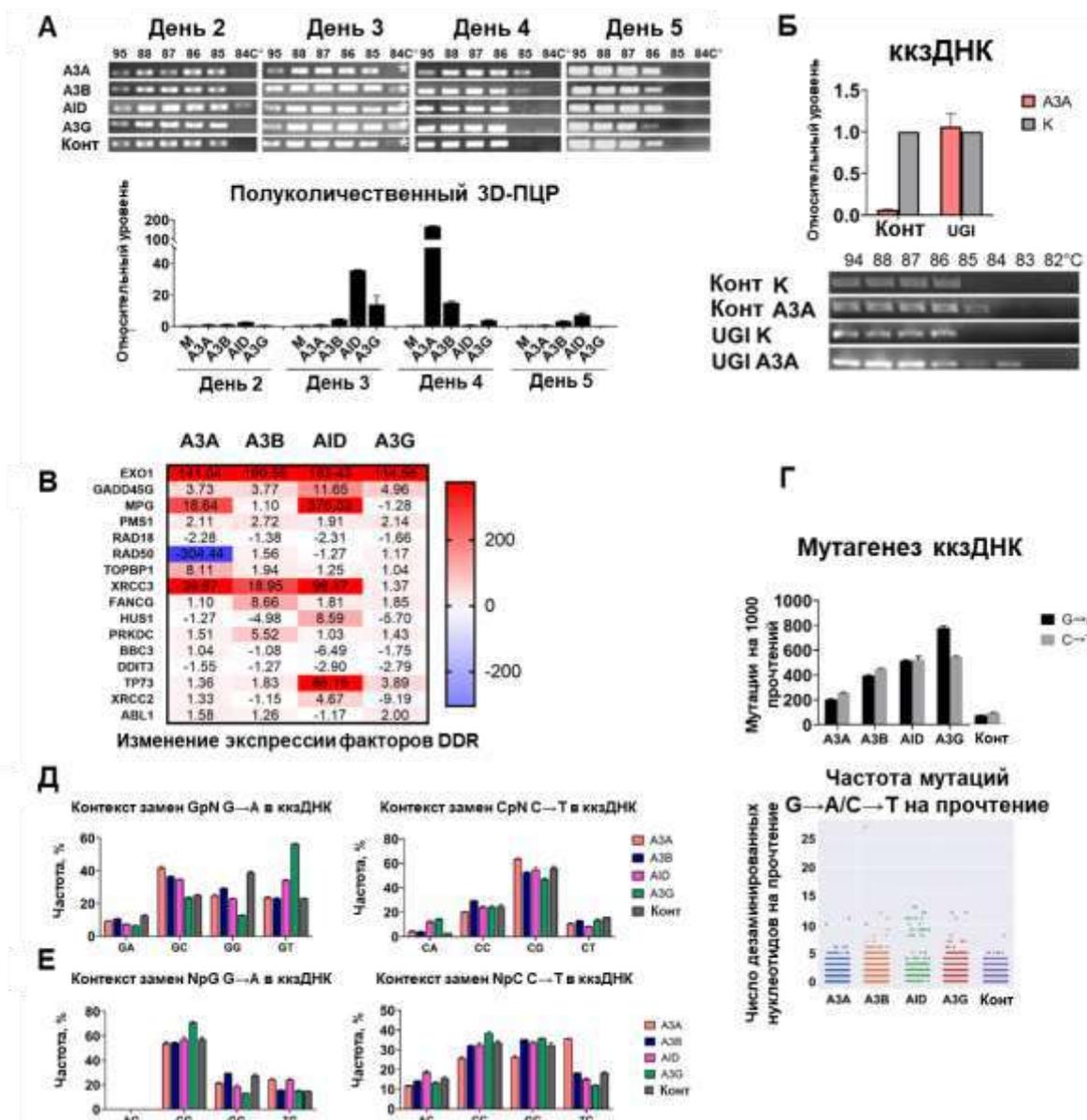
### 6.5. Динамика дезаминирования и профиль мутаций ккзДНК вируса гепатита В при действии АРОВЕС/AID

Белки АРОВЕС/AID могут дезаминировать одноцепочечные участки ДНК ВГВ и ккзДНК, что приводит к мутациям G→A и C→T. Считается, что АРОВЕС/AID

взаимодействуют только с одноцепочечными нитями ДНК; следовательно, взаимодействие с ккзДНК ВГВ (двухцепочечной молекулой) может происходить только в результате расплетания нитей вирусного генома при репликации. Тем не менее, недавно было продемонстрировано, что АЗВ может также дезаминировать двухцепочечную ккзДНК, не способную к транскрипции и репликации. Обильно дезаминированные вирусные геномы могут разрушаться, вероятно, с помощью урацил-ДНК-гликозилазы (UNG) и *interferon stimulated gene 20* (ISG20). В противном случае мутации могут функционально инактивировать геномы ВГВ. Дезаминирование ДНК можно детектировать с помощью метода 3D-ПЦР, который селективно амплифицирует мутации А:Т в богатой С:G области НВх генома ВГВ. Чем ниже температура, при которой может быть получен целевой ампликон, тем выше дезаминирование мишени.

В рамках исследований мы выполнили 3D-ПЦР-анализ ккзДНК ВГВ, выделенной через 2–5 дней после начала исследования, и обнаружили дополнительные ПЦР-продукты ожидаемого размера в клетках, трансфицированных системами CRISPRa (Рисунок 102). При анализе, ккзДНК ВГВ очищали от других геномных форм с использованием высокоэффективной процедуры по обработке изолятов экзонуклеазой Т5. Результаты 3D-ПЦР показали обширное дезаминирование целевой области ккзДНК ВГВ. Однако кинетика дезаминирования различалась в образцах с активацией разных генов семейства АРОВЕС/AID: А3А и А3В заметно дезаминировали ккзДНК ВГВ на 4-й день после начала исследования, в то время как дезаминирование, вызванное АID и А3G, было наиболее выраженным на 3-й день после начала исследования. Матрицы дезаминированной ккзДНК ВГВ практически отсутствовали через 5 дней после начала исследования (Рисунок 102А). Полуколичественная 3D-ПЦР подтвердила результаты амплификации с детекцией методом гель-электрофореза. Полученные данные указывают на различную кинетику дезаминирования ккзДНК ВГВ с помощью АРОВЕС/AID и позволяют предположить, что обширно дезаминированные вирусные геномы разрушаются [503].

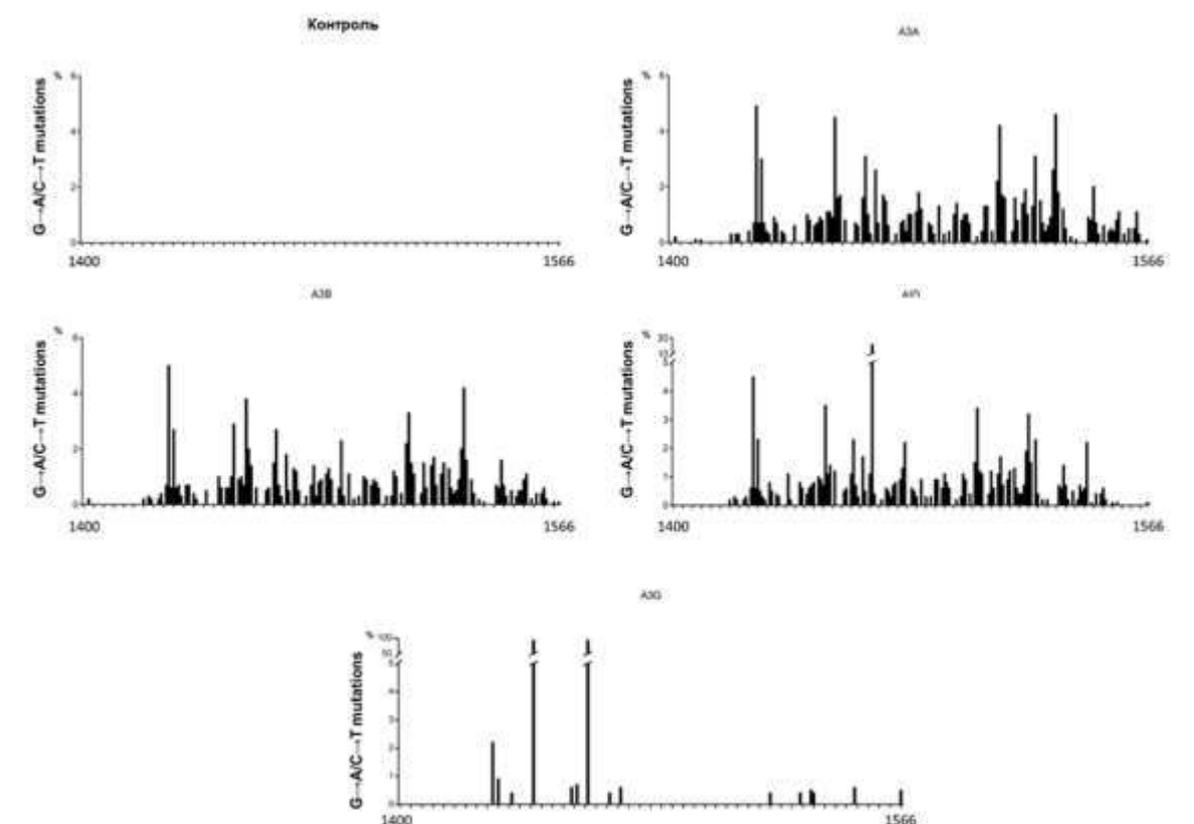
Чтобы непосредственно оценить деградацию ккзДНК ВГВ при активации цитидин-дезаминаз, были проведены исследования по блокированию фактора UNG - основного фермента, ответственного за вырезание дезаминированных нуклеотидов. С этой целью трансфицировали ингибитор урацилгликозилазы (UGI) и измеряли уровни ккзДНК ВГВ и дезаминирования вирусного генома. Как и ожидалось, ко-трансфекция UGI блокировала деградацию ккзДНК ВГВ и увеличивала образование продуктов 3D-ПЦР при более низких температурах, что свидетельствует о разрушении значительной доли внутриклеточной ккзДНК ВГВ (Рисунок 102Б).



**Рисунок 102. Активация АРОВЕС/АID вызывает дезаминирование ккзДНК ВГВ.** (А) Анализ дезаминирования ккзДНК ВГВ помощью 3D-ПЦР. Звездочками отмечены продукты ПЦР, выбранные для анализа NGS. (Б) Ингибирование деградации ккзДНК ВГВ с помощью UGI: относительные уровни ккзДНК (вверху) и результаты электрофореза 3D-ПЦР (внизу). (В) Ключевые транскриптомные изменения, определенные с помощью микроэрей анализа. Интенсивность окраски определяет среднюю относительную кратности экспрессии (Г) Частота (слева) общих мутаций G→A и C→T и (справа) мутаций G→A/C→T в последовательность ккзДНК ВГВ. ккзДНК ВГВ анализировали на 4-й день после трансфекции. Контекст мутаций мутаций G→A/C→T в ккзДНК ВГВ в динуклеотидах (Е) G/CpN и (F) NpG/C.

Транскриптомное профилирование экспериментальных групп с активацией АРОВЕС/АID в клетках НерG2-1.1merВГВ (эта клеточная линия была выбрана из-за более физиологических уровней ккзДНК при 24-часовой индукции промотора tet-on) на 3-й день после начала эксперимента (Рисунок 102В). продемонстрировало значительные различия в

экспрессии факторов ответа на повреждение ДНК. Наиболее заметное изменение экспрессии происходило в генах EXO1 (> 100-кратное увеличение), XRCC3 (> 19-кратное увеличение в группах А3А, А3В и А1D) и MPG (~ 19-кратное увеличение в А3А и ~ 350-кратное увеличение в группах А1D), которые отвечают за репарацию несовпадений ДНК, гомологичную рекомбинацию и эксцизионную репарацию оснований нуклеотидов, соответственно. Активация А1D также значительно увеличивала уровни мРНК факторов, участвующих в апоптозе, а именно GADD45G (примерно 12-кратное увеличение) и TP73 (примерно 85-кратное увеличение)..



**Рисунок 103. Профиль дезаминирования ккзДНК ВГВ при активации АРОВЕС/А1D с помощью CRISPRa.** Область генома ВГВ (1400–1566 н.т.) амплифицировали и анализировали с помощью NGS. Карта дезаминирования указывает частоту мутаций G→A/C→T в указанных положениях.

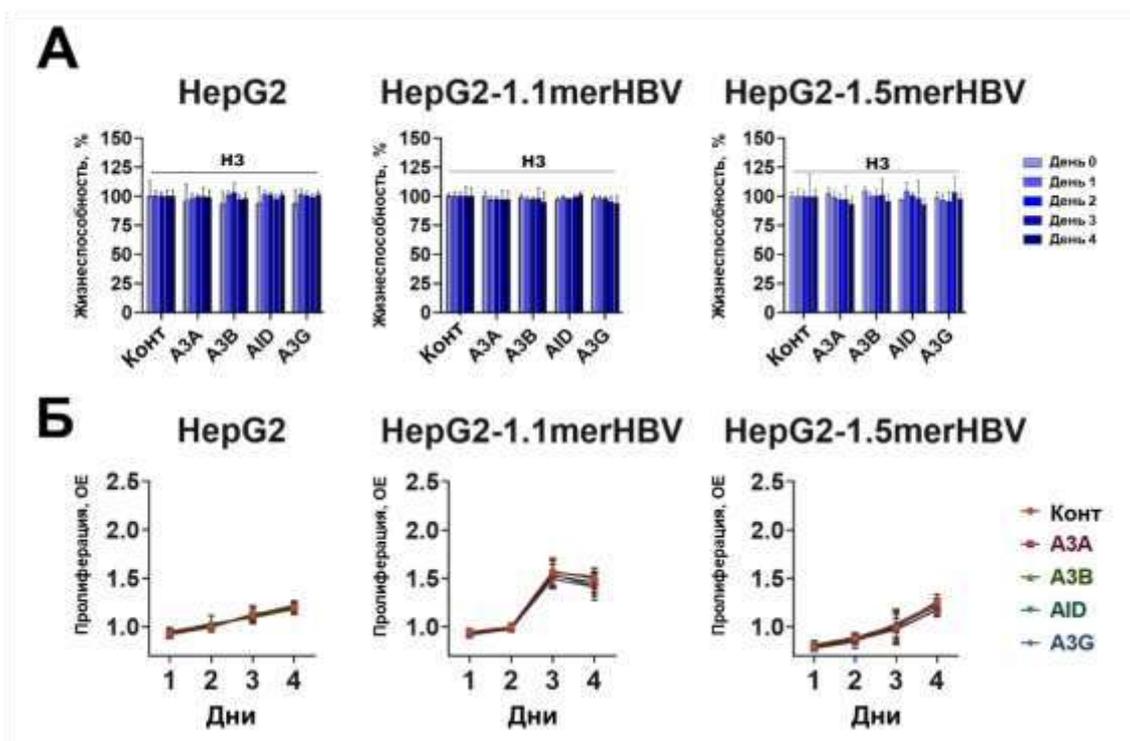
Далее, нами было проведено секвенирование 3D-ПЦР продуктов для каждого образца на 3-й день после трансфекции для анализа мутагенного действия АРОВЕС/А1D на ккзДНК ВГВ и прямого сравнения эффективности дезаминирования каждого из факторов АРОВЕС/А1D при CRISPRa. Глубокое секвенирование выявило частые, характеристичные мутации G→A и C→T, расположенные по всей анализируемой области, с похожими пиками («горячими точками») дезаминирования генома ВГВ в группах по активации А3А и А3В, и отдельными пиками в группах А3G и А1D (Рисунок 103). Частота мутаций G→A

и С→Т была схожей в группах А3А, А3В и А1D, в то время как мутации G→А преобладали при CRISPR-активации гена А3G. Анализ контекста динуклеотидных мутаций в сайтах С/GpN и NpC/G выявил характерный паттерн мутаций, типичный для АРОВЕС/А1D (Рисунок 102Г-Е). Уникальный паттерн А3G-опосредованного дезаминирования и его влияние на ккзДНК ВГВ может указывать на то, что наблюдаемые мутации возникают не напрямую в ккзДНК ВГВ, а в образованной *de novo* ккзДНК при конверсии из дезаминированного предшественника кчдДНК ВГВ. В целом, индуцированная CRISPRa гиперэкспрессия АРОВЕС/А1D приводит к выраженному дезаминированию и разрушению генома ВГВ.

#### **6.6. Токсические и мутагенные эффекты транзientной гиперэкспрессии АРОВЕС/А1D зависят от уровней вирусной репликации**

АРОВЕС/А1D вносят существенный вклад в мутации, приводящие к развитию многих видов опухолей. Факторы АРОВЕС/А1D могут напрямую индуцировать повреждение ДНК, включая ДЦР, наиболее опасный тип повреждения ДНК. При CRISPR-активации АРОВЕС/А1D был проведен исчерпывающий анализ влияния транзientной гиперэкспрессии на клеточную жизнеспособность, повреждение ДНК и мутагенез генома инфицированных клеток. Активация CRISPRa АРОВЕС/А1D не влияла на жизнеспособность и пролиферацию клеток (Рисунок 104). Поскольку модели ВГВ *in vitro* представляют собой различные варианты трансформированных клеток гепатомы человека НерG2, результаты анализа жизнеспособности могут быть необъективны, и скрывать различные токсические эффекты АРОВЕС/А1D. Чтобы проанализировать влияние АРОВЕС/А1D на целостность клеточного генома, был проведен анализ параметров комет (comet assay), который измеряет разрывы ДНК в отдельных клетках, помещенных в агарозный гель; характеристики хвостов комет указывают на степень повреждения ДНК. Используя анализ комет и анализ иммунного окрашивания на белки  $\gamma$ H2АХ (маркер разрывов ДНК) и 53BP1 (фактор передачи сигналов репарации DSB), было показано, что А3А, А3В и А1D не влияют на стабильность генома (Рисунок 105А). Более того, факторы АРОВЕС/А1D уменьшают среднее количество фокусов  $\gamma$ H2АХ на клетку, в то время как А3А и А3G также уменьшали среднее количество фокусов 53BP1 на клетку. Экспрессию  $\gamma$ H2АХ и 53BP1 оценивали также методом вестерн-блоттинга, однако различия между группами по результатам были статистически незначимы (Рисунок 106). Эти эффекты, вероятно, были связаны с подавлением репликации ВГВ и снижением ДНК-повреждающей активности вируса. Напротив, А3G генерировал значительно большее количество пан-нуклеарных фокусов  $\gamma$ H2АХ (маркер кластерных повреждений ДНК). При CRISPRa UNG, фактора, участвующего в эксцизионной репарации дезаминированных нуклеотидов, а

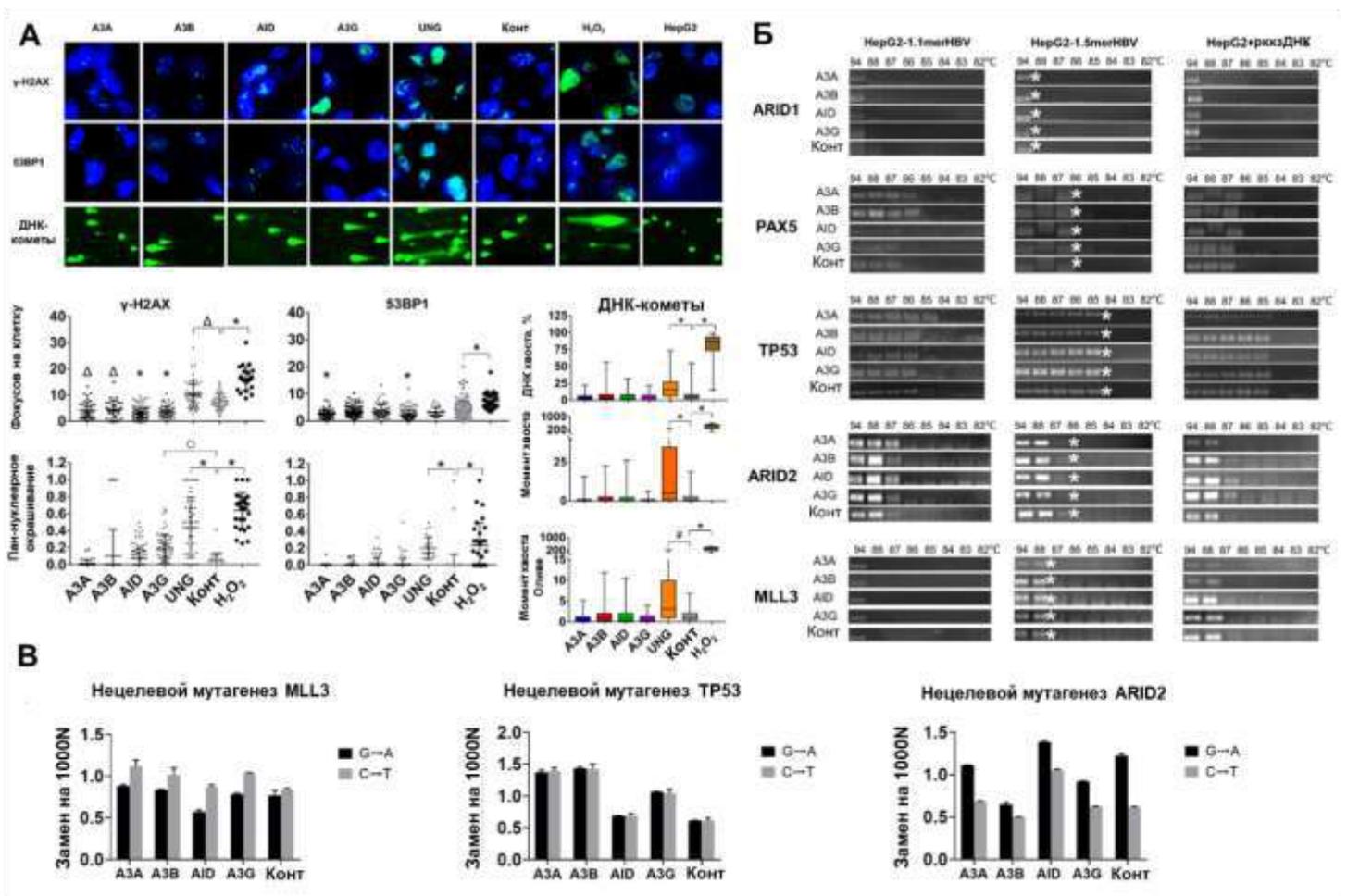
также при добавлении перекиси водорода (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), генотоксического агента, служащего положительным контролем, происходило значительное повреждение ДНК (Рисунок 107, Рисунок 105). Первоначально в рамках разработки подхода по CRISPRa факторов АРОВЕС/АID предполагалось использовать активацию UNG для увеличения эффективности деградации дезаминированной ккзДНК ВГВ. Однако, была выявлена высокая генотоксичность UNG в клетках HepG2, что вынудило нас отказаться от этой стратегии.



**Рисунок 104. Анализ токсичности АРОВЕС/АID.** Гены АРОВЕС/АID активировали в клеточных линиях НерG2, НерG2–1.1merВГВ или НерG2–1.5merВГВ с помощью CRISPRa. (А) Жизнеспособность и (Б) пролиферацию клеток измеряли на 0–4 день после трансфекции.

В нескольких исследованиях ранее было показано, что А3А, А3В и АID связываются с белком НВс ВГВ, который непосредственно привлекает дезаминазы к ккзДНК ВГВ и, таким образом, уменьшает повреждение генома хозяина, ограничивая токсичность и препятствует образованию мутаций в геномной ДНК. Следовательно, некоторые ферменты АРОВЕС/АID являются потенциальными факторами для создания на их основе методов лечения ВГВ-инфекции, способных разрушать внутриклеточный резервуар ВГВ, не повреждая геном инфицированных клеток. Однако в исследованиях по анализу безопасности активации АРОВЕС оценивали нецелевой мутагенез в областях ДНК, которые взаимодействуют с белком НВс [171]; исследования клинически значимых генов, часто подвергающихся мутациям при онкологических заболеваниях человека, практически

не изучены. Во-вторых, неясно, происходит ли мутагенез при низкой вирусной нагрузке (что может происходить в результате подавления вирусной нагрузки при противовирусной терапии либо из-за особенностей ВГВ генома), когда НВс не может эффективно защитить геном от действия цитидин-дезаминаз. Чтобы ответить на эти вопросы, мы проанализировали мутагенную активность подхода CRISPRa с использованием клеточных линий с различной вирусной нагрузкой: HepG2-1.1merВГВ (низкий уровень репликации ВГВ), HepG2-1.5merВГВ (практически физиологическая репликация) и HepG2, ко-трансфицированные рккзДНК ВГВ (высокая, не физиологическая репликация) (Рисунок 108). Затем были проанализированы CpG-богатые области генов, участвующих в канцерогенезе, вызванном АРОВЕС/AID: ARID1, PAX5, TP53, ARID2 и MLL3 (Рисунок 105Б, В).



**Рисунок 105. Токсичность и внецелевые эффекты АРОВЕС/AID при кратковременной активации CRISPR.** (А) Генотоксичность, измеренная с помощью иммуноокрашивания для γ-H2AX и 53BP1 и анализа comet-assay; репрезентативные флуоресцентные изображения (вверху) и полуколичественный анализ (внизу). (Б) 3D-

ПЦР–анализ внецелевого дезаминирования в геноме хозяина. (В) NGS–анализ геномных областей HepG2–1,5merВГВ  $\circ p < 0,05$ ;  $\Delta p < 0,01$ ;  $\#p < 0,001$ ; \*  $p < 0,0001$ .

В результате, детектировалось дезаминирование гена PAX5 при активации А3А и А3В и гена TP53 при активации А3А в клетках HepG2-1.1merHBV. Дополнительный 3D-ПЦР-продукт был также зарегистрирован при анализе гена PAX5 при CRISPRa А3В и А3G в клетках HepG2-1.5merHBV. Нецелевое дезаминирование не наблюдалось в клетках HepG2, трансфицированных рккзДНК. Эти данные свидетельствуют об обратной зависимости между скоростью репликации ВГВ и побочными эффектами ферментов АРОВЕС/AID. Транскриптомный анализ выявил увеличение экспрессии генов, связанных с ответом на повреждение ДНК, включая факторы XRCC3, EXO1, GADD45G, MPG, TOPBP1, HUS1, PRKDC, BBC3, DDIT3, XRCC2, ABL1 и др. (Рисунок 102В, Рисунок 109-111). Для непосредственного анализа мутагенеза хозяина было проведено высокопроизводительное секвенирование ампликонов с той же температурой плавления в клетках HepG2-1.5merВГВ, наиболее физиологичной модели ВГВ. Хотя дополнительные продукты 3D-PCR наблюдались в гене PAX5 только при использовании А3В, глубокое секвенирование выявило значительное увеличение характерных мутаций G→A/C→T гена TP53 (активация А3А, А3В и А3G) и гена ARID2 (активация AID).

В совокупности, кратковременная CRISPRa активация генов А3А, А3В и AID не вызывает значительных повреждений ДНК в геноме хозяина, в то время как активация А3G увеличивает образование клеток с пан-ядерным окрашиванием  $\gamma$ H2AX. Репликация ВГВ действительно ограничивает ДНК-повреждающее и дезаминирующее действие факторов АРОВЕС/AID, но этот эффект ослабевает при снижении вирусной нагрузки [503].

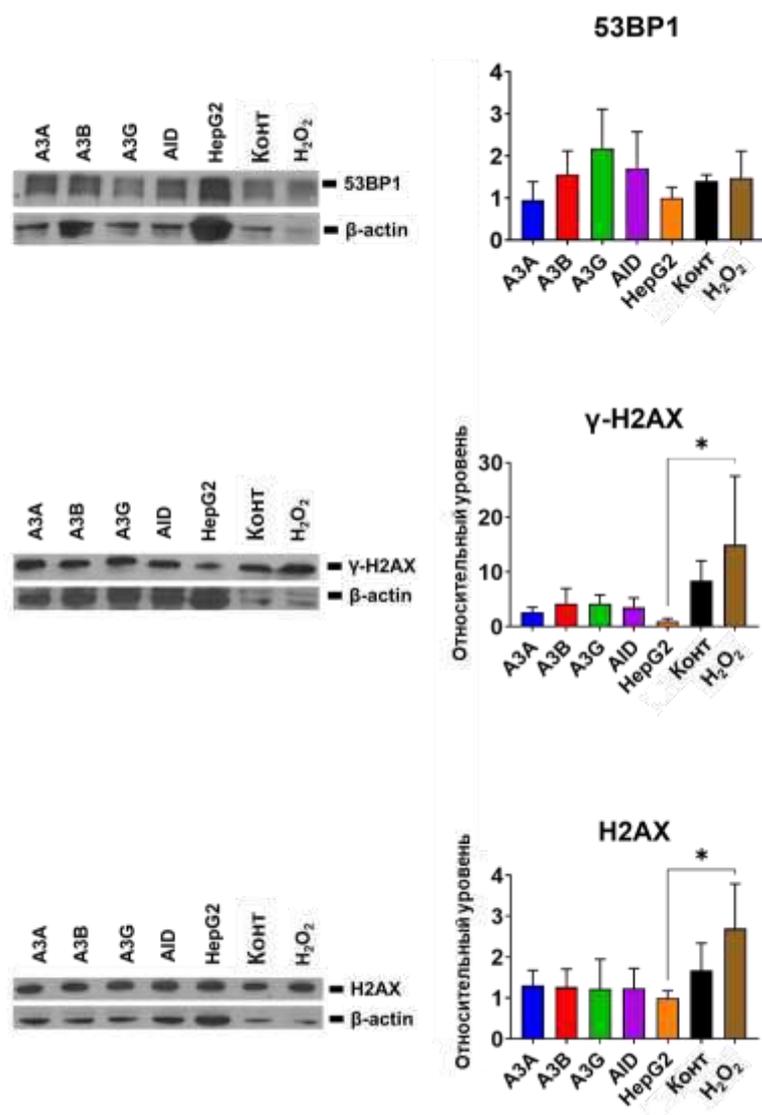


Рисунок 106. Вестерн-блот анализ уровней 53BP1,  $\gamma$ -H2AX, H2AX и  $\beta$ -актина в клетках, трансфицированных CRISPRa.

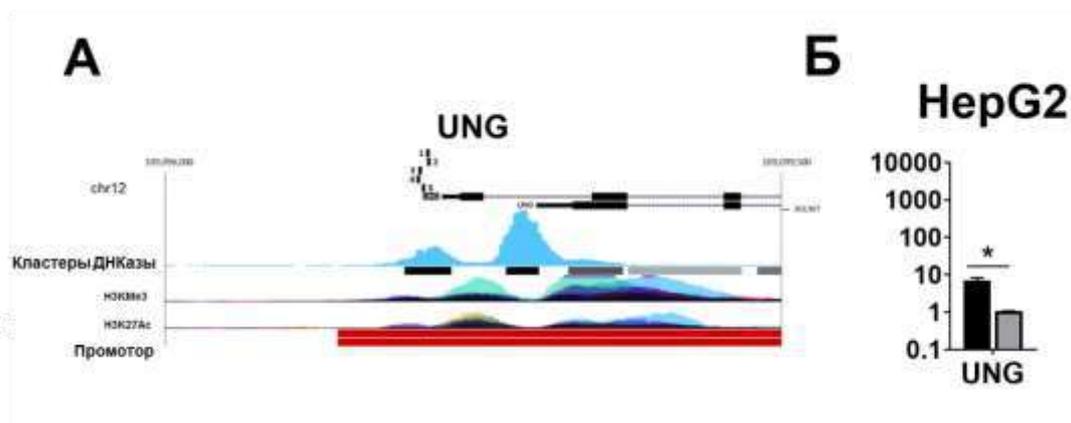
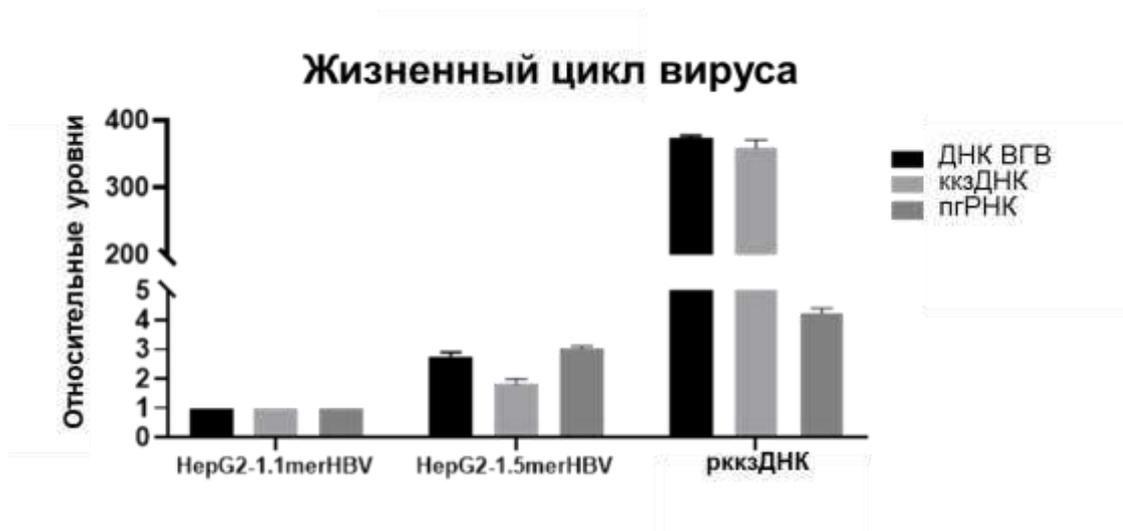


Рисунок 107. CRISPR-активация гена UNG. (А) Дизайн РНК-проводника, нацеленной к промотору гена UNG. (Б) Уровни мРНК UNG после CRISPRa. Уровни мРНК UNG с CRISPRa (черные столбцы) или CRISPRa с мутантной формой р300 (серые столбцы). Уровни мРНК UNG рассчитывали относительно мРНК GAPDH.  $\circ p < 0,05$ ,  $\Delta p < 0,01$ ,  $\# p < 0,001$ ,  $* p < 0,0001$ .



**Рисунок 108. Репликация ВГВ на моделях *in vitro*.** Относительные уровни ДНК, ккзДНК и пгРНК ВГВ измеряли в 3 клеточных линиях: HepG2–1.1merВГВ с активацией tet–on промотора ВГВ с использованием доксициклина, HepG2–1.5merВГВ с конститутивной продукцией ВГВ из промотора дикого типа и в HepG2. клетки, трансфицированные рккзДНК ВГВ.

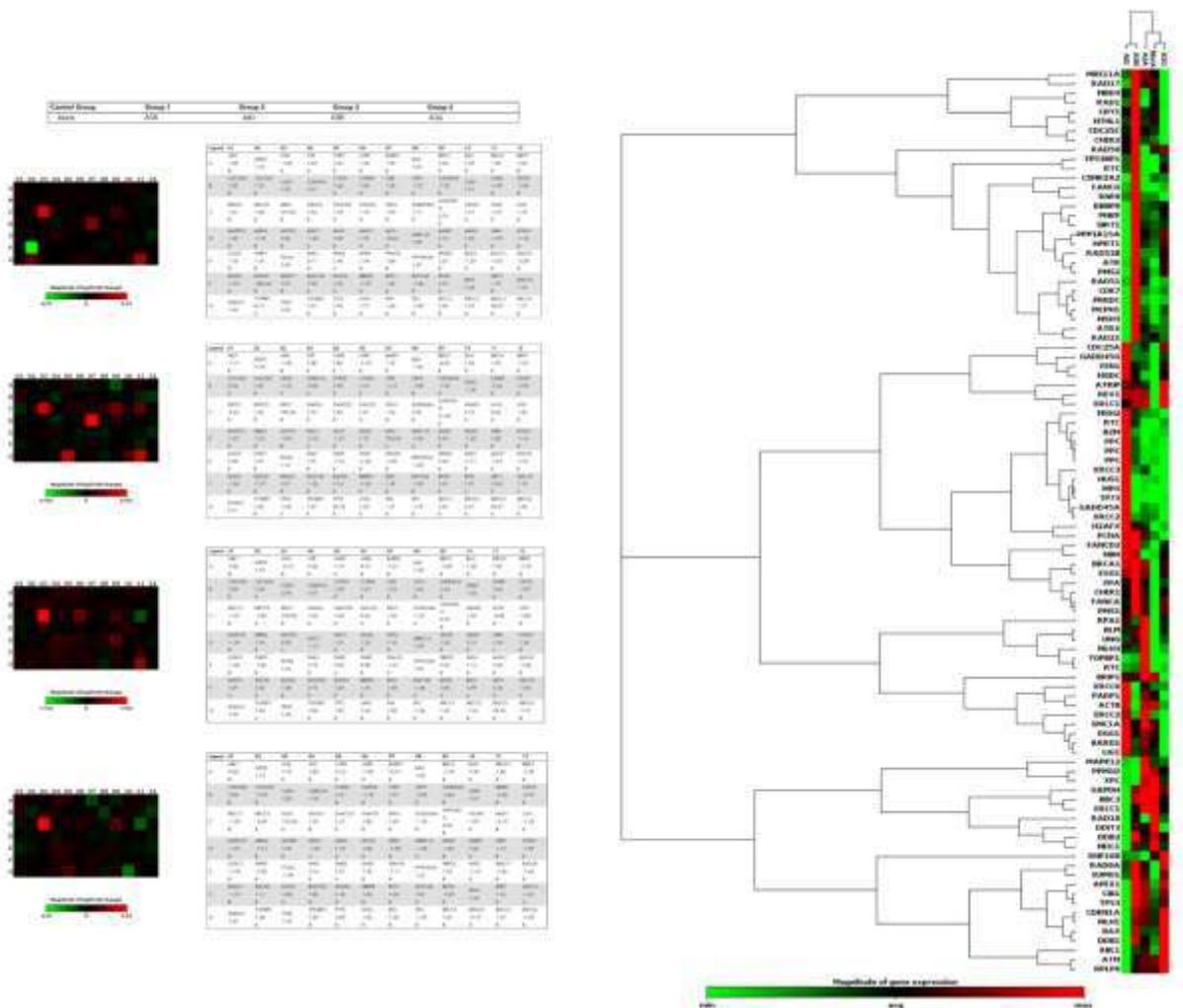


Рисунок 109. Анализ микроаррай клеток НерG2–1.1merВГВ, трансфицированных системами CRISPRa, нацеленными на АРОВЕС/AID [503].

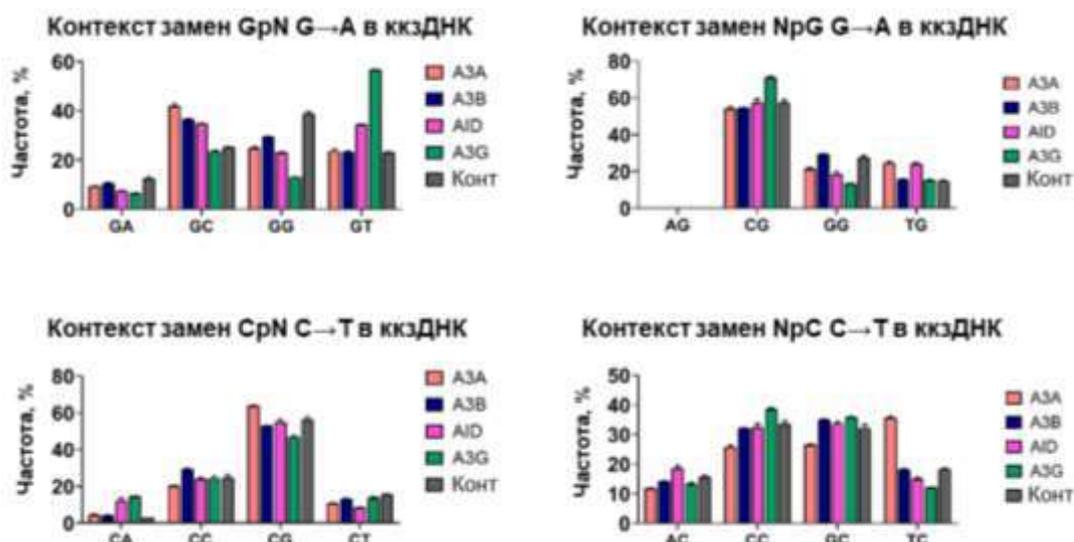


Рисунок 110. Анализ контекста мутаций в динуклеотидах ккзДНК. (А) контекст G/CpN и (Б) контекст NpG/C мутаций G→A и C→T при CRISPR–активации А3А, А3В, АИД и А3Г

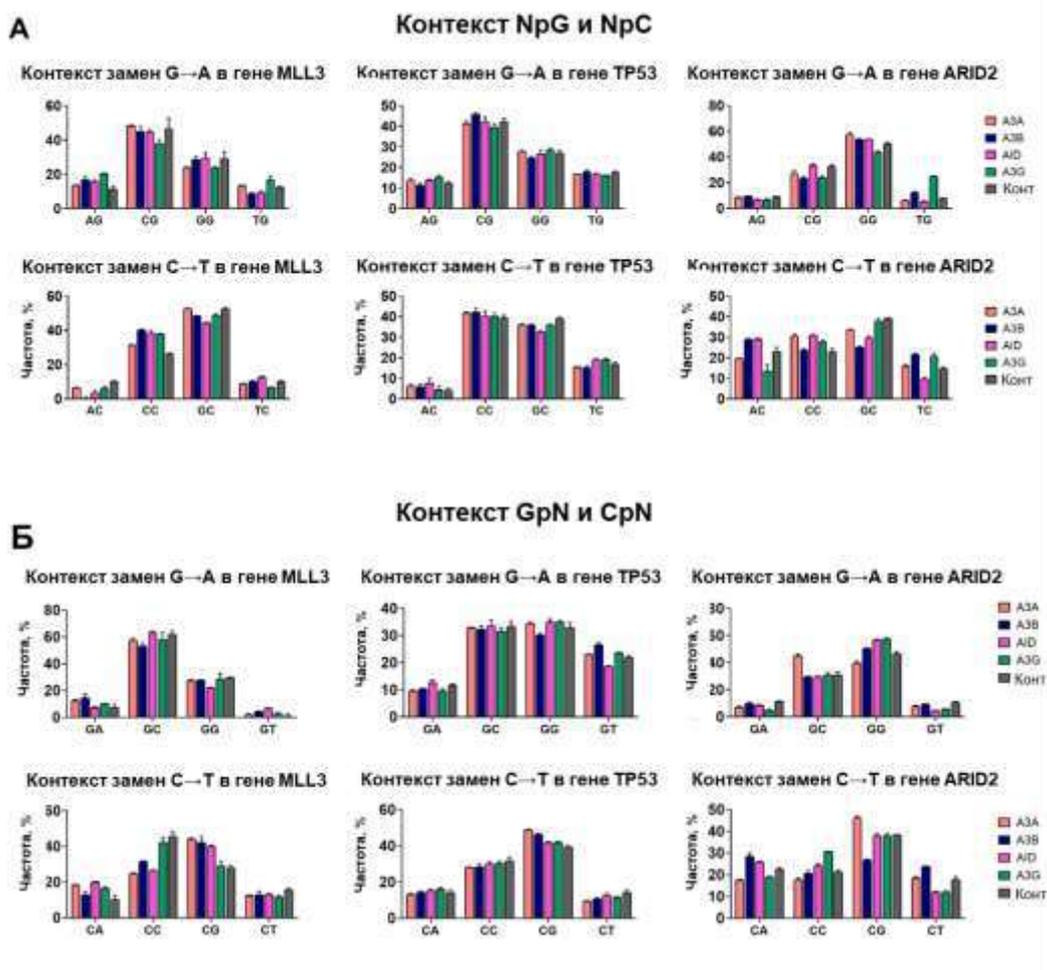


Рисунок 111. Контекст мутаций АРОВЕС/AID в геномных сайтах [503]. (А) Нуклеотидный контекст NpG/NpC при активации генов АРОВЕС/AID и (Б) Нуклеотидный

контекст GpN/CpN при активации цитидин-дезаминаз в регионах генов MLL3, TP53 и ARID2.

### **6.7. Разработка способа контроля экспрессии и противовирусной активности APOBEC/AID за счет использования аттенуированных РНК-проводников CRISPR/Cas**

APOBEC/AID являются одними из очень немногих факторов, которые могут напрямую мутировать и разрушать ккзДНК ВГВ. Тем не менее, длительная сверхэкспрессия APOBEC/AID участвует в развитии и прогрессии многих видов онкологических заболеваний человека. Поскольку даже при кратковременной активации APOBEC/AID с помощью CRISPRa в клетках с физиологической и низкой вирусной нагрузкой наблюдалось образование мутаций в генах, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний, мы предприняли шаги по улучшению подхода и увеличению его безопасности. С этой целью, был создан дополнительный уровень регуляции экспрессии APOBEC/AID с помощью простых модификаций РНК-проводника в системе CRISPRa - за счет создания аттенуированных (ослабленных) РНК-проводников (att-sgRNA).

Используя ранее созданные алгоритмы машинного обучения, был создан подход, который позволяет при введении однонуклеотидных несовпадений между РНК-проводником и ДНК-мишенью титровать активность CRISPRa APOBEC/AID с 90% до 0% с шагом в 10%. Был проведен дизайн и разработаны библиотеки аттенуированных РНК-проводников (att-sgRNA) с определенными несовпадениями нуклеотидов в определенных сайтах 20-нуклеотидной мишень-распознающей последовательности. РНК-проводники были нацелены на гены APOBEC/AID; предсказанная модель была валидирована с использованием избранных РНК-проводников для активации A3A, A3B, A3G, AID (Рисунок 112-115, Рисунок 116А, Б) и протестирована на модели ВГВ по измерению уровней вирусных транскриптов (Рисунок 116В). В целом, титрование уровней мРНК APOBEC/AID соответствовало предсказанной модели со снижением от 10-20% и до 50%, при использовании аттенуированных РНК-проводников. Противовирусная активность A3B, A3G и AID практически не изменялась даже при существенном (>2-20-кратном) снижении уровней активации целевого гена, тогда как анти-ВГВ активность A3A снижалась по сравнению с исходным РНК-проводником дикого типа. CRISPRa APOBEC/AID индуцировала дезаминирование ккзДНК ВГВ с большинством аттенуированных РНК-проводников (измерено с помощью 3D-ПЦР) (Рисунок 116Г). Таким

образом, даже ослабленная активация APOBEC/AID вызывает сопоставимую противовирусную активность и дезаминирование генома ВГВ.

Для оценки эффектов ослабленной активация APOBEC/AID с использованием аттенуированных РНК-проводников на побочные эффекты APOBEC/AID, был проведен анализ AID-индуцированной токсичности (измеренной по повышению уровней мРНК про- и анти-апоптотического фактора TP73, выявленного в ходе эпитранскриптомного профилирования). При активации гена AID с набором аттенуированных РНК-проводников, анализировали уровни мРНК TP73. Выявлено, что уровни мРНК TP73 коррелируют с экспрессией гена AID ( $r = 0,8391$ ) (Рисунок 116Д).

Следовательно, титрование уровней активации цитидиндеаминаз с помощью CRISPRa позволяет белкам APOBEC/AID сохранять противовирусные свойства даже при ослабленных уровнях активации, но при этом существенно снижает токсические эффекты гиперэкспрессированных генов.



Рисунок 112. Прогнозируемая активность аттенуированных РНК-проводников для гена A3A [503].

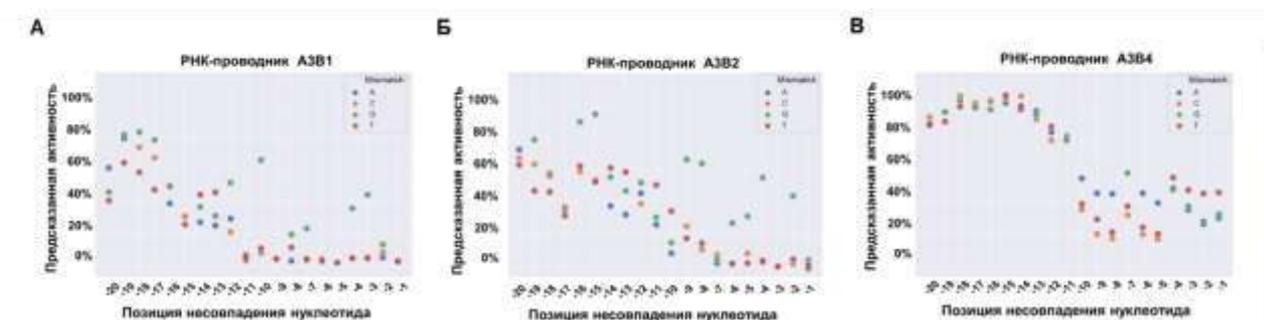


Рисунок 113. Прогнозируемая активность аттенуированных РНК-проводников для гена A3B [503].

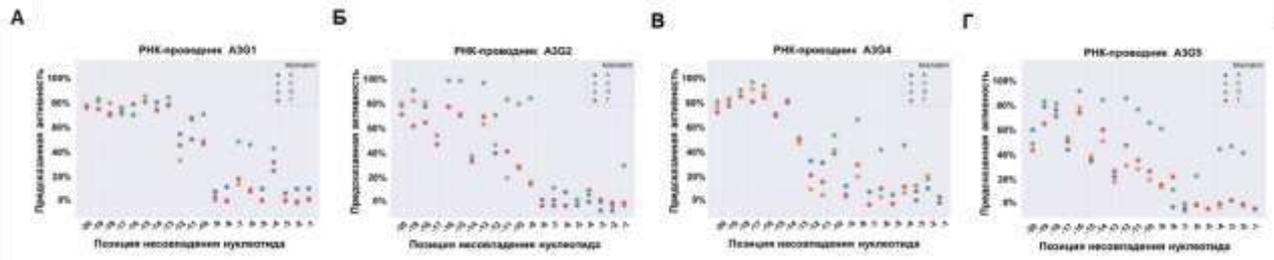


Рисунок 114. Прогнозируемая активность аттенуированных РНК–проводников для гена A3G.

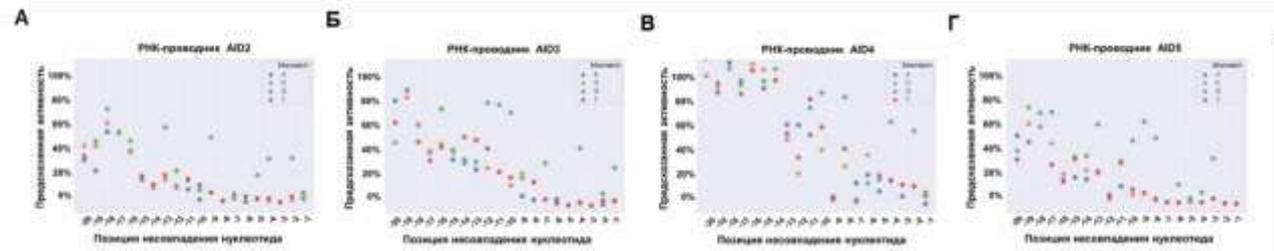


Рисунок 115. Предсказанная активность аттенуированных РНК–проводников для гена AID [503].

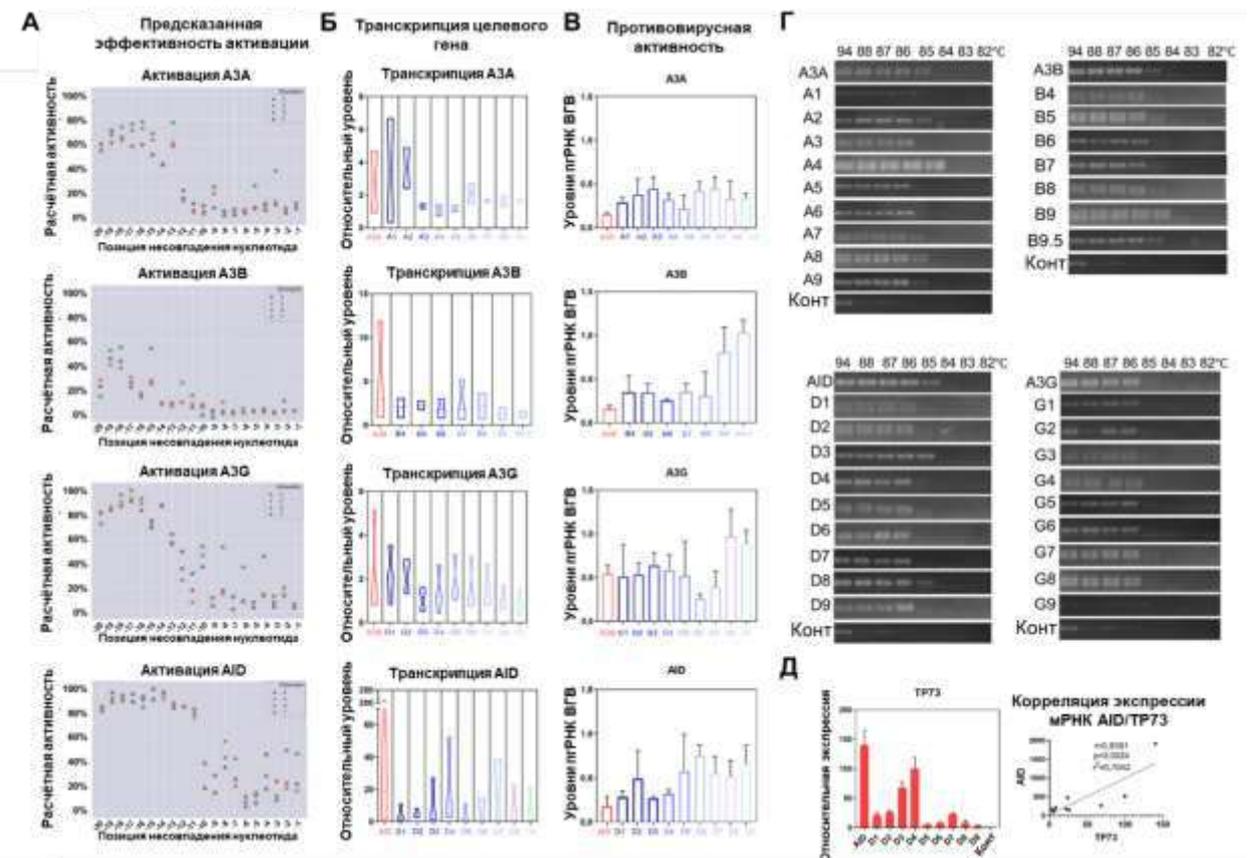


Рисунок 116. Титрование уровней активации АРОВЕС/AID с использованием аттенуированных РНК–проводников и dCas9–p300. (А) Влияние несовпадений отдельных нуклеотидов в определенных положениях (от –20 до –1) РНК–проводника на активацию генов–мишеней, показанное как % от активации РНК–проводник замен. (Б) уровни мРНК генов–мишеней при активации исходными (A3A, A3B, A3G, AID) или

аттенуированными РНК-проводниками. (В) Противовирусная активность CRISPRa с исходными или аттенуированными РНК-проводниками. (Г) 3D-ПЦР-анализ дезаминирования ккзДНК ВГВ в CpG-богатой области при активации генов APOBEC/AID с помощью dCas9-p300 и исходных РНК-проводников (A3A, A3B, AID, A3G) или аттенуированных РНК-проводников. (Д) Изменение экспрессии TP73 при активации CRISPR гена AID и корреляционный анализ уровней мРНК AID и TP73 [503]

### **6.8. Использование рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPRa и аттенуированных РНК-проводников для элиминации токсических и мутагенных свойств APOBEC/AID**

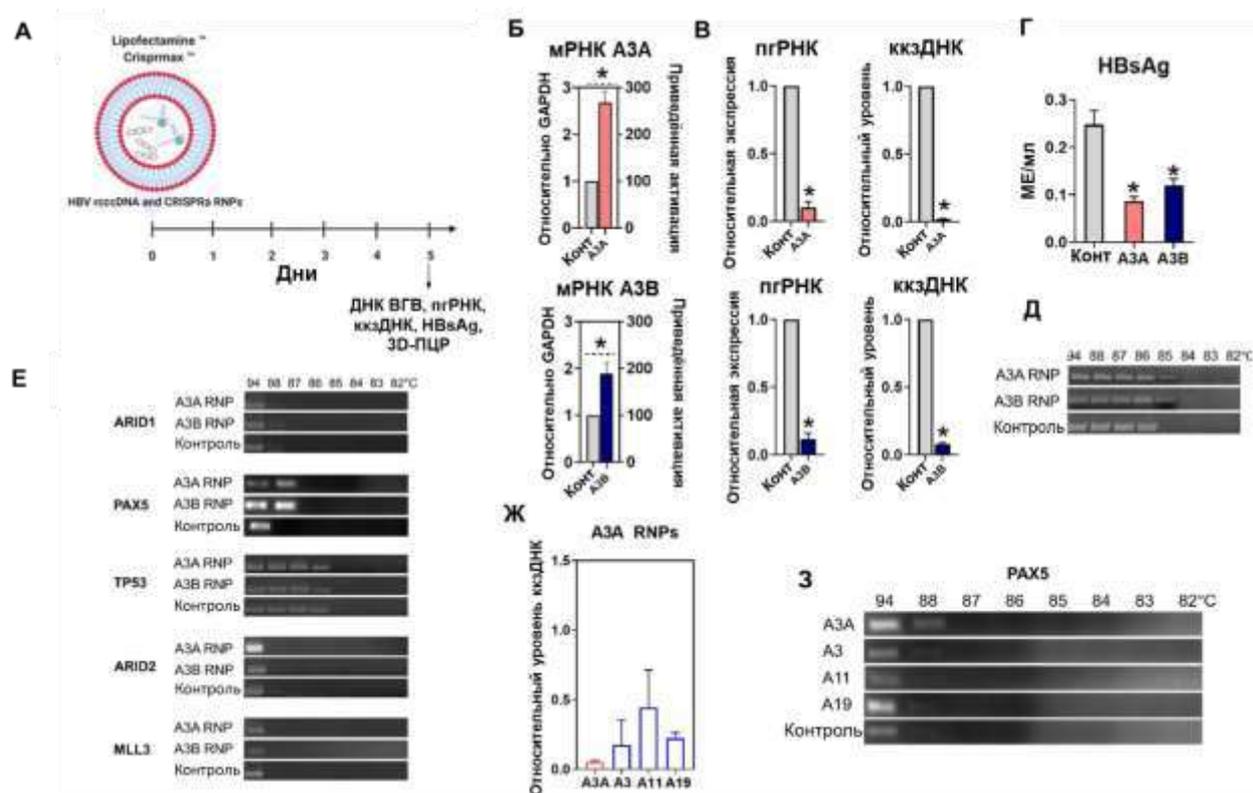
Использование РНП CRISPR/Cas, то есть комплексов очищенных белков Cas и синтезированных *in vitro* РНК-проводников, является эффективным методом внесения изменений в геном. До сих пор только подходы к редактированию генов с использованием РНП позволяли добиться долгосрочных функциональных эффектов. До сих пор остается неясным, можно ли использовать доставку короткоживущих комплексов CRISPRa для создания новых терапевтических подходов.

В связи с этим, далее мы сосредоточились на изучении того, могут ли РНП CRISPRa быть достаточно эффективными для подавления репликации ВГВ. Были получены РНП из высокоспецифичного белка *Staphylococcus aureus* dCas9-p300 (dSaCas9), который считается более безопасным по сравнению с белком *Streptococcus pyogenes* Cas9 из-за более длинного PAM и меньшего количества нецелевых сайтов, с транскрибируемыми *in vitro* РНК-проводниками, нацеленными на гены A3A и A3B. Гены A3A и A3B были избраны для дальнейшей работы, поскольку эти факторы были менее токсичны в сравнении с AID и A3G по результатам CRISPR-активации. Однократная трансфекция РНП dSaCas9 увеличивала транскрипцию A3A и A3B примерно в 200–280 раз (с поправкой на эффективность трансфекции) и приводила к резкому снижению пгРНК ВГВ (~89–90%), ккзДНК (~93–98%) и уровни HBsAg (~52–65%). 3D-ПЦР подтвердила дезаминирование ккзДНК ВГВ с помощью РНП CRISPRa в оставшейся ккзДНК (Рисунок 117А-Д). Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что кратковременная активация A3A и A3B с помощью РНП CRISPRa значительно снижает транскрипцию ВГВ, синтез белка и уровни ккзДНК.

Использование короткоживущих РНП CRISPRa приводило к нецелевому дезаминированию гена PAX5 при активации A3A, аналогично использованию плазмид CRISPRa. В попытке устранить внецелевой мутагенез PAX5, были получены РНП CRISPRa, нацеленные на ген A3A при помощи аттенуированных РНК-проводников (A3, A11, A19, содержащие несовпадения в положениях 3, 11 и 19 соответственно).

Использование att-РНК-проводников сохранило выраженную противовирусную активность А3А, но вместе с этим значительно уменьшило (для А3 и А19) либо полностью устранило (для А11) внецелевое дезаминирование гена PAX5 (Рисунок 117Ж, 3) [503].

Таким образом, аттенуированные РНК-проводники можно использовать для точной настройки активности CRISPRa и устранения/уменьшения потенциальных побочных эффектов активированных генов. В целом, описанный подход представляет собой новую противовирусную стратегию, которая впервые подтвердила возможность использования РНП CRISPRa и технологии аттенуированных РНК-проводников для подавления вирусной репликации и снижения/устранения токсических эффектов внутриклеточных факторов.



**Рисунок 117. Эффекты РНП CRISPRa.** (А) Дизайн эксперимента. (Б) Активация генов-мишеней РНП. Противовирусная CRISPRa РНП, измеренная по (В) уровням пгРНК ВГВ и ккзДНК и (Г) секретируемому HBsAg. (Д) Анализ дезаминирования ккзДНК ВГВ. (Е) Внецелевой мутагенез после действия РНП CRISPRa. (Ж) Противовирусная активность РНП CRISPRa, нацеленных на ген А3А, с исходными (А3А) или аттенуированными РНК-проводниками (А3, А11, А19 соответствуют РНК-проводникам содержащим несовпадения в положениях 3, 11 и 19 соответственно). (З) Устранение нецелевого дезаминирования А3А в гене PAX5 с помощью аттенуированных РНК-проводник.  $\circ p < 0,05$ ;  $\Delta p < 0,01$ ;  $\#p < 0,001$ ;  $* p < 0,0001$  [503]

## 6.9. Эффекты транзientной гиперэкспрессии АРОВЕС/АID на моделях инфекции вируса гепатита В

Вслед за этим, были исследованы эффекты РНП CRISPRa с исходными (А3А) и att-РНК-проводниками на наиболее продвинутых моделях инфекции ВГВ *in vitro*, включая HepG2-hNTCP и дифференцированную клеточную линию HeparG-hNTCP (Рисунок 118). Клетки инфицировали ВГВ и нуклеофицировали РНП CRISPRa через 7 дней после инфекции. РНП CRISPRa вызывали схожие уровни активации А3А (от 6 до 11 раз) между клеточными линиями с очевидным ослаблением активации А3А с использованием att-РНК-проводников. Анализ противовирусной активности через 6 дней после нуклеофекции CRISPRa РНП показал, что HBsAg не снижался при использовании CRISPRa РНП, в то время как HBeAg (суррогатный маркер ккзДНК) значительно снижался только в клетках HeparG-hNTCP. Уровни ккзДНК и пгРНК ВГВ снизились более чем на 60-80% при сопоставимых уровнях снижения между исходным и аттенуированным РНК-проводником (Рисунок 118А-Г). Незначительное снижение уровней вирусных антигенов по сравнению с ккзДНК и пгРНК на моделях установленной инфекции может объясняться относительно длительным периодом полужизни антигенов ВГВ (более 6 дней для HBsAg) и восстановлением репликации ВГВ после краткосрочное воздействие противовирусных препаратов. Таким образом, резкое подавление секреции HBsAg в экспериментах с рккзДНК, вероятно, связано с быстрой инактивацией рккзДНК и предотвращением продукции HBsAg.

Анализ целевых CG-богатых регионов ккзДНК методом 3D-ПЦР продемонстрировал дезаминирование, аналогичное предыдущим экспериментам (Рисунок 118Д). Внецелевое дезаминирование гена PAX5 исследовали в ВГВ-инфицированных и неинфицированных клетках. В клетках с ВГВ-инфекцией дезаминирование PAX5 не детектировалось, в то время как в не инфицированных клетках ген PAX5 был заметно дезаминирован как в клетках HepG2-hNTCP (группы А3А и А19), так и в клетках HeparG-hNTCP (группы А3А, А3 и А19). Следовательно, инфекция ВГВ действительно в определенной степени защищает геном от генотоксического действия А3А (Рисунок 118Е) [503].

В заключение был создан подход по кратковременной и крайне выраженной активации гена А3А со значительным подавлением репликации вируса на моделях установленной ВГВ-инфекции *in vitro*. Кроме того, была продемонстрирована сравнимая анти-ВГВ-активность РНП CRISPRa с аттенуированными РНК-проводниками.



комплексе с dSaCas9-p300. (Д) Дезаминирование ккзДНК ВГВ на 1-й день после нуклеофекции. (Е) Оценка внецелевой мутагенной активности с помощью 3D-ПЦР-анализа гена PAX5 на 1-й день после нуклеофекции. Оценку внецелевого мутагенеза проводили в (+) ВГВ (инфицированных ВГВ) и (-) ВГВ (неинфицированных) клеточных линиях. Моск РНП, белок dSaCas9-p300 с нецелевой РНК-проводник.  $\circ p < 0,05$ ;  $\Delta p < 0,01$ ;  $\#p < 0,001$ ; \*  $p < 0,0001$  [503].

Использование терапевтических подходов на основе CRISPRa имеет преимущества в связи с обратимой модификацией состояния генов интереса, низким риском внецелевой активности и способности одновременно модулировать несколько параметров заболевания. Инструменты CRISPRa уже активно используются в разработке систем регуляции противовирусного иммунитета и коррекции наследственных патологий.

Аналогично, существенный прогресс был достигнут в создании молекулярных инструментов для инактивации ккзДНК ВГВ на основе CRISPR. Многие нуклеазы CRISPR/Cas использовались для эффективного расщепления и инактивации ккзДНК ВГВ. В рамках наших исследований мы впервые продемонстрировали возможность использования CRISPRa для модулирования экспрессии факторов APOBEC/AID и элиминации ВГВ из клеток. По сравнению с нуклеазами CRISPR/Cas, этот подход не расщепляет вирусную ДНК и не вызывает разрывов двухцепочечной ДНК. Более того, внецелевая активность не является проблемой для CRISPRa, так как эпигенетические модификации даже во внецелевых областях являются короткоживущими и обратимыми.

Важно отметить, что в нашей работе было впервые продемонстрировано, что кратковременная CRISPR-активация генов APOBEC/AID с помощью РНП приводит к снижению репликации ВГВ  $>60-98\%$ . Степень дезаминирования ккзДНК ВГВ и снижение уровня HBeAg, индуцированные высокими дозами интерферона- $\alpha$  (активатор А3А) и агониста лимфотоксина- $\beta$ -рецептора (активатор А3В), были более выраженными в предыдущем исследовании. Вероятно, это связано с очень кратковременной активацией APOBEC/AID, достигнутой в наших экспериментальных условиях, или с присутствием/привлечением дополнительных кофакторов, активируемых интерферонами/агонистами лимфотоксин- $\beta$ -рецепторов. Подобные ко-факторы могут участвовать в противовирусном действии агонистов APOBEC/AID и вносить дополнительный вклад в противовирусную активность.

Транскриптомный анализ ВГВ-инфицированных клеток при CRISPRa генов APOBEC/AID показал схожие изменения в экспрессии DDR факторов для групп А3А, А3В

и AID (активация EXO1, MPG и XRCC3). При этом наблюдались уникальные транскриптомные сигнатуры для каждой цитидин-дезаминазы, что свидетельствует о различиях в результатах и механизмах клеточных ответов на дезаминирование.

Транскриптомный профиль группы A3G был наиболее отличным от профилей других деаминаз, при этом EXO1 был единственным геном, который активировался всеми используемыми деаминазами. В совокупности, наблюдаемые транскриптомные изменения клеток указывают на участие определенных сигнальных путей и каскадов в рамках ответа DDR, которые могут быть ответственны за репарацию и деградацию APOBEC/AID-индуцированных повреждений ккзДНК ВГВ.

До сих пор подходы CRISPRa использовались для длительной гиперэкспрессии генов-мишеней. Подобные подход не имеют перспектив для практического использования при системном либо локальном использовании *in vivo* у пациентов с различными заболеваниями. Впервые в наших работах была продемонстрирована значительная противовирусная (анти-ВГВ) активность, причем при использовании наименее длительной активации генов РНП CRISPRa.

В совокупности, приведенные данные указывают на перспективы использования РНП CRISPRa для модулирования противовирусных генов и, возможно, для лечения инфекции ВГВ. Вопросы иммуногенности, дозирования и доставки CRISPRa должны быть решены и подобраны для конкретных заболеваний в дальнейших исследования *in vivo*. В этом отношении различные виды наночастиц являются многообещающими средствами доставки РНП CRISPRa. Однако доставка активаторов белков APOBEC/AID в ВГВ-инфицированные клетки является обязательной для обеспечения допустимого профиля безопасности перспективных лекарственных средств-кандидатов.

APOBEC/AID являются известными факторами, участвующими в канцерогенезе и повреждении ДНК. Вместе с тем, в ряде исследований было показано, что вирусный белок HBcAg может защищать геном ВГВ-инфицированных клеток и перенаправлять действие факторов APOBEC/AID на матрицы вирусных ккзДНК ВГВ.

В наших исследованиях было выявлено, что даже очень кратковременная гиперэкспрессия APOBEC/AID вызывает образование мутаций в генах, ассоциированных с развитием онкологических заболеваний. При этом мутагенное действие APOBEC/AID на геном человека, действительно, может подавляться ВГВ при высоких уровнях репликации вируса. При снижении уровней репликации ВГВ (либо использовании моделей с разным уровнем репликации вируса) протективных свойств вирусных белков оказывается

недостаточно, и АРОВЕС/АID индуцируют внецелевой мутагенез в геноме клеток человека. «Порог» протективной защиты белков ВГВ, терапевтическое окно дозирования цитидин-дезаминаз и стратегию использования CRISPRa при настройке противовирусного иммунитета при ХГВ и других вирусных заболеваниях предстоит определить в дальнейших исследованиях [503].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

- 1) Разработан подход к разрушению ккзДНК ВГВ при однократном использовании короткоживущих рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9;
- 2) Подавление активности пути негомологичного восстановления концов ДНК NHEJ позволяет предотвратить разрушение ккзДНК ВГВ сайт-направленными нуклеазами;
- 3) Определена ключевая роль кчдДНК в поддержании пула ккзДНК при вирусной инфекции за счет конверсии кчдДНК в ккзДНК de novo: кчдДНК формирует ккзДНК за счет внутриклеточной амплификации и приводит к реактивации вирусной инфекции;
- 4) Разработана стратегия полной элиминации ВГВ из инфицированных клеток на основе истощения кчдДНК и предотвращения образования кчдДНК de novo ингибитором обратной транскриптазы вируса ламивудином с разрушением пула ккзДНК короткоживущими комплексами CRISPR/Cas9;
- 5) Установлено подавление противовирусного и нуклеолитического действия сайт-направленных нуклеаз CRISPR/Cas9 организма *Streptococcus thermophilus* при гиперметиловании ккзДНК ВГВ;
- 6) Увеличение дозы рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 позволяет преодолеть эффект гиперметилования ккзДНК ВГВ;
- 7) Установлена роль факторов ATM и ATR в реактивации ВГВ-инфекции при действии ДНК-повреждающих агентов и лекарственных препаратов;
- 8) Цитоплазматическая форма вирусного белка NBx вызывает реактивацию ВГВ из транскрипционно-инактивированного, гиперметилованного состояния;
- 9) Разработан способ контролируемой активации противовирусных генов АРОВЕС/АID, дезаминирования и разрушения ккзДНК ВГВ с помощью систем CRISPR-активации транскрипции с аттенуированными РНК-проводниками.
- 10) Цитидин-дезаминазы АРОВЕС/АID оказывают генотоксическое действие и дезаминируют участки генома клеток человека при снижении уровня внутриклеточной репликации ВГВ;

- 11) Разработан подход по устранению дезаминирования участков генома клеток человека факторами APOBEC/AID с помощью CRISPR-активации и использования аттенуированных РНК-проводников.

## **БЛАГОДАРНОСТИ**

Данная работа – результат неустомимого труда и мыслительной работы многих сотрудников, коллег и товарищей, которые преодолевали не только научные трудности, но также терпели превратности судьбы, но всегда оставались верны нашей научной команде, нашим целям, желанию избавиться от заболевания, которое для очень многих является тяжким бременем, а порой и приговором. Хочу выразить им благодарность не только за самоотверженность, но и за то, что они всегда остаются собой, и всегда приходят на помощь. Особенно отмечу и выражу свое благодарности Сергею Брезгину и Анастасии Костюшевой, которые поверили в успех наших начинаний и участвовали в реализации каждой из приведенных научных работ. Мне посчастливилось встретиться и стать учеником Владимира Петровича Чуланова, который своим научным и жизненным опытом, мудростью и ответственностью, повлиял на меня как на личность, воспитал как исследователя, и показал, какую роль для своих младших коллег может играть научный руководитель. Мне удалось повстречать замечательных единомышленников, готовых помочь в самых трудных ситуациях. В этой связи выражаю глубокую признательность Илье Гордейчуку и Екатерине Бауровой (Институт Полиомиелита), а также Александру Иванову и Наталье Закировой (Институт Молекулярной Биологии), которые внесли большой вклад в выполнение научных исследований. Трудолюбие и неустомимость Натальи Пономаревой (Сеченовский Университет) позволило провести сотни экспериментов и определить особенности реактивации ВГВ, изучить мутагенное действие цитидин-дезаминаз. Вклад Ирины Гоптарь (Сеченовский Университет) был решающим при анализе нуклеолитического и про-мутагенного действия изученных факторов. Андрей Замятнин и Анастасия Фролова (Университет «Сириус») обеспечили постановку ключевых результатов по визуализации ккзДНК ВГВ. Благодарю профессора Dieter Glebe (Университет Гиссена) за помощь с реактивами, линиями клеток и методиками, в особенности на раннем этапе работы. Наконец, я благодарен своим близким, своим родителям, семье, супруге и ее родителям, за то, что всегда поддерживали и верили в меня.

## **СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ**

- [1] A.P. Kostyusheva, S.A. Brezgin, N.I. Ponomareva, I.A. Goptar, A. V Nikiforova, V.I. Gegechkori, V.B. Poluektova, K.A. Turkadze, A.E. Sudina, V.P. Chulanov, D.S. Kostyushev, [Antiviral Activity of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes on a Hepatitis B Virus Model In Vivo]., *Mol. Biol. (Mosk)*. 56 (2022) 884–891. <https://doi.org/10.31857/S002689842206012X>.
- [2] C. Seeger, W.S. Mason, Hepatitis B virus biology., *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 64 (2000) 51–68.
- [3] M. Dandri, Epigenetic modulation in chronic hepatitis B virus infection, in: *Semin. Immunopathol.*, Springer, 2020: pp. 173–185.
- [4] J. Hu, K. Liu, Complete and incomplete hepatitis B virus particles: formation, function, and application, *Viruses*. 9 (2017) 56.
- [5] T. Tu, M.A. Budzinska, N.A. Shackel, S. Urban, HBV DNA Integration: Molecular Mechanisms and Clinical Implications, *Viruses*. 9 (2017) 75. <https://doi.org/10.3390/v9040075>.
- [6] J.H. MacLachlan, B.C. Cowie, Hepatitis B virus epidemiology, *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 5 (2015) a021410.
- [7] J. Hou, Z. Liu, F. Gu, Epidemiology and prevention of hepatitis B virus infection, *Int. J. Med. Sci.* 2 (2005) 50.
- [8] M. Sunbul, Hepatitis B virus genotypes: global distribution and clinical importance., *World J. Gastroenterol.* 20 (2014) 5427–5434.
- [9] L. Cao, C. Wu, H. Shi, Z. Gong, E. Zhang, H. Wang, K. Zhao, S. Liu, S. Li, X. Gao, Coexistence of hepatitis B virus quasispecies enhances viral replication and the ability to induce host antibody and cellular immune responses, *J. Virol.* 88 (2014) 8656–8666.
- [10] Y. Li, Y. Xiao, L. Li, Y. Song, X. Zhai, J. Liu, Z. Duan, L. Yan, F. Ding, J. Liu, L. Zhu, J. Jiang, H. Zou, L. Li, C. Liang, J. Wang, J. Li, The dynamic changes of HBV quasispecies diversity in infancy after immunoprophylaxis failure: a prospective cohort study, *Virol. J.* 18 (2021) 236. <https://doi.org/10.1186/s12985-021-01707-9>.
- [11] T. Pollicino, I. Cacciola, F. Saffioli, G. Raimondo, Hepatitis B virus PreS/S gene variants: pathobiology and clinical implications, *J. Hepatol.* 61 (2014) 408–417.
- [12] J. Sheldon, B. Rodes, F. Zoulim, A. Bartholomeusz, V. Soriano, Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus, *J. Viral Hepat.* 13 (2006) 427–434.

- [13] D. Kostyushev, S. Brezgin, A. Kostyusheva, D. Zarifyan, I. Goptar, V. Chulanov, Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus, *Cell. Mol. LIFE Sci.* 76 (2019) 1779–1794. <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03021-8>.
- [14] L.D. Moore, T. Le, G. Fan, DNA methylation and its basic function, *Neuropsychopharmacology*. 38 (2013) 23–38.
- [15] E. Hervouet, P. Peixoto, R. Delage-Mourroux, M. Boyer-Guittaut, P.-F. Cartron, Specific or not specific recruitment of DNMTs for DNA methylation, an epigenetic dilemma, *Clin. Epigenetics*. 10 (2018) 1–18.
- [16] S. Kaiser, T.P. Jurkowski, S. Kellner, D. Schneider, A. Jeltsch, M. Helm, The RNA methyltransferase Dnmt2 methylates DNA in the structural context of a tRNA, *RNA Biol.* 14 (2017) 1241–1251.
- [17] T.B. Miranda, P.A. Jones, DNA methylation: the nuts and bolts of repression, *J. Cell. Physiol.* 213 (2007) 384–390.
- [18] R.H. Miller, W.S. Robinson, Integrated hepatitis B virus DNA sequences specifying the major viral core polypeptide are methylated in PLC/PRF/5 cells., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 80 (1983) 2534–2538.
- [19] S. Jain, T.-T. Chang, S. Chen, B. Boldbaatar, A. Clemens, S.Y. Lin, R. Yan, C.-T. Hu, H. Guo, T.M. Block, W. Song, Y.-H. Su, Comprehensive DNA methylation analysis of hepatitis B virus genome in infected liver tissues, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10478. <https://doi.org/10.1038/srep10478>.
- [20] Y.-H. Guo, Y.-N. Li, J.-R. Zhao, J. Zhang, Z. Yan, HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state, *Epigenetics*. 6 (2011) 720–726.
- [21] Y. Zhang, C. Li, Y. Zhang, H. Zhu, Y. Kang, H. Liu, J. Wang, Y. Qin, R. Mao, Y. Xie, Y. Huang, J. Zhang, Comparative Analysis of CpG Islands among HBV Genotypes, *PLoS One*. 8 (2013) 1–8. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0056711>.
- [22] Y. Guo, Y. Li, S. Mu, J. Zhang, Z. Yan, Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication., *J. Med. Virol.* 81 (2009) 1177–1183. <https://doi.org/10.1002/jmv.21525>.
- [23] P. Vivekanandan, H.D.-J. Daniel, R. Kannangai, F. Martinez-Murillo, M. Torbenson,

- Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA, *J. Virol.* 84 (2010) 4321–4329.
- [24] J.-W. Kim, S.H. Lee, Y.S. Park, J.-H. Hwang, S.-H. Jeong, N. Kim, D.H. Lee, Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection, *Intervirology.* 54 (2011) 316–325.
- [25] P. Kaur, A. Paliwal, D. Durantel, P. Hainaut, J.-Y. Scoazec, F. Zoulim, I. Chemin, Z. Herceg, DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection., *J. Infect. Dis.* 202 (2010) 700–704. <https://doi.org/10.1086/655398>.
- [26] R.Y.M. Chen, S. Bowden, P.V. Desmond, J. Dean, S.A. Locarnini, Effects of interferon alpha therapy on the catalytic domains of the polymerase gene and basal core promoter, precore and core regions of hepatitis B virus, *J. Gastroenterol. Hepatol.* 18 (2003) 630–637.
- [27] C.-J. Liu, J.-H. Kao, Global perspective on the natural history of chronic hepatitis B: role of hepatitis B virus genotypes A to J, in: *Semin. Liver Dis.*, Thieme Medical Publishers, 2013: pp. 97–102.
- [28] L. Boglione, A. D’Avolio, G. Cariti, M.G. Milia, M. Simiele, A. De Nicolò, V. Ghisetti, G. Di Perri, Sequential therapy with entecavir and PEG-INF in patients affected by chronic hepatitis B and high levels of HBV-DNA with non-D genotypes, *J. Viral Hepat.* 20 (2013) e11–e19.
- [29] C. Wai, R.J. Fontana, J. Polson, M. Hussain, A.O. Shakil, S. Han, T.J. Davern, W.M. Lee, A. Lok, U.S.A.L.F.S. Group, Clinical outcome and virological characteristics of hepatitis B-related acute liver failure in the United States, *J. Viral Hepat.* 12 (2005) 192–198.
- [30] G. Wong, H. Chan, K. Yiu, J. Lai, V. Chan, K. Cheung, E. Wong, V. Wong, Meta-analysis: the association of hepatitis B virus genotypes and hepatocellular carcinoma, *Aliment. Pharmacol. Ther.* 37 (2013) 517–526.
- [31] H. Yan, G. Zhong, G. Xu, W. He, Z. Jing, Z. Gao, Y. Huang, Y. Qi, B. Peng, H. Wang, L. Fu, M. Song, P. Chen, W. Gao, B. Ren, Y. Sun, T. Cai, X. Feng, J. Sui, W. Li, Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus, *Elife.* 1 (2012) e00049. <https://doi.org/10.7554/eLife.00049>.
- [32] M. Iwamoto, W. Saso, R. Sugiyama, K. Ishii, M. Ohki, S. Nagamori, R. Suzuki, H.

- Aizaki, A. Ryo, J.-H. Yun, Epidermal growth factor receptor is a host-entry cofactor triggering hepatitis B virus internalization, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 116 (2019) 8487–8492.
- [33] S. De Falco, M.G. Ruvoletto, A. Verdoliva, M. Ruvo, A. Raucci, M. Marino, S. Senatore, G. Cassani, A. Alberti, P. Pontisso, Cloning and expression of a novel hepatitis B virus-binding protein from HepG2 cells, *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 36613–36623.
- [34] Z. Hao, L. Zheng, L. Kluwe, W. Huang, Ferritin light chain and squamous cell carcinoma antigen 1 are coreceptors for cellular attachment and entry of hepatitis B virus, *Int. J. Nanomedicine.* (2012) 827–834.
- [35] E. Van Damme, J. Vanhove, B. Severyn, L. Verschueren, F. Pauwels, The Hepatitis B Virus Interactome: A Comprehensive Overview, *Front. Microbiol.* 12 (2021).
- [36] T. Umetsu, J. Inoue, T. Kogure, E. Kakazu, M. Ninomiya, T. Iwata, S. Takai, T. Nakamura, A. Sano, T. Shimosegawa, Inhibitory effect of silibinin on hepatitis B virus entry, *Biochem. Biophys. Reports.* 14 (2018) 20–25.
- [37] A. Macovei, C. Petrareanu, C. Lazar, P. Florian, N. Branza-Nichita, Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment, *J. Virol.* 87 (2013) 6415–6427.
- [38] Q. Liu, M. Somiya, S. Kuroda, Elucidation of the early infection machinery of hepatitis B virus by using bio-nanocapsule, *World J. Gastroenterol.* 22 (2016) 8489.
- [39] Q. Osseman, L. Gallucci, S. Au, C. Cazenave, E. Berdance, M.-L. Blondot, A. Cassany, D. Bégu, J. Ragues, C. Aknin, The chaperone dynein LL1 mediates cytoplasmic transport of empty and mature hepatitis B virus capsids, *J. Hepatol.* 68 (2018) 441–448.
- [40] D.H. Nguyen, L. Ludgate, J. Hu, Hepatitis B virus–cell interactions and pathogenesis, *J. Cell. Physiol.* 216 (2008) 289–294.
- [41] M. Kann, B. Sodeik, A. Vlachou, W.H. Gerlich, A. Helenius, Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex, *J. Cell Biol.* 145 (1999) 45–55.
- [42] M.I. Barrasa, J.-T. Guo, J. Saputelli, W.S. Mason, C. Seeger, Does a cdc2 kinase-like recognition motif on the core protein of hepadnaviruses regulate assembly and disintegration of capsids?, *J. Virol.* 75 (2001) 2024–2028.
- [43] L. Wei, A. Ploss, Mechanism of hepatitis B virus cccDNA formation, *Viruses.* 13 (2021) 1463.

- [44] L. Wei, A. Ploss, Hepatitis B virus cccDNA is formed through distinct repair processes of each strand., *Nat. Commun.* 12 (2021) 1591. <https://doi.org/10.1038/s41467-021-21850-9>.
- [45] L. Allweiss, M. Dandri, The Role of cccDNA in HBV Maintenance, *Viruses*. 9 (2017) 156. <https://doi.org/10.3390/v9060156>.
- [46] S. Tsukuda, K. Watashi, Hepatitis B virus biology and life cycle, *Antiviral Res.* 182 (2020) 104925.
- [47] J. Kock, C. Rosler, J.-J. Zhang, H.E. Blum, M. Nassal, C. Thoma, J. Köck, C. Rösler, J.-J. Zhang, H.E. Blum, M. Nassal, C. Thoma, Generation of Covalently Closed Circular DNA of Hepatitis B Viruses via Intracellular Recycling Is Regulated in a Virus Specific Manner, *PLoS Pathog.* 6 (2010) e1001082. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001082>.
- [48] W.R. Addison, K.-A. Walters, W.W.S. Wong, J.S. Wilson, D. Madej, L.D. Jewell, D.L.J. Tyrrell, Half-life of the duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA pool in vivo following inhibition of viral replication, *J. Virol.* 76 (2002) 6356–6363.
- [49] Y.-Y. Zhang, B.-H. Zhang, D. Theele, S. Litwin, E. Toll, J. Summers, Single-cell analysis of covalently closed circular DNA copy numbers in a hepadnavirus-infected liver, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100 (2003) 12372–12377.
- [50] C. Ko, A. Chakraborty, W.-M. Chou, J. Hasreiter, J.M. Wettengel, D. Stadler, R. Bester, T. Asen, K. Zhang, K. Wisskirchen, Hepatitis B virus (HBV) genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels, *J. Hepatol.* (2018).
- [51] B. Werle–Lapostolle, S. Bowden, S. Locarnini, K. Wursthorn, J. Petersen, G. Lau, C. Trepo, P. Marcellin, Z. Goodman, W.E. Delaney IV, Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy<sup>1</sup>, *Gastroenterology*. 126 (2004) 1750–1758.
- [52] E.J. Bourne, J.L. Dienstag, V.A. Lopez, T.J. Sander, J.M. Longlet, J.G. Hall, R.W. Kwiatkowski, T. Wright, C.L. Lai, L.D. Condeary, Quantitative analysis of HBV cccDNA from clinical specimens: correlation with clinical and virological response during antiviral therapy, *J. Viral Hepat.* 14 (2007) 55–63.
- [53] A. Boyd, K. Lacombe, F. Lavocat, S. Maylin, P. Mialhes, C. Lascoux-Combe, C. Delaugerre, P.-M. Girard, F. Zoulim, Decay of ccc-DNA marks persistence of intrahepatic viral DNA synthesis under tenofovir in HIV-HBV co-infected patients, *J. Hepatol.* 65 (2016) 683–691.

- [54] Q.I. Huang, B. Zhou, D. Cai, Y. Zong, Y. Wu, S. Liu, A. Mercier, H. Guo, J. Hou, R. Colonna, Rapid turnover of hepatitis B virus covalently closed circular DNA indicated by monitoring emergence and reversion of signature-mutation in treated chronic hepatitis B patients, *Hepatology*. 73 (2021) 41–52.
- [55] K.A. Lythgoe, S.F. Lumley, L. Pellis, J.A. McKeating, P.C. Matthews, Estimating hepatitis B virus cccDNA persistence in chronic infection, *Virus Evol.* 7 (2021) veaa063.
- [56] C.K. Chong, C.Y.S. Cheng, S.Y.J. Tsoi, F.-Y. Huang, F. Liu, W.-K. Seto, C.-L. Lai, M.-F. Yuen, D.K.-H. Wong, Role of hepatitis B core protein in HBV transcription and recruitment of histone acetyltransferases to cccDNA minichromosome, *Antiviral Res.* 144 (2017) 1–7.
- [57] J. Ding, Z. Yi, W. Zai, M. Wu, B. Chen, Q. Cai, X. Zhang, Z. Yuan, Illuminating the Live-Cell Dynamics of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Using the CRISPR-Tag System, *MBio*. (2023) e03550-22.
- [58] Y. Zhong, C. Wu, Z. Xu, Y. Teng, L. Zhao, K. Zhao, J. Wang, W. Wang, Q. Zhan, C. Zhu, Hepatitis B Virus Core Protein Is Not Required for Covalently Closed Circular DNA Transcriptional Regulation, *J. Virol.* 96 (2022) e01362-22.
- [59] A. Decorsière, H. Mueller, P.C. Van Breugel, F. Abdul, L. Gerossier, R.K. Beran, C.M. Livingston, C. Niu, S.P. Fletcher, O. Hantz, Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor, *Nature*. 531 (2016) 386–389.
- [60] K. Sekiba, M. Otsuka, M. Ohno, M. Yamagami, T. Kishikawa, T. Suzuki, R. Ishibashi, T. Seimiya, E. Tanaka, K. Koike, Inhibition of HBV transcription from cccDNA with nitazoxanide by targeting the HBx–DDB1 interaction, *Cell. Mol. Gastroenterol. Hepatol.* 7 (2019) 297–312.
- [61] L. Belloni, T. Pollicino, F. De Nicola, F. Guerrieri, G. Raffa, M. Fanciulli, Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 106 (2009).
- [62] Y. Li, Y. Fu, X. Hu, L. Sun, D. Tang, N. Li, F. Peng, X. Fan, The HBx–CTTN interaction promotes cell proliferation and migration of hepatocellular carcinoma via CREB1, *Cell Death Dis.* 10 (2019) 405.
- [63] S. Benhenda, D. Cougot, M.-A. Buendia, C. Neuveut, Hepatitis B virus X protein: molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis, *Adv. Cancer Res.* 103

- (2009) 75–109.
- [64] M.J. Bouchard, R.J. Schneider, The enigmatic X gene of hepatitis B virus, *J. Virol.* 78 (2004) 12725–12734.
- [65] G. Waris, K.W. Huh, A. Siddiqui, Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF-kappa B via oxidative stress., *Mol. Cell. Biol.* 21 (2001) 7721–7730. <https://doi.org/10.1128/MCB.21.22.7721-7730.2001>.
- [66] X. Zhang, X. You, Q. Wang, T. Zhang, Y. Du, N. Lv, Z. Zhang, S. Zhang, C. Shan, L. Ye, X. Zhang, Hepatitis B virus X protein drives multiple cross-talk cascade loops involving NF-κB, 5-LOX, OPN and Capn4 to promote cell migration., *PLoS One.* 7 (2012) e31458. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0031458>.
- [67] L.-P. Liu, B.-G. Hu, C. Ye, R.L.K. Ho, G.G. Chen, P.B.S. Lai, HBx mutants differentially affect the activation of hypoxia-inducible factor-1α in hepatocellular carcinoma., *Br. J. Cancer.* 110 (2014) 1066–1073. <https://doi.org/10.1038/bjc.2013.787>.
- [68] N.K. Mohd-Ismail, Z. Lim, J. Gunaratne, Y.-J. Tan, Mapping the Interactions of HBV cccDNA with Host Factors., *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20174276>.
- [69] M. Stahl, M. Retzlaff, M. Nassal, J. Beck, Chaperone activation of the hepadnaviral reverse transcriptase for template RNA binding is established by the Hsp70 and stimulated by the Hsp90 system., *Nucleic Acids Res.* 35 (2007) 6124–6136. <https://doi.org/10.1093/nar/gkm628>.
- [70] H. Wang, S. Kim, W.-S. Ryu, DDX3 DEAD-Box RNA helicase inhibits hepatitis B virus reverse transcription by incorporation into nucleocapsids., *J. Virol.* 83 (2009) 5815–5824. <https://doi.org/10.1128/JVI.00011-09>.
- [71] J. Hu, Y.-Y. Lin, P.-J. Chen, K. Watashi, T. Wakita, Cell and Animal Models for Studying Hepatitis B Virus Infection and Drug Development., *Gastroenterology.* 156 (2019) 338–354. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.06.093>.
- [72] F.A. Lempp, E. Wiedtke, B. Qu, P. Roques, I. Chemin, F.W.R. Vondran, R. Le Grand, D. Grimm, S. Urban, Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is the limiting host factor of hepatitis B virus infection in macaque and pig hepatocytes., *Hepatology.* 66 (2017) 703–716. <https://doi.org/10.1002/hep.29112>.

- [73] B.J. Burwitz, J.M. Wettengel, M.A. Muck-Hausl, M. Ringelhan, C. Ko, M.M. Festag, K.B. Hammond, M. Northrup, B.N. Bimber, T. Jacob, J.S. Reed, R. Norris, B. Park, S. Moller-Tank, K. Esser, J.M. Greene, H.L. Wu, S. Abdulhaqq, G. Webb, W.F. Sutton, A. Klug, T. Swanson, A.W. Legasse, T.Q. Vu, A. Asokan, N.L. Haigwood, U. Protzer, J.B. Sacha, Hepatocytic expression of human sodium-taurocholate cotransporting polypeptide enables hepatitis B virus infection of macaques., *Nat. Commun.* 8 (2017) 2146. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01953-y>.
- [74] X. Hong, Y.I. Kawasaki, S. Menne, J. Hu, Host cell-dependent late entry step as determinant of hepatitis B virus infection., *PLoS Pathog.* 18 (2022) e1010633. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010633>.
- [75] L.G. Guidotti, B. Matzke, H. Schaller, F. V Chisari, High-level hepatitis B virus replication in transgenic mice., *J. Virol.* 69 (1995) 6158–6169. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.10.6158-6169.1995>.
- [76] X. Cui, J.-T. Guo, J. Hu, Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Formation in Immortalized Mouse Hepatocytes Associated with Nucleocapsid Destabilization., *J. Virol.* 89 (2015) 9021–9028. <https://doi.org/10.1128/JVI.01261-15>.
- [77] F.A. Lempp, B. Qu, Y.-X. Wang, S. Urban, Hepatitis B Virus Infection of a Mouse Hepatic Cell Line Reconstituted with Human Sodium Taurocholate Cotransporting Polypeptide., *J. Virol.* 90 (2016) 4827–4831. <https://doi.org/10.1128/JVI.02832-15>.
- [78] K. Zhao, F. Guo, J. Wang, Y. Zhong, J. Yi, Y. Teng, Z. Xu, L. Zhao, A. Li, Z. Wang, X. Chen, X. Cheng, Y. Xia, Limited disassembly of cytoplasmic hepatitis B virus nucleocapsids restricts viral infection in murine hepatic cells., *Hepatology.* 77 (2023) 1366–1381. <https://doi.org/10.1002/hep.32622>.
- [79] L. Wei, T.R. Cafiero, A. Tseng, H.P. Gertje, A. Berneshawi, N.A. Crossland, A. Ploss, Conversion of hepatitis B virus relaxed circular to covalently closed circular DNA is supported in murine cells., *JHEP Reports Innov. Hepatol.* 4 (2022) 100534. <https://doi.org/10.1016/j.jhepr.2022.100534>.
- [80] H. Tang, A. McLachlan, Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 1841–1846. <https://doi.org/10.1073/pnas.98.4.1841>.
- [81] W. Yang, J. Summers, Infection of ducklings with virus particles containing linear double-stranded duck hepatitis B virus DNA: illegitimate replication and reversion., *J.*

- Virology. 72 (1998) 8710–8717. <https://doi.org/10.1128/JVI.72.11.8710-8717.1998>.
- [82] J. Summers, W.S. Mason, Residual integrated viral DNA after hepadnavirus clearance by nucleoside analog therapy., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 638–640. <https://doi.org/10.1073/pnas.0307422100>.
- [83] L.-H. Zhao, X. Liu, H.-X. Yan, W.-Y. Li, X. Zeng, Y. Yang, J. Zhao, S.-P. Liu, X.-H. Zhuang, C. Lin, C.-J. Qin, Y. Zhao, Z.-Y. Pan, G. Huang, H. Liu, J. Zhang, R.-Y. Wang, Y. Yang, W. Wen, G.-S. Lv, H.-L. Zhang, H. Wu, S. Huang, M.-D. Wang, L. Tang, H.-Z. Cao, L. Wang, T.-L. Lee, H. Jiang, Y.-X. Tan, S.-X. Yuan, G.-J. Hou, Q.-F. Tao, Q.-G. Xu, X.-Q. Zhang, M.-C. Wu, X. Xu, J. Wang, H.-M. Yang, W.-P. Zhou, H.-Y. Wang, Genomic and oncogenic preference of HBV integration in hepatocellular carcinoma., *Nat. Commun.* 7 (2016) 12992. <https://doi.org/10.1038/ncomms12992>.
- [84] W.-K. Sung, H. Zheng, S. Li, R. Chen, X. Liu, Y. Li, N.P. Lee, W.H. Lee, P.N. Ariyaratne, C. Tennakoon, F.H. Mulawadi, K.F. Wong, A.M. Liu, R.T. Poon, S.T. Fan, K.L. Chan, Z. Gong, Y. Hu, Z. Lin, G. Wang, Q. Zhang, T.D. Barber, W.-C. Chou, A. Aggarwal, K. Hao, W. Zhou, C. Zhang, J. Hardwick, C. Buser, J. Xu, Z. Kan, H. Dai, M. Mao, C. Reinhard, J. Wang, J.M. Luk, Genome-wide survey of recurrent HBV integration in hepatocellular carcinoma., *Nat. Genet.* 44 (2012) 765–769. <https://doi.org/10.1038/ng.2295>.
- [85] K. Zhao, A. Liu, Y. Xia, Insights into Hepatitis B Virus DNA Integration-55 Years after Virus Discovery., *Innov. (Cambridge)* 1 (2020) 100034. <https://doi.org/10.1016/j.xinn.2020.100034>.
- [86] T. Tu, H. Zhang, S. Urban, Hepatitis B Virus DNA Integration: In Vitro Models for Investigating Viral Pathogenesis and Persistence., *Viruses*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/v13020180>.
- [87] V. Kumar, N. Jayasuryan, R. Kumar, A truncated mutant (residues 58-140) of the hepatitis B virus X protein retains transactivation function., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 5647–5652. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.11.5647>.
- [88] C.-C. Lau, T. Sun, A.K.K. Ching, M. He, J.-W. Li, A.M. Wong, N.N. Co, A.W.H. Chan, P.-S. Li, R.W.M. Lung, J.H.M. Tong, P.B.S. Lai, H.L.Y. Chan, K.-F. To, T.-F. Chan, N. Wong, Viral-human chimeric transcript predisposes risk to liver cancer development and progression., *Cancer Cell*. 25 (2014) 335–349. <https://doi.org/10.1016/j.ccr.2014.01.030>.
- [89] H. Dong, L. Zhang, Z. Qian, X. Zhu, G. Zhu, Y. Chen, X. Xie, Q. Ye, J. Zang, Z. Ren, Q.

- Ji, Identification of HBV-MLL4 Integration and Its Molecular Basis in Chinese Hepatocellular Carcinoma., *PLoS One*. 10 (2015) e0123175.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123175>.
- [90] D. Ding, X. Lou, D. Hua, W. Yu, L. Li, J. Wang, F. Gao, N. Zhao, G. Ren, L. Li, B. Lin, Recurrent targeted genes of hepatitis B virus in the liver cancer genomes identified by a next-generation sequencing-based approach., *PLoS Genet*. 8 (2012) e1003065.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1003065>.
- [91] Y. Shiraishi, A. Fujimoto, M. Furuta, H. Tanaka, K. Chiba, K.A. Boroevich, T. Abe, Y. Kawakami, M. Ueno, K. Gotoh, S. Ariizumi, T. Shibuya, K. Nakano, A. Sasaki, K. Maejima, R. Kitada, S. Hayami, Y. Shigekawa, S. Marubashi, T. Yamada, M. Kubo, O. Ishikawa, H. Aikata, K. Arihiro, H. Ohdan, M. Yamamoto, H. Yamaue, K. Chayama, T. Tsunoda, S. Miyano, H. Nakagawa, Integrated analysis of whole genome and transcriptome sequencing reveals diverse transcriptomic aberrations driven by somatic genomic changes in liver cancers., *PLoS One*. 9 (2014) e114263.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114263>.
- [92] X. Li, J. Zhang, Z. Yang, J. Kang, S. Jiang, T. Zhang, T. Chen, M. Li, Q. Lv, X. Chen, M.A. McCrae, H. Zhuang, F. Lu, The function of targeted host genes determines the oncogenicity of HBV integration in hepatocellular carcinoma., *J. Hepatol*. 60 (2014) 975–984. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2013.12.014>.
- [93] T. Pollicino, G. Caminiti, HBV-Integration Studies in the Clinic: Role in the Natural History of Infection., *Viruses*. 13 (2021). <https://doi.org/10.3390/v13030368>.
- [94] P. Paterlini-Bréchet, K. Saigo, Y. Murakami, M. Chami, D. Gozuacik, C. Mugnier, D. Lagorce, C. Bréchet, Hepatitis B virus-related insertional mutagenesis occurs frequently in human liver cancers and recurrently targets human telomerase gene., *Oncogene*. 22 (2003) 3911–3916. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1206492>.
- [95] K.A. Shera, C.A. Shera, J.K. McDougall, Small tumor virus genomes are integrated near nuclear matrix attachment regions in transformed cells., *J. Virol*. 75 (2001) 12339–12346. <https://doi.org/10.1128/JVI.75.24.12339-12346.2001>.
- [96] H. Yan, Y. Yang, L. Zhang, G. Tang, Y. Wang, G. Xue, W. Zhou, S. Sun, Characterization of the genotype and integration patterns of hepatitis B virus in early- and late-onset hepatocellular carcinoma., *Hepatology*. 61 (2015) 1821–1831.  
<https://doi.org/10.1002/hep.27722>.

- [97] L. Lévy, C.A. Renard, Y. Wei, M.A. Buendia, Genetic alterations and oncogenic pathways in hepatocellular carcinoma., *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 963 (2002) 21–36. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2002.tb04091.x>.
- [98] R. Bonilla Guerrero, L.R. Roberts, The role of hepatitis B virus integrations in the pathogenesis of human hepatocellular carcinoma., *J. Hepatol.* 42 (2005) 760–777. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2005.02.005>.
- [99] S. Liu, H. Zhang, C. Gu, J. Yin, Y. He, J. Xie, G. Cao, Associations between hepatitis B virus mutations and the risk of hepatocellular carcinoma: a meta-analysis., *J. Natl. Cancer Inst.* 101 (2009) 1066–1082. <https://doi.org/10.1093/jnci/djp180>.
- [100] H.-C. Wang, H.-C. Wu, C.-F. Chen, N. Fausto, H.-Y. Lei, I.-J. Su, Different types of ground glass hepatocytes in chronic hepatitis B virus infection contain specific pre-S mutants that may induce endoplasmic reticulum stress., *Am. J. Pathol.* 163 (2003) 2441–2449. [https://doi.org/10.1016/S0002-9440\(10\)63599-7](https://doi.org/10.1016/S0002-9440(10)63599-7).
- [101] K.-Y. Ng, S. Chai, M. Tong, X.-Y. Guan, C.-H. Lin, Y.-P. Ching, D. Xie, A.S.-L. Cheng, S. Ma, C-terminal truncated hepatitis B virus X protein promotes hepatocellular carcinogenesis through induction of cancer and stem cell-like properties., *Oncotarget.* 7 (2016) 24005–24017. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.8209>.
- [102] H. Tu, C. Bonura, C. Giannini, H. Mouly, P. Soussan, M. Kew, P. Paterlini-Bréchet, C. Bréchet, D. Kremsdorf, Biological impact of natural COOH-terminal deletions of hepatitis B virus X protein in hepatocellular carcinoma tissues., *Cancer Res.* 61 (2001) 7803–7810.
- [103] N.-F. Ma, S.H. Lau, L. Hu, D. Xie, J. Wu, J. Yang, Y. Wang, M.-C. Wu, J. Fung, X. Bai, C.-H. Tzang, L. Fu, M. Yang, Y.A. Su, X.-Y. Guan, COOH-terminal truncated HBV X protein plays key role in hepatocarcinogenesis., *Clin. Cancer Res. an Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 14 (2008) 5061–5068. <https://doi.org/10.1158/1078-0432.CCR-07-5082>.
- [104] K.M.F. Sze, G.K.Y. Chu, J.M.F. Lee, I.O.L. Ng, C-terminal truncated hepatitis B virus x protein is associated with metastasis and enhances invasiveness by C-Jun/matrix metalloproteinase protein 10 activation in hepatocellular carcinoma., *Hepatology.* 57 (2013) 131–139. <https://doi.org/10.1002/hep.25979>.
- [105] J.L. Miller, P.A. Grant, The role of DNA methylation and histone modifications in transcriptional regulation in humans., *Subcell. Biochem.* 61 (2013) 289–317. [https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4\\_13](https://doi.org/10.1007/978-94-007-4525-4_13).

- [106] A.J. Bannister, T. Kouzarides, Regulation of chromatin by histone modifications, *Cell Res.* 21 (2011) 381–395. <https://doi.org/10.1038/cr.2011.22>.
- [107] C.T. Bock, P. Schranz, C.H. Schröder, H. Zentgraf, Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell., *Virus Genes.* 8 (1994) 215–229. <https://doi.org/10.1007/BF01703079>.
- [108] T. Kouzarides, Chromatin modifications and their function., *Cell.* 128 (2007) 693–705. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.02.005>.
- [109] B.D. Strahl, C.D. Allis, The language of covalent histone modifications., *Nature.* 403 (2000) 41–45. <https://doi.org/10.1038/47412>.
- [110] P. Tropberger, A. Mercier, M. Robinson, W. Zhong, D.E. Ganem, M. Holdorf, Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E5715–24. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518090112>.
- [111] W. Zhang, J. Chen, M. Wu, X. Zhang, M. Zhang, L. Yue, Y. Li, J. Liu, B. Li, F. Shen, Y. Wang, L. Bai, U. Protzer, M. Levrero, Z. Yuan, PRMT5 restricts hepatitis B virus replication through epigenetic repression of covalently closed circular DNA transcription and interference with pregenomic RNA encapsidation., *Hepatology.* 66 (2017) 398–415. <https://doi.org/10.1002/hep.29133>.
- [112] T. Pollicino, L. Belloni, G. Raffa, N. Pediconi, G. Squadrito, G. Raimondo, M. Levrero, Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones, *Gastroenterology.* 130 (2006) 823–837. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2006.01.001>.
- [113] J. Lucifora, D. Durantel, L. Belloni, L. Barraud, S. Villet, I.E. Vincent, S. Margeridon-Thermet, O. Hantz, A. Kay, M. Levrero, F. Zoulim, Initiation of hepatitis B virus genome replication and production of infectious virus following delivery in HepG2 cells by novel recombinant baculovirus vector., *J. Gen. Virol.* 89 (2008) 1819–1828. <https://doi.org/10.1099/vir.0.83659-0>.
- [114] P. Singh, D. Kairuz, P. Arbuthnot, K. Bloom, Silencing hepatitis B virus covalently closed circular DNA: The potential of an epigenetic therapy approach., *World J. Gastroenterol.* 27 (2021) 3182–3207. <https://doi.org/10.3748/wjg.v27.i23.3182>.
- [115] M. Levrero, T. Pollicino, J. Petersen, L. Belloni, G. Raimondo, M. Dandri, Control of

- cccDNA function in hepatitis B virus infection, *J. Hepatol.* 51 (2009) 581–592.
- [116] M. Shamay, O. Barak, G. Doitsh, I. Ben-Dor, Y. Shaul, Hepatitis B virus pX interacts with HBXAP, a PHD finger protein to coactivate transcription., *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 9982–9988. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111354200>.
- [117] U. Saeed, J. Kim, Z.Z. Piracha, H. Kwon, J. Jung, Y.-J. Chwae, S. Park, H.-J. Shin, K. Kim, Parvulin 14 and Parvulin 17 Bind to HBx and cccDNA and Upregulate Hepatitis B Virus Replication from cccDNA to Virion in an HBx-Dependent Manner., *J. Virol.* 93 (2019). <https://doi.org/10.1128/JVI.01840-18>.
- [118] J. Jiang, H. Tang, Mechanism of inhibiting type I interferon induction by hepatitis B virus X protein, 1 (2010) 1106–1117. <https://doi.org/10.1007/s13238-010-0141-8>.
- [119] C. Curtil, L.S. Enache, P. Radreau, A.-G. Dron, C. Scholtès, A. Deloire, D. Roche, V. Lotteau, P. André, C. Ramière, The metabolic sensors FXR $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ , and SIRT1 cooperatively regulate hepatitis B virus transcription., *FASEB J. Off. Publ. Fed. Am. Soc. Exp. Biol.* 28 (2014) 1454–1463. <https://doi.org/10.1096/fj.13-236372>.
- [120] J.-H. Ren, Y. Tao, Z.-Z. Zhang, W.-X. Chen, X.-F. Cai, K. Chen, B.C.B. Ko, C.-L. Song, L.-K. Ran, W.-Y. Li, A.-L. Huang, J. Chen, Sirtuin 1 regulates hepatitis B virus transcription and replication by targeting transcription factor AP-1., *J. Virol.* 88 (2014) 2442–2451. <https://doi.org/10.1128/JVI.02861-13>.
- [121] J.-J. Deng, K.-Y.E. Kong, W.-W. Gao, H.-M.V. Tang, V. Chaudhary, Y. Cheng, J. Zhou, C.-P. Chan, D.K.-H. Wong, M.-F. Yuen, D.-Y. Jin, Interplay between SIRT1 and hepatitis B virus X protein in the activation of viral transcription., *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech.* 1860 (2017) 491–501. <https://doi.org/10.1016/j.bbagr.2017.02.007>.
- [122] S. Benhenda, A. Ducroux, L. Rivière, B. Sobhian, M.D. Ward, S. Dion, O. Hantz, U. Protzer, M.-L. Michel, M. Benkirane, O.J. Semmes, M.-A. Buendia, C. Neuveut, Methyltransferase PRMT1 is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription., *J. Virol.* 87 (2013) 4360–4371. <https://doi.org/10.1128/JVI.02574-12>.
- [123] X. Fu, X. Song, Y. Li, D. Tan, G. Liu, Hepatitis B virus X protein upregulates DNA methyltransferase 3A/3B and enhances SOCS-1 CpG island methylation., *Mol. Med. Rep.* 13 (2016) 301–308. <https://doi.org/10.3892/mmr.2015.4545>.
- [124] L. Koumbi, P. Karayiannis, The Epigenetic Control of Hepatitis B Virus Modulates the

- Outcome of Infection, *Front. Microbiol.* 6 (2015) 1491.  
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01491>.
- [125] I. Sengupta, D. Das, S.P. Singh, R. Chakravarty, C. Das, Host transcription factor Speckled 110 kDa (Sp110), a nuclear body protein, is hijacked by hepatitis B virus protein X for viral persistence., *J. Biol. Chem.* 292 (2017) 20379–20393.  
<https://doi.org/10.1074/jbc.M117.796839>.
- [126] D. Cougot, E. Allemand, L. Rivière, S. Benhenda, K. Durore, F. Levillayer, C. Muchardt, M.-A. Buendia, C. Neuveut, Inhibition of PP1 phosphatase activity by HBx: a mechanism for the activation of hepatitis B virus transcription., *Sci. Signal.* 5 (2012) ra1.  
<https://doi.org/10.1126/scisignal.2001906>.
- [127] C. Shen, X. Feng, T. Mao, D. Yang, J. Zou, X. Zao, Q. Deng, X. Chen, F. Lu, Yin-Yang 1 and HBx protein activate HBV transcription by mediating the spatial interaction of cccDNA minichromosome with cellular chromosome 19p13.11., *Emerg. Microbes Infect.* 9 (2020) 2455–2464. <https://doi.org/10.1080/22221751.2020.1840311>.
- [128] H. Tang, N. Oishi, S. Kaneko, S. Murakami, Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein., *Cancer Sci.* 97 (2006) 977–983.  
<https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2006.00299.x>.
- [129] Q. He, W. Li, J. Ren, Y. Huang, Y. Huang, Q. Hu, J. Chen, W. Chen, ZEB2 inhibits HBV transcription and replication by targeting its core promoter., *Oncotarget.* 7 (2016) 16003–16011. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.7435>.
- [130] I.K. Mandemaker, M.E. Geijer, I. Kik, K. Bezstarosti, E. Rijkers, A. Raams, R.C. Janssens, H. Lans, J.H. Hoeijmakers, J.A. Demmers, W. Vermeulen, J.A. Marteijn, DNA damage-induced replication stress results in PA200-proteasome-mediated degradation of acetylated histones., *EMBO Rep.* 19 (2018). <https://doi.org/10.15252/embr.201745566>.
- [131] J. Liou, M.L. Kim, W. Do Heo, J.T. Jones, J.W. Myers, J.E.J. Ferrell, T. Meyer, STIM is a Ca<sup>2+</sup> sensor essential for Ca<sup>2+</sup>-store-depletion-triggered Ca<sup>2+</sup> influx., *Curr. Biol.* 15 (2005) 1235–1241. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2005.05.055>.
- [132] S. Jackson, Y. Xiong, CRL4s: the CUL4-RING E3 ubiquitin ligases., *Trends Biochem. Sci.* 34 (2009) 562–570. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.07.002>.
- [133] T. Li, E.I. Robert, P.C. van Breugel, M. Strubin, N. Zheng, A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase

- machinery., *Nat. Struct. Mol. Biol.* 17 (2010) 105–111.  
<https://doi.org/10.1038/nsmb.1719>.
- [134] W. Gao, Z. Jia, Y. Tian, P. Yang, H. Sun, C. Wang, Y. Ding, M. Zhang, Y. Zhang, D. Yang, Z. Tian, J. Zhou, Z. Ruan, Y. Wu, B. Ni, HBx Protein Contributes to Liver Carcinogenesis by H3K4me3 Modification Through Stabilizing WD Repeat Domain 5 Protein., *Hepatology.* 71 (2020) 1678–1695. <https://doi.org/10.1002/hep.30947>.
- [135] B. Shen, Y. Chen, J. Hu, M. Qiao, J. Ren, J. Hu, J. Chen, N. Tang, A. Huang, Y. Hu, Hepatitis B virus X protein modulates upregulation of DHX9 to promote viral DNA replication., *Cell. Microbiol.* 22 (2020) e13148. <https://doi.org/10.1111/cmi.13148>.
- [136] N. Liu, J. Zhang, X. Yang, T. Jiao, X. Zhao, W. Li, J. Zhu, P. Yang, J. Jin, J. Peng, Z. Li, X. Ye, HDM2 Promotes NEDDylation of Hepatitis B Virus HBx To Enhance Its Stability and Function., *J. Virol.* 91 (2017). <https://doi.org/10.1128/JVI.00340-17>.
- [137] D. Glebe, C. Bremer, The Molecular Virology of Hepatitis B Virus, *Semin. Liver Dis.* 33 (2013) 103–112. <https://doi.org/10.1055/s-0033-1345717>.
- [138] G.C. Fanning, F. Zoulim, J. Hou, A. Bertoletti, Therapeutic strategies for hepatitis B virus infection: towards a cure, *Nat. Rev. Drug Discov.* 18 (2019) 827–844.
- [139] T. Tu, B. Zehnder, B. Qu, S. Urban, De novo synthesis of hepatitis B virus nucleocapsids is dispensable for the maintenance and transcriptional regulation of cccDNA, *JHEP Reports.* 3 (2021) 100195.
- [140] A. Schulze, K. Mills, T.S. Weiss, S. Urban, Hepatocyte polarization is essential for the productive entry of the hepatitis B virus., *Hepatology.* 55 (2012) 373–383.  
<https://doi.org/10.1002/hep.24707>.
- [141] B. Qu, Y. Ni, F.A. Lempp, F.W.R. Vondran, S. Urban, T5 exonuclease hydrolysis of hepatitis B virus replicative intermediates allows reliable quantification and fast drug efficacy testing of covalently closed circular DNA by PCR, *J. Virol.* 92 (2018) e01117-18.
- [142] T. Volz, L. Allweiss, M. Ben M'Barek, M. Warlich, A.W. Lohse, J.M. Pollok, A. Alexandrov, S. Urban, J. Petersen, M. Lütgehetmann, M. Dandri, The entry inhibitor Myrcludex-B efficiently blocks intrahepatic virus spreading in humanized mice previously infected with hepatitis B virus, *J. Hepatol.* 58 (2013) 861–867.  
<https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.jhep.2012.12.008>.
- [143] A. Kau, J. Vermehren, C. Sarrazin, Treatment predictors of a sustained virologic response

- in hepatitis B and C., *J. Hepatol.* 49 (2008) 634–651.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2008.07.013>.
- [144] J. Wang, T. Shen, X. Huang, G.R. Kumar, X. Chen, Z. Zeng, R. Zhang, R. Chen, T. Li, T. Zhang, Q. Yuan, P.-C. Li, Q. Huang, R. Colonno, J. Jia, J. Hou, M.A. McCrae, Z. Gao, H. Ren, N. Xia, H. Zhuang, F. Lu, Serum hepatitis B virus RNA is encapsidated pregenome RNA that may be associated with persistence of viral infection and rebound., *J. Hepatol.* 65 (2016) 700–710. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.05.029>.
- [145] A.S. Lok, F. Zoulim, G. Dusheiko, M.G. Ghany, Hepatitis B cure: From discovery to regulatory approval, *Hepatology.* 66 (2017) 1296–1313.  
<https://doi.org/10.1002/hep.29323>.
- [146] M. Moini, S. Fung, HBsAg Loss as a Treatment Endpoint for Chronic HBV Infection: HBV Cure., *Viruses.* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/v14040657>.
- [147] В.П. Чуланов, А.П. Зуева, Д.С. Костюшев, С.А. Брезгин, Е.В. Волчкова, В.В. Малеев, Гепатит С стал излечим. Гепатит В—следующий?, *Терапевтический Архив (Архив До 2018 Г.)*. 89 (2017) 4–13.
- [148] S.A. Brezgin, A.P. Kostyusheva, N.I. Ponomareva, V.I. Gegechkori, N.P. Kirdyashkina, S.R. Ayvasyan, L.N. Dmitrieva, L.N. Kokoreva, V.P. Chulanov, D.S. Kostyushev, HBx Protein Potentiates Hepatitis B Virus Reactivation, *Mol. Biol.* 56 (2022) 713–722.
- [149] EASL, EASL 2017 Clinical Practice Guidelines on the management of hepatitis B virus infection, *J. Hepatol.* 67 (2017) 370–398.
- [150] D. Cheng, B. Han, W. Zhang, W. Wu, Clinical effects of NTCP-inhibitor myrcludex B., *J. Viral Hepat.* 28 (2021) 852–858. <https://doi.org/10.1111/jvh.13490>.
- [151] A. Blank, C. Markert, N. Hohmann, A. Carls, G. Mikus, T. Lehr, A. Alexandrov, M. Haag, M. Schwab, S. Urban, W.E. Haefeli, First-in-human application of the novel hepatitis B and hepatitis D virus entry inhibitor myrcludex B., *J. Hepatol.* 65 (2016) 483–489. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2016.04.013>.
- [152] A. Blank, A. Eidam, M. Haag, N. Hohmann, J. Burhenne, M. Schwab, S. van de Graaf, M.R. Meyer, H.H. Maurer, K. Meier, J. Weiss, T. Bruckner, A. Alexandrov, S. Urban, G. Mikus, W.E. Haefeli, The NTCP-inhibitor Myrcludex B: Effects on Bile Acid Disposition and Tenofovir Pharmacokinetics., *Clin. Pharmacol. Ther.* 103 (2018) 341–348.  
<https://doi.org/10.1002/cpt.744>.

- [153] L. Allweiss, K. Giersch, A. Piroso, T. Volz, R.C. Muench, R.K. Beran, S. Urban, H. Javanbakht, S.P. Fletcher, M. Lütgehetmann, Therapeutic shutdown of HBV transcripts promotes reappearance of the SMC5/6 complex and silencing of the viral genome in vivo, *Gut*. 71 (2022) 372–381.
- [154] H. Zhang, F. Wang, X. Zhu, Y. Chen, H. Chen, X. Li, M. Wu, C. Li, J. Liu, Y. Zhang, Y. Ding, J. Niu, Antiviral Activity and Pharmacokinetics of the Hepatitis B Virus (HBV) Capsid Assembly Modulator GLS4 in Patients With Chronic HBV Infection., *Clin. Infect. Dis. an Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 73 (2021) 175–182.  
<https://doi.org/10.1093/cid/ciaa961>.
- [155] M.-F. Yuen, K. Agarwal, E.J. Gane, C. Schwabe, S.H. Ahn, D.J. Kim, Y.-S. Lim, W. Cheng, W. Sievert, K. Visvanathan, E. Ruby, S. Liaw, R. Yan, Q. Huang, R. Colonno, U. Lopatin, Safety, pharmacokinetics, and antiviral effects of ABI-H0731, a hepatitis B virus core inhibitor: a randomised, placebo-controlled phase 1 trial., *Lancet. Gastroenterol. Hepatol.* 5 (2020) 152–166. [https://doi.org/10.1016/S2468-1253\(19\)30346-2](https://doi.org/10.1016/S2468-1253(19)30346-2).
- [156] N. Mani, A.G. Cole, J.R. Phelps, A. Ardzinski, K.D. Cobarrubias, A. Cuconati, B.D. Dorsey, E. Evangelista, K. Fan, F. Guo, H. Guo, J.-T. Guo, T.O. Harasym, S. Kadhim, S.G. Kultgen, A.C.H. Lee, A.H.L. Li, Q. Long, S.A. Majeski, R. Mao, K.D. McClintock, S.P. Reid, R. Rijnbrand, N.M. Snead, H.M. Micolochick Steuer, K. Stever, S. Tang, X. Wang, Q. Zhao, M.J. Sofia, Preclinical Profile of AB-423, an Inhibitor of Hepatitis B Virus Pregenomic RNA Encapsidation., *Antimicrob. Agents Chemother.* 62 (2018).  
<https://doi.org/10.1128/AAC.00082-18>.
- [157] M.-F. Yuen, I. Schiefke, J.-H. Yoon, S.H. Ahn, J. Heo, J.H. Kim, H. Lik Yuen Chan, K.T. Yoon, H. Klinker, M. Manns, J. Petersen, T. Schlupe, J. Hamilton, B.D. Given, C. Ferrari, C.-L. Lai, S.A. Locarnini, R.G. Gish, RNA Interference Therapy With ARC-520 Results in Prolonged Hepatitis B Surface Antigen Response in Patients With Chronic Hepatitis B Infection., *Hepatology*. 72 (2020) 19–31. <https://doi.org/10.1002/hep.31008>.
- [158] R.W.-H. Hui, L.-Y. Mak, W.-K. Seto, M.-F. Yuen, RNA interference as a novel treatment strategy for chronic hepatitis B infection., *Clin. Mol. Hepatol.* 28 (2022) 408–424.  
<https://doi.org/10.3350/cmh.2022.0012>.
- [159] E.P. Thi, A.P. Dhillon, A. Ardzinski, L. Bidirici-Ertekin, K.D. Cobarrubias, A. Cuconati, A.S. Kondratowicz, K. Kwak, A.H.L. Li, A. Miller, C. Pasetka, L. Pei, J.R. Phelps, N.M. Snead, X. Wang, X. Ye, M.J. Sofia, A.C.H. Lee, ARB-1740, a RNA Interference

- Therapeutic for Chronic Hepatitis B Infection., *ACS Infect. Dis.* 5 (2019) 725–737.  
<https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.8b00191>.
- [160] H. Javanbakht, H. Mueller, J. Walther, X. Zhou, A. Lopez, T. Pattupara, J. Blaising, L. Pedersen, N. Albæk, M. Jackerott, T. Shi, C. Ploix, W. Driessen, R. Persson, J. Ravn, J.A.T. Young, S. Ottosen, Liver-Targeted Anti-HBV Single-Stranded Oligonucleotides with Locked Nucleic Acid Potently Reduce HBV Gene Expression In Vivo., *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 11 (2018) 441–454. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.02.005>.
- [161] E. Degasperi, M.P. Anolli, P. Lampertico, : A 2022 UTowards a Functional Cure for Hepatitis B Virusupdate on New Antiviral Strategies, *Viruses.* 14 (2022).  
<https://doi.org/10.3390/v14112404>.
- [162] P. Marcellin, S.H. Ahn, X. Ma, F.A. Caruntu, W.Y. Tak, M. Elkashab, W.-L. Chuang, S.-G. Lim, F. Tabak, R. Mehta, J. Petersen, G.R. Foster, L. Lou, E.B. Martins, P. Dinh, L. Lin, A. Corsa, P. Charuworn, G.M. Subramanian, H. Reiser, H.W. Reesink, S. Fung, S.I. Strasser, H. Trinh, M. Buti, G.B. Gaeta, A.J. Hui, G. Papatheodoridis, R. Flisiak, H.L.Y. Chan, Combination of Tenofovir Disoproxil Fumarate and Peginterferon  $\alpha$ -2a Increases Loss of Hepatitis B Surface Antigen in Patients With Chronic Hepatitis B., *Gastroenterology.* 150 (2016) 134-144.e10. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2015.09.043>.
- [163] S. Phillips, S. Mistry, A. Riva, H. Cooksley, T. Hadzhiolova-Lebeau, S. Plavova, K. Katzarov, M. Simonova, S. Zeuzem, C. Woffendin, P.-J. Chen, C.-Y. Peng, T.-T. Chang, S. Lueth, R. De Knegt, M.-S. Choi, H. Wedemeyer, M. Dao, C.-W. Kim, H.-C. Chu, M. Wind-Rotolo, R. Williams, E. Cooney, S. Chokshi, Peg-Interferon Lambda Treatment Induces Robust Innate and Adaptive Immunity in Chronic Hepatitis B Patients., *Front. Immunol.* 8 (2017) 621. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.00621>.
- [164] C. Boni, A. Vecchi, M. Rossi, D. Laccabue, T. Giuberti, A. Alfieri, P. Lampertico, G. Grossi, F. Facchetti, M.R. Brunetto, TLR7 Agonist Increases Responses of Hepatitis B Virus-Specific T Cells and Natural Killer Cells in Patients With Chronic Hepatitis B Treated With Nucleos (T) Ide Analogues, *Gastroenterology.* 154 (2018) 1764–1777.
- [165] N. Chuaypen, N. Posuwan, S. Chittmittraprap, N. Hirankarn, S. Treeprasertsuk, Y. Tanaka, N. Shinkai, Y. Poovorawan, P. Tangkijvanich, Predictive role of serum HBsAg and HBcrAg kinetics in patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B receiving pegylated interferon-based therapy., *Clin. Microbiol. Infect. Off. Publ. Eur. Soc. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 24 (2018) 306.e7-306.e13.

<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2017.07.016>.

- [166] D. Mu, F.-C. Yuan, Y. Chen, X.-Y. Jiang, L. Yan, L.-Y. Jiang, J.-P. Gong, D.-Z. Zhang, H. Ren, Y. Liao, Baseline value of intrahepatic HBV DNA over cccDNA predicts patient's response to interferon therapy, *Sci. Rep.* 7 (2017) 5937.  
<https://doi.org/10.1038/s41598-017-05242-y>.
- [167] C. Niu, L. Li, S. Daffis, J. Lucifora, M. Bonnin, S. Maadadi, E. Salas, R. Chu, H. Ramos, C.M. Livingston, R.K. Beran, A. V Garg, S. Balsitis, D. Durantel, F. Zoulim, W.E. 4th Delaney, S.P. Fletcher, Toll-like receptor 7 agonist GS-9620 induces prolonged inhibition of HBV via a type I interferon-dependent mechanism., *J. Hepatol.* 68 (2018) 922–931.  
<https://doi.org/10.1016/j.jhep.2017.12.007>.
- [168] F. Shen, Y. Li, Y. Wang, V. Sozzi, P.A. Revill, J. Liu, L. Gao, G. Yang, M. Lu, K. Sutter, U. Dittmer, J. Chen, Z. Yuan, Hepatitis B virus sensitivity to interferon- $\alpha$  in hepatocytes is more associated with cellular interferon response than with viral genotype., *Hepatology.* 67 (2018) 1237–1252. <https://doi.org/10.1002/hep.29609>.
- [169] P. Mutz, P. Metz, F.A. Lempp, S. Bender, B. Qu, K. Schöneweis, S. Seitz, T. Tu, A. Restuccia, J. Frankish, C. Dächert, B. Schusser, R. Koschny, G. Polychronidis, P. Schemmer, K. Hoffmann, T.F. Baumert, M. Binder, S. Urban, R. Bartenschlager, HBV Bypasses the Innate Immune Response and Does Not Protect HCV From Antiviral Activity of Interferon., *Gastroenterology.* 154 (2018) 1791-1804.e22.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2018.01.044>.
- [170] L. Belloni, L. Allweiss, F. Guerrieri, N. Pediconi, T. Volz, T. Pollicino, J. Petersen, G. Raimondo, M. Dandri, M. Levrero, IFN- $\alpha$  inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome., *J. Clin. Invest.* 122 (2012) 529–537.  
<https://doi.org/10.1172/JCI58847>.
- [171] J. Lucifora, Y. Xia, F. Reisinger, K. Zhang, D. Stadler, X. Cheng, M.F. Sprinzl, H. Koppensteiner, Z. Makowska, T. Volz, Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA, *Science* (80-. ). 343 (2014) 1221–1228.
- [172] D. Stadler, M. Kächele, A.N. Jones, J. Hess, C. Urban, J. Schneider, Y. Xia, A. Oswald, F. Nebioglu, R. Bester, F. Lasitschka, M. Ringelhan, C. Ko, W.-M. Chou, A. Geerlof, M.A. van de Klundert, J.M. Wettengel, P. Schirmacher, M. Heikenwälder, S. Schreiner, R. Bartenschlager, A. Pichlmair, M. Sattler, K. Unger, U. Protzer, Interferon-induced

- degradation of the persistent hepatitis B virus cccDNA form depends on ISG20., *EMBO Rep.* (2021) e49568. <https://doi.org/10.15252/embr.201949568>.
- [173] C. Seeger, J.A. Sohn, Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA., *Mol. Ther.* 24 (2016) 1258–1266. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.94>.
- [174] E. Degasperi, M.P. Anolli, P. Lampertico, Towards a Functional Cure for Hepatitis B Virus: A 2022 Update on New Antiviral Strategies, *Viruses*. 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/v14112404>.
- [175] S. Brezgin, A. Kostyusheva, D. Kostyushev, V. Chulanov, Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 6041.
- [176] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A Programmable Dual-RNA–Guided DNA Endonuclease in Adaptive Bacterial Immunity, *Science* (80-. ). 337 (2012) 816 LP – 821.
- [177] L.S. Qi, M.H. Larson, L.A. Gilbert, J.A. Doudna, J.S. Weissman, A.P. Arkin, W.A. Lim, Repurposing CRISPR as an RNA-guided platform for sequence-specific control of gene expression, *Cell*. 152 (2013) 1173–1183.
- [178] Y.-H. Huang, J. Su, Y. Lei, L. Brunetti, M.C. Gundry, X. Zhang, M. Jeong, W. Li, M.A. Goodell, DNA epigenome editing using CRISPR-Cas SunTag-directed DNMT3A, *GENOME Biol.* 18 (2017). <https://doi.org/10.1186/s13059-017-1306-z>.
- [179] G. Mkannez, V. Gagne-Ouellet, M.J. Nsaibia, M.-C. Boulanger, M. Rosa, D. Argaud, F. Hadji, N. Gaudreault, G. Rheume, L. Bouchard, Y. Bosse, P. Mathieu, DNA methylation of a PLPP3 MIR transposon-based enhancer promotes an osteogenic programme in calcific aortic valve disease, *Cardiovasc. Res.* 114 (2018) 1525–1535. <https://doi.org/10.1093/cvr/cvy111>.
- [180] J. Qu, L. Zhu, Z. Zhou, P. Chen, S. Liu, M.L. Locy, V.J. Thannickal, Y. Zhou, Reversing Mechanoinductive DSP Expression by CRISPR/dCas9-mediated Epigenome Editing, *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 198 (2018) 599–609. <https://doi.org/10.1164/rccm.201711-2242OC>.
- [181] S.R. Choudhury, Y. Cui, K. Lubecka, B. Stefanska, J. Irudayaraj, CRISPR-dCas9 mediated TET1 targeting for selective DNA demethylation at BRCA1 promoter, *Oncotarget*. 7 (2016). <https://doi.org/10.18632/oncotarget.10234>.
- [182] S. Morita, H. Noguchi, T. Horii, K. Nakabayashi, M. Kimura, K. Okamura, A. Sakai, H.

- Nakashitna, K. Hata, K. Nakashima, I. Hatada, Targeted DNA demethylation in vivo using dCas9-peptide repeat and scFv-TET1 catalytic domain fusions, *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 1060–1065. <https://doi.org/10.1038/nbt.3658>.
- [183] X.S. Liu, H. Wu, X. Ji, Y. Stelzer, X. Wu, S. Czauderna, J. Shu, D. Dadon, R.A. Young, R. Jaenisch, Editing DNA Methylation in the Mammalian Genome, *Cell.* 167 (2016) 233–247.e17. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.08.056>.
- [184] R. Schneider, A.J. Bannister, F.A. Myers, A.W. Thorne, C. Crane-Robinson, T. Kouzarides, Histone H3 lysine 4 methylation patterns in higher eukaryotic genes, *Nat. Cell Biol.* 6 (2004) 73–77. <https://doi.org/10.1038/ncb1076>.
- [185] M.P. Creighton, A.W. Cheng, G.G. Welstead, T. Kooistra, B.W. Carey, E.J. Steine, J. Hanna, M.A. Lodato, G.M. Frampton, P.A. Sharp, L.A. Boyer, R.A. Young, R. Jaenisch, Histone H3K27ac separates active from poised enhancers and predicts developmental state, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 107 (2010) 21931–21936. <https://doi.org/10.1073/pnas.1016071107>.
- [186] J.R. Friedman, W.J. Fredericks, D.E. Jensen, D.W. Speicher, X.P. Huang, E.G. Neilson, F.J. Rauscher, KAP-1, a novel corepressor for the highly conserved KRAB repression domain, *GENES Dev.* 10 (1996) 2067–2078. <https://doi.org/10.1101/gad.10.16.2067>.
- [187] H. O’Geen, S.L. Bates, S.S. Carter, K.A. Nisson, J. Halmai, K.D. Fink, S.K. Rhie, P.J. Farnham, D.J. Segal, Ezh2-dCas9 and KRAB-dCas9 enable engineering of epigenetic memory in a context-dependent manner, *Epigenetics Chromatin.* 12 (2019).
- [188] H.O. Geen, C. Ren, C.M. Nicolet, A.A. Perez, J. Halmai, V.M. Le, J.P. Mackay, P.J. Farnham, D.J. Segal, dCas9-based epigenome editing suggests acquisition of histone methylation is not sufficient for target gene repression, *Nucleic Acids Res.* 45 (2017) 9901–9916. <https://doi.org/10.1093/nar/gkx578>.
- [189] A. Amabile, A. Migliara, P. Capasso, M. Biffi, D. Cittaro, L. Naldini, A. Lombardo, Inheritable Silencing of Endogenous Genes by Hit-and-Run Targeted Epigenetic Editing, *Cell.* 167 (2016) 219–232.e14. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.09.006>.
- [190] A. Chavez, J. Scheiman, S. Vora, B.W. Pruitt, M. Tuttle, E.P.R. Iyer, S. Lin, S. Kiani, C.D. Guzman, D.J. Wiegand, Highly efficient Cas9-mediated transcriptional programming, *Nat. Methods.* 12 (2015) 326.
- [191] L. Fang, S.S.C. Hung, J. Yek, L. El Wazan, T. Nguyen, S. Khan, S.Y. Lim, A.W. Hewitt,

- R.C.B. Wong, A Simple Cloning-free Method to Efficiently Induce Gene Expression Using CRISPR/Cas9, *Mol. Ther. ACIDS*. 14 (2019) 184–191.  
<https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.11.008>.
- [192] A. Chavez, M. Tuttle, B.W. Pruitt, B. Ewen-Campen, R. Chari, D. Ter-Ovanesyan, S.J. Haque, R.J. Cecchi, E.J.K. Kowal, J. Buchthal, B.E. Housden, N. Perrimon, J.J. Collins, G. Church, Comparison of Cas9 activators in multiple species, *Nat. Methods*. 13 (2016) 563–567. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3871>.
- [193] H. Zhou, J. Liu, C. Zhou, N. Gao, Z. Rao, H. Li, X. Hu, C. Li, X. Yao, X. Shen, Y. Sun, Y. Wei, F. Liu, W. Ying, J. Zhang, C. Tang, X. Zhang, H. Xu, L. Shi, L. Cheng, P. Huang, H. Yang, In vivo simultaneous transcriptional activation of multiple genes in the brain using CRISPR-dCas9-activator transgenic mice, *Nat. Neurosci*. 21 (2018) 440+.  
<https://doi.org/10.1038/s41593-017-0060-6>.
- [194] M.E. Tanenbaum, L.A. Gilbert, L.S. Qi, J.S. Weissman, R.D. Vale, A Protein-Tagging System for Signal Amplification in Gene Expression and Fluorescence Imaging, *Cell*. 159 (2014) 635–646. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.09.039>.
- [195] J.G. Zalatan, M.E. Lee, R. Almeida, L.A. Gilbert, E.H. Whitehead, M. La Russa, J.C. Tsai, J.S. Weissman, J.E. Dueber, L.S. Qi, Engineering complex synthetic transcriptional programs with CRISPR RNA scaffolds, *Cell*. 160 (2015) 339–350.
- [196] A.W. Cheng, N. Jillette, P. Lee, D. Plaskon, Y. Fujiwara, W. Wang, A. Taghbalout, H. Wang, Casilio: a versatile CRISPR-Cas9-Pumilio hybrid for gene regulation and genomic labeling, *CELL Res*. 26 (2016) 254–257. <https://doi.org/10.1038/cr.2016.3>.
- [197] S. Konermann, M.D. Brigham, A.E. Trevino, J. Joung, O.O. Abudayyeh, C. Barcena, P.D. Hsu, N. Habib, J.S. Gootenberg, H. Nishimasu, Genome-scale transcriptional activation by an engineered CRISPR-Cas9 complex, *Nature*. 517 (2015) 583.
- [198] A. Kunii, Y. Hara, M. Takenaga, N. Hattori, T. Fukazawa, T. Ushijima, T. Yamamoto, T. Sakuma, Three-Component Repurposed Technology for Enhanced Expression: Highly Accumulable Transcriptional Activators via Branched Tag Arrays, *Cris. J*. 1 (2018) 337–347. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0009>.
- [199] X. Xu, J. Gao, W. Dai, D. Wang, J. Wu, J. Wang, Gene activation by a CRISPR-assisted trans enhancer, *Elife*. 8 (2019). <https://doi.org/10.7554/eLife.45973>.
- [200] J.I. McDonald, H. Celik, L.E. Rois, G. Fishberger, T. Fowler, R. Rees, A. Kramer, A.

- Martens, J.R. Edwards, G.A. Challen, Reprogrammable CRISPR/Cas9-based system for inducing site-specific DNA methylation, *Biol. Open.* 5 (2016) 866–874.
- [201] A. Vojta, P. Dobrinic, V. Tadic, L. Bockor, P. Korac, B. Julg, M. Klasic, V. Zoldos, Repurposing the CRISPR-Cas9 system for targeted DNA methylation, *Nucleic Acids Res.* 44 (2016) 5615–5628. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw159>.
- [202] P. Stepper, G. Kungulovski, R.Z. Jurkowska, T. Chandra, F. Krueger, R. Reinhardt, W. Reik, A. Jeltsch, T.P. Jurkowski, Efficient targeted DNA methylation with chimeric dCas9–Dnmt3a–Dnmt3L methyltransferase, *Nucleic Acids Res.* 45 (2016) 1703–1713.
- [203] X. Xu, Y. Tao, X. Gao, L. Zhang, X. Li, W. Zou, K. Ruan, F. Wang, G. Xu, R. Hu, A CRISPR-based approach for targeted DNA demethylation, *Cell Discov.* 2 (2016) 16009.
- [204] N.A. Kearns, H. Pham, B. Tabak, R.M. Genga, N.J. Silverstein, M. Garber, R. Maehr, Functional annotation of native enhancers with a Cas9-histone demethylase fusion, *Nat. Methods.* 12 (2015) 401–403. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3325>.
- [205] I.B. Hilton, C.M. Vockley, I. Pratiksha, G.E. Crawford, T.E. Reddy, C. a Gersbach, N. Carolina, U. States, C. Biology, N. Carolina, N. Carolina, N. Carolina, N. Carolina, CRISPR Acetyltransferase Activates Genes From Promoters and Enhancers, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 510–517. <https://doi.org/10.1038/nbt.3199>. Epigenome.
- [206] P. Perez-Pinera, D.D. Kocak, C.M. Vockley, A.F. Adler, A.M. Kabadi, L.R. Polstein, P.I. Thakore, K.A. Glass, D.G. Ousterout, K.W. Leong, F. Guilak, G.E. Crawford, T.E. Reddy, C.A. Gersbach, RNA-guided gene activation by CRISPR-Cas9-based transcription factors, *Nat. Methods.* 10 (2013) 973+. <https://doi.org/10.1038/NMETH.2600>.
- [207] M.L. Maeder, S.J. Linder, V.M. Cascio, Y. Fu, Q.H. Ho, J.K. Joung, CRISPR RNA–guided activation of endogenous human genes, *Nat. Methods.* 10 (2013) 977–979.
- [208] L.A. Gilbert, M.H. Larson, L. Morsut, Z. Liu, G.A. Brar, S.E. Torres, N. Stern-Ginossar, O. Brandman, E.H. Whitehead, J.A. Doudna, CRISPR-mediated modular RNA-guided regulation of transcription in eukaryotes, *Cell.* 154 (2013) 442–451.
- [209] A.W. Cheng, H. Wang, H. Yang, L. Shi, Y. Katz, T.W. Theunissen, S. Rangarajan, C.S. Shivalila, D.B. Dadon, R. Jaenisch, Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPR-on, an RNA-guided transcriptional activator system., *Cell Res.* 23 (2013) 1163–71. <https://doi.org/10.1038/cr.2013.122>.
- [210] P.I. Thakore, A.M.D. Ippolito, L. Song, A. Safi, N.K. Shivakumar, A.M. Kabadi, T.E.

- Reddy, G.E. Crawford, C.A. Gersbach, Highly specific epigenome editing by CRISPR-Cas9 repressors for silencing of distal regulatory elements, *Nat. Methods.* (2015) 1–9. <https://doi.org/10.1038/nmeth.3630>.
- [211] N.C. Yeo, A. Chavez, A. Lance-Byrne, Y. Chan, D. Menn, D. Milanova, C.-C. Kuo, X. Guo, S. Sharma, A. Tung, R.J. Cecchi, M. Tuttle, S. Pradhan, E.T. Lim, N. Davidsohn, M.R. Ebrahimkhani, J.J. Collins, N.E. Lewis, S. Kiani, G.M. Church, An enhanced CRISPR repressor for targeted mammalian gene regulation, *Nat. Methods.* 15 (2018) 611+. <https://doi.org/10.1038/s41592-018-0048-5>.
- [212] M. Gasperini, A.J. Hill, J.L. McFaline-Figueroa, B. Martin, S. Kim, M.D. Zhang, D. Jackson, A. Leith, J. Schreiber, W.S. Noble, C. Trapnell, N. Ahituv, J. Shendure, A Genome-wide Framework for Mapping Gene Regulation via Cellular Genetic Screens, *Cell.* 176 (2019) 377+. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.11.029>.
- [213] T.S. Klann, J.B. Black, M. Chellappan, A. Safi, L. Song, I.B. Hilton, G.E. Crawford, T.E. Reddy, C.A. Gersbach, CRISPR-Cas9 epigenome editing enables high-throughput screening for functional regulatory elements in the human genome, *Nat. Biotechnol.* 35 (2017) 561+. <https://doi.org/10.1038/nbt.3853>.
- [214] H.P. Bogerd, A.V.R. Kornepati, J.B. Marshall, E.M. Kennedy, B.R. Cullen, Specific induction of endogenous viral restriction factors using CRISPR/Cas-derived transcriptional activators, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E7249–E7256. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516305112>.
- [215] S.M. Saayman, D.C. Lazar, T.A. Scott, J.R. Hart, M. Takahashi, J.C. Burnett, V. Planelles, K. V Morris, M.S. Weinberg, Potent and Targeted Activation of Latent HIV-1 Using the CRISPR/dCas9 Activator Complex, *Mol. Ther.* 24 (2016) 488–498. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.202>.
- [216] P. Limsirichai, T. Gaj, D. V Schaffer, CRISPR-mediated Activation of Latent HIV-1 Expression, *Mol. Ther.* 24 (2016) 499–507. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.213>.
- [217] Y. Zhang, C. Yin, T. Zhang, F. Li, W. Yang, R. Kaminski, P.R. Fagan, R. Putatunda, W.-B. Young, K. Khalili, W. Hu, CRISPR/gRNA-directed synergistic activation mediator (SAM) induces specific, persistent and robust reactivation of the HIV-1 latent reservoirs, *Sci. Rep.* 5 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep16277>.
- [218] H. Ji, Z. Jiang, P. Lu, L. Ma, C. Liz, H. Pan, Z. Fill, X. Qui, P. Wang, J. Deng, X. Yang, J. Wang, H. Zhu, Specific Reactivation of Latent HIV-1 by dCas9-SunTag-VP64-mediated

- Guide RNA Targeting the HIV-1 Promoter, *Mol. Ther.* 24 (2016) 508–521.  
<https://doi.org/10.1038/mt.2016.7>.
- [219] R.C. Orchard, M.E. Sullender, B.F. Dunlap, D.R. Balce, J.G. Doench, H.W. Virgin, Identification of antinorovirus genes in human cells using Genome-Wide CRISPR activation screening, *J. Virol.* 93 (2019) e01324-18.
- [220] C. Moses, F. Nugent, C.B. Waryah, B. Garcia-Bloj, A.R. Harvey, P. Blancafort, Activating PTEN Tumor Suppressor Expression with the CRISPR/dCas9 System, *Mol. Ther. ACIDS.* 14 (2019) 287–300. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.12.003>.
- [221] C.J. Braun, P.M. Bruno, M.A. Horlbeck, L.A. Gilbert, J.S. Weissman, M.T. Hemann, Versatile in vivo regulation of tumor phenotypes by dCas9-mediated transcriptional perturbation, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E3892–E3900.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1600582113>.
- [222] H. Karadooni, E. Gonzalez-Gualda, E. Stylianakis, S. Saffaran, J. Waxman, R.M. Kypta, CRISPR-Mediated Reactivation of DKK3 Expression Attenuates TGF-beta Signaling in Prostate Cancer, *Cancers (Basel).* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/cancers10060165>.
- [223] K.E. Savell, S. Bach V, M.E. Zipperly, J.S. Revanna, N.A. Goska, J.J. Tuscher, C.G. Duke, F.A. Sultan, J.N. Burke, D. Williams, L. Ianov, J.J. Day, A Neuron-Optimized CRISPR/dCas9 Activation System for Robust and Specific Gene Regulation, *ENEURO.* 6 (2019). <https://doi.org/10.1523/ENEURO.0495-18.2019>.
- [224] T.A. Baeumler, A.A. Ahmed, T.A. Fulga, Engineering Synthetic Signaling Pathways with Programmable dCas9-Based Chimeric Receptors, *Cell Rep.* 20 (2017) 2639–2653.  
<https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.08.044>.
- [225] N.H. Kipniss, P.C.D.P. Dingal, T.R. Abbott, Y. Gao, H. Wang, A.A. Dominguez, L. Labanieh, L.S. Qi, Engineering cell sensing and responses using a GPCR-coupled CRISPR-Cas system, *Nat. Commun.* 8 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02075-1>.
- [226] K.R. Sanson, R.E. Hanna, M. Hegde, K.F. Donovan, C. Strand, M.E. Sullender, E.W. Vaimberg, A. Goodale, D.E. Root, F. Piccioni, J.G. Doench, Optimized libraries for CRISPR-Cas9 genetic screens with multiple modalities, *Nat. Commun.* 9 (2018).  
<https://doi.org/10.1038/s41467-018-07901-8>.
- [227] C.-T. Law, L. Wei, F.H.-C. Tsang, C.Y.-K. Chan, I.M.-J. Xu, R.K.-H. Lai, D.W.-H. Ho,

- J.M.-F. Lee, C.C.-L. Wong, I.O.-L. Ng, C.-M. Wong, HELLS Regulates Chromatin Remodeling and Epigenetic Silencing of Multiple Tumor Suppressor Genes in Human Hepatocellular Carcinoma, *HEPATOLOGY*. 69 (2019) 2013–2030.  
<https://doi.org/10.1002/hep.30414>.
- [228] A.C. Bester, J.D. Lee, A. Chavez, Y.-R. Lee, D. Nachmani, S. Vora, J. Victor, M. Sauvageau, E. Monteleone, J.L. Rinn, P. Provero, G.M. Church, J.G. Clohessy, P.P. Pandolfi, An Integrated Genome-wide CRISPRa Approach to Functionalize lncRNAs in Drug Resistance, *Cell*. 173 (2018) 649+. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.03.052>.
- [229] J. Joung, J.M. Engreitz, S. Konermann, O.O. Abudayyeh, V.K. Verdine, F. Aguet, J.S. Gootenberg, N.E. Sanjana, J.B. Wright, C.P. Fulco, Genome-scale activation screen identifies a lncRNA locus regulating a gene neighbourhood, *Nature*. 548 (2017) 343.
- [230] S.J. Liu, M.A. Horlbeck, S.W. Cho, H.S. Birk, M. Malatesta, D. He, F.J. Attenello, J.E. Villalta, M.Y. Cho, Y. Chen, CRISPRi-based genome-scale identification of functional long noncoding RNA loci in human cells, *Science* (80-. ). 355 (2017) eaah7111.
- [231] K.J. Wangensteen, Y.J. Wang, Z. Dou, A.W. Wang, E. Mosleh-Shirazi, M.A. Horlbeck, L.A. Gilbert, J.S. Weissman, S.L. Berger, K.H. Kaestner, Combinatorial genetics in liver repopulation and carcinogenesis with a *in vivo* CRISPR activation platform, *Hepatology*. 68 (2018) 663–676.
- [232] K. Lou, V. Steri, A.Y. Ge, Y.C. Hwang, C.H. Yogodzinski, A.R. Shkedi, A.L.M. Choi, D.C. Mitchell, D.L. Swaney, B. Hann, J.D. Gordan, K.M. Shokat, L.A. Gilbert, KRAS(G12C) inhibition produces a driver-limited state revealing collateral dependencies, *Sci. Signal*. 12 (2019). <https://doi.org/10.1126/scisignal.aaw9450>.
- [233] Y. Zhang, S. Ozono, W. Yao, M. Tobiume, S. Yamaoka, S. Kishigami, H. Fujita, K. Tokunaga, CRISPR-mediated activation of endogenous BST-2/tetherin expression inhibits wild-type HIV-1 production, *Sci. Rep.* 9 (2019). <https://doi.org/10.1038/s41598-019-40003-z>.
- [234] N. Farhang, J.M. Brunger, J.D. Stover, P.I. Thakore, B. Lawrence, F. Guilak, C.A. Gersbach, L.A. Setton, R.D. Bowles, CRISPR-Based Epigenome Editing of Cytokine Receptors for the Promotion of Cell Survival and Tissue Deposition in Inflammatory Environments, *TISSUE Eng. PART A*. 23 (2017) 738–749.  
<https://doi.org/10.1089/ten.tea.2016.0441>.
- [235] N. Farhang, M. Ginley-Hidinger, K.C. Berrett, J. Gertz, B. Lawrence, R.D. Bowles,

- Lentiviral CRISPR Epigenome Editing of Inflammatory Receptors as a Gene Therapy Strategy for Disc Degeneration, *Hum. Gene Ther.* (n.d.).  
<https://doi.org/10.1089/hum.2019.005>.
- [236] J.D. Stover, N. Farhang, B. Lawrence, R.D. Bowles, Multiplex Epigenome Editing of Dorsal Root Ganglion Neuron Receptors Abolishes Redundant Interleukin 6, Tumor Necrosis Factor Alpha, and Interleukin 1 beta Signaling by the Degenerative Intervertebral Disc, *Hum. Gene Ther.* (n.d.). <https://doi.org/10.1089/hum.2019.032>.
- [237] C.-D. Chen, E. Zeldich, Y. Li, A. Yuste, C.R. Abraham, Activation of the Anti-Aging and Cognition-Enhancing Gene Klotho by CRISPR-dCas9 Transcriptional Effector Complex, *J. Mol. Neurosci.* 64 (2018) 175–184. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-1011-0>.
- [238] P.I. Thakore, J.B. Kwon, C.E. Nelson, D.C. Rouse, M.P. Gemberling, M.L. Oliver, C.A. Gersbach, RNA-guided transcriptional silencing in vivo with *S. aureus* CRISPR-Cas9 repressors, *Nat. Commun.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-04048-4>.
- [239] H.-K. Liao, F. Hatanaka, T. Araoka, P. Reddy, M.-Z. Wu, Y. Sui, T. Yamauchi, M. Sakurai, D.D. O’Keefe, E. Nunez-Delicado, P. Guillen, J.M. Campistol, C.-J. Wu, L.-F. Lu, C.R. Esteban, J.C. Izpisua Belmonte, In Vivo Target Gene Activation via CRISPR/Cas9-Mediated Trans-epigenetic Modulation., *Cell.* 171 (2017) 1495-1507.e15. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.10.025>.
- [240] N. Matharu, S. Rattanasopha, S. Tamura, L. Maliskova, Y. Wang, A. Bernard, A. Hardin, W.L. Eckalbar, C. Vaisse, N. Ahituv, CRISPR-mediated activation of a promoter or enhancer rescues obesity caused by haploinsufficiency, *Science* (80-. ). 363 (2019) 246+. <https://doi.org/10.1126/science.aau0629>.
- [241] G. Colasante, G. Lignani, S. Brusco, C. Di Berardino, J. Carpenter, S. Giannelli, N. Valassina, S. Bido, R. Ricci, V. Castoldi, dCas9-based *Scn1a* gene activation restores inhibitory interneuron excitability and attenuates seizures in Dravet syndrome mice, *Mol. Ther.* 28 (2020) 235–253.
- [242] H. Wang, R. Guo, Z. Du, L. Bai, L. Li, J. Cui, W. Li, A.R. Hoffman, J.-F. Hu, Epigenetic Targeting of Granulin in Hepatoma Cells by Synthetic CRISPR dCas9 Epi-suppressors, *Mol. Ther. ACIDS.* 11 (2018) 23–33. <https://doi.org/10.1016/j.omtn.2018.01.002>.
- [243] W. Dai, X. Xu, D. Wang, J. Wu, J. Wang, Cancer therapy with a CRISPR-assisted telomerase-activating gene expression system, *Oncogene.* 38 (2019) 4110–4124. <https://doi.org/10.1038/s41388-019-0707-8>.

- [244] G. Wang, R.D. Chow, Z. Bai, L. Zhu, Y. Errami, X. Dai, M.B. Dong, L. Ye, X. Zhang, P.A. Renauer, Multiplexed activation of endogenous genes by CRISPRa elicits potent antitumor immunity., *Nat. Immunol.* (2019).
- [245] K. Xiong, Y. Zhou, K.A. Blichfeld, P. Hyttel, L. Bolund, K.K. Freude, Y. Luo, RNA-Guided Activation of Pluripotency Genes in Human Fibroblasts, *Cell. Reprogram.* 19 (2017) 189–198. <https://doi.org/10.1089/cell.2017.0006>.
- [246] J. Hu, Y. Lei, W.-K. Wong, S. Liu, K.-C. Lee, X. He, W. You, R. Zhou, J.-T. Guo, X. Chen, X. Peng, H. Sun, H. Huang, H. Zhao, B. Feng, Direct activation of human and mouse Oct4 genes using engineered TALE and Cas9 transcription factors, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 4375–4390. <https://doi.org/10.1093/nar/gku109>.
- [247] J. Weltner, D. Balboa, S. Katayama, M. Bernal, K. Krjutskov, E.-M. Jouhilahti, R. Trokovic, J. Kere, T. Otonkoski, Human pluripotent reprogramming with CRISPR activators, *Nat. Commun.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05067-x>.
- [248] J. Guo, D. Ma, R. Huang, J. Ming, M. Ye, K. Kee, Z. Xie, J. Na, An inducible CRISPR-ON system for controllable gene activation in human pluripotent stem cells, *Protein Cell.* 8 (2017) 379–393. <https://doi.org/10.1007/s13238-016-0360-8>.
- [249] Y. Furuhashi, Y. Nihongaki, M. Sato, K. Yoshimoto, Control of Adipogenic Differentiation in Mesenchymal Stem Cells via Endogenous Gene Activation Using CRISPR-Cas9, *ACS Synth. Biol.* 6 (2017) 2191–2197. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00246>.
- [250] Y. Liu, C. Yu, T.P. Daley, F. Wang, W.S. Cao, S. Bhate, X. Lin, C. Still II, H. Liu, D. Zhao, H. Wang, X.S. Xie, S. Ding, W.H. Wong, M. Wernig, L.S. Qi, CRISPR Activation Screens Systematically Identify Factors that Drive Neuronal Fate and Reprogramming, *Cell Stem Cell.* 23 (2018) 758+. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2018.09.003>.
- [251] D. Balboa, J. Weltner, S. Eurola, R. Trokovic, K. Wartiovaara, T. Otonkoski, Conditionally Stabilized dCas9 Activator for Controlling Gene Expression in Human Cell Reprogramming and Differentiation, *STEM CELL REPORTS.* 5 (2015) 448–459. <https://doi.org/10.1016/j.stemcr.2015.08.001>.
- [252] H. Daub, K. Specht, A. Ullrich, Strategies to overcome resistance to targeted protein kinase inhibitors, *Nat. Rev. DRUG Discov.* 3 (2004) 1001–1010. <https://doi.org/10.1038/nrd1579>.
- [253] H. Wang, H. Yang, C.S. Shivalila, M.M. Dawlaty, A.W. Cheng, F. Zhang, R. Jaenisch,

One-step generation of mice carrying mutations in multiple genes by CRISPR/Cas-mediated genome engineering, *Cell*. 153 (2013) 910–918.

- [254] C.S. Nabel, H. Jia, Y. Ye, L. Shen, H.L. Goldschmidt, J.T. Stivers, Y. Zhang, R.M. Kohli, AID/APOBEC deaminases disfavor modified cytosines implicated in DNA demethylation, *Nat. Chem. Biol.* 8 (2012) 751–758.  
<https://doi.org/10.1038/NCHEMBIO.1042>.
- [255] N. Navaratnam, R. Sarwar, An overview of cytidine deaminases, *Int. J. Hematol.* 83 (2006) 195–200.
- [256] A.C. Komor, Y.B. Kim, M.S. Packer, J.A. Zuris, D.R. Liu, Programmable editing of a target base in genomic DNA without double-stranded DNA cleavage, *Nature*. 533 (2016) 420–424. <https://doi.org/10.1038/nature17946>.
- [257] X. Wang, J. Li, Y. Wang, B. Yang, J. Wei, J. Wu, R. Wang, X. Huang, J. Chen, L. Yang, Efficient base editing in methylated regions with a human APOBEC3A-Cas9 fusion, *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 946.
- [258] Y. Ma, J. Zhang, W. Yin, Z. Zhang, Y. Song, X. Chang, Targeted AID-mediated mutagenesis ( TAM ) enables efficient genomic diversification in mammalian cells, *Nat. Methods*. 13 (2016) 1029.
- [259] K. Nishida, T. Arazoe, N. Yachie, S. Banno, M. Kakimoto, M. Tabata, M. Mochizuki, A. Miyabe, M. Araki, K.Y. Hara, Z. Shimatani, A. Kondo, Targeted nucleotide editing using hybrid prokaryotic and vertebrate adaptive immune systems, *Science* (80-. ). 353 (2016) aaf8729.
- [260] G.T. Hess, L. Frésard, K. Han, C.H. Lee, A. Li, K.A. Cimprich, S.B. Montgomery, M.C. Bassik, Directed evolution using dCas9-targeted somatic hypermutation in mammalian cells, *Nat. Methods*. 13 (2016) 1036.
- [261] A.C. Komor, K.T. Zhao, M.S. Packer, N.M. Gaudelli, A.L. Waterbury, L.W. Koblan, Y.B. Kim, A.H. Badran, D.R. Liu, Improved base excision repair inhibition and bacteriophage Mu Gam protein yields C : G-to-T : A base editors with higher efficiency and product purity, *Sci. Adv.* 3 (2017) eaao4774.
- [262] N.M. Gaudelli, A.C. Komor, H.A. Rees, M.S. Packer, A.H. Badran, D.I. Bryson, D.R. Liu, Programmable base editing of A•T to G•C in genomic DNA without DNA cleavage, *Nature*. 551 (2017) 464–471.

- [263] Y.B. Kim, A.C. Komor, J.M. Levy, M.S. Packer, K.T. Zhao, D.R. Liu, Increasing the genome-targeting scope and precision of base editing with engineered Cas9-cytidine deaminase fusions, *Nat. Biotechnol.* 35 (2017) 371+. <https://doi.org/10.1038/nbt.3803>.
- [264] H. Nishimasu, X. Shi, S. Ishiguro, L. Gao, S. Hirano, S. Okazaki, T. Noda, O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, H. Mori, S. Oura, B. Holmes, M. Tanaka, M. Seki, H. Hirano, H. Aburatani, R. Ishitani, M. Ikawa, N. Yachie, F. Zhang, O. Nureki, Engineered CRISPR-Cas9 nuclease with expanded targeting space, *Science* (80-. ). 361 (2018) 1259–1262. <https://doi.org/10.1126/science.aas9129>.
- [265] C. Zhou, Y. Sun, R. Yan, Y. Liu, E. Zuo, C. Gu, L. Han, Y. Wei, X. Hu, R. Zeng, Off-target RNA mutation induced by DNA base editing and its elimination by mutagenesis, *Nature*. (2019) 1.
- [266] J. Grunewald, R. Zhou, S.P. Garcia, S. Iyer, C.A. Lareau, M.J. Aryee, J.K. Joung, Transcriptome-wide off-target RNA editing induced by CRISPR-guided DNA base editors, *Nature*. 569 (2019) 433+. <https://doi.org/10.1038/s41586-019-1161-z>.
- [267] J. Grünewald, R. Zhou, S. Iyer, C.A. Lareau, S.P. Garcia, M.J. Aryee, J.K. Joung, CRISPR DNA base editors with reduced RNA off-target and self-editing activities, *Nat. Biotechnol.* (2019) 1–8.
- [268] H.A. Rees, C. Wilson, J.L. Doman, D.R. Liu, Analysis and minimization of cellular RNA editing by DNA adenine base editors, *Sci. Adv.* 5 (2019) eaax5717.
- [269] B.W. Thuronyi, L.W. Koblan, J.M. Levy, W.-H. Yeh, C. Zheng, G.A. Newby, C. Wilson, M. Bhaumik, O. Shubina-Oleinik, J.R. Holt, Continuous evolution of base editors with expanded target compatibility and improved activity, *Nat. Biotechnol.* (2019) 1.
- [270] D.B.T. Cox, J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, B. Franklin, M.J. Kellner, J. Joung, F. Zhang, RNA editing with CRISPR-Cas13, 358 (2017) 1019–1027. <https://doi.org/10.1126/science.aaq0180>.
- [271] O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, B. Franklin, J. Koob, M.J. Kellner, A. Ladha, J. Joung, P. Kirchgatterer, D.B.T. Cox, F. Zhang, A cytosine deaminase for programmable single-base RNA editing, *Science* (80-. ). (2019) eaax7063.
- [272] H.A. Rees, D.R. Liu, Base editing: precision chemistry on the genome and transcriptome of living cells, *Nat. Rev. Genet.* 19 (2018) 770–788.
- [273] C. Lee, D.H. Jo, G.-H. Hwang, J. Yu, J.H. Kim, S. Park, J.-S. Kim, J.H. Kim, S. Bae,

- CRISPR-pass: Gene rescue of nonsense mutations using adenine base editors, *Mol. Ther.* (2019).
- [274] C. Kuscü, M. Parlak, T. Tufan, J. Yang, K. Szlachta, X. Wei, R. Mammadov, M. Adli, CRISPR-STOP: gene silencing through base-editing-induced nonsense mutations, *Nat. Methods.* 14 (2017) 710+. <https://doi.org/10.1038/nmeth.4327>.
- [275] P. Billon, E.E. Bryant, S.A. Joseph, T.S. Nambiar, S.B. Hayward, R. Rothstein, A. Ciccía, CRISPR-Mediated Base Editing Enables Efficient Disruption of Eukaryotic Genes through Induction of STOP Codons, *Mol. Cell.* 67 (2017) 1068+. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2017.08.008>.
- [276] W. Jiang, S. Feng, S. Huang, W. Yu, G. Li, G. Yang, Y. Liu, Y. Zhang, L. Zhang, Y. Hou, J. Chen, J. Chen, X. Huang, BE-PLUS: a new base editing tool with broadened editing window and enhanced fidelity, *CELL Res.* 28 (2018) 855–861. <https://doi.org/10.1038/s41422-018-0052-4>.
- [277] M.P. Zafra, E.M. Schatoff, A. Katti, M. Foronda, M. Breinig, A.Y. Schweitzer, A. Simon, T. Han, S. Goswami, E. Montgomery, J. Thibado, E.R. Kasthuber, F.J. Sanchez-Rivera, J. Shi, C.R. Vakoc, S.W. Lowe, D.F. Tschaharganeh, L.E. Dow, Optimized base editors enable efficient editing in cells, organoids and mice, *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 888+. <https://doi.org/10.1038/nbt.4194>.
- [278] K. Kim, S.-M. Ryu, S.-T. Kim, G. Baek, D. Kim, K. Lim, E. Chung, S. Kim, J.-S. Kim, Highly efficient RNA-guided base editing in mouse embryos, *Nat. Biotechnol.* 35 (2017) 435+. <https://doi.org/10.1038/nbt.3816>.
- [279] P. Liang, H. Sun, X. Zhang, X. Xie, J. Zhang, Y. Bai, X. Ouyang, S. Zhi, Y. Xiong, W. Ma, Effective and precise adenine base editing in mouse zygotes, *Protein Cell.* 9 (2018) 808–813.
- [280] S.-M. Ryu, T. Koo, K. Kim, K. Lim, G. Baek, S.-T. Kim, H.S. Kim, D. Kim, H. Lee, E. Chung, J.-S. Kim, Adenine base editing in mouse embryos and an adult mouse model of Duchenne muscular dystrophy, *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 536–539. <https://doi.org/10.1038/nbt.4148>.
- [281] D.-S. Park, M. Yoon, J. Kweon, A.-H. Jang, Y. Kim, S.-C. Choi, Targeted Base Editing via RNA-Guided Cytidine Deaminases in *Xenopus laevis* Embryos, *Mol. Cells.* 40 (2017) 823–827. <https://doi.org/10.14348/molcells.2017.0262>.

- [282] Z. Liu, M. Chen, S. Chen, J. Deng, Y. Song, L. Lai, Z. Li, Highly efficient RNA-guided base editing in rabbit, *Nat. Commun.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05232-2>.
- [283] H. Sasaguri, K. Nagata, M. Sekiguchi, R. Fujioka, Y. Matsuba, S. Hashimoto, K. Sato, D. Kurup, T. Yokota, T.C. Saido, Introduction of pathogenic mutations into the mouse *Psen1* gene by Base Editor and Target-AID, *Nat. Commun.* 9 (2018). <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05262-w>.
- [284] M. Gapinske, A. Luu, J. Winter, W.S. Woods, K.A. Kostan, N. Shiva, J.S. Song, P. Perez-Pinera, CRISPR-SKIP: programmable gene splicing with single base editors, *GENOME Biol.* 19 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1482-5>.
- [285] J.M. Gehrke, O. Cervantes, M.K. Clement, Y. Wu, J. Zeng, D.E. Bauer, L. Pinello, J.K. Joung, An APOBEC3A-Cas9 base editor with minimized bystander and off-target activities, *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 977+. <https://doi.org/10.1038/nbt.4199>.
- [286] P. Liang, C. Ding, H. Sun, X. Xie, Y. Xu, X. Zhang, Y. Sun, Y. Xiong, W. Ma, Y. Liu, Y. Wang, J. Fang, D. Liu, Z. Songyang, C. Zhou, J. Huang, Correction of beta-thalassemia mutant by base editor in human embryos, *Protein Cell.* 8 (2017) 811–822. <https://doi.org/10.1007/s13238-017-0475-6>.
- [287] Y. Zeng, J. Li, G. Li, S. Huang, W. Yu, Y. Zhang, D. Chen, J. Chen, J. Liu, X. Huang, Correction of the Marfan Syndrome Pathogenic *FBN1* Mutation by Base Editing in Human Cells and Heterozygous Embryos, *Mol. Ther.* 26 (2018) 2631–2637. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2018.08.007>.
- [288] A.C. Rossidis, J.D. Stratigis, A.C. Chadwick, H.A. Hartman, N.J. Ahn, H. Li, K. Singh, B.E. Coons, L. Li, W. Lv, P.W. Zoltick, D. Alapati, W. Zacharias, R. Jain, E.E. Morrissey, K. Musunuru, W.H. Peranteau, In utero CRISPR-mediated therapeutic editing of metabolic genes, *Nat. Med.* 24 (2018) 1513+. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0184-6>.
- [289] A.C. Chadwick, X. Wang, K. Musunuru, In Vivo Base Editing of PCSK9 (Proprotein Convertase Subtilisin/Kexin Type 9) as a Therapeutic Alternative to Genome Editing, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 37 (2017) 1741+. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.117.309881>.
- [290] Y.-C. Yang, Y.-H. Chen, J.-H. Kao, C. Ching, I.-J. Liu, C.-C. Wang, C.-H. Tsai, F.-Y. Wu, C.-J. Liu, P.-J. Chen, Permanent inactivation of HBV genomes by CRISPR/Cas9-mediated non-cleavage base editing, *Mol. Ther. Acids.* (2020).

- [291] C.C. Campa, N.R. Weisbach, A.J. Santinha, D. Incarnato, R.J. Platt, Multiplexed genome engineering by Cas12a and CRISPR arrays encoded on single transcripts, *Nat. Methods*. 16 (2019) 887+. <https://doi.org/10.1038/s41592-019-0508-6>.
- [292] Y. Zhang, L. Qian, W. Wei, Y. Wang, B. Wang, P. Lin, W. Liu, L. Xu, X. Li, D. Liu, S. Cheng, J. Li, Y. Ye, H. Li, X. Zhang, Y. Dong, X. Zhao, C. Liu, H.M. Zhang, Q. Ouyang, C. Lou, Paired Design of dCas9 as a Systematic Platform for the Detection of Featured Nucleic Acid Sequences in Pathogenic Strains, *ACS Synth. Biol.* 6 (2017) 211–216. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.6b00215>.
- [293] X.-Y. Qiu, L.-Y. Zhu, C.-S. Zhu, J.-X. Ma, T. Hou, X.-M. Wu, S.-S. Xie, L. Min, D.-A. Tan, D.-Y. Zhang, L. Zhu, Highly Effective and Low-Cost MicroRNA Detection with CRISPR-Cas9, *ACS Synth. Biol.* 7 (2018) 807–813. <https://doi.org/10.1021/acssynbio.7b00446>.
- [294] B. Koo, D. Kim, J. Kweon, C.E. Jin, S.-H. Kim, Y. Kim, Y. Shin, CRISPR/dCas9-mediated biosensor for detection of tick-borne diseases, *SENSORS AND ACTUATORS B-CHEMICAL*. 273 (2018) 316–321. <https://doi.org/10.1016/j.snb.2018.06.069>.
- [295] S.E. Klompe, P.L.H. Vo, T.S. Halpin-Healy, S.H. Sternberg, Transposon-encoded CRISPR–Cas systems direct RNA-guided DNA integration, *Nature*. 571 (2019) 219–225.
- [296] J. Strecker, A. Ladha, Z. Gardner, J.L. Schmid-Burgk, K.S. Makarova, E. V Koonin, F. Zhang, RNA-guided DNA insertion with CRISPR-associated transposases, *Science* (80-. ). 365 (2019) 48–53.
- [297] X.M. Liu, J. Zhou, Y.H. Mao, Q.Q. Ji, S.B. Qian, Programmable RNA N<sup>6</sup>-methyladenosine editing by CRISPR-Cas9 conjugates, *Nat. Chem. Biol.* 15 (2019) 865-+. <https://doi.org/10.1038/s41589-019-0327-1>.
- [298] Y. Xu, Y. Wang, F.-S. Liang, Site-Specific m<sup>6</sup>A Erasing via Conditionally Stabilized CRISPR-Cas13b Editor, *Angew. Chemie*. (n.d.) e202309291.
- [299] H. Ma, L. Tu, A. Naseri, M. Huisman, S. Zhang, D. Grunwald, T. Pederson, Multiplexed labeling of genomic loci with dCas9 and engineered sgRNAs using CRISPRainbow, *Nat. Biotechnol.* (2016) 1–4. <https://doi.org/10.1038/nbt.3526>.
- [300] J. Duan, G. Lu, Y. Hong, Q. Hu, X. Mai, J. Guo, X. Si, F. Wang, Y. Zhang, Live imaging and tracking of genome regions in CRISPR/dCas9 knock-in mice, *GENOME Biol.* 19 (2018). <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1530-1>.

- [301] D.A. Nelles, M.Y. Fang, M.R. O'Connell, J.L. Xu, S.J. Markmiller, J.A. Doudna, G.W. Yeo, Programmable RNA Tracking in Live Cells with CRISPR/Cas9, *Cell*. 165 (2016) 488–496. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.02.054>.
- [302] W. Tang, D.R. Liu, Rewritable multi-event analog recording in bacterial and mammalian cells, *Science* (80-. ). 360 (2018). <https://doi.org/10.1126/science.aap8992>.
- [303] F. Farzadfard, N. Gharaei, Y. Higashikuni, G. Jung, J. Cao, T.K. Lu, Single-Nucleotide-Resolution Computing and Memory in Living Cells, *Mol. Cell*. 75 (2019) 769+. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2019.07.011>.
- [304] M. Kosicki, K.K. Tomberg, A. Bradley, Repair of double-strand breaks induced by CRISPR-Cas9 leads to large deletions and complex rearrangements., *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 765–771. <https://doi.org/10.1038/nbt.4192>.
- [305] R.J. Ihry, K.A. Worringer, M.R. Salick, E. Frias, D. Ho, K. Theriault, S. Kommineni, J. Chen, M. Sondey, C. Ye, R. Randhawa, T. Kulkarni, Z. Yang, G. McAllister, C. Russ, J. Reece-Hoyes, W. Forrester, G.R. Hoffman, R. Dolmetsch, A. Kaykas, p53 inhibits CRISPR-Cas9 engineering in human pluripotent stem cells, *Nat. Med.* 24 (2018) 939+. <https://doi.org/10.1038/s41591-018-0050-6>.
- [306] I.M. Slaymaker, L. Gao, B. Zetsche, D.A. Scott, W.X. Yan, F. Zhang, Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity., *Science*. 351 (2016) 84–88. <https://doi.org/10.1126/science.aad5227>.
- [307] J.S. Chen, Y.S. Dagdas, B.P. Kleinstiver, M.M. Welch, A.A. Sousa, L.B. Harrington, S.H. Sternberg, J.K. Joung, A. Yildiz, J.A. Doudna, Enhanced proofreading governs CRISPR–Cas9 targeting accuracy, *Nature*. 550 (2017) 407.
- [308] J.K. Lee, E. Jeong, J. Lee, M. Jung, E. Shin, Y. Kim, K. Lee, I. Jung, D. Kim, S. Kim, J.-S. Kim, Directed evolution of CRISPR-Cas9 to increase its specificity, *Nat. Commun.* 9 (2018) 3048. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05477-x>.
- [309] C.A. Vakulskas, D.P. Dever, G.R. Rettig, R. Turk, A.M. Jacobi, M.A. Collingwood, N.M. Bode, M.S. McNeill, S. Yan, J. Camarena, A high-fidelity Cas9 mutant delivered as a ribonucleoprotein complex enables efficient gene editing in human hematopoietic stem and progenitor cells, *Nat. Med.* 24 (2018) 1216.
- [310] J.H. Hu, S.M. Miller, M.H. Geurts, W. Tang, L. Chen, N. Sun, C.M. Zeina, X. Gao, H.A. Rees, Z. Lin, Evolved Cas9 variants with broad PAM compatibility and high DNA

- specificity, *Nature*. 556 (2018) 57–63.
- [311] J.P.K. Bravo, M.-S. Liu, G.N. Hibshman, T.L. Dangerfield, K. Jung, R.S. McCool, K.A. Johnson, D.W. Taylor, Structural basis for mismatch surveillance by CRISPR–Cas9, *Nature*. 603 (2022) 343–347.
- [312] J.L. Schmid-Burgk, L. Gao, D. Li, Z. Gardner, J. Strecker, B. Lash, F. Zhang, Highly parallel profiling of Cas9 variant specificity, *Mol. Cell*. 78 (2020) 794–800.
- [313] D. Cerchione, K. Loveluck, E.L. Tillotson, F. Harbinski, J. DaSilva, C.P. Kelley, E. Keston-Smith, C.A. Fernandez, V.E. Myer, H. Jayaram, SMOOT libraries and phage-induced directed evolution of Cas9 to engineer reduced off-target activity, *PLoS One*. 15 (2020) e0231716.
- [314] H. Xie, X. Ge, F. Yang, B. Wang, S. Li, J. Duan, X. Lv, C. Cheng, Z. Song, C. Liu, High-fidelity SaCas9 identified by directional screening in human cells, *PLoS Biol*. 18 (2020) e3000747.
- [315] B.P. Kleinstiver, M.S. Prew, S.Q. Tsai, V. V Topkar, N.T. Nguyen, Z. Zheng, A.P.W. Gonzales, Z. Li, R.T. Peterson, J.-R.J. Yeh, M.J. Aryee, J.K. Joung, Engineered CRISPR-Cas9 nucleases with altered PAM specificities, *Nature*. 523 (2015) 481–485.
- [316] R.T. Walton, K.A. Christie, M.N. Whittaker, B.P. Kleinstiver, Unconstrained genome targeting with near-PAMless engineered CRISPR-Cas9 variants, *Science* (80-. ). 368 (2020) 290–296.
- [317] D. Agudelo, S. Carter, M. Velimirovic, A. Durringer, J.-F. Rivest, S. Levesque, J. Loehr, M. Mouchiroud, D. Cyr, P.J. Waters, Versatile and robust genome editing with *Streptococcus thermophilus* CRISPR1-Cas9, *Genome Res*. 30 (2020) 107–117.
- [318] F.A. Ran, L. Cong, W.X. Yan, D.A. Scott, J.S. Gootenberg, A.J. Kriz, B. Zetsche, O. Shalem, X. Wu, K.S. Makarova, E. Koonin, P.A. Sharp, F. Zhang, In vivo genome editing using *Staphylococcus aureus* Cas9, *Nature*. 520 (2015) 186–191.  
<https://doi.org/10.1038/nature14299>.
- [319] S.Q. Tsai, N. Wyvekens, C. Khayter, J.A. Foden, V. Thapar, D. Reyon, M.J. Goodwin, M.J. Aryee, J.K. Joung, Dimeric CRISPR RNA-guided FokI nucleases for highly specific genome editing, *Nat. Biotechnol*. 32 (2014) 569.
- [320] X. Ren, Z. Yang, J. Xu, J. Sun, D. Mao, Y. Hu, S.-J. Yang, H.-H. Qiao, X. Wang, Q. Hu, Enhanced specificity and efficiency of the CRISPR/Cas9 system with optimized sgRNA

- parameters in *Drosophila*, *Cell Rep.* 9 (2014) 1151–1162.
- [321] D.D. Kocak, E.A. Josephs, V. Bhandarkar, S.S. Adkar, J.B. Kwon, C.A. Gersbach, Increasing the specificity of CRISPR systems with engineered RNA secondary structures, *Nat. Biotechnol.* 37 (2019) 657.
- [322] A. Hendel, R.O. Bak, J.T. Clark, A.B. Kennedy, D.E. Ryan, S. Roy, I. Steinfeld, B.D. Lunstad, R.J. Kaiser, A.B. Wilkens, R. Bacchetta, A. Tsalenko, D. Dellinger, L. Bruhn, M.H. Porteus, Chemically modified guide RNAs enhance CRISPR-Cas genome editing in human primary cells, *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 985–989.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.3290>.
- [323] L. Taemaitree, A. Shivalingam, A.H. El-Sagheer, T. Brown, An artificial triazole backbone linkage provides a split-and-click strategy to bioactive chemically modified CRISPR sgRNA, *Nat. Commun.* 10 (2019) 1610. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-09600-4>.
- [324] M.A. McMahon, T.P. Prakash, D.W. Cleveland, C.F. Bennett, M. Rahdar, Chemically modified Cpf1-CRISPR RNAs mediate efficient genome editing in mammalian cells, *Mol. Ther.* 26 (2018) 1228–1240.
- [325] J. Tycko, V.E. Myer, P.D. Hsu, Methods for Optimizing CRISPR-Cas9 Genome Editing Specificity, *Mol. Cell.* 63 (2016) 355–370. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.07.004>.
- [326] K. Pardee, A.A. Green, M.K. Takahashi, D. Braff, G. Lambert, J.W. Lee, T. Ferrante, D. Ma, N. Donghia, M. Fan, N.M. Daringer, I. Bosch, D.M. Dudley, D.H. O'Connor, L. Gehrke, J.J. Collins, Rapid, Low-Cost Detection of Zika Virus Using Programmable Biomolecular Components., *Cell.* 165 (2016) 1255–1266.  
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2016.04.059>.
- [327] J.S. Gootenberg, O.O. Abudayyeh, J.W. Lee, P. Essletzbichler, A.J. Dy, J. Joung, V. Verdine, N. Donghia, N.M. Daringer, C.A. Freije, C. Myhrvold, R.P. Bhattacharyya, J. Livny, A. Regev, E. V Koonin, D.T. Hung, P.C. Sabeti, J.J. Collins, F. Zhang, Nucleic acid detection with CRISPR-Cas13a/C2c2., *Science.* 356 (2017) 438–442.  
<https://doi.org/10.1126/science.aam9321>.
- [328] Y. Ishino, H. Shinagawa, K. Makino, M. Amemura, A. Nakata, Nucleotide sequence of the *iap* gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in *Escherichia coli*, and identification of the gene product., *J. Bacteriol.* 169 (1987) 5429–5433.  
<https://doi.org/10.1128/jb.169.12.5429-5433.1987>.

- [329] D.H. Haft, J. Selengut, E.F. Mongodin, K.E. Nelson, A guild of 45 CRISPR-associated (Cas) protein families and multiple CRISPR/Cas subtypes exist in prokaryotic genomes., *PLoS Comput. Biol.* 1 (2005) e60. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.0010060>.
- [330] K.S. Makarova, E. V Koonin, Annotation and Classification of CRISPR-Cas Systems., *Methods Mol. Biol.* 1311 (2015) 47–75. [https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9\\_4](https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2687-9_4).
- [331] S.J.J. Brouns, M.M. Jore, M. Lundgren, E.R. Westra, R.J.H. Slijkhuis, A.P.L. Snijders, M.J. Dickman, K.S. Makarova, E. V Koonin, J. van der Oost, Small CRISPR RNAs guide antiviral defense in prokaryotes., *Science.* 321 (2008) 960–964. <https://doi.org/10.1126/science.1159689>.
- [332] R.P. Hayes, Y. Xiao, F. Ding, P.B.G. van Erp, K. Rajashankar, S. Bailey, B. Wiedenheft, A. Ke, Structural basis for promiscuous PAM recognition in type I-E Cascade from *E. coli.*, *Nature.* 530 (2016) 499–503. <https://doi.org/10.1038/nature16995>.
- [333] M. Kazlauskienė, G. Kostiuk, C. Venclovas, G. Tamulaitis, V. Siksnys, A cyclic oligonucleotide signaling pathway in type III CRISPR-Cas systems., *Science.* 357 (2017) 605–609. <https://doi.org/10.1126/science.aao0100>.
- [334] O. Niewoehner, C. Garcia-Doval, J.T. Rostol, C. Berk, F. Schwede, L. Bigler, J. Hall, L.A. Marraffini, M. Jinek, Type III CRISPR-Cas systems produce cyclic oligoadenylate second messengers., *Nature.* 548 (2017) 543–548. <https://doi.org/10.1038/nature23467>.
- [335] E. V Koonin, K.S. Makarova, Origins and evolution of CRISPR-Cas systems., *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 374 (2019) 20180087. <https://doi.org/10.1098/rstb.2018.0087>.
- [336] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, O.S. Alkhnbashi, F. Costa, S.A. Shah, S.J. Saunders, R. Barrangou, S.J.J. Brouns, E. Charpentier, D.H. Haft, P. Horvath, S. Moineau, F.J.M. Mojica, R.M. Terns, M.P. Terns, M.F. White, A.F. Yakunin, R.A. Garrett, J. van der Oost, R. Backofen, E. V Koonin, An updated evolutionary classification of CRISPR-Cas systems., *Nat. Rev. Microbiol.* 13 (2015) 722–736. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3569>.
- [337] S. Shmakov, A. Smargon, D. Scott, D. Cox, N. Pyzocha, W. Yan, O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, K.S. Makarova, Y.I. Wolf, K. Severinov, F. Zhang, E. V Koonin, Diversity and evolution of class 2 CRISPR-Cas systems., *Nat. Rev. Microbiol.* 15 (2017) 169–182. <https://doi.org/10.1038/nrmicro.2016.184>.
- [338] P. Mohanraju, K.S. Makarova, B. Zetsche, F. Zhang, E. V Koonin, J. van der Oost,

- Diverse evolutionary roots and mechanistic variations of the CRISPR-Cas systems, *Science* (80-. ). 353 (2016) aad5147. <https://doi.org/10.1126/science.aad5147>.
- [339] M. Jinek, K. Chylinski, I. Fonfara, M. Hauer, J.A. Doudna, E. Charpentier, A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity., *Science*. 337 (2012) 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>.
- [340] B.P. Kleinstiver, V. Pattanayak, M.S. Prew, S.Q. Tsai, N.T. Nguyen, Z. Zheng, J. Keith Joung, High-fidelity CRISPR–Cas9 nucleases with no detectable genome-wide off-target effects, *Nature*. 529 (2016) 490–495. <https://doi.org/10.1038/nature16526>.
- [341] A. Casini, M. Olivieri, G. Petris, C. Montagna, G. Reginato, G. Maule, F. Lorenzin, D. Prandi, A. Romanel, F. Demichelis, A highly specific SpCas9 variant is identified by in vivo screening in yeast, *Nat. Biotechnol.* 36 (2018) 265.
- [342] A. Ikeda, W. Fujii, K. Sugiura, K. Naito, High-fidelity endonuclease variant HypaCas9 facilitates accurate allele-specific gene modification in mouse zygotes, *Commun. Biol.* 2 (2019) 1–7.
- [343] K.M. Esvelt, P. Mali, J.L. Braff, M. Moosburner, S.J. Yaung, G.M. Church, Orthogonal Cas9 proteins for RNA-guided gene regulation and editing, *Nat. Methods*. 10 (2013) 1116–1123. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2681>.
- [344] C.M. Lee, T.J. Cradick, G. Bao, The *Neisseria meningitidis* CRISPR-Cas9 System Enables Specific Genome Editing in Mammalian Cells, *Mol. Ther.* 24 (2016) 645–654. <https://doi.org/10.1038/mt.2016.8>.
- [345] M. Muller, C.M. Lee, G. Gasiunas, T.H. Davis, T.J. Cradick, V. Siksnys, G. Bao, T. Cathomen, C. Mussolino, *Streptococcus thermophilus* CRISPR-Cas9 Systems Enable Specific Editing of the Human Genome., *Mol. Ther.* 24 (2016) 636–644. <https://doi.org/10.1038/mt.2015.218>.
- [346] N. Amrani, X.D. Gao, P. Liu, A. Edraki, A. Mir, R. Ibraheim, A. Gupta, K.E. Sasaki, T. Wu, P.D. Donohoue, A.H. Settle, A.M. Lied, K. McGovern, C.K. Fuller, P. Cameron, T.G. Fazio, L.J. Zhu, S.A. Wolfe, E.J. Sontheimer, NmeCas9 is an intrinsically high-fidelity genome-editing platform, *Genome Biol.* 19 (2018) 214. <https://doi.org/10.1186/s13059-018-1591-1>.
- [347] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, J. Iranzo, S.A. Shmakov, O.S. Alkhnbashi, S.J.J. Brouns, E. Charpentier, D. Cheng, D.H. Haft, P. Horvath, Evolutionary classification of CRISPR–

- Cas systems: a burst of class 2 and derived variants, *Nat. Rev. Microbiol.* (2019) 1–17.
- [348] D. Kim, J. Kim, J.K. Hur, K.W. Been, S.-H. Yoon, J.-S. Kim, Genome-wide analysis reveals specificities of Cpf1 endonucleases in human cells., *Nat. Biotechnol.* 34 (2016) 863–868. <https://doi.org/10.1038/nbt.3609>.
- [349] A. Bothmer, T. Phadke, L.A. Barrera, C.M. Margulies, C.S. Lee, F. Buquicchio, S. Moss, H.S. Abdulkerim, W. Selleck, H. Jayaram, V.E. Myer, C. Cotta-Ramusino, Characterization of the interplay between DNA repair and CRISPR/Cas9-induced DNA lesions at an endogenous locus., *Nat. Commun.* 8 (2017) 13905. <https://doi.org/10.1038/ncomms13905>.
- [350] L.B. Harrington, D. Burstein, J.S. Chen, D. Paez-Espino, E. Ma, I.P. Witte, J.C. Cofsky, N.C. Kyrpides, J.F. Banfield, J.A. Doudna, Programmed DNA destruction by miniature CRISPR-Cas14 enzymes, *Science.* 362 (2018) 839–842. <https://doi.org/10.1126/science.aav4294>.
- [351] O.O. Abudayyeh, J.S. Gootenberg, P. Essletzbichler, S. Han, J. Joung, J.J. Belanto, V. Verdine, D.B.T. Cox, M.J. Kellner, A. Regev, E.S. Lander, D.F. Voytas, A.Y. Ting, F. Zhang, RNA targeting with CRISPR-Cas13, *Nature.* 550 (2017) 280–284. <https://doi.org/10.1038/nature24049>.
- [352] K.S. Makarova, Y.I. Wolf, E. V Koonin, Classification and Nomenclature of CRISPR-Cas Systems: Where from Here?, *Cris. J.* 1 (2018) 325–336. <https://doi.org/10.1089/crispr.2018.0033>.
- [353] L. Sun, J. Wu, F. Du, X. Chen, Z.J. Chen, Cyclic GMP-AMP synthase is a cytosolic DNA sensor that activates the type I interferon pathway., *Science.* 339 (2013) 786–791. <https://doi.org/10.1126/science.1232458>.
- [354] F. Civril, T. Deimling, C.C. de Oliveira Mann, A. Ablasser, M. Moldt, G. Witte, V. Hornung, K.-P. Hopfner, Structural mechanism of cytosolic DNA sensing by cGAS, *Nature.* 498 (2013) 332–337.
- [355] X. Zhang, J. Wu, F. Du, H. Xu, L. Sun, Z. Chen, C.A. Brautigam, X. Zhang, Z.J. Chen, The cytosolic DNA sensor cGAS forms an oligomeric complex with DNA and undergoes switch-like conformational changes in the activation loop, *Cell Rep.* 6 (2014) 421–430.
- [356] K.-P. Hopfner, V. Hornung, Molecular mechanisms and cellular functions of cGAS–STING signalling, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 21 (2020) 501–521.

- [357] P. Gao, M. Ascano, T. Zillinger, W. Wang, P. Dai, A.A. Serganov, B.L. Gaffney, S. Shuman, R.A. Jones, L. Deng, G. Hartmann, W. Barchet, T. Tuschl, D.J. Patel, Structure-function analysis of STING activation by c[G(2',5')pA(3',5')p] and targeting by antiviral DMXAA., *Cell*. 154 (2013) 748–762. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.07.023>.
- [358] G.N. Barber, STING: infection, inflammation and cancer, *Nat. Rev. Immunol.* 15 (2015) 760–770.
- [359] Z. Ma, B. Damania, The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses, *Cell Host Microbe*. 19 (2016) 150–158. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2016.01.010>.
- [360] L. Ponomareva, H. Liu, X. Duan, E. Dickerson, H. Shen, R. Panchanathan, D. Choubey, AIM2, an IFN-inducible cytosolic DNA sensor, in the development of benign prostate hyperplasia and prostate cancer., *Mol. Cancer Res.* 11 (2013) 1193–1202. <https://doi.org/10.1158/1541-7786.MCR-13-0145>.
- [361] N. Ketelut-Carneiro, K.A. Fitzgerald, Inflammasomes, *Curr. Biol.* 30 (2020) R689–R694.
- [362] T. Fernandes-Alnemri, J.-W. Yu, P. Datta, J. Wu, E.S. Alnemri, AIM2 activates the inflammasome and cell death in response to cytoplasmic DNA., *Nature*. 458 (2009) 509–513. <https://doi.org/10.1038/nature07710>.
- [363] M. Lamkanfi, V.M. Dixit, Mechanisms and functions of inflammasomes., *Cell*. 157 (2014) 1013–1022. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.04.007>.
- [364] V. Sagulenko, S.J. Thygesen, D.P. Sester, A. Idris, J.A. Cridland, P.R. Vajjhala, T.L. Roberts, K. Schroder, J.E. Vince, J.M. Hill, AIM2 and NLRP3 inflammasomes activate both apoptotic and pyroptotic death pathways via ASC, *Cell Death Differ.* 20 (2013) 1149–1160.
- [365] F. Zhang, Y. Yuan, F. Ma, Function and regulation of nuclear DNA sensors during viral infection and tumorigenesis, *Front. Immunol.* 11 (2020).
- [366] B.A. Diner, K.K. Lum, I.M. Cristea, The emerging role of nuclear viral DNA sensors, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 26412–26421. <https://doi.org/10.1074/jbc.R115.652289>.
- [367] S.A. Schattgen, K.A. Fitzgerald, The PYHIN protein family as mediators of host defenses., *Immunol. Rev.* 243 (2011) 109–118. <https://doi.org/10.1111/j.1600-065X.2011.01053.x>.
- [368] J. Bai, F. Liu, Nuclear cGAS: sequestration and beyond, *Protein Cell*. 13 (2022) 90–101.

- [369] M.R. Jakobsen, S.R. Paludan, IFI16: at the interphase between innate DNA sensing and genome regulation, *Cytokine Growth Factor Rev.* 25 (2014) 649–655.
- [370] L. Wang, M. Wen, X. Cao, Nuclear hnRNPA2B1 initiates and amplifies the innate immune response to DNA viruses., *Science.* 365 (2019) eaav0758.  
<https://doi.org/10.1126/science.aav0758>.
- [371] K. Burleigh, J.H. Maltbaek, S. Cambier, R. Green, M. Gale, R.C. James, D.B. Stetson, Human DNA-PK activates a STING-independent DNA sensing pathway, *Sci. Immunol.* 5 (2020).
- [372] S. Brezgin, A. Kostyusheva, E. Bayurova, E. Volchkova, V. Gegechkori, I. Gordeychuk, D. Glebe, D. Kostyushev, V. Chulanov, Immunity and Viral Infections: Modulating Antiviral Response via CRISPR–Cas Systems, *Viruses.* 13 (2021) 1373.
- [373] S.-Y. Liu, R. Aliyari, K. Chikere, G. Li, M.D. Marsden, J.K. Smith, O. Pernet, H. Guo, R. Nusbaum, J.A. Zack, A.N. Freiberg, L. Su, B. Lee, G. Cheng, Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase broadly inhibits viral entry by production of 25-hydroxycholesterol., *Immunity.* 38 (2013) 92–105.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2012.11.005>.
- [374] C. Li, Y.-Q. Deng, S. Wang, F. Ma, R. Aliyari, X.-Y. Huang, N.-N. Zhang, M. Watanabe, H.-L. Dong, P. Liu, 25-Hydroxycholesterol protects host against Zika virus infection and its associated microcephaly in a mouse model, *Immunity.* 46 (2017) 446–456.
- [375] I. Romero-Brey, C. Berger, C.C. Colpitts, T. Boldanova, M. Engelmann, D. Todt, P.M. Perin, P. Behrendt, F.W.R. Vondran, S. Xu, Interferon-inducible cholesterol-25-hydroxylase restricts hepatitis C virus replication through blockage of membranous web formation, *Hepatology.* 62 (2015) 702–714.
- [376] R. Zang, J.B. Case, E. Yutuc, X. Ma, S. Shen, M.F.G. Castro, Z. Liu, Q. Zeng, H. Zhao, J. Son, Cholesterol 25-hydroxylase suppresses SARS-CoV-2 replication by blocking membrane fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci.* (2020).
- [377] X. Zhao, J. Li, C.A. Winkler, P. An, J.-T. Guo, IFITM genes, variants, and their roles in the control and pathogenesis of viral infections, *Front. Microbiol.* 9 (2019) 3228.
- [378] S.K. Narayana, K.J. Helbig, E.M. McCartney, N.S. Eyre, R.A. Bull, A. Eltahla, A.R. Lloyd, M.R. Beard, The interferon-induced transmembrane proteins, IFITM1, IFITM2, and IFITM3 inhibit hepatitis C virus entry, *J. Biol. Chem.* 290 (2015) 25946–25959.

- [379] J. Lu, Q. Pan, L. Rong, S.-L. Liu, C. Liang, The IFITM proteins inhibit HIV-1 infection, *J. Virol.* 85 (2011) 2126–2137.
- [380] A. Kühnl, A. Musiol, N. Heitzig, D.E. Johnson, C. Ehrhardt, T. Grewal, V. Gerke, S. Ludwig, U. Rescher, Late endosomal/lysosomal cholesterol accumulation is a host cell-protective mechanism inhibiting endosomal escape of influenza A virus, *MBio.* 9 (2018).
- [381] S.P. John, C.R. Chin, J.M. Perreira, E.M. Feeley, A.M. Aker, G. Savidis, S.E. Smith, A.E.H. Elia, A.R. Everitt, M. Vora, The CD225 domain of IFITM3 is required for both IFITM protein association and inhibition of influenza A virus and dengue virus replication, *J. Virol.* 87 (2013) 7837–7852.
- [382] K. Tartour, X.-N. Nguyen, R. Appourchaux, S. Assil, V. Barateau, L.-M. Bloyet, J. Burlaud Gaillard, M.-P. Confort, B. Escudero-Perez, H. Gruffat, Interference with the production of infectious viral particles and bimodal inhibition of replication are broadly conserved antiviral properties of IFITMs, *PLoS Pathog.* 13 (2017) e1006610.
- [383] F. Wrensch, C.B. Karsten, K. Gnirß, M. Hoffmann, K. Lu, A. Takada, M. Winkler, G. Simmons, S. Pöhlmann, Interferon-Induced Transmembrane Protein–Mediated Inhibition of Host Cell Entry of Ebolaviruses, *J. Infect. Dis.* 212 (2015) S210–S218.
- [384] X. Zhao, M. Sehgal, Z. Hou, J. Cheng, S. Shu, S. Wu, F. Guo, S.J. Le Marchand, H. Lin, J. Chang, Identification of residues controlling restriction versus enhancing activities of IFITM proteins on entry of human coronaviruses, *J. Virol.* 92 (2018).
- [385] G. Shi, A.D. Kenney, E. Kudryashova, A. Zani, L. Zhang, K.K. Lai, L. Hall-Stoodley, R.T. Robinson, D.S. Kudryashov, A.A. Compton, Opposing activities of IFITM proteins in SARS-CoV-2 infection, *EMBO J.* 40 (2021) e106501.
- [386] J.M. Weidner, D. Jiang, X.-B. Pan, J. Chang, T.M. Block, J.-T. Guo, Interferon-induced cell membrane proteins, IFITM3 and tetherin, inhibit vesicular stomatitis virus infection via distinct mechanisms, *J. Virol.* 84 (2010) 12646–12657.
- [387] R. Mudhasani, J.P. Tran, C. Retterer, S.R. Radoshitzky, K.P. Kota, L.A. Altamura, J.M. Smith, B.Z. Packard, J.H. Kuhn, J. Costantino, IFITM-2 and IFITM-3 but not IFITM-1 restrict Rift Valley fever virus, *J. Virol.* 87 (2013) 8451–8464.
- [388] T. Doyle, O. Moncorgé, B. Bonaventure, D. Pollpeter, M. Lussignol, M. Tauziet, L. Apolonia, M.-T. Catanese, C. Goujon, M.H. Malim, The interferon-inducible isoform of NCOA7 inhibits endosome-mediated viral entry., *Nat. Microbiol.* 3 (2018) 1369–1376.

<https://doi.org/10.1038/s41564-018-0273-9>.

- [389] S. Pfaender, K.B. Mar, E. Michailidis, A. Kratzel, I.N. Boys, P. V'kovski, W. Fan, J.N. Kelly, D. Hirt, N. Ebert, H. Stalder, H. Kleine-Weber, M. Hoffmann, H.-H. Hoffmann, M. Saeed, R. Dijkman, E. Steinmann, M. Wight-Carter, M.B. McDougal, N.W. Hanners, S. Pöhlmann, T. Gallagher, D. Todt, G. Zimmer, C.M. Rice, J.W. Schoggins, V. Thiel, LY6E impairs coronavirus fusion and confers immune control of viral disease, *Nat. Microbiol.* (2020). <https://doi.org/10.1038/s41564-020-0769-y>.
- [390] L.A. Durfee, N. Lyon, K. Seo, J.M. Huibregtse, The ISG15 conjugation system broadly targets newly synthesized proteins: implications for the antiviral function of ISG15, *Mol. Cell.* 38 (2010) 722–732. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2010.05.002>.
- [391] А.П. Костюшева, Д.С. Костюшев, С.А. Брезгин, Д.Н. Зарифьян, Е.В. Волчкова, В.П. Чуланов, Низкомолекулярные ингибиторы путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК усиливают противовирусное действие системы CRISPR/Cas9 на моделях вируса гепатита В, *Молекулярная Биология.* 53 (2019) 311–323.
- [392] P. Kumar, T.R. Sweeney, M.A. Skabkin, O. V Skabkina, C.U.T. Hellen, T. V Pestova, Inhibition of translation by IFIT family members is determined by their ability to interact selectively with the 5'-terminal regions of cap0-, cap1-and 5' ppp-mRNAs, *Nucleic Acids Res.* 42 (2014) 3228–3245.
- [393] R.C. Fleith, H. V Mears, X.Y. Leong, T.J. Sanford, E. Emmott, S.C. Graham, D.S. Mansur, T.R. Sweeney, IFIT3 and IFIT2/3 promote IFIT1-mediated translation inhibition by enhancing binding to non-self RNA, *Nucleic Acids Res.* 46 (2018) 5269–5285.
- [394] M. Li, E. Kao, D. Malone, X. Gao, J.Y.J. Wang, M. David, DNA damage-induced cell death relies on SLFN11-dependent cleavage of distinct type II tRNAs, *Nat. Struct. Mol. Biol.* 25 (2018) 1047–1058.
- [395] M.R. Jakobsen, T.H. Mogensen, S.R. Paludan, Caught in translation: innate restriction of HIV mRNA translation by a schlafen family protein, *Cell Res.* 23 (2013) 320–322.
- [396] F. Valdez, J. Salvador, P.M. Palermo, J.E. Mohl, K.A. Hanley, D. Watts, M. Llano, Schlafen 11 restricts flavivirus replication, *J. Virol.* 93 (2019) 10–1128.
- [397] K. Jitobaom, T. Sirihongthong, C. Boonarkart, S. Phakaratsakul, O. Suptawiwat, P. Auewarakul, Human Schlafen 11 inhibits influenza A virus production, *Virus Res.* 334 (2023) 199162.

- [398] W. Rodriguez, T. Mehrmann, D. Hatfield, M. Muller, Shiftless restricts viral gene expression and influences RNA granule formation during Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus lytic replication, *J. Virol.* 96 (2022) e01469-22.
- [399] S. Naphtine, C.H. Hill, H.C.M. Nugent, I. Brierley, Modulation of viral programmed ribosomal frameshifting and stop codon readthrough by the host restriction factor shiftless, *Viruses.* 13 (2021) 1230.
- [400] J.W. Schoggins, S.J. Wilson, M. Panis, M.Y. Murphy, C.T. Jones, P. Bieniasz, C.M. Rice, A diverse range of gene products are effectors of the type I interferon antiviral response., *Nature.* 472 (2011) 481–485. <https://doi.org/10.1038/nature09907>.
- [401] C. Panayiotou, R. Lindqvist, C. Kurhade, K. Vonderstein, J. Pasto, K. Edlund, A.S. Upadhyay, A.K. Överby, Viperin restricts Zika virus and tick-borne encephalitis virus replication by targeting NS3 for proteasomal degradation, *J. Virol.* 92 (2018) 10–1128.
- [402] K.A. Fitzgerald, The interferon inducible gene: Viperin, *J. Interf. Cytokine Res.* 31 (2011) 131–135.
- [403] T. Saitoh, T. Satoh, N. Yamamoto, S. Uematsu, O. Takeuchi, T. Kawai, S. Akira, Antiviral protein Viperin promotes Toll-like receptor 7-and Toll-like receptor 9-mediated type I interferon production in plasmacytoid dendritic cells, *Immunity.* 34 (2011) 352–363.
- [404] M.H. Malim, P.D. Bieniasz, HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion., *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* 2 (2012) a006940. <https://doi.org/10.1101/cshperspect.a006940>.
- [405] J. Batra, J.F. Hultquist, D. Liu, O. Shtanko, J. Von Dollen, L. Satkamp, G.M. Jang, P. Luthra, T.M. Schwarz, G.I. Small, E. Arnett, M. Anantpadma, A. Reyes, D.W. Leung, R. Kaake, P. Haas, C.B. Schmidt, L.S. Schlesinger, D.J. LaCount, R.A. Davey, G.K. Amarasinghe, C.F. Basler, N.J. Krogan, Protein Interaction Mapping Identifies RBBP6 as a Negative Regulator of Ebola Virus Replication., *Cell.* 175 (2018) 1917-1930.e13. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.08.044>.
- [406] R.B. Richardson, M.B. Ohlson, J.L. Eitson, A. Kumar, M.B. McDougal, I.N. Boys, K.B. Mar, P.C. De La Cruz-Rivera, C. Douglas, G. Konopka, C. Xing, J.W. Schoggins, C. Pamela, C. Douglas, G. Konopka, A CRISPR screen identifies IFI6 as an ER-resident interferon effector that blocks flavivirus replication., *Nature Publishing Group*, 2018. <https://doi.org/10.1038/s41564-018-0244-1>.

- [407] M. Sajid, H. Ullah, K. Yan, M. He, J. Feng, M.A. Shereen, R. Hao, Q. Li, D. Guo, Y. Chen, L. Zhou, The Functional and Antiviral Activity of Interferon Alpha-Inducible IFI6 Against Hepatitis B Virus Replication and Gene Expression., *Front. Immunol.* 12 (2021) 634937. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.634937>.
- [408] X. Guo, J. Ma, J. Sun, G. Gao, The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 151–156. <https://doi.org/10.1073/pnas.0607063104>.
- [409] Y. Qiao, X. Han, G. Guan, N. Wu, J. Sun, V. Pak, G. Liang, TGF-beta triggers HBV cccDNA degradation through AID-dependent deamination., *FEBS Lett.* 590 (2016) 419–427. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12058>.
- [410] A. Chakrabarti, B.K. Jha, R.H. Silverman, New insights into the role of RNase L in innate immunity., *J. Interf. Cytokine Res. Off. J. Int. Soc. Interf. Cytokine Res.* 31 (2011) 49–57. <https://doi.org/10.1089/jir.2010.0120>.
- [411] E. Abernathy, B. Glaunsinger, Emerging roles for RNA degradation in viral replication and antiviral defense., *Virology.* 479–480 (2015) 600–608. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.02.007>.
- [412] L. Espert, G. Degols, C. Gongora, D. Blondel, B.R. Williams, R.H. Silverman, N. Mechti, ISG20, a new interferon-induced RNase specific for single-stranded RNA, defines an alternative antiviral pathway against RNA genomic viruses., *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 16151–16158. <https://doi.org/10.1074/jbc.M209628200>.
- [413] N. Wu, X.-N. Nguyen, L. Wang, R. Appourchaux, C. Zhang, B. Panthu, H. Gruffat, C. Journo, S. Alais, J. Qin, N. Zhang, K. Tartour, F. Catez, R. Mahieux, T. Ohlmann, M. Liu, B. Du, A. Cimarelli, The interferon stimulated gene 20 protein (ISG20) is an innate defense antiviral factor that discriminates self versus non-self translation., *PLoS Pathog.* 15 (2019) e1008093. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008093>.
- [414] T. Kawai, S. Akira, TLR signaling, in: *Semin. Immunol.*, Elsevier, 2007: pp. 24–32.
- [415] A.C. Köhner, J.C. Brüning, Toll-like receptors: linking inflammation to metabolism, *Trends Endocrinol. Metab.* 22 (2011) 16–23.
- [416] T. Oka, S. Hikoso, O. Yamaguchi, M. Taneike, T. Takeda, T. Tamai, J. Oyabu, T. Murakawa, H. Nakayama, K. Nishida, Mitochondrial DNA that escapes from autophagy causes inflammation and heart failure, *Nature.* 485 (2012) 251–255.

- [417] T. Vogl, K. Tenbrock, S. Ludwig, N. Leukert, C. Ehrhardt, M.A.D. Van Zoelen, W. Nacken, D. Foell, T. Van der Poll, C. Sorg, Mrp8 and Mrp14 are endogenous activators of Toll-like receptor 4, promoting lethal, endotoxin-induced shock, *Nat. Med.* 13 (2007) 1042–1049.
- [418] A.S. Jureka, A.B. Kleinpeter, G. Cornilescu, C.C. Cornilescu, C.M. Petit, Structural Basis for a Novel Interaction between the NS1 Protein Derived from the 1918 Influenza Virus and RIG-I., *Structure.* 23 (2015) 2001–2010. <https://doi.org/10.1016/j.str.2015.08.007>.
- [419] Q. Feng, M.A. Langereis, M. Lork, M. Nguyen, S. V Hato, K. Lanke, L. Emdad, P. Bhoopathi, P.B. Fisher, R.E. Lloyd, F.J.M. van Kuppeveld, Enterovirus 2Apro targets MDA5 and MAVS in infected cells., *J. Virol.* 88 (2014) 3369–3378. <https://doi.org/10.1128/JVI.02712-13>.
- [420] M.E. Davis, M.K. Wang, L.J. Rennick, F. Full, S. Gableske, A.W. Mesman, S.I. Gringhuis, T.B.H. Geijtenbeek, W.P. Duprex, M.U. Gack, Antagonism of the phosphatase PP1 by the measles virus V protein is required for innate immune escape of MDA5., *Cell Host Microbe.* 16 (2014) 19–30. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2014.06.007>.
- [421] C. Xu, L. Sun, W. Liu, Z. Duan, Latent Membrane Protein 1 of Epstein-Barr Virus Promotes RIG-I Degradation Mediated by Proteasome Pathway., *Front. Immunol.* 9 (2018) 1446. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01446>.
- [422] Z. Yang, X. Zhang, F. Wang, P. Wang, E. Kuang, X. Li, Suppression of MDA5-mediated antiviral immune responses by NSP8 of SARS-CoV-2, *BioRxiv.* (2020). <https://doi.org/10.1101/2020.08.12.247767>.
- [423] C. Chiang, E.-K. Pauli, J. Biryukov, K.F. Feister, M. Meng, E.A. White, K. Münger, P.M. Howley, C. Meyers, M.U. Gack, The Human Papillomavirus E6 Oncoprotein Targets USP15 and TRIM25 To Suppress RIG-I-Mediated Innate Immune Signaling., *J. Virol.* 92 (2018). <https://doi.org/10.1128/JVI.01737-17>.
- [424] H.-L. Zhang, H.-Q. Ye, S.-Q. Liu, C.-L. Deng, X.-D. Li, P.-Y. Shi, B. Zhang, West Nile Virus NS1 Antagonizes Interferon Beta Production by Targeting RIG-I and MDA5., *J. Virol.* 91 (2017). <https://doi.org/10.1128/JVI.02396-16>.
- [425] R. Rajsbaum, R.A. Albrecht, M.K. Wang, N.P. Maharaj, G.A. Versteeg, E. Nistal-Villán, A. García-Sastre, M.U. Gack, Species-specific inhibition of RIG-I ubiquitination and IFN induction by the influenza A virus NS1 protein., *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1003059. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003059>.

- [426] Y. Hu, W. Li, T. Gao, Y. Cui, Y. Jin, P. Li, Q. Ma, X. Liu, C. Cao, The Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus Nucleocapsid Inhibits Type I Interferon Production by Interfering with TRIM25-Mediated RIG-I Ubiquitination., *J. Virol.* 91 (2017). <https://doi.org/10.1128/JVI.02143-16>.
- [427] J. Ban, N.-R. Lee, N.-J. Lee, J.K. Lee, F.-S. Quan, K.-S. Inn, Human Respiratory Syncytial Virus NS 1 Targets TRIM25 to Suppress RIG-I Ubiquitination and Subsequent RIG-I-Mediated Antiviral Signaling., *Viruses.* 10 (2018). <https://doi.org/10.3390/v10120716>.
- [428] Y.K. Chan, M.U. Gack, A phosphomimetic-based mechanism of dengue virus to antagonize innate immunity., *Nat. Immunol.* 17 (2016) 523–530. <https://doi.org/10.1038/ni.3393>.
- [429] H. Oshiumi, M. Miyashita, M. Matsumoto, T. Seya, A distinct role of Riplet-mediated K63-Linked polyubiquitination of the RIG-I repressor domain in human antiviral innate immune responses., *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003533. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003533>.
- [430] W. Riedl, D. Acharya, J.-H. Lee, G. Liu, T. Serman, C. Chiang, Y.K. Chan, M.S. Diamond, M.U. Gack, Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity., *Cell Host Microbe.* 26 (2019) 493-503.e6. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.012>.
- [431] M.H. Orzalli, N.M. Broekema, B.A. Diner, D.C. Hancks, N.C. Elde, I.M. Cristea, D.M. Knipe, cGAS-mediated stabilization of IFI16 promotes innate signaling during herpes simplex virus infection., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E1773-81. <https://doi.org/10.1073/pnas.1424637112>.
- [432] M.H. Orzalli, N.A. DeLuca, D.M. Knipe, Nuclear IFI16 induction of IRF-3 signaling during herpesviral infection and degradation of IFI16 by the viral ICP0 protein., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 109 (2012) E3008-17. <https://doi.org/10.1073/pnas.1211302109>.
- [433] I.M. Cristea, N.J. Moorman, S.S. Terhune, C.D. Cuevas, E.S. O’Keefe, M.P. Rout, B.T. Chait, T. Shenk, Human cytomegalovirus pUL83 stimulates activity of the viral immediate-early promoter through its interaction with the cellular IFI16 protein., *J. Virol.* 84 (2010) 7803–7814. <https://doi.org/10.1128/JVI.00139-10>.
- [434] C. Su, C. Zheng, Herpes Simplex Virus 1 Abrogates the cGAS/STING-Mediated Cytosolic DNA-Sensing Pathway via Its Virion Host Shutoff Protein, UL41., *J. Virol.* 91

- (2017). <https://doi.org/10.1128/JVI.02414-16>.
- [435] M. Biolatti, V. Dell'Oste, S. Pautasso, F. Gugliesi, J. von Einem, C. Krapp, M.R. Jakobsen, C. Borgogna, M. Gariglio, M. De Andrea, S. Landolfo, Human Cytomegalovirus Tegument Protein pp65 (pUL83) Dampens Type I Interferon Production by Inactivating the DNA Sensor cGAS without Affecting STING., *J. Virol.* 92 (2018). <https://doi.org/10.1128/JVI.01774-17>.
- [436] Z.-F. Huang, H.-M. Zou, B.-W. Liao, H.-Y. Zhang, Y. Yang, Y.-Z. Fu, S.-Y. Wang, M.-H. Luo, Y.-Y. Wang, Human Cytomegalovirus Protein UL31 Inhibits DNA Sensing of cGAS to Mediate Immune Evasion., *Cell Host Microbe.* 24 (2018) 69-80.e4. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.05.007>.
- [437] J. Wu, W. Li, Y. Shao, D. Avey, B. Fu, J. Gillen, T. Hand, S. Ma, X. Liu, W. Miley, A. Konrad, F. Neipel, M. Stürzl, D. Whitby, H. Li, F. Zhu, Inhibition of cGAS DNA Sensing by a Herpesvirus Virion Protein., *Cell Host Microbe.* 18 (2015) 333–344. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2015.07.015>.
- [438] Y. Zheng, Q. Liu, Y. Wu, L. Ma, Z. Zhang, T. Liu, S. Jin, Y. She, Y.-P. Li, J. Cui, Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1-caspase-1 axis., *EMBO J.* 37 (2018). <https://doi.org/10.15252/embj.201899347>.
- [439] J. Zhang, J. Zhao, S. Xu, J. Li, S. He, Y. Zeng, L. Xie, N. Xie, T. Liu, K. Lee, G.J. Seo, L. Chen, A.C. Stabell, Z. Xia, S.L. Sawyer, J. Jung, C. Huang, P. Feng, Species-Specific Deamidation of cGAS by Herpes Simplex Virus UL37 Protein Facilitates Viral Replication., *Cell Host Microbe.* 24 (2018) 234-248.e5. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2018.07.004>.
- [440] J. Huang, H. You, C. Su, Y. Li, S. Chen, C. Zheng, Herpes Simplex Virus 1 Tegument Protein VP22 Abrogates cGAS/STING-Mediated Antiviral Innate Immunity., *J. Virol.* 92 (2018). <https://doi.org/10.1128/JVI.00841-18>.
- [441] G. Zhang, B. Chan, N. Samarina, B. Abere, M. Weidner-Glunde, A. Buch, A. Pich, M.M. Brinkmann, T.F. Schulz, Cytoplasmic isoforms of Kaposi sarcoma herpesvirus LANA recruit and antagonize the innate immune DNA sensor cGAS., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) E1034-43. <https://doi.org/10.1073/pnas.1516812113>.
- [442] L. Lau, E.E. Gray, R.L. Brunette, D.B. Stetson, DNA tumor virus oncogenes antagonize the cGAS-STING DNA-sensing pathway., *Science.* 350 (2015) 568–571. <https://doi.org/10.1126/science.aab3291>.

- [443] Y. Liu, J. Li, J. Chen, Y. Li, W. Wang, X. Du, W. Song, W. Zhang, L. Lin, Z. Yuan, Hepatitis B Virus Polymerase Disrupts K63-Linked Ubiquitination of STING To Block Innate Cytosolic DNA-Sensing Pathways, *J. Virol.* 89 (2015) 2287–2300. <https://doi.org/10.1128/JVI.02760-14>.
- [444] Z. Ma, S.R. Jacobs, J.A. West, C. Stopford, Z. Zhang, Z. Davis, G.N. Barber, B.A. Glaunsinger, D.P. Dittmer, B. Damania, Modulation of the cGAS-STING DNA sensing pathway by gammaherpesviruses., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112 (2015) E4306-15. <https://doi.org/10.1073/pnas.1503831112>.
- [445] Q. Ding, J.M. Gaska, F. Douam, L. Wei, D. Kim, M. Balev, B. Heller, A. Ploss, Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease., *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 115 (2018) E6310–E6318. <https://doi.org/10.1073/pnas.1803406115>.
- [446] L.G. Webb, A. Fernandez-Sesma, RNA viruses and the cGAS-STING pathway: reframing our understanding of innate immune sensing., *Curr. Opin. Virol.* 53 (2022) 101206. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2022.101206>.
- [447] S. Aguirre, A.M. Maestre, S. Pagni, J.R. Patel, T. Savage, D. Gutman, K. Maringer, D. Bernal-Rubio, R.S. Shabman, V. Simon, J.R. Rodriguez-Madoz, L.C.F. Mulder, G.N. Barber, A. Fernandez-Sesma, DENV inhibits type I IFN production in infected cells by cleaving human STING., *PLoS Pathog.* 8 (2012) e1002934. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002934>.
- [448] K. Li, E. Foy, J.C. Ferreon, M. Nakamura, A.C.M. Ferreon, M. Ikeda, S.C. Ray, M. Gale Jr, S.M. Lemon, Immune evasion by hepatitis C virus NS3/4A protease-mediated cleavage of the Toll-like receptor 3 adaptor protein TRIF, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 2992–2997. <https://doi.org/10.1073/pnas.0408824102>.
- [449] C.-Y. Yu, J.-J. Liang, J.-K. Li, Y.-L. Lee, B.-L. Chang, C.-I. Su, W.-J. Huang, M.M.C. Lai, Y.-L. Lin, Dengue Virus Impairs Mitochondrial Fusion by Cleaving Mitofusins., *PLoS Pathog.* 11 (2015) e1005350. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1005350>.
- [450] J. Drahos, V.R. Racaniello, Cleavage of IPS-1 in cells infected with human rhinovirus., *J. Virol.* 83 (2009) 11581–11587. <https://doi.org/10.1128/JVI.01490-09>.
- [451] C. Pythoud, W.W.S.I. Rodrigo, G. Pasqual, S. Rothenberger, L. Martínez-Sobrido, J.C. de la Torre, S. Kunz, Arenavirus nucleoprotein targets interferon regulatory factor-activating kinase IKK $\epsilon$ , *J. Virol.* 86 (2012) 7728–7738. <https://doi.org/10.1128/JVI.00187-12>.

- [452] K.C. Prins, W.B. Cárdenas, C.F. Basler, Ebola virus protein VP35 impairs the function of interferon regulatory factor-activating kinases IKKepsilon and TBK-1., *J. Virol.* 83 (2009) 3069–3077. <https://doi.org/10.1128/JVI.01875-08>.
- [453] D. Verpooten, Y. Ma, S. Hou, Z. Yan, B. He, Control of TANK-binding kinase 1-mediated signaling by the gamma(1)34.5 protein of herpes simplex virus 1., *J. Biol. Chem.* 284 (2009) 1097–1105. <https://doi.org/10.1074/jbc.M805905200>.
- [454] R. Lin, P. Genin, Y. Mamane, M. Sgarbanti, A. Battistini, W.J.J. Harrington, G.N. Barber, J. Hiscott, HHV-8 encoded vIRF-1 represses the interferon antiviral response by blocking IRF-3 recruitment of the CBP/p300 coactivators., *Oncogene.* 20 (2001) 800–811. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1204163>.
- [455] Q. Liang, B. Fu, F. Wu, X. Li, Y. Yuan, F. Zhu, ORF45 of Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus inhibits phosphorylation of interferon regulatory factor 7 by IKKε and TBK1 as an alternative substrate, *J. Virol.* 86 (2012) 10162–10172. <https://doi.org/10.1128/JVI.05224-11>.
- [456] Z. Xiang, L. Liu, X. Lei, Z. Zhou, B. He, J. Wang, 3C Protease of Enterovirus D68 Inhibits Cellular Defense Mediated by Interferon Regulatory Factor 7, *J. Virol.* 90 (2015) 1613–1621. <https://doi.org/10.1128/JVI.02395-15>.
- [457] K. Watters, A.C. Palmenberg, Differential processing of nuclear pore complex proteins by rhinovirus 2A proteases from different species and serotypes., *J. Virol.* 85 (2011) 10874–10883. <https://doi.org/10.1128/JVI.00718-11>.
- [458] J. Morrison, M. Laurent-Rolle, A.M. Maestre, R. Rajsbaum, G. Pisanelli, V. Simon, L.C.F. Mulder, A. Fernandez-Sesma, A. García-Sastre, Dengue virus co-opts UBR4 to degrade STAT2 and antagonize type I interferon signaling., *PLoS Pathog.* 9 (2013) e1003265. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003265>.
- [459] J. Ashour, M. Laurent-Rolle, P.-Y. Shi, A. García-Sastre, NS5 of Dengue Virus Mediates STAT2 Binding and Degradation, *J. Virol.* 83 (2009) 5408–5418. <https://doi.org/10.1128/JVI.02188-08>.
- [460] S.A. Kopecky-Bromberg, L. Martínez-Sobrido, M. Frieman, R.A. Baric, P. Palese, Severe acute respiratory syndrome coronavirus open reading frame (ORF) 3b, ORF 6, and nucleocapsid proteins function as interferon antagonists., *J. Virol.* 81 (2007) 548–557. <https://doi.org/10.1128/JVI.01782-06>.

- [461] L.K. White, T. Sali, D. Alvarado, E. Gatti, P. Pierre, D. Streblow, V.R. Defilippis, Chikungunya virus induces IPS-1-dependent innate immune activation and protein kinase R-independent translational shutoff., *J. Virol.* 85 (2011) 606–620. <https://doi.org/10.1128/JVI.00767-10>.
- [462] B.J. Lamphear, R. Yan, F. Yang, D. Waters, H.D. Liebig, H. Klump, E. Kuechler, T. Skern, R.E. Rhoads, Mapping the cleavage site in protein synthesis initiation factor eIF-4 gamma of the 2A proteases from human Coxsackievirus and rhinovirus., *J. Biol. Chem.* 268 (1993) 19200–19203.
- [463] von K. C, van D. JM, J.P. Rodrigues, D. Sitterlin, A. Bachi, X. Wu, M. Wilm, M. Carmo-Fonseca, E. Izaurralde, Vesicular stomatitis virus matrix protein inhibits host cell gene expression by targeting the nucleoporin Nup98., *Mol. Cell.* 6 (2000) 1243–1252. [https://doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)00120-9](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(00)00120-9).
- [464] E.J. Walker, P. Younessi, A.J. Fulcher, R. McCuaig, B.J. Thomas, P.G. Bardin, D.A. Jans, R. Ghildyal, Rhinovirus 3C protease facilitates specific nucleoporin cleavage and mislocalisation of nuclear proteins in infected host cells., *PLoS One.* 8 (2013) e71316. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0071316>.
- [465] S.G. Conticello, R.S. Harris, M.S. Neuberger, The Vif protein of HIV triggers degradation of the human antiretroviral DNA deaminase APOBEC3G, *Curr. Biol.* 13 (2003) 2009–2013. <https://doi.org/10.1016/j.cub.2003.10.034>.
- [466] S.J.D. Neil, T. Zang, P.D. Bieniasz, Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu., *Nature.* 451 (2008) 425–430. <https://doi.org/10.1038/nature06553>.
- [467] X. Guo, P. Chen, X. Hou, W. Xu, D. Wang, T. Wang, L. Zhang, G. Zheng, Z. Gao, C.-Y. He, B. Zhou, Z.-Y. Chen, The recombined cccDNA produced using minicircle technology mimicked HBV genome in structure and function closely, *Sci. Rep.* 6 (2016) 25552. <http://dx.doi.org/10.1038/srep25552>.
- [468] D. Alfaiate, P. Dény, D. Durantel, Hepatitis delta virus: From biological and medical aspects to current and investigational therapeutic options., *Antiviral Res.* 122 (2015) 112–129. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2015.08.009>.
- [469] M. Jost, D.A. Santos, R.A. Saunders, M.A. Horlbeck, J.S. Hawkins, S.M. Scaria, T.M. Norman, J.A. Hussmann, C.R. Liem, C.A. Gross, Titrating gene expression using libraries of systematically attenuated CRISPR guide RNAs, *Nat. Biotechnol.* (2020) 1–10.

- [470] D. Kostyushev, S. Brezgin, A. Kostyusheva, D. Zarifyan, I. Goptar, V. Chulanov, Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus., *Cell. Mol. Life Sci.* (2019). <https://doi.org/10.1007/s00018-019-03021-8>.
- [471] D. Kostyushev, A. Kostyusheva, S. Brezgin, D. Zarifyan, A. Utkina, I. Goptar, V. Chulanov, Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9, *Sci. Rep.* 9 (2019) 1847.
- [472] D. Cai, H. Nie, R. Yan, J.-T. Guo, T.M. Block, H. Guo, A southern blot assay for detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA from cell cultures., *Methods Mol. Biol.* 1030 (2013) 151–161. [https://doi.org/10.1007/978-1-62703-484-5\\_13](https://doi.org/10.1007/978-1-62703-484-5_13).
- [473] V. Ramanan, A. Shlomai, D.B.T. Cox, R.E. Schwartz, E. Michailidis, A. Bhatta, D.A. Scott, F. Zhang, C.M. Rice, S.N. Bhatia, CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus, *Sci. Rep.* 5 (2015) 10833. <https://doi.org/10.1038/srep10833>.
- [474] А.П. Костюшева, С.А. Брезгин, Д.Н. Зарифьян, Д.С. Чистяков, В.И. Гегечкори, Е.О. Баюрова, Е.В. Волчкова, Д.С. Костюшев, В.П. Чуланов, Вирус гепатита В и сайт-специфические нуклеазы: влияние генетических модификаций CRISPR/Cas9 на противовирусную активность, *Инфекция и Иммунология.* 9 (2019) 279–287.
- [475] S. Giunta, R. Belotserkovskaya, S.P. Jackson, DNA damage signaling in response to double-strand breaks during mitosis., *J. Cell Biol.* 190 (2010) 197–207. <https://doi.org/10.1083/jcb.200911156>.
- [476] C. Yu, Y. Liu, T. Ma, K. Liu, S. Xu, Y. Zhang, H. Liu, M. La Russa, M. Xie, S. Ding, L.S. Qi, Small molecules enhance CRISPR genome editing in pluripotent stem cells., *Cell Stem Cell.* 16 (2015) 142–147. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2015.01.003>.
- [477] J. Benn, R.J. Schneider, Hepatitis B virus HBx protein deregulates cell cycle checkpoint controls., *Proc. Natl. Acad. Sci.* 92 (1995) 11215–11219.
- [478] K. Murai, T. Kodama, H. Hikita, A. Shimoda, M. Fukuoka, K. Fukutomi, S. Shigeno, Y. Shiode, D. Motooka, Y. Higuchi, K. Miyakawa, H. Suemizu, A. Ryo, Y. Tahata, Y. Makino, R. Yamada, R. Sakamori, T. Tatsumi, T. Takehara, Inhibition of nonhomologous end joining-mediated DNA repair enhances anti-HBV CRISPR therapy., *Hepatol. Commun.* 6 (2022) 2474–2487. <https://doi.org/10.1002/hep4.2014>.
- [479] E.K. Brinkman, T. Chen, M. de Haas, H.A. Holland, W. Akhtar, B. van Steensel, Kinetics

- and Fidelity of the Repair of Cas9-Induced Double-Strand DNA Breaks, *Mol. Cell.* (2018) 1–13. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2018.04.016>.
- [480] D. Kostyushev, A. Kostyusheva, N. Ponomareva, S. Brezgin, V. Chulanov, CRISPR/Cas and Hepatitis B Therapy: Technological Advances and Practical Barriers, *Nucleic Acid Ther.* (2021).
- [481] M.G. Martinez, E. Combe, A. Inchauspe, P.E. Mangeot, E. Delberghe, F. Chapus, G. Neveu, A. Alam, K. Carter, B. Testoni, F. Zoulim, CRISPR-Cas9 Targeting of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Generates Transcriptionally Active Episomal Variants., *MBio.* 13 (2022) e0288821. <https://doi.org/10.1128/mbio.02888-21>.
- [482] D. Kostyushev, A. Kostyusheva, S. Brezgin, N. Ponomareva, N.F. Zakirova, A. Egorshina, D. V Yanvarev, E. Bayurova, A. Sudina, I. Goptar, Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9, *Mol. Ther. Acids.* 31 (2023) 482–493.
- [483] S. Brezgin, A. Kostyusheva, E. Bayurova, I. Gordeychuk, M. Isaguliants, I. Goptar, A. Nikiforova, V. Smirnov, E. Volchkova, D. Glebe, Replenishment of Hepatitis B Virus cccDNA Pool Is Restricted by Baseline Expression of Host Restriction Factors In Vitro, *Microorganisms.* 7 (2019) 533.
- [484] E. Bayurova, J. Jansons, D. Skrastina, O. Smirnova, D. Mezale, A. Kostyusheva, D. Kostyushev, S. Petkov, P. Podschwadt, V. Valuev-Elliston, HIV-1 reverse transcriptase promotes tumor growth and metastasis formation via ROS-dependent upregulation of twist, *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019 (2019).
- [485] J. Jansons, E. Bayurova, D. Skrastina, A. Kurlanda, I. Fridrihsone, D. Kostyushev, A. Kostyusheva, A. Artyuhov, E. Dashinimaev, D. Avdoshina, Expression of the Reverse Transcriptase Domain of Telomerase Reverse Transcriptase Induces Lytic Cellular Response in DNA-Immunized Mice and Limits Tumorigenic and Metastatic Potential of Murine Adenocarcinoma 4T1 Cells, *Vaccines.* 8 (2020) 318.
- [486] V. Kostyusheva, A.; Brezgin, S.; Bayurova, E.; Gordeychuk, I.; Isaguliants, M.; Goptar, I.; Urusov, F.; Nikiforova, A.; Volchkova, E.; Kostyushev, D.; Chulanov, A. Kostyusheva, S. Brezgin, E. Bayurova, I. Gordeychuk, M. Isaguliants, I. Goptar, F. Urusov, A. Nikiforova, E. Volchkova, D. Kostyushev, V. Chulanov, ATM and ATR Expression Potentiates HBV Replication and Contributes to Reactivation of HBV Infection upon DNA Damage, *Viruses.* 11 (2019) 997. <https://doi.org/10.3390/v11110997>.

- [487] A. Capovilla, S. Carmona, P. Arbuthnot, Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 232 (1997) 255–260. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1997.6269>.
- [488] Y. Yuan, K. Zhao, Y. Yao, C. Liu, Y. Chen, J. Li, Y. Wang, R. Pei, J. Chen, X. Hu, HDAC11 restricts HBV replication through epigenetic repression of cccDNA transcription, *Antiviral Res.* 172 (2019) 104619.
- [489] C.M. Murphy, Y. Xu, F. Li, K. Nio, N. Reszka-Blanco, X. Li, Y. Wu, Y. Yu, Y. Xiong, L. Su, Hepatitis B virus X protein promotes degradation of SMC5/6 to enhance HBV replication, *Cell Rep.* 16 (2016) 2846–2854.
- [490] B. Mitra, H. Guo, Hepatitis B virus X protein crosses out Smc5/6 complex to maintain cccDNA transcription, *Hepatology.* 64 (2016) 2246.
- [491] Y. Teng, Z. Xu, K. Zhao, Y. Zhong, J. Wang, L. Zhao, Z. Zheng, W. Hou, C. Zhu, X. Chen, Novel function of SART1 in HNF4 $\alpha$  transcriptional regulation contributes to its antiviral role during HBV infection, *J. Hepatol.* 75 (2021) 1072–1082.
- [492] W. Liu, Q. Yao, X. Su, Y. Deng, M. Yang, B. Peng, F. Zhao, C. Du, X. Zhang, J. Zhu, Molecular insights into Spindlin1-HBx interplay and its impact on HBV transcription from cccDNA minichromosome, *Nat. Commun.* 14 (2023) 4663.
- [493] T.-Y. Na, N.-L. Ka, H. Rhee, D. Kyeong, M.-H. Kim, J.K. Seong, Y.N. Park, M.-O. Lee, Interaction of hepatitis B virus X protein with PARP1 results in inhibition of DNA repair in hepatocellular carcinoma., *Oncogene.* 35 (2016) 5435–5445. <https://doi.org/10.1038/onc.2016.82>.
- [494] S. Batskikh, S. Morozov, E. Vinnitskaya, E. Sbikina, Z. Borunova, A. Dorofeev, Y. Sandler, K. Saliev, D. Kostyushev, S. Brezgin, May Previous Hepatitis B Virus Infection Be Involved in Etiology and Pathogenesis of Autoimmune Liver Diseases?, *Adv. Ther.* 39 (2022) 430–440.
- [495] S. Batskikh, S. Morozov, D. Kostyushev, Hepatitis B virus markers in hepatitis B surface antigen negative patients with pancreatic cancer: Two case reports, *World J. Hepatol.* 14 (2022) 1512.
- [496] S. Batskikh, S. Morozov, A. Dorofeev, Z. Borunova, D. Kostyushev, S. Brezgin, A. Kostyusheva, V. Chulanov, Previous hepatitis B viral infection—an underestimated cause of pancreatic cancer, *World J. Gastroenterol.* 28 (2022) 4812.

- [497] S. Kim, H.-S. Lee, J.-H. Ji, M.-Y. Cho, Y.-S. Yoo, Y.-Y. Park, H.-J. Cha, Y. Lee, Y. Kim, H. Cho, Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression., *J. Gen. Virol.* 96 (2015) 2242–2251.  
<https://doi.org/10.1099/vir.0.000150>.
- [498] F. Zhao, N.-B. Hou, T. Song, X. He, Z.-R. Zheng, Q.-J. Ma, L. Li, Y.-H. Zhang, H. Zhong, Cellular DNA repair cofactors affecting hepatitis B virus infection and replication., *World J. Gastroenterol.* 14 (2008) 5059–5065.
- [499] С.А. Брезгин, А.П. Костюшева, В.Н. Сими́рский, Е.В. Волчкова, Д.С. Чистяков, Д.С. Костюшев, В.П. Чуланов, Подавление цикла вируса гепатита в под действием нуклеолитических систем CRISPR/Cas9 и белка HBx, *Инфекция и Имму́нитет.* 9 (2019) 476–484.
- [500] S.A. Brezgin, A.P. Kostyusheva, V.N. Simirsky, E. V Volchkova, D.S. Chistyakov, D.S. Kostyushev, V.P. Chulanov, Suppression of hepatitis b virus by a combined activity of CRISPR/Cas9 and HBx proteins, *Russ. J. Infect. Immun.* 9 (2019) 476–484.
- [501] I.B. Hilton, A.M. D’Ippolito, C.M. Vockley, P.I. Thakore, G.E. Crawford, T.E. Reddy, C.A. Gersbach, Epigenome editing by a CRISPR-Cas9-based acetyltransferase activates genes from promoters and enhancers., *Nat. Biotechnol.* 33 (2015) 510–517.  
<https://doi.org/10.1038/nbt.3199>.
- [502] S. Brezgin, A. Kostyusheva, N. Ponomareva, V. Volia, I. Goptar, A. Nikiforova, I. Shilovskiy, V. Smirnov, D. Kostyushev, V. Chulanov, Clearing of Foreign Episomal DNA from Human Cells by CRISPRa-Mediated Activation of Cytidine Deaminases, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020) 6865.
- [503] D. Kostyushev, S. Brezgin, A. Kostyusheva, N. Ponomareva, E. Bayurova, N. Zakirova, A. Kondrashova, I. Goptar, A. Nikiforova, A. Sudina, Transient and tunable CRISPRa regulation of APOBEC/AID genes for targeting hepatitis B virus, *Mol. Ther. Acids.* 32 (2023) 478–493.