

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи

Костюшев Дмитрий Сергеевич

Принципы полной элиминации вируса гепатита В

1.5.10. Вирусология

АВТОРЕФЕРАТ

на соискание ученой степени

доктора биологических наук

Москва – 2024

Диссертация подготовлена в лаборатории генетических технологий в создании лекарственных средств Института медицинской паразитологии, тропических и трансмиссивных заболеваний им. Е.И. Марциновского Первого московского государственного медицинского университета имени И.М. Сеченова (Сеченовский Университет)

- Научный консультант** – *Чуланов Владимир Петрович, доктор медицинских наук, доцент*
- Официальные оппоненты** – *Михайлов Михаил Иванович, доктор медицинских наук, член-корреспондент РАН, ФБУН «ЦНИИ Эпидемиологии» Роспотребнадзора, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной эпидемиологии вирусных гепатитов*
- Нетёсов Сергей Викторович, доктор биологических наук, академик РАН, ФГАОУ ВО «Новосибирский национальный исследовательский государственный университет», факультет естественных наук, заведующий лабораторией биотехнологии и вирусологии*
- Морозов Сергей Юрьевич, доктор биологических наук, профессор, ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова», заведующий лабораторией генной инженерии вирусов отдела биохимии вирусов растений НИИ физико-химической биологии имени А.Н.Белозерского*

Защита диссертации состоится «06» февраля 2025 г. в 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.4 Московского государственного университета имени М.В.Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы МГУ, д. 1, стр. 12, биологический факультет, ауд. М1.

E-mail: mgu.03.01.dissovet@gmail.com

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский просп., д.27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3224>

Автореферат разослан «__» ноября 2024 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

Т.В. Комарова

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность проблемы

Вирус гепатита В (ВГВ), представитель семейства *Hepadnaviridae*, при попадании в организм человека инфицирует гепатоциты печени и вызывает острый либо хронический гепатит В (ХГВ). При ХГВ, инфекция переходит в хроническую форму, что главным образом связано с подавлением адаптивного и врожденного ветвей иммунитета и образованием стабильного «депо» вируса в ядрах инфицированных клеток в виде кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) вируса. В ходе длительной персистенции ВГВ, происходит иммуно-опосредованный 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). Распространенность ХГВ в Российской Федерации составляет ~2%, и остается на этом уровне в течение последних десятилетий эпидемиологического мониторинга. 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 подавления ВГВ-инфекции 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 и ингибиторов инфекции), поскольку прекращение приема приводит к реактивации ВГВ-инфекции. Восстановление вирусной репликации связывают с высокой стабильностью и персистентностью внутриядерной кольцевой формы генома, 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, включая CRISPR/Cas9, –

единственные, способные напрямую взаимодействовать с целевыми последовательностями ккзДНК ВГВ, расщеплять и инактивировать вирусные геномы. Работы по использованию сайт-направленных нуклеаз CRISPR/Cas для расщепления и инактивации ккзДНК ВГВ ведутся с 2013 года. Несмотря на воодушевляющие результаты по экспериментальной инактивации до 99% всех вирусных геномов, цель полной элиминации ВГВ-инфекции из клеток до сих пор остается недостижимой.

В 2000-2020-х годах было продемонстрировано, что внутриклеточные факторы семейства цитидиндезаминаз APOBEC/AID могут по различным механизмам подавлять активность и разрушать ккзДНК ВГВ. Факторы APOBEC/AID на сегодняшний день представляют собой единственный пример внутриклеточных факторов, способных к селективному взаимодействию с геномами ВГВ и их инактивации посредством гипермутирования и разрушения. APOBEC/AID способны дезаминировать нуклеотиды ДНК, вызывая образование мутаций по типу C→T и G→A с нарушением рамок считывания и/или разрушением вирусных ДНК. Однако, безопасная и эффективная активация APOBEC/AID до сих пор не реализована. Помимо этого, опубликован ряд свидетельств низкой эффективности действия APOBEC/AID непосредственно на ккзДНК. Следовательно, необходимо, с одной стороны, создание новых методов контролируемой регуляции активности APOBEC/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 вируса, механизмы репликации вирусных геномов, особенности реактивации ВГВ, и роль эпигенетических модификаций ккзДНК ВГВ в поддержании хронической инфекции и низкой эффективности противовирусных инструментов.

Цель исследования

Целью данной работы было определение ключевых компонентов жизненного цикла вируса гепатита В, имеющих значение для вирусной персистенции, репликации и реактивации инфекции, разработки на их основе принципов полной элиминации вируса гепатита В из инфицированных клеток человека.

Задачи исследования

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 уровне 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 CpG и нуклеотидного контекста, 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 APOBEC/AID. В рамках этой задачи были проведены:
 - Разработка подхода по CRISPR-активации факторов APOBEC3A, APOBEC3B, APOBEC3G и AID.

- Изучение цито- и генотоксического действия CRISPR-активации APOBEC/AID.
 - Создание подхода по контролируемой активации APOBEC/AID за счет создания аттенуированных РНК-проводников.
 - Оценка влияния контролируемой активации APOBEC/AID на дезаминирование генома клеток человека в областях онкогенов.
- 9) Изучить влияние APOBEC/AID на различные этапы жизненного цикла ВГВ. В рамках этой задачи были проведены:
- Изучение влияния CRISPR-активации APOBEC/AID на уровни вирусных РНК, ДНК, вирусных белков и ВГВ-позитивных клеток.
 - Оценка дезаминирования ккзДНК ВГВ факторами APOBEC/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 APOBEC/AID.

Научная новизна, теоретическая и практическая значимость работы

Впервые исследованы исходы нуклеолитических разрывов в ккзДНК ВГВ при использовании CRISPR/Cas9 систем в норме и в условиях модуляции активности основных компонентов пути гомологичной репарации (фактор RAD51) и пути негомологичного соединения концов ДНК (фактор DNA-PKcs). Продемонстрировано, что подавление активности DNA-PKcs, основного фактора в пути негомологичного соединения концов ДНК, с помощью низкомолекулярного ингибитора NU7026 изменяет исходы репарации двуцепочечных разрывов, 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 репарации ДНК с образованием разнородных делеций в сайте нуклеолитического расщепления.

Предложен метод оценки эффективности CRISPR/Cas9 в отношении генома вируса гепатита В с использованием соединения NU7026. Обработка клеток, инфицированных ВГВ, раствором соединения NU7026 позволяет объективно оценивать нуклеолитическую и противовирусную активность сайт-направленных нуклеаз.

Впервые продемонстрирована ключевая роль кольцевой частично двуцепочечной ДНК ВГВ (кчДНК) в поддержании персистенции вируса и реактивации инфекции за счет ре-импорта в ядро и формирования ккзДНК de novo при полной элиминации пула ккзДНК. За счет создания рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 удалось добиться удаления >99% всех матриц ккзДНК из инфицированных клеток при их однократном использовании. При этом было выявлено восстановление вирусной репликации и пула ккзДНК de novo из оставшихся матриц кчДНК 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 кчДНК ВГВ в инфицированных клетках и устраняет возможность восстановления вирусной репликации после разрушения ккзДНК ВГВ системами 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.

Впервые показано, что метилирование ккзДНК ВГВ нарушает нуклеолитическое и противовирусное действие CRISPR/Cas9 систем. При этом значительную роль играет расположение сайта нуклеолитического расщепления, а также принадлежность целевого сайта к островкам CpG. Выявлено, что эффект ДНК-метилирования зависит 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. 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.

Впервые обнаружена возможность запуска репликации ВГВ из транскрипционно-инактивированного, гиперметилированного состояния ккзДНК за счет активности белка вируса НВх и 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 АРОВЕС3А и АРОВЕС3В ограничивают пополнение пула ккзДНК на уровне базальной экспрессии. Нокдаун АРОВЕС3А/3В увеличивает внутриклеточный пул ккзДНК ВГВ в ~2-3 раза.

Разработан подход по кратковременной активации экспрессии цитидин-дезаминаз семейства АРОВЕС/AID и проведен всесторонний анализ эффектов АРОВЕС/AID на параметры вирусной репликации, мутаций вирусных геномов, цито- и генотоксических эффектов. Впервые предложен способ регуляции уровней активации АРОВЕС/AID с помощью аттенуированных РНК-проводников, которые позволяют титровать уровни активации целевых генов с сохранением противовирусных и устранением токсических свойств. Разработанный подход демонстрирует высокую эффективность и имеет широкие перспективы для оперативного создания противовирусных подходов для лечения острых и хронических вирусных инфекций.

Впервые показано, что мутагенные свойства факторов АРОВЕС/AID находятся в обратной зависимости от вирусной нагрузки в инфицированных клетках. В условиях низкой репликации ВГВ АРОВЕС/AID индуцируют дезаминирование генома человека, в то время как при высокой вирусной внутриклеточной нагрузке ВГВ дезаминирования генома не происходит.

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.

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. Опубликовано глава в международной монографии.

Степень достоверности результатов

В работе использовали современные методики измерений и приборы, а также применялись адекватные методы статистического анализа. Использовались реактивы от ведущих российских и международных компаний. Последовательности генов и фрагментов ДНК проверялись секвенированием и соотносились с заданными. Выполнение работ по диссертационному исследованию было поддержано Министерством науки и высшего образования Российской Федерации по грантовому соглашению № 075-15-2024-640 (Сеченовский университет).

Апробация результатов

Основные результаты работы были доложены автором лично на международных, региональных и всероссийских конференциях и симпозиумах, включая HBV international meeting (2015, Бад Найхайм, Германия), HBV international meeting (2016, Сеул, Южная Корея), HBV international meeting (2017, Вашингтон, D.C., США), Global hepatitis summit (2018, Торонто, Канада), Global hepatitis summit (2023, Париж, Франция), Cold Spring Harbor Laboratory Genome Engineering: CRISPR Frontiers (2020, CSHL, США), International CRISPR and Gene Editing Symposium (2020, удаленное участие), HEP DART 2017 (2017, Кона, Гавайи, США), 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, удаленное участие), TechVac 2020 (2020, удаленное участие), 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, Манила, Филиппины), Молодёжный междисциплинарный телемост “Наука настоящего для медицины будущего” (2020, Москва, Россия), Геномное редактирование в медицинской генетике 2021 (Москва, Россия), NanoResCon2023 (2023, Рим, Италия), Саммит разработчиков лекарственных препаратов «Сириус. Биотех» (2023, Сочи, Россия).

Публикации

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

Структура и объем работы

Диссертация состоит из следующих глав: «Введение», «Обзор литературы», «Материалы и методы исследования», «Результаты и обсуждение», «Выводы», «Благодарности», «Список сокращений», «Список цитируемой литературы» (503 наименования). Работу иллюстрируют 118 рисунков и 4 таблицы. Общий объем диссертации 289 страниц.

СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

I. Разрушение основной формы генома вируса гепатита В при действии сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9

Ранее было показано, что сайт-специфические нуклеазы CRISPR/Cas могут использоваться для расщепления вирусных геномов по целевым локусам. В первых работах 2013-2014 гг. была подтверждена возможность расщепления ДНК ВГВ и снижения уровней всех форм генома ВГВ вскоре после трансфекции систем CRISPR/Cas9. Несмотря на высочайшую эффективность действия, недостатком CRISPR/Cas9 являлись остаточные матрицы ккзДНК ВГВ и сохранение репликативно-активных интермедиатов вируса, что

может приводить к реактивации инфекции после прекращения действия CRISPR/Cas9. 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.

1. Разработка подходов по расщеплению генома вируса гепатита В генетически модифицированными вариантами CRISPR/Cas9 нуклеаз

Был проведен дизайн, синтез и испытания 24 генетически модифицированных 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 при внесении генетических модификаций (Рисунок 1). Однако, модификации РНК-проводников в случае с низкоактивными РНК-проводниками слабо усиливали противовирусное действие CRISPR/Cas9, тогда как с высокоактивными – существенно снижали ее.

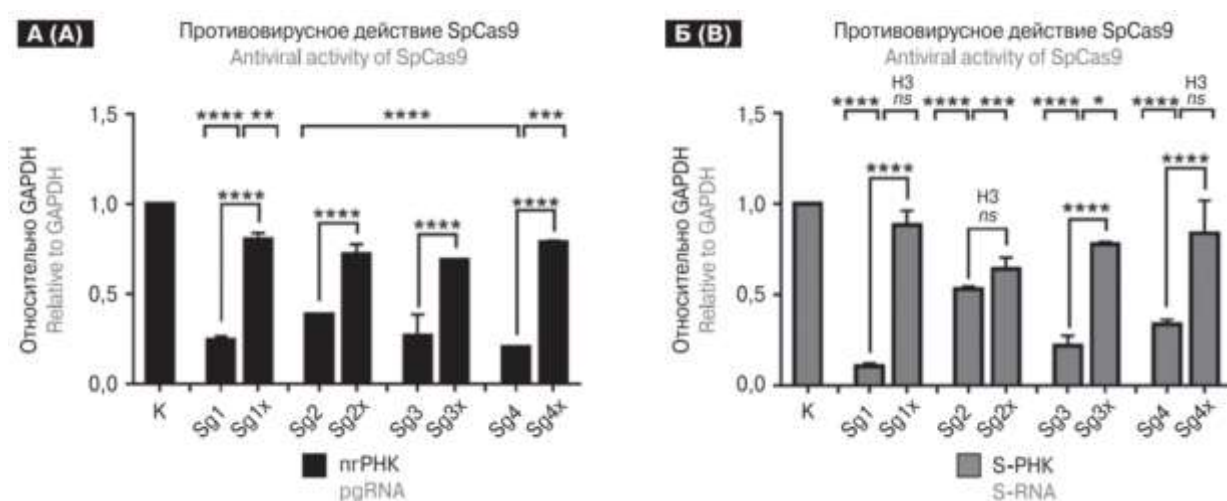


Рисунок 1. Эффекты генетических модификаций РНК-проводников CRISPR/Cas9 на транскрипцию ВГВ. (А) Уровни npРНК (Б) и S-РНК после действия SpCas9 с модифицированными либо немодифицированными РНК-проводниками. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, H3 — незначимые отличия [448].

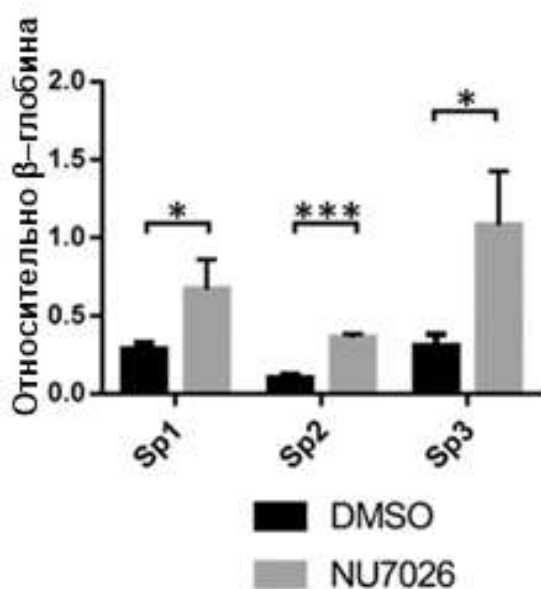
Исходя из полученных результатов, сделан вывод о достаточности действия исходно активных РНК-проводников и слабом либо негативном влиянии использованных генетических модификаций на противовирусное действие систем CRISPR/Cas9.

2. Переключение между путями NHEJ и MMEJ определяет судьбу кольцевой ковалентно замкнутой ДНК вируса гепатита В после расщепления системами CRISPR/Cas9

Удаление ккзДНК из инфицированных клеток считается важным шагом на пути к элиминации инфекции ВГВ. Seeger и Sohn инфицировали ВГВ клеточную линию, продуцирующую CRISPR/Cas9, и наблюдали редактирование 91% ккзДНК ВГВ. 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 также, что значительная часть вирусных геномов разрушается после нуклеолитического расщепления.

В 2019 году мы впервые продемонстрировали, что ккзДНК ВГВ действительно разрушается с помощью Cas9, и что использование низкомолекулярных ингибиторов пути NHEJ (NU7026) предотвращает деградацию ккзДНК ВГВ. При использовании CRISPR/Cas9 с NU7026 происходило увеличение противовирусного действия по всем параметрам, за исключением уровней ккзДНК, которые не изменялись либо снижались менее значимо, чем в контроле без NU7026 (Рисунок 2).

ккзДНК



*Рисунок 2. Влияние NU7026 на уровни ккзДНК ВГВ при расщеплении CRISPR/Cas9. Уровни ккзДНК измеряли относительно уровней β-глобина. * $p < 0,05$, *** $p < 0,001$.*

Секвенирование областей-мишеней расщепления CRISPR/Cas9 в ккзДНК с целью анализа изменений исходов репарации двуцепочечных разрывов ДНК (ДЦР) продемонстрировало редкие делеции без использования NU7026, что не объясняет резкого подавления репликации вируса (Рисунок 3). Обработка NU7026 приводила к формированию многочисленных и разнородных делеций нуклеотидов с типичным

паттерном распределения вокруг предпочтительного сайта расщепления в нуклеотидах 3-6 перед PAM (Рисунок 3).

По сравнению с контрольными группами с ДМСО, NU7026 усиливал образование делеций при трансфекции CRISPR/Cas9 с частотой делеций до 180–200 на 1000 прочтений. NU7026 не приводил к такому количеству вставок, как делеций.

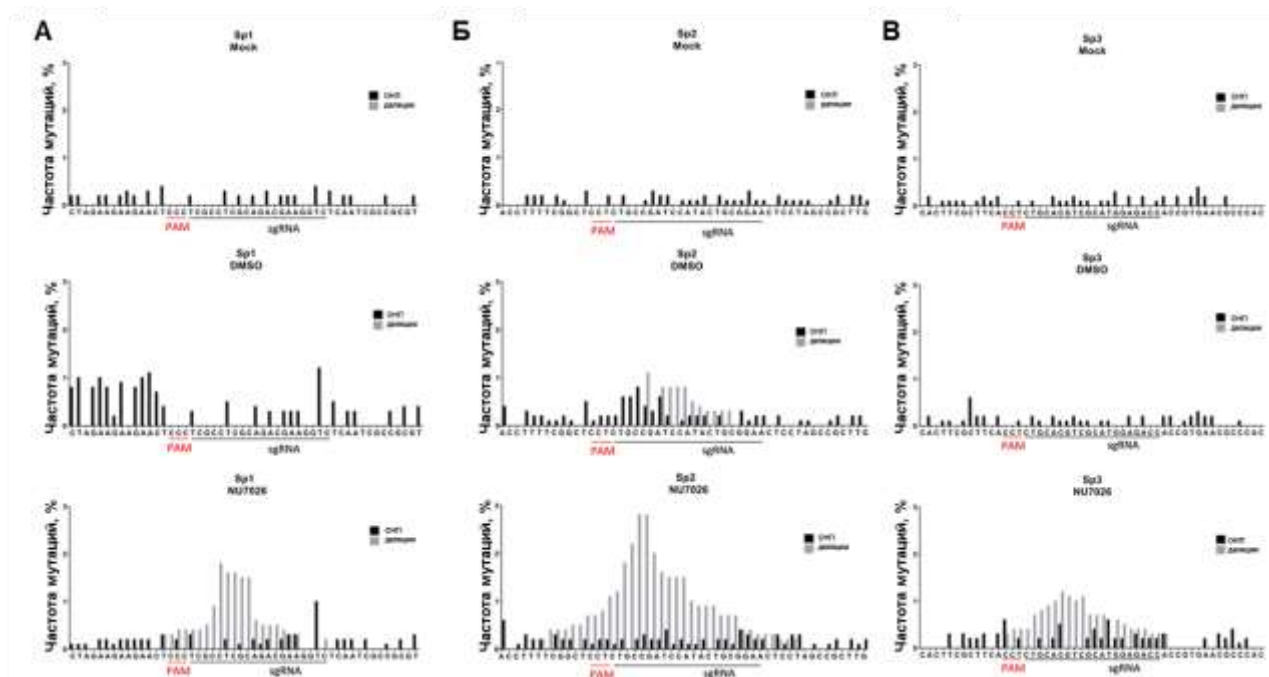


Рисунок 3. Глубокое секвенирование целевых сайтов расщепления CRISPR/Cas9. (А–В) Частота мутаций и профили результатов репарации двуцепочечных разрывов в областях-мишенях ккзДНК ВГВ. Секвенировали участки, содержащие сайты-мишени, и рассчитывали частоты вставок/делеций для РНК-проводников Sp1, Sp2 и Sp3 в клетках, обработанных NU7026 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.

Был сделан вывод, что ккзДНК ВГВ преимущественно разрушается с помощью CRISPR/Cas9, а ингибирование NHEJ может предотвратить деградацию ккзДНК при действии сайт-направленных нуклеаз.

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

При анализе уровней ккзДНК ВГВ в этих образцах и секвенировали целевых регионов, были обнаружены частые делеции в сайтах-мишенях (Рисунок 4). Исходя из этого следует, что ккзДНК ВГВ, расщепленная Cas9 белком, более эффективно восстанавливается при ингибировании NHEJ.

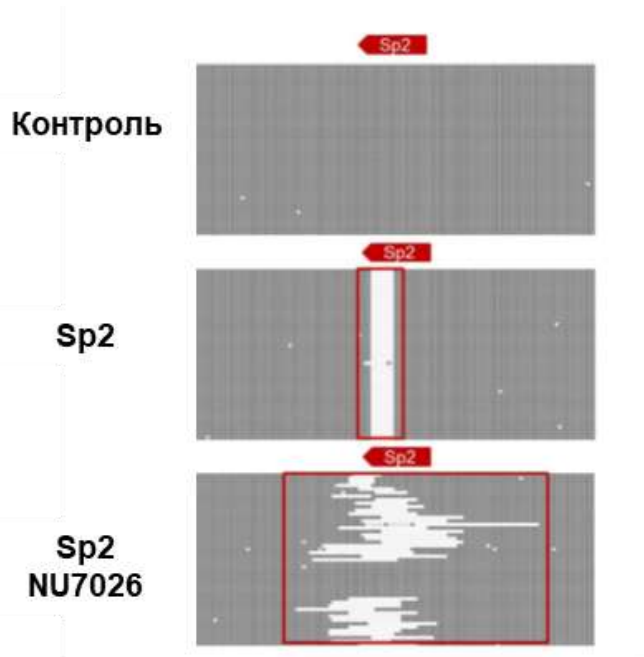


Рисунок 4. Пример результатов глубокого секвенирования участков распознавания CRISPR/Cas9 [444]. Mock – контрольный образец.

Анализ целевых мутаций показал, что ингибирование NHEJ сдвигает тип делеций с преимущественно 2-нуклеотидных (>90%) на редкие более крупные делеции от 3–70 нуклеотидов до целого спектра делеций, начиная от часто встречающихся 1–46 нуклеотидных и заканчивая менее распространенными, более крупными делециями (Рисунок 5). Был сделан вывод, что ккзДНК ВГВ преимущественно разрушается с помощью CRISPR/Cas9, а ингибирование NHEJ может предотвратить деградацию ккзДНК.

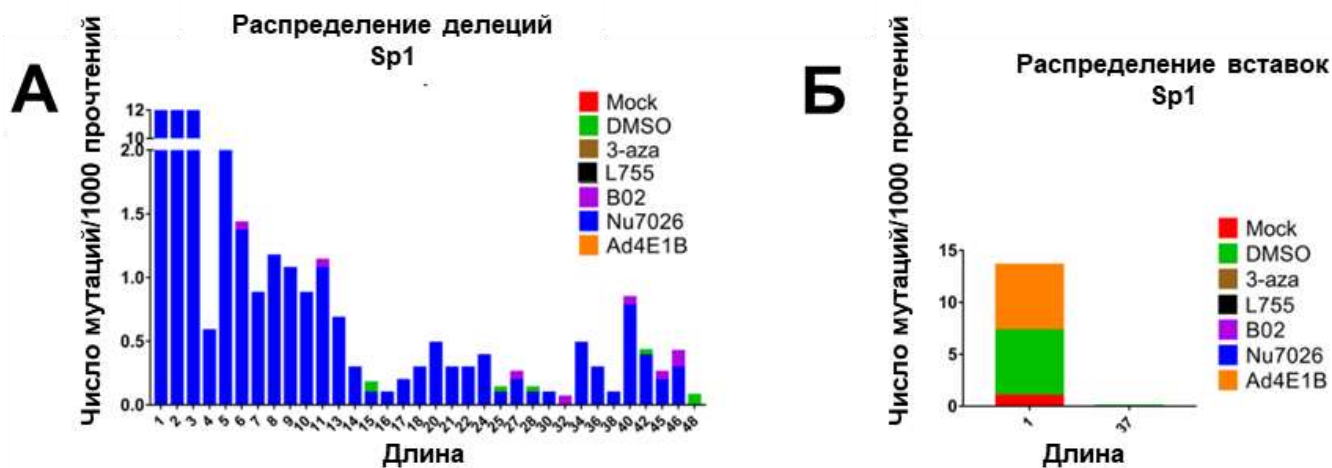


Рисунок 5. Распределение вставок и делеций нуклеотидов в геноме ВГВ при расщеплении CRISPR/Cas9. Анализ делеций (А) и вставок (Б) нуклеотидов при действии системы CRISPR/Cas9 совместно с низкомолекулярными соединениями.

II. Ре-импорт кольцевой частично-двуцепочечной ДНК вируса гепатита В обеспечивает персистенцию вируса и хронизацию инфекции

1. Короткоживущие рибонуклеопротеиновые комплексы (РНП) удаляют кольцевую ковалентно замкнутую ДНК вируса гепатита В при однократном использовании

РНП CRISPR/Cas9 редактируют ДНК-мишень вскоре после внутриклеточной доставки, причем уже через 24 часа РНП разрушаются эндогенными нуклеазами и протеазами и не детектируются в клетках (Рисунок 6А).

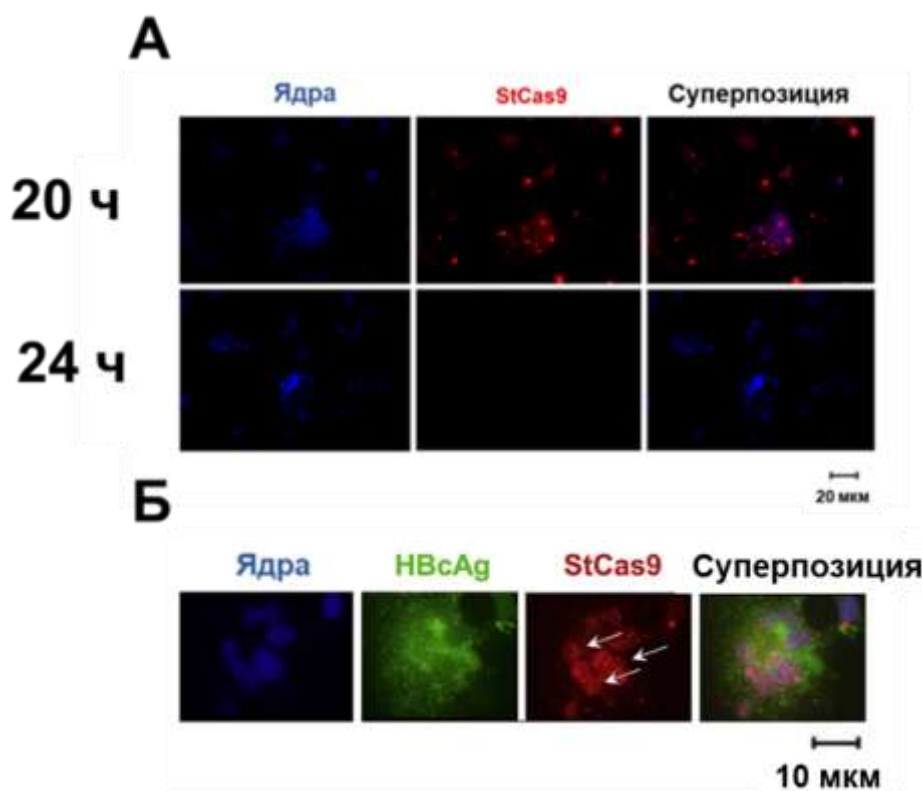


Рисунок 6. Разрушение белка StCas9 через 24 часа после трансфекции в клетки HepG2. (А) Иммуноцитохимический анализ StCas9 через 20 и 24 часа после трансфекции. (Б) Внутриядерная локализация белка StCas9.

Ограниченное время жизни и взрывообразная кинетика РНП приводят к крайне высокой эффективности действия. При трансфекции в клетки HepG2 гсссDNA ВГВ RNP приводили к снижению вирусной транскрипции ВГВ и репликации. Успешная внутриядерная доставка StCas9 была подтверждена иммуноцитохимическим методом через 20 ч после трансфекции (Рисунок 6Б). Однократное использование РНП CRISPR/Cas9 вызывали падение уровней ккзДНК более чем на 98%, полное исчезновение вирусных транскриптов и снижение экспрессии вирусных белков (HBsAg и HBcAg) более, чем на 90-95% (Рисунок 7).

Активность РНП CRISPR/Cas9 далее оценивали *in vivo* на модели гидродинамической инъекции плазмиды, кодирующей геном ВГВ, мышам BALB/c. Параметры вирусной репликации анализировали на 48 час после начала эксперимента по измерению уровней ДНК ВГВ в сыворотке крови и в ткани печени.

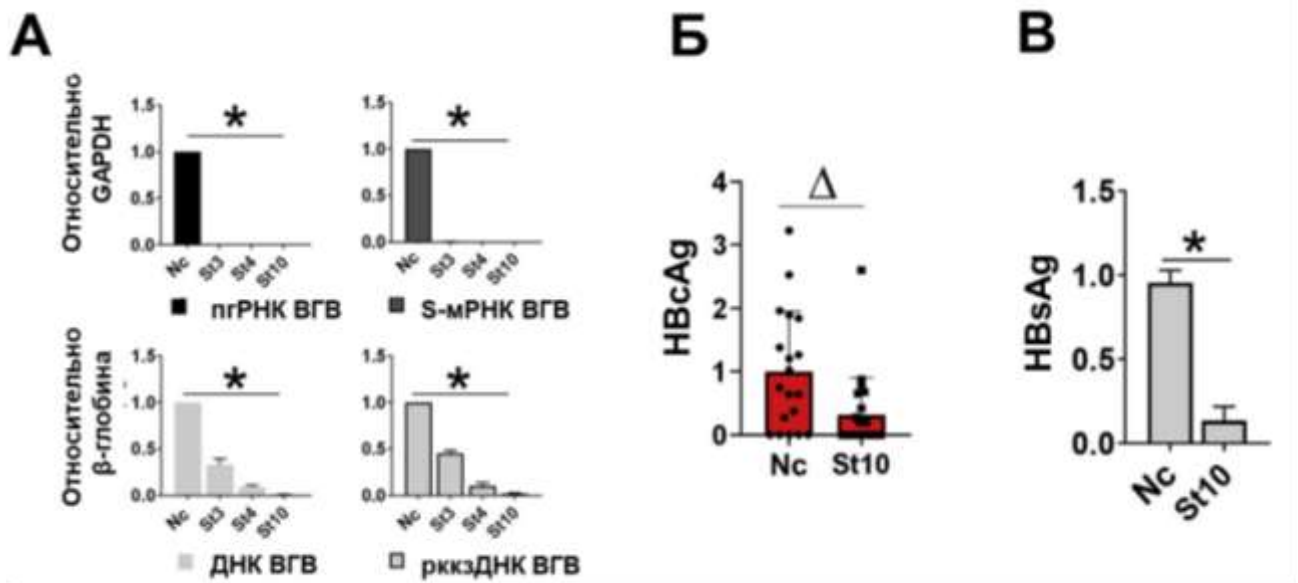


Рисунок 7. Действие РНП CRISPR/Cas9 на ВГВ. (А) Уровни pgРНК и S-мРНК ВГВ, ДНК ВГВ и рккзДНК. (Б) Анализ экспрессии HBsAg и (В) HBsAg-позитивных клеток $p < 0,05$, $\Delta p < 0,01$, $\#p < 0,001$, $*p < 0,0001$; нс, нет статистической значимости.

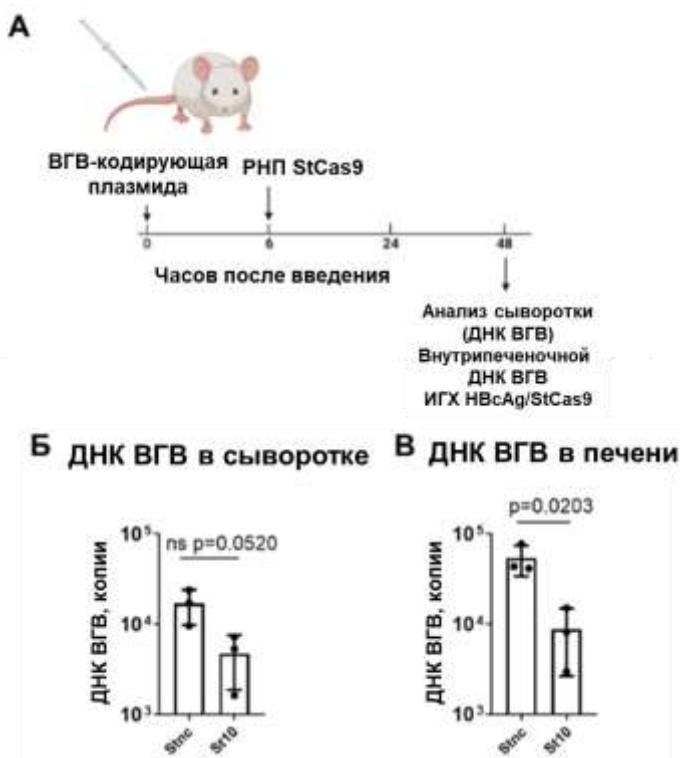


Рисунок 8. Активность РНП CRISPR/Cas9 *in vivo*. (А) Схема эксперимента. Изменение уровней ДНК ВГВ в (Б) сыворотке крови и (В) печени мышей (48 час после инъекции). Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ns – статистически не значимые отличия.

Кроме того, проводили иммуногистологическое окрашивание печени на маркер вирусной инфекции, HBsAg. Однократное введение РНП CRISPR/Cas9 в 10 раз снижало вирусную нагрузку по ДНК ВГВ в сыворотке крови и ткани печени.

2. Восстановление вирусной репликации после действия CRISPR/Cas9

Чтобы оценить влияние однократного введения RNP CRISPR/Cas9 на репликацию ВГВ, проводили анализ уровней всех вирусных интермедиатов в течение 14 суток после однократного введения комплексов в клетки с ВГВ репликацией.

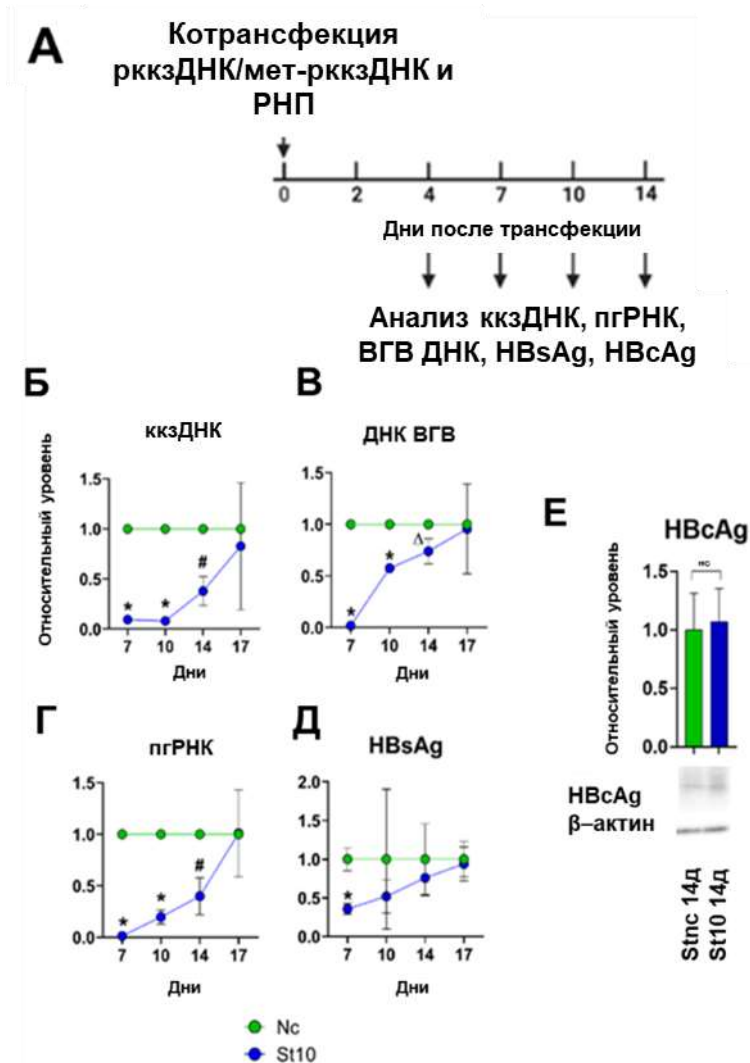


Рисунок 9. Восстановление репликации ВГВ после действия CRISPR/Cas9 РНП. (А) Схема эксперимента. Изменения в уровнях (Б) ккзДНК ВГВ, (В) внутриклеточной ДНК ВГВ, (Г) пгРНК (Д) HBsAg и (Е) HBcAg. $\circ p < 0,05$, $\Delta p < 0,01$, $\#p < 0,001$, $*p < 0,0001$; нс, нет статистически значимых отличий.

К четвертому дню после трансфекции все протестированные параметры ВГВ все еще были значительно ($> 90\%$) снижены; однако уровни ккзДНК, внутриклеточной ДНК ВГВ, пгРНК, HBsAg и HBcAg постепенно вернулись к исходным значениям к 14 суткам эксперимента (Рисунок 9). Это указывает на то, что репликация ВГВ восстанавливается после почти полной эрадикации ккзДНК ВГВ. Реактивация ВГВ может быть связана либо с активностью оставшихся матриц ккзДНК, не разрушенных CRISPR/Cas9, либо с их формированием de novo из формы-предшественника, кольцевой частично двуцепочечной ДНК (кчдДНК).

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

Для изучения роли кчдДНК в реактивации ВГВ, клетки HepG2 предварительно обрабатывали ламивудином (LAM), ингибитором обратной транскриптазы ВГВ, за 1 день до трансфекции и сохраняли его в культуральной среде в течение следующих 6 дней; вслед за этим LAM отбирали и проводили оценку вирусной репликации (Рисунок 10А). LAM предотвращает образование кчдДНК. При его использовании кчдДНК практически отсутствует в клетках, так что кчдДНК не может образоваться из кчдДНК de novo. В результате, при использовании LAM совместно с CRISPR/Cas9 все параметры ВГВ оставались практически на тех же, остаточных уровнях, и реактивации ВГВ не происходило (Рисунок 10Б-Е).

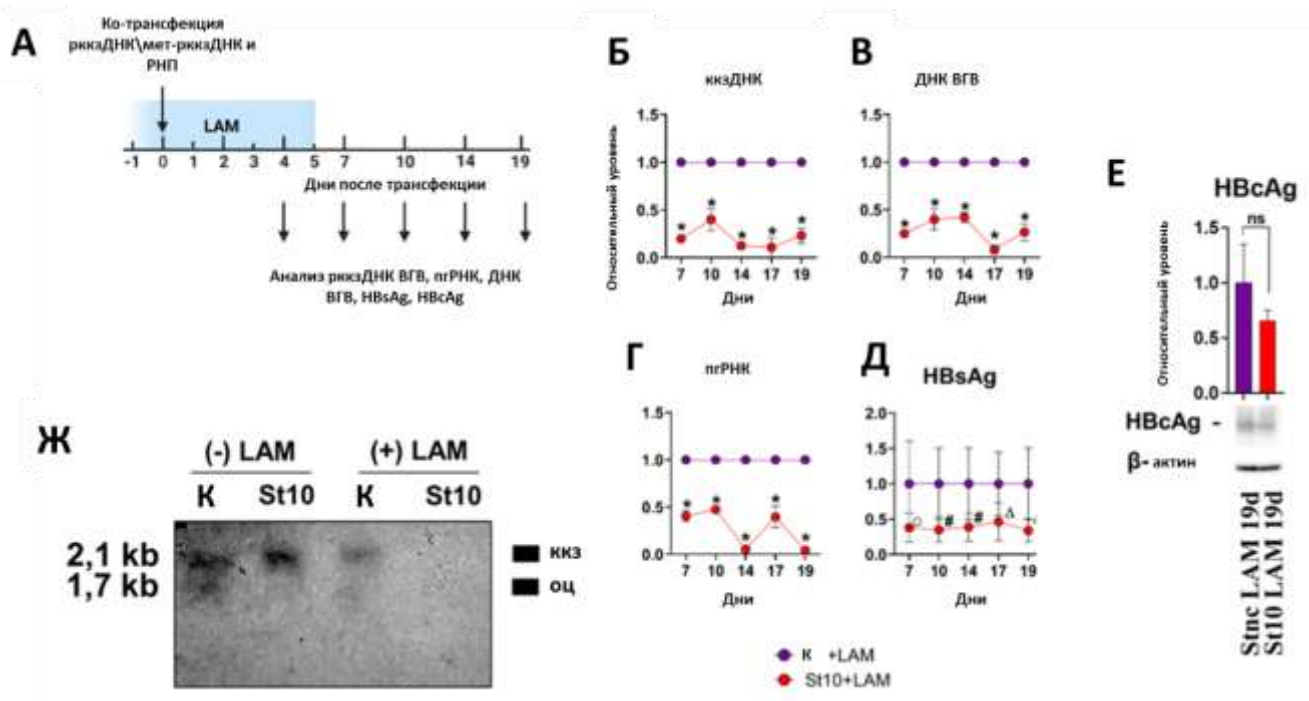


Рисунок 10. Восстановление репликации ВГВ после трансфекции CRISPR–Cas9 РНП и способы его предотвращения. (А) Дизайн эксперимента (Б – Е) Изменения в уровнях (Б) кчдДНК ВГВ, (В) внутриклеточной ДНК ВГВ, (Г) pgRNA, (Д) HBsAg и (Е) уровнях HBcAg (Ж) Саузерн–блот анализ уровней кчдДНК. $\circ p < 0,05$, $\Delta p < 0,01$, $\# p < 0,001$, $* p < 0,0001$; нс, нет значимых отличий [455].

Саузерн-блоттинг подтвердил восстановление репликации ВГВ после трансфекции РНП, а также выявил исчезновение кчдДНК при совместном действии CRISPR/Cas9 с LAM (Рисунок 10Ж).

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

Для изучения выявленного эффекта реактивации ВГВ-инфекции и восстановления ккзДНК ВГВ на наиболее релевантной модели, были использованы клетки HepG2-hNTCP, которую заражали вирионами ВГВ, и проводили обработку LAM и CRISPR/Cas9, как показано на Рисунке 11А. На модели инфекции все проанализированные интермедиаты ВГВ были значительно снижены (~95% для внутриклеточной ДНК ВГВ, ~86% для ккзДНК ВГВ и ~60% для секретируемого HBsAg) при трансфекции CRISPR/Cas9 РНП с предварительной обработкой LAM (группа St10 + LAM) к 17 дню после нуклеофекции, тогда как в контрольной группе (Nc) репликация ВГВ усиливалась (Рисунок 11 Б, В). 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.

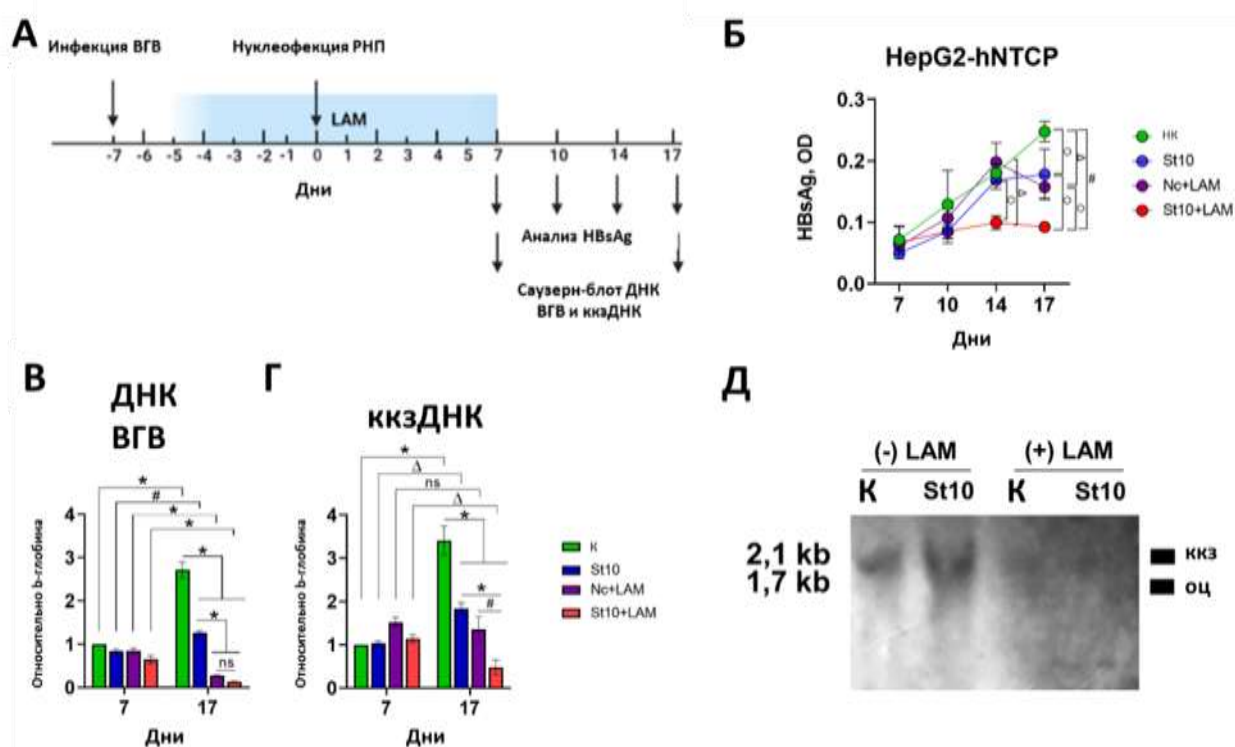


Рисунок 11. Эффекты CRISPR/Cas9 РНП и LAM на модели инфекции HepG2-NTCP. (А) Дизайн эксперимента (Б–Г) Противовирусная активность РНП CRISPR/Cas9: измерение уровней (Б) HBsAg, (В) ДНК ВГВ и (Г) ккзДНК. (Д) Саузерн-блот-анализ в конечной точке. $p < 0,05$, $\Delta p < 0,01$, $\#p < 0,001$, $*p < 0,0001$; нс, нет статистически значимых отличий [455].

К 7 суткам эксперимента, после действия РНП CRISPR/Cas9 (St10) без LAM вновь происходил рост параметров вирусной инфекции. Предварительная обработка инфицированных ВГВ клеток LAM (Nc + LAM) заметно снижала внутриклеточную ДНК ВГВ и, менее выражено, уровни секретируемого HBsAg (Рисунок 11 В-Г).

образование ккзДНК ВГВ de novo было заблокировано LAM, о чем свидетельствуют данные измерений вирусных интермедиатов (Рисунок 11Б-Г) и Саузерн-блот анализ ккзДНК на 17-й день после нуклеофекции (Рисунок 11Д). Это доказывает, что этап конверсии кчдДНК в ккзДНК является основным механизмом, поддерживающий образование ккзДНК de novo в клетках HepG2-hNTCP.

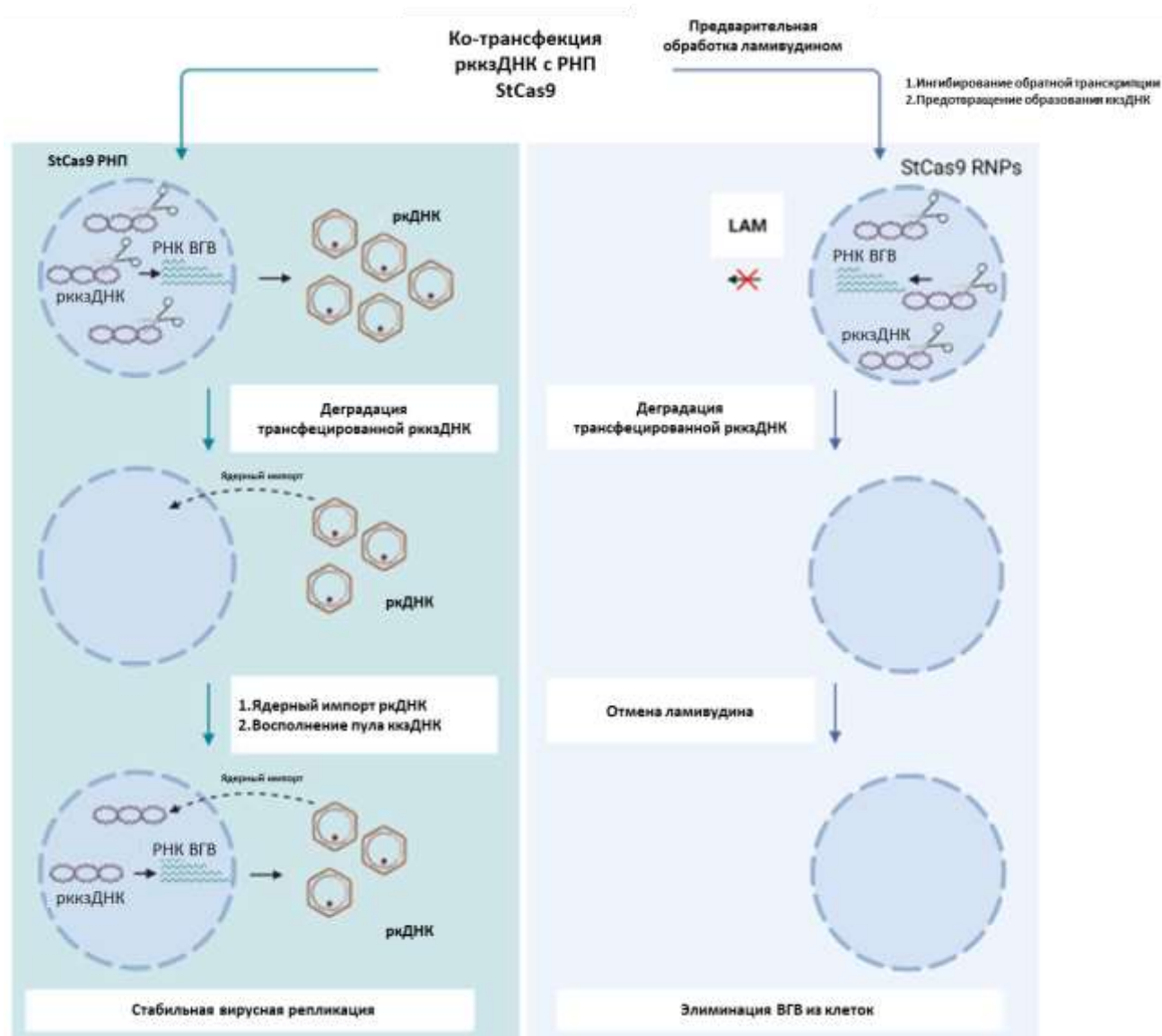


Рисунок 12. Предобработка ламивудином для элиминации ВГВ из клеток с помощью CRISPR/Cas9 [455].

В заключение, данные инфекционной модели подтверждают наш главный вывод о том, что конверсия кчдДНК ВГВ \rightarrow ккзДНК является основным механизмом, поддерживающим персистенцию ВГВ после разрушения ккзДНК ВГВ системами CRISPR/Cas9. Предложенная нами стратегия (Рисунок 12) блокирует амплификацию ВГВ и приводит к разрешению ВГВ-инфекции.

III. Влияние метилирования ккзДНК ВГВ и НВх белка на нуклеолитическое действие CRISPR/Cas9 и реактивацию вирусной инфекции

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 ДМНТ. DNMT, а именно метилтрансфераза de novo DNMT3A, служат врожденными факторами, которые эпигенетически подавляют ккзДНК ВГВ и ограничивают транскрипцию и репликацию вируса. Действительно, при гиперпродукции DNMT3A происходит значительное подавление транскрипции и репликации ВГВ (Рисунок 13А, Б), однако уровни ккзДНК ВГВ парадоксально увеличивались (Рисунок 13Б).

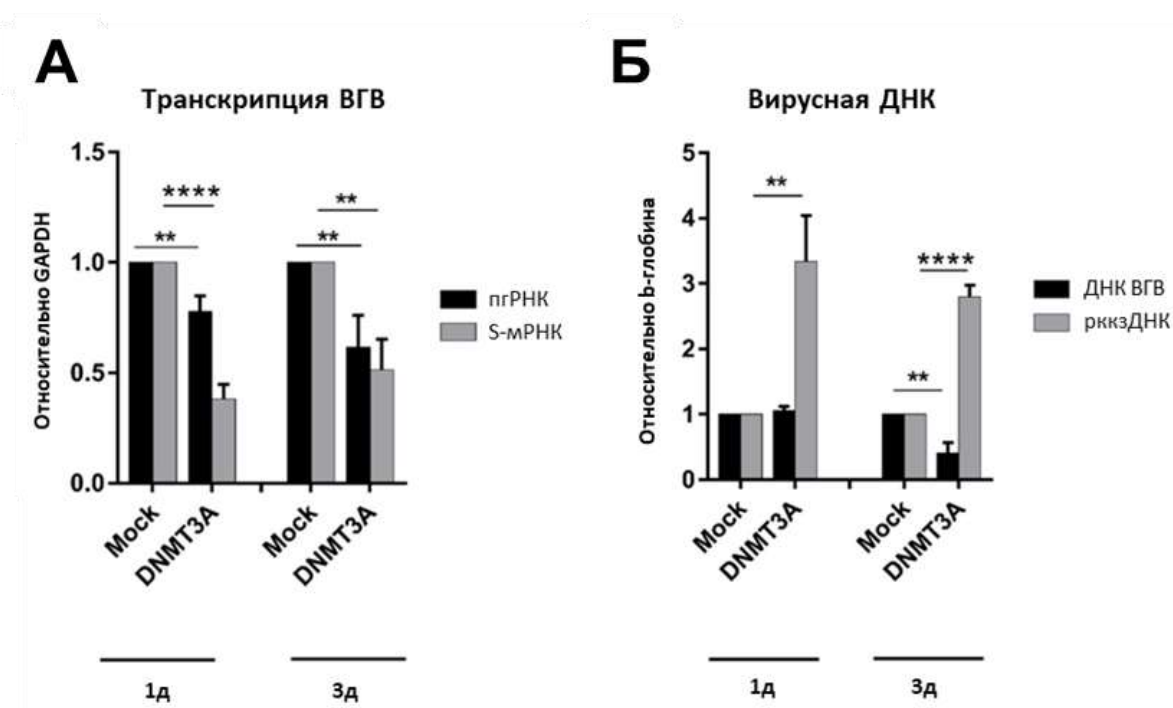


Рисунок 13. Влияние DNMT3A на цикл репликации ВГВ. (А) Подавление транскрипции ВГВ при гиперэкспрессии DNMT3A в клетках astHerG2-1.1 (пгРНК: черные столбцы; S-мРНК: серые столбцы). (Б) Снижение общей внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) и увеличение внутриклеточной ккзДНК ВГВ (серые столбцы) при гиперэкспрессии DNMT3A. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Далее было изучено, действительно ли наблюдаемое увеличение уровней ккзДНК ВГВ связано с повышенной экспрессией DNMT3A. С этой целью проводили гиперпродукцию DNMT3A с обработкой клеток 5-азациитидином (aza), мощным ингибитором ДМНТ. Обработка aza восстанавливала экспрессию репликацию ВГВ до исходных значений и предотвращала рост уровней ккзДНК при гиперпродукции ДМНТ

(Рисунок 14). Следовательно, увеличение образования ккзДНК, действительно, вызвано ДНМТ.

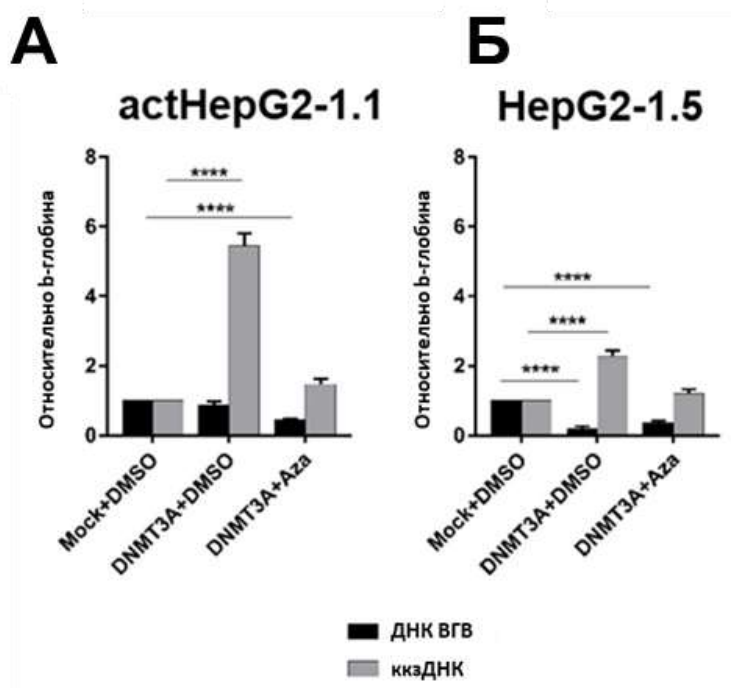


Рисунок 14. Влияние 5-азацитидина (aza) на репликацию ВГВ при гиперэкспрессии ДНМТ3А. Изменения общей внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) и ккзДНК (серые столбцы) в клетках (А) actHepG2-1.1 и (Б) HepG2-1.5 клетки. Звездочками отмечены статистически значимые различия. **** $p < 0,0001$.

Поскольку ккзДНК не реплицируется самостоятельно, пул ккзДНК разбавляется при быстром делении клеток, либо возрастает, когда клетки остаются в состоянии покоя. Таким образом, мы предположили, что избыточная экспрессия ДНМТ3А может влиять на клеточный цикл, что может усиливать конверсию ккдДНК в ккзДНК во время фазы G0/G1.

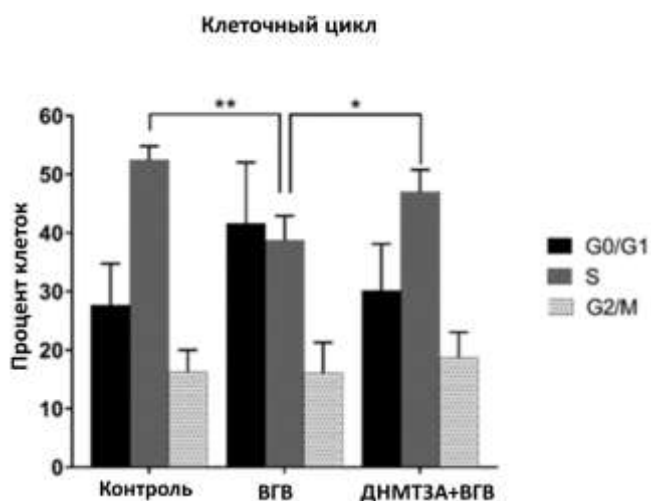


Рисунок 15. Анализ клеточного цикла при гиперэкспрессии ДНМТ3А. На графике представлен процент клеток HepG2-1.1 в разных фазах клеточного цикла: G0/G1 (черные столбцы), S (серые столбцы) и G2/M (пунктирные столбцы). Звездочками отмечены статистически значимые различия. * $p < 0,05$, **

Действительно, как было показано ранее, репликация ВГВ (ВГВ) приводила к остановке клеток в фазе G0/G1 и уменьшала долю клеток в S-фазе по сравнению с контролем ($p < 0,01$) (Рисунок 15). Однако трансфекция ДНМТ3А стимулировала

прохождение клеточного цикла, о чем свидетельствует значимое увеличение доли клеток в S-фазе вместе со снижением количества клеток G1/G0 (не значимо; $p = 0,140$) (Рисунок 15). В целом, ДНМТ3А, по-видимому, стимулирует клеточный цикл в ВГВ-продуцирующих клетках, что приводит к уменьшению количества клеток в фазе G0/G1 и увеличению числа клеток в фазе S. Однако, влияние ДНМТ3А на клеточный цикл не объясняет увеличение пула ккзДНК.

2. ДНК-метилирование нарушает расщепление генома вируса гепатита В нуклеазой StCas9 in vitro

Три канонических и несколько неканонических CpG-островков и не-CpG-сайтов в геноме ВГВ подвергаются метилированию ДНК. Различные генотипы ВГВ содержат различные CpG-островки и неодинаково метилированы. Степень метилирования ккзДНК ВГВ коррелирует с прогрессированием ХГВ. Чтобы выяснить влияние метилирования рккзДНК ВГВ на активность РНП, была создана модель гиперметилированной рккзДНК (мет-рккзДНК). In vitro анализ расщепления показал, что метилирование рккзДНК полностью блокирует либо значительно снижает расщепление системами CRISPR/Cas9 (~86% расщепления в рккзДНК по сравнению с ~% мет-рккзДНК).

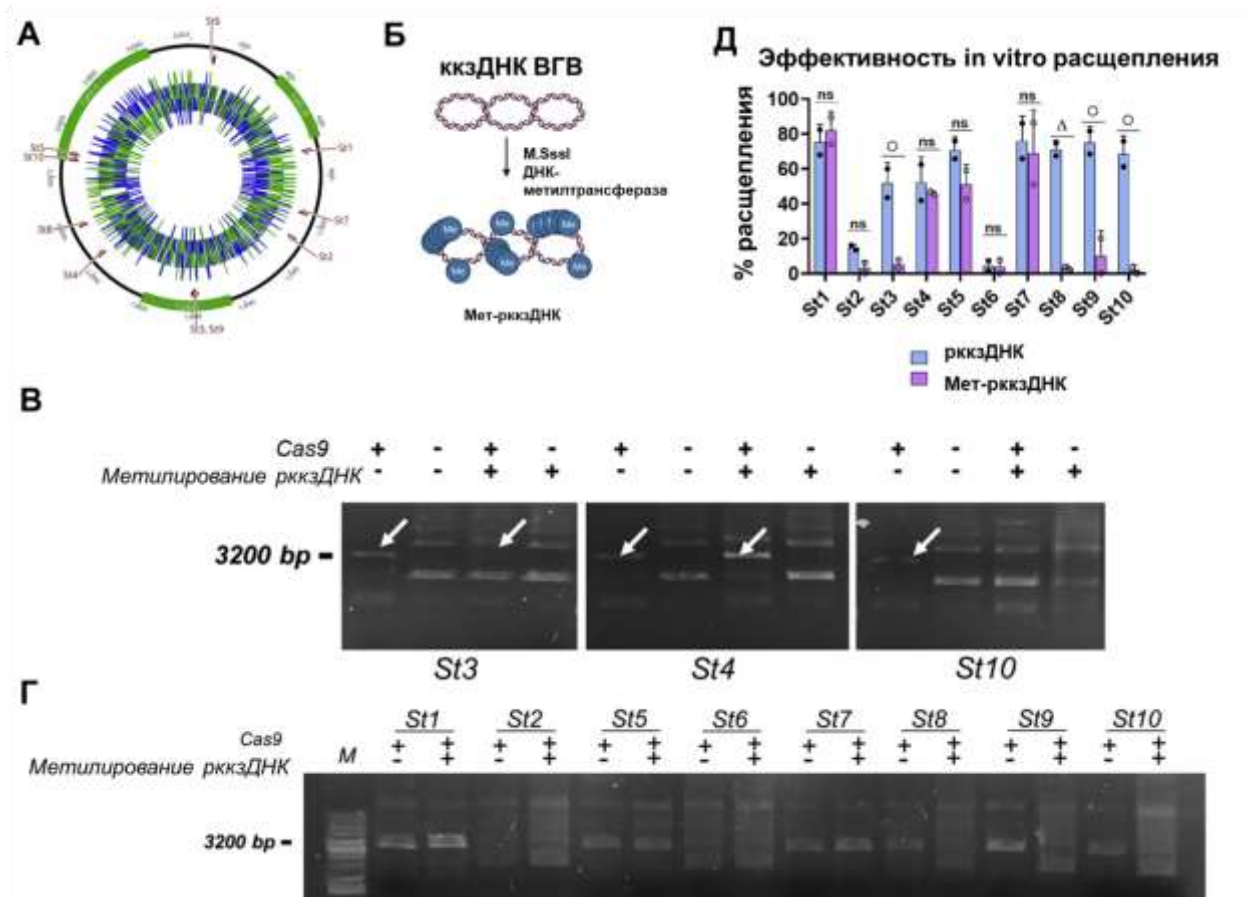


Рисунок 16. Влияние метилирования рккзДНК ВГВ противовирусную активность CRISPR–Cas9 РНП. (А) Распределение островков CpG (I–III). Мишени РНК–проводников St1–St10 показаны на карте генома ВГВ. (Б) Схема метилирования рккзДНК ВГВ ДНК–метилтрансферазой M.SssI. (В и Г) Реакция расщепления рккзДНК и мет–рккзДНК *in vitro* с помощью РНП StCas9 (Д) Относительные уровни расщепления рккзДНК и мет–рккзДНК с помощью StCas9 РНП. $\circ p < 0,05$, $\Delta p < 0,01$, $\#p < 0,001$, $*p < 0,0001$ [455].

Для исчерпывающего анализа влияния метилирования рккзДНК на расщепление CRISPR/Cas9, были созданы все возможные РНК–проводники ко всем мишеням CRISPR/Cas9 в рккзДНК, и проведены реакции *in vitro* расщепления мишени (Рисунок 16). Из десяти РНК–проводников, с 8 РНК–проводниками расщепление рккзДНК превышало 50%; St2 и St6 расщепляли менее 20% рккзДНК и в дальнейшем в анализе не использовались. Сравнение расщепления с мет–рккзДНК показало, что 4 из 8 РНК–проводников, как правило, имеющих мишени внутри CpG–островков, практически не действуют при гиперметилировании рккзДНК. Следовательно, метилирование рккзДНК по CpG–островкам нарушает нуклеолитическое действие CRISPR/Cas9.

3. Увеличение дозы комплексов CRISPR/Cas9 позволяет преодолеть эффекты метилирования ккзДНК ВГВ

Далее мы предположили, что эффект метилирования рккзДНК может преодолеваться при использовании больших количеств РНП. Для этого проводили 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) и РНК–проводником. При более низких дозах (0,25 мкг и 1 мкг на реакцию) метилирование рккзДНК снижало активность РНП, в то время как увеличение количества РНП позволяло преодолевать эффект метилирования рккзДНК и эффективно расщеплять мишень (Рисунок 17). Из этих результатов мы впервые демонстрируем, что метилирование ккзДНК ВГВ препятствует расщеплению комплексами CRISPR/Cas9, однако этот эффект можно преодолеть увеличением дозы РНП.

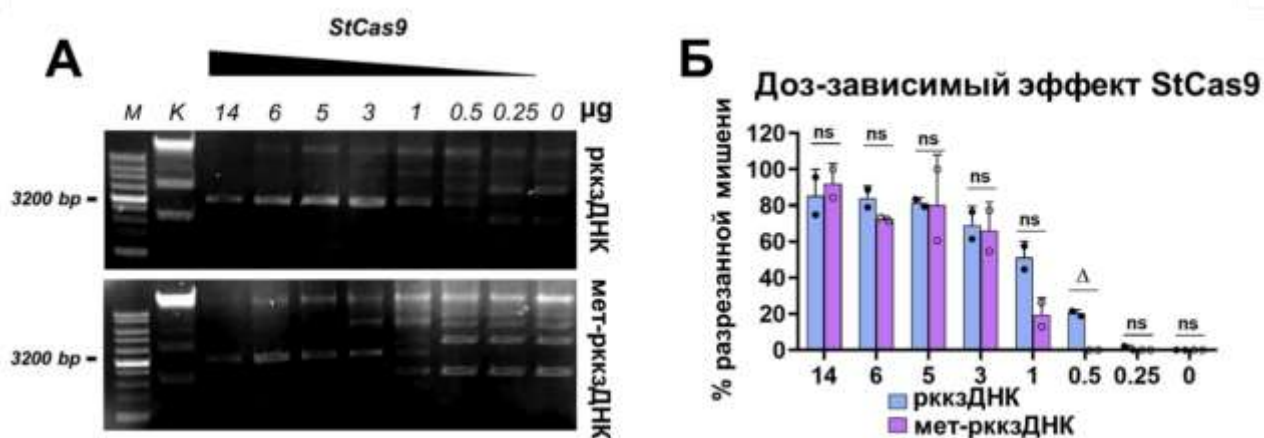


Рисунок 17. Увеличение концентрации РНП StCas9/РНК-проводник преодолевают эффекты метилирования ДНК. (А) Гель-электрофорез реакций *in vitro* расщепления ДНК-мишени. (Б) Полуколичественный анализ эффективности расщепления ДНК-мишени.

4. Эффекты НВх на действие сайт-направленных нуклеаз

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. 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. 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.

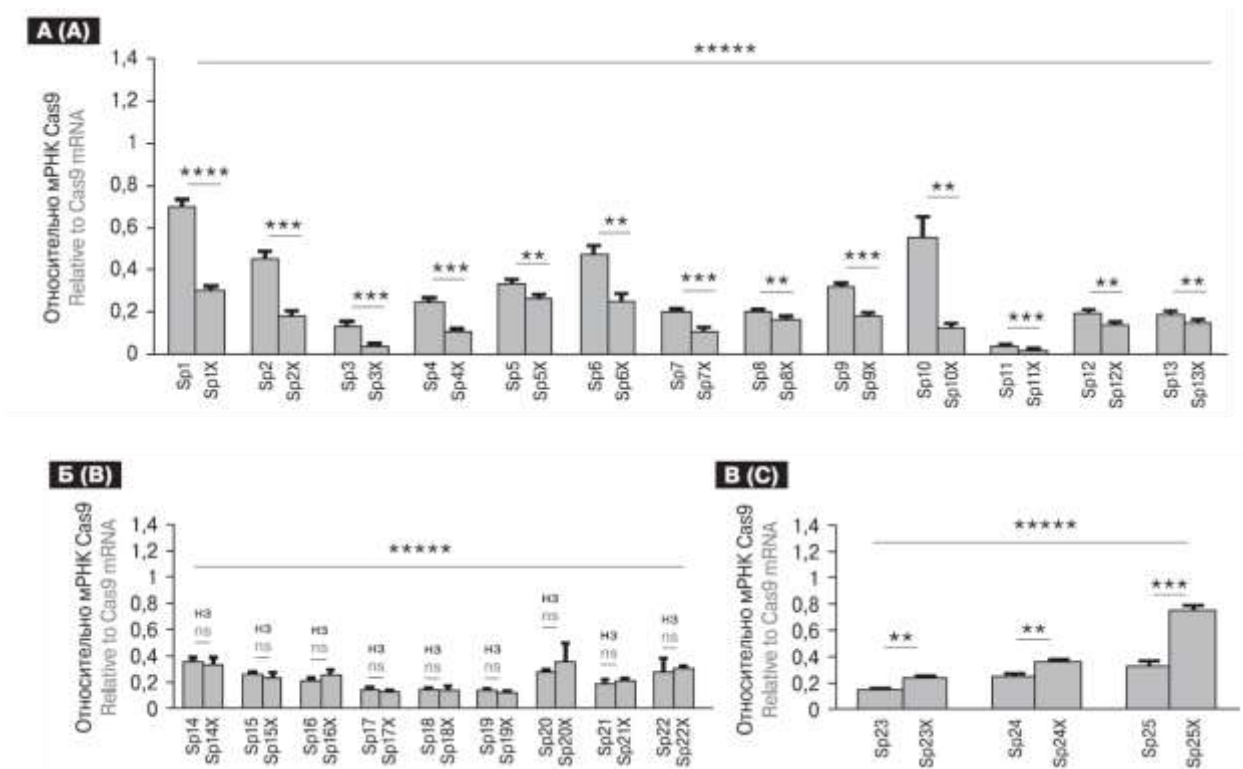


Рисунок 18. Эффект гиперпродукции НВх белка ВГВ на противовирусное действие CRISPR/Cas9. (А) РНК-проводники, эффективность которых возрастала, (Б) не изменялась либо (В) снижалась при ко-трансфекции НВх. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, ns — незначимые отличия.

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, и впервые продемонстрировано, что НВх может усиливать действие большинства слабо активных РНК-проводников (Рисунок 18А), при этом с высоко активными РНК-проводниками НВх не оказывал влияния на противовирусное действие (Рисунок 18Б) либо снижал его (Рисунок 18В).

5. Транскрипционно-инактивированная форма генома вируса гепатита В может реактивировать вирусную репликацию при участии белка НВх

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-НВс 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. 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 варианты белка НВх ВГВ, на репликацию биохимически гиперметилированной ккзДНК.

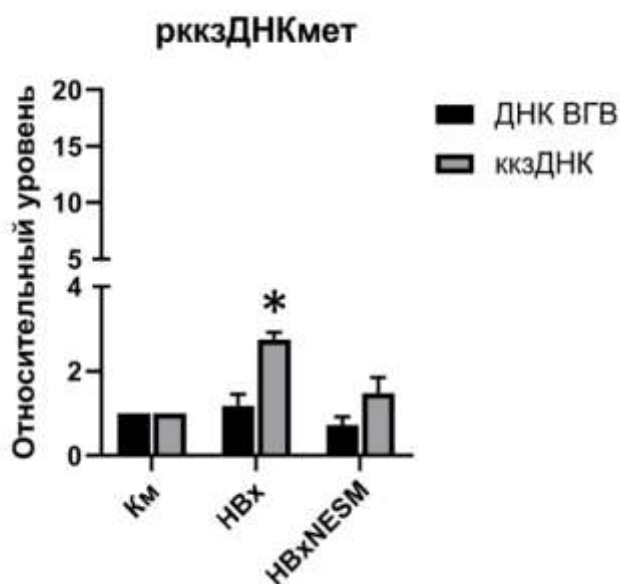


Рисунок 19. Влияние НВх на репликацию транскрипционно неактивной рккзДНК. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * $p < 0,001$.

В результате, было выявлено, что белок НВх дикого типа вызывает увеличение уровней ккзДНК ВГВ и вызывает реактивацию ВГВ из инактивированного состояния (Рисунок 19). При этом схожего действия белка НВхNESM с исключительно ядерной локализацией обнаружено не было. Это свидетельствует о том, что взаимодействие НВх с ккзДНК не играет роли в реактивации гиперметилированной ккзДНК; вместо этого, очевидно, в реактивации ккзДНК участвуют факторы, индуцированные НВх в цитоплазме.

IV. Роль повреждения генома инфицированных клеток и внутриклеточных киназ ATM/ATR в репликации и реактивации ВГВ

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 и др. Считается, что основными механизмами реактивации ВГВ при действии различных групп препаратов является подавление иммунного ответа и активация про-вирусных внутриклеточных каскадов.

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

Для репликации некоторых вирусов требуется активация механизмов ответа на повреждение ДНК (ДДР). Вирусы могут привлекать факторы ATM, ATR, каталитическую субъединицу ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PKcs) и их зависимые белки, а также другие белки ДЦР, включая MRE11A и RAD51. Белки ДДР являются важными факторами в транскрипции и репликации ВГВ. Исследования *in vitro* показали, что инфекция ВГВ активирует ДДР и приводит к повышению уровней ATR и фосфорилированной Chk1. Кроме того, сообщалось, что ДДР 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 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 теofilлин) или Chk1 (UCN01) подавляют репликацию ВГВ и патогенез, связанный с ВГВ. Эти данные свидетельствуют о важной роли передачи сигналов ДДР в естественном жизненном цикле ВГВ.

Несмотря на имевшиеся данные, точные механизмы реактивации ВГВ при повреждении ДНК, а также роль отдельных компонентов ДДР в репликации ВГВ оставались в значительной степени неизвестными. Обработка клеток HepG2 с ВГВ доксорубицином, либо H₂O₂ в экспериментах *in vitro* резко увеличивает транскрипцию и репликацию ВГВ (Рисунок 20). Транскрипция ВГВ увеличилась в 15–20 раз при обработке доксорубицином и более чем в 100–300 раз при действии H₂O₂. Транскрипция ВГВ сопровождается повышением уровня внутриклеточной и секретируемой ДНК ВГВ и HBsAg.

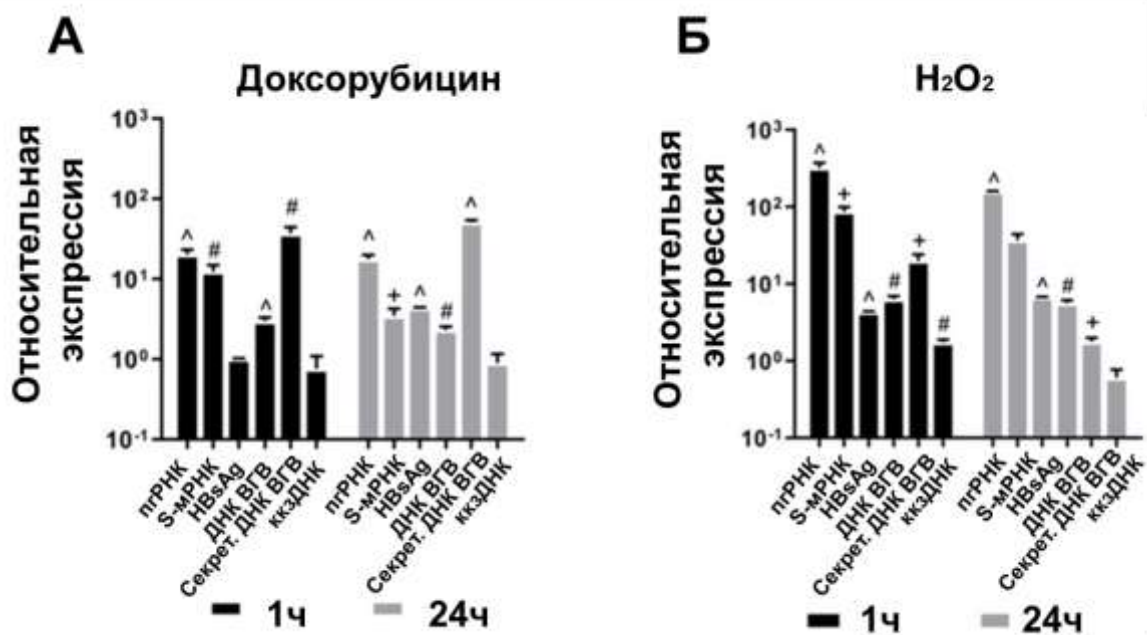


Рисунок 20. Активация репликации ВГВ под действием ДНК–повреждающих агентов. Изменения уровней ВГВ (pgРНК, S–мРНК, внутриклеточной ДНК ВГВ, секретируемой ДНК ВГВ и секретируемого HBsAg) при обработке (А) доксорубицином и (Б) H₂O₂ в клетках HepG2–1.1merВГВ. Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях по сравнению с контролем. * $p < 0,05$, + $p < 0,01$, # $p < 0,001$, ^ $p < 0,0001$.

2. Реактивация ВГВ при повреждении генома связана с транскрипционной активацией фактором ATM и ATR

Обработка клеток H₂O₂ либо доксорубицином многократно усиливала уровни экспрессии генов ATM и ATR (Рисунок 21). Для детального изучения роли ATM и ATR в репликации ВГВ, проводили нокдаун факторов ATM и ATR в клеточной линии с помощью малых шпилечных РНК (shATM и shATR).

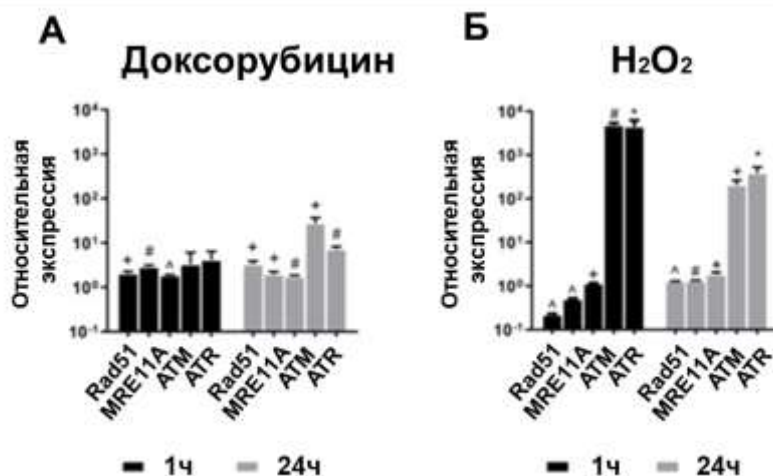


Рисунок 21. Изменение уровней экспрессии факторов DDR при действии ДНК-повреждающих агентов доксорубицина и пероксида водорода после 1 ч и 24 ч обработки. * $p < 0,05$, + $p < 0,01$, # $p < 0,001$, ^ $p < 0,0001$.

Как shATM, так и shATR снижали уровни пгРНК ВГВ, S-РНК ВГВ, внутриклеточной ДНК ВГВ и секретируемой ДНК ВГВ на 50–85%. Результаты по выключению данных генов свидетельствуют о том, что ATM и ATR играют важную роль в репликации ВГВ (Рисунок 22).

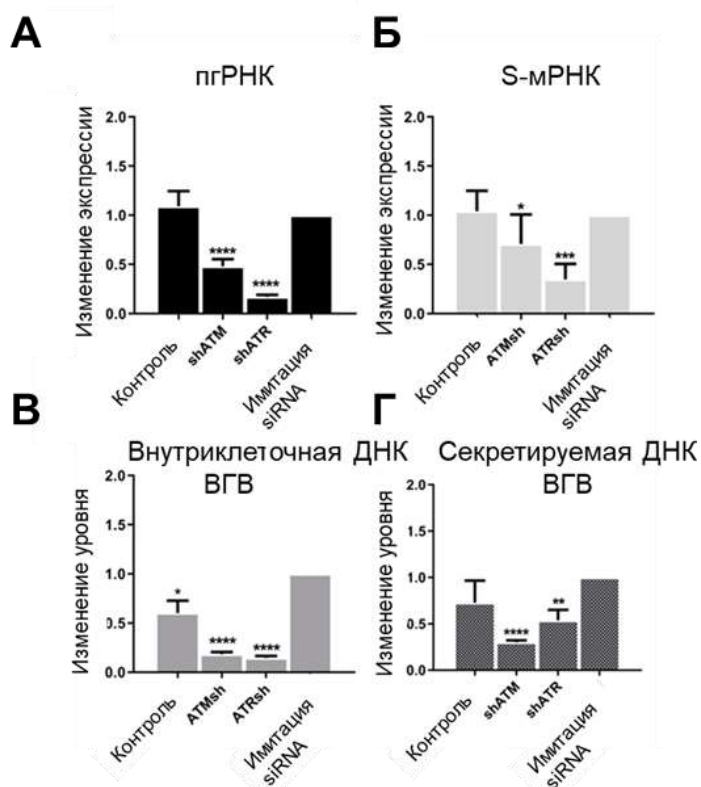


Рисунок 22. Подавление репликации ВГВ при выключении факторов ATM и ATR. Подавление ATM (shATM) и ATR (shATR) снижает (А) пгРНК ВГВ, (Б) S-РНК ВГВ, (В) уровни внутриклеточной ДНК ВГВ и (Г) уровни секретируемой ДНК ВГВ. Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях по сравнению с контролем. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$.

Вслед за этим, было изучено обратное действие – влияние активации транскрипции ATM и ATR на репликацию ВГВ (Рисунок 23). Была разработана система для активации транскрипции генов ATM и ATR с помощью CRISPR-активации. Трансфекция CRISPRa комплексов повышала уровни ATM более, чем в 600 раз, и уровни ATR более, чем в 4 раза

(Рисунок 23А). В клетках HepG2, ко-трансфицированных CRISPRa и рекомбинантной ккзДНК ВГВ (Рисунок 23Б-Г). CRISPRa-опосредованная активация ATM приводила к 40–140-кратному увеличению транскрипции ВГВ, ~4-кратному увеличению уровней внутриклеточной ДНК ВГВ и ~2-кратному увеличению уровней секретируемой ДНК ВГВ. Аналогично, регистрировалось значительное усиление репликации ВГВ при активации ATR. Таким образом, ATM и ATR – ключевые факторы, которые гиперэкспрессируются при повреждении генома в ВГВ-инфицированных клетках, и стимулируют резкое увеличение репликации и реактивацию ВГВ.

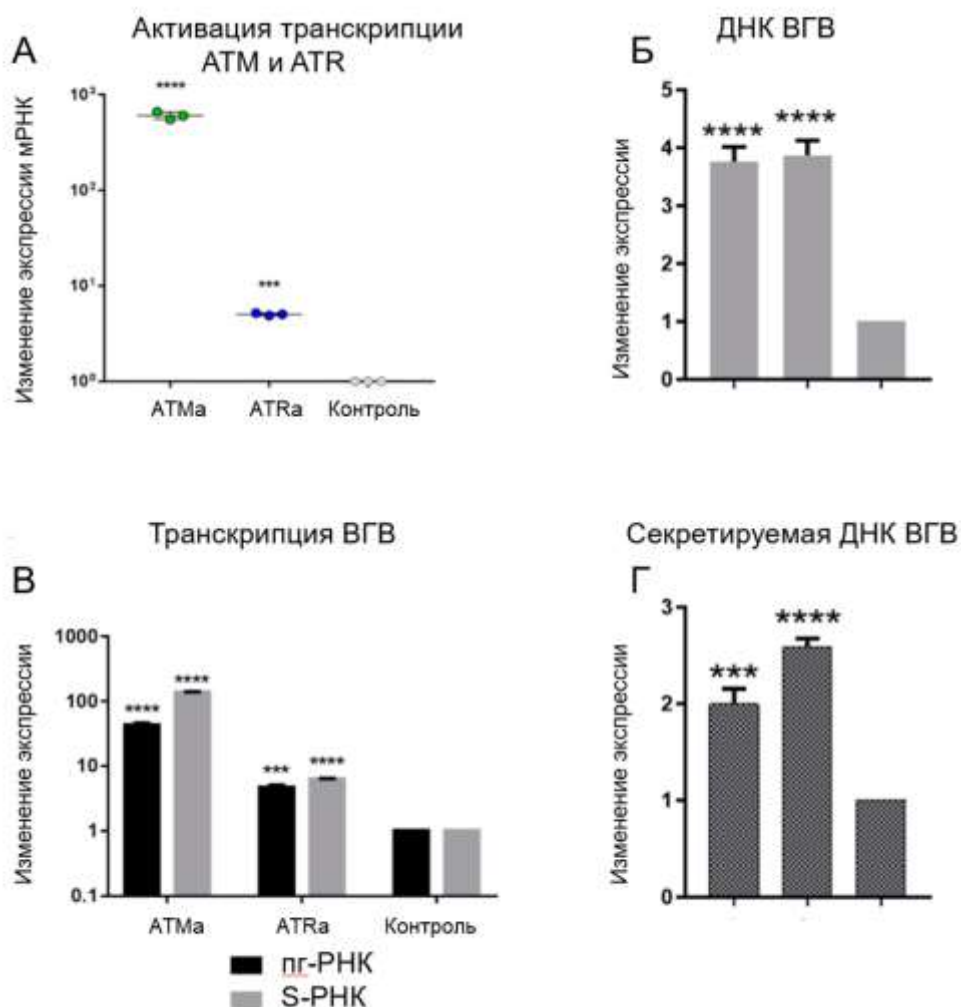


Рисунок 23. Активация транскрипция ATM и ATR усиливает репликацию ВГВ. (А) уровни мРНК ATM или ATR при активации транскрипции ATM (ATMa) или ATR (ATRa). Влияние ATMa и ATRA на (Б) транскрипцию ВГВ и уровни (В) внутриклеточной и (Г) секретируемой ДНК ВГВ. Результаты были воспроизведены как минимум в 3 независимых экспериментах. Звездочки указывают на статистически значимые различия в средних значениях по сравнению с контролем. *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$ [458].

3. Белок HBx потенцирует влияние ДНК-повреждающих агентов на репликацию и реактивацию вируса гепатита В

Вслед за этим, было проведено изучение влияния вариантов белка HBx (HBx дикого типа и HBxNESM) (Рисунок 24) на возможность и выраженность реактивации ВГВ при действии генотоксических агентов, а именно доксорубина и пероксида водорода (Рисунок 25), и препаратов таргетной терапии (сунитиниба и бортезомиба) (Рисунок 26). Влияние HBx 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.

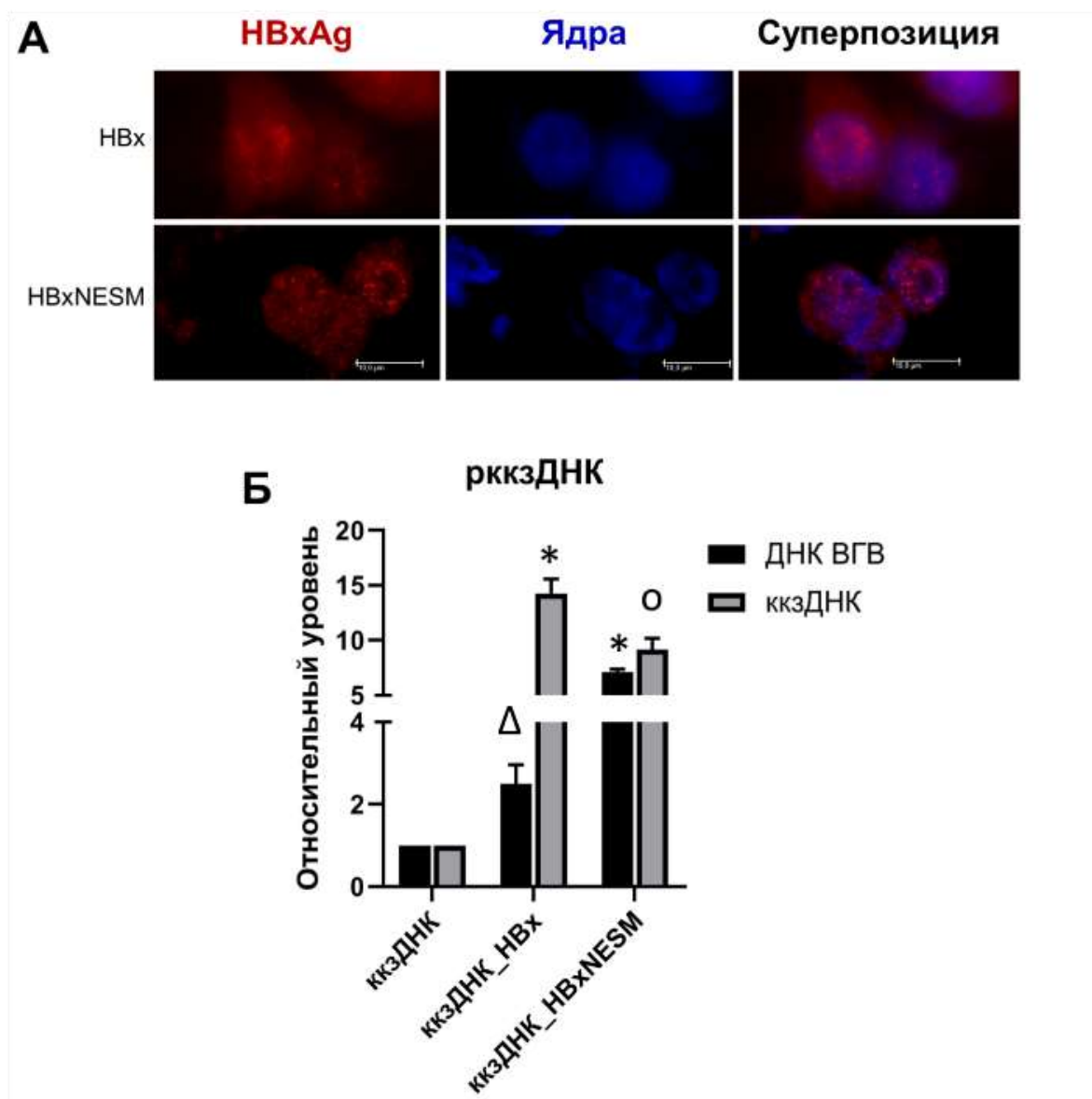


Рисунок 24. Влияние HBx и HBxNESM на уровни репликацию ВГВ. (А) Иммуноцитохимическое окрашивание на белок HBx. Ядра окрашивали красителем Hoescht33324. (Б) Уровни внутриклеточной ДНК ВГВ (чёрные столбцы) и ккзДНК ВГВ (серые столбцы) при действии HBx либо HBxNESM. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. Уровни значимости: $+p < 0,05$; $\Delta p < 0,01$; $o p < 0,005$; $*p < 0,001$.

Ожидаемо, доксорубин и пероксид водорода вызывали выраженное (до 10 раз) увеличение уровней общей внутриклеточной ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ (Рисунок 25). При этом трансфекция НВх дикого типа либо НВхNESM приводила к воспроизводимому, значимому увеличению уровней ДНК ВГВ (до 10 раз) и ккзДНК ВГВ (до 100 раз). 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.

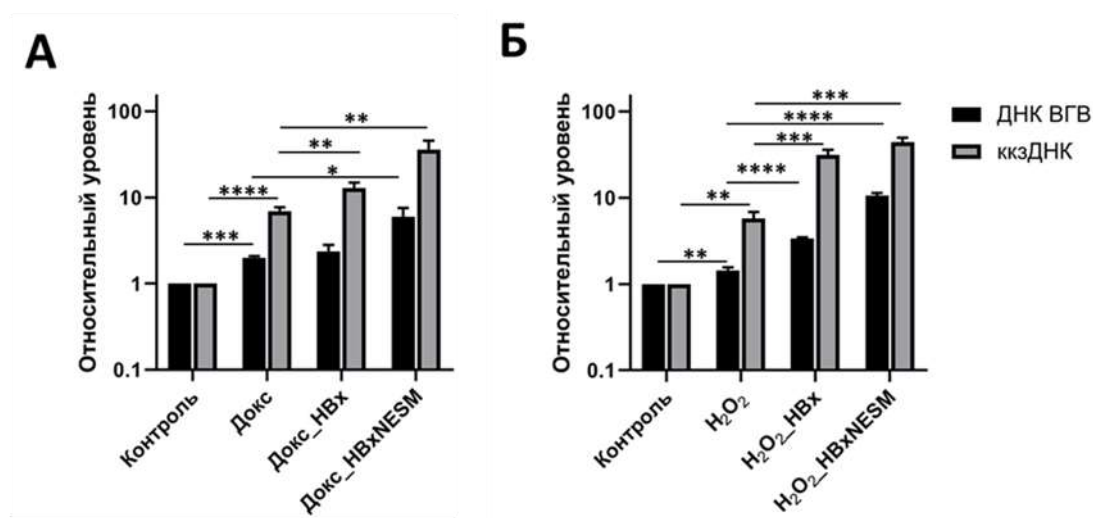


Рисунок 25. Влияние белков НВх на реактивацию ВГВ-инфекции при действии генотоксических агентов и препаратов для таргетной терапии. Репликация ВГВ при действии (А) доксорубина и (Б) пероксида водорода. Анализ проводился по оценке параметров ДНК ВГВ и ккзДНК с помощью ПЦР в реальном времени. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,005$; **** $p < 0,001$.

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 (Рисунок 26). 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.

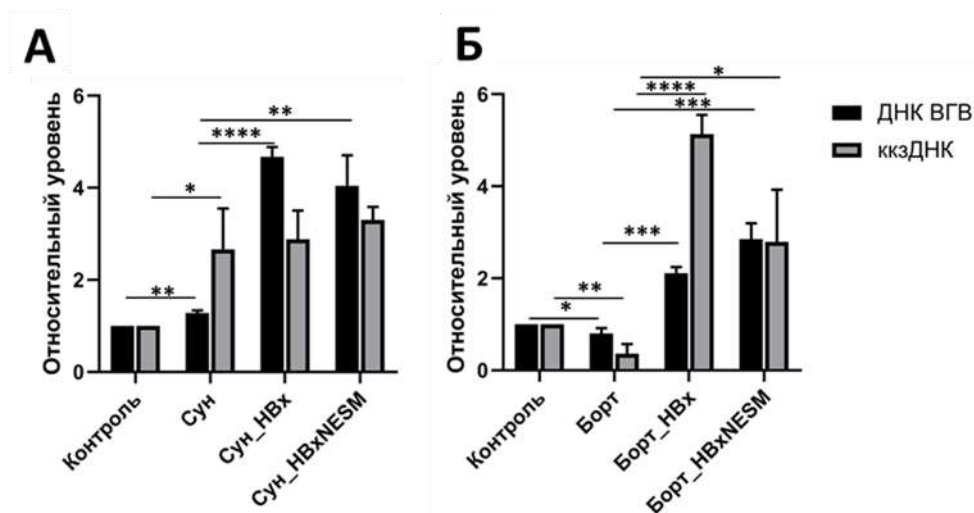


Рисунок 26. Реактивация метилированной ккзДНК ВГВ. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ при обработке клеток с метилированной рккзДНК (А) доксорубицином, (Б) пероксидом водорода, (В) сунитинибом и (Г) бортезомибом. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.005$; **** $p < 0.001$ [460].

V. Многоуровневое действие цитидин-дезаминаз АРОВЕС/АID на жизненный цикл ВГВ.

Внутриклеточные противовирусные системы распознавания и удаления чужеродной ДНК являются фундаментальными защитными механизмами, необходимыми для функционирования клеток человека. АРОВЕС/АID являются факторами рестрикции чужеродной ДНК, которые могут напрямую дезаминировать цитидиновые нуклеотиды в одноцепочечной или двухцепочечной ДНК, что приводит к гипермутации С→Т и/или G→А, образованию делеций и распад чужеродной ДНК. Экспрессию АРОВЕС/АID можно индуцировать интерферонами (IFN) или другими цитокинами. Наиболее хорошо охарактеризованными индукторами АРОВЕС3 являются IFN- α (участвует в индукции транскрипции А3А, А3G и А3F), IFN- γ (повышает уровни мРНК А3G и А3F) и IFN- λ (индуцирует экспрессию А3А, А3В и А3G). Помимо IFN, важную роль в регуляции врожденных ответов и индукции АРОВЕС3 играет передача сигналов NF- κ B.

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

КкзДНК ВГВ восполняется путем преобразования кчдДНК в ккзДНК, где кчдДНК может возникать либо из кчдДНК, образованной из пгРНК, либо в результате инфицирования de novo частицами ВГВ, содержащими кчдДНК.

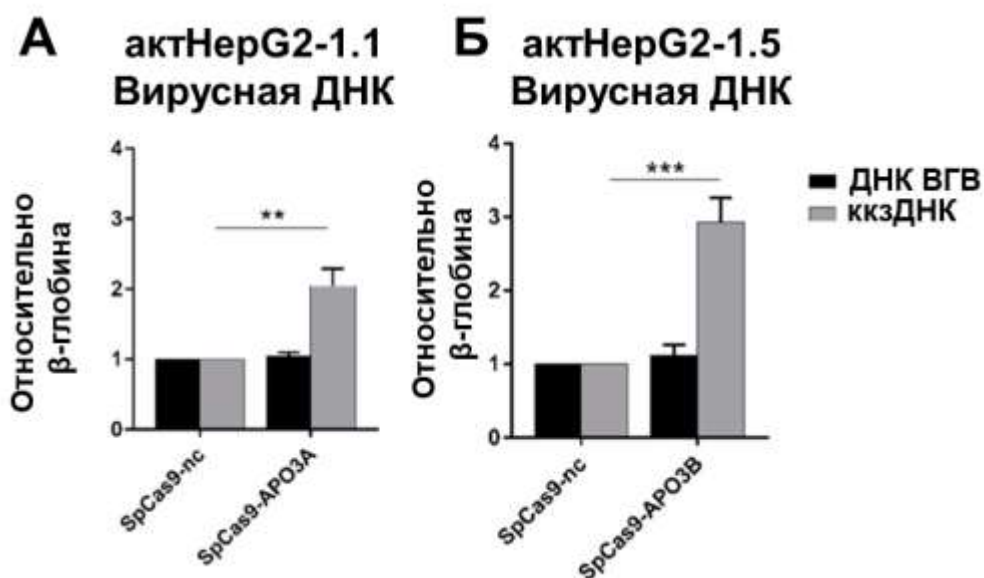


Рисунок 27. CRISPR-нокдаун генов APO3A и APO3B повышает уровень ккзДНК ВГВ. (А) уровни общей внутриклеточной ДНК ВГВ (черные столбцы) и ккзДНК (серые столбцы) в клетках actHerG2–1.1 и (Б) HerG2– 1.5. Звездочками отмечены статистически значимые различия. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Индукция системами CRISPR/Cas9 нокдауна генов APO3A и APO3B незначительно влияла на вирусную транскрипцию, но приводила к существенному увеличению уровней ккзДНК ВГВ (Рисунок 27). В нашем исследовании впервые было продемонстрировано, что подавление продукции APO3A и APO3B приводит к увеличению пула ккзДНК ВГВ. Один из сценариев заключается в том, что эти факторы могут нейтрализовать часть ккдДНК, тем самым снижая количество ккдДНК (предшественника ккзДНК), способной конвертироваться в ккзДНК. Другим возможным сценарием является прямое воздействие APO3A/APO3B на процессы конверсии ккдДНК в ккзДНК ВГВ (Рисунок 28).

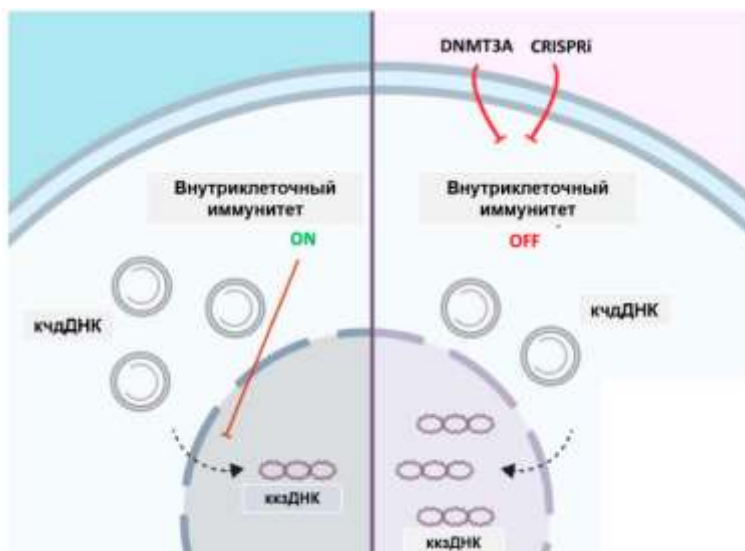


Рисунок 28. Роль врожденного иммунитета в образовании и поддержании ккзДНК ВГВ на моделях репликации ВГВ in vitro.

2. Кратковременная активация APOBEC/AID подавляет репликацию ВГВ

С помощью системы CRISPRa нами была разработана система, которая обеспечивала >4-100,000-кратную активацию транскрипции целевых генов (Рисунок 29А).

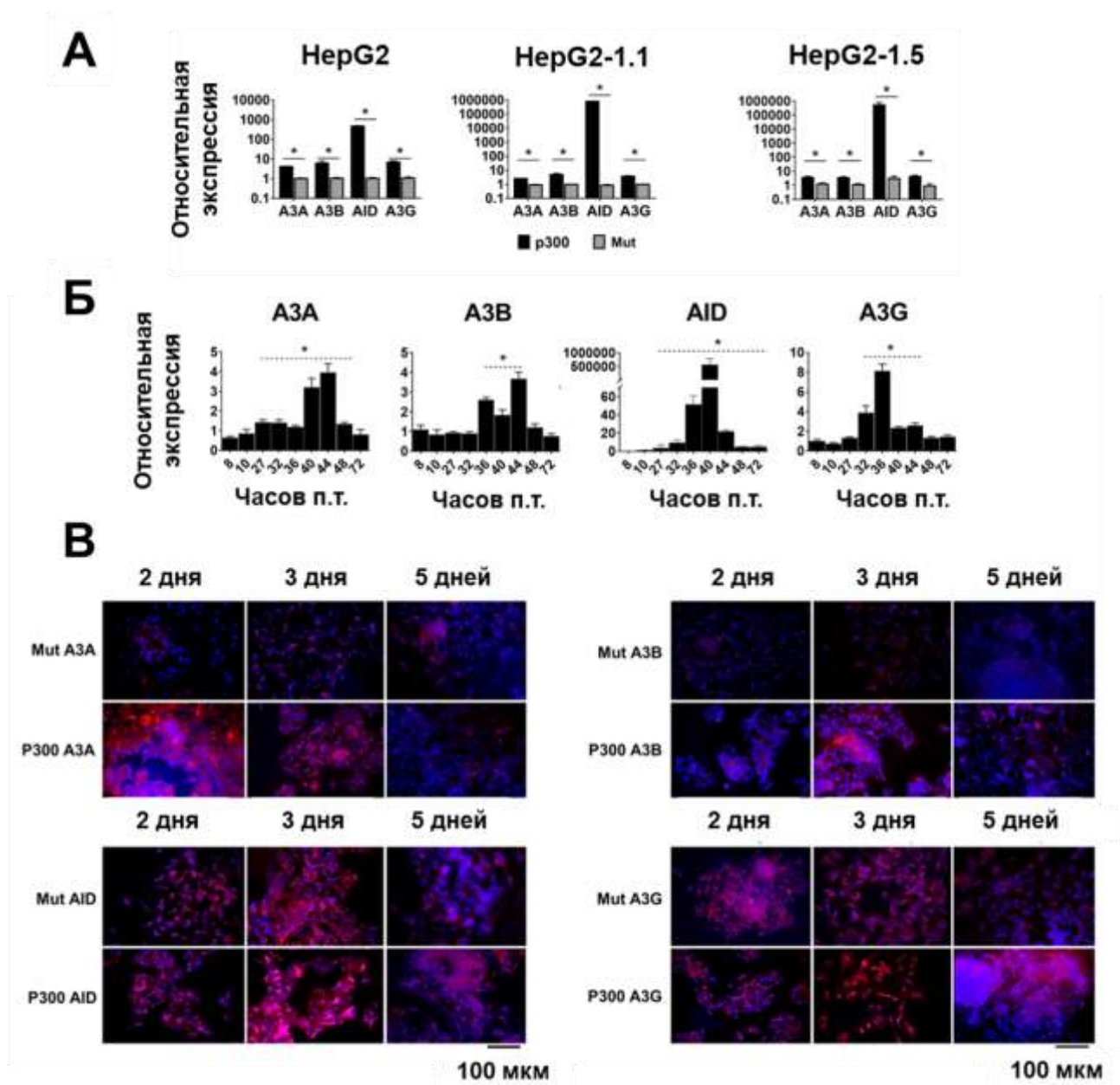


Рисунок 29. Активация экспрессии генов семейства APOBEC/AID с помощью CRISPRa. (А) Уровни мРНК APOBEC/AID в клеточных линиях, трансфицированных CRISPRa (черные столбцы) или CRISPRa с мутантной формой p300 (серые столбцы). (Б) Динамический анализ уровней мРНК APOBEC/AID после трансфекции систем CRISPRa в клетках HepG2–1,5merВГВ. (В) Динамический анализ уровней экспрессии APOBEC/AID с помощью иммуноцитохимии в клетках HepG2. $\circ p < 0,05$; $\Delta p < 0,01$; $\#p < 0,001$; $* p < 0,0001$.

При изучении динамики активации целевых генов было выявлено, что вскоре после роста уровней целевых мРНК к 32-40 часу после трансфекции, уже к 48 часам уровни транскрипции возвращались к базальным значениям (Рисунок 29Б). Из этого следует, что

трансфекция систем CRISPRa вызывает значительное, но кратковременное увеличение транскрипции целевых генов. Индукция уровней мРНК АРОВЕС/AID сопровождалась повышением уровней транслируемых белков на 2–3 день после трансфекции. После активации, белки семейства факторов АРОВЕС/AID демонстрировали типичное для данных факторов распределение по клетке, включая цитоплазматическое и внутриядерное распределение (Рисунок 29В). 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.

На модели ркзДНК CRISPR-активация всех выбранных генов, за исключением А3G, снижала уровни ккзДНК (А3G не воздействовал на уже сформированный пул ккзДНК) (Рисунок 30А-Г). Кроме того, активация всех изученных факторов подавляла транскрипцию (по уровням пгРНК и S-мРНК) и уровни внутриклеточной ДНК ВГВ.

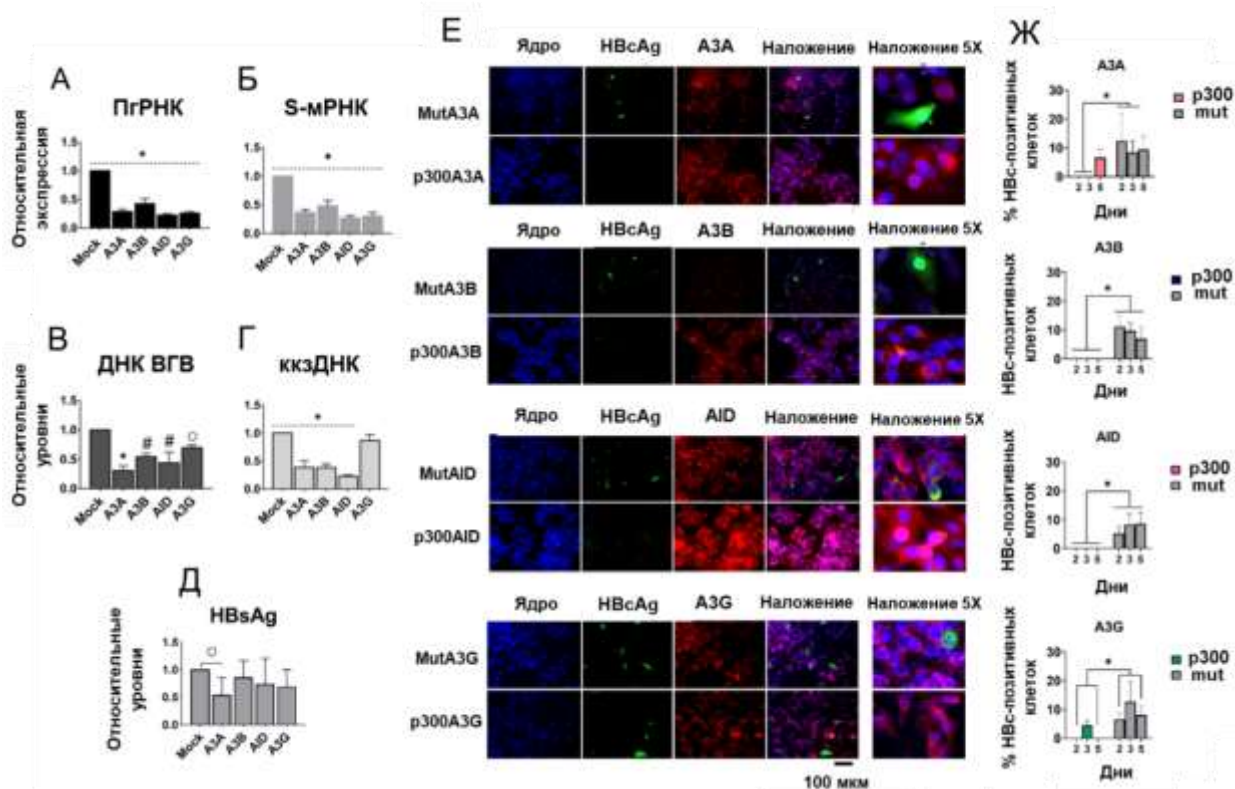


Рисунок 30. Противовирусная активность АРОВЕС/AID при действии CRISPRa. Оценка противовирусной активности по уровням (А) пгРНК, (Б) S-мРНК, (В) общей внутриклеточной ДНК ВГВ, (Г) ккзДНК и (Д) HBsAg. (Е) Снижение экспрессии HBsAg ВГВ при действии CRISPRa. (Ж) Полуколичественный анализ экспрессии HBsAg ВГВ в экспериментальных группах при активации отдельных факторов АРОВЕС/AID. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК представлены относительно уровней β-глобина; Уровни пгРНК и S-

mPНК - относительно *mPНК GAPDH*. Мокк, *dCas9-p300* с нецелевой *PНК*-проводник. Результаты представляют собой среднее значение по крайней мере 3 экспериментов \pm стандартное отклонение. $\circ p < 0,05$; $\Delta p < 0,01$; $\#p < 0,001$; $* p < 0,0001$.

Снижение параметров ВГВ при активации любого из изученных факторов составляло 50-80%. Вместе с этим, уровни секретируемого HBsAg практически не изменялись при CRISPR-активации APOBEC/AID, что может быть связано с длительным временем полужизни HBsAg (Рисунок 30Д). Количественный анализ HBsAg-позитивных клеток показал полную элиминацию экспрессии HBsAg при CRISPRa (Рисунок 30Е,Ж). В целом эти результаты показывают, что даже кратковременная активация APOBEC/AID значительно подавляет транскрипцию и репликацию ВГВ и снижает уровни ккзДНК ВГВ.

3. Динамика дезаминирования и профиль мутаций ккзДНК ВГВ при действии APOBEC/AID

APOBEC/AID могут дезаминировать одноцепочечные участки ДНК ВГВ и ккзДНК, что приводит к мутациям G→A и C→T. В рамках исследований мы выполнили 3D-ПЦР-анализ ккзДНК ВГВ и обнаружили обширное дезаминирование целевой области ккзДНК ВГВ (Рисунок 31А). Однако кинетика дезаминирования различалась в образцах с активацией разных генов семейства APOBEC/AID: A3A и A3B заметно дезаминировали ккзДНК ВГВ на 4-й день после начала исследования, в то время как дезаминирование, вызванное A1D и A3G, было наиболее выраженным на 3-и сутки. Матрицы дезаминированной ккзДНК ВГВ практически отсутствовали через 5 суток. Полученные данные указывают на различную кинетику дезаминирования ккзДНК ВГВ с помощью APOBEC/AID и позволяют предположить, что обширно дезаминированные вирусные геномы разрушаются. Чтобы непосредственно оценить разрушение ккзДНК ВГВ при активации цитидин-дезаминаз, были проведены исследования по блокированию фактора UNG - основного фермента, ответственного за вырезание дезаминированных нуклеотидов. С этой целью использовали 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 31Б).

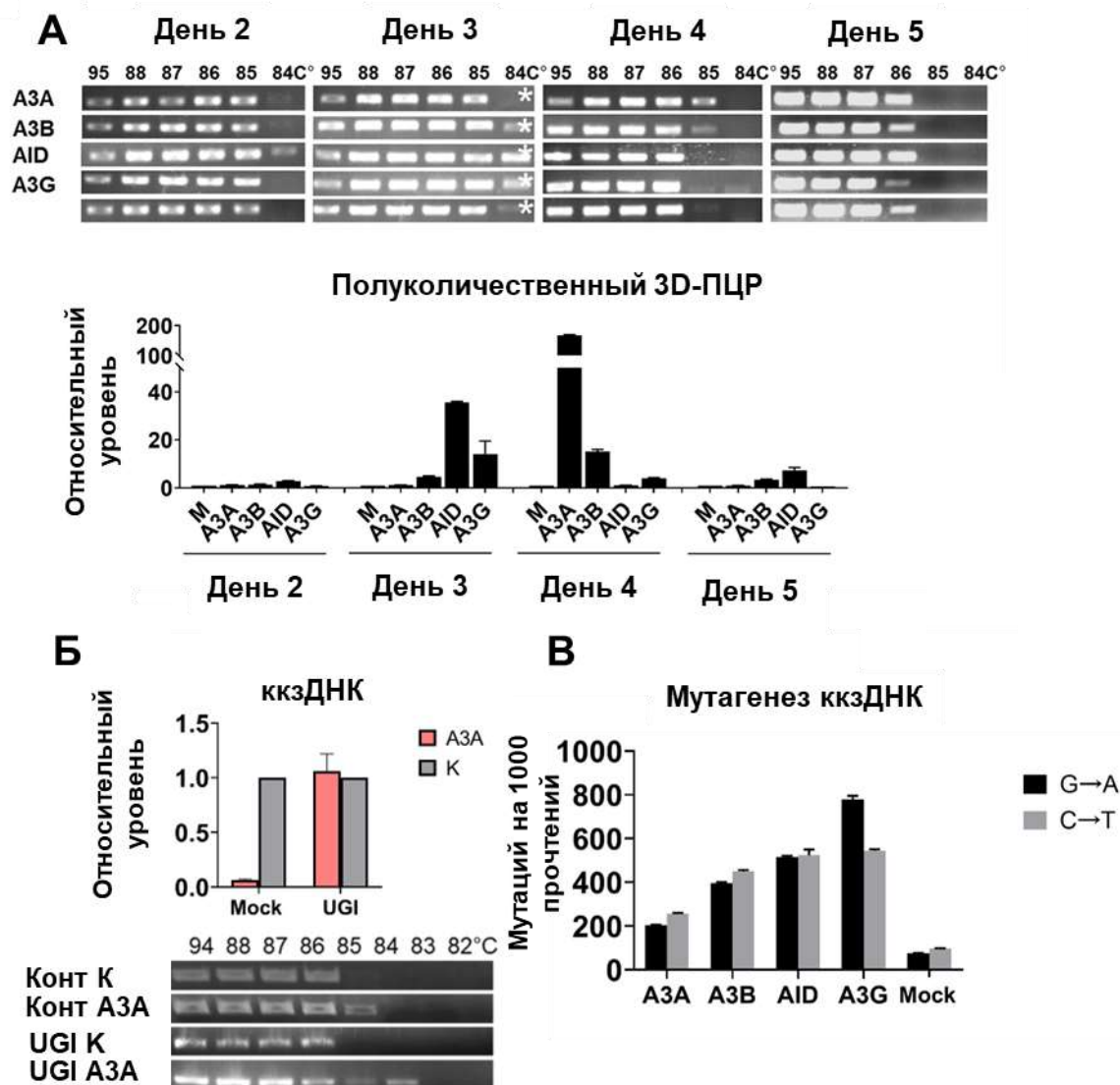


Рисунок 31. Активация АРОВЕС/AID вызывает дезаминирование ккзДНК ВГВ. (А) Анализ дезаминирования ккзДНК ВГВ помощью 3D-ПЦР. Звездочками отмечены продукты ПЦР, выбранные для анализа NGS. (Б) Подавление разрушения ккзДНК ВГВ с помощью UGI: относительные уровни ккзДНК (вверху) и результаты электрофореза 3D-ПЦР (внизу). (В) Частота мутаций G→A/C→T в последовательность ккзДНК ВГВ.

Далее, проводили секвенирование 3D-ПЦР продуктов для каждого образца для анализа мутагенного действия АРОВЕС/AID на ккзДНК ВГВ и прямого сравнения эффективности дезаминирования каждого из факторов АРОВЕС/AID при CRISPRa. Глубокое секвенирование выявило частые, характеристичные мутации G→A и C→T. Частота мутаций G→A и C→T была схожей в группах А3А, А3В и АID, в то время как мутации G→A преобладали при CRISPR-активации гена А3G (Рисунок 31В). В целом, индуцированная CRISPRa гиперэкспрессия АРОВЕС/AID приводит к выраженному дезаминированию и разрушению генома ВГВ.

4. Мутагенные эффекты кратковременной гиперэкспрессии АРОВЕС/АID зависят от уровней вирусной репликации

АРОВЕС/АID вносят существенный вклад в мутации, приводящие к развитию многих видов опухолей. 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, 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; 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).

Затем были проанализированы CpG-богатые области генов, участвующих в канцерогенезе, вызванном АРОВЕС/АID: ARID1, PAX5, TP53, ARID2 и MLL3. В результате, детектировалось дезаминирование гена PAX5 при активации А3А и А3В и гена TP53 при активации А3А в клетках HepG2-1.1merHBV.

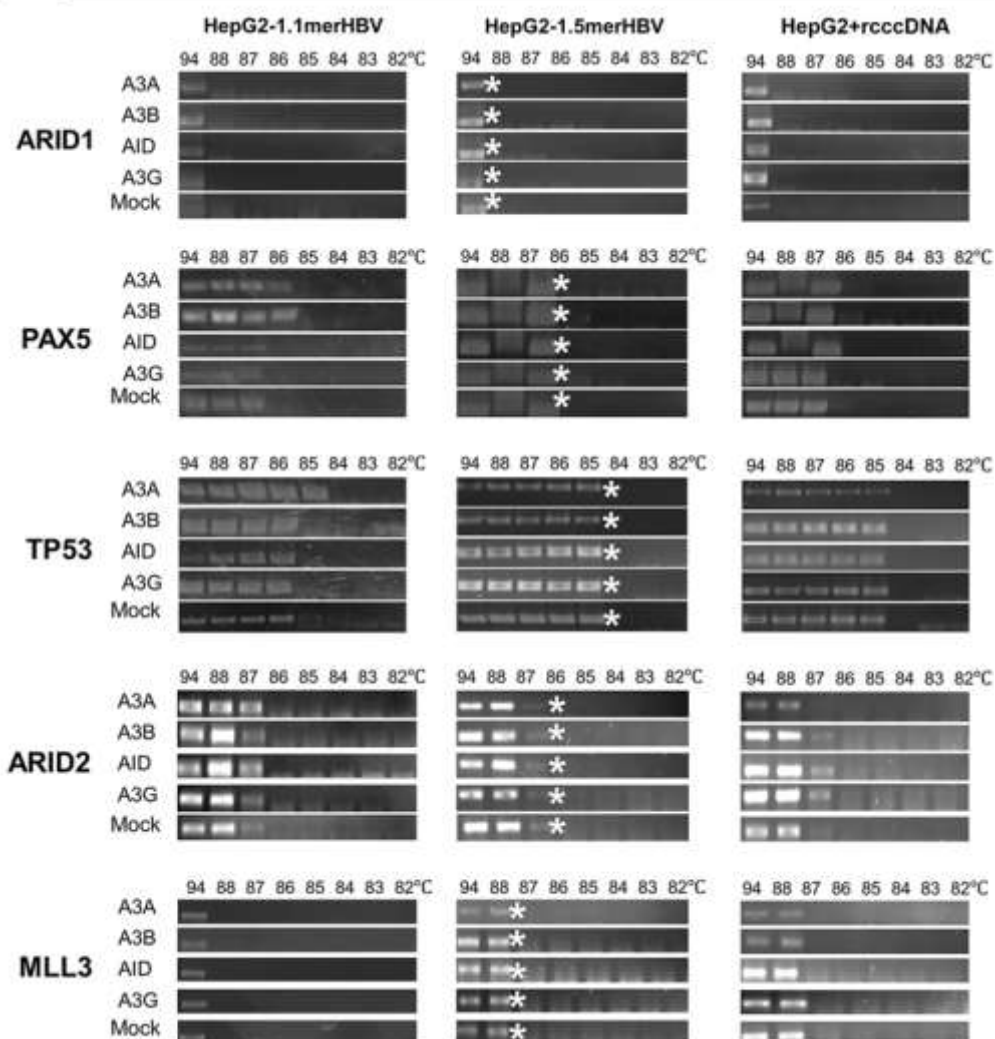


Рисунок 32. Дезаминирование генома факторами АРОВЕС/АИД в ВГВ-инфицированных клетках. Представлены результаты 3D-ПЦР-анализа внецелевого дезаминирования в геноме инфицированных клеток на трех модельных линиях ВГВ.

Дополнительный 3D-ПЦР-продукт был также зарегистрирован при анализе гена PAX5 при CRISPRa A3B и A3G 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/АИД.

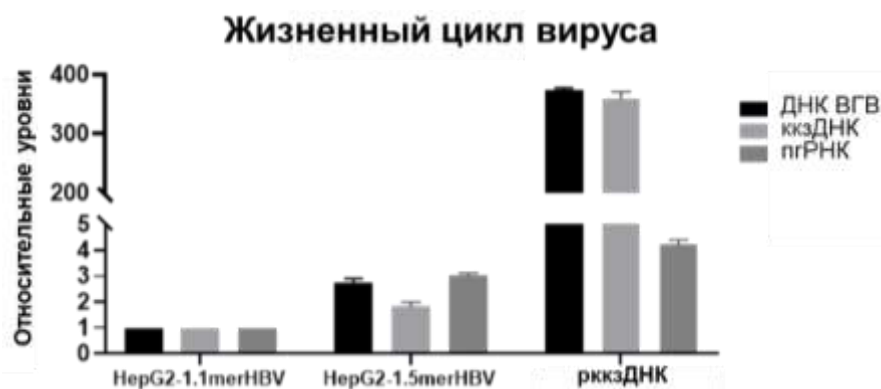


Рисунок 33. Репликация ВГВ на моделях *in vitro*. Относительные уровни ДНК, ккзДНК и pgРНК ВГВ на трех модельных линиях ВГВ.

5. 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 остается неясным, можно ли использовать доставку короткоживущих комплексов CRISPRa для создания новых терапевтических подходов. В рамках работы были получены РНП из высокоспецифичного белка *Streptococcus aureus* dCas9-p300 (dSaCas9), который считается одним из наиболее безопасных вариантов Cas белков, с транскрибируемыми *in vitro* РНК-проводниками, нацеленными на гены А3А и А3В. Гены А3А и А3В были избраны для дальнейшей работы, поскольку эти факторы были менее токсичны в сравнении с AID и А3G по результатам CRISPR-активации. Однократная трансфекция РНП dSaCas9 увеличивала транскрипцию А3А и А3В примерно в 200–280 раз (с поправкой на эффективность трансфекции) (Рисунок 34А) и приводила к резкому снижению репликации ВГВ ~52–98% (Рисунок 34Б, В) и дезаминированию ккзДНК (Рисунок 34Г). Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что кратковременная активация А3А и А3В 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 А3А, аналогично использованию плазмид CRISPRa. В попытке устранить внецелевой мутагенез PAX5, были получены РНП CRISPRa, нацеленные на ген А3А при помощи аттенуированных РНК-проводников (А3, А11, А19, содержащие несовпадения в положениях 3, 11 и 19 соответственно).

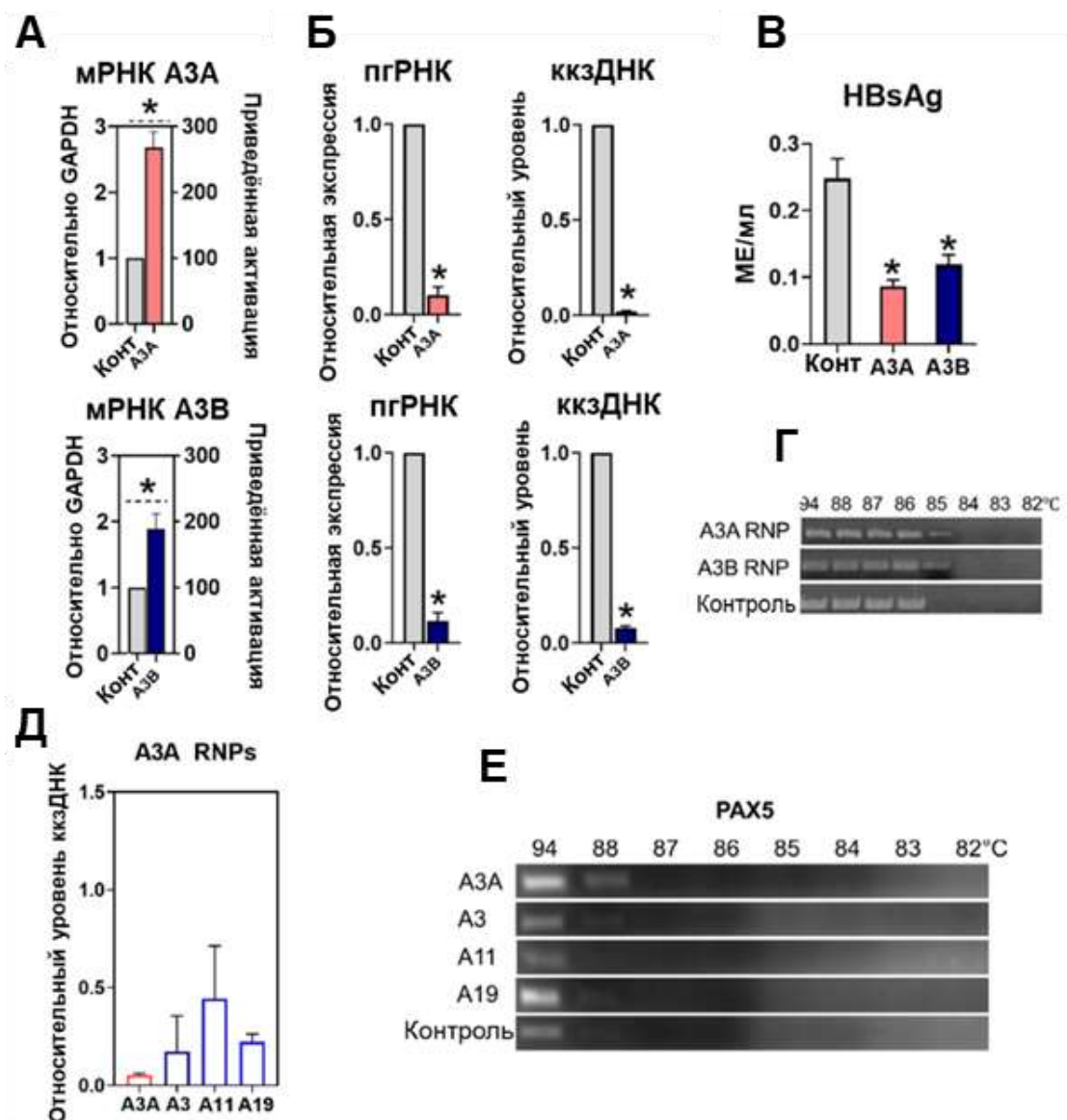


Рисунок 34. Эффекты РНП CRISPRa. (А) Активация генов-мишеней. (Б, В) Противовирусная активность CRISPRa РНП. (Г) Дезаминирование ккзДНК ВГВ. (Д) Противовирусная активность с исходным (А3А) и аттенуированными РНК-проводниками (А3, А11, А19). (Е) Устранение нецелевого дезаминирования А3А с помощью аттенуированных РНК-проводников. $\circ p < 0,05$; $\Delta p < 0,01$; $\#p < 0,001$; $* p < 0,0001$.

Использование att-РНК-проводников сохранило выраженную противовирусную активность А3А (Рисунок 34Д), но вместе с этим значительно уменьшило (для А3 и А19) либо полностью устранило (для А11) внецелевое дезаминирование гена PAX5 (Рисунок 34Е).

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.

Диссертационная работа была направлена на определение ключевых механизмов, ответственных за установление и поддержание хронической персистенции ВГВ-инфекции в клетках человека. Были разработаны методы и подходы для направленного расщепления и разрушения основной формы генома ВГВ, ккзДНК. На основе рибонуклеопротеиновых комплексов (комплексов рекомбинантного белка Cas9 с *in vitro* транскрибированным РНК-проводником) создан подход, обеспечивающий ранее недостижимые значения расщепления и удаления ккзДНК ВГВ из инфицированных клеток. С помощью высокопроизводительного секвенирования были исследованы исходы нуклеолитических разрывов в ккзДНК ВГВ, в том числе в условиях модуляции активности пути негомологичного соединения концов ДНК (DNA-PKcs). С использованием ряда ингибиторов и активаторов путей репарации двуцепочечных разрывов впервые было показано, что большая часть нуклеолитически расщепленных матриц ккзДНК ВГВ подвергается деградации. Выявлено, что низкомолекулярный ингибитор компонента пути NHEJ – DNA-PKcs, препятствует разрушению ккзДНК ВГВ при действии сайт-направленных нуклеаз. Предложен метод по оценке уровней разрушения ккзДНК ВГВ за счет обработки клеток человека раствором соединения NU7026. В экспериментах с использованием высокоэффективных рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 продемонстрирована ключевая роль ккзДНК ВГВ в поддержании персистенции ВГВ и реактивации ВГВ-инфекции за счет внутриклеточной амплификации и восстановления нуклеолитически разрушенного пула ккзДНК. В экспериментах с ингибитором обратной транскрипции ВГВ, ламивудином, была подтверждена роль ккзДНК в восстановлении пула ккзДНК. На основе проведенных исследований впервые был предложен подход полной элиминации ВГВ-инфекции, и экспериментально подтверждена возможность устойчивой элиминации большей части ВГВ-инфекции.

На основе разработанной модели гиперметилического и транскрипционной инактивации рекомбинантной ккзДНК ВГВ, была показана возможность эпигенетического нарушения действия сайт-направленных нуклеаз CRISPR/Cas9. Модель гиперметилического ккзДНК имитирует ДНК-метилическое у пациентов с хронической инфекцией и переходом заболевания в цирроз и рак печени. На основе данных на клеточных моделях и биохимических реакциях *in vitro* реализована возможность преодоления негативного влияния ДНК-метилического на нуклеолитическое и противовирусное действие нуклеаз CRISPR/Cas9. Доказано, что увеличение дозы рибонуклеопротеиновых

комплексов CRISPR/Cas9 эффективно расщепляет гиперметилированные участки ккзДНК ВГВ. Был исследован феномен реактивации ВГВ-инфекции при действии ДНК-повреждающих соединений и лекарственных препаратов. Доказано, что факторы ATM и ATR играют ведущую роль в реактивации и потенцировании ВГВ-инфекции при действии подобных агентов. Роль ATM и ATR была подтверждена в исследованиях по блокированию и направленной активации транскрипции ATM/ATR, а также в экспериментах по анализу уровней экспрессии ATM/ATR при обработке клеток с ВГВ ДНК-повреждающими соединениями. При исследовании вирусологических факторов реактивации ВГВ определена основополагающая роль НВх белка ВГВ в потенциации про-вирусного действия ДНК-повреждающих соединений и лекарственных препаратов. Продемонстрировано, что ДНК-повреждающие агенты, а также НВх белок ВГВ могут реактивировать ккзДНК ВГВ даже из транскрипционно-инактивированного, не репликативного состояния.

Выявлены механизмы ограничения активности пути внутриклеточной амплификации ккзДНК на уровне базальной экспрессии цитидин-дезаминаз. Обнаружен новый механизм противовирусной активности APOBEC3A и APOBEC3B, при котором данные факторы регулируют и ограничивают размер пула ккзДНК ВГВ. На примере цитидин-дезаминаз были изучены особенности взаимодействия ВГВ с внутриклеточными противовирусными факторами. Для этого были разработаны подходы по кратковременной, физиологичной гиперэкспрессии факторов APOBEC/AID, и проведено всестороннее изучение особенностей активации целевых генов, эпигенетической модификации промоторов генов, экспрессии целевых белков, а также противовирусного и токсического действия, про-мутагенного и ДНК-повреждающей активности APOBEC/AID. Обнаружено, что краткосрочная активация APOBEC/AID значительно подавляет репликацию ВГВ, при этом вызывает дезаминирование ккзДНК ВГВ. Определены особенности дезаминирования, распространенности и нуклеотидного контекста дезаминирования, а также особенности и механизмы разрушения дезаминированных матриц ккзДНК ВГВ при CRISPR-активации APOBEC/AID. Анализ мутагенной активности выявил возможность внесения мутаций в геном человека даже при кратковременной гиперэкспрессии APOBEC/AID. Доказано, что мутагенная активность APOBEC/AID в отношении генома инфицированных клеток проявляется при снижении репликации ВГВ. Разработан и экспериментально валидирован подход по элиминации внецелевой, про-мутагенной активности APOBEC/AID факторов за счет использования аттенуированных (ослабленных) РНК-проводников. Обнаружено, что ослабленная активация APOBEC/AID в определенном диапазоне уровней активации

сохраняет выраженную противовирусную активность. Результаты подтверждены на наиболее продвинутых моделях ВГВ-инфекции клеток человека.

Выводы

- 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 APOBEC/AID, дезаминирования и разрушения ккзДНК ВГВ с помощью систем CRISPR-активации транскрипции с аттенуированными РНК-проводниками.
- 10) Цитидин-дезаминазы APOBEC/AID 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.

Список публикаций по теме диссертации

1. Brezgin S, Kostyusheva A, Bayurova E, Gordeychuk I, Isaguliants M, Goptar I, Nikiforova A, Smirnov V, Volchkova E, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. Replenishment of Hepatitis B Virus cccDNA Pool Is Restricted by Baseline Expression of Host Restriction Factors *In Vitro // Microorganisms*. 2019. 7(11):533. (SJR – 4.8; Q2). Доля участия=30%. 0,92 п.л.

2. Kostyusheva A, Brezgin S, Bayurova E, Gordeychuk I, Isaguliants M, Goptar I, Urusov F, Nikiforova A, Volchkova E, **Kostyushev D**, Chulanov V. ATM and ATR Expression Potentiates ВГВ Replication and Contributes to Reactivation of ВГВ Infection upon DNA Damage // *Viruses*. 2019. 11(11):997. (SJR – 4.8; Q1). Доля участия=40%. 0,98 п.л.

3. Костюшева А.П., **Костюшев Д.С.**, Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Волчкова Е.В., Чуланов В.П. Низкомолекулярные ингибиторы путей репарации двухцепочечных разрывов ДНК усиливают противовирусное действие системы CRISPR/Cas9 на моделях вируса гепатита В // *Молекулярная Биология*. 2019. Т.53. №1. С.1-13. (ИФ РИНЦ = 1.2). Доля участия=40%. 0,75 п.л.

[Kostyusheva AP, **Kostyushev DS**, Brezgin SA, Zarifyan DN, Volchkova EV, Chulanov VP. [Small Molecular Inhibitors of DNA Double Strand Break Repair Pathways Increase the ANTI-HBV Activity of CRISPR/Cas9] // *Molecular Biology (Moskva)*. 2019. 53(2):311-323. Russian. doi: 10.1134/S0026898419010075. (SJR – 0,153, Q4)]. Доля участия=40%. 0,75 п.л.

4. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Brezgin S, Zarifyan D, Utkina A, Goptar I, Chulanov V. Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of ВГВ cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9 // *Scientific Reports*. 2019. 9(1):1847. (SJR – 4.6, Q1). Доля участия=60%. 0,63 п.л.

5. Костюшева А.П., Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Чистяков Д.С., Гегечкори В.И., Баурова Е.О., Волчкова Е.В., **Костюшев Д.С.**, Чуланов В.П. Вирус гепатита В и сайт-специфические нуклеазы: влияние генетических модификаций CRISPR/Cas9 на противовирусную активность // *Инфекция и иммунитет*. 2019. Т. 9, No 2. С. 279–287. (ИФ РИНЦ = 0.647). Доля участия=20%. 0,46 п.л.

[Kostyusheva A.P., Brezgin S.A., Zarifyan D.N., Chistyakov D.S., Gegechkory V.I., Bayurova E.O., Volchkova E.V., **Kostyushev D.S.**, Chulanov V.P. Hepatitis B virus and site-specific nucleases: effects of genetic modifications in CRISPR/Cas9 on antiviral activity// *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*, 2019. 9(2): 279–287. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-279-28. (SJR – 0,17, Q4)]. Доля участия=20%. 0,46 п.л.

6. Брезгин С.А., Костюшева А.П., Смирский В.Н., Волчкова Е.В., Чистяков Д.С., **Костюшев Д.С.**, Чуланов В.П. Подавление цикла вируса гепатита В под действием нуклеолитических систем CRISPR/Cas9 и белка HBx // *Инфекция и иммунитет*. 2019. Т. 9, No 3–4. С. 476–484. (ИФ РИНЦ = 0.647). Доля участия=20%. 0,46 п.л.

[Brezgin S.A., Kostyusheva A.P., Simirsky V.N.c, Volchkova E.V., Chistyakov D.S., **Kostyushev D.S.**, Chulanov V.P. Suppression of hepatitis B virus by a combined activity of CRISPR/Cas9 and HBx proteins // *Russian Journal of Infection and Immunity = Infektsiya i immunitet*, 2019. 9(3–4): 476–484. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-476-484. (SJR – 0,17, Q4)]. Доля участия=20%. 0,46 п.л.

7. Bayurova E, Jansons J, Skrastina D, Smirnova O, Mezale D, Kostyusheva A, **Kostyushev D**, Petkov S, Podschwadt P, Valuev-Elliston V, Sasinovich S, Korolev S, Warholm P, Latanova A, Starodubova E, Tukhvatulin A, Latyshev O, Selimov R, Metalnikov P, Komarov A, Ivanova O, Gorodnicheva T, Kochetkov S, Gottikh M, Strumfa I, Ivanov A, Gordeychuk I, Isaguliants M. HIV-1 Reverse Transcriptase Promotes Tumor Growth and Metastasis Formation via ROS-

- Dependent Upregulation of Twist // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. 2019. 6016278. (SJR – 7.3, Q1). Доля участия=20%. 1,61 п.л.
8. Brezgin S, Kostyusheva A, Ponomareva N, Volia V, Goptar I, Nikiforova A, Shilovskiy I, Smirnov V, **Kostyushev D**, Chulanov V. Clearing of Foreign Episomal DNA from Human Cells by CRISPRa-Mediated Activation of Cytidine Deaminases // *International Journal of Molecular Sciences*. 2020. 21(18):6865. (SJR – 6.208, Q1). Доля участия=40%. 0,98 п.л.
9. Jansons J, Bayurova E, Skrastina D, Kurlanda A, Fridrihsone I, **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Artyuhov A, Dashinimaev E, Avdoshina D, Kondrashova A, Valuev-Elliston V, Latyshev O, Eliseeva O, Petkov S, Abakumov M, Hippe L, Kholodnyuk I, Starodubova E, Gorodnicheva T, Ivanov A, Gordeychuk I, Isagulians M. 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 (Basel)*. 2020. 8(2):318. (SJR – 7.8, Q1). Доля участия=20%. 2,42 п.л.
10. Batskikh S, Morozov S, Vinnitskaya E, Sbikina E, Borunova Z, Dorofeev A, Sandler Y, Saliev K, **Kostyushev D**, Brezgin S, Kostyusheva A, Chulanov V. May Previous Hepatitis B Virus Infection Be Involved in Etiology and Pathogenesis of Autoimmune Liver Diseases? // *Advances in Therapy*. 2022. 39(1):430-440. (SJR – 4.6, Q1). Доля участия=60%. 0,92 п.л.
11. А.П. Костюшева, С.А. Брезгин, Н.И. Пономарева, И.А. Гоптарь, А.В. Никифорова, В.И. Гегечкори, В.Б. Полэуктова, К.А. Туркадзе, А.Е. Судьина, В.П. Чуланов, **Д.С. Костюшев**. Противовирусное действие рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 на модели вируса гепатита В *in vivo* // *Молекулярная Биология*. Том 56(2022) №6 стр. 884-891; (ИФ РИНЦ = 1.2). Доля участия=40%. 0,40 п.л.
- [Kostyusheva AP, Brezgin SA, Ponomareva NI, Goptar IA, Nikiforova AV, Gegechkori VI, Poluektova VB, Turkadze KA, Sudina AE, Chulanov VP, **Kostyushev DS**. Antiviral Activity of CRISPR/Cas9 Ribonucleoprotein Complexes on a Hepatitis B Virus Model In Vivo]. *Molecular Biology (Moskva)*. 2022. 56(6):884-891. Russian. doi: 10.31857/S002689842206012X. (SJR – 0,153, Q4)]. Доля участия=40%. 0,40 п.л.
12. С.А. Брезгин, А.П. Костюшева, Н.И. Пономарева, В.И. Гегечкори, Н.П. Кирдяшкина, С.Р. Айвазян, Л.Н. Дмитриева, Л.Н. Кокорева, В.П. Чуланов, **Д.С. Костюшев**. Белок HBx потенцирует реактивацию вируса гепатита В // *Молекулярная Биология*. 2022. Т. 56. №5 стр. 783-794; (ИФ РИНЦ = 1.2). Доля участия=50%. 0,63 п.л.
- [Brezgin SA, Kostyusheva AP, Ponomareva NI, Gegechkori VI, Kirdyashkina NP, Ayvasyan SR, Dmitrieva LN, Kokoreva LN, Chulanov VP, Kostyushev DS. [HBx Protein Potentiates Hepatitis B Virus Reactivation]. *Molecular Biology (Moskva)*. 2022. 56(5):783-794. Russian. doi: 10.31857/S0026898422050044. (SJR – 0,153, Q4)]. Доля участия=50%. 0,63 п.л.
13. Batskikh S, Morozov S, **Kostyushev D**. Hepatitis B virus markers in hepatitis B surface antigen negative patients with pancreatic cancer: Two case reports // *World Journal of Hepatology*. 2022. 14(7):1512-1519. (SJR – 2.4, Q3). Доля участия=60%. 0,40 п.л.
14. Batskikh S, Morozov S, Dorofeev A, Borunova Z, **Kostyushev D**, Brezgin S, Kostyusheva A, Chulanov V. Previous hepatitis B viral infection-an underestimated cause of pancreatic cancer // *World Journal of Gastroenterology*. 2022. 28(33):4812-4822. (SJR – 4.3, Q1). Доля участия=40%. 0,58 п.л.
15. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Brezgin S, Ponomareva N, Zakirova NF, Egorshina A, Yanvarev DV, Bayurova E, Sudina A, Goptar I, Nikiforova A, Dunaeva E, Lisitsa T, Abramov I, Frolova A, Lukashev A, Gordeychuk I, Zamyatnin AA Jr, Ivanov A, Chulanov V. Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9 //

Molecular Therapy – Nucleic Acids. 2023. 31:482-493. (SJR – 8.8, Q1). Доля участия=60%. 0,63 п.л.

16. **Kostyushev Dmitry**, Brezgin Sergey, Kostyusheva Anastasiya, Ponomareva Natalia, Bayurova Ekaterina, Zakirova Natalia, Kondrashova Alla, Goptar Irina, Nikiforova Anastasiya, Sudina Anna, Babin Yurii, Gordeychuk Ilya, Lukashev Alexander, Zamyatnin Andrey A., Ivanov Alexander, Chulanov Vladimir. Transient and tunable CRISPRa regulation of APOBEC/AID genes for targeting hepatitis B virus // Molecular Therapy – Nucleic Acids. 2023. 32:478-493. (SJR – 8.8, Q1). Доля участия=50%. 0,86 п.л.

17. Kostyusheva A, **Kostyushev D**, Brezgin S, Volchkova E, Chulanov V. Clinical Implications of Hepatitis B Virus RNA and Covalently Closed Circular DNA in Monitoring Patients with Chronic Hepatitis B Today with a Gaze into the Future: The Field Is Unprepared for a Sterilizing Cure // Genes (Basel). 2018. 9(10):483 (SJR – 3.5, Q1). Доля участия=40%. 1,38 п.л.

18. 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. 2017. Т.89. №11. С. 4-13. (ИФ РИНЦ = 0.45). Доля участия=30%. 0,52 п.л.

[Chulanov VP, Zueva AP, **Kostyushev DS**, Brezgin SA, Volchkova EV, Maleyev VV. Gepatit S stal izlechim. Gepatit V - sleduiushchiy? [Hepatitis C can be cured: will hepatitis B become next?]. Terapevticheskii arkhiv. 2017. 89(11):4-13. Russian. doi: 10.17116/terarkh201789114-13. (SJR – 0,17, Q2)]. Доля участия=30%. 0,52 п.л.

19. Brezgin S, Kostyusheva A, **Kostyushev D**, Chulanov V. Dead Cas Systems: Types, Principles, and Applications // International Journal of Molecular Sciences. 2019. 20(23):6041. (SJR - 6.208) Доля участия=60%. 1,50 п.л.

20. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Brezgin S, Smirnov V, Volchkova E, Lukashev A, Chulanov V. Gene Editing by Extracellular Vesicles // International Journal of Molecular Sciences. 2020. 21(19):7362. (SJR – 6.208, Q1). Доля участия=80%. 2,07 п.л.

21. Chulanov V, Kostyusheva A, Brezgin S, Ponomareva N, Gegechkori V, Volchkova E, Pimenov N, **Kostyushev D**. CRISPR Screening: Molecular Tools for Studying Virus-Host Interactions // Viruses. 2021. 13(11):2258. (SJR – 4.8, Q1). Доля участия=40%. 1,04 п.л.

22. **Kostyushev D**, Kostyusheva A, Ponomareva N, Brezgin S, Chulanov V. CRISPR/Cas and Hepatitis B Therapy: Technological Advances and Practical Barriers // Nucleic Acids Therapeutics. 2022. 32(1):14-28. (SJR – 4.0, Q1). Доля участия=90%. 0,81 п.л.

23. Kostyusheva A, Brezgin S, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. Host-cell interactions in HBV infection and pathogenesis: the emerging role of m6A modification // Emerging Microbes and Infections. 2021. 10(1):2264-2275. (SJR – 12.19, Q1). Доля участия=50%. 0,63 п.л.

24. Brezgin S, Kostyusheva A, Bayurova E, Volchkova E, Gegechkori V, Gordeychuk I, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. Immunity and Viral Infections: Modulating Antiviral Response via CRISPR/Cas Systems // Viruses. 2021. 13(7):1373. (SJR – 4.8, Q1). Доля участия=20%. 2,13 п.л.

25. Kostyusheva A, Brezgin S, Babin Y, Vasilyeva I, Glebe D, **Kostyushev D**, Chulanov V. CRISPR/Cas systems for diagnosing infectious diseases // Methods. 2022. 203:431-446. (SJR – 4.647, Q1). Доля участия=50%. 0,86 п.л.