ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ АВТОНОМНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ «РОССИЙСКИЙ УНИВЕРСИТЕТ ДРУЖБЫ НАРОДОВ ИМЕНИ ПАТРИСА ЛУМУМБЫ»

На правах рукописи

Тихонов Андрей Сергеевич

Роль кольцевой частично двухцепочечной ДНК в ограничении противовирусной и дезаминирующей активности цитидин-дезаминаз APOBEC/AID

1.5.4. Биохимия
1.5.3. Молекулярная биология

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:

Доктор медицинских наук, профессор
Покровский Вадим Сергеевич

Доктор биологических наук
Костюшев Дмитрий Сергеевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ..... 5

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ 14

1.1. Репликация ВГВ..... 14
1.1.1. Кольцевая ковалентно-замкнутая кольцевая ДНК..... 15
1.1.2. Кольцевая частично двухцепочечная ДНК 18

1.2. Цитидин-дезаминазы семейства APOBEC/AID 19
1.2.1. Взаимодействие APOBEC/AID с вирусами. 20
1.2.2. Механизмы противовирусного действия..... 23
1.2.3 Влияние вторичной структуры ДНК на специфичность APOBEC/AID 25
1.2.4 Механизм противовирусного действия через гипермутации 25
1.2.5 Деаминазно-независимые механизмы противовирусной активности..... 26

1.3. Роль APOBEC/AID в развитии онкологических заболеваний 26
1.3.1. Мутации, ассоциированные с APOBEC/AID..... 26
1.3.2 Распределение мутаций, связанных с APOBEC/AID в различных типах рака 27
1.3.3 Механизмы активации APOBEC3 в раковых клетках..... 28
1.3.4 Кластеризованный мутационный процесс и явление kataegis 29

1.4. Взаимодействие APOBEC3/AID с вирусом гепатита В 30

1.5. Ограничения и нерешённые вопросы в исследовании APOBEC/AID при инфекции ВГВ..... 32

1.6. CRISPR и CRISPR-активирующие системы для терапии хронического гепатита В.... 34

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ..... 38

2.1. Культивирование клеток человека..... 38

2.2. Получение рекомбинантной ккзДНК..... 38

2.3 Трансфекция клеток и введение рекомбинантной ккзДНК 39

2.4. Система CRISPR-активации (CRISPRa) для усиления экспрессии генов APOBEC/AID 39

2.5 Противовирусная терапия ламивудином и shRNA..... 40

2.6. Модель инфекции вируса гепатита В..... 41

2.7. Выделение нуклеиновых кислот из клеток 41

2.8. Синтез и очистка однонаправляющих РНК (sgRNA) *in vitro*..... 42

2.9. Экспрессия и очистка рекомбинантного белка saCas9-p300 42

2.10. Методы количественного анализа вирусной ДНК 43

2.11. Анализ дезаминирования методом 3D-ПЦР 43

2.12. Высокопроизводительное секвенирование (NGS) 44

2.13. Анализ вирусных белков методом ELISA 45

2.14. Анализ экспрессии генов методом qRT-PCR 45

2.15. Иммуноблоттинг (Western-блот) 46

2.16. Хроматин-иммунопреципитационное секвенирование (ChIP-Seq) 46

2.17. Статистический анализ 47

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ 48

3.1 Дезаминирование транскрипционно инактивированной ккзДНК вируса гепатита В ферментами APOBEC/AID протекает активнее в сравнении с активно реплицирующейся формой вирусного генома 48

3.2 Блокада образования кольцевой частично двухцепочечной (кчдДНК) формы генома вируса гепатита В усиливает инактивацию ккзДНК 52

3.2.1. Снижение уровней кчдДНК ламивудином усиливает дезаминирование ккзДНК 52

3.2.2 Подавление синтеза кчдДНК с помощью shRNA против HBx усиливает дезаминирующую активность APOBEC/AID 53

3.3 Противовирусная и дезаминирующая активность APOBEC/AID на инфекционной модели ВГВ при настраиваемой активации с помощью системы CRISPRa 58

3.3.1 Влияние активации A3A и A3B на ккзДНК в инфицированных клетках HepaRG-hNTCP 58

3.3.2 Анализ мутационного профиля в инфицированных клетках 59

3.4 Кольцевая частично двухцепочечная ДНК ВГВ выполняет функцию молекулярной ловушки, защищая ккзДНК и геном хозяина от дезаминирующего действия APOBEC3 ... 63

3.4.1. Экзогенная кчдДНК конкурентно ингибирует дезаминирование ккзДНК ферментом A3A 63

3.4.2 A3A активно дезаминирует экзогенную кчдДНК 64

3.5 APOBEC3A упаковывается в вирионы вируса гепатита В и взаимодействуют с кчдДНК внутри нуклеокапсидов 67

3.5.1 Обнаружение A3A в составе очищенных вирионов ВГВ 67

3.5.2 Внутрикапсидная кчдДНК как дополнительный компартмент молекулярных ловушек . 67

3.6 Истощение пула кчдДНК усиливает генотоксическое действие APOBEC/AID на геном

хозяина в инфицированных клетках человека 71
3.6.1 Картирование геномных локусов взаимодействия APOBEC/AID с хроматином методом ChIP-Seq 71
3.6.2 Дезаминирование онкосупрессора TP53 и генов хозяина при подавлении репликации ВГВ 71

3.7 Цитидин-дезаминазы A3C, A3D и A3H подавляют репликацию вируса гепатита B без индукции мутагенеза генома хозяина 75
3.7.1. Активация экспрессии A3C, A3D и A3H системой CRISPRa 75
3.7.2 Противовирусная активность A3C, A3D и A3H 76
3.7.3 Анализ дезаминирования вирусной ДНК 77
3.7.4 Отсутствие внецелевого дезаминирования онкогенов 79

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ 81

4.1 Механизм насыщения кчдДНК как новая стратегия иммунной эвазии ВГВ 81

4.2 Сравнение с известными механизмами иммунной эвазии ВГВ 82

4.3 Дифференциальный профиль дезаминирования членов семейства APOBEC/AID 82

4.4 Взаимосвязь между вирусной нагрузкой и мутагенезом генома хозяина 83

4.5 Ограничения исследования и перспективы 84

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ 86

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ 88

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ 90

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ 95

ПРИЛОЖЕНИЕ А. СПИСОК ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ 108

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования

Хронический гепатит В (ХГВ) представляет одну из наиболее острых проблем современного здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения (ВОЗ), в мире насчитывается более 292 миллионов человек, инфицированных вирусом гепатита В (ВГВ) [122] Инфекция ВГВ является одной из основных причин развития цирроза и гепатоцеллюлярного рака [24; 3]. Ежегодно от последствий ВГВ-инфекции погибает около 1 миллиона человек [174]. Современные лекарственные препараты могут подавлять репликацию ВГВ, но не способны полностью удалить вирус из инфицированных клеток, при этом прекращение приема противовирусной терапии вызывает реактивацию вирусной инфекции [76]. Причиной хронической инфекции, высокой персистенции вируса и реактивации вирусной репликации является кольцевая ковалентно замкнутая ДНК (ккзДНК) ВГВ [171]. Полное разрушение ккзДНК удаляет ВГВ из инфицированных клеток и может в перспективе привести к выздоровлению пациентов с ХГВ [97; 74; 73]. Одним из наиболее перспективных подходов к направленному разрушению ккзДНК ВГВ является применение систем программируемых нуклеаз, в частности CRISPR/Cas [74; 73; 138; 86; 124]. В своём базовом варианте система CRISPR/Cas состоит из двух компонентов: белка-нуклеазы Cas, осуществляющего расщепление ДНК-мишени, и направляющей РНК (sgRNA), которая обеспечивает последовательность-специфическое связывание с мишенью [151; 154]. При расщеплении ДНК белком Cas-нуклеазой происходит образование двухцепочечных разрывов (ДЦР) в ДНК, которые могут либо репарироваться с образованием мутаций либо (в случае генома ВГВ) разрушать мишень [28; 137]. Несмотря на множество достоинств, система CRISPR-Cas обладает также рядом серьезных недостатков, включая расщепление нецелевых мишеней в геноме человека [38; 87; 66]. Внесение нецелевых разрывов в геном человека может вызывать развитие хромосомных аномалий, образование мутаций, масштабные перестройки генома, оказывать генотоксическое действие, что может приводить к гибели клеток либо их опухолевой трансформации [106]. При разработке новых подходов противовирусной терапии нежелательным также является расщепление интегрированных форм вирусных геномов. Разрезание интегрированных ДНК вируса, в особенности при высокой частоте интеграций, вызывает различные генетические аберрации, что может компрометировать безопасность подобных способов терапии [12]. При инфекции ВГВ ДНК вируса также интегрируется в геном клеток человека; при этом интегрированные формы

вирусов участвуют в продукции вирусных белков (в том числе мутированных), но не участвуют в репликации вируса [13].

Кроме того, ккзДНК ВГВ может быть непосредственно инактивирована и разрушена некоторыми факторами врождённого иммунитета, в частности APOBEC/AID дезаминазами [91] Семейство APOBEC/AID у человека включает 10 представителей (APOBEC1, APOBEC2, A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G, A3H и AID). A3A, A3B, A3C, A3D, A3F, A3G, A3H и AID способны непосредственно дезаминировать цитидины в одноцепочечной ДНК, индуцируя C-в-T и G-в-A мутации на комплементарной цепи, тогда как APOBEC1, A3A и A3G дезаминируют РНК с образованием C-в-U мутаций. Согласно последним данным, повышенные (но не естественные) уровни A3B также могут редактировать РНК в специфических участках, вызывая летальность в модели индуцируемой экспрессии A3B у мышей. APOBEC2 не способен редактировать нуклеиновые кислоты. APOBEC/AID известны как мощные мутаторные факторы, вовлеченные в развитие многочисленных онкологических заболеваний, и одновременно являются важными факторами, ограничивающими распространение в организме чужеродных РНК и ДНК, в частности, вирусных или утечку внутриклеточной ДНК, например, из ядра или митохондрий. APOBEC/AID подавляют репликацию многих вирусов, инфицирующих человека, включая вирус иммунодефицита человека, вирус простого герпеса 1-го типа, вирус Эпштейна–Барр, вирус гепатита С, папилломавирусы человека и ВГВ. Ранее исследования продемонстрировали способность редактировать геном ВГВ для A3G, A3C, A3H и A3F. Также было показано, что A3G ингибирует ВГВ без цитидинового дезаминирования, подавляя упаковку пгРНК в вирусные капсиды. В более позднем исследовании Chen et al. провели всестороннюю оценку цитидиндезаминазной активности APOBEC/AID в отношении пкДНК ВГВ, показав, что активность дезаминирования снижается в порядке A3B >> A3G > A3H или A3C, в то время как активность A3A, A3D, A3H и A3F была очень низкой или неопределяемой. Ряд исследований представил доказательства того, что A3A, A3B, а также AID способны вызывать гиперредактирование и деградацию ккзДНК ВГВ. Вместе с тем транзиентно активированные ферменты A3A, A3B и AID индуцируют мутации в онкологически значимых генах клетки-хозяина даже при кратковременной активации, тогда как A3G вызывает двухцепочечные разрывы ДНК.

Благодаря мощной анти-ВГВ активности, индукция APOBEC/AID рассматривается как перспективная противовирусная стратегия для потенциального излечения пациентов с ХГВ.

Внутриклеточную экспрессию цитидиндезаминаз в печени можно индуцировать различными агонистами, однако их использование чревато развитием тяжелых побочных эффектов. В то же время экспрессию APOBEC/AID можно контролировать на транскрипционном уровне с помощью молекулярных активаторов на основе dCas (системы CRISPR-активации, CRISPRa). CRISPRa обеспечивают точную активацию и регулируемый контроль экспрессии целевых генов, а также моногенную или одновременную активацию нескольких противовирусных факторов. Как правило, система CRISPRa состоит из нуклеолитически неактивного белка Cas9 (dCas), который направляется в регуляторные области генов с помощью однонаправляющей РНК (sgRNA) Белок dCas9 или sgRNA также могут содержать домены, опосредующие активацию транскрипции.

В рамках данной работы впервые идентифицирован новый механизм защиты ВГВ от действия APOBEC/AID-дезаминаз, связанный с созданием «ДНК-приманок» (decoys), в роли которых выступают кольцевые частично двухцепочечные формы генома вируса (кчдДНК). Подобные кчдДНК гиперпредставлены в ядре инфицированных клеток в сравнении с ккзДНК — основной терапевтической мишенью — и предпочтительно дезаминируются APOBEC/AID-дезаминазами. Подобный эффект, с одной стороны, нарушает анти-ккзДНК активность APOBEC/AID и, с другой стороны, препятствует мутагенному действию APOBEC/AID дезаминаз на геном человека.

Степень разработанности темы исследования

Объектом исследования являются геномные формы вируса гепатита В и ДНК инфицированных клеток человека, подверженных действию APOBEC/AID-дезаминаз.

Изучение особенностей взаимодействия APOBEC/AID-дезаминаз с ДНК вируса гепатита В и инфицированными клетками способствует развитию новых методов лечения хронической формы инфекции, определению особенностей мутагенного действия APOBEC/AID при развитии онкологических заболеваний, а также механизмов взаимодействия вирусов с инфицированной клеткой.

В настоящее время особенности взаимодействия APOBEC/AID с вирусными геномами, с кчдДНК, с геномом человека в ВГВ-инфицированных клетках практически не изучены. При этом создание безопасных и эффективных противовирусных подходов на основе APOBEC/AID-дезаминаз считается одним из перспективных направлений в области создания противовирусных препаратов.

Цель исследования

Изучить роль кольцевой частично двухцепочечной ДНК в ограничении противовирусной и дезаминирующей активности цитидин-дезаминаз APOBEC/AID.

Задачи исследования

1. Определить активность APOBEC/AID на транскрипционно активной и транскрипционно инактивированной ккзДНК вируса гепатита В.
2. Исследовать влияние блокады образования кольцевой частично двухцепочечной ДНК вируса гепатита В на противовирусную активность APOBEC/AID.
3. Оценить упаковку APOBEC-дезаминаз в вирионы вируса гепатита В.
4. Проанализировать внецелевое дезаминирование генома клеток, инфицированных вирусом гепатита В, факторами APOBEC/AID при нарушении формирования кольцевой частично двухцепочечной ДНК.
5. Определить уровни дезаминирования ккзДНК факторами APOBEC/AID при блокаде формирования кчдДНК.
6. Изучить подавление вирусной репликации, уровни дезаминирования ккзДНК и генома клеток человека факторами APOBEC3C, APOBEC3D и APOBEC3H.

Научная новизна

В настоящей работе впервые создана модель с трансфекцией изолированной из вирионов кчдДНК вируса в клетки человека. Впервые изучено влияние APOBEC/AID дезаминаз на клетках человека с репликацией ВГВ и естественной инфекцией клеток человека с одновременной блокадой обратной транскрипции либо транскрипции вируса аналогами нуклеот(з)идов и РНК-интерферирующими молекулами. Впервые продемонстрирован механизм «фоновой защиты» ВГВ, при котором избыток кчдДНК насыщает APOBEC/AID, минимизируя воздействие на ккзДНК. Установлено, что подавление кчдДНК усиливает дезаминирование ккзДНК, но одновременно провоцирует мутации в генах хозяина.

Теоретическая и практическая значимость результатов исследования

Результаты работы раскрывают новый аспект взаимодействия ВГВ с молекулярными субстратами, обеспечивающими механизмы врожденного иммунитета, что важно для разработки стратегий направленной элиминации ккзДНК. Обнаруженные риски генотоксичности

APOBEC/AID указывают на необходимость селективного подхода к их применению. Полученные данные могут лечь в основу разработки новых комбинированных подходов к терапии ВГВ, сочетающих подавление кчдДНК с активацией безопасных цитидиндезаминаз.

Методология и методы исследования

В ходе проведенного исследования были использованы культуральные, молекулярно-биологические методы, биохимические и молекулярно-генетические исследования для изучения особенностей взаимодействия геномных форм вируса и ДНК человека с APOBEC/AID-дезаминазами. Были разработаны новые модели для исследования, включая модели гиперметилированных форм ДНК вируса с транзиентно гиперэкспрессированными APOBEC/AID-дезаминазами, в том числе впервые создана модель с трансфекцией изолированной из вирионов кчдДНК вируса в клетки человека. Методами сайт-направленной CRISPR-активации были транзиентно гиперэкспрессированы целевые APOBEC/AID-дезаминазы с оценкой уровней экспрессии мРНК методами ПЦР и вестерн-блота. Методами 3D-ПЦР и высокопроизводительного секвенирования было изучено дезаминирование и мутагенное действие APOBEC/AID-дезаминаз на кчдДНК и ккзДНК ВГВ, а также исследованы участки ДНК инфицированных и неинфицированных клеток. Противовирусное действие анализировали методами ПЦР на ДНК- и РНК-формы генома вируса с анализом экспрессии вирусных белков HBsAg и HBeAg. Впервые было изучено взаимодействие APOBEC-белков с ДНК человека и вируса с помощью ChIP-Seq метода, в том числе в условиях активной репликации и в условии блокады образования кчдДНК с помощью РНК-интерферирующих молекул.

Статистическую обработку результатов проводили с расчетом критерия Стьюдента, однофакторного или двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) для сравнения переменных и расчета p-значений для определения статистически значимых различий в средних значениях.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Дезаминирование транскрипционно инактивированной ккзДНК вируса гепатита В ферментами APOBEC/AID более эффективно в сравнении с активно реплицирующейся формой вирусного генома.
2. Блокада образования кольцевой частично двухцепочечной формы генома вируса гепатита В усиливает гипермутирование ккзДНК.

3. APOBEC3A упаковывается в вирионы вируса гепатита В.
4. Подавление образования внутриклеточной кчдДНК усиливает внесение мутаций в геном клеток человека, инфицированных ВГВ.
5. КчдДНК ВГВ защищает ккзДНК и геном клетки-хозяина от дезаминирующего и мутагенного действия APOBEC/AID-дезаминаз;
6. APOBEC-дезаминазы A3C, A3D и A3H подавляют вирусную репликацию и дезаминируют ккзДНК без воздействия на геном человека.

Внедрение результатов исследования

Разработанные модели, методики анализа и подходы были внедрены в работу научно-исследовательского отдела Института медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е. И. Марциновского ФГАОУ ВО Первого МГМУ им. И.М. Сеченова (Сеченовский Университет).

Личный вклад

Автор участвовал во всех этапах диссертационной работы, начиная от изучения литературы по заданной тематике, планирования экспериментов, разработки и выполнения экспериментальных методик, анализе и интерпретации полученных результатов. Также автор непосредственно участвовал в написании публикаций, в представлении полученных результатов на конференциях в виде устных и постерных докладов.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Основные научные положения диссертации соответствуют п. 11 паспорта специальности 1.5.4. Биохимия, п. 11 и п. 12 паспорта специальности 1.5.3. Молекулярная биология.

Степень достоверности и апробация результатов

Эксперименты были поставлены, а результаты — проанализированы и обработаны на сертифицированном оборудовании, что позволяет сделать заключение о достоверности полученных результатов исследования. Статистическая обработка результатов проводилась в программном обеспечении R версии 4.1.2 в среде RStudio по расчёту критерия Стьюдента или однофакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с использованием теста Тьюки для сравнения переменных и расчёта p-значений для определения статистически значимых различий в средних значениях.

Публикации

Результаты диссертационного исследования опубликованы в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus.

По теме диссертации опубликовано 7 статей:

1. Kostyusheva A., Brezgin S., Ponomareva N., Frolova A., Lunin A., Bayurova E., **Tikhonov A**., Slatinskaya O., Demina P., Kachanov A., Babayeva G., Khan I., Khochenkov D., Khochenkova Y., Sokolova D., Silachev D., Maksimov G., Khaydukov E., Pokrovsky V. S., Zamyatnin A. A. Biologics-based technologies for highly efficient and targeted RNA delivery // Molecular Therapy. 2025. Vol. 33. No. 1. pp. 168-183. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 12.
2. Brezgin S, Frolova A, Bayurova E, Slatinskaya O, Ponomareva N, Parshina E, Bochkova Z, Kachanov A, **Tikhonov A**, Kostyusheva A, Karandashov I, Demina P, Latyshev O, Eliseeva O, Belikova M, Pokrovsky VS, Gegechkory V, Khaydukov E, Silachev D, Zamyatnin AA Jr, Maksimov G, Lukashev A, Gordeychuk I, Chulanov V, Kostyushev D. Saponin is Essential for the Isolation of Proteins and RNA from Biological Nanoparticles // Analytical Chemistry. 2024. Vol. 96. No. 43. pp. 17432-17443. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 6.7.
3. **Tikhonov A. S.**, Kachanov A., Yudaeva A. D., Danilik O., Ponomareva N., Karandashov I., Kostyusheva A., Zamyatnin A. A., Parodi A., Chulanov V., Brezgin S., Kostyushev D. Biomimetic Nanoparticles for Basic Drug Delivery // Pharmaceutics. 2024. Vol. 16. No. 10. p. 1306. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 5.5.
4. Kachanov A., Kostyusheva A., Brezgin S., Karandashov I., Ponomareva N., **Tikhonov A. S.**, Lukashev A., Pokrovsky V., Zamyatnin A. A., Parodi A., Chulanov V., Kostyushev D. The menace of severe adverse events and deaths associated with viral gene therapy and its potential solution // Medicinal Research Reviews. 2024. Vol. 44. No. 5. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 11.6.
5. **Tikhonov A.**, Mintaev R. R., Glazkova D. V., Bogoslovskaya E. V., Shipulin G. A. HIV Restriction Factor APOBEC3G and Prospects for Its Use in Gene Therapy for HIV // Molecular Biology. 2022. Vol. 56. No. 4. pp. 508-516. (ВАК/Scopus/WoS), Impact factor — 1.2.
6. Karandashov I. V., Brezgin S. A., Ponomareva N. I., **Tikhonov A. S.**, Chulanov V. P., Kostyushev D. S., Kostyusheva A. P. Antiviral and Mutagenic Effects of APOBEC Deaminases A3C, A3D, and A3H in a Hepatitis B Virus Model. // Biochemistry Moscow 2026 Vol. 91, 289–298. (ВАК/Scopus/WoS) Impact factor — 2.2.
7. Bayurova E., Kostyushev D., **Tikhonov A. S.**, Chulanov V., Gordeychuk I. Broad-acting

antivirals: the pursuit of pan-viral therapeutics in the era of pandemics // Journal of Virology. 2026. e00077-26. (ВАК/Scopus/WoS) Impact factor — 3.8.

Материалы конференций по теме диссертационного исследования:

1. Тихонов А.С. Genetic refinement of CRISPR-nucleases for targeting hepatitis B virus. Устный доклад, Саммит «Сириус Биотех», г. Сочи, Университет Сириус, 15-17 мая 2024 года.
2. Тихонов А. С. Анализ содержания протеолипидов и нуклеиновых кислот в биологических наночастицах. Устный доклад, «OpenBio-2024» г. Новосибирск, наукоград Кольцово, 24-27 сентября 2024 года. сборник тезисов - 10.25205/978-5-4437-1691-6
3. Тихонов А. С. Программирование внутриклеточного иммунитета как новый подход в лечении инфекционных заболеваний, Устный доклад, «VIII Сеченовский Международный биомедицинский саммит: научно-технологическая кооперация в медицинской отрасли (SIBS-2024)» г. Москва, Сеченовский университет, 6 -7 ноября 2024 года.
4. Тихонов А. С. Эпитранскриптом у пациентов с хроническим гепатитом B и D, Устный доклад, «Актуальные вопросы профилактики инфекционных и неинфекционных болезней: эпидемиологические, организационные и гигиенические аспекты (НАСКИ)», г. Москва, Сеченовский университет, 23-25 октября 2024 года.
5. Тихонов А. С. «Доставка РНК-интерферирующих молекул для подавления репликации вируса гепатита В с помощью программируемых наночастиц». Устный доклад, «III Международный инфекционный форум (МИФ)», г. Москва, 8 — 12 декабря 2024 года.
6. Тихонов А. С. «Механизм защиты ВГВ от цитидин-деаминаз через избыточное количество кольцевой частично двухцепочечной ДНК». Устный доклад, «Международный молодёжный научный форум Ломоносов-2025», г. Москва, МГУ, 11 — 25 апреля 2025 года. Материалы Международного молодежного научного форума «ЛОМОНОСОВ-2025» / Отв. ред. И.А. Алешковский, А.В. Андриянов, Е.А. Антипов, Е.И. Зимакова. [Электронный ресурс] – М.: МАКС Пресс, 2025. ISBN 978-5-317-07418-0.
7. Тихонов А. С. «Особенности действия APOBEC цитидин-дезаминаз на инфицированную клетку при инфекции вирусом гепатита В». Устный доклад, «Science for health», г. Москва, РУДН, 15 — 17 мая 2025 года.
8. Тихонов А. С. «Hepatitis B virus relaxed circular DNA as a primary target for APOBEC deaminases». Устный доклад, «Future of biomedicine 2025», г. Владивосток, ДВФУ, 16 – 22 сентября 2025 года.

9. Future of Biomedicine 2025. IV international scientific conference, 16–22 September 2025: abstract book. – Vladivostok: Publishing House of the Far Eastern Federal University, 2025. [167 p.] – ISBN 978-5-7444-6012-9. – DOI https://doi.org/10.24866/7444-6012-9. – URL: https://www.dvfu.ru/science/publishing-activities/catalogue-of-books-fefu/. – Date of publication:08.12.2025. Text: electronic.

10. Тихонов А. С. «Мутагенное действие APOBEC-дезаминаз при снижении уровней репликации вируса гепатита В». Устный доклад, «Международный инфекционный форум 2025», г. Москва, 9 — 12 декабря 2025 года.

Объем и структура диссертации

Диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук изложена на 113 страницах и состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списков сокращений и литературы, а также приложения. Работа иллюстрирована 11 рисунками и 1 таблицей. Список литературы содержит 188 источников.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Репликация ВГВ

Вирус гепатита В (ВГВ) принадлежит к семейству *Hepadnaviridae* и является единственным представителем этого семейства, патогенным для человека. Геном ВГВ представляет собой частично двухцепочечную кольцевую ДНК размером ~3,2 тыс. п.н., заключённую в нуклеокапсид, который, в свою очередь, окружён липидной оболочкой с встроенными поверхностными антигенами (HBsAg). Жизненный цикл ВГВ отличается рядом уникальных черт, центральное место среди которых занимает формирование ядерного резервуара — ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК), — обеспечивающего хроническую персистенцию вируса

Жизненный цикл ВГВ включает несколько последовательных этапов: прикрепление вируса к рецептору NTCP (натрий-таурохолат котранспортирующий полипептид) на поверхности гепатоцитов, проникновение путём эндоцитоза, высвобождение нуклеокапсида в цитоплазму, ядерный импорт капсиды, высвобождение релаксированной кольцевой ДНК (кчдДНК) в ядро и её репарацию с образованием ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК) [179]. После образования пула ккзДНК в ядре инфицированных гепатоцитов этот стабильный вирусный резервуар служит матрицей для транскрипции всех вирусных РНК, включая прегеномную РНК (pgRNA), которая обратно-транскрибируется в цитоплазме с образованием новых молекул кчдДНК [101; 162]. Таким образом, ковалентно-замкнутая кольцевая ДНК (ккзДНК) представляет собой центральное звено репликативного цикла вируса ВГВ и является основным фактором, обеспечивающим персистенцию вируса в инфицированных гепатоцитах.

Одной из фундаментальных проблем терапии ВГВ остаётся низкая эффективность существующих препаратов в отношении ккзДНК. В настоящее время большинство применяемых средств, включая аналоги нуклеозидов/нуклеотидов (ламивудин, энтекавир, тенофовир), интерфероны альфа (IFN-α) и ингибитор проникновения вируса булевиртид, действуют только на стадии цитоплазматической репликации вируса. Однако они не обеспечивают элиминацию или инактивацию внутриядерного пула ккзДНК [72, 66]. Особенно это характерно для аналогов нуклеозидов/нуклеотидов, которые ингибируют обратную транскрипцию пгРНК в цитоплазме, сохраняя стабильный пул ккзДНК неизменным [74]. Даже при длительной терапии аналогами нуклеозидов/нуклеотидов пациенты часто прерывают лечение и испытывают вирусологический рецидив с быстрым восстановлением вирусной нагрузки благодаря сохранившемуся ккзДНК

резервуару [3]. Это подчеркивает критическую необходимость разработки новых подходов к лечению, способных направленно воздействовать на ккзДНК и приводить к его деградации или стойкой инактивации, что позволило бы достичь функционального или стерилизующего излечения от хронического гепатита В.

1.1.1. Кольцевая ковалентно-замкнутая кольцевая ДНК

Кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК (ккзДНК) является высокостабильной, полностью двухцепочечной и ковалентно-замкнутой формой вирусного генома, которая образуется в результате репарации кчдДНК в ядре инфицированных гепатоцитов [162, 101]. ккзДНК представляет собой суперспирализованную кольцевую молекулу длиной примерно 3,2 килобазы, содержащую полностью двухцепочечное, замкнутое кольцо без каких-либо химических модификаций на концах [9]. В отличие от кчдДНК, ккзДНК не содержит ковалентно присоединенного Р-белка, РНК-праймера или одноцепочечных разрывов; вместо этого оба конца обеих цепей соединены ковалентными фосфодиэфирными связями, создавая полностью замкнутую молекулу [162, 9].

ккзДНК существует в ядре инфицированных гепатоцитов не в виде голой ДНК, а в виде специализированной структуры, обозначаемой как "минихромосома" (minichromosome) [179]. Минихромосома состоит из ккзДНК, оборачивающейся вокруг октамеров клеточных гистонов, включая гистоны H2A, H2B, H3 и H4, точно так же, как клеточная ДНК в нуклеосомах типичного хроматина [134, 152]. Это создает компактную трехмерную структуру, которая позволяет вирусному геному занимать минимальный объем в ядре, одновременно оставляя его доступным для факторов транскрипции хозяйской клетки [30; 3]. Минихромосома также регулируется эпигенетическими модификациями гистонов [84; 189].

Исследования с использованием микрококкальной нуклеазы (MNase) показали, что ккзДНК в минихромосомах содержит примерно 1,5-2 нуклеосомы на одну копию ВГВ генома (в нормальном хроматине содержится примерно 1 нуклеосома на 200 базовых пар ДНК) [9, 152]. Это указывает на то, что ккзДНК более плотно упакована, чем типичная клеточная ДНК, хотя механизм, обеспечивающий эту более плотную упаковку, до конца не понят. Некоторые исследования предполагают, что для формирования минихромосомы вовлечены дополнительные нестандартные гистоны или негистоновые белки, которые могут быть отличны от стандартных гистонов клеточного хроматина [134].

Одной из особенностей ккзДНК является её исключительная стабильность в ядре инфицированных гепатоцитов [127]. Исследования на животных моделях и в культивируемых клетках показали, что ккзДНК может сохраняться в клетках в течение недель, месяцев и даже лет [127]. Это объясняет, почему пациенты с хронической инфекцией ВГВ, получающие противовирусную терапию, часто испытывают рецидив вирусной активности при прерывании лечения - остаточная ккзДНК в немногих инфицированных гепатоцитах достаточна для восстановления вирусной репликации [127].

Количественная динамика снижения ккзДНК при противовирусной терапии аналогами нуклеозидов/нуклеотидов демонстрирует выраженную многофазность. В первые недели лечения период полужизни ккзДНК составляет 6–18 суток, что обусловлено иммуноопосредованной элиминацией инфицированных гепатоцитов [56]. По данным проспективных клинических исследований, в течение первого года непрерывной терапии снижение ккзДНК составляет около 1 $\log_{10}$, соответствуя периоду полужизни ~14 недель. При длительном лечении (2–10 лет) скорость снижения прогрессивно замедляется: период полужизни возрастает до 36–112 недель в зависимости от HBeAg-статуса пациента — у HBeAg-позитивных пациентов он составляет около 36 недель, у HBeAg-негативных достигает 112 недель. В когорте пациентов с коинфекцией вируса гепатита В (ВГВ) и вируса иммунодефицита человека (ВИЧ), получавших нуклеозидную терапию в течение в среднем 65,8 месяцев, в ходе девятилетнего наблюдения было зафиксировано общее снижение уровня ккзДНК на 1,94 $\log_{10}$, что эквивалентно периоду полужизни порядка 76 недель. Принципиально, что выявленное замедление не отражает снижение эффективности противовирусных препаратов, а указывает на смену доминирующего механизма элиминации ккзДНК: от иммунозависимого клиренса инфицированных гепатоцитов на ранних этапах терапии к естественной замене клеток печени в условиях длительного лечения. Период полужизни гепатоцитов в стационарных условиях, согласно литературным данным, составляет 100–300 дней [171], что определяет верхний предел скорости пассивной элиминации ккзДНК и подчёркивает необходимость разработки терапевтических подходов, направленных на её активную деградацию.

Молекулярные механизмы, обеспечивающие исключительную устойчивость ккзДНК, остаются недостаточно изученными. Тем не менее считается, что её длительной персистенции способствуют несколько факторов: защита от деградации клеточными нуклеазами вследствие упаковки в минихромосомную структуру; отсутствие центромерных последовательностей, что

препятствует равномерному распределению ккзДНК между дочерними клетками при митозе; постоянное пополнение внутриклеточного пула ккзДНК за счёт повторного импорта нуклеокапсидов, содержащих кчдДНК, обратно в ядро [127, 9].

Несмотря на устойчивость ккзДНК к большинству современных противовирусных препаратов, исследования показали, что её можно селективно деградировать несколькими механизмами, включая: (1) активацию интерфероном-α, который вызывает транскрипционное подавление и потенциально деградацию ккзДНК; (2) активацию ферментов APOBEC/AID, которые дезаминируют цитидиновые основания в ккзДНК, приводя к мутациям и ее деградации; (3) использование CRISPR/Cas9 технологии для направленного разрушения ккзДНК; (4) активацию пролиферации гепатоцитов, которая приводит к разбавлению и потенциальной потере ккзДНК в дочерних клетках [9, 183].

Как упоминалось ранее, пул ккзДНК в инфицированном гепатоците может значительно увеличиваться посредством процесса, называемого внутриклеточной амплификацией, при котором вновь синтезированные нуклеокапсиды, содержащие кчдДНК, повторно импортируются в ядро для образования дополнительных копий ккзДНК [169, 92] Этот процесс опосредован теми же механизмами ядерного импорта, которые используются нуклеокапсидом при первоначальной инфекции [162].

Исследования показали, что при активной вирусной репликации первоначальный пул ккзДНК, который образуется из входящего вирусного генома, может быть амплифицирован в 5–10 раз посредством реимпорта и репарации вновь синтезированной кчдДНК [162, 86]. Эта амплификация имеет решающее значение для поддержания достаточно высокого пула ккзДНК для обеспечения непрерывного производства вирусных мРНК и новых вирионов [162].

Однако динамика и степень этой амплификации различаются в разных исследованиях, что указывает на то, что её регуляция может зависеть от различных факторов, включая состояние клеточного цикла гепатоцита, активность сигнальных путей и стадию инфекции. Подавление амплификации ккзДНК посредством блокирования процесса реимпорта представляет одну из потенциальных терапевтических стратегий для ограничения персистенции ВГВ [169]

Репарация кчдДНК с образованием ккзДНК включает не менее пяти последовательных этапов, реализуемых внутриклеточными ферментами: (1) удаление ковалентно присоединённого Р-белка с 5'-конца минус-цепи с участием тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы TDP2; (2) удаление РНК-олигомера (праймера) с 5'-конца плюс-цепи при участии FEN1; (3) достройка неполной

плюс-цепи ДНК-полимеразами хозяина; (4) удаление терминальной избыточности минус-цепи; (5) ковалентное лигирование обеих цепей [42, 170]. Биохимические эксперименты установили, что минимально необходимый набор клеточных факторов для репарации кчдДНК *in vitro* включает PCNA, RFC, ДНК-полимеразу δ, FEN1 и лигазу I. *In cellulo* репарацию обеспечивают также ДНК-полимеразы κ и η [42]. Каждый из перечисленных ферментов представляет потенциальную мишень для фармакологического вмешательства: например, ингибирование ДНК-полимеразы δ афидиколином существенно снижает эффективность образования ккзДНК *in vitro [170]*, что указывает на принципиальную применимость данного подхода в разработке лечения.

1.1.2. Кольцевая частично двухцепочечная ДНК

Кольцевая частично двухцепочечная ДНК (кчдДНК) представляет собой частично двухцепочечную молекулу вирусного генома, которая образуется в результате сложного процесса обратной транскрипции прегеномной РНК (pgRNA) в цитоплазме инфицированных гепатоцитов [179, 185]. кчдДНК имеет уникальную структуру, характерную только для гепаднавирусов: минус-цепь ДНК состоит из 3215 нуклеотидов, тогда как плюс-цепь ДНК неполна и содержит одноцепочечный разрыв переменной длины (обычно 50–200 нуклеотидов) на 3'-конце [9, 162]. Кроме того, минус-цепь содержит на своем 5'-конце ковалентно присоединенную вирусную полимеразу, обладающий ревертазной активностью [162].

Минус-цепь кчдДНК также содержит терминальную избыточность, которая образуется в процессе обратной транскрипции [172]. На 5'-конце плюс-цепи находится короткий РНК-праймер длиной обычно 18–50 нуклеотидов, который первоначально служил праймером для инициации синтеза плюс-цепи во время обратной транскрипции пгРНК.

После завершения процесса обратной транскрипции внутри нуклеокапсида, кчдДНК остается тесно упакована внутри икосаэдрической структуры, образованной множеством копий вирусного core-белка (HBc) [93]. Эта упаковка является критической для поддержания структурной целостности кчдДНК и защиты ее от деградации клеточными нуклеазами в цитоплазме [162; 54]. Нуклеокапсиды, содержащие кчдДНК, накапливаются в цитоплазме инфицированных гепатоцитов, где они выполняют несколько критических функций в жизненном цикле ВГВ [179].

Цитоплазматическая кчдДНК распределяется между двумя основными пулами нуклеокапсидов: первый пул представлен незрелыми или созревающими нуклеокапсидами,

которые активно синтезируют кчдДНК путем обратной транскрипци пгРНК, а второй пул — это зрелые нуклеокапсиды, которые готовы к либо переносу в ядро, либо к присоединению поверхностных антигенов (HBsAg) для образования инфекционных вирионов [126].

Транспорт нуклеокапсидов вируса гепатита В в ядро клетки осуществляется посредством комплексов ядерных пор (NPC) при участии системы ядерного импорта. Ключевую роль в этом процессе играет С-концевой домен белка HBc, взаимодействующий с импортинами α и β [29]. Ядерный импорт имеет выраженную селективность: только зрелые нуклеокапсиды, содержащие полноразмерную кчдДНК, способны диссоциировать в ядерном кармане NPC и высвобождать ДНК в нуклеоплазму. Напротив, незрелые нуклеокапсиды, в составе которых находится частично реплицированная кчдДНК, задерживаются на уровне ядерной оболочки и не подвергаются разборке [29]. Указанный процесс обеспечивает импорт исключительно полноценных нуклеокапсидов, что гарантирует точность последующих стадий вирусной репликации. Согласно данным литературы, приблизительно 1/6 от общего клеточного пула кчдДНК локализуется в ядре [70] При этом молярное соотношение кчдДНК и ккзДНК варьирует в пределах 2–10:1.

Исследования показали, что дезпротеинизированная кчдДНК существует как в цитоплазме, так и в ядре инфицированных клеток [31]. Ряд исследований продемонстрировал, что дезпротеинизированные формы кчдДНК присутствуют как в цитоплазме, так и в ядре инфицированных клеток. При этом значительная доля депротеинизированной цитоплазматической кчдДНК ассоциирована с рецепторами ядерного импорта, что указывает на постоянную готовность цитоплазматических нуклеокапсидов к транспорту в ядро Уровни цитоплазматической кчдДНК в активно инфицированных клетках достигают 10^6–10^7 копий на клетку, что значительно превышает содержание ядерной ккзДНК — обычно 10^1–10^2 копий на клетку [162]. Это различие в количестве кчдДНК и ккзДНК имеет критическое значение для защиты ккзДНК от действия противовирусных ферментов, включая цитидиндезаминазы семейства APOBEC/AID [183, 63, 180].

1.2. Цитидин-дезаминазы семейства APOBEC/AID

В последние десятилетия значительное внимание исследователей сосредоточилось на врожденных механизмах противовирусной защиты, особенно на цитидиндезаминазах семейства APOBEC3/AID, как на потенциальных факторах, которые могут индуцировать мутационную инактивацию или физическую деградацию вирусной ккзДНК. Семейство APOBEC (apolipoprotein B mRNA editing enzyme, catalytic polypeptide) человека включает десять хорошо

охарактеризованных белков: APOBEC3A (A3A), APOBEC3B (A3B), APOBEC3C (A3C), APOBEC3D (A3D), APOBEC3F (A3F), APOBEC3G (A3G), APOBEC3H (A3H), AID (activation-induced cytidine deaminase), APOBEC1, и APOBEC4 [102, 152, 14, 91-90, 22, 68]. Из этого семейства APOBEC3 и AID способны непосредственно дезаминировать остатки цитидина (C) в одноцепочечной ДНК, превращая их в остатки урацила (U), что приводит к характерным мутациям C→T на одной цепи и G→A на комплементарной цепи в процессе репликации [152, 112, 14, 129] Благодаря этому механизму ферменты семейства APOBEC/AID демонстрируют мощную противовирусную активность в отношении множества вирусов, включая ретровирусы (особенно HIV-1), гепаднавирусы (включая ВГВ), и другие РНК и ДНК вирусы[103, 163]

Однако несмотря на хорошо документированную противовирусную активность ферментов APOBEC/AID, механизмы, с помощью которых ВГВ активно противодействует этим компонентам врожденного иммунитета и поддерживает стабильный пул ккзДНК в условиях активной вирусной репликации, остаются недостаточно изученными. ВГВ, как известно, обладает многочисленными механизмами иммунной эвазии, включая подавление интерферонового сигналинга путем ингибирования PRRs-опосредованной активации, [165, 53. 180] блокаду нейтрализующих антител через избыточную продукцию HBsAg-содержащих субвирусных частиц, и индукцию иммунотолерантности у хронически инфицированных пациентов. [148, 17] Понимание того, как вирус уклоняется от действия APOBEC/AID, может открыть новые перспективы для разработки более эффективных противовирусных стратегий.

1.2.1. Взаимодействие APOBEC/AID с вирусами.

Семейство ферментов APOBEC/AID представляет собой одну из самых эффективных и универсальных линий врожденной противовирусной защиты, действуя против огромного спектра вирусов, включая ретровирусы, гепаднавирусы, папилломавирусы, герпесвирусы, коронавирусы и множество других вирусов с ДНК и РНК геномом [179. 30]. Это указывает на то, что механизм дезаминирования цитидинов в нуклеиновых кислотах — фундаментальный механизм противовирусной защиты, вероятно, возникший миллионы лет назад для противодействия различным инфекционным агентам [184. 176]

Взаимодействие ферментов семейства APOBEC3 с ретровирусом HIV-1 представляет собой один из наиболее хорошо изученных примеров противовирусной активности этих цитидиндезаминаз [85, 39, 30. 83] APOBEC3G (A3G) является наиболее мощным противовирусным фактором для HIV-1, обладая способностью вызывать гипермутации

вирусного генома посредством дезаминирования цитидинов в процессе обратной транскрипции в цитоплазме инфицированных клеток [85, 96. 130] Когда A3G упаковывается в вирионы и попадает в новые инфицированные клетки, он опосредует дезаминирование вновь синтезируемой минус-цепи ДНК (кДНК) во время обратной транскрипции, вызывая накопление мутаций, которые часто приводят к образованию стоп-кодонов в вирусных генах [130; 85; 39]

Наиболее характерными мутациями, индуцируемыми A3G, являются замены в контексте TGG, при которых триплет TGG (кодирующий триптофан) преобразуется в TAG (стоп-кодон), что приводит к инактивации вирусных белков [87, 132] Наряду с A3G, другие члены семейства APOBEC3, включая APOBEC3F (A3F), APOBEC3D (A3D) и APOBEC3H (A3H), также способны ограничивать репликацию HIV-1, хотя и с различной степенью эффективности [39; 85; 128; 130]

Для противодействия противовирусной активности APOBEC3, HIV-1 имеет вирусный белок, называемый Vif (virion infectivity factor), который вызывает протеасомную деградацию APOBEC3 [96; 34] Vif достигает этого путем рекрутирования E3 убиквитинлигазного комплекса, содержащего Cul5 (Cullin-5), Rbx2 (RING-box protein 2), CBFβ (core-binding factor beta), и элонгины C и B [96, 188, 32] Недавнее исследование выявило точную структуру комплекса HIV-1 Vif, связанного с A3G [85; 168; 59] Вирус лейкемии мышей (MLV) представляет интересный контраст с HIV-1, демонстрируя избирательную чувствительность к определённым членам семейства APOBEC3. Было показано, что MLV высоко чувствителен к ограничению человеческим APOBEC3G (hA3G) и APOBEC3B (hA3B), но устойчив к ограничению гомологичным мышиным APOBEC3 (mA3). Эта дифференциальная чувствительность полностью коррелирует с способностью различных APOBEC3 белков быть упакованными в вирионы MLV.

Механистически, hA3G и hA3B могут быть эффективно упакованы в вирионы MLV через взаимодействие с вирусным Gag-белком, в то время как mA3 не способен упаковываться в вирионы.

Человеческий папилломавирус (HPV) представляет собой ДНК-содержащий вирус, который часто ассоциируется с развитием рака шейки матки и других эпителиальных злокачественных новообразований. Было показано, что члены семейства APOBEC3, в частности APOBEC3A (A3A), APOBEC3B (A3B), APOBEC3C (A3C) и APOBEC3H (A3H), оказывают противовирусное действие против HPV путем дезаминирования обеих цепей генома HPV во время транскрипции или репликации.

Наиболее примечательно, что APOBEC3B (A3B) активно экспрессируется в опухолях, ассоциированных с HPV, и, в частности, связан с развитием HPV18-ассоциированного рака шейки матки.

Существует интересный парадокс в отношении роли APOBEC3 при HPV-инфекции и ассоциированных с HPV опухолях: с одной стороны, APOBEC3, в частности A3A, демонстрируют противовирусную активность против HPV и могут подавлять инфекцию. С другой стороны, повышенная экспрессия APOBEC3B (A3B) в HPV-инфицированных и трансформированных клетках способствует накоплению соматических мутаций в клеточном геноме, что может способствовать развитию опухоли и прогрессированию рака.

Двухцепочечные ДНК-содержащие герпесвирусы, такие как вирус простого герпеса 1 типа (HSV-1) и вирус Эпштейна-Барр (EBV), демонстрируют относительно низкую восприимчивость к дезаминированию ферментами семейства APOBEC3 [4, 5] Это объясняется несколькими факторами: во-первых, большая часть вирусного генома герпесвирусов находится в виде двухцепочечной ДНК, которая менее доступна для дезаминирования [5]. Во-вторых, герпесвирусы содержат специализированные механизмы для подавления APOBEC3, включая рибонуклеотидредуктазы, которые способствуют образованию цитоплазматических агрегатов APOBEC3A и APOBEC3B, тем самым инактивируя эти цитидиндезаминазы [4].

Несмотря на эту общую устойчивость, было показано, что A3C может целевым образом редактировать как плюс-, так и минус-цепи HSV-1 и EBV [94]. Это указывает на то, что хотя герпесвирусы в целом устойчивы к APOBEC3, определенные члены семейства APOBEC3 способны осуществлять противовирусные функции против этих вирусов [103]. Интересно, что этот эффект был лишь частично зависим от дезаминирующей активности APOBEC3, поскольку даже каталитически неактивные варианты APOBEC3 сохраняли значительную противовирусную активность [103; 30]

Исследования показали, что APOBEC3 взаимодействуют с коронавирусным нуклеопротеином, и это взаимодействие ингибирует вирусную репликацию [103]. Предположительно противовирусная активность APOBEC3 относительно коронавирусов может происходить через механизмы, не зависящие исключительно от цитидиндезаминирующей активности, а скорее через белок-белковые взаимодействия [103; 30].

Геномные последовательности вирусных изолятов от пациентов, инфицированных SARS-CoV-2, показали сильное обогащение мутациями C - U [145; 142]. Первое экспериментальное

свидетельство продемонстрировало, что APOBEC3A (A3A), APOBEC1 (A1) и APOBEC3G (A3G) могут редактировать РНК SARS-CoV-2 [145; 30].

Представители семейства APOBEC3 обладают выраженной специфичностью к нуклеотидному контексту, определяющему их способность осуществлять дезаминирование цитозинов в определённых участках нуклеиновых кислот. Показано, что изоформы A3A и A3B преимущественно действуют на мотивы TC в составе как РНК, так и ДНК, тогда как A3G характеризуется высоким сродством к последовательностям TGG. AID, в свою очередь, демонстрирует предпочтение к мотивам WRC (где W = A или T, R = A или G) [31; 21].

Для реализации противовирусной активности белков семейства APOBEC3/AID в отношении большинства ретровирусов критически необходимо включение цитидиндезаминаз в состав формирующихся вирусных частиц. Это обеспечивает контакт с синтезируемым вирусным геномом на стадии обратной транскрипции, что делает возможным прямое дезаминирование [188, 103]. Упаковка регулируется взаимодействиями между APOBEC и вирусным нуклеокапсидом [168, 188].

Однако для ДНК-содержащих вирусов упаковка может быть менее критичной, и APOBEC3 могут осуществлять противовирусную активность через действие на вирусную ДНК или РНК в ядре и цитоплазме клетки.

1.2.2. Механизмы противовирусного действия

Фундаментальный механизм противовирусного действия цитидиндезаминаз семейства APOBEC3 и AID основан на их способности катализировать дезаминирование остатков цитидина (C) в остатки урацила (U) в одноцепочечной ДНК, превращая пары оснований C-G в U-G [114; 43; 48]. Этот процесс происходит через прямую реакцию гидролиза, опосредованную цинк-зависимым активным сайтом каждого APOBEC3 белка, аналогично реакциям, катализируемым другими членами семейства, включая AID.

Цинк-зависимый активный сайт APOBEC3 содержит три гистидиновых остатка и один глутаминовый остаток, которые координируют ион цинка [47; 98; 52]. Этот цинковый центр активирует молекулу воды, превращая её в нуклеофильный гидроксидный ион, который атакует электрофильный углерод на остатке цитидина, инициируя гидролитическое удаление аминогруппы и образование остатка урацила [131; 47]. Процесс дезаминирования является высокоэффективным, и одна молекула APOBEC3 способна дезаминировать множество остатков цитидина в одноцепочечной ДНК [58].

Образующиеся в результате дезаминирования цитидина урациловые основания являются неканоничными компонентами ДНК и в большинстве случаев удаляются посредством системы репарации оснований при участии урацил-ДНК-гликозилазы (UNG) [45; 55]. В тех случаях, когда урацил не элиминируется до наступления репликации, его присутствие в матрице приводит к формированию мутаций типа C→T на одной цепи и G→A на комплементарной, поскольку ДНК-полимераза встраивает аденин напротив урацила при синтезе комплиментарной цепи [131; 77].

Различные представители семейства APOBEC3 характеризуются специфичностью к определённым нуклеотидным контекстам, окружающим целевой остаток цитидина, что определяет спектр редактируемых участков вирусных и клеточных геномов. A3A преимущественно нацелен на мотивы TC, проявляя наибольшую активность в отношении цитидинов в контекстах TC и CC [51; 79; 146] а также эффективно редактируя C-содержащие участки, включённые в шпилечные и иные вторичные структуры ДНК, что имеет принципиальное значение для редактирования множества вирусных последовательностей [81; 11; 15]. APOBEC3B (A3B): предпочитает RTC мотивы (где R = аденин или гуанин), то есть ATC и GTC контексты [132]. A3B демонстрирует предпочтение к мотивам типа RTC (где R = A или G), в частности ATC и GTC . обладая более узкой, по сравнению с A3A, но всё ещё относительно вариабельной специфичностью [132; 15]. A3G характеризуется выраженным сродством к мотивам TGG, что лежит в основе его высокой антивирусной активности в отношении HIV-1, геном которого содержит значительное число таких сайтов [52; 47; 71]. Специфичность контекста согласуется с наблюдаемыми мутациями, при которых кодон TGG часто превращается в стоп-кодон, что приводит к функциональной инактивации вирусных белков. A3H отличается сравнительно низкой контекстной избирательностью и способен редактировать широкий спектр последовательностей, тогда как AID предпочитает мотивы типа WRC (W = A/T, R = A/G) [120; 119; 71].

1.2.3 Влияние вторичной структуры ДНК на специфичность APOBEC/AID

Недавние кристаллографические и биохимические исследования показали, что специфичность редактирования белков семейства APOBEC3 определяется не только линейным нуклеотидным окружением целевого цитидина, но и трёхмерной организацией ДНК, включая формирование шпилек и других вторичных структур [81; 15; 111]. В частности, A3A и A3B

предпочтительно редактируют остатки цитидина, расположенные в шпилечных структурах ДНК, где остаток цитидина находится в одноцепочечном состоянии на вершине петли [15; 144; 48].

Исследования с использованием селективно синтезированных шпилечных структур показали, что A3A и A3B демонстрируют чувствительность к конкретным типам таких структур, и даже идентичные линейные последовательности редактируются с различной эффективностью в зависимости от того, образуют ли они шпильку [11; 123]. Это объясняет, почему редактирование APOBEC3 в геномах часто происходит в виде локализованных кластеров мутаций (феномен, обозначаемый как "kataegis", что означает "ливень"), где множественные остатки цитидина в близкой пространственной близости редактируются в очень короткий период времени [157; 187; 118].

1.2.4. Механизм противовирусного действия через гипермутации

Для большинства вирусов противовирусный механизм APOBEC3/AID работает путём индукции массивного накопления мутаций в вирусном геноме, процесса, обозначаемого как "гиперредактирование" [176; 123; 119]. Когда белки APOBEC3/AID упаковываются в вирионы или активируются в инфицированных клетках, они катализируют дезаминирование множества остатков цитидина в вирусной ДНК [173; 90].

Это массивное редактирование приводит к накоплению потенциально летальных мутаций в критических генах, кодирующих вирусные белки, таких как обратная транскриптаза, белки капсида, оболочечные гликопротеины и другие функционально важные компоненты [30; 173; 67]. В результате накопления этих мутаций вирусные белки либо полностью теряют свою функцию, либо демонстрируют существенно сниженную активность, приводя к образованию дефектных вирионов, неспособных к успешному инфицированию новых клеток [121; 109; 30].

Для HIV-1, наиболее хорошо изученного вируса, было показано, что гиперредактирование A3G приводит к накоплению тысяч мутаций в вирусном геноме, превращая его из функционального вируса в геном, содержащий множество стоп-кодонов и нарушенных рамок считывания [125; 133; 85]. Характерной чертой этого процесса является накопление G→A переходных мутаций на кодирующей цепи вирусного генома, отражающих деаминирование C→U на матричной цепи, которые часто преобразуют функциональные кодоны в стоп-кодоны (TAA, TAG, TGA) или вызывают сдвиги рамок считывания [110; 116].

1.2.5. Деаминазно-независимые механизмы противовирусной активности

Исследования последних лет выявили, что белки APOBEC3/AID обладают противовирусной активностью, которая не зависит от их цитидиндезаминирующей каталитической активности [99; 46; 103]. Мутанты APOBEC3 с нарушенной дезаминирующей активностью, обычно через мутацию критических остатков гистидина в активном сайте, которые координируют атом цинка, всё ещё демонстрируют значительное противовирусное действие, хотя обычно со сниженной эффективностью [51; 46].

Предполагаемые деаминазно-независимые механизмы включают: (1) прямое физическое взаимодействие APOBEC3 с вирусными нуклеопротеидными комплексами, которое может нарушить их конформацию и функциональность [103; 41; 27]; (2) ингибирование вирусной обратной транскриптазы посредством связывания (APOBEC3G связывается с матричной цепью и физически блокирует синтез вирусной ДНК) [19; 54]; (3) воздействие на вирусную РНК, приводящее к её деградации или нарушающее её упаковку в вирионы [103; 95; 99].

1.3. Роль APOBEC/AID в развитии онкологических заболеваний

1.3.1. Мутации, ассоциированные с APOBEC/AID

Комплексное геномное профилирование злокачественных опухолей с использованием методов секвенирования нового поколения (NGS) в последнее десятилетие выявило, что множество типов рака содержат характерные мутационные сигнатуры, которые отражают определённые эндогенные или экзогенные мутационные процессы [65; 177; 150]. Одними из наиболее распространённых сигнатур являются SBS2 (single base substitution signature 2) и SBS13 (SBS13), которые характеризуются C→T и C→G/C→A мутациями, соответственно [60; 108].

Эти мутационные сигнатуры были связаны с активностью членов семейства APOBEC3, в частности APOBEC3A (A3A) и APOBEC3B (A3B) [153; 60]. SBS2 преимущественно характеризуется C→T мутациями и связана с дезаминированием [178]. SBS13 характеризуется C→G и C→A мутациями и отражает более сложный путь обработки урациловых оснований, включающий удаление урацила UNG с последующей ошибочной репарацией через трансляционный синтез или альтернативные пути [142; 143; 64].

1.3.2 Распределение мутаций, связанных с APOBEC/AID в различных типах рака

Исследования связанных с APOBEC3/AID мутационных сигнатур в 2451 первичных опухолях из 39 различных типов злокачественных новообразований в проекте Pan-Cancer

Analysis of Whole Genomes (PCAWG) выявили, что эти сигнатуры наиболее распространены в определённых типах рака [23; 110; 40; 45]. Мутации, связанные с APOBEC3/AID обнаруживаются в 50–60% всех молекулярных подтипов рака молочной железы, но особенно распространены в люминальных подтипах (HR-положительные/HER2-отрицательные) [23; 112]. Мутации, связанные с APOBEC3/AID присутствуют в 40–50% опухолей мочевого пузыря, особенно в мышечно-инвазивном раке [33; 146; 35]. Примечательно, что HPV-позитивные опухоли головы и шеи демонстрируют более высокие уровни связанных с APOBEC3 мутаций [90]. При раке шейки матки аналогичные мутации обнаруживаются в 30–40% опухолей, особенно в HPV-позитивных опухолях. Мутации, связанные с APOBEC3/AID обнаруживаются в большинстве (>80%) плоскоклеточных карцином пищевода [14; 25; 146]. Эта высокая распространённость в плоскоклеточных карциномах пищевода предполагает, что APOBEC3A может быть особенно активен в дифференцирующихся клетках плоского эпителия [146]. Напротив, при раке толстой кишки мутации, связанные с APOBEC3/AID, обнаруживаются редко (менее 5%), указывая на то, что APOBEC3 может не играть значительной роли в колоректальном канцерогенезе [32; 30]. Особое значение в контексте настоящей работы играет роль APOBEC-опосредованного мутагенеза в развитии гепатоцеллюлярной карциномы (ГЦК) - основного онкологического осложнения хронической ВГВ-инфекции. По данным крупнейшего анализа геномов (PCAWG), мутационные сигнатуры SBS2 и SBS13 обнаруживаются в ~15–20% опухолей ГЦК [1], что ниже, чем в раке мочевого пузыря или молочной железы, однако абсолютное число случаев велико ввиду высокой заболеваемости ГЦК во всём мире. Среди ВГВ-ассоциированных ГЦК доля опухолей с APOBEC-сигнатурами значимо выше, что связано с хронической индукцией ИФН-α-опосредованной экспрессии A3A и A3B при ВГВ-инфекции.

Принципиальным наблюдением является то, что из всех членов семейства APOBEC3 именно A3B демонстрирует значимое повышение экспрессии в тканях ГЦК по сравнению с прилегающей нормальной печёночной паренхимой [179]. Высокая экспрессия A3B в ГЦК коррелирует с более низкими показателями общей выживаемости и выживаемости без прогрессирования, что указывает на потенциальную роль A3B как прогностического маркёра. Механистически A3B индуцирует мутации в ключевых онкогенах и онкосупрессорах, включая *TP53*, *PIK3CA*, а также формирует положительную обратную связь с IL-6, усиливая воспалительный ответ в опухолевом микроокружении [179].

Экспериментальные данные подтверждают причинно-следственную связь между активностью APOBEC и развитием ГЦК: экспрессия человеческого A3A в тканях печени мышей приводила к формированию опухолей с характерными мутационными сигнатурами SBS2 и SBS13, обогащёнными в мотивах TCA/TCT [82]. Примечательно, что A3B в той же модели не индуцировал опухолеобразование в печени, что указывает на тканеспецифичность онкогенного потенциала и преимущественную роль A3A в APOBEC-опосредованном канцерогенезе гепатоцитов.

1.3.3 Механизмы активации APOBEC3 в раковых клетках

Вопрос о том, почему белки APOBEC3 активируются в раковых клетках и какие стимулы приводят к их повышенной экспрессии и активности, остаётся предметом активных исследований. Предложено несколько механизмов: (1) Вирусная инфекция: многие белки APOBEC3, в частности A3A и A3B, индуцируются интерфероном-альфа (IFN-α) и интерфероном-гамма (IFN-γ) в ответ на вирусную инфекцию [147; 83; 90]. Инфекция HPV или другими вирусами в клетках, предрасположенных к раку, может приводить к хронической активации интерферонового сигналинга и поддерживаемой долговременной гиперэкспрессии APOBEC3 [49; 57]. Это критично для HPV-позитивных опухолей, где вирусная инфекция постоянно активирует врождённый иммунный ответ [85; 167] (2) Репликационный стресс: исследования показали, что активная ДНК репликация и репликационный стресс могут активировать экспрессию APOBEC3, возможно, через активацию врожденных иммунных путей [114]. Это объясняет, почему быстро делящиеся раковые клетки часто демонстрируют повышенный уровень APOBEC3-ассоциированных мутаций [83]. Активация ATR-CHK1 пути в ответ на репликационный стресс может способствовать усилению мутагенеза [114]. (3) Мутации в *TP53*: потеря функции опухолевого супрессора p53 может приводить к повышению уровня A3B в раковых клетках [101; 114]. Это объясняется тем, что p53 является транскрипционным репрессором генов семейства APOBEC3, и его потеря приводит к активации APOBEC3B [100; 88]. Это предполагает положительную обратную связь, при которой первоначальные мутации TP53 могут стимулировать гиперредактирование, приводящее к ещё большему мутационному бремени и адаптации раковых клеток [116; 101]. Это предполагает положительную обратную связь, при которой первоначальные мутации TP53 могут стимулировать гиперредактирование, приводящее к ещё большему мутационному бремени и адаптации раковых клеток [158; 114]. (4) Воспаление в опухолевом микроокружении: хроническое воспаление в опухолевом

микроокружении, опосредованное цитокинами, такими как TNF-α, IL-6 и другими, может способствовать активации APOBEC3 в раковых и иммунных клетках [116; 147].

1.3.4 Кластеризованный мутационный процесс и явление kataegis

Одной из особенностей APOBEC3 является кластеризованный паттерн мутаций, известный как "kataegis" [157; 187; 118]. Катаэгис характеризуется линией множественных близко расположенных мутаций, часто более сотни мутаций, сконцентрированных в области размером в несколько тысяч пар оснований [6]. Предполагаемый механизм включает: (1) формирование структур одноцепочечной ДНК (например, в результате открытия репликационной вилки или формирования R-loops) в определённых хромосомных локусах [43; 115; 127]; (2) рекрутирование APOBEC3 к этим структурам одноцепочечной ДНК [157; 127]; (3) быстрое и интенсивное редактирование множественных соседних остатков цитидина в этом локусе [63; 118]. Более того, исследования показали, что APOBEC3A (A3A) предпочтительно редактирует остатки цитидина, расположенные в определённых шпилечных структурах, возможно, объясняя локализованную природу катаэгиса [81; 15].

Кроме точечных мутаций (SNVs), активность APOBEC3/AID также может способствовать более глобальной геномной нестабильности, включая образование инсерций, делеций и структурных вариаций [60; 63; 155].

Механизм, посредством которого APOBEC3 способствует этим более обширным геномным перестройкам, предположительно включает: (1) генерацию двойных разрывов за счёт дезаминирования урациловых оснований на обеих цепях ДНК и последующей ошибочной репарации [118; 139]; (2) нарушение репликационной вилки, приводящее к образованию DSBs [43; 126]; (3) нарушение целостности хромосом через механизм, включающий R-loops и открытие репликационных вилок [43; 118].

1.4. Взаимодействие APOBEC3/AID с вирусом гепатита B

История изучения взаимодействия ферментов семейства APOBEC3/AID с вирусом гепатита B началась в начале 2000-х годов с фундаментальных исследований, демонстрирующих, что в процессе развития острого и хронического гепатита B вирусный геном подвергается массивному редактированию, характеризующемуся так называемыми G→A гиперпермутациями, которые происходят в результате дезаминирования цитидинов в одноцепочечной ДНК [152; 159]. Первые авторы, связавшие эти гиперпермутации с деятельностью APOBEC3, обнаружили, что в

образцах сыворотки пациентов с хроническим гепатитом В обнаруживались вирусные геномы, содержащие по существу сотни мутаций, сконцентрированных в определённых регионах вирусного генома [152]. Исследование, проведённое Vartanian и коллегами в 2010 году, опубликованное в PLOS Pathogens, впервые демонстрировало, что APOBEC3G (A3G) является доминирующим противовирусным фактором для ВГВ *in vivo* и может отредактировать до 35% всех вирусных геномов в ткани печени [163]. Это исследование анализировало 41 образец ткани цирротической печени (включая 10 алкогольных, 10 $ВГВ^{+}$, 11 $ВГВ^{+}HCV^{+}$ и 10 HCV^{+}) и 4 нормальных образца, и показало, что в сравнении с нормальной тканью 5 из 7 генов APOBEC3 были значительно гиперэкспрессированы [163]. Авторы пришли к выводу, что цитокиновый шторм, связанный с хроническими воспалительными ответами на ВГВ и HCV, явно активирует множество генов семейства APOBEC3, причём A3G является главным ограничивающим фактором для ВГВ [163].

Детальные механистические исследования выявили, что различные члены семейства APOBEC3 демонстрируют различные способности к редактированию разных форм вирусной ДНК в жизненном цикле ВГВ [184; 149; 22].

Одним из ключевых регуляторов экспрессии APOBEC3 в гепатоцитах является интерферон-альфа (IFN-α), являющийся одним из основных цитокинов, продуцируемых в ответ на вирусную инфекцию [20; 50; 161]. Пять из семи генов APOBEC3 тесно регулируются IFN-α в первичных человеческих гепатоцитах [20; 62].

Это открытие имеет важное клиническое значение, так как пегилированный интерферон-α (PEG-IFN-α) используется для лечения части пациентов с ХГВ, и ответ на терапию PEG-IFN-α может частично объясняться индукцией экспрессии APOBEC3 [20; 62].

Революционные исследования, проведённые в Техническом университете Мюнхена (Helmholtz Munich), впервые детально охарактеризовали механизмы, посредством которых ферменты APOBEC3, индуцированные интерфероном, приводят к деградации вирусной ккзДНК. Работа показала, что активация рецептора лимфотоксина-бета (LTβR) или обработка IFN-α приводят к повышению экспрессии ферментов семейства APOBEC3, в частности A3A и A3B [91].

APOBEC3A (A3A) и APOBEC3B (A3B) способны специфичным образом редактировать ядерную ккзДНК через дезаминирование цитидинов в урацилы [91; 10]. Это редактирование приводит к: (1) накоплению урациловых оснований, которые узнаются клеточной урацил-ДНК-

гликозилазой (UNG); (2) образованию апуриновых (AP) сайтов при удалении урацила; (3) образованию двойных разрывов (DSBs) ДНК при попытке восстановления AP-сайтов.

Наиболее значительным открытием последних исследований было то, что координированная деятельность A3A и A3B может приводить к эффективной деградации ккзДНК, что потенциально открывает новые терапевтические возможности для лечения хронического гепатита B [91; 10; 36].

Когортные клинические исследования выявили интересные ассоциации между генотипами APOBEC3 и прогрессированием инфекции ВГВ [184]. Было показано, что наличие делеции гена A3B связано с более быстрым прогрессированием заболевания, а уровни ДНК ВГВ были значительно выше у носителей делеции A3B [184].

Интересный и неожиданный результат выявился в исследованиях A3D: было показано, что A3D может оказывать провирусный эффект на репликацию ВГВ [184; 152]. Механизм предположительно включает связывание A3D с A3F и A3G, что предотвращает упаковку последних в вирионы, тем самым облегчая вирусную репликацию [184].

Понимание механизмов, посредством которых APOBEC3 ограничивает репликацию ВГВ и деградирует ккзДНК, открыло новые потенциальные терапевтические подходы для лечения хронического гепатита B.

Недавние исследования с использованием CRISPRa (CRISPR активация) продемонстрировали возможность временной и настраиваемой активации эндогенных генов APOBEC3 в клетках для противовирусной активности [75] Использование AAV (аденоассоциированного вируса) или других вирусных векторов для доставки кодирующих последовательностей APOBEC3 в гепатоциты потенциально может привести к локальной активации этих ферментов и деградации ккзДНК [75].

В то же время разрабатываются и комбинированные подходы — объединение APOBEC3-активирующих стратегий с другими методами, направленными на ккзДНК (такие как нуклеазы CRISPR/Cas9, эпигенетические модификаторы или иммунотерапия), что может привести к синергетическому противовирусному эффекту [178].

Несмотря на значительный прогресс в понимании механизмов взаимодействия APOBEC3 и ВГВ, остаётся ряд открытых вопросов, требующих дальнейшего исследования. Известно, что A3B является ядерно-цитоплазматическим челноком, при этом точные сигналы ядерной локализации и механизмы импорта других членов семейства APOBEC3 в ядро остаются

недостаточно изученными [104]. Детальное понимание того, как APOBEC3 взаимодействуют с вирусными белками, включая HBc и HBx, и как эти взаимодействия модулируют противовирусную активность, требует дальнейшего исследования. Отдельных исследований требует оценка влияния APOBEC3 на процесс реимпорта вновь синтезированных нуклеокапсидов, содержащих кчдДНК, в ядро и амплификацию пула ккзДНК [184; 69].

1.5. Ограничения и нерешённые вопросы в исследовании APOBEC/AID при инфекции ВГВ

Одной из фундаментальных проблем при разработке терапевтических стратегий, основанных на активации APOBEC3 для лечения хронического гепатита В, является крайне низкий уровень базальной экспрессии белков семейства APOBEC в гепатоцитах в нормальных условиях [152; 184; 10]. Более того, даже при активной инфекции ВГВ индукция APOBEC3 может быть неполной и недостаточной для полного контроля вирусной репликации [62; 162].

Исследования показали, что пять из семи генов APOBEC3 (A3A, A3B, A3C, A3F, A3G) тесно регулируются интерфероном-альфа (IFN-α) в первичных человеческих гепатоцитах, но только при достаточно высоких концентрациях IFN-α [20; 91]. Это означает, что для достижения терапевтически релевантных уровней APOBEC3 требуется либо длительное лечение высокими дозами IFN-α, либо разработка более эффективных методов активации этих генов.

Другой значительной проблемой является тот факт, что разные гепатоциты демонстрируют различную способность к индукции APOBEC3 в ответ на одни и те же сигналы [50; 9]. Некоторые гепатоциты проявляют выраженный ответ на IFN-α и быстро повышают экспрессию APOBEC3, в то время как другие демонстрируют слабый или отсутствующий ответ [166].

Эта гетерогенность может быть обусловлена несколькими факторами: (1) различиями в экспрессии рецепторов IFN-α (IFNAR1 и IFNAR2) на поверхности гепатоцитов [50]; (2) различиями в балансе активирующих (JAK-STAT) и подавляющих (MAPK) путей внутри гепатоцитов [20]; (3) эпигенетическими различиями в состоянии хроматина в локусах генов APOBEC3 в разных клетках [93]; (4) клеточно-специфичными факторами, которые модулируют чувствительность к IFN-α [166; 9].

Недавние данные существенно усложнили представление о терапевтическом потенциале семейства APOBEC3. Показано, что A3A, являясь интерферон-стимулируемым геном (ISG) и его активация в ответ на воздействие IFN-α, способна, вопреки ожиданиям, подавлять экспрессию других ISG посредством механизма независящего от деаминирования [156]. Установлено, что

A3A связывается с промоторными участками, обогащёнными TTTC-мотивами, характерными для элементов интерферон-стимулируемого ответа (ISRE), и ингибирует связывание фосфорилированного STAT-1, что приводит к снижению транскрипционной активности ряда ISG, включая ISG15 и OAS1 [156].

Таким образом формируется отрицательная обратная связь: IFN-α индуцирует экспрессию A3A, тогда как повышенные уровни A3A, в свою очередь, ограничивают дальнейшую индукцию интерферон-стимулируемых генов. В результате чрезмерная активация A3A потенциально способна ослаблять совокупный противовирусный ответ и создавать благоприятные условия для репликации отдельных вирусов [15].

Существенным ограничением применения APOBEC3 в качестве терапевтической мишени при ХГВ являются различия в субклеточной локализации отдельных членов этого семейства [79]. A3B обладает сигналами ядерной локализации и способен транслоцироваться в ядро, где он взаимодейтсвует с ккзДНК и участвует в её дезаминировании и деградации [184]. В отличие от A3B, A3G не имеет универсального сигнала ядерной локализации и во многих случаях зависит от взаимодействия с вирусными или клеточными РНК для попадания в ядро, вследствие чего значительная доля A3G остаётся в цитоплазме и не участвует в модификации ядерной ккзДНК [185; 79]. Во время митоза, когда ядерная оболочка временно разрушается, геномная ДНК хозяина становится доступной для цитоплазматически локализованных APOBEC3, что создаёт риск усиленного внецелевого мутагенеза. Этот эффект особенно значим для быстро пролиферирующих опухолевых клеток, в которых активация APOBEC3 может усиливать геномную нестабильность [43; 126].

Хроническая инфекция ВГВ, как правило, сопровождается формированием состояния интерферон-резистентности, при котором гепатоциты и клетки иммунной системы демонстрируют сниженный ответ на IFN-α. Это состояние связывают, в частности, со способностью ВГВ ослаблять сигнальный путь IFN-α за счёт действия вирусных белков, включая HBx что приводит к снижению активации APOBEC3 под действием интерфероновой терапии [180].

Хотя гиперредактирование в целом выступает фактором ограничения репликации ВГВ, показано, что ограниченное или «мягкое» редактирование небольшой доли вирусных геномов может способствовать накоплению адаптивных мутаций и эволюционному приспособлению

вируса. В долгосрочной перспективе это создаёт предпосылки для формирования лекарственной резистентности [67].

Как обсуждается в работах, посвящённых роли APOBEC3 в онкогенезе, хроническая или чрезмерная активация этих цитидиндезаминаз сопряжена с риском внецелевого мутагенеза в геноме хозяина. Это обстоятельство представляет собой принципиально важный аспект безопасности, который необходимо тщательно контролировать при разработке стратегий фармакологической активации APOBEC3 [114].

Активации APOBEC3 как единственная терапевтическая стратегия при ХГВ вряд ли будет одновременно достаточно эффективна и безопасна. Представляется более перспективным формирование комбинированных подходов, в рамках которых активация APOBEC3 сочетается с другими методами, включая ингибиторы обратной транскриптазы, технологии редактирования генома на основе CRISPR/Cas9, эпигенетические модификаторы и различные варианты иммунотерапии.

1.6. CRISPR и CRISPR-активирующие системы для терапии хронического гепатита В

В свете обозначенных ограничений особое значение приобретают технологии на основе CRISPR/Cas9 (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats*), которые рассматриваются, с одной стороны, как самостоятельный инструмент прямого воздействия на ковалентно-замкнутую кольцевую ДНК (ккзДНК) ВГВ, а с другой — как платформа для контролируемой транскрипционной активации эндогенных генов семейства APOBEC3. В ряде экспериментальных моделей показано, что направленное редактирование или разрушение ккзДНК с помощью CRISPR/Cas9, а также транзиентная CRISPR-опосредованная активация генов A3A и A3B способны существенно снижать уровни транскрипции и репликации ВГВ, что подчёркивает перспективность комбинированных стратегий, сочетающих оба подхода.

Ранние доклинические исследования продемонстрировали, что CRISPR/Cas9, направленная против консервативных регионов генома ВГВ, может эффективно вносить разрывы в ккзДНК и приводить к её деградации *in vitro* и *in vivo* [167; 84]. Кроме того, было показано, что множественные направляющие РНК (gRNAs), направленные против различных регионов вирусного генома, могут обеспечить более полное разрушение ккзДНК и минимизировать риск вирусной резистентности через мутации в сайтах узнавания [186].

Ряд экспериментальных работ продемонстрировал, что для достижения стойкого излечения недостаточно нацеливаться исключительно на ккзДНК, поскольку кчдДНК служит её

предшественником и резервуаром для формирования ккзДНК. Показано, что однократная доставка рибонуклеопротеиновых комплексов CRISPR/Cas9 может элиминировать более 98% ккзДНК, однако после прекращения действия системы происходит восстановление пула ккзДНК за счёт сохранённой кчдДНК, что подчёркивает необходимость комбинированного подавления обоих вирусных резервуаров [73]

Альтернативные стратегии опираются на модифицированные инструменты CRISPR/Cas, предназначенные не для прямого редактирования генома, а для тонкой регуляции экспрессии генов хозяина. Такие системы, объединяемые термином CRISPRa (CRISPR activation), используют каталитически неактивный вариант Cas9 (dCas9), который лишён нуклеазной активности, но сохраняет способность специфически связываться с целевыми промоторными участками и рекрутировать транскрипционные активаторы, обеспечивая управляемую индукцию эндогенных генов, включая гены семейства APOBEC3.

Исследование, проведенное в 2023 году, продемонстрировало, что временная и настраиваемая активация генов APOBEC3 и AID с использованием CRISPRa может быть достигнута в гепатоцитах для таргетирования ВГВ [75]. В этом исследовании использовалась система dCas9, слитая с транскрипционными активаторными доменами, которая направлялась к промоторным регионам генов APOBEC3A, APOBEC3B и AID с помощью специфичных направляющих РНК, что сопровождалось увеличением уровня соответствующих мРНК более чем в 100 раз по сравнению с исходным уровнем. Ключевым преимуществом CRISPRa является возможность временной активации, которая, в отличие от конститутивной сверхэкспрессии APOBEC3 через вирусные векторы, позволяет обратимо активировать эндогенные гены, минимизируя риски внецелевого мутагенеза геномной ДНК.

В дополнение к системам разрезания ДНК были предложены альтернативные подходы, основанные на редактировании оснований, которые позволяют индуцировать стабильные точечные изменения в геноме ВГВ без формирования двухцепочечных разрывов (DSBs), тем самым снижая риск нежелательных крупномасштабных геномных перестроек. В частности, цитозиновые редакторы, построенные на основе дезаминаз семейства APOBEC - прежде всего APOBEC1, продемонстрировали высокую эффективность против ВГВ, однако их применение сопровождается угрозой внецелевого редактирования как на уровне ДНК, так и РНК, что требует тщательной оценки и минимизации негативных эффектов.

Критическим барьером для клинического применения вариантов терапии, основаннных на CRISPR для лечения хронического гепатита В, является эффективная и безопасная доставка CRISPR компонентов (Cas9 белок или мРНК, и направляющая РНК) в инфицированные гепатоциты. Для решения данной проблемы был предложен ряд подходов. Engineered extracellular vesicles (EVs), модифицированные с VSV-G (vesicular stomatitis virus-glycoprotein) на мембране, показали значительное улучшение доставки функционального Cas9/gRNA в гепатоциты для элиминации ккзДНК ВГВ и интегрированного вирусного генома [182].

Аденоассоциированные вирусные векторы (AAV) продолжают рассматриваться как один из ключевых инструментов доставки терапевтических конструкций в печень, что обусловлено их выраженным тропизмом к гепатоцитам и способностью эффективно трансдуцировать как делящиеся, так и неделящиеся клетки. Эти особенности делают AAV-платформы привлекательными для in vivo доставки компонентов CRISPR/Cas, включая модифицированные dCas9-платформы и редакторы оснований [26]

Наиболее перспективной стратегией может быть комбинирование прямого разрушения ккзДНК ВГВ через CRISPR/Cas9 с одновременной активацией эндогенных APOBEC3 через CRISPRa. Такой двойной подход может обеспечить немедленное разрушение существующей ккзДНК через Cas9-опосредованные двухцепочечные разрывы, долгосрочный контроль над ккзДНК через APOBEC3-опосредованное дезаминирование и деградацию, и синергетический эффект за счёт дестабилизации ккзДНК APOBEC3-индуцированными мутациями, повышающими её восприимчивость к последующему Cas9-опосредованному разрушению [16]. Это направление требует дальнейших доклинических и клинических исследований для оценки эффективности и безопасности, особенно с учетом потенциальных внецелевых эффектов и необходимости полной элиминации всех форм вирусного генома, включая кчдДНК [8].

ВЫВОДЫ К ГЛАВЕ 1

Анализ современной литературы позволяет сформулировать концептуальные тезисы, лежащие в основе настоящего исследования.

1. ВГВ формирует в ядре инфицированных гепатоцитов стабильный эпигенетический резервуар в виде ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК), существующей в составе минихромосомы. Именно ккзДНК обусловливает хроническую персистенцию вируса и устойчивость к действию одобренных противовирусных препаратов, в связи с

чем её элиминация или стойкая инактивация являются необходимыми условиями функционального излечения ХГВ.

2. Кольцевая частично двухцепочечная ДНК (кчдДНК) — промежуточная форма вирусного генома, образующаяся при обратной транскрипции пгРНК — накапливается в клетке в количестве, на порядки превышающем ккзДНК. Значительная часть кчдДНК транспортируется в ядро, где может конкурировать с ккзДНК за доступ к внутриядерным факторам.
3. Цитидин-дезаминазы семейства APOBEC/AID являются многофункциональными факторами врождённого иммунитета, обладающими противовирусной активностью в отношении широкого спектра вирусов. Их противовирусный механизм основан преимущественно на дезаминировании остатков цитидина в одноцепочечной ДНК, однако описаны и деаминазно-независимые способы подавления репликации.
4. APOBEC/AID-дезаминазы, прежде всего A3A и A3B, способны дезаминировать ккзДНК ВГВ и индуцировать её деградацию, что открывает перспективу их терапевтического применения. Вместе с тем эти же ферменты являются значимыми триггерами мутагенеза клеточного генома, ответственными за мутационные сигнатуры SBS2 и SBS13, широко представленные при онкологических заболеваниях.
5. Механизм, посредством которого ВГВ в условиях активной репликации противостоит мутагенной активности APOBEC/AID в отношении ккзДНК, к моменту начала настоящего исследования оставался неизвестным. Не был изучен и вопрос о влиянии терапевтического подавления вирусной репликации на характер взаимодействия APOBEC/AID с вирусным и клеточным геномами.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

2.1. Культивирование клеток человека

Исследование проводили с использованием нескольких видов гепатоцитов. Основной клеточной линией были клетки ГЦК HepG2 и производная линия HepG2-hNTCP, которые культивировали в среде DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium) с высоким содержанием глюкозы (4,5 г/л), дополненной 10% инактивированной фетальной бычьей сыворотки (FBS, Gibco), 2 мМ L-глутамина, 100 ед/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, при 37°C в атмосфере 5% CO_2 в увлажненном инкубаторе. Среду меняли каждые 48 часов, и клетки пассировали 1:3 каждые 3–4 дня с использованием 0,25% трипсина-ЭДТА. Для экспериментов использовали клетки, которые демонстрировали типичную морфологию монослоя.

В дополнение к этим линиям применяли дифференцированные гепатоцитоподобные клетки HepaRG, стабильно экспрессирующие натрий-таурихолат-котранспортирующий полипептид (hNTCP), которые рассматриваются как более физиологичная модель для анализа жизненного цикла ВГВ ввиду их способности формировать популяции гепатоцитоподобных и билиарноподобных клеток при длительном культивировании. Для HepaRG описана более высокая, по сравнению с HepG2 и Huh7, базальная и индуцируемая экспрессия интерферон-стимулируемых генов (ISG), что обусловливает их повышенную информативность в экспериментах, связанных с изучением врождённого противовирусного ответа; в настоящем исследовании клетки HepaRG культивировали в условиях, аналогичных тем, что были использованы для HepG2/HepG2-hNTCP.

2.2. Получение рекомбинантной ккзДНК

Рекомбинантная ковалентно-замкнутая кольцевая ДНК (рккзДНК) была получена с использованием технологии minicircle DNA, как было подробно описано в предшествующих исследованиях [41]. Полная последовательность генома ВГВ генотипа D была синтезирована компанией BGI (Shenzhen, China) и субклонирована в вектор pMC.BESXP между сайтами рекомбинации attB и attP с использованием набора In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Takara Bio). Полученная плазмида была трансформирована в химически компетентные клетки *E. coli* штамма ZYCY10P3S2T согласно стандартным протоколам. После трансформации бактериальные клетки культивировали в среде Terrific Broth при 37°C с интенсивной аэрацией до достижения оптической плотности OD_{600} = 6-8. Затем индуцировали рекомбинацию между attB и attP сайтами

путем добавления в среду индуктора, содержащего 1 N NaOH и 0,2% L-арабинозы, и проводили дополнительную инкубацию при 30°C в течение 3 часов, затем при 37°C в течение 1 часа для оптимизации эффективности рекомбинации. После инкубации бактериальный осадок собирали центрифугированием при 6000 g в течение 10 мин. рккзДНК выделяли из бактериального осадка с использованием набора Plasmid Maxi Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. Процедура включала лизис клеток щелочной фенолизацией, осаждение ДНК изопропанолом, отмывку 70% этанолом и растворение в ТЕ буфере (10 мМ Tris-HCl pH 8,0, 1 мМ ЭДТА). Полученная рккзДНК была высокой чистоты (более 99,7%), общей концентрации 1–2 мг/мл. В итоге была получена рккзДНК длиной 3,2 тысячи пар оснований, содержащая мономерный ВГВ геном, что близко соответствует размеру и структуре ккзДНК дикого типа. Было также создано несколько вариантов рккзДНК, включая транскрипционно активную рккзДНК (активная рккзДНК) и гиперметилированную транскрипционно инактивированную рккзДНК (meth-рккзДНК). Для создания гиперметилированной версии рккзДНК была обработана *in vitro* метилтрансферазой M.SssI (New England Biolabs), которая добавляет метильные группы ко всем остаткам цитозина в контексте CpG динуклеотидов. Полноту метилирования проверяли путем обработки гидролизованной ДНК рестрикционной эндонуклеазой BstUI, которая нечувствительна к метилированию в этих сайтах.

2.3 Трансфекция клеток и введение рекомбинантной ккзДНК

Клетки HepG2 трансфицировали рккзДНК с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, Life Technologies) согласно протоколу производителя. За один день до трансфекции клетки пересаживали в 96-луночные планшеты в концентрации 2×10^4 клеток на лунку в среде DMEM с 10% FBS, что обеспечивало конфлюентность 60–70% во время трансфекции. Через 16 часов после добавления комплекса среду заменяли на полную питательную среду DMEM с 10% FBS. Анализ эффективности трансфекции проводился через 24 часа методом флуоресцентной микроскопии для трансфекций, использовавших маркированные ДНК-конструкции. Обычно достигалась эффективность трансфекции 40–60% в популяции клеток.

2.4. Система CRISPR-активации (CRISPRa) для усиления экспрессии генов APOBEC/AID

Для транскрипционной активации генов, кодирующих члены семейства APOBEC/AID, использовали модифицированную систему CRISPR-активации (CRISPRa), которая основана на применении каталитически неактивного белка Cas9 (dCas9) слитого с доменами активации

транскрипции. Система включала два основных компонента: первый компонент — плазмида либо белок, кодирующая dsaCas9, слитый с доменом активации p300, второй компонент — плазмиды, кодирующие направляющие РНК (sgRNA) для каждого целевого гена. Направляющие РНК были разработаны и синтезированы с целью специфичного нацеливания на область промотора каждого целевого гена (A3A, A3B, A3C, A3D, A3H и AID). sgRNA конструировали для нацеливания на участки ДНК, расположенные в пределах 200–500 п.н. выше сайта начала транскрипции целевого гена, что обеспечивало оптимальную активацию без цитотоксичности. Для каждого гена было разработано 2–3 различных sgRNA, позволяющих выбрать наиболее эффективный вариант после первоначального скрининга. Клетки HepG2 трансфицировали плазмидами, кодирующими компоненты CRISPRa (200 нг dCas9-p300 и 100 нг целевой sgRNA) с использованием Lipofectamine 3000 (Life Technologies) согласно протоколу производителя. Трансфицированные клетки культивировали в течение 72–96 часов перед сбором клеток для анализа. Уровни экспрессии целевых генов измеряли методом количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR) с использованием специфичных олигонуклеотидных праймеров. Эффективность CRISPRa активации оценивали в каждом эксперименте путем измерения уровней мРНК целевых генов. Обычно достигалось 2–20-кратное увеличение экспрессии целевых генов, которое было достаточным для получения значимого противовирусного эффекта.

2.5 Противовирусная терапия ламивудином и shRNA

Для снижения уровней кчдДНК ВГВ и оценки влияния этого снижения на дезаминирование ккзДНК использовали два независимых подхода: обработка ингибитором обратной транскриптазы ламивудином и трансфекция малой шпилечной РНК (shRNA). При добавлении ламивудина в культуральную среду происходит прерывание цикла синтеза кчдДНК в цитоплазме, однако существующий пул ккзДНК в ядре остается нетронутым, так как ламивудин не влияет на уже сформированные молекулы ккзДНК. Для фармакологического подавления репликации ВГВ применяли ламивудин (Sigma-Aldrich). Препарат растворяли в PBS до концентрации 10 мМ, за сутки до трансфекции вносили в культуральную среду до достижения конечной концентрации 2 мкМ и далее поддерживали в среде на протяжении 6 дней инкубации. Питательную среду, содержащую ламивудин, обновляли через каждые 48 часов, что позволяло сохранять стабильный уровень препарата в культурах в течение всего эксперимента.

Для более глубокого подавления репликативной активности вируса использовали малую шпилечную РНК (shRNA), нацеленную на ген *HBx*, кодирующий ключевой регуляторный белок,

необходимый для инициации и поддержания транскрипции пгРНК и других вирусных транскриптов. Последовательность shRNA, направленной против *HBx*, была синтезирована компанией Integrated DNA Technologies (IDT) и имела следующий таргетный участок: 5'-GCGACGCCTGCTGCGCGAGG-3'. В качестве отрицательного контроля использовали shRNA с произвольной последовательностью, не комплементарной известным генам человека и ВГВ. Клетки HepG2, трансфицированные рккзДНК, трансфицировали shRNA одновременно с трансфекцией компонентов CRISPRa в концентрации 20 нМ с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen) согласно стандартному протоколу производителя.

2.6. Модель инфекции вируса гепатита В

Клетки HepG2-hNTCP (линия HepG2, стабильно экспрессирующая натрий-таурохолат котранспортирующий полипептид — рецептор входа ВГВ) высевали на 6-луночные планшеты, покрытые коллагеном I типа (из хвостов крыс), в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (Gibco), дополненной 10% эмбриональной телячьей сывороткой (ЭТС, Biosera), при плотности 6×10^4 клеток на лунку. После формирования монослоя клетки культивировали дополнительные 3 суток без пассирования, после чего среду заменяли на аналогичную, содержащую 2% диметилсульфоксида (ДМСО, Sigma-Aldrich) для индукции дифференцировки. Спустя 72 часа клетки инфицировали вирусом гепатита В из расчёта 650 геномных эквивалентов на клетку в среде Williams E (Gibco), дополненной GlutaMAX, 50 мкМ гидрокортизоном, 5 мкг/мл инсулином, 2% FetalClone II (Thermo Fisher Scientific), 50 Ед/мл пенициллина, 50 мкг/мл стрептомицина и 4% полиэтиленгликоля 8000 (ПЭГ-8000). Через 24 часа после инфицирования клетки трижды отмывали фосфатным солевым раствором (PBS) по 3 мл и добавляли свежую среду без ПЭГ-8000. На третьи сутки после инфицирования в соответствующих экспериментальных группах к среде добавляли ламивудин до конечной концентрации 2 мкМ; среду с ламивудином заменяли каждые 3 суток.

2.7. Выделение нуклеиновых кислот из клеток

Клетки, отмытые PBS, лизировали в лизирующем буфере (АмплиСенс Биотехнологии, Россия) и выделяли суммарные нуклеиновые кислоты с использованием набора АмплиСенс Рибопреп (АмплиСенс Биотехнологии, Россия) согласно протоколу производителя. Для селективного анализа ккзДНК выделенные образцы обрабатывали экзонуклеазой T5 (New England Biolabs, США) при 37°C в течение 60 минут с последующей инактивацией фермента при

70°C в течение 20 минут. Данная обработка обеспечивает деградацию линейной и открытой кольцевой ДНК (включая кчдДНК), сохраняя интактными только молекулы ковалентно замкнутой кольцевой ДНК. Концентрацию выделенных нуклеиновых кислот определяли методом спектрофотометрии (NanoDrop ND-1000, Thermo Scientific).

2.8. Синтез и очистка однонаправляющих РНК (sgRNA) *in vitro*

ПЦР-продукт, кодирующий последовательность sgRNA под контролем промотора T7, синтезировали с использованием ДНК-полимеразы Q5 (New England Biolabs) на основе U6-ПЦР-продукта с праймерами ultramerT7_f и ultramerSt1_r, как описано ранее. Полученный ПЦР-продукт, содержащий промотор T7, использовали в качестве матрицы для реакции транскрипции *in vitro* (IVT) с применением набора HiScribe Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs) согласно протоколу производителя. Реакционную смесь инкубировали в течение ночи при 37°C, после чего обрабатывали ДНКазой I (New England Biolabs) в течение 15 мин при 37°C. Очистку синтезированной РНК проводили осаждением изопропанолом в присутствии 0,5 M NaCl с последующим последовательным промыванием осадка 70% и 95% этанолом. Высушенный осадок ресуспендировали в воде, свободной от РНКаз, и хранили при −80°C.

2.9. Экспрессия и очистка рекомбинантного белка saCas9-p300

Рекомбинантный белок saCas9-p300 экспрессировали в клетках *E. coli* штамма BL21 (DE3) pLysS (Novagen). Клетки культивировали в среде LB, дополненной ампициллином, 0,5% сахарозой, 0,5% глицерином, 1 мМ хлоридом магния, 50 мМ Na_2HPO_4, 50 мМ KH_2PO_4 и 25 мМ $(NH_4)_2SO_4$, при 30°C до достижения оптической плотности OD_{600} = 1,2. Экспрессию индуцировали добавлением 0,1 мМ ИПТГ (изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозида) с последующей инкубацией при 18°C в течение 16 ч. Клетки ресуспендировали в буфере (50 мМ Tris-HCl pH 8,0; 500 мМ NaCl; 1 мМ ФМСФ; 0,2% Triton X-100; 0,1% Tween 20), обрабатывали ультразвуком на льду и центрифугировали при 15 000×g в течение 40 минут. Осветлённый лизат обрабатывали 0,05% полиэтиленимином при 4°C в течение 30 минут, затем повторно центрифугировали. Белок очищали последовательной аффинной хроматографией на Ni-хелатирующей сефарозе (GE Healthcare) и ионообменной хроматографией на SP-сефарозе (GE Healthcare). Очищенный препарат доводили до конечной концентрации глицерина 50% и хранили при −20°C.

2.10. Методы количественного анализа вирусной ДНК

Уровни различных форм ВГВ ДНК — включая ккзДНК, кчдДНК — определяли методом количественной ПЦР в реальном времени (qPCR). Праймеры и зонды были разработаны для специфичной амплификации каждой формы ДНК. Для селективной амплификации только ккзДНК использовался набор праймеров, разработанных так, чтобы они не амплифицировали интегрированную ДНК ВГВ или кчдДНК. Реакционная смесь содержала 50 нг геномной ДНК, 0,5 мкМ каждого праймера и 0,2 мкМ TaqMan зонда в составе 2×TaqMan PCR Master Mix (Applied Biosystems) в общем объеме 20 мкл. ПЦР проводили с использованием прибора StepOnePlus (Applied Biosystems) с начальной фазой 95°C, 10 мин, затем 50 циклов 95°C (15 с) и 60°C (1 мин). Количество копий ккзДНК определяли путем сравнения значения Ct (threshold cycle) исследуемых образцов с кривой стандартов, полученной с использованием серийных разведений плазмиды, кодирующей ккзДНК ВГВ. Для определения общего уровня внутриклеточной ДНК ВГВ использовали праймеры к консервативным регионам ВГВ генома, которые амплифицировали все формы вирусной ДНК. После определения общей внутриклеточной ДНК ВГВ, уровень кчдДНК рассчитывали как разницу между общей внутриклеточной ДНА и ккзДНК.

2.11. Анализ дезаминирования методом 3D-ПЦР

Цитозин-специфическое дезаминирование вирусной ДНК, индуцированное ферментами APOBEC/AID, анализировали методом дифференциальной денатурационной ПЦР (3D-ПЦР), который основан на различии в температурах плавления (Tm) между нормальной GC-богатой ДНК и AT-обогащенной ДНК, образующейся в результате мутаций C→T после дезаминирования остатков цитидина в урацил. Метод 3D-ПЦР был разработан для детекции и количественной оценки мутаций, индуцированных APOBEC/AID, и представляет собой мощный инструмент для анализа вирусной эволюции под давлением врожденного иммунитета. Геномная ДНК выделялась из клеток HepG2 через 6 дней после начала экспериментальных манипуляций с использованием набора QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. После выделения концентрация ДНК определялась спектрофотометрией (NanoDrop ND-1000), и ДНК хранили при –20°C до анализа. 3D-ПЦР проводили с использованием специфичных праймеров, разработанных для амплификации различных регионов генома ВГВ, включая X-область 1340 п.н., и полногеномные регионы. Реакционная смесь содержала 100 нг геномной ДНК, 0,5 мкМ каждого праймера, 200 мкМ dNTP, 1× буфер Taq полимеразы, 2,5 мМ $MgCl_2$ и 1 ед. Taq ДНК полимеразы (Takara Bio) в общем объеме 50 мкл.

ПЦР проводили с использованием градиента температур денатурации от 82°C до 88°C в 1°C интервалах для выявления различий в температуре плавления ампликонов. Программа ПЦР включала начальную денатурацию при 95°C в течение 5 мин, затем 40 циклов денатурации при переменной температуре (от 82°C до 88°C, 15 с), отжига при 55°C (20 с) и удлинения при 72°C (1,5 мин на килобазу), с финальным удлинением при 72°C в течение 10 мин.

Продукты амплификации анализировали методом электрофореза в 1,5% агарозном геле в буфере ТАЕ, окрашивали бромидом этидия и визуализировали под УФ-светом.

2.12. Высокопроизводительное секвенирование (NGS)

Для детального анализа спектра мутаций, индуцированных ферментами APOBEC/AID в вирусной ДНК, проводили таргетное секвенирование нового поколения (NGS) Х-региона ВГВ ккзДНК и секретируемой вирусной ДНК. Секвенирование выполняли на платформе DNBSEQ (прибор DNBSEQ-G50, MGI Tech, КНР).

Библиотеки для секвенирования готовили путём ПЦР-амплификации целевых регионов генома ВГВ с использованием специфичных праймеров. ПЦР проводили в трёх технических повторностях для каждого образца с применением высокоточной ДНК-полимеразы (Phusion High-Fidelity DNA Polymerase, Thermo Scientific). Продукты амплификации очищали с использованием магнитных частиц AMPure XP (Beckman Coulter), объединяли в равных молярных соотношениях и подвергали дополнительной ПЦР-амплификации для добавления уникальных индексных штрих-кодов для мультиплексирования. Концентрацию конечных библиотек определяли методом флуорометрии (Qubit 2.0, Life Technologies), качество оценивали электрофорезом на приборе TapeStation (Agilent). Для подготовки библиотек к секвенированию на платформе DNBSEQ проводили циркуляризацию ДНК с последующим формированием ДНК-наношариков (DNB) согласно протоколу производителя (MGI Tech). Секвенирование проводили в режиме парноконцевых прочтений длиной 100 п.н. (PE100) на проточной ячейке FCL, обеспечивающей выход до 150 Гб данных за запуск при точности прочтений Q30 ≥85%. Типичная глубина покрытия целевых регионов составляла 100 000–1 000 000 прочтений на образец.

После секвенирования полученные прочтения обрабатывали с использованием биоинформатического пайплайна: первичный контроль качества проводился в программе FASTQC, прочтения с низким качеством отбраковывали. Прочтения выравнивали на референсную последовательность ВГВ генотипа D (GenBank NC_003977.1) с использованием

алгоритма BWA-MEM. Дублированные прочтения, возникающие при ПЦР-амплификации, удаляли с использованием инструмента MarkDuplicates из пакета GATK (Genome Analysis Toolkit). Варианты (SNV и инделы) идентифицировали с помощью GATK HaplotypeCaller с пороговым значением качества Q30; аннотацию проводили с использованием SnpEff. Анализ мутационного спектра включал категоризацию всех выявленных замен по типу (C→T, G→A и др.), нуклеотидному контексту (5'- и 3'-фланкирующие нуклеотиды редактируемого цитозина) и локализации в геноме ВГВ (X-область, preC/C-область и др.).

2.13. Анализ вирусных белков методом ELISA

Уровни вирусных поверхностных антигенов (HBsAg) и е-антигенов (HBeAg) определяли в культуральной среде и внутри клеток методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) с использованием коммерческих наборов в соответствии с протоколом производителя. Образцы клеточной культуры отбирали через указанные времена, центрифугировали при 500g в течение 5 мин для удаления клеток и клеточного дебриса, затем замораживали при –80°C до анализа.

Для измерения HBsAg 50–100 мкл культурального супернатанта разводили 1:100 или 1:1000 в буфере разведения и добавляли в микролуночные планшеты, предварительно покрытые моноклональными антителами к HBsAg. После инкубации при комнатной температуре и промывок добавляли вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Реакцию проявляли с использованием субстрата TMB (тетраметилбензидин), реакцию останавливали 2 N H_2SO_4, и оптическую плотность измеряли на спектрофотометре для микролуночных планшетов при 450 нм.

2.14. Анализ экспрессии генов методом qRT-PCR

Уровни экспрессии мРНК членов семейства APOBEC/AID анализировали методом количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Общую РНК выделяли из клеток с использованием набора RNeasy Mini Kit (Qiagen) согласно протоколу производителя. РНК обратно транскрибировалась в кДНК с использованием набора SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen) согласно рекомендациям производителя.

qRT-PCR проводили с использованием SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) и специфичных праймеров для каждого гена. Программа ПЦР включала начальную фазу при 95°C в течение 10 мин для денатурации, затем 40 циклов 95°C (15 с), отжига при 55–60°C (30 с,

в зависимости от конкретного праймера) и удлинения при 72°C (30 с) с последующей кривой плавления для проверки специфичности продукта. Относительная экспрессия целевых генов рассчитывалась методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$ с нормировкой на уровень экспрессии генов домашнего хозяйства (*GAPDH* и β-актин).

2.15. Иммуноблоттинг (Western-блот)

Для анализа уровней белков клеточные лизаты готовили на льду в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl pH 7,4; 150 мМ NaCl; 1% NP-40; 0,5% дезоксихолат натрия; 0,1% ДСН) в присутствии ингибиторов протеаз (коктейль cOmplete, Roche). Концентрацию белка определяли методом БЦА (BCA Protein Assay Kit, Pierce/Thermo Scientific). Образцы (30–50 мкг суммарного белка) разделяли в 10–12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях (ДСН-ПААГ) и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Bio-Rad) методом полусухого переноса. Мембраны блокировали 5% обезжиренным молоком в ФБР-Т (ФБР с 0,1% Tween 20) в течение 1 часа при комнатной температуре, после чего инкубировали с первичными антителами при 4°C в течение ночи. Использовали следующие первичные антитела: к белку HBx (Abcam), к APOBEC3A и APOBEC3B (Santa Cruz Biotechnology), к β-актину в качестве контроля нагрузки (Sigma-Aldrich). После трёхкратной отмывки в ФБР-Т мембраны инкубировали с соответствующими вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (1:5000, 1 ч, комнатная температура). Визуализацию проводили методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Thermo Scientific) на системе Bio-Rad ChemiDoc MP. Денситометрический анализ полос выполняли с использованием программного обеспечения ImageJ.

2.16. Хроматин-иммунопреципитационное секвенирование (ChIP-Seq)

Для картирования геномных локусов, связанных с ферментами APOBEC3A и APOBEC3B, использовали метод иммунопреципитации хроматина с последующим высокопроизводительным секвенированием (ChIP-Seq). Клетки HepG2-hNTCP, инфицированные ВГВ, фиксировали 1% формальдегидом в течение 10 минут при комнатной температуре; реакцию останавливали добавлением глицина до конечной концентрации 0,125 М. Хроматин фрагментировали ультразвуком (фрагменты 150–300 п.н.) с использованием ультразвукового дезинтегратора Bioruptor (Diagenode). Иммунопреципитацию проводили с антителами против A3A или A3B (Santa Cruz Biotechnology) в присутствии белок-A/G-сефарозных шариков при 4°C в течение ночи. После серии промывок иммунопреципитированную ДНК элюировали, деперекрёстно

сшивали при 65°C в течение ночи и очищали набором QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). Библиотеки для секвенирования готовили с использованием набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI Tech) согласно протоколу производителя, включающему этапы восстановления концов, добавления адаптеров и циркуляризации ДНК для формирования ДНК-наношариков (DNB). Секвенирование проводили на приборе DNBSEQ-G50 (MGI Tech) в режиме одиночных прочтений длиной 100 п.н. (SE100) на проточной ячейке FCL. Биоинформатическую обработку данных выполняли с использованием пакетов Bowtie2 (выравнивание на геном человека hg38), SAMtools (фильтрация и сортировка прочтений) и MACS2 (идентификация пиков связывания). Аннотацию пиков проводили относительно базы данных UCSC hg38.

2.17. Статистический анализ

Все эксперименты проводили не менее чем в трёх независимых биологических повторностях; каждое измерение выполнялось в двух-трёх технических повторностях. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартное отклонение (M±SD) или стандартная ошибка среднего (M±SEM), как указано в подписях к рисункам. Статистическую значимость различий между двумя группами оценивали с использованием двустороннего критерия Стьюдента (unpaired t-test). Для сравнения трёх и более групп применяли однофакторный (one-way ANOVA) или двухфакторный (two-way ANOVA) дисперсионный анализ с апостериорным критерием Тьюки для множественных сравнений. Различия считались статистически значимыми при $p < 0,05$. Все расчёты и построение графиков проводили в программном обеспечении R версии 4.1.2 в среде Rstudio.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1 Дезаминирование транскрипционно инактивированной ккзДНК вируса гепатита В ферментами APOBEC/AID протекает активнее в сравнении с активно реплицирующейся формой вирусного генома

Первая серия экспериментов была направлена на прояснение ключевого вопроса: определяет ли транскрипционный статус ккзДНК эффективность её дезаминирования ферментами семейства APOBEC/AID? Для ответа на этот вопрос была разработана экспериментальная система с использованием двух различных форм рекомбинантной ккзДНК: транскрипционно активной рккзДНК (обозначаемой как WT-рккзДНК) и транскрипционно инактивированной гиперметилированной рккзДНК (meth-рккзДНК). Различие между этими двумя формами заключается в том, что только транскрипционно активная WT-рккзДНК инициирует образование вирусной прегеномной РНК (пгРНК) и последующие этапы вирусной репликации, включая синтез кчдДНК.

Гиперметилированная meth-рккзДНК была получена путем обработки рккзДНК метилтрансферазой M.SssI в условиях, обеспечивающих полное метилирование всех остатков цитозина в контексте CpG динуклеотидов на всей длине генома. Полнота метилирования была верифицирована рестрикционным анализом, продемонстрировавшим, что все потенциальные сайты рестрикции, чувствительные к метилированию цитозина, становились нечувствительными к гидролизу. Гиперметилирование CpG в составе ВГВ ккзДНК приводит к стойкому эпигенетическому сайленсингу вирусных генов и подавлению синтеза вирусных РНК.

В эксперименте клетки HepG2 котрансфицировали либо WT-рккзДНК, либо meth-рккзДНК вместе с компонентами системы CRISPRa для активации экспрессии генов A3A, A3B, A3C, A3D, A3H или AID. Клеточные лизаты и культуральный супернатант собирали через 6 дней после трансфекции для анализа различных параметров вирусной репликации и дезаминирования.

Результаты qPCR показали, что CRISPR-активация генов A3A, A3B и AID приводила к снижению уровней и ккзДНК (рис. 1B) примерно на 50–75% как в группе рккзДНК, так и в группе мет-рккзДНК. Однако анализ с использованием методов 3D-ПЦР и таргетного секвенирования нового поколения выявил существенные и статистически значимые различия в степени цитозин-специфического дезаминирования между этими двумя формами ккзДНК. Было обнаружено, что при использовании ферментов A3A, A3B и AID спектр и интенсивность дезаминирования в мет-рккзДНК превышали таковые в рккзДНК при этом частота мутаций C→T в рккзДНК составляла

3–15%, тогда как в рккзДНК — 0,01–0,5%, (рис. 1Г, Д) что свидетельствует о принципиальном влиянии транскрипционного статуса на доступность ккзДНК для дезаминаз. Более интенсивное дезаминирование meth-рккзДНК согласуется с опубликованными данными: установлено, что A3A эффективнее дезаминирует метилированный цитозин, тогда как A3B, напротив, несколько хуже работает с метилированными CpG-контекстами [32; 119]. Парадоксальное усиление дезаминирования meth-рккзДНК по сравнению с WT-рккзДНК в настоящей работе объясняется не различием в субстратной специфичности, а принципиально иным биологическим контекстом: WT-рккзДНК запускает вирусную репликацию и накопление кчдДНК, выступающей в роли конкурентного субстрата для APOBEC/AID, тогда как meth-рккзДНК лишена этой защиты.

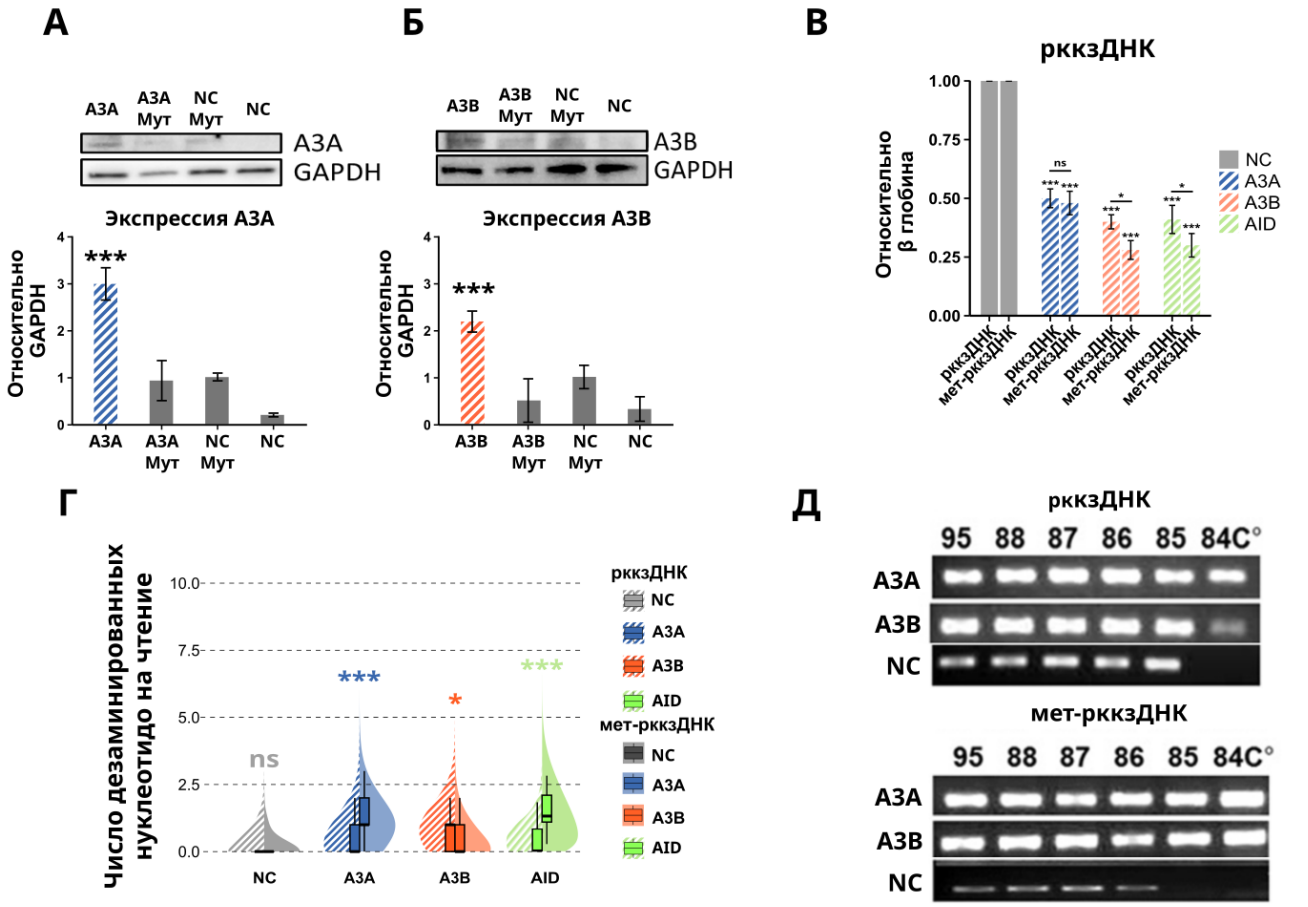


Рисунок 1. Влияние A3A, A3B и AID на транскрипционно активную и инактивированную кзкДНК. Анализ уровней белка (А)A3A и (Б)A3B методом Western-блот после CRISPR-активации. (В) Анализ уровней ркккзДНК методом ПЦР в реальном времени после CRISPR-активации A3A, A3B и AID. Анализ дезаминирования в ркккзДНК и метилированной ркзкДНК методом (Г) NGS и (Д)3D-ПЦР. Мут — контрольный активирующий белок saCas9 с удаленным доменом активации. NC — контрольная направляющая РНК (sgRNA) без специфичности к мишени. ns — статистически незначимо; *p < 0,01; ***p < 0,0001.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ 3.1

1. Установлено, что транскрипционный статус ккзДНК принципиально определяет интенсивность её дезаминирования: разработана экспериментальная модель с использованием транскрипционно активной (WT-ркккзДНК) и гиперметилированной (meth-ркккзДНК) форм рекомбинантной ккзДНК.

2. Методами 3D-ПЦР и таргетного секвенирования NGS установлено, что гиперметилированная meth-ркккзДНК дезаминируется ферментами A3A, A3B и AID с существенно более высокой частотой (3–15% мутаций C→T) по сравнению с неметилированной WT-ркккзДНК (0,01–0,5%).

3. Полученные данные свидетельствуют о том, что гиперметилирование ккзДНК вируса гепатита В, выступая в роли механизма транскрипционного сайленсинга, одновременно сенсибилизирует вирусный геном к мутагенному действию цитидин-дезаминаз семейства APOBEC/AID.

3.2 Блокада образования кольцевой частично двухцепочечной (кчдДНК) формы генома вируса гепатита В усиливает инактивацию ккзДНК

Для проверки предположения о роли кчдДНК в защите ккзДНК от APOBEC/AID была разработана экспериментальная схема, в которой уровни кчдДНК специфичным образом снижались двумя независимыми и дополнительными методами: обработкой ингибитором обратной транскриптазы ламивудином (LAM) и подавлением вирусной репликации малой шпилечной РНК (shRNA), нацеленной на Х-ген ВГВ. Оба этих подхода приводят к эффективному снижению уровней кчдДНК в цитоплазме, однако посредством различных молекулярных механизмов, что позволяет оценить общность наблюдаемого феномена.

3.2.1. Снижение уровней кчдДНК ламивудином усиливает дезаминирование ккзДНК

Клетки HepG2, которые были трансфицированы рекомбинантной ккзДНК, обрабатывали ламивудином в концентрации 2 мкМ, начиная за один день до трансфекции и в течение 6 дней после трансфекции. Концентрация 2 мкМ была выбрана на основе предварительных исследований и полностью соответствует концентрациям ламивудина в плазме пациентов, получающих терапию по поводу инфекции ВГВ.

Анализ методом ИФА показал, что уровни HBsAg в культуральном супернатанте клеток, обработанных ламивудином, не отличались от уровней в контрольной группе (рис. 2A), получавшей одну только рккзДНК без обработки LAM. Это ожидаемый результат, так как ламивудин не влияет напрямую на транскрипцию вирусных РНК. Однако внутриклеточные уровни ДНК ВГВ снижались при обработке LAM, при CRISPR-активации A3A/A3B/AID, или при комбинированном воздействии LAM + CRISPRa в примерно равной степени.

Анализ различных форм ДНК ВГВ методом qPCR показал, что уровни ккзДНК снижались в 2–3 раза при CRISPR-активации A3A, A3B или AID в монорежиме в контрольной группе (без LAM) (рис. 2B). Однако в группе, обработанной LAM, селективная активация A3A (но не A3B или AID) в сочетании с LAM демонстрировала статистически значимо большую эффективность снижения уровней ккзДНК по сравнению с одной только CRISPR-активацией A3A. Специфично, LAM + A3A приводила к примерно 50% снижению ккзДНК (рис. 2B), в то время как только активация A3A приводила к снижению уровней ккзДНК на 20–30%.

Анализ 3D-ПЦР выявил выраженные различия в степени и интенсивности цитозин-специфического редактирования различных форм ДНК ВГВ между контрольными группами и клетками, обработанными LAM. При обработке LAM секретируемая ВГВ ДНК демонстрировала

значительно более интенсивное дезаминирование ферментами A3A и A3B в сравнении с контрольной группой (рис. 2Г). Полосы в геле, соответствующие дезаминированным ампликонам (денатурирующимся при более низких температурах), были значительно более интенсивными в группе LAM, особенно для A3A и A3B. Наблюдалось также умеренное улучшение дезаминирования ккзДНК ферментом AID и внутриклеточной ДНК ВГВ ферментом A3B при обработке ламивудином (рис. 2Е).

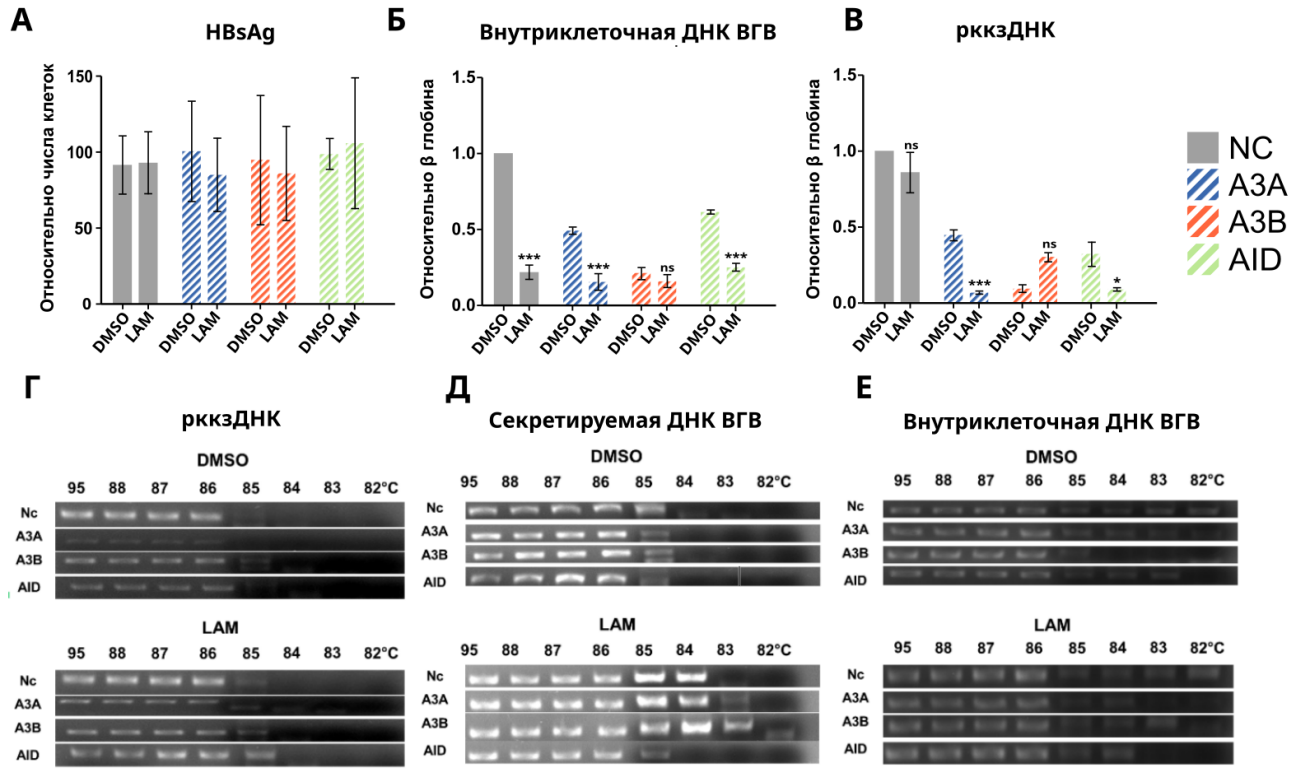


Рисунок 2. Противовирусная и дезаминирующая активность APOBEC/AID в комбинации с терапией LAM. (А) Анализ секретированного HbsAg методом ИФА. (Б) Влияние комбинации CRISPR активации APOBEC/AID и ламивудина на уровень (Б) внутриклеточной ДНК ВГВ и (Г) рккзДНК. (Г) Анализ дезаминирования рккзДНК методом 3D-ПЦР в контрольной (обработанной DMSO) и экспериментальной (обработанной ламивудином) группах. (Д) Анализ дезаминирования секретированной ДНК ВГВ методом 3D-ПЦР. (Е) Анализ дезаминирования внутриклеточной ДНК ВГВ методом 3D-ПЦР. NC — контрольная направляющая РНК (sgRNA) без специфичности к мишени. ns — статистически незначимо; **p < 0,001; ***p < 0,0001.

3.2.2 Подавление синтеза кчдДНК с помощью shRNA против HBx усиливает дезаминирующую активность APOBEC/AID

Для оценки влияния подавления HBx на репликацию вируса использовали малую шпилечную РНК (shRNA), нацеленную на *HBx*, и анализировали как секретируемые, так и внутриклеточные вирусные маркеры. По данным ИФА, обработка клеток специфичной shRNA сопровождалась

выраженным снижением концентрации HBsAg в культуральной среде по сравнению с группой, обработанной контрольной shRNA (Mock-shRNA), что согласуется с ключевой ролью HBx в поддержании транскрипции вирусных РНК (рис. 3A) [181].

Анализ методом qPCR показал, что внутриклеточные уровни ДНК ВГВ резко снижались при обработке shRNA в сравнении с контрольной shRNA (рис. 3B), как в монотерапии, так и при комбинировании с CRISPRa. Уровни ккзДНК снижались на 30–50% при CRISPRa в контрольной группе, но комбинированное воздействие shRNA + CRISPRa приводило к значительно более выраженному снижению уровней ккзДНК (на 60–80%) по сравнению с монотерапией (рис. 3Б).

Анализ 3D-ПЦР продемонстрировал мощное усиленное дезаминирование внутриклеточной ДНК ВГВ при обработке anti-HBx shRNA в комбинации с CRISPR-активацией. Результаты показали интенсивное дезаминирование ккзДНК ферментами A3A (рис. 3d) а также кчдДНК A3A, A3B в группе shRNA + CRISPRa (рис. 3Г, Д).

NGS-анализ ккзДНК и кчдДНК из различных экспериментальных групп продемонстрировал выраженные различия в мутационном спектре между контрольной группой и группой, обработанной shRNA. Было показано, что подавление репликации ВГВ с помощью shRNA индуцирует массивное дезаминирование ккзДНК ферментами A3A и AID. Частота мутаций C→T в контрольной группе составляла 0,1–0,5%, в то время как в группе shRNA + A3A/AID частота возрастала до 3–10% в зависимости от конкретного региона генома.

Следует отметить, что дезаминирование, индуцированное A3B, было уже значительным в контрольной группе (частота мутаций 0,5–2,0%), но не увеличивалось дополнительно при обработке shRNA. Это явление может объясняться тем, что интенсивно дезаминированная ккзДНК, содержащая многочисленные остатки урацила, может подвергаться деградации клеточными или вирусными нуклеазами, как было показано в предыдущих исследованиях [36]. Данный феномен — отсутствие усиления A3B-опосредованного дезаминирования при подавлении репликации — согласуется с гипотезой о «гипередактировании», при котором тотальное дезаминирование ккзДНК приводит к её стремительной деградации клеточной системой эксцизионной репарации оснований (BER) с участием урацил-ДНК-гликозилазы (UNG) [91]. Косвенным подтверждением служат данные о том, что совместная трансфекция ингибитора урацилгликозилазы (UGI) предотвращает деградацию гипердезаминированной ккзДНК и значительно увеличивает число 3D-ПЦР-продуктов при низких температурах денатурации [75]. Таким образом, наблюдаемый в настоящей работе нижний предел обнаруживаемого

дезаминирования для A3B при высоких уровнях вирусной репликации отражает баланс между интенсивным редактированием и ускоренной деградацией гиперредактированных молекул, а не отсутствие активности фермента.

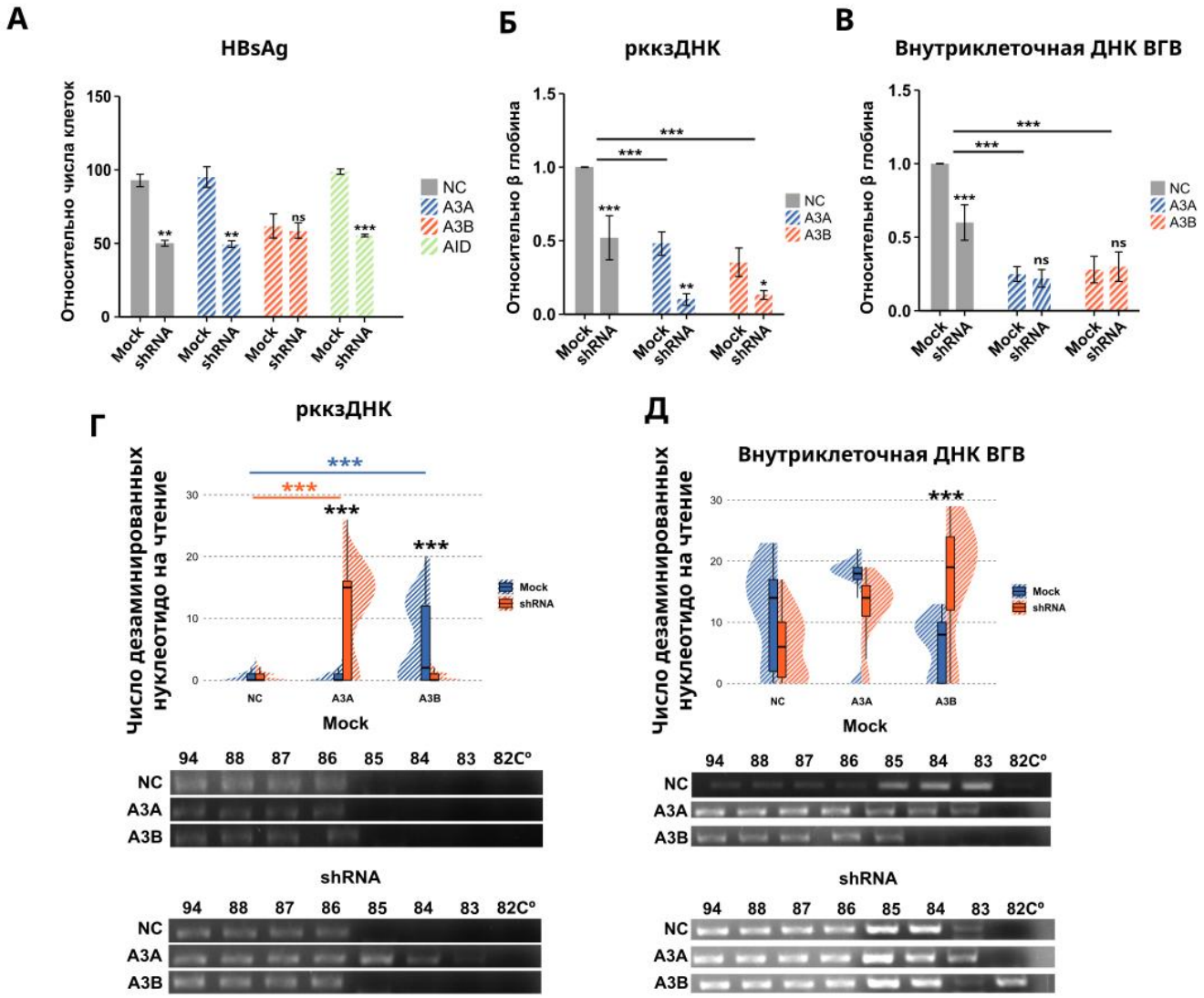


Рисунок 3. Влияние подавления синтеза кчдДНК с помощью shRNA против *HBx* на противовирусную и дезаминирующую активность APOBEC/AID в клетках HepG2.
(А) Уровни секретируемого HBsAg при активации NC, A3A, A3B и AID в присутствии shRNA против *Hbx* либо нецелевой shRNA (Mock), нормированные на число клеток. Уровни (Б) рккзДНК и (В) внутриклеточной ДНК ВГВ по данным qPCR, нормированные на β-глобин. (Г) Анализ дезаминирования рккзДНК и (Д) внутриклеточной ДНК ВГВ: сверху — количество дезаминированных нуклеотидов на прочтение по данным NGS (синий — Mock, оранжевый — shRNA); снизу — результаты 3Д-ПЦР с градиентом температур денатурации 94–82°C в группах Mock и shRNA. NC — контрольная sgRNA; Mock — внецелевая shRNA. ns — статистически незначимо; *p < 0,01; **p < 0,001; ***p < 0,0001.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ 3.2.

1. Полученные данные свидетельствуют о том, что образование кчдДНК выполняет защитную функцию в отношении ккзДНК, и нарушение этого этапа репликационного цикла ВГВ

критически повышает уязвимость вирусного генома к мутагенному действию цитидин-дезаминаз.

2. Применение двух независимых подходов — ингибитора обратной транскриптазы ламивудина и shRNA против X-гена ВГВ — позволило специфически снизить уровень кчдДНК и продемонстрировать, что истощение пула кчдДНК усиливает дезаминирование ккзДНК ферментами APOBEC/AID.

3. Обработка ламивудином не влияла на уровни HBsAg, однако в комбинации с активацией A3A приводила к достоверно более выраженному снижению уровней ккзДНК (на 50%) по сравнению с изолированной активацией A3A (20–30%).

4. Подавление HBx с помощью shRNA вызывало резкое снижение HBsAg и внутриклеточной ДНК ВГВ, а комбинация anti-HBx siRNA с активацией A3A или AID обеспечивала максимальное снижение уровней ккзДНК (60–80%) и наиболее интенсивное дезаминирование по данным 3D-ПЦР.

5. По данным NGS, комбинированное воздействие shRNA против HBx и активации A3A или AID повышало частоту мутаций C→T в ккзДНК с 0,1–0,5% (контроль) до 3–10% в зависимости от региона генома.

6. В отличие от A3A и AID, дезаминирование, опосредованное A3B, не увеличивалось дополнительно при подавлении репликации, что может быть связано с деградацией гипердезаминированных молекул ккзДНК.

7. Полученные данные свидетельствуют о том, что образование кчдДНК выполняет защитную функцию в отношении ккзДНК, и нарушение этого этапа репликационного цикла ВГВ критически повышает уязвимость вирусного генома к мутагенному действию цитидин-дезаминаз.

3.3 Противовирусная и дезаминирующая активность APOBEC/AID на инфекционной модели ВГВ при настраиваемой активации с помощью системы CRISPRa

Результаты, полученные на трансфекционной модели с рккзДНК в клетках HepG2, потребовали верификации в условиях, более приближенных к реальной вирусной инфекции. С этой целью описанные экспериментальные условия были воспроизведены на модели гепатоцитов линии HepaRG, стабильно экспрессирующих транспортёр NTCP (натрий-таурохолат котранспортирующий полипептид), после инфицирования ВГВ. Клетки HepaRG-hNTCP поддерживают полный репликационный цикл вируса и образуют ккзДНК *de novo* из вирионов, что принципиально отличает данную модель от трансфекционной системы с рккзДНК. Одновременно в данной серии экспериментов была поставлена задача оценить зависимость противовирусного и мутагенного эффекта от уровня активации A3A, для чего использовали систему CRISPRa с аттенуированными направляющими РНК (sgRNA), обозначенными A90 и A70. Применение аттенуированных вариантов sgRNA позволяет предсказуемо титровать степень транскрипционной активации целевого гена в диапазоне от ~90% (A90) до ~70% (A70) от уровня, достигаемого с полноценной sgRNA.

3.3.1 Влияние активации A3A и A3B на ккзДНК в инфицированных клетках HepaRG-hNTCP

В ходе экспериментов было показано, что CRISPR-активация A3A снижала содержание ккзДНК в инфицированных клетках HepaRG-hNTCP на 70%, тогда как активация A3B обеспечивала снижение лишь на 35%. Применение аттенуированных sgRNA (варианты A90 и A70) приводило к прогрессивно менее выраженному эффекту по сравнению с полноценной A3A: снижение ккзДНК составило 40% и 35% соответственно (рис. 4А). Таким образом, показана чёткая дозозависимость противовирусного эффекта от уровня активации A3A. Сама по себе shRNA, нацеленная на X-ген ВГВ, не влияла на содержание ккзДНК, однако незначительно усиливала активность слабо действующих вариантов A70 и A3B (рис. 4Б). Подавление внутриклеточной ДНК ВГВ достигалось преимущественно за счёт shRNA; статистически значимое дополнительное снижение наблюдалось только при сочетании shRNA с A3A.

3.3.2 Анализ мутационного профиля в инфицированных клетках

Снижение уровней вирусных промежуточных форм может отражать как их физическую деградацию, так и блокаду синтеза. Для различения этих механизмов был проведён анализ

дезаминирования методами 3D-ПЦР и NGS. Полученные данные убедительно свидетельствуют в пользу того, что ключевую роль играет именно APOBEC-опосредованный мутагенез: в клетках с активированными A3A или A3B выявлялись характерные мутации C→T, соответствующие канонической субстратной специфичности каждого фермента.

Мутационный анализ на модели ркккзДНК показал, что A3A и A3B по отдельности, а также в комбинации с shRNA, индуцируют сходный профиль дезаминирования с сохранением субстратных предпочтений. Добавление shRNA усиливало дезаминирование ккзДНК для A3A, однако для A3B уровень дезаминирования в условиях комбинированного воздействия снижался до контрольных значений (рис. 4В) — феномен, ранее наблюдавшийся в трансфекционной модели и объясняемый деградацией гипердезаминированных молекул. Ослабление активации с помощью варианта A90 последовательно уменьшало интенсивность дезаминирования до фоновых уровней как в ккзДНК, так и в геномной ДНК ВГВ (рис. 4В, Г). Напротив, вариант A70, наименее эффективный по данным qPCR, парадоксальным образом демонстрировал высокие показатели дезаминирования на обеих формах вирусного генома — что указывает на диссоциацию между уровнем экспрессии A3A и его мутагенной активностью при определённых условиях (рис. 4В, Г).

Полученные результаты на инфекционной модели HepaRG-hNTCP воспроизводят и подтверждают закономерности, установленные в трансфекционной системе: подавление репликации ВГВ с сопутствующим истощением пула кчдДНК закономерно повышает активность A3A и A3B в отношении ккзДНК и совокупной геномной ДНК ВГВ.

Сопоставление результатов, полученных на трансфекционной модели HepG2 (Главы 3–4) и на инфекционной модели HepaRG-hNTCP, выявляет качественное сходство паттернов дезаминирования при определённых количественных различиях. В инфицированных клетках HepaRG-hNTCP базальный уровень экспрессии A3A и A3B несколько выше за счёт интерферон-опосредованной индукции при ВГВ-инфекции [91], что могло бы повышать фоновый уровень дезаминирования. Тем не менее наблюдаемая закономерность — усиление дезаминирования ккзДНК при снижении пула кчдДНК — воспроизводится в обеих системах, что свидетельствует о её универсальности и независимости от клеточного контекста. Это принципиально важно для трансляции результатов: механизм молекулярной ловушки кчдДНК является биологическим свойством системы «вирус – фермент», а не артефактом конкретной клеточной модели.

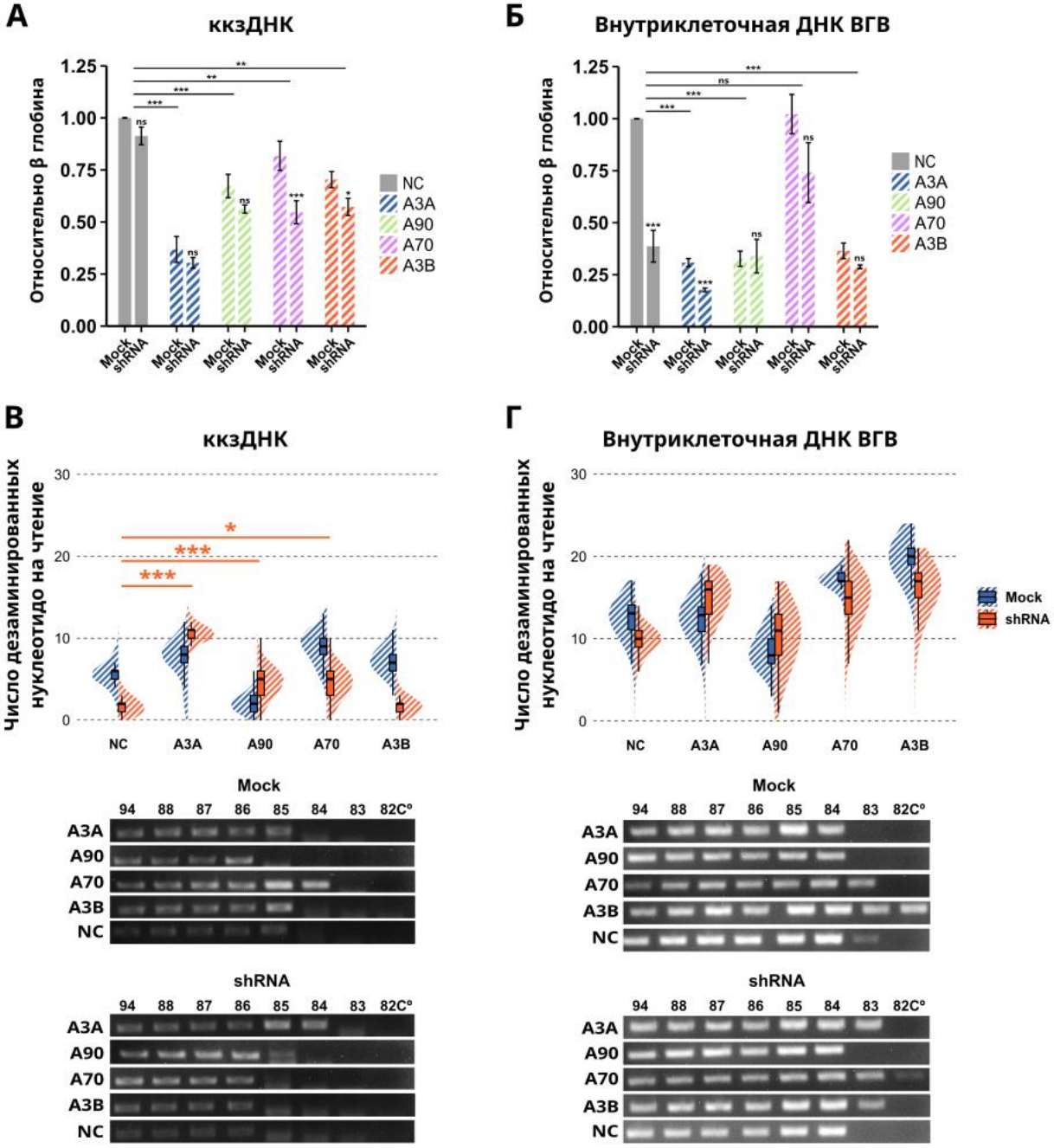


Рисунок 4. Анализ противовирусной и дезаминирующей активности APOBEC3 на инфекционной модели HepaRG-hNTCP (А) Уровни кккзДНК по данным qPCR при активации A3A и A3B, и при активации A3A аттенуированными направляющими РНК A90 и A70 в присутствии shRNA либо Mock. (Б) Уровни внутриклеточной ДНК ВГВ в тех же условиях. (В) Анализ дезаминирования кккзДНК методом NGS (сверху) и 3D-ПЦР (снизу). (Г) Анализ дезаминирования внутриклеточной ДНК ВГВ методом NGS (сверху) и 3Д-ПЦР (снизу). NC — контрольная sgRNA; Mock — внецелевая shRNA. *p < 0,01, **p < 0,001, ***p < 0,0001.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ 3.3.

1. На инфекционной модели клеток HepaRG-hNTCP подтверждена противовирусная активность A3A и A3B: CRISPR-активация A3A снижала содержание ккзДНК на 70%, A3B — на 35%.
2. Установлена однозначная дозозависимость противовирусного эффекта от уровня активации A3A: применение аттенуированных sgRNA A90 и A70 обеспечивало снижение ккзДНК на 40% и 35% соответственно, что подтверждает возможность управляемого титрования активности через систему CRISPRa.
3. shRNA против *HBx* ВГВ не влияла на ккзДНК в монорежиме, однако в комбинации с A3A обеспечивала дополнительное снижение внутриклеточной ДНК ВГВ.
4. Мутационный анализ методами 3D-ПЦР и NGS подтвердил, что снижение уровней ккзДНК обусловлено именно APOBEC-опосредованным дезаминированием, а не блокадой синтеза.
5. Вариант A70, минимально эффективный по снижению вирусной нагрузки, демонстрировал высокий уровень дезаминирования — что свидетельствует о диссоциации между количеством вирусной ДНК и её мутационным бременем при низких уровнях активации дезаминаз.
6. Полученные данные воспроизводят результаты трансфекционной модели и подтверждают общую закономерность: истощение пула кчдДНК — независимо от модельной системы — критически повышает уязвимость ккзДНК к APOBEC-опосредованному мутагенезу.

3.4. Кольцевая частично двухцепочечная ДНК ВГВ выполняет функцию молекулярной ловушки, защищая ккзДНК и геном хозяина от дезаминирующего действия APOBEC3

Результаты, полученные в Главах 3.1 и 3.2, демонстрировали общую закономерность: подавление репликации ВГВ двумя независимыми методами — ламивудином и shRNA — неизменно приводило к усилению дезаминирования ккзДНК. Была сформулирована гипотеза о том, что именно кчдДНК может служить фактором, насыщающим ферменты APOBEC/AID. В пользу этого предположения свидетельствует то, что кчдДНК является первичным субстратом для большинства членов семейства APOBEC/AID, поскольку содержит протяжённые одноцепочечные участки, доступные для дезаминирования. Кроме того, количество кчдДНК в активно инфицированных клетках на 3–4 порядка превышает содержание ккзДНК: при уровнях ккзДНК 10^2–10^3 копий на клетку кчдДНК достигает 10^6–10^7.

3.4.1. Экзогенная кчдДНК конкурентно ингибирует дезаминирование ккзДНК ферментом A3A

Для прямой проверки сформулированной гипотезы кчдДНК была выделена из вирионов ВГВ и введена методом электропорации вместе с рибонуклеопротеиновыми комплексами CRISPRa (RNP) в клетки HepG2. Выделенная вирионная кчдДНК не превращалась в ккзДНК в данных условиях, что подтверждается отсутствием ккзДНК-сигнала во всех группах (рис. 5А), однако надёжно определялась методом qPCR (рис. 5Б). Забор материала для анализа проводили на третий день после электропорации.

В качестве мишени для оценки конкурентного влияния кчдДНК на активность A3A использовали гиперметилированную рккзДНК (мет-рккзДНК) — транскрипционно инактивированную форму, наиболее уязвимую для дезаминаз. В отсутствие экзогенной кчдДНК (0 копий) CRISPR-активация A3A снижала содержание мет-рккзДНК примерно на 72% по сравнению с контрольной группой (NC mean = 0,724; $p < 0,001$; рис. 5b). Введение экзогенной кчдДНК в концентрации 1×10^6 копий дозозависимо восстанавливало уровень meth-рккзДНК в группе A3A до значений контрольной группы (различия статистически незначимы, ns). При концентрациях 1×10^7 и 5×10^7 копий кчдДНК уровни meth-рккзДНК в группах A3A и NC были полностью неразличимы (рис. 5b), что свидетельствует о полном конкурентном насыщении A3A экзогенной кчдДНК.

3.4.2 A3A активно дезаминирует экзогенную кчдДНК

В параллельных сериях экспериментов анализировали динамику внесённой кчдДНК в зависимости от уровня активации A3A. При внесении 10, 100 и 1000 копий кчдДНК на клетку было показано, что CRISPR активация A3A сопровождается статистически значимым снижением количества детектируемой кчдДНК по сравнению с контрольной группой NC во всех трёх вариантах нагрузки (рис. 5Б). Эти результаты указывают на то, что A3A не только связывается с кчдДНК, но и эффективно дезаминирует её, инициируя последующую деградацию и тем самым подтверждая роль кчдДНК как полноценного субстрата фермента.

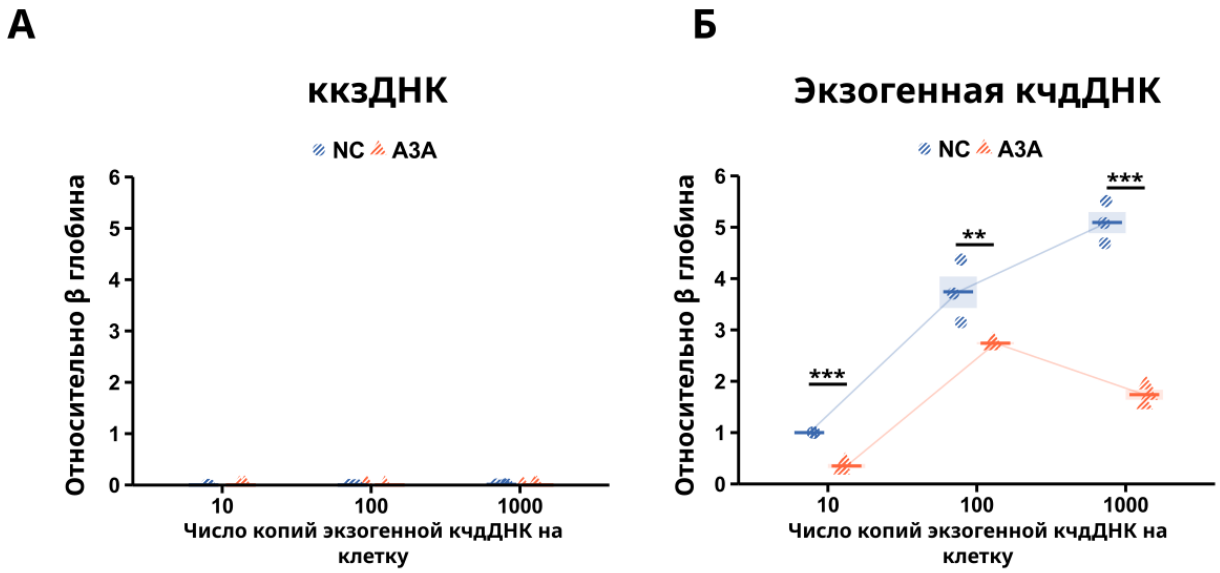


Рисунок 5. экзогенная кчдДНК не превращается в ккзДНК. Рибонуклеопротеиновые комплексы CRISPRa (RNP) и кчдДНК, выделенная из вирионов ВГВ, вводились в клетки HepG2 при помощи электропорации; анализ проводили на 3 день. (А) Уровни ккзДНК во всех группах — сигнал отсутствует, что подтверждает отсутствие конверсии введённой кчдДНК в ккзДНК. (Б) Уровни введённой вирионной кчдДНК при концентрациях 10, 100 и 1000 копий на клетку в группах NC и A3A. NC — контрольная sgRNA. ns — статистически незначимо; **$p < 0{,}001$, ***$p < 0{,}0001$.

Совокупность полученных наблюдений согласуется с моделью конкурентного насыщения. При наличии избытка кчдДНК значительная часть молекул A3A связывается с этим субстратом и не достигает ккзДНК, что приводит к защите последней от дезаминирования. В условиях активной репликации ВГВ, когда внутриклеточный пул кчдДНК максимален, ккзДНК оказывается эффективно экранированной от A3A; напротив, истощение кчдДНК за счёт подавления репликации ламивудином или shRNA снимает этот защитный барьер и делает ккзДНК, а также геном клетки-хозяина, более уязвимыми к мутагенному воздействию цитидиндезаминаз.

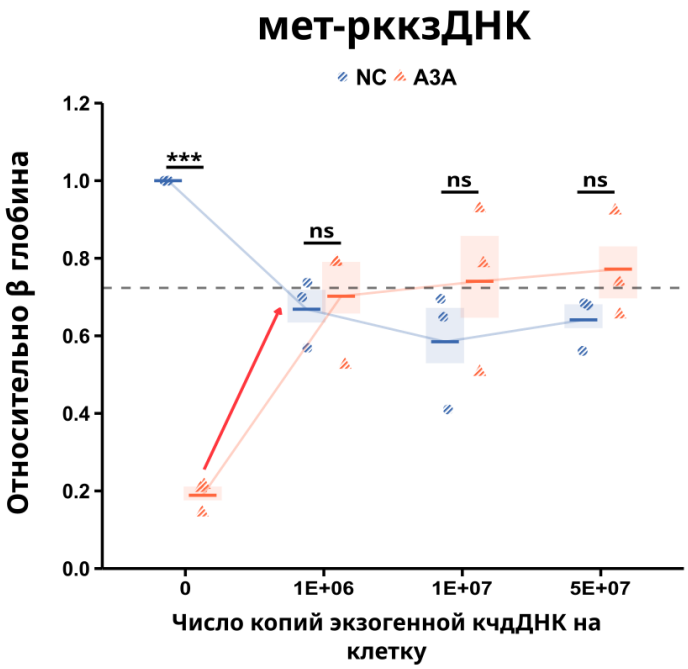


Рисунок 6. кчдДНК ВГВ функционирует как молекулярная ловушка, защищающая ккзДНК от дезаминирования A3A. Уровни meth-ркккзДНК (нормировано на β-глобин) в зависимости от концентрации введённой кчдДНК (0; 1×10^6; 1×10^7; 5×10^7 копий). Пунктирная линия — среднее значение контрольной группы NC (0,724). NC — контрольная sgRNA. ns — статистически незначимо; ***p < 0,0001.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ 3.4

1. Экспериментально подтверждена гипотеза о том, что кчдДНК ВГВ выполняет функцию молекулярной ловушки: введение вирионной кчдДНК в концентрации 1×10^6–5×10^7 копий полностью блокировало дезаминирующую активность A3A в отношении meth-ркккзДНК.
2. Защитный эффект кчдДНК носит дозозависимый характер: уже при 1×10^6 копий/клетку уровень meth-ркккзДНК в группе A3A восстанавливался до контрольных значений, а при 1×10^7 и 5×10^7 копий/клетку группы A3A и NC были статистически неразличимы.
3. A3A активно дезаминирует введённую кчдДНК, снижая её определяемые уровни во всех исследованных концентрациях (10–1000 копий/клетку) — что подтверждает, что кчдДНК является полноценным субстратом для фермента, а не просто его ингибитором.
4. Введенная вирионная кчдДНК не конвертировалась в ккзДНК ни в одной из исследованных концентраций, что исключает влияние вновь образованной ккзДНК на результаты экспериментов.
5. Выявлен принципиально новый механизм иммунной эвазии ВГВ: избыточная продукция кчдДНК в процессе репликации вируса служит молекулярным щитом, насыщающим

ферменты APOBEC/AID и одновременно защищающим персистентный резервуар вируса (ккзДНК) и геном хозяина от мутагенного воздействия.

3.5. APOBEC3A упаковывается в вирионы вируса гепатита B и взаимодействуют с кчдДНК внутри нуклеокапсидов

Установленная в предшествующих главах протекторная роль кчдДНК в отношении ккзДНК предполагает существование непосредственного пространственного взаимодействия между ферментами APOBEC/AID и кчдДНК. Цитоплазматическая кчдДНК упакована в нуклеокапсиды, образованные core-белком ВГВ (HBc), и в составе зрелых вирионов покрыта липидной оболочкой. Диаметр пор нуклеокапсида (~10 Å) недостаточен для проникновения белковых молекул после завершения его сборки. Следовательно, включение белков APOBEC/AID в состав нуклеокапсида возможно исключительно в процессе его сборки — совместно с прегеномной РНК (пгРНК) и вирусной полимеразой, до начала обратной транскрипции. В настоящей главе представлены данные о присутствии A3A и A3B в составе очищенных вирионов ВГВ и рассматриваются последствия этого явления для механизма молекулярной ловушки.

3.5.1 Обнаружение A3A в составе очищенных вирионов ВГВ

Вирионы ВГВ выделяли из культурального супернатанта инфицированных клеток HepaRG-hNTCP методом ультрацентрифугирования. Состав вирионных фракций анализировали методом иммуноблоттинга с использованием специфичных антител к A3A и core-белку (HBc). HBc служил маркёром нуклеокапсидов.

В результате иммуноблот-анализа очищенных вирионных фракций в них были обнаружен белок A3A (рис. 6). Присутствие фермента во фракции нуклеокапсидов, верифицированной по HBc, что свидетельствует о его включении внутрь нуклеокапсидов в процессе сборки. Полученные данные впервые демонстрируют данное явление для A3A.

3.5.2 Внутрикапсидная кчдДНК как дополнительный компартмент молекулярных ловушек

Нуклеокапсид ВГВ содержит кчдДНК с протяжённой одноцепочечной минус-цепью (~3,2 т.п.н.), представляющей оптимальный субстрат для дезаминирующей активности APOBEC. Упаковка A3A внутрь нуклеокапсидов означает, что ферменты оказываются в непосредственной близости от субстрата ещё до завершения вирусной репликации. Каждый нуклеокапсид, содержащий кчдДНК совместно с молекулами APOBEC, функционирует как замкнутая

реакционная единица, в которой дезаминирование кчдДНК происходит независимо от ядерного компартмента.

С учётом этих данных совокупный ловушечный пул кчдДНК включает не менее трёх компартментов: (1) свободные нуклеокапсиды в цитоплазме; (2) зрелые вирионы до их секреции; (3) нуклеокапсиды, импортированные в ядро и конвертирующиеся в ккзДНК. Все три компартмента конкурируют с ккзДНК за молекулы APOBEC/AID. Подавление репликации ВГВ — ламивудином или shRNA — прекращает образование новых нуклеокапсидов, истощает все три пула кчдДНК и высвобождает APOBEC для воздействия на ккзДНК и геном хозяина, что согласуется с результатами предыдущих глав.

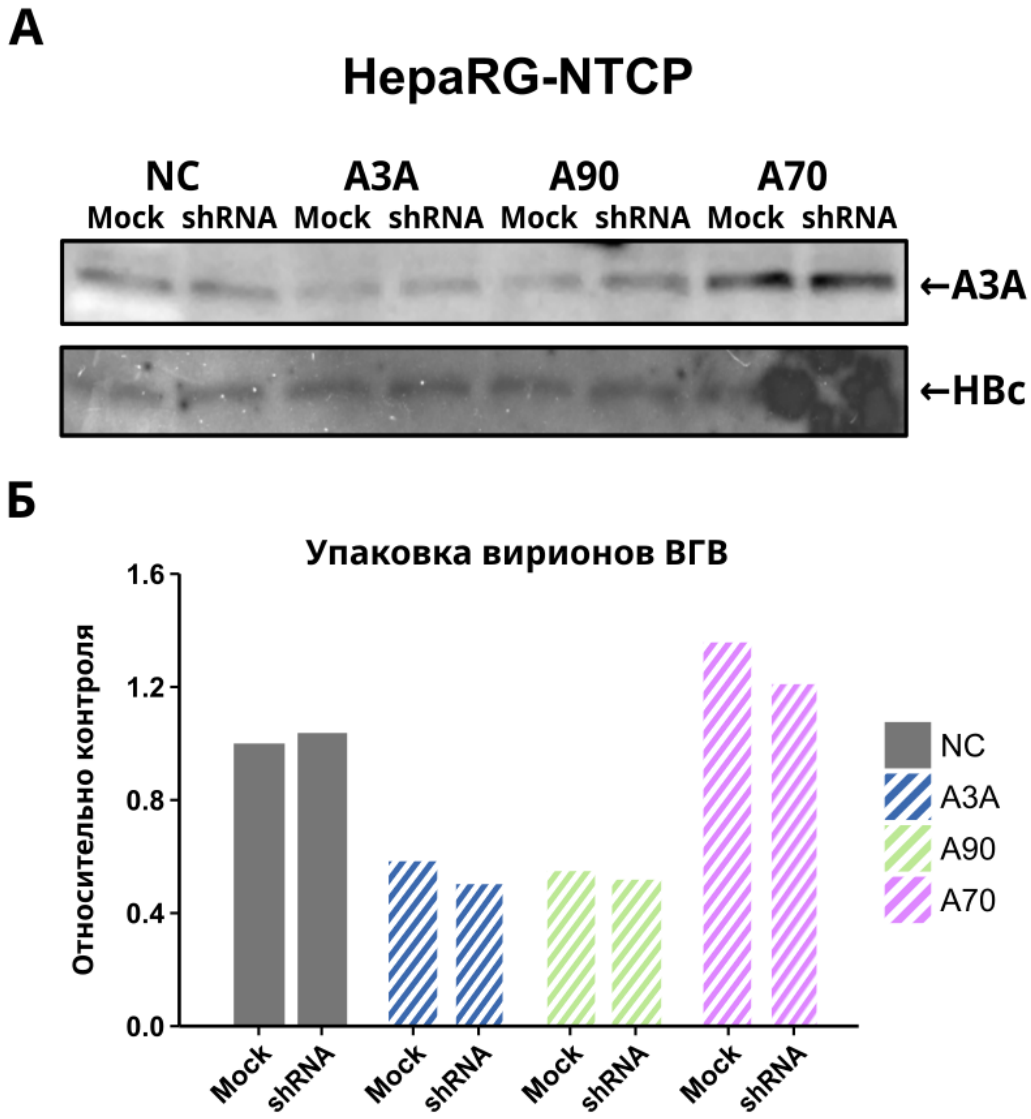


Рисунок 7. A3A в составе очищенных вирионов ВГВ по данным иммуноблоттинга. Анализ вирионных фракций, выделенных из супернатанта инфицированных клеток HepaRG-hNTCP. Детекция: A3A (верхняя панель), HBc (нижняя панель). (Б) Количественный расчет эффективности упаковки. Обнаружение A3A во фракции вирионов подтверждает упаковку внутрь нуклеокапсидов ВГВ.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ 3.5

1. Методом иммуноблоттинга установлено присутствие ферментов A3A в составе очищенных вирионов ВГВ, выделенных из супернатанта инфицированных клеток HepaRG-hNTCP.

2. Включение A3A в состав нуклеокапсидов происходит в процессе их сборки — совместно с пгРНК и вирусной полимеразой, поскольку завершённый нуклеокапсид непроницаем для белковых молекул.
3. Внутри нуклеокапсида A3A находятся в непосредственной близости к одноцепочечной минус-цепи кчдДНК, что создаёт условия для её дезаминирования в изолированном компартменте.
4. Внутрикапсидная кчдДНК представляет собой дополнительный пул молекулярных ловушек, дополняющий свободную цитоплазматическую кчдДНК. Совокупный ловушечный пул охватывает три компартмента: свободные нуклеокапсиды цитоплазмы, зрелые вирионы и ядерные нуклеокапсиды.
5. Истощение всех пулов кчдДНК при подавлении репликации ВГВ является необходимым условием для высвобождения APOBEC/AID и их переориентации на ккзДНК и геном хозяина.

3.6 Истощение пула кчдДНК усиливает генотоксическое действие APOBEC/AID на геном хозяина в инфицированных клетках человека

Активация ферментов APOBEC/AID как терапевтическая стратегия против ВГВ сопряжена с потенциальным риском внецелевого мутагенеза генома хозяина. Результаты предыдущих глав свидетельствуют о том, что кчдДНК ВГВ в норме конкурентно насыщает APOBEC/AID, защищая от их воздействия не только ккзДНК, но, вероятно, и геном хозяина. Из этого следует, что подавление репликации ВГВ, истощающее пул кчдДНК, должно одновременно повышать доступность хромосомной ДНК для дезаминирования. Для проверки данного предположения был проведён ChIP-Seq анализ и таргетное NGS-секвенирование генов хозяина, ассоциированных с канцерогенезом.

3.6.1 Картирование геномных локусов взаимодействия APOBEC/AID с хроматином методом ChIP-Seq

ChIP-Seq анализ проводили в клетках HepG2-hNTCP с использованием антител к A3A и A3B. Иммунопреципитация хроматина позволила идентифицировать геномные локусы, с которыми физически ассоциированы молекулы A3A и A3B в условиях активной репликации ВГВ и при её подавлении с помощью shRNA.

ChIP-Seq анализ выявил существенные различия в профилях связывания A3A, A90, A70 и A3B с хроматином в зависимости от условий репликации. При активации A3A значимое обогащение хроматина обнаруживалось преимущественно в локусе *7SK* — как в условиях Mock, так и при добавлении shRNA, однако с более выраженным сигналом в последнем случае (рис. 8A). Аттенуированный вариант A90 при подавлении репликации shRNA демонстрировал расширенный спектр значимых локусов: *CD63*, *RNU6-1*, *TP53* и *7SK* (рис. 7b). Вариант A70 не выявил значимых пиков связывания ни в одной из групп, что согласуется с его минимальной функциональной активностью (Глава 5). Для A3B при подавлении репликации shRNA наиболее значимыми мишенями оказались *RNU6-1* и *MUC12*.

3.6.2 Дезаминирование онкосупрессора TP53 и генов хозяина при подавлении репликации ВГВ

NGS-анализ дезаминирования показал, что для A3A характерно избирательное дезаминирование гена *7SK* в условиях подавления репликации (группа shRNA), тогда как в контрольной группе (Mock) сигнал был минимальным. Дезаминирование *CD63* также

преобладало в группе shRNA, однако носило менее выраженный характер. Для гена *TP53* уровень дезаминирования при активации A3A оставался близким к фоновому; более заметный сигнал в локусе *TP53* регистрировался при использовании аттенуированного варианта A90 в группе shRNA (рис. 7b). Позиционный анализ мутационного профиля по геномным координатам (рис. 7c) подтвердил кластеризованный характер дезаминирования в нескольких горячих точках локусов *7SK* и *CD63*, что соответствует канонической субстратной специфичности A3A.

Для A3B дезаминирование генов *7SK* и *CD63* регистрировалось в обеих группах — Mock и shRNA, — причём интенсивность сигнала в обоих случаях была сопоставимо высокой (рис. 7b, c). Это указывает на то, что A3B, в отличие от A3A, взаимодействует с геномом хозяина независимо от уровня вирусной репликации, что может свидетельствовать о более высоком базальном риске внецелевого мутагенеза, ассоциированного с экспрессией A3B. Ген *TP53* при активации A3B оставался практически интактным.

Вариант A70, не демонстрировавший значимых противовирусных эффектов, также не индуцировал дезаминирования генома хозяина ни в одной из изученных групп — что указывает на наличие порогового уровня активации APOBEC, ниже которого внецелевой мутагенез отсутствует.

Среди выявленных мишеней функционально значимыми являются: *7SK* — некодирующая РНК, регулирующая транскрипционный комплекс P-TEFb и контролирующая клеточную пролиферацию; *CD63* — тетраспанин, вовлечённый в везикулярный транспорт; *RNU6-1* — компонент малой ядерной РНК; *MUC12* — муцин, ассоциированный с карциномами. Дезаминирование *TP53* при данном уровне активации APOBEC оставалось минимальным, однако его выявление при аттенуированной активации A90 в условиях подавления репликации требует дополнительного внимания при оценке терапевтической безопасности.

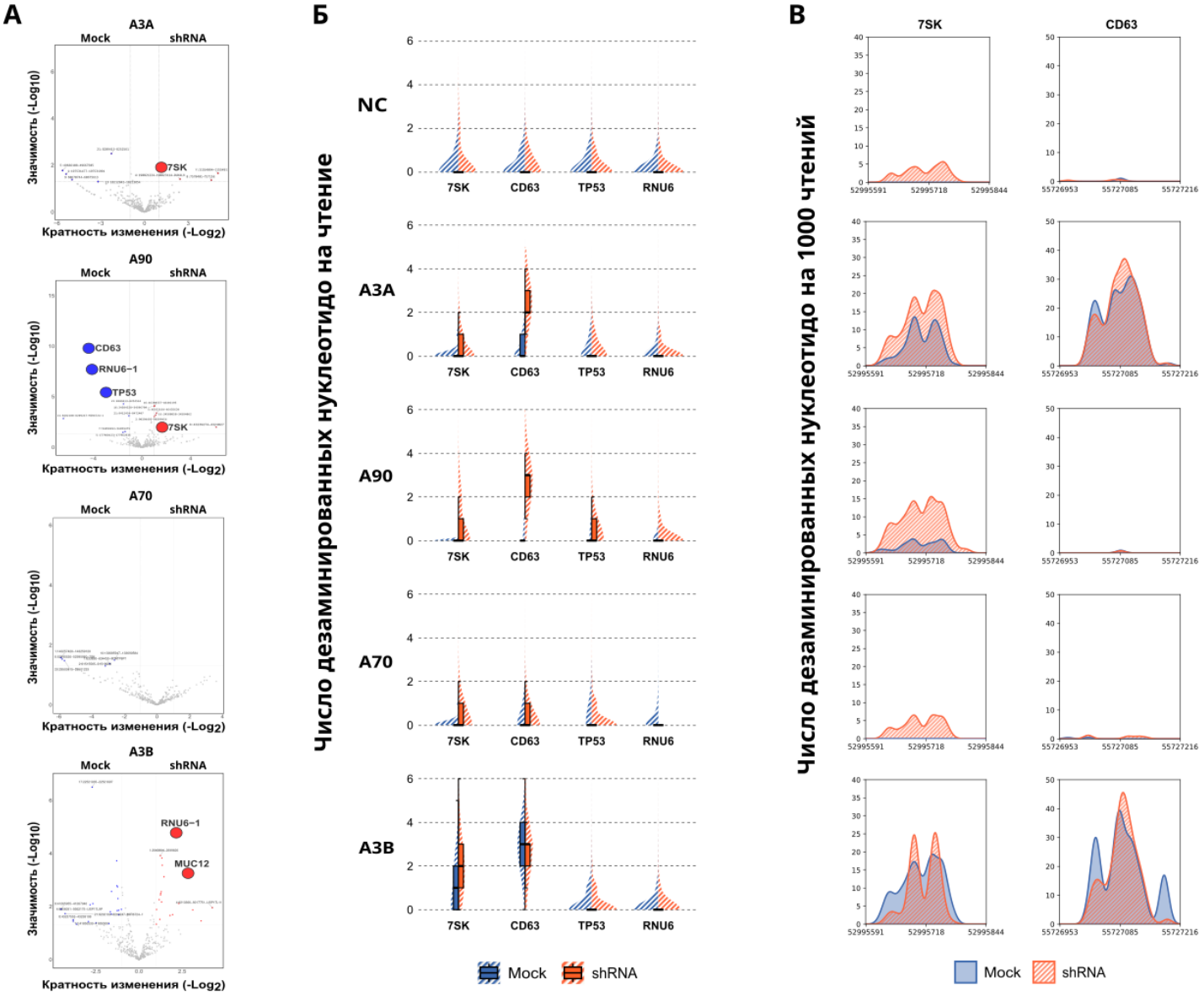


Рисунок 8. Дезаминирование генома хозяина ферментами A3A, A90, A70 и A3B при подавлении репликации ВГВ. (А) ChIP-Seq анализ: геномные локусы, значимо обогащённые в иммунопреципитатах A3A, A90, A70 и A3B, в условиях Mock и shRNA против HBx. Ось X — кратность изменения, ось Y — значимость. Выделены гены: *7SK*, *CD63*, *RNU6-1*, *TP53*, *MUC12*. (Б) Количество дезаминированных нуклеотидов на чтение по данным NGS для генов *7SK*, *CD63*, *TP53* и *RNU6* при активации NC, A3A, A90, A70 и A3B в группах Mock (синий) и shRNA (оранжевый). (В) Позиционный профиль дезаминирования по геномным координатам для локусов *7SK* (chr7: 52 995 591–52 995 844) и *CD63* (chr1: 55 726 953–55 727 218) в группах Mock и shRNA для каждого из изученных ферментов.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ 3.6

1. NGS-секвенирование подтвердило, что дезаминирование *7SK* и *CD63* ферментом A3A происходит исключительно при подавлении репликации ВГВ (группа shRNA) и отсутствует в контрольной группе с активной репликацией, что прямо подтверждает протекторную функцию кчдДНК в отношении генома хозяина.
2. A3B дезаминирует *7SK* и *CD63* в обеих группах — Mock и shRNA — с сопоставимой интенсивностью, что указывает на независимость его активности в отношении генома хозяина от уровня вирусной репликации и обусловливает более высокий базальный риск внецелевого мутагенеза.
3. Вариант A70 не индуцировал дезаминирования генома хозяина, что свидетельствует о наличии порогового уровня активации APOBEC, ниже которого внецелевой мутагенез отсутствует.
4. Дезаминирование *TP53* при активации полноценной A3A оставалось минимальным; более выраженный сигнал в локусе *TP53* регистрировался при активации A90 в условиях подавления репликации, что требует учёта при оценке терапевтической безопасности.
5. Совокупность данных экспериментально подтверждает двойственную протекторную роль кчдДНК: при активной репликации ВГВ кчдДНК защищает геном хозяина от мутагенного воздействия APOBEC/AID; истощение пула кчдДНК при противовирусной терапии снимает эту защиту.

3.7 Цитидин-дезаминазы A3C, A3D и A3H подавляют репликацию вируса гепатита B без индукции мутагенеза генома хозяина

Описанные в предшествующих главах противовирусная активность и профиль безопасности A3A и A3B определяют их как мощные, но потенциально небезопасные агенты при сниженной вирусной нагрузке. В настоящей главе представлены результаты исследования трёх других членов семейства APOBEC3 — A3C, A3D и A3H, профиль дезаминирования ккзДНК и генотоксичность которых оставались неохарактеризованными. Для транскрипционной активации использовалась система CRISPRa на основе dCas9, слитого с доменом ацетилтрансферазы p300 (dCas9-p300), направляемая sgRNA к промоторным областям генов *A3C*, *A3D* и *A3H*. В качестве контроля применяли мутантную форму dCas9-p300(D1399Y) с инактивированной ацетилтрансферазной активностью в сочетании с нецелевой sgRNA (Mock) [64].

3.7.1. Активация экспрессии A3C, A3D и A3H системой CRISPRa

Конструкции sgRNA, нацеленные на промоторные области генов *A3C*, *A3D* и *A3H*, были разработаны с использованием платформы Broad Institute Genetic Perturbation Platform (рис. 8A). Трансфекция клеток HepG2 плазмидой dCas9-p300 совместно с соответствующими sgRNA обеспечивала устойчивую транскрипционную активацию целевых генов (рис. 8B): уровни мРНК *A3C* возрастали приблизительно в 4 раза, *A3D* — до 35 раз, *A3H* — приблизительно в 2 раза относительно контрольной группы.

3.7.2 Противовирусная активность A3C, A3D и A3H

Клетки HepG2, котрансфицированные рккзДНК и компонентами CRISPRa, анализировали по уровням пгРНК, ккзДНК и HBsAg (рис. 8B, нижний ряд). CRISPR-активация A3C, A3D и A3H вызывала значимое снижение уровней пгРНК примерно на 40–65% по сравнению с Mock ($p < 0,05$). Уровни ккзДНК снижались значимо для всех трёх ферментов: на ~50% при активации A3C ($p < 0,01$), на ~40% при A3D ($p < 0,01$) и наиболее выражено — приблизительно на 75% при активации A3H ($p < 0,001$) [64]. Уровни секретируемого HBsAg оставались практически неизменными при активации всех трёх ферментов (ns). Диссоциация между снижением внутриклеточных вирусных нуклеиновых кислот и сохранением уровней HBsAg свидетельствует о специфическом воздействии на внутриклеточные этапы репликационного цикла, не затрагивающем транскрипцию с ккзДНК непосредственно.

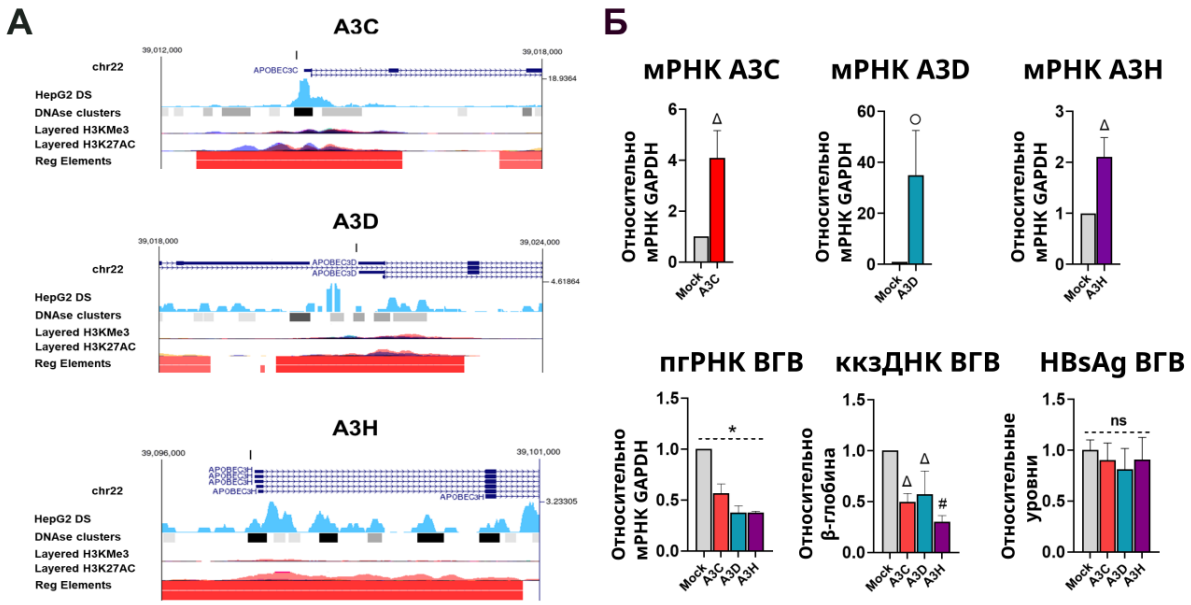


Рисунок 9. Активация экспрессии A3C, A3D и A3H системой CRISPRa на основе dCas9-p300 и противовирусная активность в клетках HepG2. (А) Геномный браузер UCSC (хромосома 22): архитектура промоторных регионов генов *A3C*, *A3D* и *A3H*. Дорожки: открытый хроматин HepG2 (DS), DNAse-кластеры, гистоновые метки H3K4me3 и H3K27ac, регуляторные элементы. Вертикальная метка указывает положение sgRNA. (Б) Верхний ряд: уровни мРНК *A3C*, *A3D* и *A3H* при трансфекции целевой CRISPRa (цветные столбцы) и мутантной формой dCas9-p300(D1399Y) (Mock, серые столбцы), нормировано на GAPDH. Нижний ряд: уровни пгРНК (нормировано на GAPDH), ккзДНК (нормировано на β-глобин) и HBsAg при активации A3C, A3D и A3H. Mock — dCas9-p300 с нецелевой sgRNA. ○ $p < 0,05$; Δ $p < 0,01$; # $p < 0,001$; ns — статистически незначимо.

3.7.3 Анализ дезаминирования вирусной ДНК

Дезаминирование вирусных геномных форм оценивали методом 3D-ПЦР для трёх субстратов: ккзДНК, секретируемой ДНК ВГВ и внутриклеточной ДНК ВГВ (рис. 9).

По данным 3D-ПЦР, дезаминирование ккзДНК не регистрировалось ни при активации A3C, ни A3D, ни A3H: профиль электрофореза во всех группах был идентичен контрольному (продукт только при 95–88°C), а полуколичественный анализ не выявил статистически значимых различий с Mock (рис. 10, А). Это принципиально отличает данные ферменты от A3A и A3B.

В секретируемой ДНК ВГВ слабое дезаминирование выявлялось при активации A3C (~1,5-кратное увеличение относительно Mock) и A3D (~1,2-кратное), тогда как при активации A3H уровень дезаминирования оставался на уровне фона (рис. 10, Б).

Наиболее выраженное дезаминирование регистрировалось во внутриклеточной ДНК ВГВ (кчдДНК): активация A3C обеспечивала ~6,7-кратное увеличение уровня дезаминированных молекул относительно Mock, активация A3D — ~5-кратное (рис. 10, В). Для A3H-значимого дезаминирования внутриклеточной ДНК ВГВ не зарегистрировано.

Полученные данные свидетельствуют о том, что A3C и A3D реализуют противовирусный эффект преимущественно через дезаминирование одноцепочечной минус-цепи кчдДНК в процессе обратной транскрипции, не затрагивая ккзДНК в ядре. Механизм действия A3H, по всей видимости, не связан с дезаминированием каких-либо форм вирусной ДНК и может включать деаминазно-независимое ограничение репликации [64].

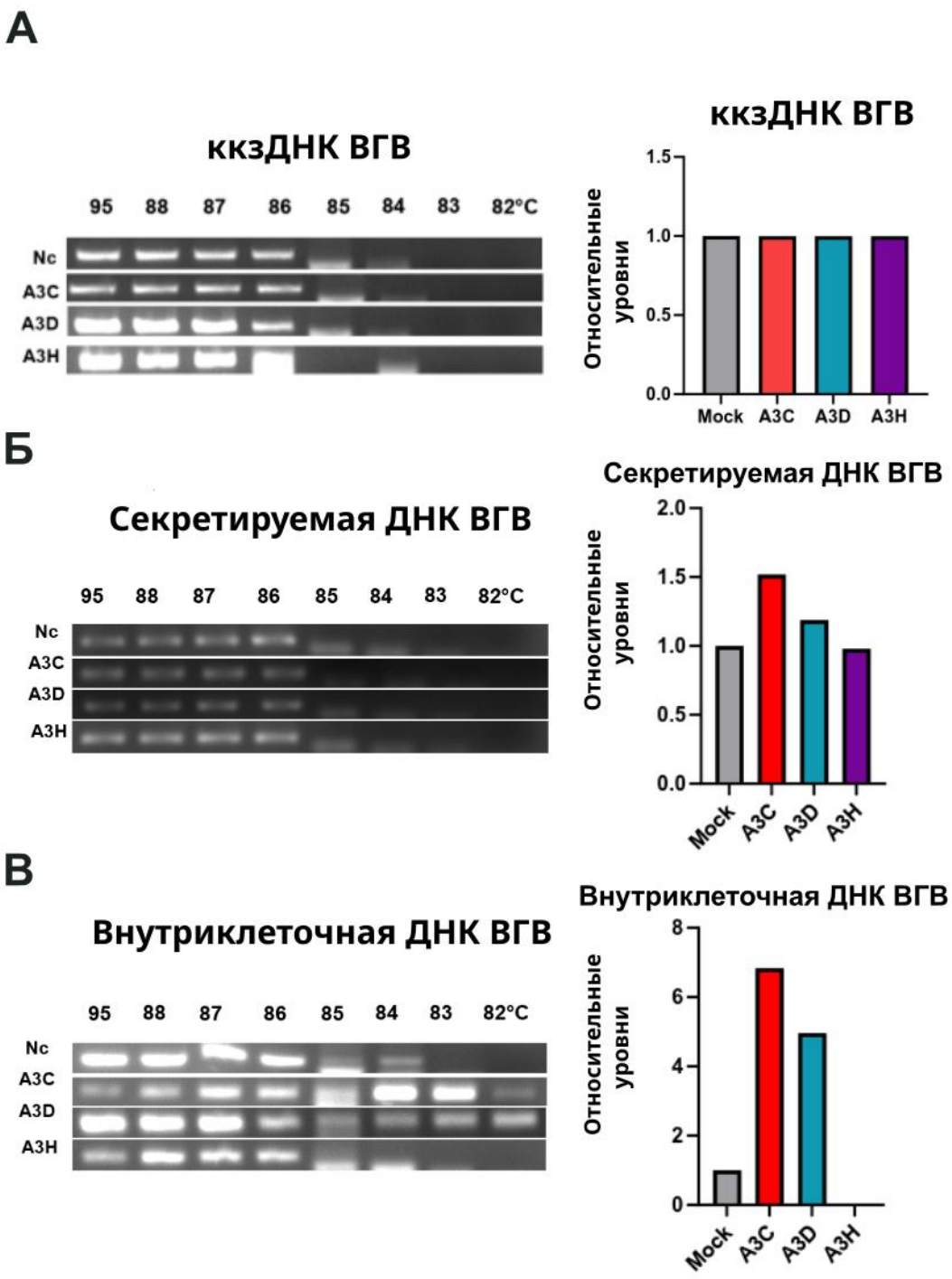


Рисунок 10. Анализ дезаминирования геномных форм ДНК ВГВ методом 3D-ПЦР при активации A3C, A3D и A3H. Гели 3D-ПЦР с градиентом температур денатурации 95–82°C и соответствующий полуколичественный анализ интенсивности ампликонов для: (А) ккзДНК (ccc HBV DNA); (Б) секретируемой ДНК ВГВ (Secreted HBV DNA); (В) внутриклеточной ДНК ВГВ (Intracellular HBV DNA). Nc — контрольная sgRNA (negative control). Появление дополнительных полос при температурах ниже 88°C свидетельствует о дезаминировании субстрата.

3.7.4 Отсутствие внецелевого дезаминирования онкогенов

Для оценки генотоксического потенциала A3C, A3D и A3H проводили 3D-ПЦР анализ CpG-богатых регионов генов, задействованных в канцерогенезе *ARID1*, *PAX5* и *TP53* (рис. 11А). Ни в одной из экспериментальных групп дезаминирования изученных генов выявлено не было: полуколичественный анализ показал уровни, сопоставимые с Mock (ARID1: все группы ~1,0; PAX5: A3C ~1,0; A3D ~1,1; A3H ~1,2; TP53: A3C ~0,9; A3D ~0,8; A3H ~0,5).

Для сравнения, в той же экспериментальной системе с активной репликацией ВГВ активация A3A, A3B и AID также не вызывала дезаминирования *ARID1*, *PAX5* и *TP53* (рис. 11Б): все группы демонстрировали уровни, сопоставимые с Mock. Это согласуется с данными главы 8, где мутагенез генома хозяина наблюдали исключительно при подавлении вирусной репликации, то есть при истощении пула кчдДНК [64].

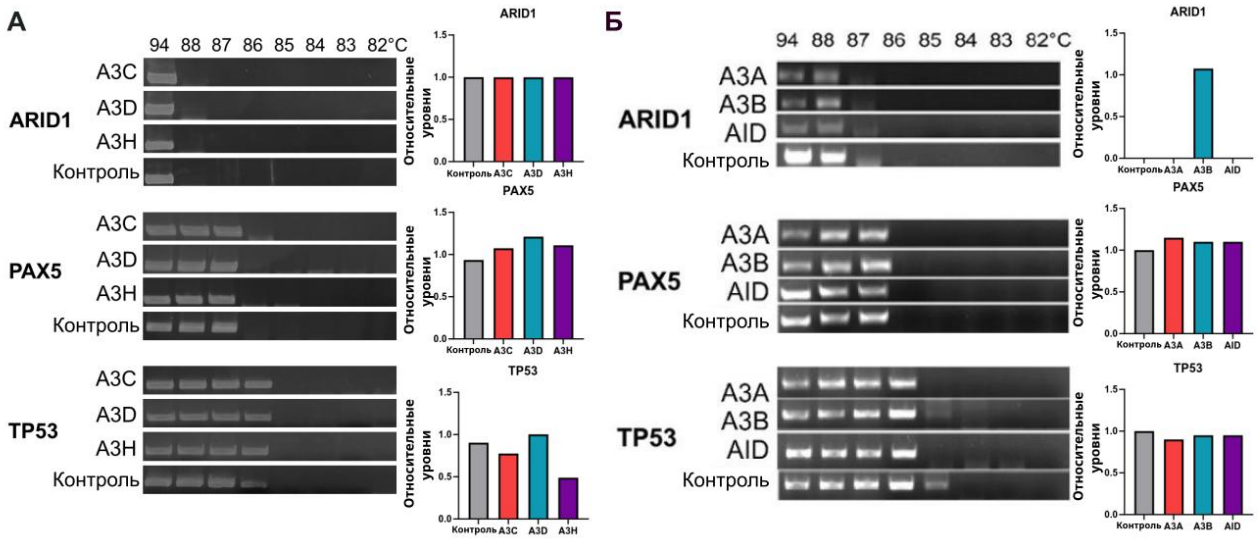


Рисунок 11. Анализ внецелевого дезаминирования онкогенов методом 3D-ПЦР при активации членов семейства APOBEC3. (А) Результаты для A3C, A3D и A3H: 3D-ПЦР с градиентом 94–82°C для генов *ARID1*, *PAX5* и *TP53* (слева — гели, справа — полуколичественный анализ). (Б) Результаты для A3A, A3B и AID: аналогичный анализ. Mock — dCas9-p300 с нецелевой sgRNA. Отсутствие полос при температурах ниже 88°C и сопоставимые с Mock уровни на количественных графиках свидетельствуют об отсутствии внецелевого дезаминирования во всех экспериментальных группах.

ВЫВОДЫ ПО РАЗДЕЛУ 3.7

1. Система CRISPRa на основе dCas9-p300 обеспечивала устойчивую активацию генов *A3C* (~4-кратную), *A3D* (~35-кратную) и *A3H* (~2-кратную), сопровождавшуюся снижением уровней пгРНК и ккзДНК на 50% и более при неизменных уровнях HBsAg.

2. Методом 3D-ПЦР установлено, что A3C, A3D и A3H не дезаминируют ккзДНК, что принципиально отличает их от A3A и A3B. Дезаминирование выявлялось преимущественно во внутриклеточной ДНК ВГВ (кчдДНК) при активации A3C и A3D, и в меньшей степени в секретируемой ДНК ВГВ.
3. Мутагенного воздействия на гены *ARID1*, *PAX5* и *TP53* при активации A3C, A3D и A3H обнаружено не было, что свидетельствует об отсутствии генотоксического риска при данном уровне активации.
4. Сравнительный анализ показал, что A3A, A3B и AID в условиях активной репликации ВГВ также не вызывают дезаминирования генов, задействованных в канцерогенезе, — внецелевой мутагенез реализуется лишь при снижении вирусной нагрузки (глава 8), что дополнительно подтверждает протекторную роль кчдДНК.
5. Совокупность данных позволяет разграничить члены семейства APOBEC3 по механизму и профилю безопасности: A3C, A3D и A3H ограничивают репликацию ВГВ без дезаминирования ккзДНК и без внецелевого мутагенеза генома хозяина, что определяет их потенциальное преимущество как терапевтических агентов перед A3A и A3B.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ

4.1 Механизм насыщения кчдДНК как новая стратегия иммунной эвазии ВГВ

В настоящей работе впервые представлены экспериментальные доказательства нового механизма иммунной эвазии ВГВ, связанного с насыщением цитидин-дезаминаз семейства APOBEC/AID избыточным количеством кчдДНК. Совокупность полученных данных демонстрирует, что кчдДНК ВГВ, образующаяся в цитоплазме инфицированных гепатоцитов в результате обратной транскрипции пгРНК, функционирует как молекулярная ловушка, конкурентно насыщающая APOBEC/AID и предотвращающая их доступ к ядерной ккзДНК.

Молекулярная основа этого механизма определяется кардинальным несоответствием в численности двух форм вирусного генома: уровни кчдДНК в цитоплазме активно инфицированных гепатоцитов достигают 10^6–10^7 копий на клетку, тогда как ядерный пул ккзДНК составляет 10^2–10^3 копий [70]. Поскольку APOBEC/AID взаимодействуют исключительно с одноцепочечной ДНК, а кчдДНК содержит протяжённую одноцепочечную минус-цепь (~3,2 т.п.н.), она является предпочтительным субстратом для большинства членов семейства. Подавление вирусной репликации — ламивудином (ингибитором обратной транскриптазы) или shRNA против X-гена ВГВ — приводит к истощению пула кчдДНК и сопряжено с резким усилением дезаминирования ккзДНК, что подтверждает причинно-следственную связь между уровнем кчдДНК и степенью защиты ккзДНК. Прямое доказательство этого механизма получено в экспериментах с введением очищенной вирионной кчдДНК: её добавление в концентрации 1×10^6–5×10^7 копий на клетку полностью блокировало дезаминирующую активность A3A в отношении meth-рккзДНК, перенаправляя фермент на кчдДНК.

Обнаружение A3A и A3B в составе очищенных вирионов ВГВ расширяет концепцию ловушки: помимо свободной цитоплазматической кчдДНК, роль молекулярного буфера выполняет и внутрикапсидная фракция. Упаковка APOBEC/AID в нуклеокапсиды создаёт замкнутые реакционные компартменты, в которых дезаминирование кчдДНК происходит в непосредственной близости от синтезируемой минус-цепи — вероятно, ещё до завершения формирования кчдДНК. Тем самым ВГВ не только производит избыточное количество кчдДНК, но и физически изолирует молекулы APOBEC/AID от ядерных мишеней.

4.2 Сравнение с известными механизмами иммунной эвазии ВГВ

Выявленный механизм органично вписывается в совокупность стратегий иммунной эвазии, выработанных ВГВ в ходе эволюции с учетом влияния иммунной системы хозяина. ВГВ характеризуется как активно уклоняющийся от распознавания врождённым иммунитетом вирус [172]. Белки HBx и вирусная полимераза подавляют STING-опосредованную активацию IRF-3, ингибируют TLR-зависимую и RLR-зависимую индукцию интерферона-β и снижают экспрессию интерферон-стимулируемых генов, в том числе кодирующих члены семейства APOBEC3 [105; 91]. В условиях подавленного интерферонового сигналинга базальные уровни APOBEC/AID недостаточны для эффективной элиминации ккзДНК; обнаруженный в настоящей работе механизм насыщения кчдДНК обеспечивает дополнительный уровень защиты, действующий уже на уровне активности ферментов, а не их экспрессии.

Структурная аналогия прослеживается с механизмом подавления адаптивного иммунитета: ВГВ продуцирует HBsAg-содержащие субвирусные частицы в количестве, на 100–1000 раз превышающем число инфекционных вирионов [37], перегружая антигенпрезентирующие клетки и индуцируя толерантность B- и T-лимфоцитов. Описанный в настоящей работе механизм реализует ту же логику в отношении врождённого иммунитета: перегрузка APOBEC/AID избытком кчдДНК предотвращает их накопление в ядре в количестве, достаточном для элиминации ккзДНК. В обоих случаях вирус использует закономерный продукт собственной репликации как инструмент иммунной эвазии, не требующий отдельных белков-ингибиторов.

Следует, однако, подчеркнуть, что описанный механизм не отменяет, а дополняет прямое подавление APOBEC/AID: при снижении репликации на фоне противовирусной терапии оба барьера снимаются одновременно, что объясняет наблюдаемое резкое усиление дезаминирования ккзДНК в условиях подавления вирусной нагрузки.

4.3 Дифференциальный профиль дезаминирования членов семейства APOBEC/AID

Полученные данные выявили принципиальные различия между членами семейства APOBEC/AID по характеру взаимодействия с вирусными и геномными мишенями.

A3A и A3B демонстрировали наиболее выраженную активность в отношении ккзДНК при снижении вирусной нагрузки. A3A преимущественно дезаминировал ккзДНК в TC-контексте и проявлял более высокую активность в отношении гиперметилированной ккзДНК (meth-ркккзДНК), что согласуется с опубликованными данными о способности A3A эффективно

дезаминировать метилированный цитозин [136]. A3B демонстрировал более высокий базальный уровень дезаминирования ккзДНК независимо от наличия shRNA, что может объясняться его ядерно-цитоплазматическим шаттлингом и более широкой субстратной специфичностью (TC- и CC-контексты). Парадоксальное отсутствие усиления A3B-опосредованного дезаминирования при добавлении shRNA объясняется, по всей видимости, деградацией гипердезаминированных молекул ккзДНК с множественными остатками урацила, что снижает их детектируемый пул.

A3C, A3D и A3H не дезаминировали ккзДНК при любых экспериментальных условиях, однако проявляли выраженное дезаминирование внутриклеточной кчдДНК (A3C и A3D). Это свидетельствует о том, что данные ферменты реализуют противовирусный эффект преимущественно на цитоплазматическом уровне — в ходе обратной транскрипции пгРНК, — не достигая ядерного пула ккзДНК. Механизм этого ограничения может быть связан с их преимущественно цитоплазматической локализацией и/или меньшей аффинностью к субстратам с вторичной структурой, характерной для ккзДНК.

4.4 Взаимосвязь между вирусной нагрузкой и мутагенезом генома хозяина

Одним из наиболее значимых результатов настоящей работы является установление обратной корреляции между уровнем вирусной репликации и риском внецелевого мутагенеза генома хозяина. ChIP-Seq анализ в клетках HepG2-hNTCP продемонстрировал, что при активной репликации ВГВ хроматин-ассоциированные локусы A3A и A3B практически отсутствуют, тогда как подавление репликации shRNA сопровождается значительным увеличением числа и интенсивности таких локусов. NGS-секвенирование выявило дезаминирование генов *7SK*, *CD63* и *TP53* ферментом A3A исключительно в условиях сниженной вирусной нагрузки.

Данный результат переопределяет оценку безопасности APOBEC-активирующих терапевтических стратегий. Установленное в ряде исследований отсутствие токсичности A3A и A3B для генома инфицированных клеток при физиологических уровнях экспрессии [75] объясняется именно протекторным действием кчдДНК — а не какой-либо специфической резистентностью генома гепатоцитов. Снижение вирусной нагрузки нуклеозидными аналогами, которое является стандартной терапевтической целью при ХГВ, создаёт условие, при котором APOBEC-активирующая терапия становится генотоксической. Это представляет существенное клиническое ограничение для APOBEC/AID-направленных подходов и требует переосмысления протоколов комбинированной терапии.

Выполненный анализ внецелевого мутагенеза показал, что наблюдаемые эффекты носили ограниченный характер: дезаминирование TP53 регистрировали преимущественно при CRISPR активации A3A на фоне подавления репликации ВГВ shRNA, тогда как при использовании ламивудина аналогичные изменения были менее выражены. Это указывает на то, что не каждое снижение вирусной нагрузки в одинаковой степени истощает пул кчдДНК и, следовательно, степень риска внецелевых эффектов определяется конкретным механизмом подавления репликации.

На основе совокупности полученных результатов можно предложить ряд практических ориентиров для проектирования противовирусных стратегий. Использование RNP CRISPRa в сочетании с аттенуированными sgRNA демонстрирует принципиальную возможность разведения терапевтического и токсического компонентов эффекта: антивирусная активность сохраняется при одновременном устранении детектируемого внецелевого мутагенеза. Транзиентный характер активации при доставке CRISPRa в виде рибонуклеопротеиновых комплексов создаёт дополнительный уровень безопасности, поскольку ограничивает время действия системы и снижает суммарную нагрузку на геном клетки-хозяина.

Наблюдение о том, что ВГВ-инфекция защищает геном хозяина от мутагенеза A3A в инфицированных, но не в интактных клетках, имеет непосредственное значение для планирования клинических испытаний: испытания APOBEC-активирующих подходов на здоровых добровольцах или клетках без ВГВ-инфекции будут переоценивать генотоксический риск, а испытания на пациентах с успешно подавленной вирусной нагрузкой — недооценивать его.

4.5 Ограничения исследования и перспективы

Результаты настоящей работы получены преимущественно на клеточных линиях HepG2 и HepaRG-hNTCP, которые, несмотря на широкое применение в вирусологии ВГВ, не воспроизводят в полной мере сложность взаимодействия вируса с иммунной системой *in vivo*, включая влияние резидентных макрофагов печени (клеток Купфера), естественных киллеров и системного интерферонового ответа. Перенос установленных закономерностей на первичные гепатоциты человека и животные модели (трансгенные мыши с ВГВ-геномом, системы доставки ВГВ-ккзДНК в печень мышей) является необходимым этапом доклинической верификации.

Механизм, посредством которого APOBEC/AID направляются к ккзДНК при снижении пула кчдДНК — ядерная локализация, взаимодействие с HBc-белком, хроматиновое

ремоделирование — в настоящей работе не был охарактеризован в полной мере и требует отдельного исследования. Установление роли конкретных доменов A3A и A3B в ядерном импорте и взаимодействии с HBc, а также идентификация клеточных факторов, модулирующих этот процесс, позволит рационально конструировать варианты с улучшенным терапевтическим эффектом.

Наконец, асимметричность дезаминирования двух цепей кчдДНК — минус-цепи (полноразмерная, одноцепочечная, ковалентно связана с полимеразой) и плюс-цепи (неполная, различной длины) — представляет отдельный предмет исследования: различные члены семейства APOBEC/AID могут иметь неодинаковую аффинность к каждой из цепей, что влияет на эффективность насыщения и характер мутационного спектра [107].

ГЛАВА 5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хронический гепатит В остаётся одним из наиболее значимых инфекционных заболеваний человека, а достижение его функционального излечения ограничено невозможностью элиминировать персистентный ядерный резервуар вируса — ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (ккзДНК). Цитидин-дезаминазы семейства APOBEC/AID рассматривались как перспективные агенты для мутационной инактивации ккзДНК, однако механизм их взаимодействия с различными формами вирусного генома и безопасность в отношении генома хозяина оставались неохарактеризованными.

В настоящей диссертационной работе установлен принципиально новый механизм иммунной эвазии ВГВ: кольцевая частично двухцепочечная ДНК (кчдДНК), образующаяся в цитоплазме инфицированных гепатоцитов в процессе репликации вируса, функционирует как молекулярная ловушка, насыщающая ферменты APOBEC/AID и защищающая ккзДНК от дезаминирования. Данный механизм реализуется через конкурентное перенаправление APOBEC/AID с ядерной ккзДНК на цитоплазматическую кчдДНК, численно превосходящую ккзДНК на 3–4 порядка. Дополнительным компонентом механизма является упаковка A3A в нуклеокапсиды ВГВ, изолирующая молекулы ферментов в замкнутых реакционных компартментах.

Экспериментально показано, что подавление вирусной репликации — ламивудином или shRNA против *Hbx* — истощает пул кчдДНК и резко усиливает дезаминирование ккзДНК ферментами A3A и A3B. Прямое введение вирионной кчдДНК в клетки полностью восстанавливало защиту ккзДНК от дезаминирования дозозависимым образом, подтвердив причинно-следственный характер выявленной закономерности. Аналогичная закономерность воспроизведена на инфекционной модели клеток HepaRG-hNTCP, инфицированных ВГВ.

Установлено, что истощение пула кчдДНК при подавлении репликации ВГВ одновременно снимает защиту генома хозяина: ChIP-Seq анализ и таргетное NGS-секвенирование выявили дезаминирование генов *7SK*, *CD63* и *TP53* ферментом A3A исключительно в условиях сниженной вирусной нагрузки. Данный результат свидетельствует о том, что безопасность APOBEC/AID в инфицированных клетках, описанная в ряде предшествующих работ, является не абсолютным свойством ферментов, а следствием конкурентной защиты, обеспечиваемой кчдДНК.

Сравнительный анализ членов семейства APOBEC3 выявил принципиальные различия в их профиле безопасности: A3C, A3D и A3H не дезаминировали ккзДНК и не вызывали

мутагенеза онкогенов *ARID1*, *PAX5* и *TP53* ни при каких условиях, реализуя противовирусный эффект через механизм, не зависящий от дезаминирования ккзДНК.

Совокупность полученных данных вносит существенный вклад в понимание молекулярных механизмов взаимодействия ВГВ с факторами врождённого иммунитета и формирует концептуальную основу для рационального дизайна противовирусных стратегий, основанных на управляемой активации APOBEC/AID.

ОБЩИЕ ВЫВОДЫ

1. Установлено, что гиперметилированная транскрипционно инактивированная рккзДНК подвергается более интенсивному дезаминированию ферментами A3A, A3B и AID по сравнению с транскрипционно активной формой: частота мутаций C→T в meth-рккзДНК составляла 3–15%, тогда как в WT-рккзДНК — 0,01–0,5%. Показано, что данное различие определяется не неспецифическим метилированием, а запуском транскрипции пгРНК, следствием которого является накопление кчдДНК.
2. Подавление образования кчдДНК двумя независимыми методами — ингибитором обратной транскриптазы ламивудином и shRNA против *Hbx* — приводило к усилению дезаминирования ккзДНК ферментами A3A и AID: частота мутаций C→T возрастала с 0,1–0,5% (контроль) до 3–10% в зависимости от региона генома, а снижение уровней ккзДНК при комбинированном воздействии достигало 60–80%.
3. Фермент A3A впервые обнаружен в составе очищенных вирионов ВГВ методом иммуноблоттинга, что свидетельствует об его упаковке внутрь нуклеокапсидов в процессе вирусной сборки. Внутрикапсидная кчдДНК представляет собой дополнительный компартмент молекулярных ловушек, дополняющий свободную цитоплазматическую кчдДНК.
4. ChIP-Seq анализ и таргетное NGS-секвенирование установили, что дезаминирование генов хозяина *7SK*, *CD63* и *TP53* ферментом A3A наблюдается исключительно в условиях подавления репликации ВГВ и отсутствует при активной репликации. A3B дезаминировал *7SK* и *CD63* независимо от уровня вирусной нагрузки, тогда как A70-вариант A3A не индуцировал мутагенеза генома хозяина, свидетельствуя о наличии порогового уровня активации APOBEC/AID.
5. Показано, что кчдДНК ВГВ, введённая в клетки HepG2 методом электропорации в концентрации 1×10^6–5×10^7 копий, дозозависимо подавляла дезаминирующую активность A3A в отношении meth-рккзДНК вплоть до полного её блокирования, что прямо подтверждает функцию кчдДНК как молекулярной ловушки, насыщающей APOBEC/AID и защищающей ккзДНК и геном хозяина от мутагенного воздействия.
6. CRISPR-активация генов *A3C*, *A3D* и *A3H* системой dCas9-p300 обеспечивала снижение пгРНК и ккзДНК ВГВ на 50% и более без дезаминирования ккзДНК и без внецелевого

мутагенеза онкогенов *ARID1*, *PAX5* и *TP53*, что принципиально отличает эти ферменты от A3A и A3B.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

A3A — APOBEC3A, цитидин-дезаминаза семейства APOBEC (*APOBEC3A*)

A3B — APOBEC3B, цитидин-дезаминаза семейства APOBEC (*APOBEC3B*)

A3C — APOBEC3C, цитидин-дезаминаза семейства APOBEC (*APOBEC3C*)

A3D — APOBEC3D, цитидин-дезаминаза семейства APOBEC (*APOBEC3D*)

A3G — APOBEC3G, цитидин-дезаминаза семейства APOBEC (*APOBEC3G*)

A3H — APOBEC3H, цитидин-дезаминаза семейства APOBEC (*APOBEC3H*)

AID — активационно-индуцированная дезаминаза (*Activation-Induced cytidine Deaminase*)

ANOVA — дисперсионный анализ (*ANalysis Of VAriance*)

APOBEC — семейство ферментов редактирования аполипопротеина B мРНК (*Apolipoprotein B mRNA Editing enzyme, Catalytic polypeptide-like*)

AP-сайт — апуриновый/апиримидиновый сайт (*Apurinic/Apyrimidinic site*)

att-sgRNA — аттенуированная однонаправляющая РНК (*attenuated single guide RNA*)

BAM — формат хранения выровненных последовательностей (*Binary Alignment Map*)

BCA — анализ белка бицинхониновой кислотой (*BiCinchonicAcid protein assay*)

BER — эксцизионная репарация оснований (*Base Excision Repair*)

BWA-MEM — алгоритм выравнивания последовательностей (*Burrows-Wheeler Aligner – Maximal Exact Match*)

CD63 — мембранный тетраспанин, мишень ChIP-Seq в настоящей работе (*Cluster of Differentiation 63*)

ChIP-Seq — хроматин-иммунопреципитационное секвенирование (*CHromatin ImmunoPrecipitation followed by Sequencing*)

CRISPR/Cas — кластеризованные регулярно расположенные короткие палиндромные повторы и ассоциированный белок (*Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/CRISPR-associated protein*)

CRISPRa — система транскрипционной активации генов на основе CRISPR (*CRISPR*

Activation)

dCas9 — каталитически инактивированный белок Cas9 (*dead Cas9*)

dSaCas9 — каталитически инактивированный белок SaCas9 (*dead Staphylococcus aureus Cas9*)

DMEM — среда Игла, модифицированная по Дульбекко (*Dulbecco's Modified Eagle Medium*)

DNB — ДНК-наношарики (*DNA NanoBalls*), технология секвенирования MGI

DNBSEQ — платформа высокопроизводительного секвенирования на основе технологии DNB (*DNA NanoBall SEQuencing*)

DSB — двухцепочечный разрыв ДНК (*Double-Strand Break*)

DTT — дитиотреитол (*DiThioThreitol*)

ECL — усиленная хемилюминесценция (*Enhanced ChemiLuminescence*)

EDTA — этилендиаминтетрауксусная кислота (*EthyleneDiamineTetraAcetic acid*)

ELISA — твердофазный иммуноферментный анализ (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*)

FASTQ — формат хранения сырых данных секвенирования

FBS — фетальная бычья сыворотка (*Fetal Bovine Serum*)

GAPDH — глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа (*GlycerAldehdye-3-Phosphate DeHydrogenase*), ген домашнего хозяйства

GATK — набор инструментов для анализа геномных данных (*Genome Analysis ToolKit*)

HBcAg — антиген ядра (core) вируса гепатита B (*Hepatitis B Core Antigen*)

HBeAg — e-антиген вируса гепатита B (*Hepatitis B e Antigen*)

HBsAg — поверхностный антиген вируса гепатита B (*Hepatitis B surface Antigen*)

HBV — вирус гепатита B (*Hepatitis B Virus*); в тексте используется также русскоязычное обозначение ВГВ

HBx — белок X вируса гепатита B (*Hepatitis B virus X protein*)

hNTCP — натрий-таурохолат котранспортирующий полипептид человека (*human Sodium-Taurocholate CoTransporting Polypeptide*)

IFN-α — интерферон-альфа (*InterFeroN-alpha*)

IPTG — изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (*IsoPropyl β-D-1-ThioGalactopyranoside*)

IRF — интерферон-регуляторный фактор (*Interferon Regulatory Factor*)

ISG — интерферон-стимулируемый ген (*Interferon-Stimulated Gene*)

IVT — транскрипция in vitro (*In Vitro Transcription*)

LAM — ламивудин (*LaMivudine*)

LTβR — рецептор лимфотоксина-бета (*LymphoToxin beta Receptor*)

MACS2 — инструмент идентификации пиков ChIP-Seq (*Model-based Analysis of ChIP-Seq, version 2*)

MCP — белок оболочки MS2 (*MS2 Coat Protein*)

MUC12 — муцин 12 (*MUCin 12*), выявленный как мишень A3B в ChIP-Seq

NGS — высокопроизводительное секвенирование нового поколения (*Next-Generation Sequencing*)

NF-κB — ядерный фактор каппа-би (*Nuclear Factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*)

NLS — сигнал ядерной локализации (*Nuclear Localization Signal*)

NTCP — натрий-таурохолат котранспортирующий полипептид (*Sodium-Taurocholate CoTransporting Polypeptide*)

p300 — гистонацетилтрансфераза p300 (*E1A binding protein p300*)

PAM — мотив, прилегающий к протоспейсеру (*Protospacer Adjacent Motif*)

PBS — фосфатно-солевой буфер (*Phosphate-Buffered Saline*)

PE100 — режим парноконцевого секвенирования с длиной прочтения 100 п.н. (*Paired-End 100*)

пгРНК — прегеномная РНК ВГВ (*pregenomic RNA*)

PMSF — фенилметилсульфонилфторид (*PhenylMethylSulfonyl Fluoride*)

Q30 — показатель качества данных секвенирования (≥99,9% точности прочтения)

qPCR — количественная ПЦР в реальном времени (*quantitative Polymerase Chain Reaction*)

qRT-PCR — количественная ПЦР в реальном времени с обратной транскрипцией (*quantitative*

Reverse Transcription PCR)

кчдДНК — кольцевая частично двухцепочечная ДНК ВГВ (*relaxed circular DNA*)

ркказДНК — рекомбинантная ккзДНК (*recombinant covalently closed circular DNA*)

RIPA — буфер для иммунопреципитации радиоактивных меток (*RadioImmunoPrecipitation Assay buffer*)

RNP — рибонуклеопротеиновый комплекс (*RiboNucleoProtein*)

RNU6-1 — малая ядерная РНК U6-1 (*RNA, U6 small nuclear 1*), выявленная как мишень A3A/A3B в ChIP-Seq

SaCas9 — белок Cas9 *Staphylococcus aureus* (*Staphylococcus aureus Cas9*)

SBS2, SBS13 — мутационные сигнатуры APOBEC (*Single Base Substitution signatures 2 and 13*)

SE100 — режим одиночных прочтений длиной 100 п.н. (*Single-End 100*)

sgRNA — однонаправляющая РНК (*single guide RNA*)

shRNA — малая шпилечная РНК (*short hairpin RNA*)

siRNA — малая интерферирующая РНК (*small interfering RNA*)

SnpEff — инструмент аннотации вариантов (*SNP Effect annotator*)

STING — стимулятор генов интерферона (*Stimulator of INterferon Genes*)

TLR — толл-подобный рецептор (*Toll-Like Receptor*)

TMB — тетраметилбензидин (*TetraMethylBenzidine*), субстрат для ELISA

TP53 — опухолевый супрессор p53 (*Tumour Protein 53*)

UNG — урацил-ДНК-гликозилаза (*Uracil-DNA Glycosylase*)

UGI — ингибитор урацилгликозилазы (*Uracil Glycosylase Inhibitor*)

VPR — химерный трансактиватор VP64-p65-Rta

7SK — некодирующая РНК, регулятор транскрипционного комплекса P-TEFb; выявлена как мишень A3A в ChIP-Seq

ВГВ — вирус гепатита B (см. также HBV)

ГКЦ — гепатоцеллюлярная карцинома

ДЦР — двухцепочечный разрыв ДНК (см. также DSB)

ИФА — иммунно-ферментный анализ (см. также ELISA)

кДНК — комплементарная ДНК

ккзДНК — ковалентно замкнутая кольцевая ДНК ВГВ (см. также cccDNA)

кчдДНК — кольцевая частично двухцепочечная ДНК ВГВ (см. также rcDNA)

МСП — мутационный спектр

ПААГ — полиакриламидный гель

пгРНК — прегеномная РНК ВГВ (см. также pgRNA)

пн — пар нуклеотидов

т.п.н. — тысяч пар нуклеотидов

ПЦР — полимеразная цепная реакция

ПЦР-РВ / qPCR — полимеразная цепная реакция в реальном времени

мет-ркккзДНК — метелированная рекомбинантная ккзДНК

РНП — рибонуклеопротеиновый комплекс (см. также RNP)

PBS — фосфатно-солевой буфер

ХГВ — хронический гепатит В

3Д-ПЦР — дифференциальная денатурационная ПЦР (*3D-PCR, Differential DNA Denaturation PCR*)

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Alexandrov, L. B. The repertoire of mutational signatures in human cancer // Nature. 2020. Vol. 578. № 7793. – P. 94-101.

2. Alvarez, D. M. Cetylpyridinium chloride blocks herpes simplex virus replication in gingival fibroblasts // Antiviral Research. 2020. Vol. 179. – P. 104818.

3. Ascione, A. Mortality from cirrhosis and hepatocellular carcinoma in Western Europe over the last 40 years // Liver International: Official Journal of the International Association for the Study of the Liver. 2017. Vol. 37. № 8. – P. 1193-1201.

4. Az, C. A Conserved Mechanism of APOBEC3 Relocalization by Herpesviral Ribonucleotide Reductase Large Subunits // Journal of virology. 2019. Vol. 93. № 23.

5. Az, C. APOBECs and Herpesviruses // Viruses. 2021. Vol. 13. № 3.

6. Bergstrom, E. N. Mapping clustered mutations in cancer reveals APOBEC3 mutagenesis of ecDNA // Nature. 2022. Vol. 602. № 7897. – P. 510-517.

7. Bhat, S. A. HBV cccDNA─A Culprit and Stumbling Block for the Hepatitis B Virus Infection: Its Presence in Hepatocytes Perplexed the Possible Mission for a Functional Cure / S.A. Bhat, S.N. Kazim – Text : direct // ACS Omega. 2022. Vol. 7. HBV cccDNA─A Culprit and Stumbling Block for the Hepatitis B Virus Infection. № 28. – P. 24066-24081.

8. Bloom, K. Gene Therapy for Chronic HBV-Can We Eliminate cccDNA? // Genes. 2018. Vol. 9. № 4. – P. 207.

9. Bolen, C. R. Dynamic expression profiling of type I and type III interferon-stimulated hepatocytes reveals a stable hierarchy of gene expression // Hepatology (Baltimore, Md.). 2014. Vol. 59. № 4. – P. 1262-1272.

10. Brezgin, S. Replenishment of Hepatitis B Virus cccDNA Pool Is Restricted by Baseline Expression of Host Restriction Factors In Vitro // Microorganisms. 2019. Vol. 7. № 11. – P. 533.

11. Brown, A. L. Single-stranded DNA binding proteins influence APOBEC3A substrate preference // Scientific Reports. 2021. Vol. 11. № 1. – P. 21008.

12. Brunet, E. Chromosomal translocations induced at specified loci in human stem cells // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2009. Vol. 106. № 26. – P. 10620-10625.

13. Budzinska, M. A. Cellular Genomic Sites of Hepatitis B Virus DNA Integration // Genes. 2018. Vol. 9. № 7. – P. 365.

14. Butler, K. APOBEC3-mediated mutagenesis in cancer: causes, clinical significance and therapeutic potential / K. Butler, A.R. Banday – Text: direct // Journal of Hematology & Oncology. 2023. Vol. 16. APOBEC3-mediated mutagenesis in cancer. № 1. – P. 31.

15. Butt, Y. Distinguishing preferences of human APOBEC3A and APOBEC3B for cytosines in hairpin loops, and reflection of these preferences in APOBEC-signature cancer genome mutations // Nature Communications. 2024. Vol. 15. № 1. – P. 2369.

16. Cai, B. CRISPR/Cas9 for hepatitis B virus infection treatment // Immunity, Inflammation and Disease. 2023. Vol. 11. № 5. – P. e866.

17. Chang, J. Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists: Current status and potential for a cure / J. Chang, J.-T. Guo – Text : direct // Antiviral Research. 2015. Vol. 121. Treatment of chronic hepatitis B with pattern recognition receptor agonists. – P. 152-159.

18. Chanyshev, M. D. NGS amplification panel for HBV (Hepadnaviridae: *Orthohepadnavirus*) sequencing // Problems of Virology. 2024. Vol. 69. NGS amplification panel for HBV (Hepadnaviridae. № 1. – P. 65-75.

19. Chaurasiya, K. R. Oligomerization transforms human APOBEC3G from an efficient enzyme to a slowly dissociating nucleic acid-binding protein // Nature Chemistry. 2014. Vol. 6. № 1. – P. 28-33.

20. Chen, H. Interferon-alpha induces high expression of APOBEC3G and STAT-1 in vitro and in vivo // International Journal of Molecular Sciences. 2010. Vol. 11. № 9. – P. 3501-3512.

21. Chen, J. The preferred nucleotide contexts of the AID/APOBEC cytidine deaminases have differential effects when mutating retrotransposon and virus sequences compared to host genes / J. Chen, T. MacCarthy – Text: direct // PLoS computational biology. 2017. Vol. 13. № 3. – P. e1005471.

22. Chen, Z. APOBEC3-induced mutation of the hepatitis virus B DNA genome occurs during its viral RNA reverse transcription into (−)-DNA // The Journal of Biological Chemistry. 2021. Vol. 297. № 2. – P. 100889.

23. Chen, Z. Integrative genomic analyses of APOBEC-mutational signature, expression and germline deletion of APOBEC3 genes, and immunogenicity in multiple cancer types // BMC medical genomics. 2019. Vol. 12. № 1. – P. 131.

24. Chuang, Y.-C. Pathogenicity and virulence of Hepatitis B virus / Y.-C. Chuang, K.-N. Tsai, J.-H.J. Ou – Text: direct // Virulence. Vol. 13. № 1. – P. 258-296.

25. Dananberg, A. APOBEC Mutagenesis in Cancer Development and Susceptibility // Cancers. 2024. Vol. 16. № 2. – P. 374.

26. De Giorgi, M. Targeting the Apoa1 locus for liver-directed gene therapy // Molecular Therapy. Methods & Clinical Development. 2021. Vol. 21. – P. 656-669.

27. Desimmie, B. A. Multiple APOBEC3 restriction factors for HIV-1 and one Vif to rule them all // Journal of Molecular Biology. 2014. Vol. 426. № 6. – P. 1220-1245.

28. Ding, R. High-efficiency of genetic modification using CRISPR/Cpf1 system for engineered CAR-T cell therapy / R. Ding, C.-C. Chao, Q. Gao – Text: direct // Methods in Cell Biology. 2022. Vol. 167. – P. 1-14.

29. Diogo Dias, J. Early Steps of Hepatitis B Life Cycle: From Capsid Nuclear Import to cccDNA Formation / J. Diogo Dias, N. Sarica, C. Neuveut – Text: direct // Viruses. 2021. Vol. 13. Early Steps of Hepatitis B Life Cycle. № 5. – P. 757.

30. Dudley, J. P. APOBECs: Our fickle friends? / J.P. Dudley – Text: direct // PLOS Pathogens. 2023. Vol. 19. APOBECs. № 5. – P. e1011364.

31. Duggal, N. K. Identification and antiviral activity of common polymorphisms in the APOBEC3 locus in human populations // Virology. 2013. Vol. 443. № 2. – P. 329-337.

32. Evans, S. L. HIV-1 Vif N-terminal Motif is required for recruitment of Cul5 to Suppress APOBEC3 // Retrovirology. 2014. Vol. 11. – P. 4.

33. Faden, D. L. APOBEC mutagenesis is tightly linked to the immune landscape and immunotherapy biomarkers in head and neck squamous cell carcinoma // Oral Oncology. 2019. Vol. 96. – P. 140-147.

34. Fang, L. Analysis of Vif-induced APOBEC3G degradation using an alpha-complementation assay / L. Fang, N.R. Landau – Text: direct // Virology. 2007. Vol. 359. № 1. – P. 162-169.

35. Fanourakis, G. APOBEC3B Is Co-Expressed with PKCα/NF-κB in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinomas // Diagnostics (Basel, Switzerland). 2023. Vol. 13. № 3. – P. 569.

36. Faure-Dupuy, S. Control of APOBEC3B induction and cccDNA decay by NF-κB and miR-138-5p // JHEP Reports. 2021. Vol. 3. № 6. – P. 100354.

37. Ferrari, C. HBV and the immune response / C. Ferrari – Text: direct // Liver International. 2015. Vol. 35. <span style="font-variant. № s1. – P. 121-128.

38. Fu, Y. High frequency off-target mutagenesis induced by CRISPR-Cas nucleases in human cells // Nature biotechnology. 2013. Vol. 31. № 9. – P. 822-826.

39. Gaba, A. Variability in HIV-1 transmitted/founder virus susceptibility to combined APOBEC3F and APOBEC3G host restriction // Journal of Virology. 2025. Vol. 99. № 1. – P. e01606-24.

40. Giunta, S. Decoding human cancer with whole genome sequencing: a review of PCAWG Project studies published in February 2020 / S. Giunta – Text: direct // Cancer Metastasis Reviews. 2021. Vol. 40. Decoding human cancer with whole genome sequencing. № 3. – P. 909-924.

41. Gm, J. Protein Interaction Map of APOBEC3 Enzyme Family Reveals Deamination-Independent Role in Cellular Function // Molecular & cellular proteomics: MCP. 2024. Vol. 23. № 5.

42. Gómez-Moreno, A. Mechanisms of Hepatitis B Virus cccDNA and Minichromosome Formation and HBV Gene Transcription / A. Gómez-Moreno, A. Ploss – Text: direct // Viruses. 2024. Vol. 16. № 4. – P. 609.

43. Green, A. M. APOBEC3A damages the cellular genome during DNA replication // Cell Cycle (Georgetown, Tex.). 2016. Vol. 15. № 7. – P. 998-1008.

44. Grillo, M. J. The current toolbox for APOBEC drug discovery // Trends in Pharmacological

Sciences. 2022. Vol. 43. № 5. – P. 362-377.

45. Guo, H. APOBEC Alteration Contributes to Tumor Growth and Immune Escape in Pan-Cancer // Cancers. 2022. Vol. 14. № 12. – P. 2827.

46. Hakata, Y. Deaminase-Independent Mode of Antiretroviral Action in Human and Mouse APOBEC3 Proteins / Y. Hakata, M. Miyazawa – Text: direct // Microorganisms. 2020. Vol. 8. № 12. – P. 1976.

47. Harjes, E. An extended structure of the APOBEC3G catalytic domain suggests a unique holoenzyme model // Journal of Molecular Biology. 2009. Vol. 389. № 5. – P. 819-832.

48. Harjes, S. Structure-guided inhibition of the cancer DNA-mutating enzyme APOBEC3A // Nature Communications. 2023. Vol. 14. № 1. – P. 6382.

49. Harper, M. S. IFN-α treatment inhibits acute Friend retrovirus replication primarily through the antiviral effector molecule Apobec3 // Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950). 2013. Vol. 190. № 4. – P. 1583-1590.

50. He, X.-S. Differential transcriptional responses to interferon-alpha and interferon-gamma in primary human hepatocytes // Journal of Interferon & Cytokine Research: The Official Journal of the International Society for Interferon and Cytokine Research. 2010. Vol. 30. № 5. – P. 311-320.

51. Holmes, R. K. APOBEC3F can inhibit the accumulation of HIV-1 reverse transcription products in the absence of hypermutation. Comparisons with APOBEC3G // The Journal of Biological Chemistry. 2007. Vol. 282. № 4. – P. 2587-2595.

52. Hou, S. Structural basis of substrate specificity in human cytidine deaminase family APOBEC3s // Journal of Biological Chemistry. 2021. Vol. 297. № 2. – P. 100909.

53. Hou, Z. Hepatitis B virus inhibits intrinsic RIG-I and RIG-G immune signaling via inducing miR146a // Scientific Reports. 2016. Vol. 6. – P. 26150.

54. Hu, J. Hepadnavirus Genome Replication and Persistence / J. Hu, C. Seeger – Text : direct // Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine. 2015. Vol. 5. № 7. – P. a021386.

55. Hu, J. Hepatitis B virus nucleocapsid uncoating: biological consequences and regulation by cellular nucleases // Emerging Microbes & Infections. 2021. Vol. 10. Hepatitis B virus nucleocapsid uncoating. № 1. – P. 852-864.

56. Hu, J.-L. Dynamics of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA: A Mini-Review / J.-L. Hu, A.-L. Huang – Text : direct // Microorganisms. 2023. Vol. 11. Dynamics of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA. № 3. – P. 600.

57. Iuliano, M. Virus-Induced Tumorigenesis and IFN System // Biology. 2021. Vol. 10. № 10. – P. 994.

58. Iwatani, Y. Biochemical Activities of Highly Purified, Catalytically Active Human APOBEC3G: Correlation with Antiviral Effect // Journal of Virology. 2006. Vol. 80. Biochemical Activities of

Highly Purified, Catalytically Active Human APOBEC3G. № 12. – P. 5992-6002.

59. Iwatani, Y. The unique structure of the highly conserved PPLP region in HIV-1 Vif is critical for the formation of APOBEC3 recognition interfaces // mBio. 2025. Vol. 16. № 3. – P. e0333224.

60. Jakobsdottir, G. M. APOBEC3 mutational signatures are associated with extensive and diverse genomic instability across multiple tumour types // BMC biology. 2022. Vol. 20. № 1. – P. 117.

61. Jeong, H. Y. Correlation-based and feature-driven mutation signature analyses to identify genetic features associated with DNA mutagenic processes in cancer genomes // Genomics & Informatics. 2021. Vol. 19. № 4. – P. e40.

62. Jost, S. Induction of antiviral cytidine deaminases does not explain the inhibition of hepatitis B virus replication by interferons // Journal of Virology. 2007. Vol. 81. № 19. – P. 10588-10596.

63. Kanu, N. DNA replication stress mediates APOBEC3 family mutagenesis in breast cancer // Genome Biology. 2016. Vol. 17. № 1. – P. 185.

64. Karandashov, I. V. Antiviral and Mutagenic Effects of APOBEC Deaminases A3C, A3D, and A3H in a Hepatitis B Virus Model // Biochemistry (Moscow). 2026. Vol. 91. № 2. – P. 289-298.

65. Karihtala, P. The mutational signatures of cancer: can passengers set a direction for prognosis? / P. Karihtala – Text : direct // Oncoscience. 2023. Vol. 10. The mutational signatures of cancer. – P. 54-55.

66. Kim, D. Digenome-seq: genome-wide profiling of CRISPR-Cas9 off-target effects in human cells // Nature Methods. 2015. Vol. 12. Digenome-seq. № 3. – P. 237-243, 1 p following 243.

67. Kim, E.-Y. Human APOBEC3 induced mutation of human immunodeficiency virus type-1 contributes to adaptation and evolution in natural infection // PLoS pathogens. 2014. Vol. 10. № 7. – P. e1004281.

68. Kitamura, K. Uracil DNA glycosylase counteracts APOBEC3G-induced hypermutation of hepatitis B viral genomes: excision repair of covalently closed circular DNA // PLoS pathogens. 2013. Vol. 9. Uracil DNA glycosylase counteracts APOBEC3G-induced hypermutation of hepatitis B viral genomes. № 5. – P. e1003361.

69. Ko, C. Hepatitis B virus genome recycling and de novo secondary infection events maintain stable cccDNA levels // Journal of hepatology. 2018. Vol. 69. № 6. – P. 1231-1241.

70. Köck, J. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner // PLoS pathogens. 2010. Vol. 6. № 9. – P. e1001082.

71. Kohli, R. M. Local sequence targeting in the AID/APOBEC family differentially impacts retroviral restriction and antibody diversification // The Journal of Biological Chemistry. 2010. Vol. 285. № 52. – P. 40956-40964.

72. Kostyushev, D. CRISPR/Cas and Hepatitis B Therapy: Technological Advances and Practical Barriers // Nucleic Acid Therapeutics. 2022. Vol. 32. CRISPR/Cas and Hepatitis B Therapy. № 1. – P. 14-28.

73. Kostyushev, D. Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9 // Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2023. Vol. 31. – P. 482-493.

74. Kostyushev, D. Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus // Cellular and Molecular Life Sciences. 2019. Vol. 76. № 9. – P. 1779-1794.

75. Kostyushev, D. Transient and tunable CRISPRa regulation of APOBEC/AID genes for targeting hepatitis B virus // Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2023. Vol. 32. – P. 478-493.

76. Koumbi, L. Current and future antiviral drug therapies of hepatitis B chronic infection / L. Koumbi – Text : direct // World Journal of Hepatology. 2015. Vol. 7. № 8. – P. 1030-1040.

77. Kouno, T. Crystal structure of APOBEC3A bound to single-stranded DNA reveals structural basis for cytidine deamination and specificity // Nature Communications. 2017. Vol. 8. № 1. – P. 15024.

78. Kuipery, A. Mechanisms of HBV immune evasion / A. Kuipery, A.J. Gehring, M. Isogawa – Text : direct // Antiviral Research. 2020. Vol. 179. – P. 104816.

79. Lackey, L. Subcellular localization of the APOBEC3 proteins during mitosis and implications for genomic DNA deamination // Cell Cycle (Georgetown, Tex.). 2013. Vol. 12. № 5. – P. 762-772.

80. Lai, C.-L. A One-Year Trial of Lamivudine for Chronic Hepatitis B // New England Journal of Medicine. 1998. Vol. 339. № 2. – P. 61-68.

81. Langenbucher, A. An extended APOBEC3A mutation signature in cancer // Nature Communications. 2021. Vol. 12. № 1. – P. 1602.

82. Law, E. K. APOBEC3A catalyzes mutation and drives carcinogenesis in vivo // The Journal of Experimental Medicine. 2020. Vol. 217. № 12. – P. e20200261.

83. Lehle, J. Viral infection, APOBEC3 dysregulation, and cancer // Frontiers in Genetics. 2024. Vol. 15. – P. 1489324.

84. Li, H. Removal of Integrated Hepatitis B Virus DNA Using CRISPR-Cas9 // Frontiers in Cellular and Infection Microbiology. 2017. Vol. 7. – P. 91.

85. Li, Y.-L. The structural basis for HIV-1 Vif antagonism of human APOBEC3G // Nature. 2023. Vol. 615. № 7953. – P. 728-733.

86. Lin, S.-R. The CRISPR/Cas9 System Facilitates Clearance of the Intrahepatic HBV Templates In Vivo // Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2014. Vol. 3. – P. e186.

87. Lin, Y. CRISPR/Cas9 systems have off-target activity with insertions or deletions between target DNA and guide RNA sequences // Nucleic Acids Research. 2014. Vol. 42. № 11. – P. 7473-7485.

88. Liu, Q. Association between APOBEC3H-Mediated Demethylation and Immune Landscape in Head and Neck Squamous Carcinoma // BioMed Research International. 2020. Vol. 2020. – P. 4612375.

89. Locatelli, M. HIRA Supports Hepatitis B Virus Minichromosome Establishment and Transcriptional Activity in Infected Hepatocytes // Cellular and Molecular Gastroenterology and Hepatology. 2022. Vol. 14. № 3. – P. 527-551.

90. Lovšin, N. The Intricate Interplay between APOBEC3 Proteins and DNA Tumour Viruses / N. Lovšin, B. Gangupam, M. Bergant Marušič – Text : direct // Pathogens. 2024. Vol. 13. № 3. – P. 187.

91. Lucifora, J. Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA // Science (New York, N.Y.). 2014. Vol. 343. № 6176. – P. 1221-1228.

92. Lutgehetmann, M. In Vivo Proliferation of Hepadnavirus-Infected Hepatocytes Induces Loss of Covalently Closed Circular DNA in Mice // Hepatology. 2010. Vol. 52. № 1. – P. 16-24.

93. M, D. Epigenetic modulation in chronic hepatitis B virus infection / D. M – Text : direct // Seminars in immunopathology. 2020. Vol. 42. № 2.

94. M, S. Mutational pressure by host APOBEC3s more strongly affects genes expressed early in the lytic phase of herpes simplex virus-1 (HSV-1) and human polyomavirus (HPyV) infection / S. M, K. Lt, M. T – Text : direct // PLoS pathogens. 2021. Vol. 17. № 4.

95. Manjunath, L. APOBEC3B drives PKR-mediated translation shutdown and protects stress granules in response to viral infection // Nature Communications. 2023. Vol. 14. № 1. – P. 820.

96. Marcsisin, S. R. On the solution conformation and dynamics of the HIV-1 viral infectivity factor // Journal of Molecular Biology. 2011. Vol. 410. № 5. – P. 1008-1022.

97. Martinez, M. G. CRISPR-Cas9 Targeting of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Generates Transcriptionally Active Episomal Variants // mBio. 2022. Vol. 13. № 2. – P. e02888-21.

98. Marx, A. Zinc enhancement of cytidine deaminase activity highlights a potential allosteric role of loop-3 in regulating APOBEC3 enzymes / A. Marx, M. Galilee, A. Alian – Text: direct // Scientific Reports. 2015. Vol. 5. № 1. – P. 18191.

99. McDonnell, M. M. Highly-potent, synthetic APOBEC3s restrict HIV-1 through deamination-independent mechanisms // PLoS pathogens. 2021. Vol. 17. № 6. – P. e1009523.

100. Mendenhall, M. A. Hepatitis B Virus Capsid: The Core in Productive Entry and Covalently Closed Circular DNA Formation / M.A. Mendenhall, X. Hong, J. Hu – Text: direct // Viruses. 2023. Vol. 15. Hepatitis B Virus Capsid. № 3. – P. 642.

101. Menendez, D. The Cytidine Deaminase APOBEC3 Family Is Subject to Transcriptional Regulation by p53 // Molecular cancer research: MCR. 2017. Vol. 15. № 6. – P. 735-743.

102. Meshcheryakova, A. AID and APOBECs as Multifaceted Intrinsic Virus-Restricting Factors: Emerging Concepts in the Light of COVID-19 // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 12. AID and APOBECs as Multifaceted Intrinsic Virus-Restricting Factors.

103. Milewska, A. APOBEC3-mediated restriction of RNA virus replication // Scientific Reports. 2018. Vol. 8. № 1. – P. 5960.

104. Mussil, B. Human APOBEC3A isoforms translocate to the nucleus and induce DNA double strand breaks leading to cell stress and death // PloS One. 2013. Vol. 8. № 8. – P. e73641.

105. Mutz, P. HBV Bypasses the Innate Immune Response and Does Not Protect HCV From Antiviral Activity of Interferon // Gastroenterology. 2018. Vol. 154. № 6. – P. 1791-1804.e22.

106. Naeem, M. Latest Developed Strategies to Minimize the Off-Target Effects in CRISPR-Cas-Mediated Genome Editing // Cells. 2020. Vol. 9. № 7. – P. 1608.

107. Nair, S. Asymmetric Modification of Hepatitis B Virus (HBV) Genomes by an Endogenous Cytidine Deaminase inside HBV Cores Informs a Model of Reverse Transcription / S. Nair, A. Zlotnick – Text: direct // Journal of Virology. 2018. Vol. 92. № 10. – P. e02190-17.

108. Nakauma-González, J. A. Whole-genome mapping of APOBEC mutagenesis in metastatic urothelial carcinoma identifies driver hotspot mutations and a novel mutational signature // Cell Genomics. 2024. Vol. 4. № 4. – P. 100528.

109. Narvaiza, I. APOBEC3 proteins and genomic stability / I. Narvaiza, S. Landry, M.D. Weitzman – Text : direct // Cell Cycle. 2012. Vol. 11. № 1. – P. 33-38.

110. Ng, J. C. F. Pan-cancer transcriptomic analysis dissects immune and proliferative functions of APOBEC3 cytidine deaminases // Nucleic Acids Research. 2019. Vol. 47. № 3. – P. 1178-1194.

111. Ng, J. C.-F. Understanding the structural details of APOBEC3-DNA interactions using graph-based representations / J.C.-F. Ng, F. Fraternali – Text: direct // Current Research in Structural Biology. 2020. Vol. 2. – P. 130-143.

112. Nguyen, D. H. Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G / D.H. Nguyen, S. Gummuluru, J. Hu – Text: direct // Journal of Virology. 2007. Vol. 81. № 9. – P. 4465-4472.

113. Ni, J. Continuous Blood purification on Influenza-Associated Neurological Disease in children: a retrospective cohort study // BMC Infectious Diseases. 2021. Vol. 21. Continuous Blood purification on Influenza-Associated Neurological Disease in children. № 1. – P. 673.

114. Nikkilä, J. Elevated APOBEC3B expression drives a kataegic-like mutation signature and replication stress-related therapeutic vulnerabilities in p53-defective cells // British Journal of Cancer. 2017. Vol. 117. № 1. – P. 113-123.

115. Ortega, P. Mechanism of DNA replication fork breakage and PARP1 hyperactivation during replication catastrophe // Science Advances. 2025. Vol. 11. № 16. – P. eadu0437.

116. Periyasamy, M. Induction of APOBEC3B expression by chemotherapy drugs is mediated by DNA-PK-directed activation of NF-κB // Oncogene. 2021. Vol. 40. № 6. – P. 1077-1090.

117. Petit, V. Powerful mutators lurking in the genome / V. Petit, J.-P. Vartanian, S. Wain-Hobson – Text : direct // Philosophical Transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences. 2009. Vol. 364. № 1517. – P. 705-715.

118. Petljak, M. Molecular origins of APOBEC-associated mutations in cancer / M. Petljak, J. Maciejowski – Text : direct // DNA repair. 2020. Vol. 94. – P. 102905.

119. Pham, P. Activation-induced deoxycytidine deaminase: structural basis favoring WRC hot motif specificities unique among APOBEC family members // DNA repair. 2017. Vol. 54. Activation-induced deoxycytidine deaminase. – P. 8-12.

120. Pham, P. Structural analysis of the activation-induced deoxycytidine deaminase required in immunoglobulin diversification // DNA repair. 2016. Vol. 43. – P. 48-56.

121. Pillai, S. K. Turning up the volume on mutational pressure: Is more of a good thing always better? (A case study of HIV-1 Vif and APOBEC3) / S.K. Pillai, J.K. Wong, J.D. Barbour – Text: direct // Retrovirology. 2008. Vol. 5. Turning up the volume on mutational pressure. – P. 26.

122. Polaris Observatory Collaborators. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016: a modelling study / Polaris Observatory Collaborators – Text: direct // The Lancet. Gastroenterology & Hepatology. 2018. Vol. 3. Global prevalence, treatment, and prevention of hepatitis B virus infection in 2016. № 6. – P. 383-403.

123. Ponomarev, G. V. APOBEC mutagenesis is low in most types of non-B DNA structures // iScience. 2022. Vol. 25. № 7. – P. 104535.

124. Ramanan, V. CRISPR/Cas9 cleavage of viral DNA efficiently suppresses hepatitis B virus // Scientific Reports. 2015. Vol. 5. № 1. – P. 10833.

125. Russell, R. A. APOBEC3G induces a hypermutation gradient: purifying selection at multiple steps during HIV-1 replication results in levels of G-to-A mutations that are high in DNA, intermediate in cellular viral RNA, and low in virion RNA // Retrovirology. 2009. Vol. 6. APOBEC3G induces a hypermutation gradient. – P. 16.

126. S, V. Induction of APOBEC3 Exacerbates DNA Replication Stress and Chromosomal Instability in Early Breast and Lung Cancer Evolution // Cancer discovery. 2021. Vol. 11. № 10.

127. Sakofsky, C. J. Break-induced replication is a source of mutation clusters underlying kataegis // Cell Reports. 2014. Vol. 7. № 5. – P. 1640-1648.

128. Salamango, D. J. HIV-1 Vif Triggers Cell Cycle Arrest by Degrading Cellular PPP2R5 Phospho-regulators // Cell Reports. 2019. Vol. 29. № 5. – P. 1057-1065.e4.

129. Salter, J. D. The APOBEC Protein Family: United by Structure, Divergent in Function / J.D. Salter, R.P. Bennett, H.C. Smith – Text: direct // Trends in Biochemical Sciences. 2016. Vol. 41. The APOBEC Protein Family. № 7. – P. 578-594.

130. Salter, J. D. Structural insights for HIV-1 therapeutic strategies targeting Vif / J.D. Salter, G.A. Morales, H.C. Smith – Text: direct // Trends in Biochemical Sciences. 2014. Vol. 39. № 9. – P. 373-380.

131. Salter, J. D. Modeling the Embrace of a Mutator: APOBEC Selection of Nucleic Acid Ligands / J.D. Salter, H.C. Smith – Text: direct // Trends in Biochemical Sciences. 2018. Vol. 43. Modeling the

Embrace of a Mutator. № 8. – P. 606-622.

132. Sanchez, A. Mesoscale DNA features impact APOBEC3A and APOBEC3B deaminase activity and shape tumor mutational landscapes // Nature Communications. 2024. Vol. 15. № 1. – P. 2370.

133. Sato, K. Remarkable lethal G-to-A mutations in vif-proficient HIV-1 provirus by individual APOBEC3 proteins in humanized mice // Journal of Virology. 2010. Vol. 84. № 18. – P. 9546-9556.

134. Schädler, S. HBV life cycle: entry and morphogenesis / S. Schädler, E. Hildt – Text: direct // Viruses. 2009. Vol. 1. HBV life cycle. № 2. – P. 185-209.

135. Scheving, L. A. Loss of hepatocyte ERBB3 but not EGFR impairs hepatocarcinogenesis // American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology. 2015. Vol. 309. № 12. – P. G942-G954.

136. Schutsky, E. K. APOBEC3A efficiently deaminates methylated, but not TET-oxidized, cytosine bases in DNA // Nucleic Acids Research. 2017. Vol. 45. № 13. – P. 7655-7665.

137. Seeger, C. Complete Spectrum of CRISPR/Cas9-induced Mutations on HBV cccDNA / C. Seeger, J.A. Sohn – Text: direct // Molecular Therapy. 2016. Vol. 24. № 7. – P. 1258-1266.

138. Seeger, C. Targeting Hepatitis B Virus With CRISPR/Cas9 / C. Seeger, J.A. Sohn – Text: direct // Molecular Therapy - Nucleic Acids. 2014. Vol. 3. – P. e216.

139. Seplyarskiy, V. B. APOBEC-induced mutations in human cancers are strongly enriched on the lagging DNA strand during replication // Genome Research. 2016. Vol. 26. № 2. – P. 174-182.

140. Sepúlveda-Yáñez, J. H. Tandem Substitutions in Somatic Hypermutation // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 12. – P. 807015.

141. Serrano-Benitez, A. Unrepaired base excision repair intermediates in template DNA strands trigger replication fork collapse and PARP inhibitor sensitivity // The EMBO journal. 2023. Vol. 42. № 18. – P. e113190.

142. Shen, J. APOBEC3-related mutations in the spike protein-encoding region facilitate SARS-CoV-2 evolution // Heliyon. 2024. Vol. 10. № 11. – P. e32139.

143. Sheraz, M. Cellular DNA Topoisomerases Are Required for the Synthesis of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA // Journal of Virology. 2019. Vol. 93. № 11. – P. e02230-18.

144. Silvas, T. V. Substrate sequence selectivity of APOBEC3A implicates intra-DNA interactions // Scientific Reports. 2018. Vol. 8. № 1. – P. 7511.

145. Simmonds, P. Rampant C→U Hypermutation in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses: Causes and Consequences for Their Short- and Long-Term Evolutionary Trajectories / P. Simmonds – Text: direct // mSphere. 2020. Vol. 5. Rampant C→U Hypermutation in the Genomes of SARS-CoV-2 and Other Coronaviruses. № 3. – P. e00408-20.

146. Smith, N. J. Differentiation signals induce APOBEC3A expression via GRHL3 in squamous

epithelia and squamous cell carcinoma // The EMBO journal. 2025. Vol. 44. № 1. – P. 1-29.

147. Snell, L. M. Type I Interferon in Chronic Virus Infection and Cancer / L.M. Snell, T.L. McGaha, D.G. Brooks – Text: direct // Trends in Immunology. 2017. Vol. 38. № 8. – P. 542-557.

148. Song, H. Editorial: Interferon and its antiviral effect in response to HBV infection // Frontiers in Immunology. 2023. Vol. 14. Editorial. – P. 1135649.

149. Stavrou, S. APOBEC3 Proteins in Viral Immunity / S. Stavrou, S.R. Ross – Text : direct // Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950). 2015. Vol. 195. № 10. – P. 4565-4570.

150. Steele, E. J. Deaminase-Driven Reverse Transcription Mutagenesis in Oncogenesis: Critical Analysis of Transcriptional Strand Asymmetries of Single Base Substitution Signatures / E.J. Steele, R.A. Lindley – Text: direct // International Journal of Molecular Sciences. 2025. Vol. 26. Deaminase-Driven Reverse Transcription Mutagenesis in Oncogenesis. № 3. – P. 989.

151. Stone, D. Genome editing and the next generation of antiviral therapy / D. Stone, N. Niyonzima, K.R. Jerome – Text: direct // Human genetics. 2016. Vol. 135. № 9. – P. 1071-1082.

152. Suspène, R. Extensive editing of both hepatitis B virus DNA strands by APOBEC3 cytidine deaminases *in vitro* and *in vivo* // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2005. Vol. 102. № 23. – P. 8321-8326.

153. Swanton, C. APOBEC Enzymes: Mutagenic Fuel for Cancer Evolution and Heterogeneity // Cancer Discovery. 2015. Vol. 5. APOBEC Enzymes. № 7. – P. 704-712.

154. Swarts, D. C. Cas9 versus Cas12a/Cpf1: Structure-function comparisons and implications for genome editing / D.C. Swarts, M. Jinek – Text: direct // Wiley interdisciplinary reviews. RNA. 2018. Vol. 9. Cas9 versus Cas12a/Cpf1. № 5. – P. e1481.

155. Talluri, S. Dysregulated APOBEC3G causes DNA damage and promotes genomic instability in multiple myeloma // Blood Cancer Journal. 2021. Vol. 11. № 10. – P. 166.

156. Taura, M. APOBEC3A regulates transcription from interferon-stimulated response elements // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2022. Vol. 119. № 20. – P. e2011665119.

157. Taylor, B. J. DNA deaminases induce break-associated mutation showers with implication of APOBEC3B and 3A in breast cancer kataegis // eLife. 2013. Vol. 2. – P. e00534.

158. Tornesello, M. L. TP53 mutations in cancer: Molecular features and therapeutic opportunities (Review) / M.L. Tornesello – Text: direct // International Journal of Molecular Medicine. 2025. Vol. 55. TP53 mutations in cancer. № 1. – P. 7.

159. Trono, D. Retroviruses under editing crossfire / D. Trono – Text : direct // EMBO Reports. 2004. Vol. 5. № 7. – P. 679-680.

160. Tropberger, P. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2015. Vol. 112. № 42.

161. Tsugawa, Y. Critical Role of Interferon-α Constitutively Produced in Human Hepatocytes in Response to RNA Virus Infection // PLoS ONE. 2014. Vol. 9. № 2. – P. e89869.

162. Turelli, P. APOBEC3-independent interferon-induced viral clearance in hepatitis B virus transgenic mice // Journal of Virology. 2008. Vol. 82. № 13. – P. 6585-6590.

163. Vartanian, J.-P. Massive APOBEC3 editing of hepatitis B viral DNA in cirrhosis // PLoS pathogens. 2010. Vol. 6. № 5. – P. e1000928.

164. Vitiello, G. A. F. Antiviral Responses in Cancer: Boosting Antitumor Immunity Through Activation of Interferon Pathway in the Tumor Microenvironment // Frontiers in Immunology. 2021. Vol. 12. Antiviral Responses in Cancer. – P. 782852.

165. Wang, H. Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3: implications for immune evasion / H. Wang, W.-S. Ryu – Text: direct // PLoS pathogens. 2010. Vol. 6. Hepatitis B virus polymerase blocks pattern recognition receptor signaling via interaction with DDX3. № 7. – P. e1000986.

166. Wang, J. Cell-type-specific expression analysis of liver transcriptomics with clinical parameters to decipher the cause of intrahepatic inflammation in chronic hepatitis B // iMeta. 2024. Vol. 3. № 4. – P. e221.

167. Wang, J. Dual gRNAs guided CRISPR/Cas9 system inhibits hepatitis B virus replication // World Journal of Gastroenterology. 2015. Vol. 21. № 32. – P. 9554-9565.

168. Wang, T. 7SL RNA mediates virion packaging of the antiviral cytidine deaminase APOBEC3G // Journal of Virology. 2007. Vol. 81. № 23. – P. 13112-13124.

169. Wei, L. Hepatitis B virus cccDNA is formed through distinct repair processes of each strand / L. Wei, A. Ploss – Text: direct // Nature Communications. 2021. Vol. 12. № 1. – P. 1591.

170. Wei, L. Mechanism of Hepatitis B Virus cccDNA Formation / L. Wei, A. Ploss – Text : direct // Viruses. 2021. Vol. 13. № 8. – P. 1463.

171. Werle–Lapostolle, B. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy // Gastroenterology. 2004. Vol. 126. № 7. – P. 1750-1758.

172. Wieland, S. F. Stealth and Cunning: Hepatitis B and Hepatitis C Viruses / S.F. Wieland, F.V. Chisari – Text: direct // Journal of Virology. 2005. Vol. 79. Stealth and Cunning. № 15. – P. 9369-9380.

173. Willems, L. APOBEC3 Interference during Replication of Viral Genomes / L. Willems, N.A. Gillet – Text: direct // Viruses. 2015. Vol. 7. № 6. – P. 2999-3018.

174. World Health organization. Global hepatitis report 2017 / World Health organization World Health Organization, 2017. p.– ISBN 92-4-156545-4. – Text: direct.

175. Xia, Y. Hepatitis B virus cccDNA: Formation, regulation and therapeutic potential / Y. Xia, H. Guo – Text: direct // Antiviral Research. 2020. Vol. 180. Hepatitis B virus cccDNA. – P. 104824.

176. Xu, W. K. The Role of APOBECs in Viral Replication / W.K. Xu, H. Byun, J.P. Dudley – Text : direct // Microorganisms. 2020. Vol. 8. № 12. – P. 1899.

177. Yaacov, A. Cancer mutational signatures identification in clinical assays using neural embedding-based representations // Cell Reports. Medicine. 2024. Vol. 5. № 6. – P. 101608.

178. Yang, J. Preferential CEBP binding to T:G mismatches and increased C-to-T human somatic mutations // Nucleic Acids Research. 2021. Vol. 49. Preferential CEBP binding to T. № 9. – P. 5084-5094.

179. Yang, X. The Mechanism of APOBEC3B in Hepatitis B Virus Infection and HBV Related Hepatocellular Carcinoma Progression, Therapeutic and Prognostic Potential / X. Yang, H. Wang, C. Yu – Text : direct // Infection and Drug Resistance. 2024. Vol. 17. – P. 4477-4486.

180. You, H. Regulation of Pattern-Recognition Receptor Signaling by HBX During Hepatitis B Virus Infection // Frontiers in Immunology. 2022. Vol. 13. – P. 829923.

181. Zai, W. Optimized RNA interference therapeutics combined with interleukin-2 mRNA for treating hepatitis B virus infection // Signal Transduction and Targeted Therapy. 2024. Vol. 9. № 1. – P. 150.

182. Zeng, W. Engineered extracellular vesicles for delivering functional Cas9/gRNA to eliminate hepatitis B virus cccDNA and integration // Emerging Microbes & Infections. 2024. Vol. 13. № 1. – P. 2284286.

183. Zhang, H. Host 3’ flap endonuclease Mus81 plays a critical role in trimming the terminal redundancy of hepatitis B virus relaxed circular DNA during covalently closed circular DNA formation // PLoS pathogens. 2025. Vol. 21. № 2. – P. e1012918.

184. Zhang, Y. Roles of APOBEC3 in hepatitis B virus (HBV) infection and hepatocarcinogenesis // Bioengineered. Vol. 12. № 1. – P. 2074-2086.

185. Zhao, D. APOBEC3G directly binds Hepatitis B virus core protein in cell and cell free systems // Virus Research. 2010. Vol. 151. № 2. – P. 213-219.

186. Zheng, Q. Efficient inhibition of duck hepatitis B virus DNA by the CRISPR/Cas9 system // Molecular Medicine Reports. 2017. Vol. 16. № 5. – P. 7199-7204.

187. Zou, J. APOBEC3B, a molecular driver of mutagenesis in human cancers // Cell & Bioscience. 2017. Vol. 7. № 1. – P. 29.

188. Zuo, T. Small-molecule inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by targeting the interaction between Vif and ElonginC // Journal of Virology. 2012. Vol. 86. № 10. – P. 5497-5507.

ПРИЛОЖЕНИЕ А. СПИСОК ПРАЙМЕРОВ И ЗОНДОВ

Таблица 1. Список праймеров и зондов.

Праймер	**Последовательность 5’ → 3’**
ккзДНК_fw	CCGTGTGCACTTCGCTTCA
ккзДНК_rev	GCACAGCTTGGAGGCTTGA
ккзДНК_probe	(FAM)-CATGGAGACCACCGTGAACGCCC-(BHQ1)
ВГВ DNA	AmpliSens® ВГВ Monitor-FL
ВГВ DNA	AmpliSens® ВГВ Monitor-FL
ВГВ DNA	AmpliSens® ВГВ Monitor-FL
pgRNA fw	GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT
pgRNA rev	CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT
pgRNA_probe	(FAM)-TCTCAATCGCCGCGTCGCAGA-(BHQ1)
Gapdh fw	CAACGGATTTGGTCGTATTGG
Gapdh rev	GCAACAATATCCACTTTACCAGAGTTAA
Gapdh probe	(FAM)-CGCCTGGTCACCAGGGCTGC-(BHQ1)
β-glob fw	V31-FEP-CE - AmpliSens® HPV HCR-Screen

β-glob rev	V31-FEP-CE - AmpliSens® HPV HCR-Screen
β-glob_probe	V31-FEP-CE - AmpliSens® HPV HCR-Screen
mRNA_APOBEC3A fw	AGATGGAGTCTGGTACTGTCG
mRNA_APOBEC3A rev	GAGGCAGGAGAGTAGCGT
mRNA_APOBEC3B fw	GACCCTTTGGTCCTTCGAC
mRNA_APOBEC3B rev	GCACAGCCCCAGGAGAAG
rtA3C_fw	ACCTATGGGAAGCCAACGAT
rtA3C_rev	AGAGAGGAAGCACCTTTCTGC
sgA3C_fw	TTTCTCCGGGCCCCTCCTACGTTTTAGAGCTAGAAATAG
sgA3C_rev	GTAGGAGGGGCCCGGAGAAACGGTGTTTCGTCCTTTC
rtA3D_f	ACCCAAACGTCAGTCGAATC
rtA3D_rev	CACATTTCTGCGTGGTTCTC
sgA3D_f	CATGACTACGAGGCCCTGGGGTTTTAGAGCTAGAAATAG
sgA3D_rev	CCCAGGGCCTCGTAGTCATGCGGTGTTTCGTCCTTTC
rtA3H_fw	AGCTGTGGCCAGAAGCAC

rtA3H_rev	CGGAATGTTTCGGCTGTT
sgA3H_fw	TTCCTTTTGTGGGACTGGAGGTTTTAGAGCTAGAAATAG
sgA3H_rev	CTCCAGTCCCACAAAAGGAACGGTGTTTCGTCCTTTC
3D_cccDNA_fw	GCCTATTGATTGGAAAGTATGT
3D_cccDNA_rev	AGCTGAGGCGGTATCTA
3D_HBxin_fw	ATGGCTGCTAGGCTGTGCTGCCAA
3D_HBxin_rev	AAGTGCACACGGTYYGGCAGAT
cccDNA_fw	CCGTGTGCACTTCGCTTCA
cccDNA_rev	GCACAGCTTGGAGGCTTGA
cccDNA_probe	(FAM)-CATGGAGACCACCGTGAACGCCC-(BHQ1)
3D_off-target ARID1_off fw	AGGCCCGCCCTGAACAATAA
3D_off-target ARID1_off rev	AGGCCCGCCCTGAACAATAA
3D_off-target ARID2_off fw	ACGAGCGGAGAAAGGGACTC
3D_off-target ARID2_off rev	CCTTCGCGAATCCGCCTAAA
3D_off-target PAX5_off fw	GCCGCCCCAGACTTTTATAGG

3D_off-target PAX5_off rev	CGTCTAAGCAGCGGGGTTT
MTATP8P1_ext_f	AGCCATACACAACACTAAGGG
MTATP8P1_ext_r	ATGTGTTGTCGTGCAGGTAG
MTATP8P1_int_f	AGCGGGCGCAGTGATTAT
MTATP8P1_int_r	GGTGGCCTGCAGTAATGTT
7SK_ext_f	CCTGCTGAAGCTCTAGTACG
7SK_ext_r	CACATGCAGCGCCTCATTTG
7SK_int_f	ATATAGCTTGTGCGCCGCTT
7SK_int_r	TTGGAGGTTCTAGCAGGGGA
CD63_ext_f	GCCCTTCCCATTATTCCCTG
CD63_ext_r	GATGGGGTCAAGTCTGTGTC
CD63_int_f	AAAGATGGCAAACTGCAGGA
CD63_int_r	CTCTTCCTGGTGGCTTTTGT
TP53new_ext_f	ACTCGGATAAGATGCTGAGGA
TP53new_ext_r	GCCCTGACTTTCAACTCTGT

TP53new_int_f	GGCCAGACCTAAGAGCAATC
TP53new_int_r	CATGGCCATCTACAAGCAGT
RNU6-1_ext_f	CCCACCTCCTTCTATTCCGT
RNU6-1_ext_r	GGGGATCAGCGTTTGAGTAA
RNU6-1_int_f	GTGTTTCGTCCTTTCCACAAG
RNU6-1_int_r	GAGGGCCTATTTCCCATGAT
GH1_ext_f	CGTCCTCCTGCTGGTATAGTT
GH1_ext_r	GGAACAGTACCCAAGCGCTT
GH1_int_f	TTAGCTGAGCCTGGTCATGC
GH1_int_r	TTGTCTGACTAGGTGTCCTTCT
MUC12_ext_f	CAACACTCTCACCTGCCAGT
MUC12_ext_r	TGTTGACCAAGGGATGAGGC
MUC12_int_f	TCCCACAACACCAAGCCTC
MUC12_int_r	AGTGTTGCCTCTGTTGAGCC
DUX4L17_ext_f	CCGTAGGCAGAGCATAGACAA

DUX4L17_ext_r	GCGGCTCTTATAAAGGCACG
DUX4L17_int_f	ATGGTGCCTTCGCTCTCCTT
DUX4L17_int_r	GGTGGAGGGGAGTTTGGAAC