На правах рукописи

ТИХОНОВ АНДРЕЙ СЕРГЕЕВИЧ

РОЛЬ КОЛЬЦЕВОЙ ЧАСТИЧНО ДВУЦЕПОЧЕЧНОЙ ДНК В ОГРАНИЧЕНИИ ПРОТИВОВИРУСНОЙ И ДЕЗАМИНИРУЮЩЕЙ АКТИВНОСТИ ЦИТИДИН-ДЕЗАМИНАЗ APOBEC/AID

1.5.4 — Биохимия

1.5.3 — Молекулярная биология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени

кандидата биологических наук

Москва - 2026

Диссертация выполнена на кафедре биохимии им. Т.Т. Берёзова ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»

Научные руководители:	**Покровский Вадим Сергеевич** доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой биохимии им. Т.Т. Берёзова ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы»
	Костюшев Дмитрий Сергеевич доктор биологических наук, профессор кафедры биотехнологии Института фармации им. А.П. Нелюбина ФГАОУ ВО Первый МГМУ имени И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский Университет)
Официальные оппоненты:	**Манухов Илья Владимирович** доктор биологических наук, заведующий лабораторией молекулярной генетики ФГАОУ ВО «Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет)»
	Филипенко Максим Леонидович доктор биологических наук, заведующий лабораторией фармакогеномики ФГБУН «Институт химической биологии и фундаментальной медицины им. Д.Г. Кнорре» СО РАН
Ведущая организация:	ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

Защита диссертации состоится «18» декабря 2026 г. в 14:00 часов на заседании диссертационного совета ПДС 0300.025 при ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы», по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

С диссертацией можно ознакомиться в читальном зале УНИБЦ (Научная библиотека) ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы» 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6.

Электронные версии диссертации и автореферата размещены на сайте РУДН по адресу: https://www.rudn.ru/science/dissovet и отправлены для размещения на официальном сайте ВАК при Минобрнауки России: https://vak.minobrnauki.gov.ru

Автореферат разослан «» 2026 г.

Учёный секретарь диссертационного совета ПДС 0300.025
доктор биологических наук, профессор — Лукашева Е. В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования и степень ее разработанности

Хронический гепатит В (ХГВ) представляет одну из наиболее острых проблем современного здравоохранения. По данным Всемирной организации здравоохранения, в мире насчитывается более 240 миллионов человек, инфицированных вирусом гепатита В (ВГВ), при этом инфекция ВГВ является одной из основных причин развития цирроза и гепатоцеллюлярной карциномы, а ежегодная смертность от осложнений ХГВ составляет около 1 млн человек. Существующие противовирусные препараты, аналоги нуклеозидов/нуклеотидов (ламивудин, энтекавир, тенофовир), интерферон-α и ингибиторы входа (булевиртид), эффективно подавляют репликацию вируса в цитоплазме, однако не способны элиминировать внутриядерный резервуар ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК), который обеспечивает хроническую персистенцию вируса и служит причиной вирусологических рецидивов при отмене терапии. ккзДНК формируется в ядре инфицированных гепатоцитов путём репарации кольцевой частично двуцепочечной ДНК (кчдДНК) — продукта обратной транскрипции прегеномной РНК (пгРНК) в цитоплазме; уровни цитоплазматической кчдДНК в активно инфицированных клетках достигают 10^6–10^7 копий на клетку, превышая содержание ядерной ккзДНК на несколько порядков, однако её роль как потенциального молекулярного субстрата, способного конкурировать с ккзДНК за действие факторов врождённого иммунитета, оставалась неизученной.

Цитидин-дезаминазы семейства APOBEC/AID (A3A, A3B, AID и др.) являются важными факторами врождённого иммунитета и способны вызывать мутационную инактивацию вирусной ДНК за счёт дезаминирования цитидинов с образованием замен C→T/G→A. Показано, что A3A, A3B и AID могут индуцировать гиперредактирование и деградацию ккзДНК ВГВ, что позволяет рассматривать их как перспективные агенты для лечения ХГВ, обеспечить их контролируемую экспрессию возможно методами CRISPR-активации. В то же время A3A и A3B связаны с онкогенными мутационными сигнатурами SBS2 и SBS13 в различных опухолях человека, что актуализирует проблему потенциальных рисков стратегий, основанных на терапевтической активации APOBEC/AID. До настоящего исследования оставались неясными механизмы поддержания стабильного пула ккзДНК в условиях активной экспрессии цитидиндезаминаз, взаимодействие APOBEC/AID с кчдДНК, роль кчдДНК как субстрата-«ловушки», возможность упаковки дезаминаз в вирионы ВГВ и особенности внецелевого мутагенеза в инфицированных ВГВ клетках при различных уровнях вирусной

репликации, что существенно ограничивало возможности рациональной разработки подобных противовирусных подходов.

Цель исследования

Изучить роль кольцевой частично двуцепочечной ДНК в ограничении противовирусной и дезаминирующей активности цитидиндезаминаз 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 двуцепочечной 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 двуцепочечной 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

Впервые идентифицирован механизм «фоновой защиты» ВГВ (механизм «молекулярной ловушки»), при котором избыток кчдДНК конкурентно насыщает APOBEC/AID-дезаминазы, защищая ккзДНК от мутационной инактивации. Продемонстрировано, что гиперметилированная (транскрипционно инактивированная) ккзДНК подвергается более интенсивному дезаминированию цитидин-дезаминазами, чем транскрипционно активная форма. Впервые создана экспериментальная модель с трансфекцией кчдДНК, изолированной из очищенных вирионов ВГВ, в клетки человека, позволяющая напрямую тестировать субстратную конкуренцию между кчдДНК и ккзДНК. Изучено влияние APOBEC/AID-дезаминаз на клетках человека с естественной инфекцией ВГВ при фармакологической (аналоги нуклеотидов) и молекулярно-биологической (РНК-интерференция) блокаде синтеза кчдДНК. Была установлена анти-мутагенная активность ВГВ, которая проявляется в виде обратной зависимости между уровнями вирусной репликации и степенью внецелевого

мутагенеза генома хозяина. Снижение пула кчдДНК при подавлении репликации ВГВ приводит к дезаминированию онкосупрессора *TP53* и других генов клетки фактором A3A. Впервые показано, что белки A3A упаковывается в нуклеокапсиды ВГВ, что формирует дополнительный компартмент связывания кчдДНК внутри вирионов. Методом ChIP-Seq картировано взаимодействие белков A3A и A3B с хроматином инфицированных ВГВ при активной репликации вируса и в условиях подавления образования кчдДНК. Впервые охарактеризована противовирусная активность A3C, A3D и A3H на инфекционной модели ВГВ: показана их способность подавлять репликацию вируса и дезаминировать кчдДНК без индукции мутагенеза в онкогенах.

Теоретическая и практическая значимость

Полученные результаты раскрывают принципиально новый аспект взаимодействия вирусов, в частности, ВГВ с системой врождённого иммунитета — механизм «конкурентного насыщения» цитидиндезаминаз избытком вирусного генома — кчдДНК. Это открытие меняет концептуальное представление об избегании и противодействии иммунному ответу ВГВ, переориентирует подходы к терапевтической активации APOBEC/AID и указывает на необходимость учёта пула кчдДНК при разработке стратегий направленной элиминации ккзДНК.

Практическая значимость работы обусловлена нарастающим риском мутагенеза в геноме инфицированных клеток при активации A3A на фоне применения аналогов нуклеозидов/нуклеотидов и инструментов подавления вирусной репликации. Этот факт определяет существенный недостаток подходов к лечению ВГВ-инфекции на основе цитидин-дезаминаз. Идентифицированы относительно безопасные члены семейства APOBEC3 (A3C, A3D, A3H), не вызывающие внецелевого дезаминирования генома человека, что открывает перспективу создания противовирусных инструментов с приемлемым профилем безопасности, которые могут лечь в основу комбинированных подходов к лечению ВГВ-инфекции.

Разработанные экспериментальные модели и аналитические подходы внедрены в научно-исследовательскую деятельность Института медицинской паразитологии и тропической медицины имени Е.И. Марциновского Сеченовского Университета.

Методология и методы исследования

В работе использованы культуральные, молекулярно-биологические, биохимические и молекулярно-генетические методы. В ходе исследования были разработаны новые экспериментальные модели, включая модели с транзиентно гиперэкспрессированными

APOBEC/AID-дезаминазами на основе гиперметилированных форм ДНК вируса, а также впервые создана модель с трансфекцией кчдДНК, изолированной из вирионов ВГВ, в клетки человека.

Основные экспериментальные системы: клетки HepG2, трансфицированные рекомбинантной ккзДНК (рккзДНК), полученной с помощью технологии миникольцевых ДНК; клетки HepaRG-hNTCP, инфицированные природным ВГВ; очищенные вирионы ВГВ. Активацию APOBEC/AID проводили методом направленной CRISPR-активации (CRISPRa) с использованием рибонуклеопротеиновых комплексов dCas9-p300 и специфических sgRNA; подавление репликации проводили ламивудином и shRNA против X-гена ВГВ. Дезаминирование вирусной ДНК и генома хозяина оценивали методами дифференциальной денатурационной ПЦР (3Д-ПЦР) и высокопроизводительного секвенирования на платформе DNBSEQ (прибор DNBSEQ-G50, MGI Tech) в режиме парноконцевых прочтений PE100. Взаимодействие белков APOBEC3 с хроматином картировали методом ChIP-Seq. Уровни вирусного антигена HBsAg определяли методом ИФА; экспрессию белков — вестерн-блот анализом; экспрессию мРНК — методом qRT-PCR. Статистическую обработку результатов проводили в программном обеспечении R (версия 4.1.2) в среде RStudio с применением критерия Стьюдента, однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Тьюки; порог статистической значимости $p < 0,01$.

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 двуцепочечной 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.

Степень достоверности и апробация результатов работы

Эксперименты выполнены на сертифицированном оборудовании; результаты подтверждены независимыми биологическими повторностями и методами взаимного контроля (3Д-ПЦР, NGS, ChIP-Seq, qPCR, ИФА, вестерн-блот). Статистический анализ проведён с применением критерия Стьюдента, однофакторного и двухфакторного дисперсионного анализа (ANOVA) с тестом Тьюки при пороге значимости $p < 0,01$; расчёты выполнены в программном обеспечении R версии 4.1.2 в среде RStudio.

По материалам диссертации опубликовано 7 работ в рецензируемых научных изданиях, индексируемых в международных базах данных Web of Science и Scopus, в том числе 7 — в журналах, рекомендованных ВАК при Минобрнауки России. Основные результаты доложены на 10 международных и всероссийских научных конференциях в 2024–2025 гг..

Соискатель лично проводил все ключевые этапы работы, от анализа литературных данных и планирования экспериментальной части до разработки методик, обработки и интерпретации полученных данных.

Соответствие паспорту 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».

Объём и структура диссертации

Диссертационная работа на соискание ученой степени кандидата биологических наук изложена на 117 страницах и состоит из введения, литературного обзора, материалов и методов, результатов собственных исследований, заключения, выводов, списков сокращений и литературы, а также приложения. Работа иллюстрирована 12 рисунками и 1 таблицей. Список литературы содержит 188 источников.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Клеточные линии. В работе использовали клеточные линии HepG2, HepG2-hNTCP (с экспрессией рецептора NTCP) и HepaRG-hNTCP, культивируемые в среде DMEM (4,5 г/л глюкозы) с 10% FBS (Gibco), 2 мМ L-глутамина, пенициллином и стрептомицином при 37°C, 5% CO_2; для заражения вирусом гепатита B клетки HepG2-hNTCP или HepaRG-hNTCP культивировали в среде Williams E с добавками GlutaMAX, FetalClone II, ДМСО и ПЭГ-8000.

Получение рккзДНК. Модельную ккзДНК вируса гепатита B получали с использованием технологии minicircle DNA: конструкции клонировали в вектор pMC.BESXP с сайтами attB/attP по технологии In-Fusion HD Cloning Kit (Clontech, Takara Bio), рекомбинацию проводили в E.

coli ZYCY10P3S2T в среде Terrific Broth при 37°C до OD 6–8, после чего индуцировали рекомбинацию раствором арабинозы. рккзДНК очищали с помощью Plasmid Maxi Kit (Qiagen); параллельно готовили метилированную форму (мет-рккзДНК) с использованием метилтрансферазы M.SssI (New England Biolabs) для метилирования CpG-сайтов с верификацией гидролизом BstUI.

Трансфекция. Плазмиды, кодирующие деаминазы APOBEC/AID (A3A, A3B, A3C, A3D, A3H, AID), а также компоненты систем CRISPR активации (dCas9 с трансактиватором p300, и sgRNA), вводили в виде плазмид в клетки методом трансфекции с Lipofectamine 3000 (Invitrogen/Life Technologies), либо в виде рибонуклеопротеиновых компллксов (РНП) методом электропорации, с использованием прибора Gene Pulser Xcell (Bio-Rad). Для системы CRISPRa использовали дозы 200 нг dCas9-p300, 100 нг sgRNA на лунку 96 луночного планшета; эффективность активации верифицировали методом qRT-PCR (кратность индукции 2–20-кратная). Нокдаун белка HBx проводили с помощью shRNA (последовательность: 5'-GCGACGCCTGCTGCGCGAGG-3', Integrated DNA Technologies) с котрансфекцией Lipofectamine 3000.

In vitro транскрипция. Направляющие РНК (sgRNA) синтезировали методом транскрипции *in vitro* (IVT) с использованием набора HiScribe Quick T7 High Yield RNA Synthesis Kit (New England Biolabs); матрицу получали ПЦР-амплификацией с праймерами ultramerT7f/ultramerSt1r и полимеразой Q5 (NEB). Полученные РНК хранили при −80°C.

Получение рекомбинантного белка saCas9-p300. Рекомбинантный белок saCas9-p300 получали экспрессией в E. coli BL21(DE3)pLysS (Novagen) в минимальной среде с изопропил-β-D-тиогалактопиранозидом (0,1 мМ ИПТГ) при 18°C в течение 16 ч. Очистку проводили последовательно на Ni-аффинной колонке (GE Healthcare) и SP-катионообменной колонке (GE Healthcare); готовый белок хранили при −20°C.

3D-PCR. Для детекции мутаций, индуцированных активацией APOBEC в ДНК вируса гепатита B использовали метод 3D-PCR, основанный на различии температур плавления GC- и AT-пар. ДНК экстрагировали из клеток HepG2 с помощью QIAamp DNA Mini Kit (Qiagen) и измеряли концентрацию на NanoDrop ND-1000; ПЦР проводили с Taq-полимеразой (Takara Bio) с температурным градиентом 82–88°C и детекцией в 1,5% агарозном геле.

Секвенирование нового поколения. Для анализа мутационного спектра ДНК вируса гепатита B и геномной ДНК применяли высокопроизводительное секвенирование на платформе DNBSEQ-G50 (MGI Tech) с режимом парных концов 100 п.н. (PE100) при глубине 100 000–1 000 000 прочтений на образец. Библиотеки готовили с использованием полимеразы Phusion

High-Fidelity (Thermo Scientific) и набора MGIEasy Universal DNA Library Prep Set (MGI Tech); размерный контроль выполняли на TapeStation (Agilent), количественный — на Qubit 2.0 (Life Technologies). Выравнивание проводили на референсный геном HBV (GenBank NC_003977.1) с BWA-MEM; мутации идентифицировали инструментом GATK HaplotypeCaller (Q30).

ChIP-Seq. Для картирования сайтов связывания деаминаз APOBEC3A и APOBEC3B с хроматином проводили ChIP-Seq в клетках HepG2-hNTCP и HepaRG-hNTCP: хроматин фрагментировали до 150–300 п.н. ультразвуком, иммунопреципитацию — антителами против A3A и A3B (Santa Cruz Biotechnology) при 4°C. Библиотеки секвенировали на DNBSEQ-G50 (режим PE100); биоинформатическую обработку проводили: выравнивание Bowtie2 на hg38, обработка SAMtools, пики MACS2, визуализация UCSC Genome Browser.

qPCR. Уровни вирусной ДНК и мРНК определяли методом TaqMan-qPCR на приборе StepOnePlus (Applied Biosystems): программа 95°C 10 мин, 50 циклов 95°C 15 с / 60°C 1 мин. Для анализа экспрессии генов APOBEC суммарную РНК выделяли с RNeasy Mini Kit (Qiagen), кДНК синтезировали с SuperScript III First-Strand Synthesis SuperMix (Invitrogen); qRT-PCR выполняли с SYBR Green PCR Master Mix (Applied Biosystems) с нормировкой на GAPDH.

Вестерн блот. Для иммуноблотинга белки экстрагировали в буфере RIPA (50 мМ Tris-HCl pH 7,4, 150 мМ NaCl, 1% NP-40, 0,5% DOC, 0,1% SDS) с ингибиторами протеаз cOmplete (Roche); концентрацию определяли BCA Protein Assay Kit (Pierce/Thermo Scientific). Для иммуноблота использовали антитела: anti-HBx (Abcam), anti-APOBEC3A и anti-APOBEC3B (Santa Cruz Biotechnology), детекцию ECL-системой (Thermo Scientific) на ChemiDoc MP (Bio-Rad).

Статистическая обработка данных. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение (SD) или стандартная ошибка среднего (SEM). Сравнение двух групп проводили непарным t-тестом; множественные сравнения — однофакторным (one-way) или двухфакторным (two-way) ANOVA. Порог значимости $p < 0,01$. Анализ выполняли в R 4.1.2 (RStudio)

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

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

Для оценки влияния эпигенетического статуса ккзДНК на её доступность для APOBEC/AID разработана экспериментальная модель, основанная на технологии миникольцевых ДНК. Рекомбинантная ккзДНК (рккзДНК) была получена в двух формах:

нативной (немодифицированной) и гиперметилированной по CpG-динуклеотидам (мет-рккзДНК), имитирующей транскрипционно неактивный вирусный геном. Обе формы трансфицировали в клетки HepG2 совместно с компонентами системы CRISPRa для транзиентной активации экспрессии A3A, A3B или AID.

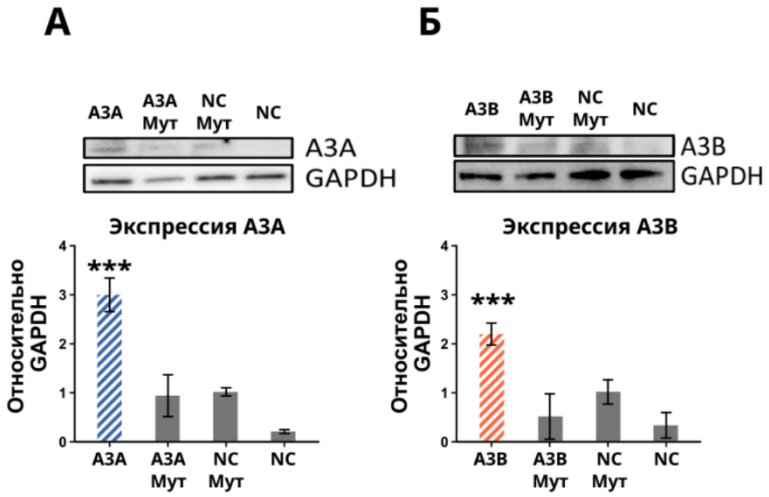


Рисунок 1 — Анализ уровней белка (А) A3A и (Б) A3B методом Western-блот после CRISPR-активации. Мут — контрольный активирующий белок saCas9 с удаленным доменом активации. NC — контрольная направляющая РНК (sgRNA) без специфичности к мишени. ns — статистически незначимо; *p < 0,01; ***p < 0,0001.

Результаты qPCR показали, что CRISPR-активация генов A3A, A3B и AID приводила к снижению уровней и ккзДНК (рис. 2) примерно на 50–75% как в группе рккзДНК, так и в группе мет-рккзДНК.

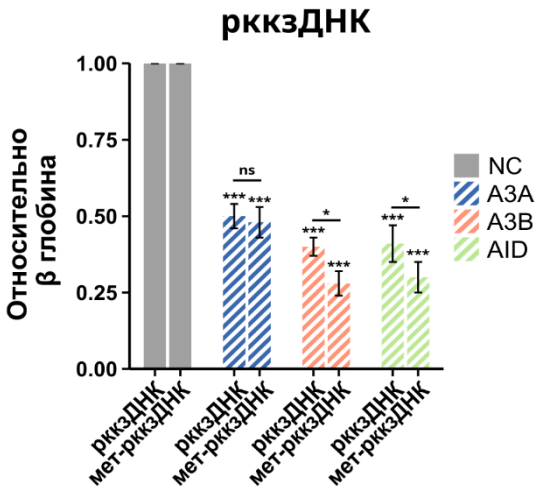


Рисунок 2 — Анализ уровней рккзДНК методом ПЦР в реальном времени после CRISPR-активации A3A, A3B и AID. NC — контрольная направляющая РНК (sgRNA) без специфичности к мишени. ns — статистически незначимо; *p < 0,01; ***p < 0,0001.

Анализ методами 3D-ПЦР и NGS показал, что мет-рккзДНК подвергалась статистически значимо более интенсивному дезаминированию со стороны A3A и AID по сравнению с немодифицированной рккзДНК. Частота мутаций C→T в мет-рккзДНК была достоверно выше, чем в нативной форме, при сопоставимых уровнях экспрессии каждого фермента. Полученные результаты свидетельствуют о том, что метилирование ДНК, сопровождающее транскрипционную инактивацию ккзДНК, одновременно повышает её уязвимость к дезаминирующему действию APOBEC/AID.

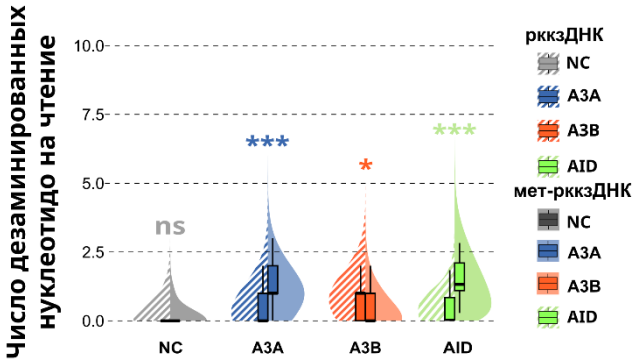
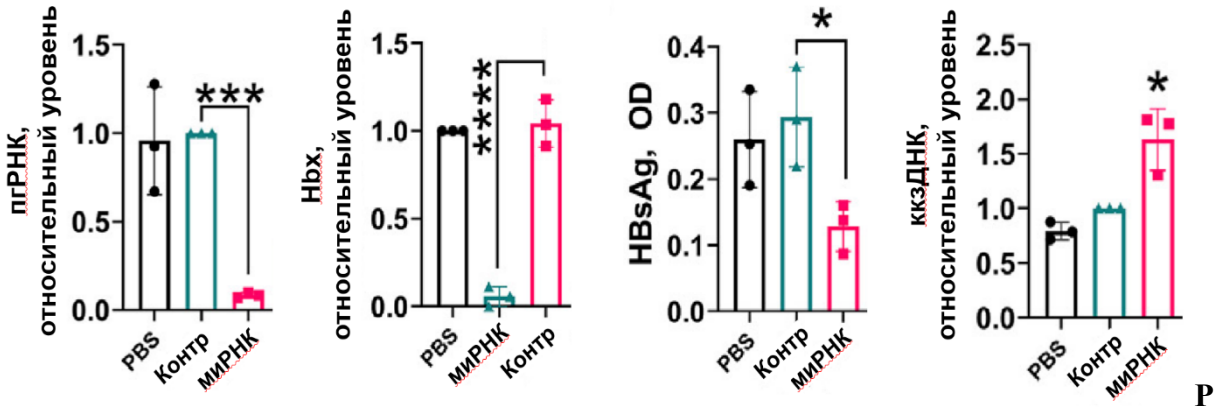


Рисунок 3 — Анализ дезаминирования в рккзДНК и метилированной рккзДНК методом NGS. NC - контрольная направляющая РНК (sgRNA) без специфичности к мишени. ns - статистически незначимо; *p < 0,01; ***p < 0,0001.

Малая интерферирующая РНК против пгРНК вируса гепатита В блокирует обратную транскрипцию, но не влияет на пул ккзДНК

Для решения задачи по определению активности интерферирующей РНК против пгРНК вируса гепатита В и других маркеров вирусного цикла была использована модель клеток HepG2, трансфицированных рекомбинантной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК ВГВ (рккзДНК, генотип D). Обработка клеток специфической миРНК, направленной против Х-гена ВГВ, приводила к статистически значимому снижению уровней пгРНК ($p < 0,001$) и белка HBx ($p < 0,0001$) по сравнению с контрольной группой, получавшей нецелевую миРНК. Уровень секретируемого HBsAg также достоверно снижался в группе с активной миРНК ($p < 0,05$).

При этом уровень ккзДНК не снижался, а статистически значимо возрастал относительно контроля ($p < 0,05$), что демонстрирует избирательность действия миРНК на пгРНК-зависимые этапы репликационного цикла без прямого влияния на уже существующий пул ккзДНК.



Р

исунок 4 — Анализ уровней основных маркеров вирусной репликации на клеточной линии HepG2 на фоне специфичной к пгРНК миРНК. PBS — контрольная группа, Контр — группа с неспецифичной к мишени миРНК. ns - статистически незначимо; *p < 0,01; ***p < 0,0001.

Полученные данные подтверждают следующее положение: малая интерферирующая РНК против последовательности пгРНК вируса гепатита В блокирует обратную транскрипцию и образование новых молекул кчдДНК, не затрагивая устойчивый ядерный резервуар вируса ковалентно замкнутую кольцевую ДНК.

Блокада образования кольцевой частично двуцепочечной формы генома вируса гепатита В усиливает гипермутирование ккзДНК

Для специфического снижения пула кчдДНК применяли ламивудин (LAM) — ингибитор обратной транскриптазы ВГВ, не влияющий непосредственно на уровни ккзДНК или экспрессию вирусных генов. Обработка LAM достоверно снижала внутриклеточный уровень ДНК ВГВ (преимущественно кчдДНК) при отсутствии значимого эффекта на HBsAg. На фоне LAM CRISPR-активация A3A приводила к снижению уровней ккзДНК на ~80%, тогда как изолированная активация A3A без LAM обеспечивала лишь ~50% снижение. Анализ 3D-ПЦР продемонстрировал выраженное усиление дезаминирования ккзДНК при комбинировании LAM с активацией A3A и AID. Таким образом, устранение кчдДНК как конкурентного субстрата перенаправляет APOBEC/AID на ккзДНК.

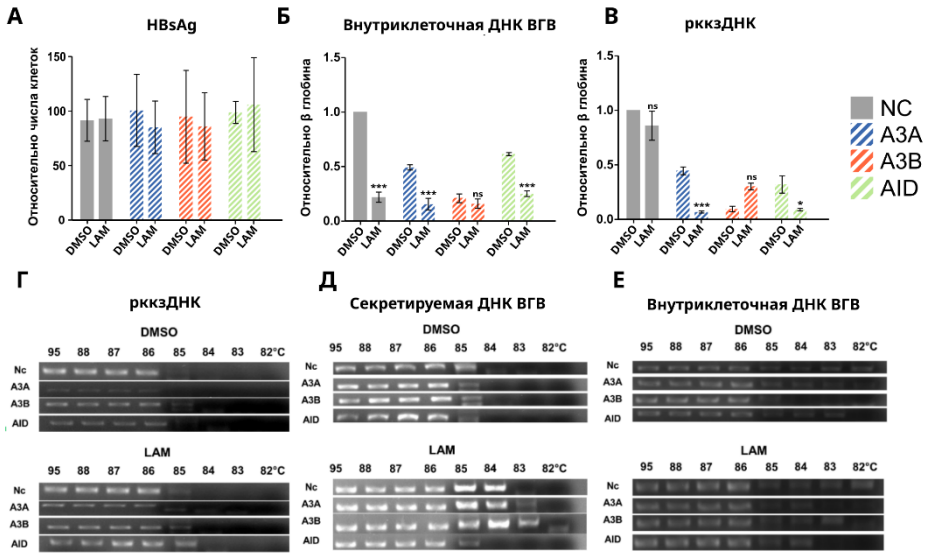


Рисунок 5 — Противовирусная и дезаминирующая активность APOBEC/AID в комбинации с терапией LAM. (А) Анализ секретированного HBsAg методом ИФА. Влияние комбинации CRISPR активации APOBEC/AID и ламивудина на уровень (Б) внутриклеточной ДНК ВГВ и (В) рккзДНК. (Г) Анализ дезаминирования рккзДНК методом 3D-ПЦР 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.

В качестве независимого подхода к истощению пула кчдДНК использовали shRNA, нацеленную на X-ген ВГВ (anti-HBx shRNA), подавляющую транскрипцию вирусных РНК и, как следствие, синтез кчдДНК. Применение anti-HBx shRNA вызывало резкое снижение HBsAg и внутриклеточной ДНК ВГВ. Комбинированное воздействие anti-HBx shRNA совместно с CRISPR-активацией A3A или AID обеспечивало снижение ккзДНК на 60–80%.

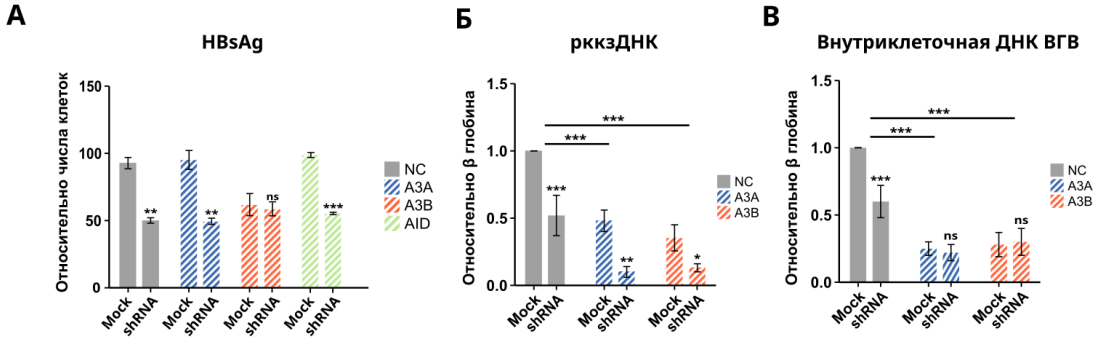


Рисунок 6 — Влияние подавления синтеза кчдДНК с помощью shRNA против *HBx* на противовирусную активность APOBEC/AID в клетках HepG2. (А) Уровни секретируемого HBsAg при активации NC, A3A, A3B и AID в присутствии shRNA против *Hbx* либо нецелевой shRNA (Mock), нормированные на число клеток. Уровни (Б) рккзДНК и (В) внутриклеточной ДНК ВГВ по данным qPCR, нормированные на β-глобин. NC — контрольная sgRNA; Mock — внецелевая shRNA. ns — статистически незначимо; *p < 0,01; **p < 0,001; ***p < 0,0001.

Примечательно, что дезаминирование, опосредованное A3B, было значительным в исходных условиях, однако не усиливалось при добавлении shRNA. Этот феномен объясняется деградацией гипердезаминированных молекул ккзДНК, содержащих множественные урацилы, по пути эксцизионной репарации оснований с участием урацил-ДНК-гликозилазы (UNG).

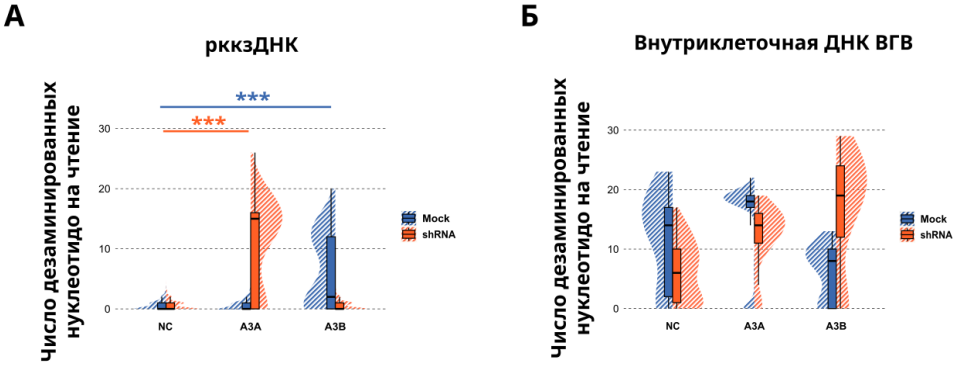


Рисунок 7 — Влияние подавления синтеза кчдДНК с помощью shRNA против *HBx* на дезаминирующую активность APOBEC/AID в клетках HepG2. (А) Анализ дезаминирования рккзДНК и (Б) внутриклеточной ДНК ВГВ: сверху — количество дезаминированных нуклеотидов на прочтение по данным NGS (синий — Mock, оранжевый — shRNA); снизу — результаты 3D-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.

Полученные на трансфекционной модели закономерности были верифицированы на инфекционной модели: клетках HepaRG-hNTCP, поддерживающих полный репликационный цикл ВГВ с *de novo* образованием ккзДНК из инфекционных вирионов. Для количественного контроля уровня активации A3A использовали аттенуированные sgRNA (A90 и A70), обеспечивающие ~90% и ~70% от максимального эффекта, соответственно.

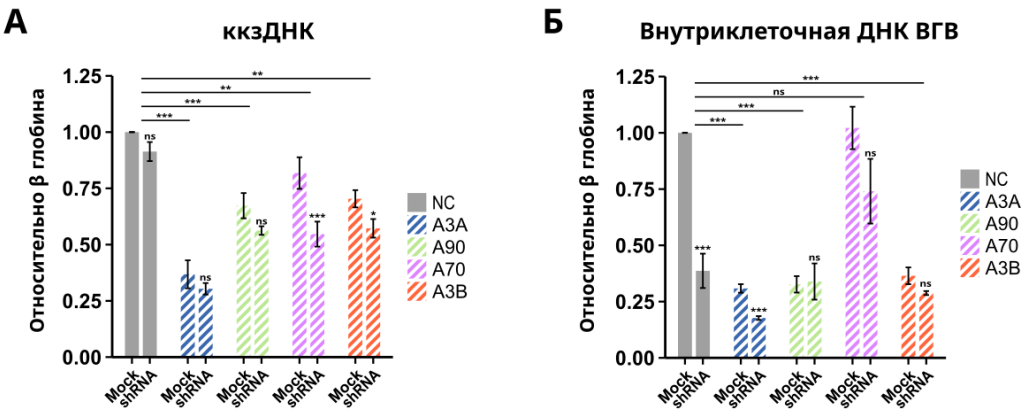


Рисунок 8 — Анализ противовирусной активности APOBEC3 на инфекционной модели HepaRG-hNTCP. (А) Уровни ккзДНК по данным qPCR при активации A3A и A3B, и при активации A3A аттенуированными направляющими РНК A90 и A70 в присутствии shRNA либо Mock. (Б) Уровни внутриклеточной ДНК ВГВ в тех же условиях. NC — контрольная sgRNA; Mock — внецелевая shRNA. *p < 0,01, **p < 0,001, ***p < 0,0001.

CRISPR-активация A3A снижала уровень ккзДНК на 70%, тогда как активация A3B на 35%. Аттенуированные варианты sgRNA приводили к прогрессивно менее выраженному снижению ккзДНК (40% для A90 и 35% для A70), демонстрируя чёткую дозозависимость противовирусного эффекта.

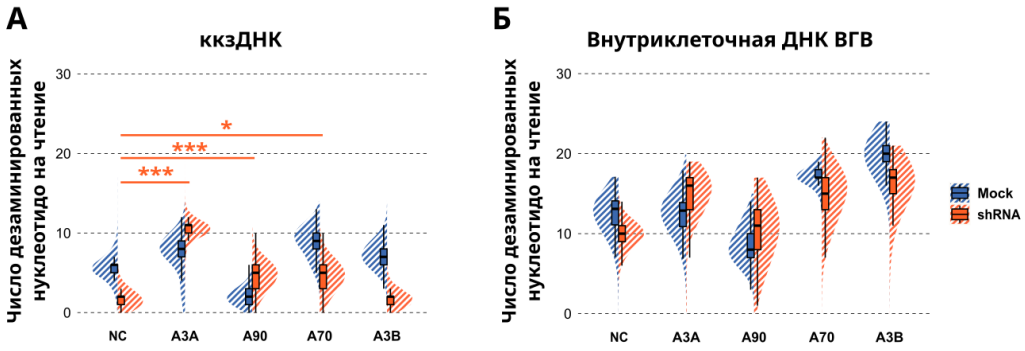


Рисунок 9 — Анализ дезаминирующей активности APOBEC3 на инфекционной модели HepaRG-hNTCP (А) Анализ дезаминирования ккзДНК методом NGS. (Б) Анализ дезаминирования внутриклеточной ДНК ВГВ методом NGS. NC — контрольная sgRNA; Mock — внецелевая shRNA. *p < 0,01, **p < 0,001, ***p < 0,0001.

NGS-анализ подтвердил, что снижение уровней ккзДНК обусловлено мутагенезом ферментами APOBEC: в клетках с активированным A3A или A3B регистрировались характерные мутации C→T в соответствующих нуклеотидных контекстах. Паттерны дезаминирования воспроизвели закономерности, установленные на трансфекционной модели HepG2, что свидетельствует об универсальности механизма молекулярной ловушки кчдДНК.

Результаты на инфекционной модели HepaRG-hNTCP полностью воспроизводят и подтверждают закономерности, установленные на трансфекционной системе.

APOBEC3A упаковывается в вирионы вируса гепатита B

Для проверки гипотезы о взаимодействии APOBEC/AID с кчдДНК внутри нуклеокапсидов ВГВ исследовали присутствие дезаминаз в составе очищенных вирионов. В клетках HepaRG-hNTCP, инфицированных природным ВГВ, методом CRISPRa индуцировали экспрессию A3A. Вирионы выделяли из культуральной среды путём ультрацентрифугирования и верифицировали их состав вестерн-блот анализом с антителами к A3A и капсидному белку HBc.

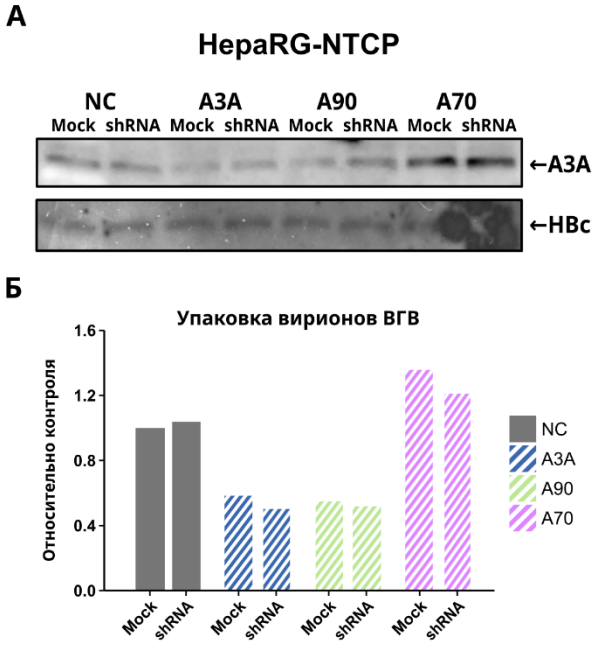


Рисунок 10 — A3A в составе очищенных вирионов ВГВ по данным иммуноблоттинга. Анализ вирионных фракций, выделенных из супернатанта инфицированных клеток HepaRG-hNTCP. (А) Детекция: A3A (верхняя панель), HBc (нижняя панель). (Б) Количественный расчет эффективности упаковки. Обнаружение A3A во фракции вирионов подтверждает упаковку внутрь нуклеокапсидов ВГВ.

Для надёжной детекции APOBEC3 в составе очищенных вирионов ВГВ применяли разработанный нами протокол на основе сапонина, обеспечивающий 2–7-кратное повышение выхода белка и 2–242-кратное увеличение эффективности экстракции РНК из биологических наночастиц по сравнению со стандартными методами. Это позволило впервые достоверно выявить присутствие A3A в составе вирионных нуклеокапсидов методом вестерн-блот. Анализ показал, что белок A3A присутствует в составе очищенных нуклеокапсидов ВГВ. Таким образом, вирионы ВГВ формируют дополнительный внутривирионный компартмент молекулярных «ловушек» кчдДНК, инкапсулированная совместно с A3A, конкурентно связывает дезаминазу и препятствует её транспорту в ядро для воздействия на ккзДНК

Снижение уровней внутриклеточной кчдДНК способствует усилению генотоксического действия и внецелевому дезаминированию генома клеток, инфицированных ВГВ

Для оценки влияния уровня вирусной репликации на характер взаимодействия APOBEC3 с геномом хозяина в клетках HepG2-hNTCP, инфицированных ВГВ, проводили ChIP-Seq и NGS-анализ геномной ДНК при различных условиях активации A3A и A3B на фоне активной репликации и при её подавлении с помощью shRNA против X-гена ВГВ.

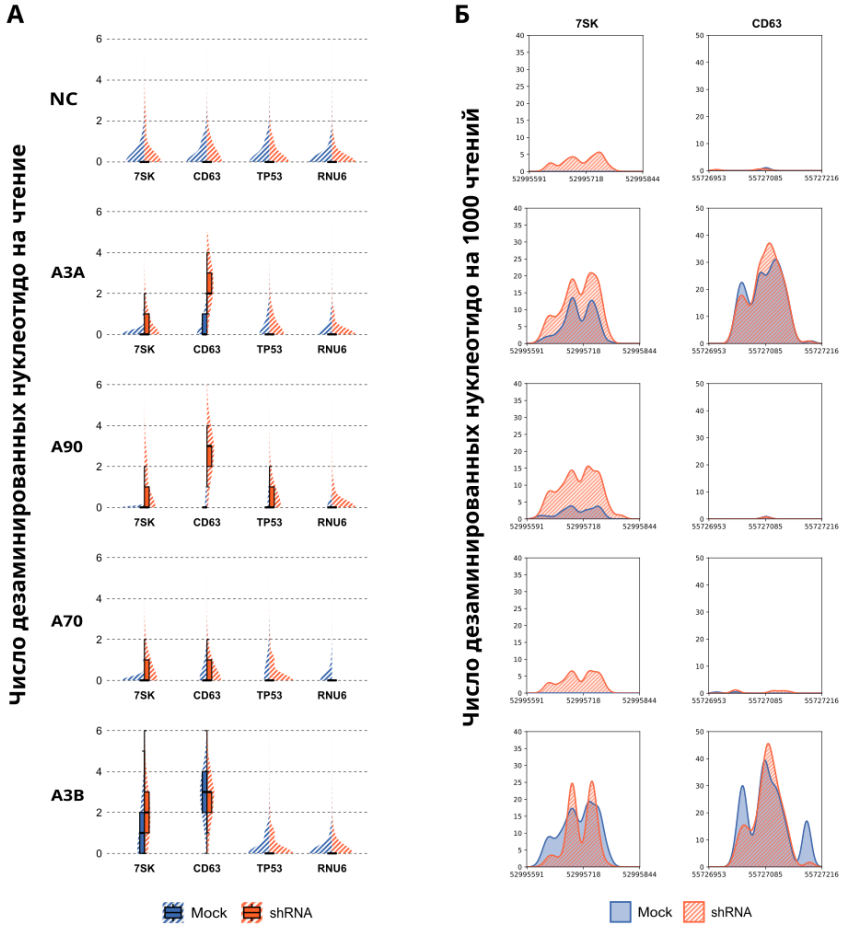


Рисунок 11 — Дезаминирование генома хозяина ферментами A3A, A90, A70 и A3B при подавлении репликации ВГВ. (А) Количество дезаминированных нуклеотидов на чтение по данным NGS для генов *7SK*, *CD63*, *TP53* и *RNU6* при активации NC, A3A, A90, A70 и A3B в группах Mock (синий) и shRNA (оранжевый). (Б) Позиционный профиль дезаминирования по геномным координатам для локусов *7SK* (chr7: 52 995 591–52 995 844) и *CD63* (chr12: 55 726 953–55 727 218) в группах Mock и shRNA для каждого из изученных ферментов.

ChIP-Seq показал, что при высоком уровне активации A3A в условиях истощения пула кчдДНК белок A3A накапливается на хроматине генов *7SK*, *CD63*, *RNU6-1* и *TP53*. При умеренной активации (sgRNA A70), когда пул кчдДНК лишь частично снижен, накопления A3A на геноме хозяина не наблюдалось — то есть даже частичное сохранение кчдДНК обеспечивает защиту генома. Белок A3B демонстрировал связывание с *7SK* и *CD63* уже в базальных условиях репликации, однако без shRNA мутаций в этих локусах не выявлялось, что указывает на конкурентное связывание A3B кчдДНК. NGS-верификация подтвердила достоверное нарастание частоты мутаций C→T в локусах *7SK*, *CD63* и *TP53* при активации A3A на фоне shRNA-опосредованного истощения кчдДНК.

Снижение вирусной нагрузки создаёт условие, при котором APOBEC-активирующая терапия становится генотоксической, вследствие истощения пула кчдДНК и переориентации

APOBEC/AID с вирусных субстратов на геном хозяина. Это представляет принципиальное клиническое ограничение для комбинированных подходов, сочетающих нуклеозидную терапию с активацией A3A или AID.

КчдДНК ВГВ защищает ккзДНК и геном клетки-хозяина от дезаминирующего и мутагенного действия APOBEC/AID-дезаминаз

Для прямой проверки гипотезы о роли кчдДНК как конкурентного субстрата была разработана модель с экзогенным добавлением кчдДНК, выделенной из очищенных вирионов ВГВ, в клетки HepG2 на фоне CRISPR активации A3A. В качестве репортёрного субстрата использовали мет-рккзДНК, интенсивность дезаминирования которой оценивали методами 3Д-ПЦР и NGS.

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. Введение экзогенной кчдДНК в концентрации 1×10^{6} копий дозозависимо восстанавливало уровень мет-рккзДНК в группе A3A до значений контрольной группы. При концентрациях 1×10^{7} и 5×10^{7} копий кчдДНК уровни мет-рккзДНК в группах A3A и NC были полностью неразличимы, что свидетельствует о полном конкурентном насыщении A3A экзогенной кчдДНК.

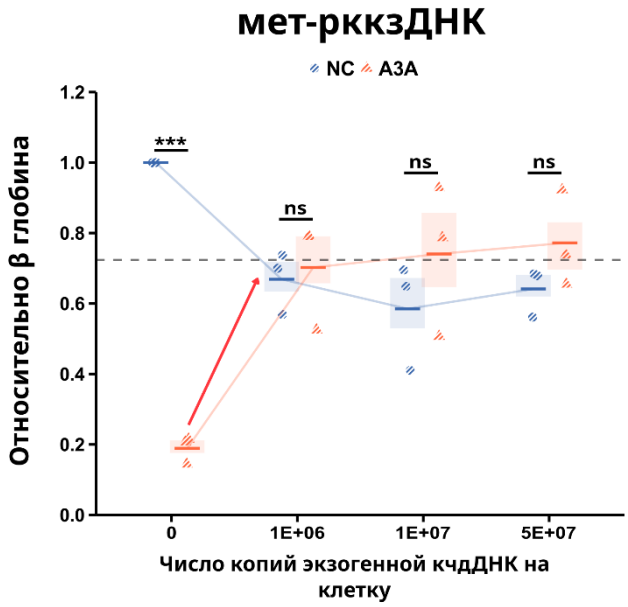


Рисунок 12 — кчдДНК ВГВ функционирует как молекулярная ловушка, защищающая ккзДНК от дезаминирования A3A. Уровни мет-рккзДНК (нормировано на β-глобин) в зависимости от концентрации введённой кчдДНК (0; 1×10^{6}; 1×10^{7}; 5×10^{7} копий). Пунктирная

линия — среднее значение контрольной группы NC (0,724). NC — контрольная sgRNA. ns — статистически незначимо; ***p < 0,0001.

Совокупность полученных данных доказывает, что цитоплазматический пул кчдДНК является ключевым механизмом, посредством которого ВГВ защищает свой ядерный резервуар ккзДНК от воздействия APOBEC/AID при активной репликации.

APOBEC-дезаминазы A3C, A3D и A3H подавляют вирусную репликацию и дезаминируют ккзДНК без воздействия на геном человека

Для оценки противовирусного потенциала и профиля безопасности членов семейства APOBEC3 A3C, A3D и A3H — в клетках HepG2 методом CRISPRa (dCas9-p300 + специфические sgRNA) индуцировали экспрессию каждого фермента: A3C — 4-кратно, A3D — 35-кратно, A3H — 2-кратно относительно контроля. Оценивали уровни HBsAg, пгРНК и ккзДНК , дезаминирование ккзДНК — методом 3D-ПЦР, внецелевой мутагенез генома хозяина — по онкогенам *ARID1*, *PAX5* и *TP53*.

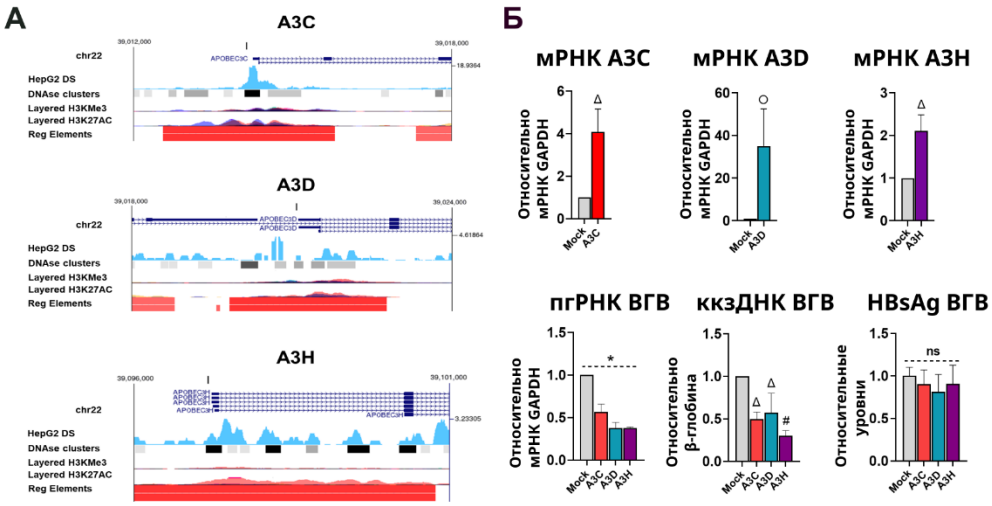


Рисунок 13 — Активация экспрессии A3C, A3D и A3H системой CRISPRa на основе dCas9-p300 и противовирусная активность в клетках HepG2. (А) Геномный браузер UCSC (хромосома 22): архитектура промоторных регионов генов *A3C*, *A3D* и *A3H*. Вертикальная метка указывает положение sgRNA. (Б) Верхний ряд: уровни мРНК *A3C*, *A3D* и *A3H* при трансфекции целевой CRISPRa (цветные столбцы) и мутантной формой dCas9-p300(D1399Y) (Mock, серые столбцы). 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.

Активация A3C снижала уровень ккзДНК на ~50% (p<0,01), A3D на ~40% (p<0,01), A3H на ~75% (p<0,001) по сравнению с контролем. При 3D-ПЦР анализе кчдДНК A3C и A3D вызывали детектируемое дезаминирование, тогда как активность A3H в отношении кчдДНК

находилась ниже порога детекции 3D-ПЦР, однако сопровождалась снижением уровней секретируемой ДНК ВГВ.

Принципиально важно, что ни A3C, ни A3D, ни A3H не вызывали статистически значимых изменений частоты мутаций C→T в генах *ARID1*, *PAX5* и *TP53* по сравнению с контролем в отличие от A3A, A3B и AID, которые во всех тех же условиях достоверно индуцировали мутации в этих онкологически значимых локусах.

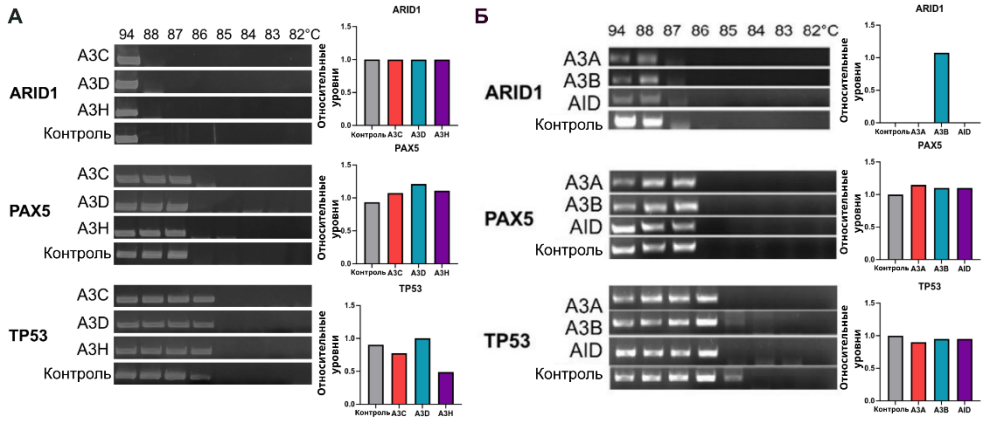


Рисунок 14 — Анализ внецелевого дезаминирования онкогенов методом 3D-ПЦР при активации членов семейства APOBEC3. (А) Результаты для A3C, A3D и A3H: 3D-ПЦР с градиентом 94–82°C для генов *ARID1*, *PAX5* и *TP53* (слева — гели, справа — полуколичественный анализ). (Б) Результаты для A3A, A3B и AID: аналогичный 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.

Таким образом, A3C, A3D и A3H представляют собой «безопасные» члены семейства APOBEC3, сочетающие противовирусную активность в отношении ВГВ с отсутствием внецелевого мутагенеза в геноме человека, что делает их перспективными кандидатами для разработки противовирусных стратегий с приемлемым профилем генотоксической безопасности.

ВЫВОДЫ

1. Установлено, что гиперметилированная транскрипционно инактивированная рккзДНК подвергается более интенсивному дезаминированию ферментами A3A, A3B и AID по сравнению с транскрипционно активной формой. 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.
5. Показано, что кчдДНК ВГВ, введённая в клетки HepG2 методом электропорации в концентрации 1×10^{6}–5×10^{7} копий, подавляла дезаминирующую активность A3A в отношении мет-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 40% без внецелевого мутагенеза онкогенов *ARID1*, *PAX5* и *TP53*, что принципиально отличает эти ферменты от A3A и A3B.

СПИСОК ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Kostyusheva, A. Biologics-based technologies for highly efficient and targeted RNA delivery / A. Kostyusheva, S. Brezgin, N. Ponomareva, A. Frolova, A. Lunin, E. Bayurova, **A. Tikhonov**, O. Slatinskaya, P. Demina, A. Kachanov, G. Babayeva, I. Khan, D. Khochenkov, Y. Khochenkova, D. Sokolova, D. Silachev, G. Maksimov, E. Khaydukov, V.S. Pokrovsky, A.A. Zamyatnin // Mol Ther. – 2025. – V. 33, № 1. – P. 168–183. doi: 10.1016/j.ymthe.2024.11.004 (IF 12,0)

2. Brezgin, S. Saponin is Essential for the Isolation of Proteins and RNA from Biological Nanoparticles / S. Brezgin, A. Frolova, E. Bayurova, O. Slatinskaya, N. Ponomareva, E. Parshina, Z. Bochkova, A. Kachanov, **A. Tikhonov**, A. Kostyusheva, I. Karandashov, P. Demina, O. Latyshev, O. Eliseeva, M. Belikova, V.S. Pokrovsky, V. Gegechkory, E. Khaydukov, D. Silachev, A.A. Zamyatnin Jr, G. Maksimov, A. Lukashev, I. Gordeychuk, V. Chulanov, D. Kostyushev // Anal Chem. – 2024. – V. 96, № 43. – P. 17432–17443. doi: 10.1021/acs.analchem.4c04607 (IF 6,7)

3. **Tikhonov, A.S**. Biomimetic Nanoparticles for Basic Drug Delivery / A.S. Tikhonov, A. Kachanov, A.D. Yudaeva, O. Danilik, N. Ponomareva, I. Karandashov, A. Kostyusheva, A.A.

Zamyatnin, A. Parodi, V. Chulanov, S. Brezgin, D. Kostyushev // Pharmaceutics. – 2024. – V. 16, № 10. – 1306. doi: 10.3390/pharmaceutics16101306 (IF 5,5)

4. Kachanov, A. The menace of severe adverse events and deaths associated with viral gene therapy and its potential solution / A. Kachanov, A. Kostyusheva, S. Brezgin, I. Karandashov, N. Ponomareva, **A. Tikhonov**, A. Lukashev, V. Pokrovsky, A.A. Zamyatnin Jr, A. Parodi, V. Chulanov, D. Kostyushev // Med Res Rev. – 2024. – V. 44, № 5. – P. 2112–2193. doi: 10.1002/med.22036 (IF 13,6)

5. **Tikhonov, A.** HIV Restriction Factor APOBEC3G and Prospects for Its Use in Gene Therapy for HIV / A. Tikhonov, R.R. Mintaev, D.V. Glazkova, E.V. Bogoslovskaya, G.A. Shipulin // Mol Biol. – 2022. – V. 56, № 4. – P. 508–516. doi: 10.1134/S0026893322040112 (IF 1,2)

6. Karandashov, I.V. Antiviral and Mutagenic Effects of APOBEC Deaminases A3C, A3D, and A3H in a Hepatitis B Virus Model / I.V. Karandashov, S.A. Brezgin, N.I. Ponomareva, **A.S. Tikhonov**, V.P. Chulanov, D.S. Kostyushev, A.P. Kostyusheva // Biochemistry (Moscow). – 2026. – V. 91, № 2. – P. 289–298. doi: 10.1134/S0006297925603326 (IF 2,2)

7. Bayurova, E. Broad-acting antivirals: the pursuit of pan-viral therapeutics in the era of pandemics / E. Bayurova, D. Kostyushev, **A.S. Tikhonov**, V. Chulanov, I. Gordeychuk // J Virol. – 2026. – V. 100, № 5. – e00077-26. doi: 10.1128/jvi.00077-26 (IF 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. «ЛОМОНОСОВ-2025» / [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. 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/. publication:08.12.2025.– Text : electronic.

9. 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.

Тихонов Андрей Сергеевич (Российская Федерация)

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

В диссертации исследована роль кольцевой частично двуцепочечной ДНК (кчдДНК) вируса гепатита В (ВГВ) в регуляции противовирусной и дезаминирующей активности цитидин-дезаминаз семейства APOBEC/AID. Показано, что кчдДНК, количественно преобладающая в инфицированных гепатоцитах по сравнению с ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (ккзДНК), выполняет функцию конкурентного субстрата для APOBEC/AID, перераспределяя их активность с терапевтически значимой ккзДНК на избыточные формы вирусного генома и тем самым снижая эффективность врождённого противовирусного ответа при одновременном уменьшении риска мутагенного повреждения генома клетки-хозяина. Впервые создана модель трансфекции в клетки человека кчдДНК ВГВ, выделенной из вирионов, и проведён комплексный анализ действия APOBEC/AID при репликации и естественной инфекции ВГВ в условиях подавления образования кчдДНК аналогами нуклеотидов и РНК-интерферирующими молекулами. Установлено, что снижение уровня кчдДНК усиливает дезаминирование ккзДНК и повышает противовирусный эффект, но сопровождается ростом частоты внецелевых мутаций в геноме человека, тогда как отдельные APOBEC3 (A3C, A3D, A3H) подавляют репликацию ВГВ и дезаминируют ккзДНК без выявленного воздействия на ДНК хозяина. Полученные результаты раскрывают новый механизм защиты ВГВ от действия APOBEC/AID и подчёркивают необходимость селективного воздействия на различные формы вирусной ДНК при разработке безопасных комбинированных стратегий элиминации ккзДНК.

Andrey Sergeevich Tikhonov (Russian Federation)

The Role of Relaxed Circular DNA in Constraining the Antiviral and Deaminating Activity of APOBEC/AID Cytidine Deaminases

The dissertation examines the role of hepatitis B virus (HBV) relaxed circular DNA (rcDNA) in regulating the antiviral and deaminating activity of APOBEC/AID family cytidine deaminases. It is shown that rcDNA, which is quantitatively predominant in infected hepatocytes compared with covalently closed circular DNA (cccDNA), serves as a DNA decoy for APOBEC/AID, redirecting their activity from therapeutically relevant cccDNA to excessive viral genome forms and thereby reducing the efficiency of innate antiviral defense while simultaneously limiting mutagenic damage to the host cell genome. A model of human cell transfection with rcDNA isolated from HBV virions was

established for the first time, enabling a comprehensive analysis of APOBEC/AID activity during HBV replication and natural infection under conditions of rcDNA formation blockade using nucleos(t)ide analogues and RNA-interference molecules. It was demonstrated that depletion of rcDNA enhances cccDNA deamination and strengthens antiviral effects but is accompanied by an increased frequency of off-target mutations in the human genome, whereas selected APOBEC3 enzymes (A3C, A3D, A3H) suppress HBV replication and deaminate cccDNA without detectable impact on host DNA. These findings reveal a previously unrecognized mechanism of HBV "background protection" from APOBEC/AID and emphasize the need for selective targeting of distinct viral DNA forms when designing safe combination strategies for cccDNA elimination.