

ПОДАВЛЕНИЕ ЦИКЛА ВИРУСА ГЕПАТИТА В ПОД ДЕЙСТВИЕМ НУКЛЕОЛИТИЧЕСКИХ СИСТЕМ CRISPR/Cas9 И БЕЛКА HBx

С.А. Брезгин^{1,2}, А.П. Костюшева¹, В.Н. Смирский³, Е.В. Волчкова⁴,
Д.С. Чистяков⁴, Д.С. Костюшев¹, В.П. Чуланов^{1,4}

¹ ФБУН Центральный НИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия

² ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия

³ Институт биологии развития имени Н.К. Кольцова РАН, Москва, Россия

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

Резюме. Вирус гепатита В (ВГВ) может вызывать хронический гепатит В (ХГВ) — тяжелое хроническое заболевание печени инфекционной природы. По последним данным официального статистического наблюдения, число больных ХГВ в мире превышает 250 млн человек, а в Российской Федерации составляет около 3 млн человек. Противовирусные препараты (аналоги нуклеоз(т)идов и пегилированный интерферон) подавляют репликацию и транскрипцию вируса, однако не способны полностью элиминировать его из организма. Причиной этого является стабильная форма генома ВГВ — кольцевая ковалентно замкнутая ДНК (ккзДНК), которая представляет из себя компактную минихромосому, экранированную от воздействия противовирусных препаратов. Необходимым шагом для излечения ХГВ является разработка новых терапевтических подходов, направленных на разрушение или инактивацию матриц ккзДНК. Системы сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 способны вносить двуцепочечные разрывы в практически любые заданные участки ДНК. Ранние работы по использованию сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 для ВГВ продемонстрировали эффективное разрезание ккзДНК, однако деградации всех матриц добиться не удалось. Вероятно, причиной этого являются структурные особенности ккзДНК, которая может существовать в гетерохроматизированном состоянии, недоступном для действия белков-нуклеаз CRISPR/Cas9. Один из активаторов транскрипции, вирусный белок HBx, способен релаксировать структуру ккзДНК, привлекая к ним факторы, ремоделирующие хроматин. Белок HBx активирует транскрипцию ВГВ и способствует расплетению структуры ккзДНК, делая ее более доступной для систем CRISPR/Cas9. В данной работе было изучено влияние белка HBx дикого типа, а также мутантных, более безопасных форм HBx белка (HBxMut, который не взаимодействует с факторами Vcl-2 и Vcl-xL, и HBxNESM, который не вызывает образование активных форм кислорода и не индуцирует двуцепочечные разрывы в геноме) на эффективность систем CRISPR/Cas9. Выяснилось, что Hbx белок и его мутантные формы способны значительно увеличить эффективность систем CRISPR/Cas9, подавляя транскрипцию вирусной прегеномной РНК вплоть до 98%. Были определены оптимальные соотношения и концентрации плазмид, кодирующих элементы систем CRISPR/Cas9 и белков HBx. Кроме того, было показано, что белки HBx в выбранном диапазоне концентраций не вы-

Адрес для переписки:

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

Contacts:

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

Библиографическое описание:

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, № 3–4. С. 476–484.
doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-476-484

Citation:

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, vol. 9,
no. 3–4, pp. 476–484. doi: 10.15789/2220-7619-2019-3-4-476-484

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

зывают изменений пролиферации и жизнеспособности клеток. Таким образом, совместное действие систем сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 и вирусного белка-активатора HBx значительно подавляет транскрипцию вируса гепатита В.

Ключевые слова: вирус гепатита В, кольцевая ковалентно замкнутая ДНК, CRISPR/Cas9, белок HBx, мутантные формы белка HBx.

SUPPRESSION OF HEPATITIS B VIRUS BY A COMBINED ACTIVITY OF CRISPR/Cas9 AND HBx PROTEINS

Brezgin S.A.^{a,b}, Kostyusheva A.P.^a, Simirsky V.N.^c, Volchkova E.V.^d, Chistyakov D.S.^d, Kostyushev D.S.^a, Chulanov V.P.^{a,d}

^a Central Research Institute of Epidemiology, Rospotrebnadzor, Moscow, Russian Federation

^b Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation

^c Koltzov Institute of Developmental Biology of Russian Academy of Sciences, Moscow, Russian Federation

^d I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation

Abstract. Chronic hepatitis B is a severe liver disease associated with persistent infection with hepatitis B virus. According to recent estimations, 250 million people in the world are chronically infected, including 3 million chronically infected people in Russia. Antiviral therapeutics (nucleos(t)ide analogues and PEGylated interferon) suppress viral transcription and replication, but do not eliminate the virus from infected cells. The key reason for HBV persistency is a stable form of the viral genome (covalently closed circular DNA, cccDNA) that exists as a minichromosome protected from novel cccDNA-targeting therapeutics. Novel therapeutic approaches aimed at elimination or inactivation of cccDNA are urgently needed. CRISPR/Cas9 systems induce double strand breaks in target sites of DNA sequences. Experiments with CRISPR/Cas9 demonstrated high antiviral activity and efficient cleavage of cccDNA, but a small part of cccDNA pool remains intact. One of the main reasons of incomplete cccDNA elimination might be the structural organization of cccDNA, which persists in a heterochromatinized, very compacted form and is not be accessible to CRISPR/Cas9 systems. Viral protein HBx unwinds cccDNA and regulates cccDNA epigenetically by recruiting transcription-remodeling factors. In this work, we analyzed effects of CRISPR/Cas9 in combination with an HBx-encoding plasmid or plasmids encoding mutant forms of HBx (HBxMut, which does not interact with pro-apoptotic factors Bcl-2 и Bcl-xL, and HBxNesm is localized exclusively in the nucleus and does not generate reactive oxygen species and double strand breaks in the genome). We showed that HBx improves CRISPR/Cas9 efficiency, decreasing pregenomic RNA transcription level over 98%. Moreover, we analyzed optimal ratios of plasmids encoding CRISPR/Cas9 and HBx proteins for better antiviral efficacy. Furthermore, we discovered that HBx proteins do not have an effect on proliferation and viability of the transfected cells. In conclusion, CRISPR/Cas9 with HBx proteins exhibit high antiviral effect.

Key words: hepatitis B virus, circular covalently closed DNA, CRISPR/Cas9, specificity, HBx protein, mutant forms of HBx protein.

Введение

Инфекция вирусом гепатита В (ВГВ) может протекать в острой или хронической формах, на сегодняшний день около 250 млн людей страдают от хронического гепатита В (ХГВ) [20]. Для лечения пациентов с ХГВ используются аналоги нуклеоз(т)идов либо пегилированная форма интерферона, однако они способны лишь подавлять вирусный цикл, при этом не оказывая прямого воздействия на основную причину хронической инфекции — персистирующую в ядрах гепатоцитов кольцевую ковалентно замкнутую ДНК (ккзДНК) ВГВ [10, 11]. В отличие от короткоживущих транскриптов вируса и репликативных интермедиатов (двухцепочечной линейной и кольцевой частично двухцепочечной ДНК) ккзДНК в покоящихся гепатоцитах может находиться в течение очень длительного времени, при этом она является

недостижимой для действия любых современных противовирусных средств даже в ходе продолжительных (от нескольких лет до десятилетий) курсов терапии [1]. Воздействие на транскрипционно-активную часть пула ккзДНК в гепатоцитах, которая составляет только некоторую часть популяции ккзДНК [16], отмечено лишь при лечении препаратами интерферона- α и несколькими цитокинами, которое заключается в снижении транскрипции ккзДНК и ее частичной элиминации в результате активации молекулярных внутриклеточных механизмов иммунитета и эпигенетического ремоделирования [17]. Следовательно, требуется разработка эффективного подхода, который позволит достичь деградации ккзДНК *per se* или сделать ее функционально некомпетентной. Технология сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 является одной из немногих технологий, способных оказывать прямое воздействие на ккзДНК. В ранее

опубликованных работах было продемонстрировано значительное подавление вирусной инфекции и снижение уровней ккзДНК вплоть до 90%. Тем не менее добиться нуклеолитического расщепления всех матриц ккзДНК системами CRISPR/Cas9 пока не удалось [5, 11, 14, 15, 16]. Причиной этого могут быть особенности структуры ккзДНК, которая остается недоступной для действия нуклеаз, поскольку она имеет нуклеосомную организацию и ассоциирована с гистоновыми и негистоновыми белками [13]. Она формирует в ядре типичную структуру «бусин на нитке» и существует в виде минихромосомы. Вирусный белок НВс в структуре минихромосомы связывается с двуцепочечной ДНК вируса, что приводит к уменьшению расстояния между нуклеопротеиновыми комплексами на 10% [3]. Таким образом, ккзДНК является высокостабильной структурой и может быть экранирована от действия CRISPR/Cas9 гистоновыми и негистоновыми белками. Считается, что ккзДНК может существовать в нескольких конформациях, которые определяют ее транскрипционную активность [12, 16]. КкзДНК, существующая в транскрипционно активной конформации, может быть более доступна для действия CRISPR/Cas9. Таким образом, перевод матриц ккзДНК в транскрипционно активное состояние может увеличить эффективность нуклеолитического расщепления системами CRISPR/Cas9. Известно, что вирусный белок НВх регулирует ккзДНК эпигенетически и усиливает экспрессию вирусных РНК [2]. Он обеспечивает эпигенетический контроль ккзДНК, регулируя взаимодействие хроматин-ремоделирующих белков с ДНК вируса. В клетках с мутантной формой НВх белка пул ккзДНК в ядре не уменьшается, однако количество транскрибируемой прегеномной РНК снижается значительно. Взаимодействие НВх с ккзДНК связано с процессами вирусной репликации и привлечения ацетилтрансфераз р300 и СВР. НВх связывает многие клеточные белки, включая компоненты транскрипционного комплекса (RPB5, TFIIВ, ТВР, TFIIН), коактиваторы (СВР, р300, и РСАФ) и факторы транскрипции (АТФ/СРЕВ, АТФ3, с/ЕВР, NF-IL-6, Ets, Egr, SMAD4, Oct1, RXR receptor, р53) [2]. Таким образом, НВх является главным активатором транскрипции вируса, способствуя релаксации структуры ккзДНК и привлечению белков, обеспечивающих процесс инициации транскрипции.

В ходе данной работы был проведен анализ действия систем CRISPR/Cas9 в комбинации с белками НВх дикого типа [4], белком НВхMut [8], не взаимодействующим с проапоптотическими факторами Bcl-2 и Bcl-xL, и НВхNESM [6], у которого отсутствует сигнал экспорта из ядра, также он не вызывает образо-

вание активных форм кислорода в цитоплазме и не индуцирует двуцепочечные разрывы в геноме человека. Были подобраны оптимальные условия котрансфекции клеток HepG2 плазмидами, кодирующими элементы систем CRISPR/Cas9, и плазмидами, кодирующими белки НВх. Выяснилось, что все 3 изученных белка могут значительно увеличивать эффект CRISPR/Cas9 систем с рядом РНК-проводников, что выражается в снижении уровня транскриптов прегеномной РНК ВГВ. Помимо этого, трансфекция плазмидами, кодирующими белки НВх, не вызвала значительных изменений пролиферации и жизнеспособности клеток.

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% CO₂). Клетки в 24- и 12-луночных планшетах, достигшие 60–70% плотности, трансфицировали: 1) плазмидой, кодирующей геном ВГВ (HBV-1.1mer, предоставлена Dieter Glebe, Университет Гиссена); 2) плазмидой, кодирующей белок Cas9 (предоставлена Phil Sharp и Feng Zhang, Addgene plasmid #63592); 3) ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник под U6-промотором (плазида для получения ПЦР-продукта предоставлена Eric Lander и David Sabatini, Addgene plasmid #50662); 4) одной из плазмид, кодирующей соответствующий белок НВх (НВх дикого типа, предоставлена Wang-Shick Ryu, Addgene plasmid #65463, НВхMut, предоставлена Ding Xue, Addgene plasmid #42598, НВхNESM, предоставлена Xin Wang, Addgene plasmid #, пустая плазида НВх, синтезирована в нашей лаборатории при помощи вырезания кодирующего НВх участка из плазмиды #65463) с помощью PEI. Через 24 ч среду отбирали, клетки промывали дважды фосфатным буфером, меняли среду на полную и инкубировали в течение еще 48 ч. После чего выделялись нуклеиновые кислоты и производился анализ ПЦР в реальном времени.

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 U6-промотором, кодирующий 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. Были подобраны следующие последовательности РНК-проводников:

Sp1: AGAGTGAGAGGCCTGTATTT;
 Sp2: CTGCACGTTCGCATGGAGACC;
 Sp3: ACTGTTCAAGCCTCCAAGCT;
 Sp4: CTCCTTATCGTCAATCTTC;
 Sp5: ATGGGCCATCAGCGCATGCG;
 Sp6: ACTACTGTTGTTAGACGACG;
 Sp7: CACCTCACCACTGCACTC;
 Sp8: GGTTCACCCACCCGACGG;
 Sp9: AATGTCAACGACCGACCTTG;
 Sp10: GTCTGTGCCTTCTCATCTGC;
 Sp11: GCGTTGATGCCTTTGTATGC;
 Sp12: AGTGTGCTGACGCAACCC;
 Sp13: CCTATCGTCAATCTTCTCG;
 Sp14: CTTCCACCAGCAATCCTCT;
 Sp15: CCACTGGCTGGGGCTTGGTC;
 Sp16: CACTGTTGGCTTTCAGTTA;
 Sp17: CACCGCACGGAGGCCTTTTG;
 Sp18: GGTCTGTGCCAAGTGTTTGC;
 Sp19: CTGCCGATCCATACTGCGGA;
 Sp20: TCTCATCTGCCGGACCGTGT;
 Sp21: TTATAAAGAATTTGGAGCTA;
 Sp22: TCGCCTCGCAGACGAAGGTC;
 Sp23: CTGGGTTTCACCCACCGCA;
 Sp24: TGTGCACTTCGCTTCACCTC;
 Sp25: TCTCGTGTTACAGGCGGGGT.

Выделение нуклеиновых кислот. 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. Фракцию нуклеиновых кислот обрабатывали ферментом DNase I по протоколу производителя в течение 30 мин при 37°C, после чего для инактивации фермента осуществлялось перевыделение РНК с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-преп». Далее проводилась обратная транскрипция с помощью набора «Реверта-L».

Полуколичественный ПЦР-анализ. Полуколичественный ПЦР-анализ проводили со специфическими праймерами и зондами TaqMan на прегеномную РНК ВГВ (пгРНК) и GAPDH. Были использованы следующие последовательности праймеров:

для GAPDH:

– прямой:

CCAGGTGGTCTCCTCTGACTT;

– обратный:

GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT;

– зонд:

(fam) GAGCTACACTTGGCTGTGCT (bhq1);

для прегеномной РНК:

– прямой:

GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT;

– обратный:

CATTGAGATTCGCGAGATTGAGAT;

– зонд:

(fam) TCTCAATCGCCGCGTTCGAGCAG (bhq1).

Иммуноцитохимический анализ. Для иммуноцитохимического окрашивания клетки выращивались на стеклах. Перед помещением в культуру стекла были простерилизованы: обработаны 70% этанолом и выдержаны под ультрафиолетом в течение часа. Далее стекла помещались на дно 6-луночных планшетов, клетки высевали с плотностью $0,5 \times 10^5$ на лунку. Фиксация клеток проводилась следующим образом: среда изымалась, клетки промывались дважды фосфатным буфером, фиксировались 4% параформальдегидом в течение 10 мин, отмывались трижды в Tris-HCl буфере (1x, 50 mM, pH = 8,0) по 10 мин. Tris-HCl отбирали, клетки обрабатывали блокирующим буфером в течение 30 мин. Стекла обрабатывали первичными антителами (разведение антител 1:1000) к НВхAg в блокирующем буфере в течение 1 ч, производили отмывку несвязавшихся антител с помощью отмывочного буфера (3 раза по 10 мин). Стекла обрабатывали вторичными антителами (разведение антител 1:300) в блокирующем буфере течение часа, снова промывали отмывочным буфером (3 раза по 10 мин). Для визуализации ядер клетки инкубировались с красителем Hoechst33342 в течение 10 мин и заключались в среде Fluoroshield.

Микроскопирование. Микроскопирование проводили на флуоресцентном микроскопе Leica DM16000 с иммерсионными линзами, при 20- и 100-кратном увеличении. Полученные изображения анализировались с помощью программы Leica AF. Работа проводилась с использованием оборудования ЦКП ИБР им. Н.К. Кольцова РАН.

Анализ пролиферации и жизнеспособности методом колориметрии. Исследование динамики пролиферации клеток HepG2 и их жизнеспособности проводили с помощью набора Cell Cytotoxicity Assay kit (Abcam Biochemicals), который предназначен для оценки пролиферации и жизнеспособности клеток по запатентованной технологии восстановления флуоресцентного субстрата делящимися клетками, по протоколу производителя. Эксперименты проводили в 96-луночных планшетах, рассеивая клетки с 30%-ной плотностью в 8 технических повторах; для детекции флуоресцентного сигнала использовали планшетный спектрофотометр iMark (Bio-Rad Laboratories, Inc., США).

Статистика. Статистическую обработку проводили с помощью t-критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа OneWay ANOVA (где применимо) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7, попарные апостериорные сравнения производили с помощью критерия Тьюки.

Результаты

Усиление нуклеолитического действия CRISPR/Cas9 под действием белка HBx

Влияние HBx на эффективность противовирусного действия анализировали на модели котрансфекции клеток HepG2 по экспрессии прегеномной РНК. В клетки были котрансфицированы: 1) плазмида, кодирующая ген ВГВ; 2) плазмида, кодирующая белок Cas9 *Streptococcus pyogenes*; 3) ПЦР-продукт, кодирующий соответствующий РНК-проводник; 4) плазмида, кодирующая соответствующий белок HBx (либо не кодирующая плазмида). Как и следовало ожидать, при трансфекции плазмиды HBx без РНК-проводников происходит значительная активация вирусного цикла: уровень прегеномной РНК возрастает в $6,12 \pm 1,02$ раз ($p > 0,001$) (рис. 1Б, II обложка). Далее была проведена первичная оценка влияния HBx дикого типа на действие систем CRISPR/Cas9. На рисунке 1А

(II обложка) представлена карта генома ВГВ с отмеченными на ней участками, к которым нацелены РНК-проводники. Все РНК-проводники были отобраны в предварительных экспериментах и сами по себе обладают высокой эффективностью действия (снижение уровня прегеномной РНК на 29–96%, $p > 0,0001$). Всего было проанализировано 25 РНК-проводников (Sp1–Sp25) для системы *S. pyogenes* Cas9 с котрансфекцией плазмиды HBx или пустой плазмиды. Противовирусное действие оценивали по уровню экспрессии транскрипта ВГВ — прегеномной РНК. Для 9 РНК-проводников котрансфекция HBx не вызвала никаких статистически достоверных изменений транскрипции прегеномной РНК (рис. 2Б), для 3 РНК-проводников наблюдалось снижение эффективности CRISPR/Cas9 на 9–42% (рис. 2В). Тем не менее для 13 РНК-проводников котрансфекция плазмидой HBx приводила к усилению противовирусного действия CRISPR/Cas9 на 2–42% (рис. 2А).

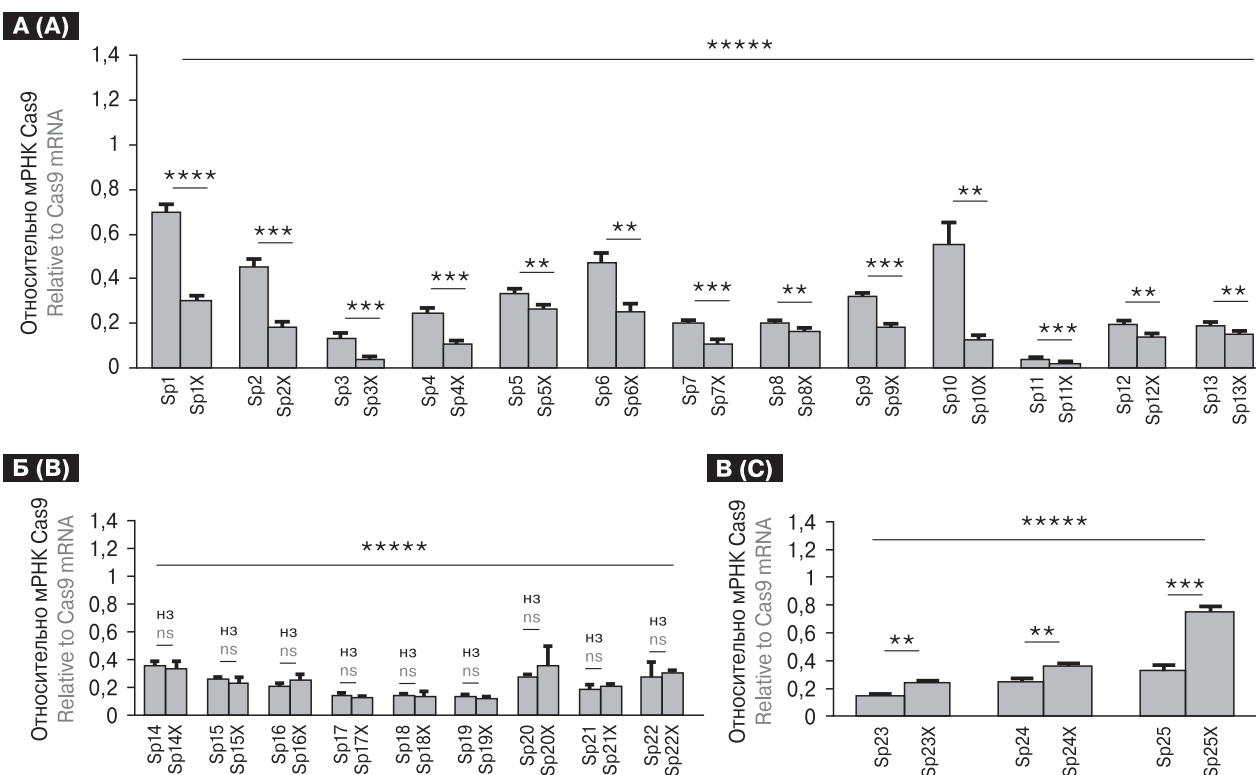


Рисунок 2. А) Экспрессия прегеномной РНК после действия системы *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 при котрансфекции с белком HBx, повышение противовирусной активности CRISPR/Cas9.

Б-В) РНК-проводники, эффективность которых не изменяется (Б) или снижается (В) при котрансфекции HBx дикого типа

Figure 2. А) Levels of pregenomic RNA after co-transfection with *S. pyogenes* CRISPR/Cas9 and HBx for RNA guides with increased antiviral activity. Б–С) RNA guides with an antiviral efficacy that remained unaltered (Б) or declined after co-transfection by wild type HBx (С)

Примечания. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, **** $p < 0,0001$, нз — незначимые отличия. В верхней части графика указаны статистические отличия экспериментальных групп от группы контроля.

Notes. The data are represented as mean \pm standard deviation. $p < 0.05$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$, ns — difference is not significant. Statistical difference between experimental groups and control group is shown on the top of each graph.

Для РНК-проводника Sp11 в комбинации с плазмидой HBx (Sp11X) удалось достигнуть снижения уровня прегеномной РНК на 98%.

Различные типы белков HBx улучшают действие CRISPR/Cas9 и не оказывают токсического действия

Поскольку HBx белок дикого типа взаимодействует с рядом клеточных белков и способен активировать онкогены, были подобраны безопасные мутантные формы белков HBx: HBxMut (не взаимодействует с проапоптотическими факторами Bcl-2 и Bcl-xL) и HBxNESM (отсутствует сигнал экспорта из ядра, не вызывает образование активных форм в цитоплазме, не вызывает образование двуцепочечных разрывов). На рисунке 3 (см. II обложку) представлены наиболее характерные отличия во внутриклеточной локализации каждого из трех вышеописанных белков: HBxNESM имеет мутацию в сигнале ядерного экспорта, поэтому почти полностью локализуется в ядре, HBxmut лока-

лизуется преимущественно в цитоплазме, тогда как HBx белок дикого типа концентрируется в ядре, но распространен по всей клетке. Для работы с этими белками были отобраны 2 РНК-проводника: Sp9 (поскольку он высоко консервативен среди наиболее часто встречающихся генотипов ВГВ А–D) и Sp11 (поскольку он обладает самым высоким противовирусным действием, как в комбинации с HBx, так и без нее).

Для РНК-проводника Sp11 были проведены опыты по подбору оптимальных соотношений плазмид ВГВ, Cas9 и HBx. В таблице на рисунке 4 представлены концентрации плазмид, использованные в опыте. Эксперименты показали, что самые значительные эффекты всех типов белков наблюдаются при внесении плазмид ВГВ и Cas9 в соотношении 1:1 (0,3 мкг : 0,3 мкг) и при внесении наибольших количества HBx белков (0,65 мкг) (рис. 4А).

Для РНК-проводника Sp9 была проведена раститровка различных количеств плазмид HBx, вносимых при котрансфекции. Исходя

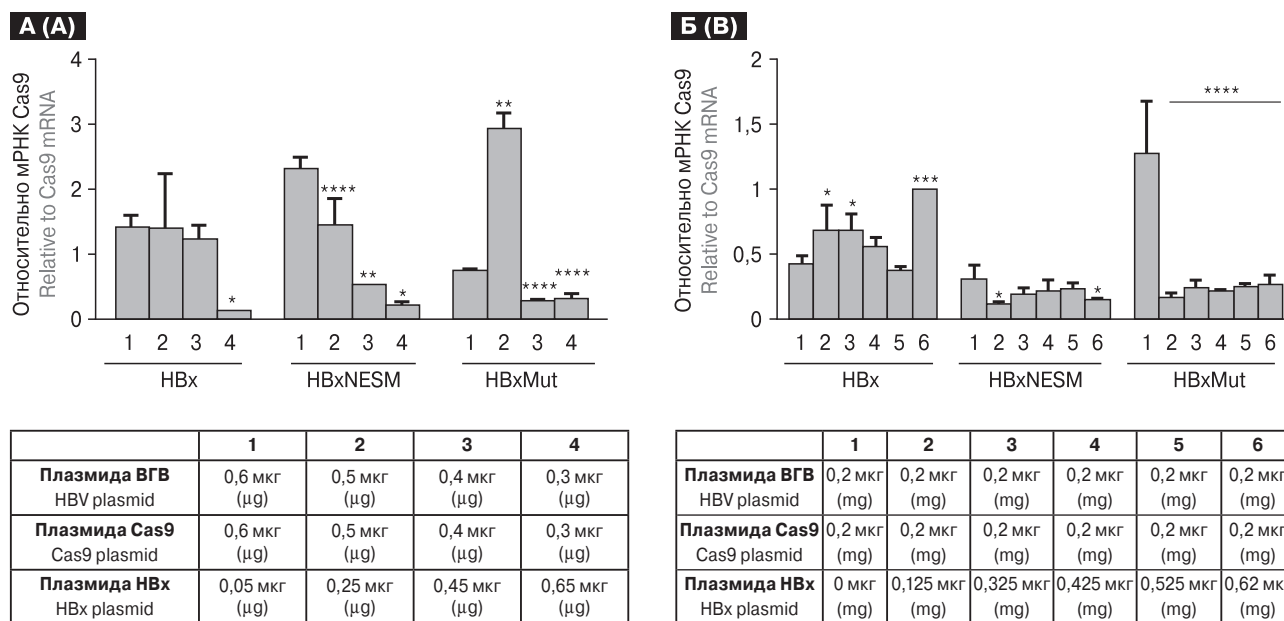


Рисунок 4. А) Подбор оптимальных соотношений кодирующих плазмид Cas9, HBx или мутантных форм (HBxmut, HBxNESM) и ВГВ с РНК-проводником Sp11 для достижения максимального противовирусного эффекта. Оптимальным было принято соотношение 4 с наименьшей нагрузкой плазмид ВГВ и Cas9 и наибольшими количествами вводимой плазмиды HBx (0,65 мкг). Б) Определение дозозависимых эффектов HBx белка дикого типа и мутантных форм HBx на противовирусное действие CRISPR/Cas9 систем на модели котрансфекции HepG2. HBxNesm и HBxmut действуют одинаково эффективно независимо от дозы. Для HBx дикого типа наблюдается некоторый дозозависимый эффект

Figure 4. A) Search for optimal concentration of Cas9, wild type or mutant HBx and HBV encoding plasmids with RNA guide Sp11 for better antiviral efficacy. It was shown that optimal ratios of the plasmid concentration was experimental settings number 4. B) Analysis of dose-dependent effects of wild type HBx and mutant forms of HBx on CRISPR/Cas9 activity at the HepG2 co-transfection model. HBxNesm and HBxmut have the same antiviral activity independently of plasmids' concentration. Dose-dependent activity is observed for different concentrations of wild-type HBx plasmid

Примечания. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. Звездочками обозначены статистически достоверные отличия экспериментальных групп от группы 1. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, ****p < 0,0001.

Notes. The data are represented as mean ± standard deviation. *p < 0.05, **p < 0.01, ***p < 0.001, ****p < 0.0001.

из данных прошлого эксперимента, плазмиды ВГВ к Cas9 брали в соотношении 1:1, а концентрации плазмид НВх были использованы следующие: 0,125; 0,325; 0,425; 0,525 и 0,62 мкг. При раститровке плазмид, кодирующих Нвх белки, выяснилось, что НВхNESM и НВхmut усиливают противовирусные эффекты нуклеаз даже при минимальной загрузке кодирующих

плазмид, тогда как для НВх белка дикого типа наблюдается некоторая тенденция к дозозависимому эффекту (рис. 4Б).

Была проведена оценка влияния НВх белка дикого типа и мутантных форм НВх белка на пролиферацию и жизнеспособность клеток с разной загрузкой кодирующих плазмид (0,05; 0,25; 0,45; 0,65 мкг). Было выявлено, что исполь-

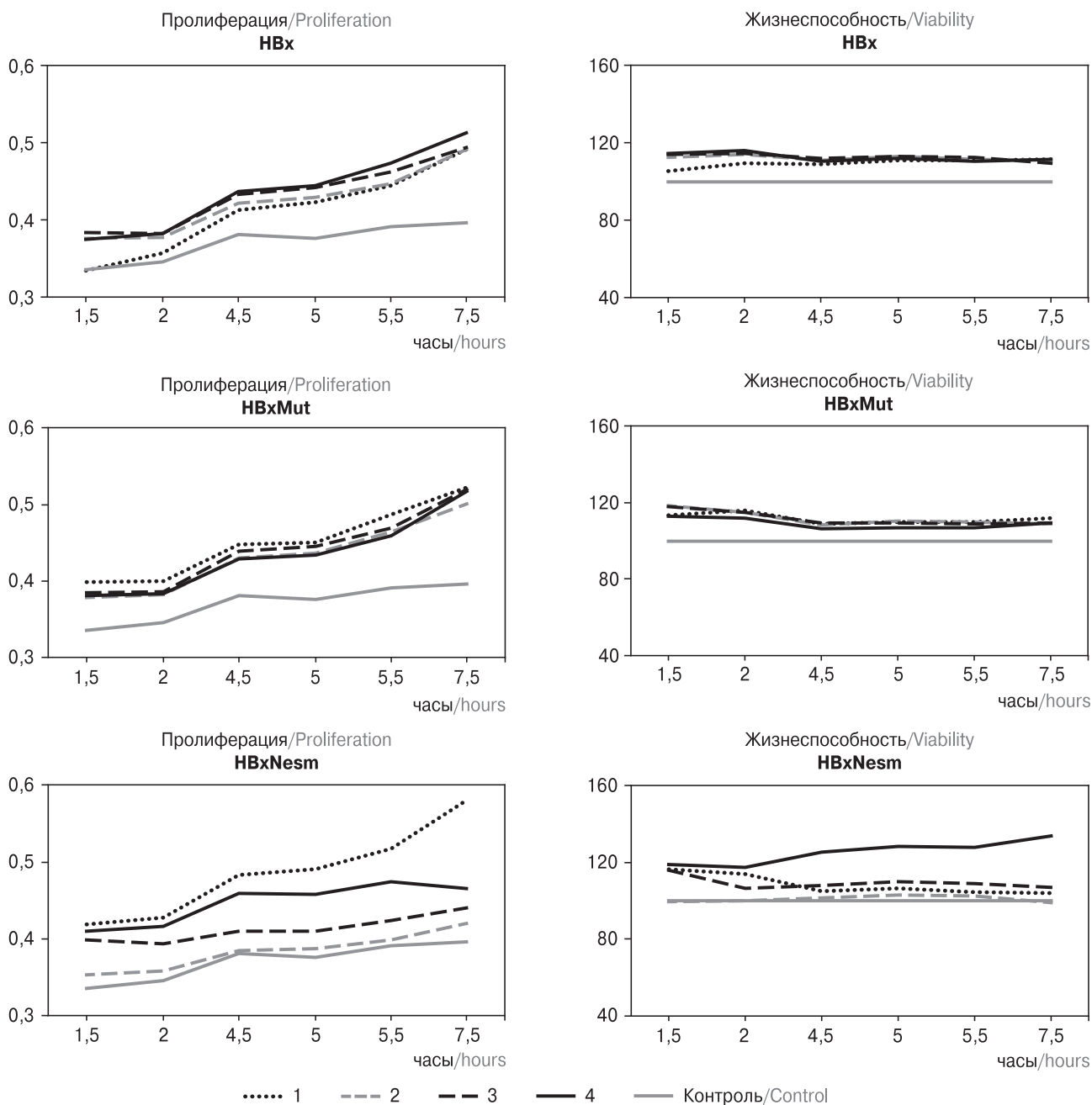


Рисунок 5. Влияние НВх белков дикого типа и мутантных форм (НВхmut, НВхNESM) на пролиферацию (слева) и жизнеспособность (справа) клеток

Figure 5. Impact of the HBx proteins on viability and proliferation of the cells

Комментарий. Клетки HepG2 были трансфицированы разными количествами (1 — 0,05 мкг; 2 — 0,25 мкг; 3 — 0,45 мкг; 4 — 0,65 мкг) плазмид, кодирующих один из НВх белков. В то время как пролиферация клеток повышается практически при всех условиях, жизнеспособность клеток при трансфекции НВх, НВхmut и НВхNesm практически не изменяется.
Comments. HepG2 cells were co-transfected with different concentration (1 — 0,05 μ g; 2 — 0,25 μ g; 3 — 0,45 μ g; 4 — 0,65 μ g) of HBx encoding plasmids. Proliferation of the cells increases and viability do not change.

зованные в экспериментах количества кодирующих HBx, HBxmut и HBxNesm плазмид не вызывают изменения жизнеспособности клеток и практически не оказывают влияния на пролиферацию клеток HepG2 (рис. 5).

Обсуждение

Хронический гепатит В является неизлечимым заболеванием, который приводит к развитию цирроза и рака печени, ответственных за гибель более 1,4 млн человек ежегодно [7]. Поэтому необходима разработка подходов к эффективной и полной элиминации вируса и ключевой формы генома ВГВ, ккзДНК. Системы CRISPR/Cas9 позволяют расщеплять матрицы ккзДНК, однако ни в одном из ранее опубликованных исследований разрушение 100% молекул ккзДНК достигнуто не было. Если предположить, что индукция мутаций в каждой из копий ккзДНК, присутствующих в клетке, технически возможна, всегда остаются риски того, что вирус может приобретать резистентность, оставаться транскрипционно активным и поддерживать репликативный цикл даже после внесения мутаций после репарации. Следовательно, применение CRISPR/Cas9 будет сопровождаться меньшей вероятностью реактивации вируса в тех условиях, когда репарация двуцепочечных разрывов в ккзДНК невозможна, а геном вируса подвергается деградации и удаляется из ядра. Одной из причин, по которым не все матрицы ккзДНК подвергаются расщеплению, является существование матриц ккзДНК в суперскрученном состоянии. Существование матриц в подобной форме может затруднять их взаимодействие с системами CRISPR/Cas9, поскольку белок Cas9 обладает более низкой нуклеолитической активностью в отношении гетерохроматина [18] [19]. HBx белок — главный регулятор эпигенетического состояния ккзДНК, способный релаксировать ккзДНК и переводить ее в транскрипционно-

активную форму, более доступную для действия нуклеаз CRISPR/Cas9 [2]. В данной работе был произведен скрининг ряда РНК-проводников, нацеленных на геном вируса гепатита В в комбинации с белками HBx. Для ряда РНК-проводников не удалось добиться усиления противовирусного действия, однако в результате экспериментов были выявлены 11 РНК-проводников, эффективность которых в комбинации с белком HBx дикого типа повышалась на 2–40%, позволяя при этом достигнуть снижения транскрипции вируса на 98%.

Помимо белка HBx дикого типа, были проанализированы эффекты мутантных белков HBxMut и HBxNesm. Были определены оптимальные соотношения плазмид, кодирующих элементы систем CRISPR/Cas9 и белков HBx, и оптимальное количество белка HBx, вызывающее самое сильное усиление противовирусного действия. Кроме того, было показано, что количества кодирующих HBx, HBxmut и HBxNesm плазмид в выбранном диапазоне не вызывают изменения жизнеспособности и пролиферации клеток.

Несмотря на то что по результатам тестов на жизнеспособность и пролиферацию не было выявлено негативных эффектов HBx дикого типа, ввиду трансактивирующей способности HBx белка не исключено его взаимодействие с онкогенами и связывание с про- и антиапоптотическими факторами, а также образование активных форм кислорода в цитоплазме и, как следствие, индукция двуцепочечных разрывов ДНК в геноме человека [9, 20]. Более целесообразным представляется использование безопасных мутантных форм HBx которые позволят если не устранить, то минимизировать возможные побочные эффекты, усилив при этом эффективность действия CRISPR/Cas9 на ккзДНК, включая высококонденсированные, гетерохроматизированные формы ккзДНК, которые не распознаются или не расщепляются классическими вариантами CRISPR/Cas9 систем.

Список литературы/References

- Allweiss L., Dandri M. The Role of cccDNA in HBV Maintenance. *Viruses*, 2017, vol. 9, no. 6: 156. doi: 10.3390/v9060156
- Belloni L., Pollicino T., De Nicola F., Guerrieri F., Raffa G., Fanciulli M., Levrero M. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2009, vol. 106, no. 47, pp. 19975–19979. doi: 10.1073/pnas.0908365106
- Bock C.T., Schwinn S., Locarnini S., Fyfe J., Manns M.P., Trautwein C., Zentgraf H. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.*, 2001, vol. 307, no. 1, pp. 183–196. doi: 10.1006/jmbi.2000.4481
- Cha M.-Y., Kim C.-M., Park Y.-M., Ryu W.-S. Hepatitis B virus X protein is essential for the activation of Wnt/beta-catenin signaling in hepatoma cells. *Hepatology*, 2004, vol. 39, no. 6, pp. 1683–1693. doi: 10.1002/hep.20245
- 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
- Forgues M., Marrogi A.J., Spillare E.A., Wu C.G., Yang Q., Yoshida M., Wang X.W. Interaction of the hepatitis B virus X protein with the Crm1-dependent nuclear export pathway. *J. Biol. Chem.*, 2001, vol. 276, no. 25, pp. 22797–22803. doi: 10.1074/jbc.M101259200
- 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. Geng X., Huang C., Qin Y., McCombs J.E., Yuan Q., Harry B.L., Xue D. Hepatitis B virus X protein targets Bcl-2 proteins to increase intracellular calcium, required for virus replication and cell death induction. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 2012, vol. 109, no. 45, pp. 18471–18476. doi: 10.1073/pnas.1204668109
9. Kim S., Lee H.-S., Ji J.-H., Cho M.-Y., Yoo Y.-S., Park Y.-Y., Cho H. Nuclear expression of hepatitis B virus X protein is associated with recurrence of early-stage hepatocellular carcinomas: role of viral protein in tumor recurrence. *J. Pathol. Transl. Med.*, 2016, vol. 50, no. 3, pp. 181–189. doi: 10.4132/jptm.2016.03.18
10. Konerman M.A., Lok A.S. Interferon treatment for hepatitis B. *Clin. Liver Dis.*, 2016, vol. 20, no. 4, pp. 645–665. doi: 10.1016/j.cld.2016.06.002
11. Liu Y., Zhao M., Gong M., Xu Y., Xie C., Deng H., Wang Z. Inhibition of hepatitis B virus replication via HBV DNA cleavage by Cas9 from *Staphylococcus aureus*. *Antiviral Res.*, 2018, vol. 152, pp. 58–67. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.02.011
12. Lucifora J., Xia Y., Reisinger F., Zhang K., Stadler D., Cheng X., Volz T. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*, 2014, vol. 343, no. 6176, pp. 1221–1228.
13. Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, 2015, vol. 64, no. 12, pp. 1972–1984. doi: 10.1136/gutjnl-2015-309809
14. Ramanan V., Shlomai A., Cox D.B.T., Schwartz R.E., Michailidis E., Bhatta A., Bhatia S.N. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus. *Sci. Rep.*, 2015, vol. 5: 10833. doi: 10.1038/srep10833
15. 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
16. 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
17. Shi H., Lu L., Zhang N.-P., Zhang S.-C., Shen X.-Z. Effect of interferon-gamma and tumor necrosis factor-alpha on hepatitis B virus following lamivudine treatment. *World J. Gastroenterol.*, 2012, vol. 18, no. 27, pp. 3617–3622. doi: 10.3748/wjg.v18.i27.3617
18. Uusi-Mäkelä M.I.E., Barker H.R., Bäuerlein C.A., Häkkinen T., Nykter M., Rämet M. Chromatin accessibility is associated with CRISPR-Cas9 efficiency in the zebrafish (*Danio rerio*). *PLoS One*, 2018, vol. 13, no. 4: e0196238–e0196238. doi: 10.1371/journal.pone.0196238
19. Verkuijl S.A., Rots M.G. The influence of eukaryotic chromatin state on CRISPR-Cas9 editing efficiencies. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 2018, vol. 55, pp. 68–73. doi: 10.1016/j.copbio.2018.07.005
20. WHO. Global hepatitis report 2017. World Health Organization, 2017.
21. Yue D., Zhang Y., Cheng L., Ma J., Xi Y., Yang L., Xiang R. Hepatitis B virus X protein (HBx)-induced abnormalities of nucleic acid metabolism revealed by ¹H-NMR-based metabolomics. *Sci. Rep.*, 2016, vol. 6: 24430. doi: 10.1038/srep24430

Авторы:

Брезгин С.А., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия; аспирант лаборатории № 73 клинической фармакологии ФГБУ ГНЦ Институт иммунологии ФМБА России, Москва, Россия;
Костюшева А.П., младший научный сотрудник лаборатории вирусных гепатитов ФБУН ЦНИИ эпидемиологии Роспотребнадзора, Москва, Россия;
Симирский В.Н., к.б.н., старший научный сотрудник Института биологии развития им. Н.К. Кольцова 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;
Чистяков Д.С., лаборант ГБОУ ВПО Первый МГМУ им. И.М. Сеченова МЗ РФ, Москва, Россия;
Костюшев Д.С., научный сотрудник 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:

Brezgin S.A., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation; PhD Student, Laboratory of Clinical Pharmacology No. 73, Institute of Immunology FMBA, Moscow, Russian Federation;
Kostyusheva A.P., Junior Researcher, Laboratory of Viral Hepatitis, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russian Federation;
Simirskii V.N., PhD (Biology), Senior Researcher, Koltsov Institute of Developmental Biology of RAS, Moscow, Russian Federation;
Volchkova E.V., PhD, MD (Medicine), Professor, Professor of the Department of Infectious Diseases, Head of the Department of Infectious Diseases on Faculty of Preventive Medicine, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Chistyakov D.S., Laboratory Technician, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation;
Kostyushev D.S., Researcher, 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 of the Department of Infectious Diseases, Faculty of Preventive Medicine, I.M. Sechenov Moscow State Medical University, Moscow, Russian Federation.

Поступила в редакцию 24.12.2018
 Отправлена на доработку 11.03.2019
 Принята к печати 13.03.2019

Received 24.12.2018
 Revision received 11.03.2019
 Accepted 13.03.2019