

# ВИРУС ГЕПАТИТА В И САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ НУКЛЕАЗЫ: ВЛИЯНИЕ ГЕНЕТИЧЕСКИХ МОДИФИКАЦИЙ CRISPR/Cas9 НА ПРОТИВОВИРУСНУЮ АКТИВНОСТЬ

А.П. Костюшева<sup>1</sup>, С.А. Брезгин<sup>1,2</sup>, Д.Н. Зарифьян<sup>1</sup>, Д.С. Чистяков<sup>4</sup>,  
В.И. Гегечкори<sup>4</sup>, Е.О. Баюрова<sup>3</sup>, Е.В. Волчкова<sup>4</sup>, Д.С. Костюшев<sup>1</sup>, В.П. Чуланов<sup>1,4</sup>

<sup>1</sup> ФБУН Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

<sup>2</sup> ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

<sup>3</sup> ФГБНУ Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов  
им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия

<sup>4</sup> ГБОУ ВПО Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия

**Резюме.** Хронический гепатит В — тяжелое заболевание печени, связанное с персистенцией вируса гепатита В в гепатоцитах человека. Хронический гепатит В является одним из самых распространенных заболеваний в мире. По обновленной статистике, более 250 млн человек хронически инфицированы, и более 1 млн человек умирают ежегодно из-за последствий ХГВ, цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы. Основная причина персистенции вируса гепатита В — особая суперспирализованная молекула кольцевой ковалентно замкнутой ДНК в ядре. Современные методы терапии подавляют вирусную инфекцию, но не действуют напрямую на матрицы кольцевой ковалентно замкнутой ДНК, поскольку она существует в ядре гепатоцитов в виде минихромосомы и является недоступной для действия противовирусных препаратов. Как правило, после прекращения курса терапии наступает реактивация инфекции, поэтому прием противовирусных препаратов может быть неопределенно долгим. Одной из современных технологий, способных действовать напрямую на кольцевую ковалентно замкнутую ДНК, является система сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 организма *Streptococcus pyogenes*. SpCas9 белок можно привлекать к участку ккЗДНК с помощью короткого РНК-проводника, в результате чего SpCas9 вносит двуцепочечные разрывы, разрушая или мутируя вирусный геном. Тем не менее на сегодняшний момент использование CRISPR/Cas9 для терапии хронического гепатита В сопряжено с рядом проблем, в том числе с такой, как внецелевое действие нуклеаз (разрезание генома клеток). В последние годы было заявлено о создании нескольких технологий, использование которых может усиливать нуклеолитическую активность CRISPR/Cas9 (модифицированные РНК-проводники) или увеличивать специфичность SpCas9 белка (eSpCas9, более безопасная форма классического белка Cas9). В этой работе было проведено сравнение противовирусного действия CRISPR/Cas9 с классической формой белка SpCas9 и белком eSpCas9 с модифицированными и немодифицированными РНК-проводниками на культуре клеток *in vitro*. Показано, что система SpCas9 подавляет транскрипцию и репликацию вируса гепатита В на 90%, а также снижает уровень ккЗДНК на 94%, тогда как противовирусный эффект при использовании eSpCas9 оказывается существенно ниже. Несмотря на то что мо-

## Адрес для переписки:

Костюшева Анастасия Павловна  
111123, Россия, Москва, ул. Новогиреевская, 3А,  
ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора.  
Тел.: 8 (925) 310-91-24.  
E-mail: ak@rcvh.ru

## Contacts:

Anastasiya P. Kostyusheva  
111123, Russian Federation, Moscow, Novogireevskaja str., 3A,  
Central Research Institute of Epidemiology.  
Phone: +7 (925) 310-91-24.  
E-mail: ak@rcvh.ru

## Библиографическое описание:

Костюшева А.П., Брезгин С.А., Зарифьян Д.Н., Чистяков Д.С.,  
Гегечкори В.И., Баюрова 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, № 2. С. 279–287.  
doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-279-287

## Citation:

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, vol. 9,  
no. 2, pp. 279–287. doi: 10.15789/2220-7619-2019-2-279-287

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 16-15-10426.

© Костюшева А.П. и соавт., 2019

DOI: <http://dx.doi.org/10.15789/2220-7619-2019-2-279-287>

дифицированные РНК-проводники должны улучшать нуклеолитическую активность CRISPR/Cas9 систем, модификация РНК-проводников также значительно снижает противовирусное действие CRISPR/Cas9. Таким образом, CRISPR/Cas9 сама по себе обладает высокой эффективностью действия, почти полностью блокируя транскрипцию и репликацию вируса гепатита В. Использование описанных технологий по улучшению свойств CRISPR/Cas9 нерационально при создании методов терапии на основе CRISPR/Cas9, а для элиминации генома вируса следует сосредоточиться на поиске эффективных РНК-проводников.

**Ключевые слова:** вирус гепатита В, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК, CRISPR/Cas9, специфичность, внецелевые эффекты, эффективность, модифицированные РНК-проводники.

## HEPATITIS B VIRUS AND SITE-SPECIFIC NUCLEASES: EFFECTS OF GENETIC MODIFICATIONS IN CRISPR/Cas9 ON ANTIVIRAL ACTIVITY

Kostyusheva A.P.<sup>a</sup>, Brezgin S.A.<sup>a,b</sup>, Zarifyan D.N.<sup>a</sup>, Chistyakov D.S.<sup>d</sup>, Gegechkory V.I.<sup>d</sup>, Bayurova E.O.<sup>c</sup>, Volchkova E.V.<sup>d</sup>, Kostyushev D.S.<sup>a</sup>, Chulanov V.P.<sup>a,d</sup>

<sup>a</sup> Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation

<sup>b</sup> Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

<sup>c</sup> Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products, Moscow, Russian Federation

<sup>d</sup> I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

**Abstract.** Chronic hepatitis B is a severe liver disease caused by persistent infection of hepatitis B virus in human hepatocytes. Chronic hepatitis B is one of the most common diseases in the world. According to recent estimations, more than 250 million people are chronically infected and more than 1 million of people die annually due to consequences of chronic hepatitis B: liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The key factor of hepatitis B virus persistency is a special form of viral genome called circular covalently closed DNA. Current therapeutics suppress viral replication but have no effect on circular covalently closed DNA as it exists in the nuclei of hepatocytes as a minichromosome and is not accessible for therapeutics. Commonly, viral reactivation occurs after cessation of treatment. Therefore, duration of antiviral treatment is supposed to be indefinitely long. One of the most promising approaches to target circular covalently closed DNA is the technology of site-specific nucleases CRISPR/Cas9 from *Streptococcus pyogenes*. A short guide RNA recruits an SpCas9 protein to the viral genome and induces generation of DNA double strand breaks. However, there are several limitations of CRISPR/Cas9 hampering translation of this technology into the clinic. First, efficacy of CRISPR/Cas9 needs to be improved. Second, CRISPR/Cas9-mediated off-target mutagenesis represents a menacing problem which has to be addressed. To overcome these limitations, several approaches have been devised to improve CRISPR/Cas9 activity (modification of guide RNAs) and reduce off-target mutagenesis (a Cas9 protein with enhanced specificity, eSpCas9). In this study, we compared antiviral activity of a classic SpCas9 with an eSpCas9 system as well as analyzed effects of gRNAs modification on anti-HBV effects. Here, we demonstrated that SpCas9 has the highest antiviral potency, reducing transcription and replication of HBV over 90%. Hepatitis B virus covalently closed circular DNA declined over 90% post CRISPR/Cas9 transfection. Although it was previously shown that modified guide RNAs increase nucleolytic activity of CRISPR/Cas9, our results indicated that this modification impairs antiviral activity of CRISPR/Cas9. To conclude, CRISPR/Cas9 effectively suppress viral replication and transcription *per se*. Described modifications do not potentiate antiviral activity of CRISPR/Cas9 system and should not be used for development of future therapeutics. The best strategy to improve CRISPR/Cas9 efficacy is to design new highly effective guide RNAs.

**Key words:** hepatitis B virus, circular covalently closed DNA, CRISPR/Cas9, specificity, off-target effects, efficiency, modified gRNAs.

## Введение

По оценкам ВОЗ смертность от вирусных гепатитов в мире с 2000 г. возросла на 22% и превысила таковую от ВИЧ-инфекции. В 2015 г. от вирусных гепатитов и их последствий — цирроза печени и гепатоцеллюлярной карциномы — умерло 1,34 млн человек [18]. Распространенность хронического гепатита В (ХГВ) в мире достигает 250 млн человек [7]. Причиной хронизации инфекции является особая форма генома вируса — кольцевая ковалентно замкнутая ДНК (ккзДНК), которая служит матрицей для транскрипции всех вирусных РНК [14]. Современные

подходы к лечению ХГВ основываются на применении препаратов интерферона и/или аналогов нуклеозидов/нуклеотидов (энтекавир, тенофовир). В первом случае эффективность лечения в целом невысока. Во втором случае лечение энтекавиром или тенофовиром позволяет подавить репликацию вируса гепатита В (ВГВ) практически у всех пациентов, однако для большинства срок лечения может быть неопределенно долгим [3, 8]. И в том, и в другом случае после завершения лечения вирусная репликация, как правило, возобновляется [10]. Несмотря на то что современные противовирусные препараты эффективно подавляют репликацию вируса,

ккзДНК ВГВ остается нечувствительной к противовирусной терапии [19]. Таким образом, для излечения пациентов, страдающих хроническим гепатитом В, необходима разработка новых, более эффективных препаратов, нацеленных на деградацию ккзДНК [1].

В ряде исследований было продемонстрировано, что сайт-специфичная эндонуклеаза CRISPR/Cas9 *Streptococcus pyogenes* может эффективно разрезать вирусный геном [5, 9, 13, 16, 22]. При действии эндонуклеаз снижаются уровни всех основных форм генома ВГВ и подавляется продукция вирусных белков. Однако на данный момент использование систем CRISPR/Cas9 для излечения ХГВ сопряжено с рядом нерешенных задач. На моделях ВГВ эффективность CRISPR/Cas9 систем остается невысокой и требует улучшения. В некоторых исследованиях под действием нуклеаз CRISPR/Cas9 происходило значительное снижение уровней HBsAg, поверхностного белка вируса, однако остаточная секреция HBsAg все же сохранялась, что свидетельствует об остаточной активности репликативно-компетентных матриц ккзДНК ВГВ и указывает на возможность реактивации инфекции после прекращения терапии [11, 16]. Действительно, остаточные матрицы после действия CRISPR/Cas9 продолжают транскрибироваться и производить вирусные белки [15].

Увеличение эффективности действия CRISPR/Cas9 на ккзДНК особенно важно, поскольку имеющиеся данные по разрушению генома ВГВ системами нуклеаз были получены на искусственных моделях, которые лишь частично имитируют жизненный цикл вируса и не повторяют особенностей ккзДНК в гепатоцитах пациентов с ХГВ. Известно, что ккзДНК существует в виде минихромосом, а у пациентов с ХГВ может персистировать в транскрипционно активном и неактивном состояниях. Часть матриц ккзДНК существует в гетерохроматизированном состоянии, недоступном для внешних воздействий [2, 12]. Следовательно, стоит ожидать, что система CRISPR/Cas9, разрушающая ккзДНК на моделях ВГВ, будет менее эффективна у пациентов с ХГВ.

В целях усиления нуклеолитического действия CRISPR/Cas9 ранее был предложен способ модификации шпильки РНК-проводника, необходимого для узнавания Cas9 белком целевой последовательности. Из 24 использованных в исследовании РНК-проводников, 18 модифицированных РНК-проводников продемонстрировали более высокую эффективность в разрезании целевой мишени. Предположительно, модификация РНК-проводников увеличивает сродство Cas9 белка к РНК-проводнику либо усиливает стабильность рибонуклеопротеинового комплекса [4].

Другим важным параметром работы CRISPR/Cas9 является специфичность действия, которая характеризует вероятность внесения разрывов ДНК и мутаций по нецелевым сайтам в геноме человека. Исходами внецелевого действия CRISPR/Cas9 могут стать генетические aberrации, нарушение работы генов, трансформация клеток и др. [21]. Следовательно, минимизация или полное устранение возможности внесения внецелевых разрывов необходимо для безопасного использования сайт-специфических нуклеаз у человека. Методами генной инженерии в ряде работ были созданы укороченные РНК-проводники [6], использованы комбинации РНК-проводников и белков Cas9 с низкой активностью (способностью разрезать одну цепь ДНК) [20], а также созданы мутантные формы белка Cas9 (enhanced SpCas9, eSpCas9), в меньшей степени способные к связыванию с нецелевыми матрицами ДНК [17].

В нашей работе было изучено влияние системы CRISPR/Cas9 с увеличенной специфичностью (eSpCas9) и/или модифицированными РНК-проводниками на транскрипцию и репликацию ВГВ в сравнении с классической системой CRISPR/Cas9. Выявлено, что классический белок Cas9 эффективно снижает транскрипцию вируса и уровни ккзДНК, в то время как eSpCas9 обладает менее выраженной эффективностью действия и не вызывает значительного подавления ВГВ. Модификация РНК-проводников существенно снижает противовирусную активность CRISPR/Cas9. Таким образом, можно заключить, что системы CRISPR/Cas9 обладают достаточной эффективностью действия и не требуют дополнительных модификаций.

## Материалы и методы

*Линии клеток.* Клетки гепатомы человека HepG2 культивировали в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л) (Thermo Fisher Scientific), 1% фетальной бычьей сыворотки (Gibco), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина и 2 мМ L-глутамин при 37°C (5% CO<sub>2</sub>). Клетки рассаживали в 24-луночные планшеты с 60% плотностью, трансфицировали плазмидой, кодирующей геном ВГВ (HBV-1.1-mer, предоставлена Dieter Glebe, Университет Гиссена), или 1.0-mer кольцевым геном ВГВ, плазмидой Cas9-P2A-EGFP (предоставлена Phil Sharp и Feng Zhang, Addgene plasmid #63592), или плазмидой, кодирующей высокоспецифичный белок Cas9 (eSpCas9) предоставлено Feng Zhang, Addgene plasmid #71814) и ПЦР-продуктом, кодирующим немодифицированный или модифицированный РНК-проводник под U6-промотором (плазмида для получения ПЦР-продукта предоставле-

на Eric Lander и David Sabatini, Addgene plasmid #50662) при помощи полиэтиленimina. Через 24 ч среду отбирали, клетки промывали дважды фосфатным буфером, меняли среду на полную и инкубировали в течение еще 48 ч.

*Получение рекомбинантной ккзДНК ВГВ.* Линейный геном ВГВ получали с помощью рестрикции ДНК ВГВ-содержащей плазмиды рСН-НВВ (предоставлено Dieter Glebe, Университет Гиссена) с помощью рестрикции ферментами PstI и PstI в буфере Y (Сибензим), как показано ранее. Линейный геном ВГВ (3182 пары нуклеотидов) был очищен с помощью гель-электрофореза и выделен из геля набором Qiagen gel extraction kit. Религирование цепей ДНК ВГВ проводили с ДНК-лигазой T4 (Thermo Fisher Scientific) при комнатной температуре ночью, продукты лигирования осаждали изопропанолом и очищали гель-электрофорезом. Фрагмент кольцевой полноразмерной ДНК ВГВ вырезали из геля и выделяли набором Qiagen gel extraction kit.

*Дизайн РНК-проводников и получение ПЦР-продуктов.* Мишени в геноме ВГВ были подобраны с использованием сервиса Broad Institute Genetic Perturbation Platform (portals.broadinstitute.org) и программы Geneious 7.1.9. ПЦР-продукт с У6-промотором, кодирующий классический или модифицированный РНК-проводник, получали при помощи двухэтапного мутагенного ПЦР с высокоточной полимеразой Q5 (New England Biolabs), с проведением амплификации с плазмиды pLX-sgRNA (Addgene plasmid #50662). РНК-проводник содержит мишень в геноме ВГВ и шпильку, необходимую для распознавания белком *S. pyogenes* Cas9. Праймеры, использованные для синтеза РНК-проводников, указаны в таблице.

*Микроскопия.* Клетки после трансфекции анализировали на микроскопе Olympus IX71 при 488 нм и методом микроскопии в светлом поле при 10-кратном увеличении.

*Выделение нуклеиновых кислот* проводили с помощью набора AmpliSens «РИБО-преп» по протоколу производителя, добавляя лизирующий буфер непосредственно к клеткам после удаления среды и двукратного промывания фосфатным буфером. Для выделения прегеномной РНК ВГВ, нуклеиновые кислоты обрабатывали ДНКазой I типа без РНКазной активности (Thermo Fisher Scientific) в течение 30 мин при 37°C, после чего РНК перевыделяли с помощью набора AmpliSens «РИБО-преп» и проводили постановку обратной транскрипции с помощью набора AmpliSens «РЕВЕРТА-Л». Для выделения ккзДНК ВГВ, ДНК обрабатывали в течение 12 ч ферментом Plasmid-safe ATP-dependent DNase (Epicentre) при 37°C для разрушения всех форм ДНК, кроме ккзДНК с последующей инактивацией фермента в течение 30 мин при 70°C.

*Полуколичественный ПЦР-анализ* проводили со специфическими праймерами и зондами TaqMan на прегеномную РНК ВГВ (пгРНК), S-РНК ВГВ, GAPDH, ДНК ВГВ,  $\beta$ -глобина генома, ккзДНК ВГВ (см. табл.). Праймеры на  $\beta$ -глобин были использованы из набора «Амплисенс HBV monitor-FL».

*Статистическую обработку* проводили с помощью t-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (где применимо) с использованием программного обеспечения IBM SPSS Statistics 19.0.0.0, попарные апостериорные сравнения производили с помощью критерия Тьюки.

## Результаты

### Активность систем CRISPR/Cas9 на уровне транскрипции ВГВ

Были созданы 4 РНК-проводника, нацеленные на регуляторные и кодирующие участки генома ВГВ: Sg1, Sg2, Sg3, Sg4 (рис. 1А, II обложка). Мишенями РНК-проводников в геноме ВГВ были регионы полимеразы ВГВ и Эхансера I (Sg1), а также полимеразы и X-белка (Sg2, Sg3, Sg4). Клетки HepG2 были котрансфицированы рекомбинантной ккзДНК (рккзДНК), плазмидой, кодирующей белок SpCas9 либо eSpCas9, и ПЦР-продуктом под У6-промотором, кодирующим РНК-проводник с немодифицированной (Sg1–4) либо с модифицированной (Sg1X–4X) шпилькой. Противовирусное действие оценивали на 4 сутки после трансфекции по снижению транскрипции прегеномной РНК (пгРНК) и S-РНК относительно контрольного образца (схема эксперимента представлена на рисунке 1Б, II обложка). Эффективность трансфекции составила 25% (рис. 1В, II обложка). ВГВ характеризуется малой кодирующей емкостью, поэтому двуцепочечный разрыв в любом участке генома может приводить к мутациям со сдвигами рамок считывания и снижению транскрипции ккзДНК (уровни пгРНК и S-РНК). Снижение транскрипции и репликации вируса также может быть связано с деградацией ккзДНК после действия CRISPR/Cas9.

Каждый из 4 немодифицированных РНК-проводников системы SpCas9 значительно подавляет транскрипцию ВГВ (от 50 до 90%) (рис. 2А, Б). Наиболее эффективным оказался РНК-проводник Sg1, который снижает уровень пгРНК на 76%, а уровень S-РНК на 90%. РНК-проводники с модифицированными шпильками оказывали значительно менее выраженный противовирусный эффект. Максимальное снижение транскрипции ВГВ составляло всего 30% (рис. 2А, Б). Подавление транскрипции ВГВ с помощью CRISPR/Cas9 с любым из использованных РНК-проводников с модифици-



**Таблица. Список праймеров и зондов**

Table. List of primers and probes

Мишень Target	Тип Type	Последовательность Sequence	Т отжига Annealing T
ккзДНК cccDNA	Прямой Forward	5'-CCGTGTGCACTTCGCTTCA-3'	60°C
	Обратный Reverse	5'-GCACAGCTTGGAGGCTTGA-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-CATGGAGACCACCGTGAACGCCC-3' (BHQ1)	
пгРНК pgRNA	Прямой Forward	5'-GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT-3'	62°C
	Обратный Reverse	5'-CATTGAGATTCCTCGAGATTGAGAT-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-TCTCAATCGCCGCGTCGCAGA-3' (BHQ1)	
мРНК GAPDH GAPDH mRNA	Прямой Forward	5'-CAACGGATTTGGTCGTATTGG-3'	51°C
	Обратный Reverse	5'-GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTA-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-CGCCTGGTCACCAGGGCTGC-3' (BHQ1)	
S-РНК S-RNA	Прямой Forward	5'-TCCTCCAACCTTGCTCTGTTATC-3'	60°C
	Обратный Reverse	5'-AGATGAGGCATAGCAGCAGGAT-3'	
	Зонд Probe	(FAM) 5'-ATGATAAAACGCCGCAGACACATCCAGC-3' (BHQ1)	
Sg1/Sg1X	Прямой (Sg1) Forward	5'-TCCGCAGTATGGATCGGCAGGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg1X) Forward	5'-TCCGCAGTATGGATCGGCAGGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-CTGCCGATCCATACTGCGGACGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Sg2/Sg2X	Прямой (Sg2) Forward	5'-GCAGATGAGAAGGCACAGACGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg2X) Forward	5'-GCAGATGAGAAGGCACAGACGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-GTCTGTGCCTTCTCATCTGCCGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Sg3/Sg3X	Прямой (Sg3) Forward	5'-GAGGTGAAGCGAAGTGCACAGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg3X) Forward	5'-GAGGTGAAGCGAAGTGCACAGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-TGTGCACTTCGCTTCACCTCCGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Sg4/Sg4X	Прямой (Sg4) Forward	5'-CTTCACCTCTGCACGTGCGAGTTTTAGAGCTAGAAATAG-3'	55°C
	Прямой (Sg4X) Forward	5'-CTTCACCTCTGCACGTGCGAGTTTTGAGCTATGCTGGAAACAGCATAGC AAGTTGAAATAAAGGC-3'	
	Обратный Reverse	5'-TGCGACGTGCAGAGGTGAAGCGGTGTTCGTCCTTTC-3'	
Праймеры для получения ПЦР продуктов Primers for synthesis of PCR-products	Прямой Forward	5'-TATATAGGATCCGAGGGCCTATTTCCCATGATTCCTTCATATTTG-3'	50°C
	Обратный Reverse	TATATAGCTAGCAAAAAAAGCACCGACTCGG-3'	

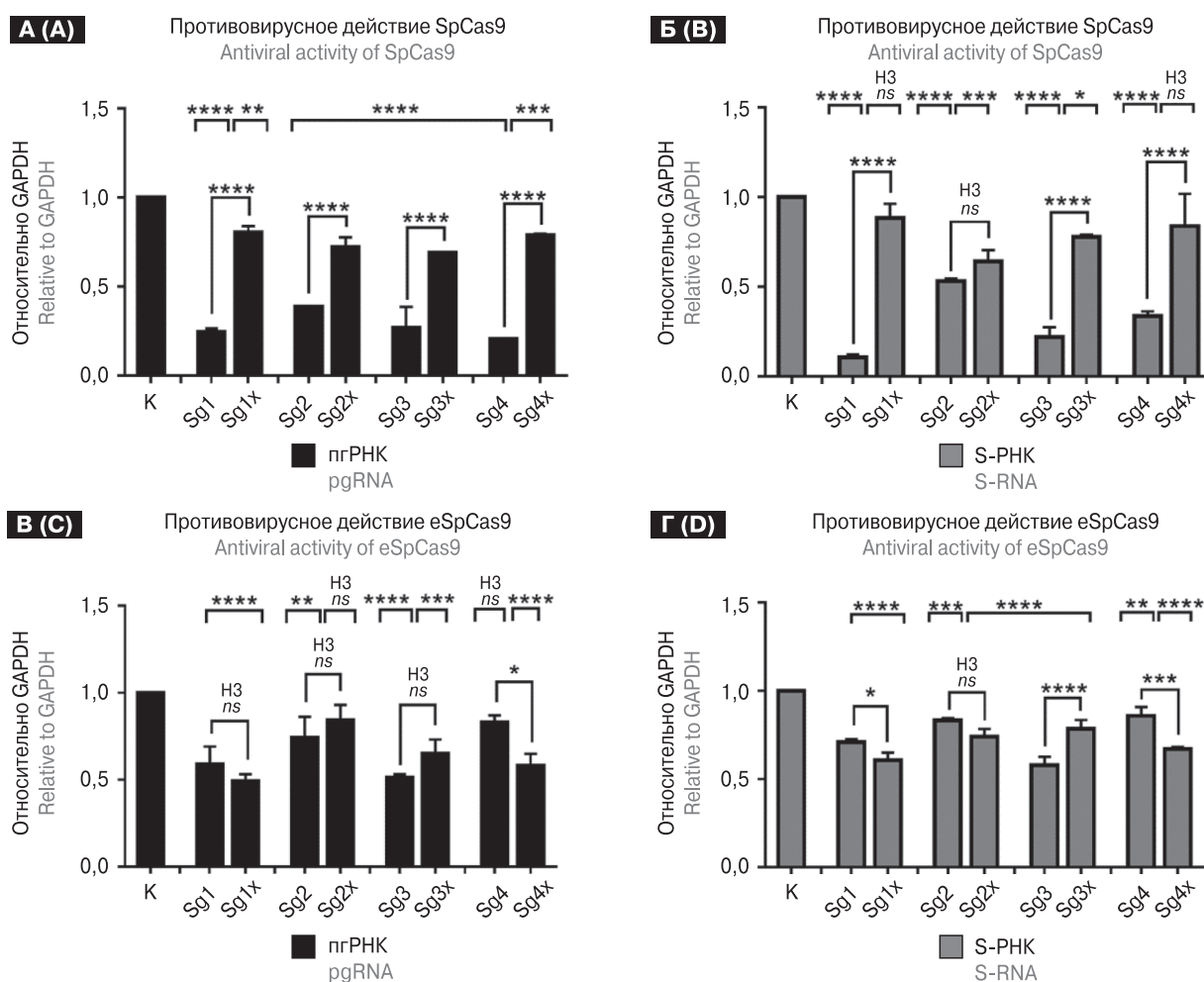
рованной шпилькой статистически значимо ниже, чем при использовании классической системы CRISPR/Cas9. Снижение уровней пгРНК и S-РНК было более выраженным с немодифицированными РНК-проводниками на 55% (рис. 2А) и 78% (рис. 2Б) соответственно.

Помимо классической системы SpCas9, указанные РНК-проводники были использованы для подавления транскрипции ВГВ с модифицированным белком eSpCas9. По результатам оценки транскрипции ВГВ eSpCas9 показал значительно меньший противовирусный эффект, чем классический белок SpCas9. Использование немодифицированного РНК-проводника Sg1 достигалось снижение пгРНК всего лишь на 41%,

а S-РНК — на 30%, что на 35 и 60% менее эффективно, чем при использовании классического белка (рис. 2В, Г). Таким образом, модификация РНК-проводника и использование мутантной формы SpCas9 белка снижает противовирусное действие системы CRISPR/Cas9 на модели ВГВ.

**Подавление транскрипции и репликации ВГВ системами CRISPR/Cas9**

Использование CRISPR/Cas9 для лечения ХГВ рационально прежде всего потому, что основной компонент жизненного цикла ВГВ, ответственный за персистенцию вируса, представляет собой двуцепочечный ДНК-содержащий геном (ккзДНК). Разрушение ккзДНК явля-



**Рисунок 2. Действие CRISPR/Cas9 на транскрипцию ВГВ**

Figure 2. Effects of CRISPR/Cas9 systems on HBV transcription

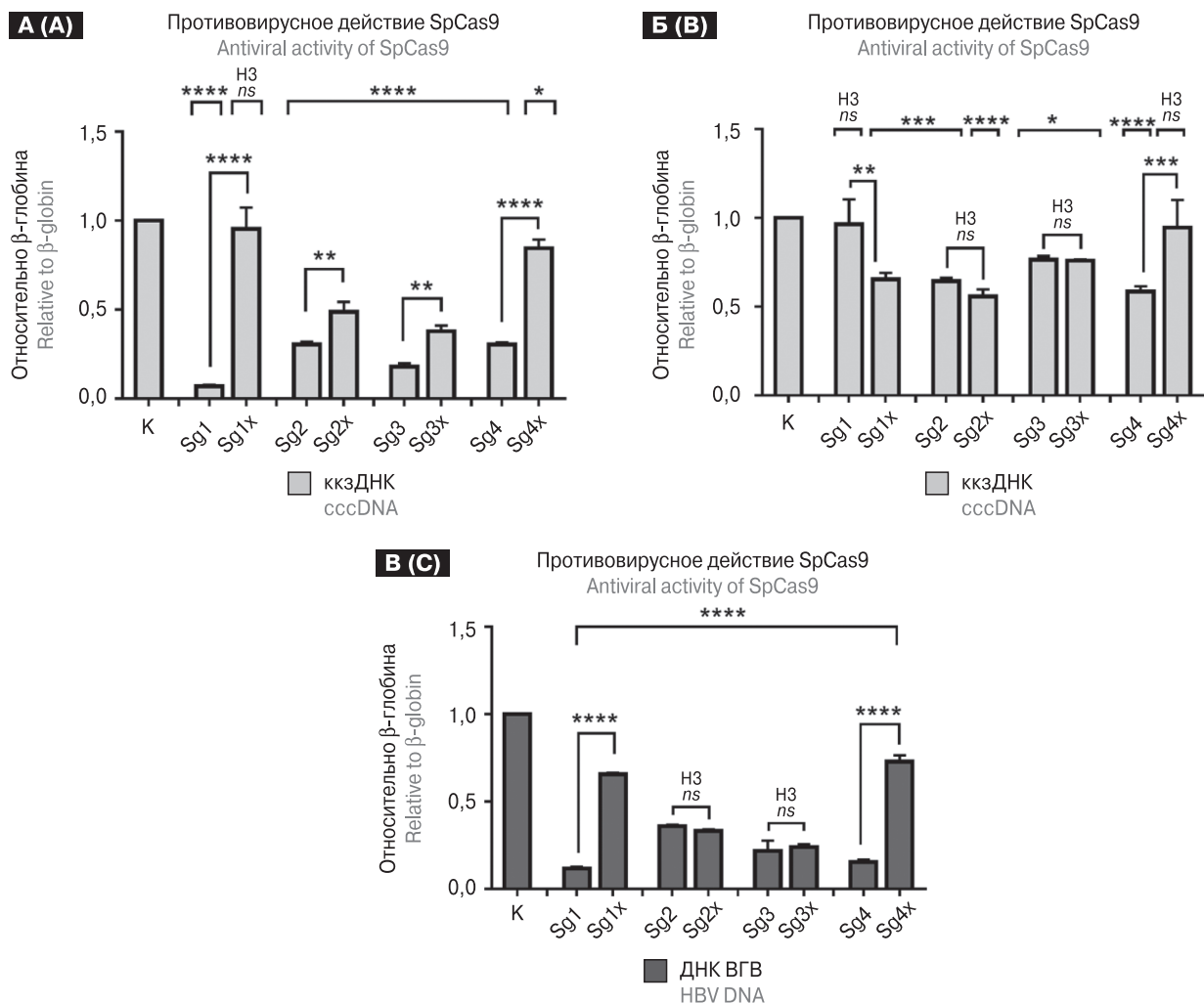
А-Б) Экспрессия пгРНК (А) и S-РНК (Б) относительно мРНК Cas9 после действия SpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками. В-Г) Экспрессия пгРНК (В) и S-РНК (Г) относительно мРНК Cas9 после действия eSpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \*p < 0,05, \*\*p < 0,01, \*\*\*p < 0,001, \*\*\*\*p < 0,0001, H3 — незначимые отличия. В верхней части графика указаны статистические отличия экспериментальных групп от группы контроля.

A-B) pgRNA (A) and S-RNA (B) expression levels relative to Cas9 mRNA after transfection of SpCas9 with modified/unmodified gRNAs. C-D) pgRNA (C) and S-RNA (D) expression levels relative to Cas9 mRNA after transfection eSpCas9 with modified/unmodified guide. The data presented as mean±standard deviation. \*p < 0.05, \*\*p < 0.01, \*\*\*p < 0.001, \*\*\*\*p < 0.0001, ns — difference is not significant. Significant difference in experimental vs. control group is depicted on the top of each graph.

ется основной целью противовирусной терапии с помощью CRISPR/Cas9. Для изучения действия систем CRISPR/Cas9 на ккзДНК и репликацию ВГВ, была использована модель котрансфекции клеток HepG2 системами CRISPR/Cas9 и рккзДНК, полученной с помощью лигирования *in vitro*. SpCas9 с немодифицированными РНК-проводниками ожидаемо снижал уровни ккзДНК на 70–96% (рис. 3А). Для модифицированных РНК-проводников уровень ккзДНК снижается на 65, 33, 23, 72% для РНК-проводников Sg1X, Sg2X, Sg3X, Sg4X соответственно. При этом эффективность дей-

ствия этих РНК-проводников ниже, чем у классических РНК-проводников на 89, 18, 20 и 54%. Как на уровне транскрипции, так и на уровне ккзДНК eSpCas9 действовал гораздо менее выразительно, чем SpCas9: для Sg1 с eSpCas9 относительное число матриц ккзДНК не отличалось от контрольного значения (снижение на 4%), в то время как Sg1 с SpCas9 снижал пул ккзДНК на 93% (рис. 3Б).

В дополнение, для оценки изменения в продукции вирионов, было проведено измерение уровней секретируемой ДНК ВГВ при действии SpCas9. Продукция вирусных частиц снижалась



**Рисунок 3. Действие CRISPR/Cas9 на уровни ккзДНК и ДНК ВГВ**

Figure 3. Effects of CRISPR/Cas9 systems on cccDNA and HBV DNA levels

А) Уровни ккзДНК после действия SpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками; В) уровни ккзДНК после действия eSpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками; С) уровни секретируемой ДНК ВГВ после действия SpCas9 с модифицированными/немодифицированными РНК-проводниками. Уровни ДНК ВГВ и ккзДНК ВГВ нормализованы относительно ДНК плазмид Cas9. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. \* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$ , \*\*\*\* $p < 0,0001$ , H3 — не значимые отличия. В верхней части графика указаны статистические отличия экспериментальных групп от группы контроля.

A) cccDNA levels after transfection of SpCas9 with modified/unmodified gRNAs; B) cccDNA levels after transfection of eSpCas9 with modified/unmodified gRNAs; C) HBV DNA levels after SpCas9 editing with modified/unmodified gRNAs. cccDNA and HBV DNA levels are measured relative to Cas9 expressing plasmid level. The data presented as mean±standard deviation.

\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ , ns — difference is not significant. Significant difference in experimental vs. control group is depicted on the top of each graph.

для всех классических РНК-проводников ( $p < 0,0001$ ), максимальное снижение на 89% наблюдается при использовании РНК-проводника Sg1 (рис. 3B).

## Обсуждение

Системы CRISPR/Cas9 — многообещающие молекулярные инструменты, которые обладают колоссальным потенциалом для разработки противовирусных лекарственных средств, в том числе против неизлечимых, хронических инфекционных заболеваний. CRISPR/Cas9 просты в использовании, обладают высокой эффективностью действия и могут быть оптимизированы для расщепления практически любой последовательности вирусного генома. В последние годы был опубликован ряд научных работ по действию CRISPR/Cas9 систем на ВГВ как *in vitro*, так и *in vivo* [5, 9, 13, 16, 22]. Упомянутые исследования проводились на различных моделях репликации ВГВ и показали значительное подавление вирусной инфекции. В данной работе был создан набор эффективных РНК-проводников, включая Sg1, который снижает уровень транскрипции вируса на 90%, уровни ккзДНК — на 94%, а уровень секретируемой ВГВ ДНК — на 89%, что свидетельствует о почти полном подавлении транскрипции и репликации вируса.

В данной работе также была изучена возможность улучшения системы CRISPR/Cas9 за счет использования мутантной формы белка eSpCas9 и модифицированных РНК-проводников. В структуре эффекторного белка eSpCas9 имеется положительно заряженная полость, которая участвует в стабилизации цепи ДНК при гибридизации РНК-проводника. При уменьшении положительного заряда связывающей полости путем замены положительно заряженных аминокислот данной области на нейтральные, связывание Cas9 белка с нецелевыми цепями ослабевает, и вероятность расщепления

нецелевых мишеней в геноме снижается. Таким образом, eSpCas9 можно считать более безопасным аналогом классического белка SpCas9 [17]. В нашей работе показано, что несмотря на более высокую специфичность, система eSpCas9 обладает очень низкой эффективностью действия по сравнению с классической SpCas9. Модификация РНК-проводников также не улучшает анти-ВГВ активность CRISPR/Cas9. Несмотря на то что в работе Dang с соавт. [4] было показано, что модификация РНК-проводников может увеличивать эффективность генетического редактирования, не подвергшиеся модификации РНК-проводники подавляют транскрипцию и репликацию ВГВ гораздо более эффективно (вплоть до 90%). Все изученные параметры вирусного цикла (пгРНК, S-РНК, ккзДНК, ДНК ВГВ) снижались под действием классической системы CRISPR/Cas9 более значительно, чем при использовании любой из возможных модификаций.

Таким образом, можно сделать вывод о том, что созданный ранее белок Cas9 с улучшенной специфичностью и модификация РНК-проводников значительно снижают противовирусное действие CRISPR/Cas9 на модели ВГВ. С другой стороны, классическая система SpCas9 сама по себе имеет очень высокую эффективность действия и практически полностью подавляют транскрипцию и репликацию ВГВ. По мнению авторов, для создания терапевтического подхода на основе CRISPR/Cas9 следует сосредоточиться не на улучшении компонентов классической системы *S. pyogenes* CRISPR/Cas9, а на создании эффективных РНК-проводников (например, Sg1) и поиске более специфичных систем CRISPR/Cas9 с меньшей способностью вносить внецелевые разрывы в ДНК (например, ортологичных систем CRISPR/Cas9). Использование CRISPR/Cas9 в комбинации с современными препаратами интерферона или аналогов нуклеоз(т)идов может стать основой для разработки подходов к противовирусной терапии ХГВ с полной элиминацией вируса.

## Список литературы/References

1. Чуланов В.П., Зуева А.П., Костюшев Д.С., Брезгин С.А., Волчкова Е.В., Малеев В.В. Гепатит С стал излечим. Гепатит В следующий? // Терапевтический архив. 2017. Т. 89, № 11. С. 4–13. [Chulanov V.P., Zueva A.P., Kostyushev D.S., Brezgin S.A., Volchkova E.V., Maleev V.V. Hepatitis C can be cured: will hepatitis B become next? *Terapevticheskiy arkhiv = Therapeutic Archive* 2017, vol. 89, no. 11, pp. 4–13. doi: 10.17116/terarkh201789114-13 (In Russ.)]
2. Allweiss L., Dandri M. The role of cccDNA in HBV maintenance. *Viruses*, 2017, vol. 9, no. 2, p. 156. doi: 10.3390/v9060156
3. Chang T.T., Lai C.L., Kew Yoon S. Entecavir treatment for up to 5 years in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. *Hepatology*, 2010, vol. 51, no. 2, pp. 422–430. doi: 10.1002/hep.23327
4. Dang Y., Jia G., Choi J. Optimizing sgRNA structure to improve CRISPR-Cas9 knockout efficiency. *Genome Biol.*, 2015, vol. 16, p. 280. doi: 10.1186/s13059-015-0846-3
5. Dong C., Qu L., Wang H., Wei L., Dong Y., Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res.*, 2015, vol. 118, pp. 110–117. doi: 10.1016/j.antiviral.2015.03.015
6. Fu Y., Sander J.D., Reyon D., Cascio V.M., Joung J.K. Improving CRISPR-Cas nuclease specificity using truncated guide RNAs. *Nat. Biotechnol.*, 2014, vol. 32, no. 3, pp. 279–284. doi: 10.1038/nbt.2808
7. Ganem D., Prince A.M. Hepatitis B virus infection — natural history and clinical consequences. *N. Engl. J. Med.*, 2004, vol. 350, no. 11, pp. 1118–1129. doi: 10.1056/NEJMra031087



8. Janssen H.L.A., Zonneveld M., Senturk H. Pegylated interferon alfa-2b alone or in combination with lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B: a randomised trial. *Lancet*, 2005, vol. 365, no. 9454, pp. 123–129. doi: 10.1016/S0140-6736(05)17701-0
9. Karimova M., Beschorner N., Dammermann W. CRISPR/Cas9 nickase-mediated disruption of hepatitis B virus open reading frame S and X. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, p. 13734. doi: 10.1038/srep13734
10. Lim S.G., Wai C.T., Rajnakova A., Kajiji T., Guan R. Fatal hepatitis B reactivation following discontinuation of nucleoside analogues for chronic hepatitis B. *Gut*, 2015, vol. 51, no. 4, pp. 597–599. doi: 10.1136/gut.51.4.597
11. Lin S.R., Yang H.C., Kuo Y.T. The CRISPR/Cas9 system facilitates clearance of the intrahepatic HBV templates in vivo. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2014, vol. 3: e186. doi: 10.1038/mtna.2014.38
12. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, 2015, vol. 64, iss. 12, pp. 1972–1984. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309809
13. Ramanan V., Shlomai A., Cox D.B.T. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5, p. 10833. doi: 10.1038/srep10833
14. Seeger C., Mason W.S. Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 2000, vol. 64, no. 1, pp. 51–68. doi: 10.1128/MMBR.64.1.51-68.2000
15. Seeger C., Sohn J.A. Complete spectrum of CRISPR/Cas9-induced mutations on HBV cccDNA. *Mol. Ther.*, 2016, vol. 24, no. 7, pp. 1258–1266. doi: 10.1038/mt.2016.94
16. Seeger C., Sohn J.A. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2014, vol. 3: e216. doi: 10.1038/mtna.2014.68
17. Slaymaker I.M., Gao L., Zetsche B., Scott D.A., Yan W.X., Zhang F. Rationally engineered Cas9 nucleases with improved specificity. *Science*, 2016, vol. 351, no. 6268, pp. 84–88. doi: 10.1126/science.aad5227
18. WHO. Global hepatitis report 2017. *World Health Organization*, 2017.
19. Yang H.C., Kao J.H. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerg. Microbes Infect.*, 2014, vol. 3, no. 9: e64. doi: 10.1038/emi.2014.64
20. Yin H., Xue W., Chen S. Genome editing with Cas9 in adult mice corrects a disease mutation and phenotype. *Nat. Biotechnol.*, 2014, vol. 32, no. 6, pp. 551–553. doi: 10.1038/nbt.2884
21. Zhang X.H., Tee L.Y., Wang X.G., Huang Q.S., Yang S.H. Off-target effects in CRISPR/Cas9-mediated genome engineering. *Mol. Ther. Nucleic Acids*, 2015, vol. 4: e264. doi: 10.1038/mtna.2015.37
22. Zhu W., Xie K., Xu Y. CRISPR/Cas9 produces anti-hepatitis B virus effect in hepatoma cells and transgenic mouse. *Virus Res.*, 2016, vol. 217, pp. 125–132. doi: 10.1016/j.virusres.2016.04.003

**Авторы:**

**Костюшева А.П.**, младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Брезгин С.А.**, младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; аспирант лаборатории № 73 клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии, Москва, Россия;

**Зарифьян Д.Н.**, лаборант-исследователь лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Чистяков Д.С.**, лаборант лаборатории вирусных гепатитов, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

**Гегечкори В.И.**, к.ф.н., старший преподаватель, ассистент кафедры фармацевтической и токсикологической химии им. А.П. Арзамасцева, ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

**Баюрова Е.О.**, младший научный сотрудник лаборатории моделирования иммунобиологических процессов с экспериментальной клиникой игрунковых обезьян отдела инновационных биотехнологических препаратов ФГБНУ ФНЦ исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, Россия;

**Волчкова Е.В.**, д.м.н., профессор кафедры инфекционных болезней, зав. кафедрой инфекционных болезней медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;

**Костюшев Д.С.**, младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов, ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;

**Чуланов В.П.**, д.м.н., зав. лабораторией вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; профессор кафедры инфекционных болезней медико-профилактического факультета ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия.

**Authors:**

**Kostyusheva A.P.**, Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Brezgin S.A.**, Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; PhD Student, Laboratory No. 73 of Clinical Pharmacology, Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation;

**Zarifyan D.N.**, Research Technician, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Chistyakov D.S.**, Technician, Laboratory of Viral Hepatitis, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Gegechkory V.I.**, PhD (Pharmaceutical Sciences), Senior Faculty Member, Assistant Professor, A.P. Arzamastsev Department of Pharmaceutical and Toxicological Chemistry, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Bayurova E.O.**, Junior Researcher, Laboratory of Immunobiological Processes Modeling with the Experimental Clinic of the Marmosets of the Department of Innovative Biotechnological Preparations, Chumakov Federal Scientific Center for Research and Development of Immune-and-Biological Products of RAS, Moscow, Russian Federation;

**Volchkova E.V.**, PhD, MD (Medicine), Professor of the Department of Infectious Diseases, Head of the Department of Infectious Diseases, Preventive Medicine Department, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;

**Kostyushev D.S.**, Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;

**Chulanov V.P.**, PhD, MD (Medicine), Head of the Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; Professor, Department of Infectious Diseases, Preventive Medicine Department, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 13.09.2018  
Отправлена на доработку 11.03.2019  
Принята к печати 15.03.2019

Received 13.09.2018  
Revision received 11.03.2019  
Accepted 15.03.2019