СИСТЕМА м6А МЕТИЛИРОВАНИЯ ОГРАНИЧИВАЕТ РЕПЛИКАЦИЮ ВИРУСА ГЕПАТИТА В

А.В. Качанов[1]*, С.А. Брезгин[1,2], Н.И. Пономарева[1,2], А.Н. Лукашев[1], В.П. Чуланов[1,2], Д.С. Костюшев[1,3], А.П. Костюшева[1]

[1]Институт медицинской паразитологии тропических и
трансмиссивных заболеваний имени Е.И. Марциновского,
Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
119991, Москва, ул. Трубецкая, 8; *эл. почта: kachanov.av99@gmail.com;
[2]Научно-технический университет "Сириус", Научный центр генетики и наук о жизни, Сочи
[3]Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова,
Факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва

N6-метиладенозин (м6А) — распространённая модификация РНК, которая играет определяющую роль в судьбе РНК, регулируя такие аспекты, как сплайсинг, стабильность, ядерный экспорт и эффективность трансляции. Внесение, удаление и распознавание м6А модификации в РНК регулируется рядом факторов, а именно белками-писателями, стирателями и читателями. Известно, что м6А-модификация может играть важную роль в жизненном цикле вирусов, в том числе вируса гепатита В. Доказано, что система м6А метилирования оказывает влияние на вирусный цикл гепатита В (ВГВ), в частности на стабильность мРНК-транскриптов, эффективность энкапсидации и обратной транскрипции пгРНК ВГВ. В данном исследовании оценивали влияние нокаута и активации экспрессии ряда факторов системы м6А метилирования на вирусный цикл ВГВ, а именно — прегеномную РНК (пгРНК) и кольцевую ковалентно-замкнутую ДНК (ккзДНК). Исследование проводили с использованием системы нуклеаз StCas9 для нокаута и системы dCas9-p300 для активации экспрессии генов. Уровни пгРНК и ккзДНК оценивали методом ПЦР в реальном времени. Полученные данные показывают ограничение вирусного цикла на базальном уровне факторами METTL3, METTL14, METTL16, FTO, JMJD6 и hnRNPA2B1, а также подавление вирусного цикла при гиперэкспрессии всех вышеперечисленных факторов, за исключением hnRNPA2B1.

Ключевые слова: гепатит В; факторы системы м6А; ккзДНК; пгРНК

DOI: 10.18097/PBMCR1509

ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита В (ВГВ) — ДНК-вирус, принадлежащий к семейству *Hepadnaviridae* [1]. Вирион ВГВ состоит из липидного суперкапсида, на поверхности которого представлены короткий (S-HBs), средний (M-HBs) и длинный (L-HBs) антигены. Внутри суперкапсида находится икосаэдрический нуклеокапсид, состоящий из белка HBc ("кор" белка). В свою очередь, нуклеокапсид заключает в себе геном, ковалентно связанный с вирусной ДНК-полимеразой (Pol). Геном ВГВ представлен частично двухцепочечной релаксированной кольцевой ДНК (кчдДНК) длиной около 3,2 тысяч пар оснований [2, 3]. При инфицировании гепатоцитов ВГВ первично взаимодействует с гепарансульфат-протеогликанами и затем — высокоаффинно с натрий-таурохолат котранспортным полипептидом (NTCP), который экспрессируется в гепатоцитах печени, что приводит к интернализации вируса за счёт рецептор-зависимого эндоцитоза. В цитоплазме клеток вирус освобождается от суперкапсида и далее импортируется в ядро через комплекс ядерных пор [4]. В ядре нуклеокапсид разбирается с высвобождением кчдДНК, которая превращается в кольцевую ковалентно-связанную ДНК (ккзДНК) за счёт многоэтапного процесса с участием клеточных ферментов [5]. ккзДНК является матрицей для синтеза всех вирусных мРНК, а также прегеномной РНК (пгРНК), на основе которой происходит обратная транскрипция с формированием кчдДНК [6]. ккзДНК является основным фактором, обеспечивающим хроническое течение ВГВ-инфекции благодаря высокой стабильности и поддержания пула ккзДНК за счёт процессов реинфекции гепатоцитов и ре-импорта кчдДНК в ядро [7–9].

N6-метиладенозин (м6А) — это наиболее распространённая эпитранскриптомная модификация, которая была обнаружена во всех типах РНК. м6А модификация преимущественно локализуется в консервативных DRACH-мотивах (D = G/A/U, R = G/A, H = A/U/C) [10]. Анализ транскриптома показал, что ~37% меток м6А располагаются внутри кодирующих последовательностей, около 20% — в 3′-нетранслируемой области; 28% меток было обнаружено в -200 до +200 нуклеотидов после стоп-кодона, при этом 12% меток располагается в области начала транскрипции. Помимо того, наиболее высокое обогащение м6А метками выявлено в области стоп-кодона и области начала транскрипции [11, 12]. Внесение, удаление и считывание м6А-меток — это динамический процесс. Метилазы, среди которых METTL3, METTL14, METTL16, также

© 2025 Коллектив авторов. Лицензиат ИБМХ, Москва. Статья открытого доступа, распространяется на условиях лицензии Creative Commons Attribution (CC BY-SA 4.0) (http://creativecommons.org/licenses/by-sa/4.0/).

известные как белки-писатели, вносят m6A-метки. Деметилазы, также называемые белками-стирателями, удаляют m6A метки. Роль стирателей играют деметилазы ALKBH5 и FTO. За распознавание m6A меток отвечают белки-читатели [10]. Белки-читатели локализуются в ядре и в цитоплазме. К ядерным читателям относят белки YTHDC1, hnRNPA2B1 и hnRNPG. К цитоплазматическим — YTHDF1, YTHDF2, YTHDF3, а также YTHDC2 [11]. Белки-читатели играют определяющую роль в судьбе m6A-модифицированной РНК, влияя на сплайсинг, ядерный экспорт, трансляцию и стабильность [13].

Известно, что ВГВ взаимодействует с системой m6A [14]. Так например, METTL3/METTL14-зависимая m6A модификация 3′ ε-петли снижает стабильность вирусных транскриптов, в то время, как аналогичная модификация 5′ ε-петли пгРНК необходима для обратной транскрипции пгРНК в кчдДНК [15]. m6A модификация 5′ ε-петли позволяет пгРНК взаимодействовать с кор-белком HBc и обеспечивает эффективную упаковку пгРНК в нуклеокапсид, что необходимо для сборки вирусных частиц [16]. Также было показано, что m6A метилирование в области кодирующей последовательности HBx, основного транскрипционного активатора вируса, необходимо для эффективной репликации гепатита B [17]. Вместе с этим, HBx напрямую связывается с комплексом белков-писателей METTL3/METTL14, стимулирует их ядерный импорт и способствует связыванию с ккзДНК, обеспечивая ко-транскрипционную модификацию вирусных транскриптов [18].

Помимо влияния на вирусный цикл, есть свидетельства влияния m6A на врождённый иммунный ответ к ВГВ. Например, METTL3/METTL14-зависимая модификация вирусной РНК приводит к снижению RIG-I-зависимого распознавания РНК ВГВ; это происходит благодаря связыванию факторов YTHDF3 и YTHDF2 с РНК ВГВ и блокированию её распознавания сенсором чужеродных РНК RIG-I [19]. HBx белок также может индуцировать m6A метилирование мРНК гена *PTEN* — фактора, необходимого для ядерного импорта фактора транскрипции интерферона IRF-3 [17, 20]. Это снижает стабильность и уровни мРНК гена *PTEN*, который участвует в ядерном импорте IRF-3, что приводит к снижению синтеза интерферона. Следовательно, m6A модификация РНК ВГВ может способствовать избеганию иммунного ответа. Вместе с этим, m6A модификация может вызывать деградацию РНК ВГВ противовирусной РНКазой ISG20 [21].

Таким образом, роль системы m6A метилирования и, в особенности, отдельных компонентов m6A метилирования в жизненном цикле ВГВ и взаимодействии ВГВ с клетками человека остаётся неясной.

В данной работе проводили оценку влияния блокады экспрессии за счёт CRISPR/Cas9-опосредованного нокаута генов и гиперэкспрессии отдельных факторов системы m6A метилирования на репликацию ВГВ в клетках человека, а именно — белков-писателей METTL3, METTL14, METTL16, белка-стирателя FTO и белков-читателей JMJD6 и hnRNPA2B1. Факторы были подобраны таким образом, чтобы в исследовании участвовало как минимум по одному фактору из каждой группы: писатели, читатели, стиратели. Для нокаута факторов использовали высокоспецифическую систему CRISPR/Cas9 от организма *Streptococcus thermophilus* (StCas9) [22, 23]. Применение нокаута вместо нокдауна позволило, в том числе, оценить влияние на поздних временных точках, а именно на 10 и 14 день.

В результате, было показано, что нокаут генов *METTL3*, *METTL14*, *METTL16*, *FTO*, *JMJD6* либо *hnRNPA2B1* приводит к повышению уровня пгРНК и ккзДНК ВГВ. Гиперэкспрессия любого из вышеперечисленных факторов, за исключением hnRNPA2B1, приводит к снижению уровней ккзДНК ВГВ в клетке. Следовательно, указанные факторы могут участвовать в подавлении репликации ВГВ.

МЕТОДИКА

Клеточная культура

Эксперименты проводили на клеточной линии HepG2 [24] (рис. 1). Клетки культивировали в полной среде DMEM с глутамином, содержание глюкозы — 4,5 г/л (“ПанЭко”, Россия), с добавлением 10% фетальной бычьей сыворотки (“Capricorn Scientific”, Германия), 2 мкМ L-глутамина (“Capricorn Scientific”) и 1% пенициллин-стрептомицина (“ПанЭко”).

Получение рекомбинантной формы генома ВГВ

Для исследования влияния нокдаунов на вирусный цикл гепатита B клеточную линию ко-нуклеофицировали рекомбинантной ккзДНК, полученной по технологии minicircle [25], описанной ранее [26]. Вкратце, в векторе pMC.CMV-MCS-EF1α-GFP-SV40polyA последовательность между сайтами рекомбинации attP и attB была заменена на последовательность, кодирующую ккзДНК ВГВ, с помощью набора Gibson Assembly Cloning (“New England Biolabs”, США). Полученная плазмида была трансформирована в клетки ZYCY10P3S2T, способные экспрессировать интегразу PhiC31, которая необходима для рекомбинации плазмиды minicircle в присутствии арабинозы. Колонии клеток далее инокулировали в среду Terrific Broth (“Диаэм”, Россия) и инкубировали 16 ч на шейкер-инкубаторе IKA KS4000 ic (“IKA-Werke GmbH & Co. KG”, Германия) при 37°C и 250 оборотах в минуту (о.в.м). Через 16 ч к ночной культуре была добавлена среда Induction Media (бульон LB, содержащий 0,2% арабинозы). После этого, бактериальную культуру инкубировали 3 ч при 30°C и 250 о.в.м и 1 ч при 37°C и 250 о.в.м. для получения рекомбинированной ккзДНК (рккзДНК). Выделение плазмиды производили с помощью набора Maxi для выделения плазмидной ДНК из бактериальных клеток (“Биолабмикс”, Россия).

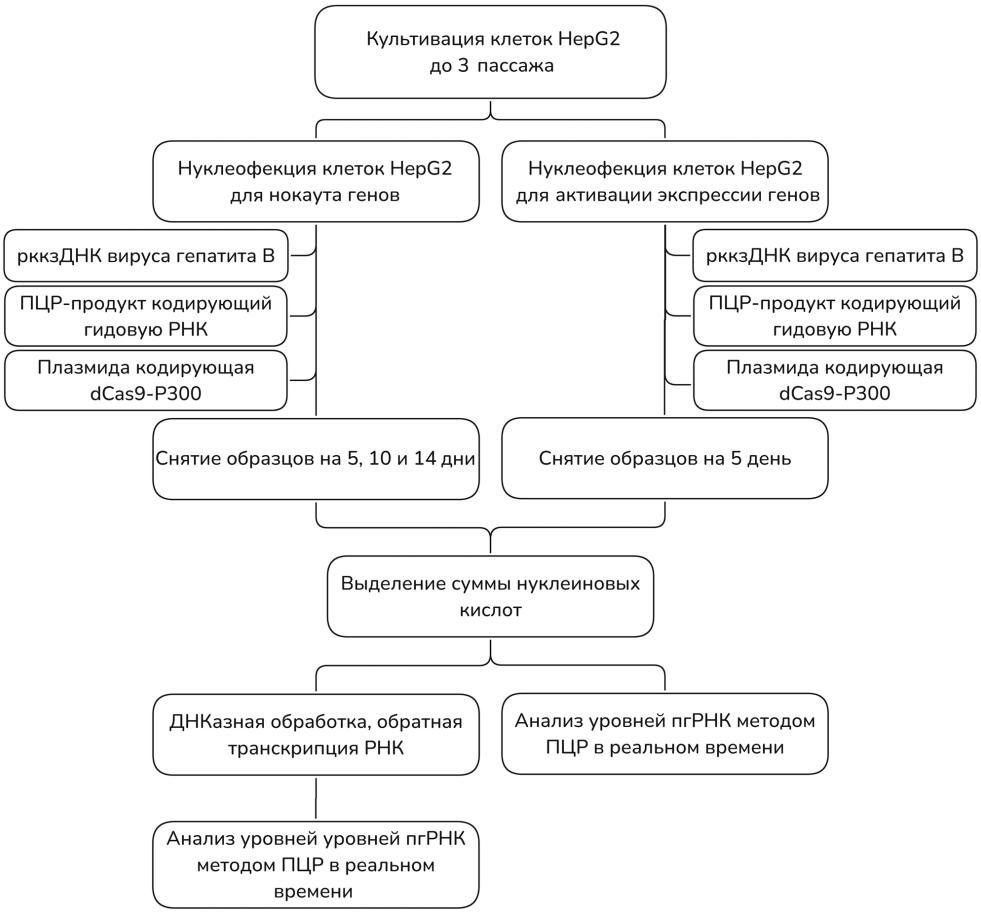

Рисунок 1. Схема эксперимента.

Нуклеофекция

Для нуклеофекции монослой клеток HepG2 был диссоциирован с помощью трипсина (“ПанЭко”) и ресуспендирован в среде OptiMem™ (“Thermo Fisher Scientific”, Gibco™, США). Затем к полученной суспензии были добавлены плазмида и ПЦР-продукт из расчёта 10 мкг плазмиды и 200 нг ПЦР-продукта на 1 млн клеток. Полученная суспензия была перенесена в кювету для электропорации Electroporation Cuvette 0.2 cm gap (“BioRad”, США), после чего была произведена электропорация с помощью электропоратора GenePulser Xcell (“BioRad”) с предустановленным заводским протоколом электропорации с наименованием COS7. После этого клетки были посажены на 6-ти луночные планшеты и культивированы, как было описано ранее.

Нокаут генов

Для нокдауна генов использовали систему нуклеаз StCas9. При нокауте гена с помощью данной системы, РНК-проводник подбирается таким образом, чтобы разрезание происходило в области экзона, который присутствует во всех транскриптах целевого гена. После разрезания, образовавшиеся концы ДНК репарируются по пути негомологичного соединения концов, что приводит к возникновению мутаций сдвига рамки считывания, возникновению стоп-кодонов с последующим нонсенс-опосредованным распадом РНК [27].

С помощью программного обеспечения CHOPCHOP [28] были подобраны РНК-проводники для StCas9 к экзонам целевых генов (рис. 2), таким образом, чтобы целевая последовательность составляла 20 нуклеотидов в длину, при этом отсутствовали нецелевые регионы генома с двумя и менее несовпадениями нуклеотидов (табл. 1). Методом ПЦР с перекрывающимися праймерами были получены ПЦР-продукты, каждый из которых кодирует U6 промотор, целевую последовательность и скаффолд гидовой РНК. U6 промотор и скаффолд гидовой РНК были получены с плазмиды MST1 sgRNA (“Addgene”, США), а целевая последовательность была образована 20-нуклеотидной перекрывающейся последовательностью праймеров.

Клетки HepG2 (54 пассаж стока в соответствии с сопроводительной документацией ATCC, 3 пассаж в лаборатории) были ко-нуклеофицированы рккзДНК, ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник и плазмидой, кодирующей белок StCas9 (“Addgene”).

Активация экспрессии генов

Для активации экспрессии генов использовали химерный белок, состоящий из dCas9 с пришитой к нему ацетилтрансферазой гистонов p300. За счёт точечных мутаций в нуклеолитических доменах белок dCas9 лишён своей нуклеолитической активности, однако сохраняет способность целенаправленно связываться с цепью ДНК.

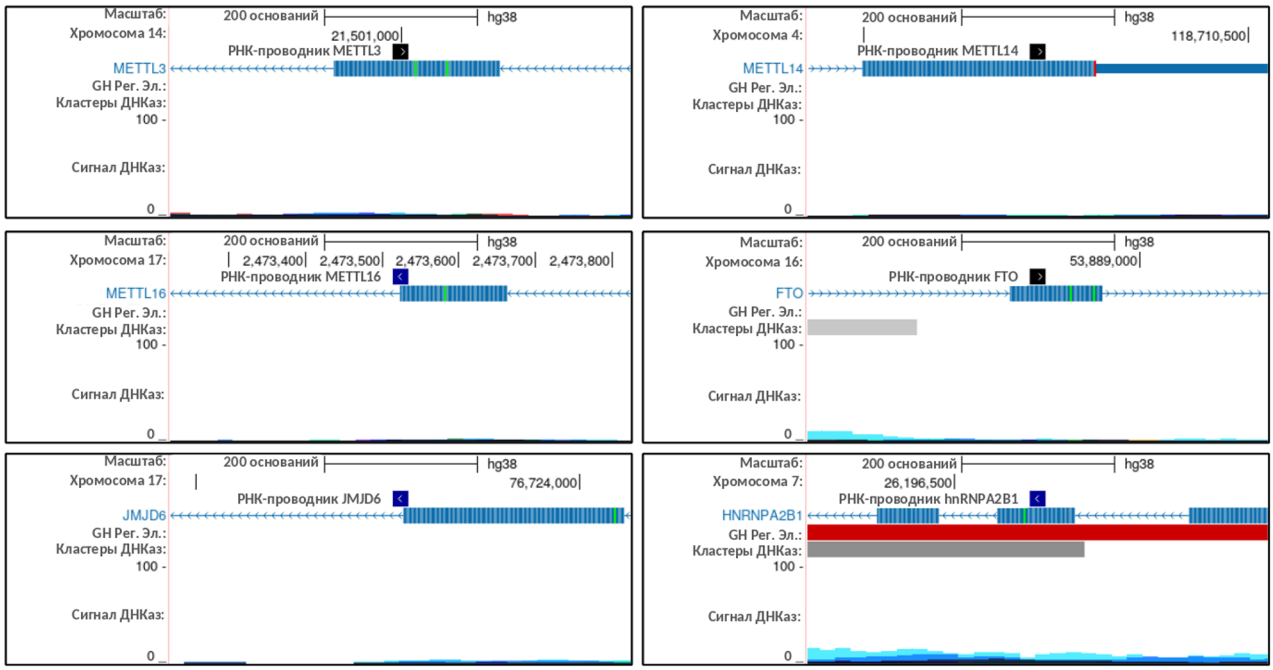

Рисунок 2. Дизайн РНК-проводников к экзонам генов для CRISPR-нокаута генов m6A. Дизайн РНК-проводников проводили с помощью ресурсов CHOPCHOP, CCTop и с использованием браузера UCSC. При дизайне РНК-проводников учитывали расположение промотора, наличие изоформ РНК, наличие сайтов чувствительности к ДНКазе I типа и возможные нецелевые мишени РНК-проводников.

Таблица 1. Целевые последовательности, подобранные для нокаута факторов системы m6A

Название РНК-проводника	Последовательность
METTL3 KO1	CACCTCAGGTACCTGTCTGC
METTL3 KO2	GGTCTTTGCTGCCAGGGGCC
METTL14 KO1	GAACTTCTGCTGGCCGTGGA
METTL14 KO2	GAAATAGATCTAACTTCCGA
METTL16 KO1	GATATGTGTTTCAACTATGC
METTL16 KO2	TCTCATAAAAGGTTAGCGCC
JMJD6 KO 1	TACCAGGTATAGATGAACTG
JMJD6 KO2	GGCCCCATCACAAACCACCT
hnRNPA2B1 KO1	TAAGAAAGGCTTTGTCTAGA
hnRNPA2B1 KO2	TCTGAATTTTTCATTCCAGT
FTO KO1	TTGGTTTCAAGGCAATCGAT
FTO KO2	GATCATCTACAGGAAAAACA

Таблица 2. Целевые последовательности для активации экспрессии факторов системы m6A

Название РНК-проводника	Последовательность
METTL3	GTTGCTTATAGACGCGCATG
METTL14	CGCGCCGGAAGTCTCTACTG
METTL16	AGAAACCCTCGCGACACCTG
FTO	CTATAGCGCCGACAGCGTGG
hnRNPA2B1	CTGGGCGAGCACGATTTCCG
JMJD6	TACGCGACGGCCTGACGTAG

Подобная доставка p300 в область дистального энхансера позволяет активировать транскрипцию целевого гена [29]. РНК-проводники для активации экспрессии генов были подобраны к промоторным участкам с помощью программного обеспечения CHOPCHOP [28] для SpCas9, таким образом, чтобы отсутствовали нецелевые взаимодействия с двумя и менее несовпадениями нуклеотидов, а целевая последовательность составляла 20 нуклеотидов в длину (табл. 2). ПЦР продукты, каждый из которых кодирует U6 промотор, целевую последовательность и скаффолд гидовой РНК. Промотор U6 и скаффолд были получены с плазмиды pLX-sgRNA (“Addgene”). Целевая последовательность была образована 20-нуклеотидной перекрывающейся последовательностью праймеров.

Клетки HepG2 (54 пассаж стока в соответствии с сопроводительной документацией ATCC, 3 пассаж в лаборатории) были нуклеофицированы рекомбинантной ккзДНК, ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник под контролем промотора U6 и плазмидой, кодирующей систему dCas9-P300 (“Addgene”).

Выделение нуклеиновых кислот

Тотальную РНК и ДНК выделяли из клеточного образца с помощью набора РИБО-преп (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии, Россия) в соответствии с протоколом производителя. В полученном образце анализировали уровень ккзДНК ВГВ, как указано далее. Часть тотальной ДНК и РНК была подвержена ДНКазной обработке (DNAse I, “New England Biolabs”) для удаления ДНК. Полученная РНК была повторно выделена с помощью набора РИБО-преп для удаления ДНКазы, после чего была подвергнута обратной транскрипции с помощью набора РЕВЕРТА L (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии). В полученном образце, содержащем кДНК, анализировали уровень пгРНК ВГВ, как указано далее.

ПЦР в реальном времени

Уровни пгРНК в клетке измеряли относительно уровня мРНК GAPDH. Уровни ккзДНК в клетке измеряли относительно гена β-глобина. Для определения уровня пгРНК использовали прямой GGTCCCCTAGAAGAAGAACTCCCT и обратный CATTGAGATTCCCGAGATTGAGAT праймеры, уровень мРНК GAPDH определяли с помощью CCAGGTGGTCTCCTCTGACTT и GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT после обратной ДНКазной обработки и обратной транскрипции. Уровни ккзДНК определяли с помощью праймеров CCGTGTGCACTTCGCTTCA и GCACAGCTTGGAGGCTTGA. Уровень гена β-глобина — с помощью набора V31-FEP-CE — AmpliSens® HPV HCR-Screen (CRIE) (Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии).

Статистический анализ

Статистический анализ данных выполняли с помощью программы GraphPad Prism. Статистическая значимость относительно контроля определялась с помощью *t*-критерия Стьюдента. Значение считали статистически значимым при $p<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Дизайн CRISPR/Cas9 систем для расщепления целевых регионов ДНК

Активность StCas9 с выбранными РНК-проводниками оценивали в реакции нуклеолитического расщепления *in vitro*. Для этого с помощью ПЦР проводили ДНК-амплификацию целевого фрагмента гена с генома клеток HepG2, инкубировали ДНК с комплексом рекомбинантного белка StCas9 и выбранным РНК-проводником. Целевое расщепление ДНК регистрировали по образованию ДНК-полос с меньшей молекулярной массой, образованных в результате расщепления целевой ДНК в центральном регионе. Была продемонстрирована высокая нуклеолитическая активность с расщеплением до 100% целевой ДНК (рис. 3). Ряд РНК-проводников не продемонстрировал эффективного разрезания. В результате, для каждого гена было выбрано по одному РНК-проводнику для разрезания и нокаута гена.

Нокаут генов, кодирующих белки системы м6А метилирования влияет на уровень пгРНК гепатита В

После валидации РНК-проводников клетки HepG2 были нуклеофицированы системой CRISPR/Cas9, направленной к конкретным генам, и рккзДНК ВГВ. В качестве контроля использовали CRISPR/Cas9 систему с нецелевым РНК-проводником. Эффективность трансфекции составляла ~85% [30, 31]. Влияние нокаута факторов на репликацию ВГВ проводили в динамике на 5, 10 и 14 сутки после нуклеофекции по изменению уровней пгРНК (рис. 4) и рккзДНК (рис. 5) ВГВ.

В результате было показано, что на пятые сутки нокаут любого из генов, кодирующих белки-писатели (*METTL3*, *METTL14*, *METTL16*) вызывал значимое ($p<0,005$) повышение уровней пгРНК (рис. 4А). При нокауте *METTL3* было отмечено повышение уровня пгРНК более чем в два раза (Среднее (СР): 2,37; $p=0,000006$), *METTL16* — почти в 100 раз (СР: 97,63; $p=0,001563$), а при нокауте *METTL14* — вплоть до 2,5 тысяч раз (Нокаут 1 (КО1) — СР: 2,65; $p=0,000547$; КО2 — СР: 2505,98; $p=0,000339$).Следовательно, белки-писатели могут снижать стабильность РНК ВГВ, а нокдаун писателей м6А — способствовать репликации ВГВ. Полученные результаты согласуются с ранее опубликованной работой, в которой была показана стабилизация пгРНК ВГВ при нокдауне обоих генов *METTL3*/*METTL14* [15]. В дальнейшем уровни пгРНК постепенно снижались и к 14 суткам оказывались на уровне либо ниже контрольных значений, что может быть связано со снижением онкогенных свойств модельных клеток HepG2, снижением жизнеспособности в результате нокаута генов-писателей, либо в связи с неизученными на сегодняшний день механизмами взаимодействия системы м6А метилирования с пгРНК ВГВ.

Нокаут гена белка-стирателя *FTO* также приводил к значительному увеличению уровней пгРНК (*FTO* КО2 СР: 21,01; $p=0,0002$) (рис. 4Б). Ранее было выявлено, что нокдаун *METTL3*/*METTL14* приводил к снижению обратной транскрипции пгРНК, а нокдаун *FTO*, напротив, приводил к её усилению. Аналогично, двойной нокдаун *METTL3*/*METTL14* повышал экспрессию белков HBc и HBs, в то время как нокдаун генов *ALKBH5* и *FTO* снижал уровни HBc и HBs [15].

Нокаут генов белков-читателей *JMJD6* и *hnRNPA2B1* вызывал повышение уровня пгРНК уже на пятый день (рис. 4В). В образцах с нокаутом

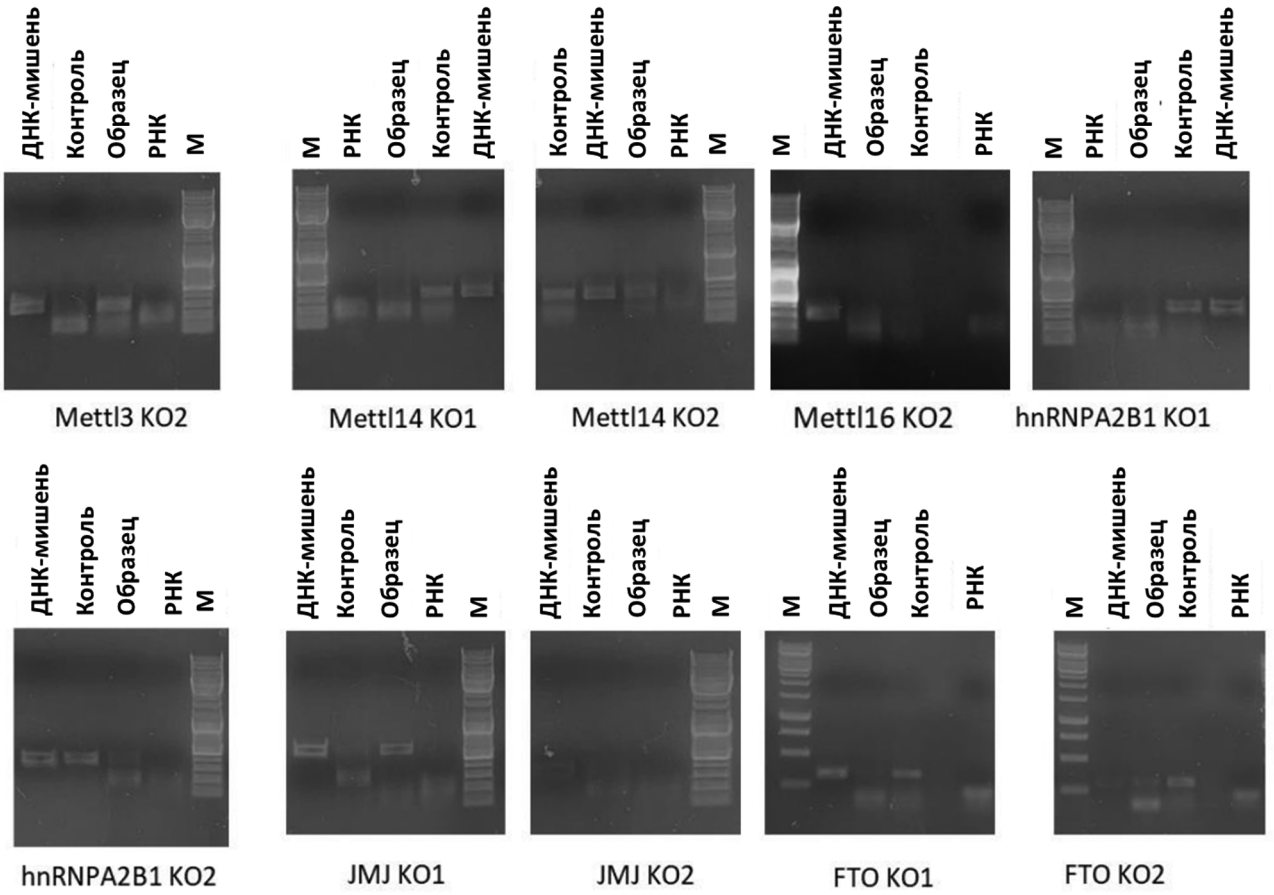

Рисунок 3. Результаты *in vitro* разрезания ДНК-мишени белком StCas9 с соответствующим РНК-проводником. Представлены результаты *in vitro* разрезания с РНК-проводниками к генам *hnRNPA2B1*, *METTL3*, *METTL14*, *JMJD6*, *FTO* и *METTL16*. KO1 и KO2 – РНК-проводники к мишеням 1 и 2 соответственно. М – маркер молекулярных масс; РНК – контроль РНК без ДНК-матрицы и белка StCas9; Образец – образец, содержащий все компоненты реакции; Контроль – контрольный образец, содержащий все компоненты реакции, но не содержащий белка StCas9; ДНК-мишень – образец целевой ДНК-мишени.

hnRNPA2B1 было отмечено повышение уровня пгРНК, более чем в 490 раз (СР: 496,9; p=0,000008), в то время как нокаут *JMJD6* вызвал более чем 10-кратный подъём уровня пгРНК (СР: 10,81; p=0,007818). Однако, с течением времени, при нокауте *hnRNPA2B1* происходило снижение уровня пгРНК: к 14 дню его уровень составил около трети от контрольного значения (СР: 0,032318; p<0,000001). Нокаут *JMJD6*, напротив, к 14 дню привёл к резкому повышению уровня пгРНК (СР: 8364; p=0,000599).

Приведённые данные свидетельствуют об ограничении транскрипции ВГВ каждым из изученных факторов на уровне базальной экспрессии. При этом наибольшей активностью в ограничении транскрипции ВГВ обладают факторы METTL14, METTL16, METTL3, hnRNPA2B1 и JMJD6.

Нокаут белков системы м6А метилирования влияет на уровень ккзДНК гепатита В

Помимо транскрипции, одними из ключевых этапов жизненного цикла ВГВ являются образование и поддержание пула ккзДНК в ядрах инфицированных клеток. Анализ влияния нокаута генов системы м6А на уровни ккзДНК продемонстрировал результаты, практически идентичные данным по оценке транскрипции ВГВ. Показано, что нокаут генов *METTL14*, *METTL16*, *METTL3* резко усиливает уровни ккзДНК в клетках HepG2 (рис. 5А–В). При этом нокаут гена *FTO* значимо снижает уровни ккзДНК. Нокауты белков-читателей hnRNPA2B1 и JMJD6 также снижали уровни ккзДНК, но только на пятые сутки. На 10 и 14 сутки значимых отличий от контрольных уровней обнаружено не было (рис. 5Б).

Влияние нокаута и активации ключевых факторов системы м6А на репликацию ВГВ

Для прямого сравнения нокаута и гиперэкспрессии генов системы м6А проводили трансфекцию клеток HepG2 с рккзДНК ВГВ системой нуклеаз CRISPR/Cas9 (для нокаута гена) либо CRISPRa с системой dCas9-p300 (для гиперэкспрессии) и анализ уровней ккзДНК ВГВ на 5 сутки после начала эксперимента. Более поздние временные точки сравнить не представлялось возможным в связи с транзиентностью активации транскрипции с помощью системы dCas9-p300. В результате, для группы факторов-писателей *METTL3*, *METTL14*, *METTL16* (рис. 6А), стирателя *FTO* (рис. 6Б) и читателя *JMJD6* (рис. 6В) был продемонстрирован провирусный эффект нокаута и противовирусный —

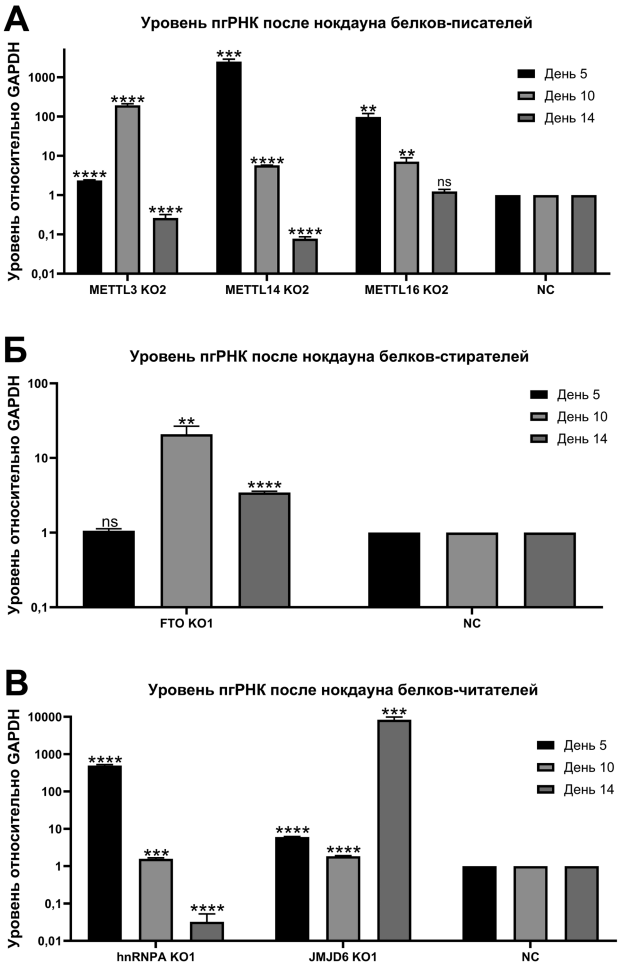

Рисунок 4. Уровни пгРНК ВГВ относительно мРНК GAPDH в клетках при нокауте факторов системы м6А. Клетки HepG2 были ко-нуклеофицированы ркккзДНК ВГВ, плазмидой, кодирующей StCas9 и ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник и U6 промотор, в трипликатах. Уровни пгРНК в образцах были проанализированы на 5, 10 и 14 сутки с помощью количественного ПЦР. В качестве контроля использован РНК-проводник (NC), не направленный к мишеням в геномах клетки и вируса. Планки погрешности соответствуют стандартным отклонениям. Статистическую значимость рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. ***p*<0,01, ****p*<0,001, *****p*<0,0001, ns – незначимо. пгРНК – прегеномная РНК ВГВ. КО – нокаут. NC – РНК-проводник, для которого отсутствует комплиментарная последовательность в геноме ВГВ и геноме человека.

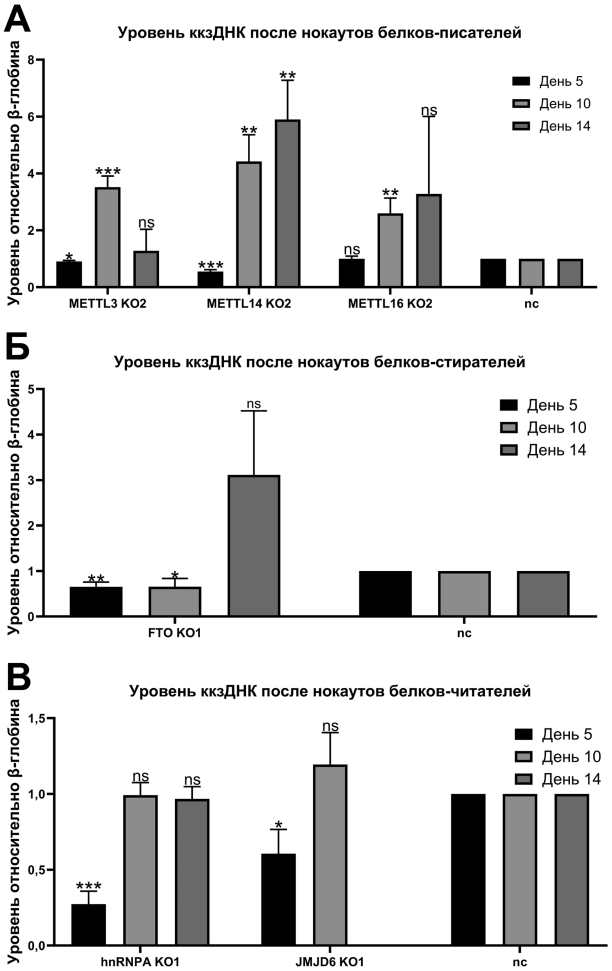

Рисунок 5. Динамика изменения уровней ккзДНК ВГВ при нокауте факторов м6А. Клетки HepG2 ко-нуклеофицировали рекомбинантной ккзДНК, плазмидой, кодирующей stCas9 и ПЦР-продуктом, кодирующим РНК-проводник и промотор U6. Анализ уровней ркккзДНК проводили на 5, 10 и 14 сутки после нуклеофекции. Планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям. Статистическую значимость рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. **p*<0,05, ***p*<0,01, ****p*<0,001, ns – незначимо. ккзДНК – короткая ковалентно-замкнутая ДНК ВГВ. КО – нокаут. NC – РНК-проводник, для которого отсутствует комплиментарная последовательность в геноме ВГВ и геноме человека.

гиперэкспрессии фактора. Следовательно, данные факторы на уровне базальной экспрессии ограничивают уровни репликации ВГВ, а при гиперэкспрессии могут оказывать противовирусное действие. Вместе с этим, гиперэкспрессия *hnRNPA2B1* (рис. 6В) не влияла на уровни ккзДНК ВГВ.

ОБСУЖДЕНИЕ И ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Влияние нокдаунов факторов м6А метилирования на уровни пгРНК ВГВ оценивали в ряде исследований. Так, к примеру, Imam и соавт. выявили, что двойной нокдаун *METTL3*/*METTL14* приводит к значительному увеличению стабильности пгРНК (с 6,5 ч до 15,9 ч) [15]. На 48 ч после нокдауна *METTL3*/*METTL14* отмечено повышение уровней общей РНК ВГВ [16, 18]. В данном исследовании увеличение уровней пгРНК происходило как при одиночном нокауте генов *METTL3* либо *METTL14*, так и при нокауте *METTL16*. Схожее провирусное действие нокаута факторов-писателей м6А выявлено и при измерении уровней ккзДНК ВГВ.

Так как деметилазы ALKBH5 и FTO удаляют м6А метилирование, их нокдаун зачастую вызывает эффекты, противоположные нокдауну метилтрансфераз. К примеру, нокдаун *FTO* и *ALKBH5* приводил к снижению экспрессии HBc и HBs, в то время как нокдаун *METTL3* и *METTL14*,

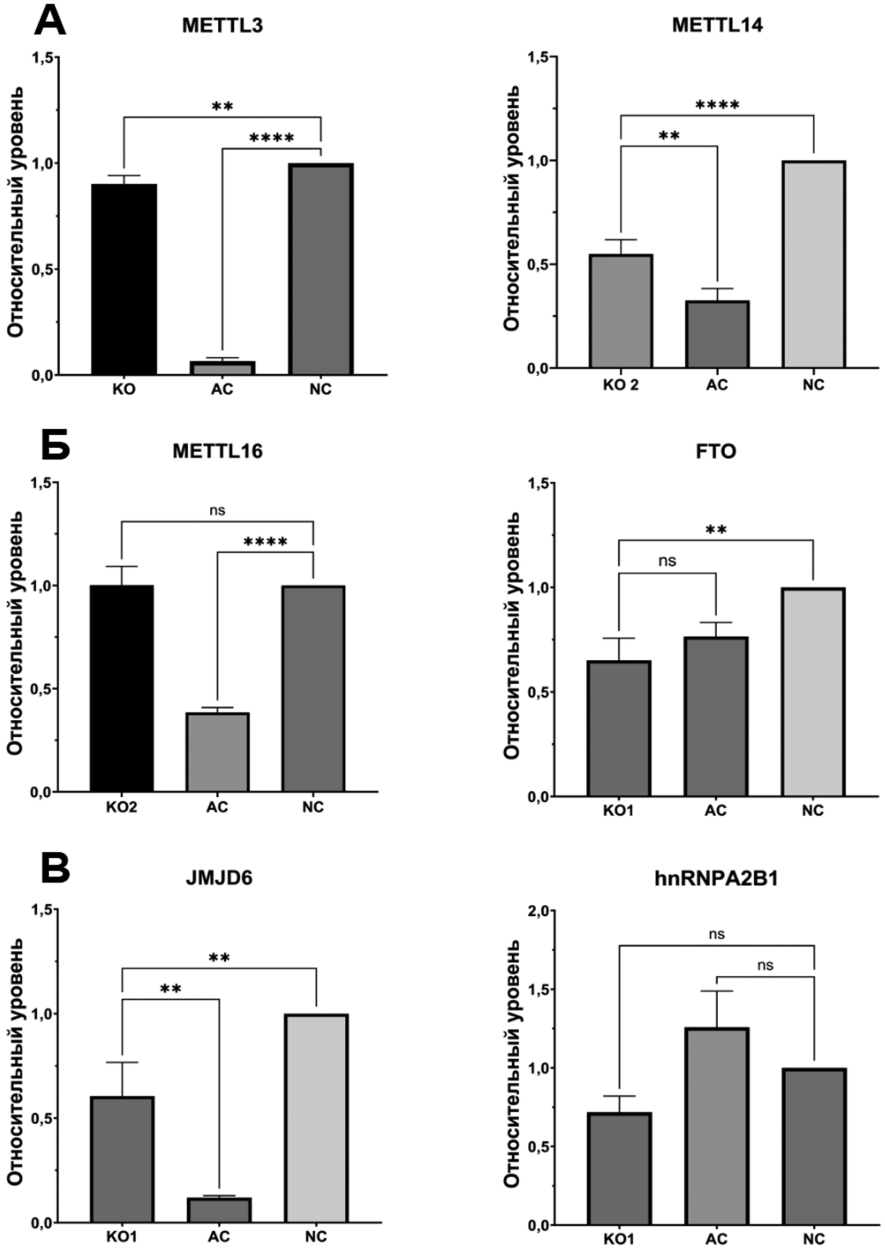

Рисунок 6. Влияние нокаутов (KO) и CRISPR-активации транскрипции (ACT) отдельных генов на уровни ккзДНК ВГВ. KD1 и KD2 – использование различных РНК-проводников к разным регионам целевого гена. Наличие одного KD означает, что только 1 РНК-проводник из 2 был активен по результатам *in vitro* теста по разрезанию ДНК-мишени. Статистическую значимость рассчитывали с помощью *t*-критерия Стьюдента. **p<0,01, ***p<0,001, ****p<0,0001, ns – незначимо. ккзДНК – короткая ковалентно-замкнутая ДНК ВГВ. KO – нокаут. NC – РНК-проводник, для которого отсутствует комплиментарная последовательность в геноме ВГВ и геноме человека.

наоборот, приводил к повышению экспрессии данных белков [15]. Тем не менее, нокдаун *FTO* увеличивал уровни пгРНК в клетке более, чем в 20 раз относительно контроля. Помимо этого, в данной работе впервые было изучено влияние нокдауна белков-читателей *JMJD6* и *hnRNPA2B1*. Продемонстрировано, что нокаут *hnRNPA2B1* не оказывает влияния, в то время как нокаут *JMJD6* резко (>8000 раз) увеличивает параметры транскрипции и репликации ВГВ.

Эксперименты с гиперэкспрессией факторов подтвердили роль METTL3, METTL14, METTL16 в ограничении репликации ВГВ. “Выключение” данных факторов системами нуклеаз CRISPR/Cas9 оказывало провирусный эффект, тогда как гиперэкспрессия — противовирусный. Таким образом можно заключить, что данные факторы препятствуют репликации ВГВ в клетках человека на уровне базальной экспрессии. Отдельно следует отметить наблюдения, что нокаут факторов FTO, JMJD6 либо hnRNPA2B1 приводил к повышению транскрипции пгРНК ВГВ, но вызывал снижение уровня ккзДНК по крайней мере на пятые сутки. В дальнейших исследованиях необходимо определить механизм действия этих факторов, их взаимодействие друг с другом, с РНК и белковыми факторами вируса и клеток человека.

ФИНАНСИРОВАНИЕ

Работа была выполнена при поддержке гранта РНФ № 22-75-10032, а также программы Приоритет 2030 (Сеченовский Университет).

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или с использованием животных в качестве объектов.

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Magnius L., Mason W.S., Taylor J., Kann M., Glebe D., Dény P., Sureau C., Norder H., ICTV Report Consortium* (2020) ICTV virus taxonomy profile: Hepadnaviridae. J. Gen. Virol., **101**(6), 571–572. DOI: 10.1099/jgv.0.001415
2. *Yuen M.-F., Chen D.-S., Dusheiko G.M., Janssen H.L.A., Lau D.T.Y., Locarnini S.A., Peters M.G., Lai C.-L.* (2018) Hepatitis B virus infection. Nat. Rev. Dis. Primers, **4**(1), 1–20. DOI: 10.1038/nrdp.2018.35
3. *Mendenhall M.A., Hong X., Hu J.* (2023) Hepatitis B virus capsid: the core in productive entry and covalently closed circular DNA formation. Viruses, **15**(3), 642. DOI: 10.3390/v15030642
4. *Tsukuda S., Watashi K.* (2020) Hepatitis B virus biology and life cycle. Antiviral Res., **182**, 104925. DOI: 10.1016/j.antiviral.2020.104925
5. *Wei L., Ploss A.* (2021) Hepatitis B virus cccDNA is formed through distinct repair processes of each strand. Nat. Commun., **12**(1), 1591. DOI: 10.1038/s41467-021-21850-9
6. *Seeger C., Mason W.S.* (2015) Molecular biology of hepatitis B virus infection. Virology, **479–480**, 672–686. DOI: 10.1016/j.virol.2015.02.031
7. *Ko C., Chakraborty A., Chou W.-M., Hasreiter J., Wettengel J.M., Stadler D., Bester R., Asen T., Zhang K., Wisskirchen K., McKeating J.A., Ryu W.-S., Protzer U.* (2018) Hepatitis B virus genome recycling and *de novo* secondary infection events maintain stable cccDNA levels. J. Hepatol., **69**(6), 1231–1241. DOI: 10.1016/j.jhep.2018.08.012
8. *Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Ponomareva N., Zakirova N.F., Egorshina A., Yanvarev D.V., Bayurova E., Sudina A., Goptar I., Nikiforova A., Dunaeva E., Lisitsa T., Abramov I., Frolova A., Lukashev A., Gordeychuk I., Zamyatnin A.A. Jr., Ivanov A., Chulanov V.* (2023) Depleting hepatitis B virus relaxed circular DNA is necessary for resolution of infection by CRISPR-Cas9. Molecular Therapy. Nucleic Acids, **31**, 482–493. DOI: 10.1016/j.omtn.2023.02.001
9. *Brezgin S., Kostyusheva A., Bayurova E., Gordeychuk I., Isaguliants M., Goptar I., Nikiforova A., Smirnov V., Volchkova E., Glebe D., Kostyushev D., Chulanov V.* (2019) Replenishment of hepatitis B virus cccDNA pool is restricted by baseline expression of host restriction factors *in vitro*. Microorganisms, **7**(11), 533. DOI: 10.3390/microorganisms7110533
10. *Jiang X., Liu B., Nie Z., Duan L., Xiong Q., Jin Z., Yang C., Chen Y.* (2021) The role of m6A modification in the biological functions and diseases. Signal Transduct. Target. Ther., **6**(1), 1–16. DOI: 10.1038/s41392-020-00450-x
11. *Karandashov I., Kachanov A., Dukich M., Ponomareva N., Brezgin S., Lukashev A., Pokrovsky V.S., Chulanov V., Kostyusheva A., Kostyushev D.* (2024) m6A methylation in regulation of antiviral innate immunity. Viruses, **16**(4), 601. DOI: 10.3390/v16040601
12. *Dominissini D., Moshitch-Moshkovitz S., Schwartz S., Salmon-Divon M., Ungar L., Osenberg S., Cesarkas K., Jacob-Hirsch J., Amariglio N., Kupiec M., Sorek R., Rechavi G.* (2012) Topology of the human and mouse m6A RNA methylomes revealed by m6A-seq. Nature, **485**(7397), 201–206. DOI: 10.1038/nature11112
13. *Wang S., Lv W., Li T., Zhang S., Wang H., Li X., Wang L., Ma D., Zang Y., Shen J., Xu Y., Wei W.* (2022) Dynamic regulation and functions of mRNA m6A modification. Cancer Cell Int., **22**(1), 48. DOI: 10.1186/s12935-022-02452-x
14. *Kostyusheva A., Brezgin S., Glebe D., Kostyushev D., Chulanov V.* (2021) Host-cell interactions in HBV infection and pathogenesis: the emerging role of m6A modification. Emerg. Microbes Infect., **10**(1), 2264–2275. DOI: 10.1080/22221751.2021.2006580
15. *Imam H., Khan M., Gokhale N.S., McIntyre A.B.R., Kim G.-W., Jang J.Y., Kim S.-J., Mason C.E., Horner S.M., Siddiqui A.* (2018) N6-methyladenosine modification of hepatitis B virus RNA differentially regulates the viral life cycle. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **115**(35), 8829–8834. DOI: 10.1073/pnas.1808319115
16. *Kim G.-W., Moon J.-S., Siddiqui A.* (2022) N6-methyladenosine modification of the 5′ epsilon structure of the HBV pregenome RNA regulates its encapsidation by the viral core protein. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **119**(7), e2120485119. DOI: 10.1073/pnas.2120485119
17. *Murata T., Iwahori S., Okuno Y., Nishitsuji H., Yanagi Y., Watashi K., Wakita T., Kimura H., Shimotohno K.* (2023) N6-methyladenosine modification of hepatitis B virus RNA in the coding region of HBX. Int. J. Mol. Sci., **24**(3), 2265. DOI: 10.3390/ijms24032265
18. *Kim G.-W., Siddiqui A.* (2021) Hepatitis B virus X protein recruits methyltransferases to affect cotranscriptional N6-methyladenosine modification of viral/host RNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **118**(3), e2019455118. DOI: 10.1073/pnas.2019455118
19. *Kim G.-W., Imam H., Khan M., Siddiqui A.* (2020) N6-methyladenosine modification of hepatitis B and C viral RNAs attenuates host innate immunity via RIG-I signaling. J. Biol. Chem., **295**(37), 13123–13133. DOI: 10.1074/jbc.RA120.014260
20. *Kim G.-W., Imam H., Khan M., Mir S.A., Kim S.-J., Yoon S.K., Hur W., Siddiqui A.* (2021) HBV-induced increased N6 methyladenosine modification of PTEN RNA affects innate immunity and contributes to HCC. Hepatology, **73**(2), 533–547. DOI: 10.1002/hep.31313
21. *Imam H., Kim G.-W., Mir S.A., Khan M., Siddiqui A.* (2020) Interferon-stimulated gene 20 (ISG20) selectively degrades N6-methyladenosine modified hepatitis B virus transcripts. PLoS Pathogens, **16**(2), e1008338. DOI: 10.1371/journal.ppat.1008338
22. *Jiang F., Doudna J.A.* (2017) CRISPR-Cas9 structures and mechanisms. Annu. Rev. Biophys., **46**, 505–529. DOI: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822
23. *Hao M., Cui Y., Qu X.* (2018) Analysis of CRISPR-Cas system in streptococcus thermophilus and its application. Front. Microbiol., **9**, 257. DOI: 10.3389/fmicb.2018.00257

24. Hep G2 [HEPG2] - HB-8065 | ATCC. Retrieved June 25, 2024, from: https://www.atcc.org/products/hb-8065
25. Minicircle Technology | System Biosciences. Retrieved June 25, 2024, from: https://www.systembio.com/products/gene-expression-systems/minicircle-technology
26. *Guo X., Chen P., Hou X., Xu W., Wang D., Wang T., Zhang L., Zheng G., Gao Z., He C.-Y., Zhou B., Chen Z.-Y.* (2016) The recombined cccDNA produced using minicircle technology mimicked HBV genome in structure and function closely. Sci. Rep., **6**(1), 25552. DOI: 10.1038/srep25552
27. *Campenhout C.V., Cabochette P., Veillard A.-C., Laczik M., Zelisko-Schmidt A., Sabatel C., Dhainaut M., Vanhollebeke B., Gueydan C., Kruys V.* (2019) Guidelines for optimized gene knockout using CRISPR/Cas9. BioTechniques, **66**(6), 295–302. DOI: 10.2144/btn-2018-0187
28. CHOPCHOP. Retrieved January 15, 2025, from: https://chopchop.cbu.uib.no/
29. *Brezgin S., Kostyusheva A., Kostyushev D., Chulanov V.* (2019) Dead Cas systems: types, principles, and applications. Int. J. Mol. Sci., **20**(23), 6041. DOI: 10.3390/ijms20236041
30. *Kostyushev D., Kostyusheva A., Brezgin S., Zarifyan D., Utkina A., Goptar I., Chulanov V.* (2019) Suppressing the NHEJ pathway by DNA-PKcs inhibitor NU7026 prevents degradation of HBV cccDNA cleaved by CRISPR/Cas9. Sci. Rep., **9**(1), 1847. DOI: 10.1038/s41598-019-38526-6
31. *Kostyushev D., Brezgin S., Kostyusheva A., Zarifyan D., Goptar I., Chulanov V.* (2019) Orthologous CRISPR/Cas9 systems for specific and efficient degradation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. Cell. Mol. Life Sci., **76**(9), 1779–1794. DOI: 10.1007/s00018-019-03021-8

Поступила в редакцию: 13. 09. 2024.
После доработки: 17. 01. 2025.
Принята к печати: 22. 01. 2025.

THE m6A METHYLATION SYSTEM LIMITS HEPATITIS B VIRUS REPLICATION

A.V. Kachanov[1]*, S.A. Brezgin[1,2], N.I. Ponomareva[1,2], A.N. Lukashev[1], V.P. Chulanov[1,2], D.S. Kostyushev[1,3], A.P. Kostyusheva[1]

[1]Sechenov University, Martsinovsky Institute of Medical Parasitology,
8-2 Trubetskaya str., Moscow, 119991 Russia; *e-mail: kachanov.av99@gmail.com
[2]Sirius University of Science and Technology, Scientific Center for Genetics and Life Sciences, Sochi, Russia
[3]Lomonosov Moscow State University, Faculty of Bioengineering and Bioinformatics, Moscow, Russia

N6-methyladenosine (m6A) is a common RNA modification, which plays a critical role in RNA fate and regulating such aspects as splicing, stability, nuclear export, and translation efficiency. The introduction, removal, and recognition of m6A modifications in RNA are regulated by a number of factors, known as writer, eraser, and reader proteins. It is known that the m6A modification can play an important role in the life cycle of viruses, including hepatitis B virus. The m6A methylation system has a significant impact on the hepatitis B viral cycle (HBV), particularly, on stability of mRNA transcripts, encapsidation efficiency, and reverse transcription of HBV pgRNA. In this study, we assessed the effect of knockout and activation of expression of several factors of the m6A methylation system on the HBV viral cycle, including pregenomic RNA (pgRNA) and circular covalently closed DNA (cccDNA). The study was carried out using the StCas9 nuclease system for knockout and the dCas9-p300 system for activation of gene expression. The levels of pgRNA and cccDNA were estimated by real-time PCR. The data obtained show the restriction of the viral cycle at the basal level by the factors METTL3, METTL14, METTL16, FTO, JMJD6, and hnRNPA2B1, as well as suppression of the viral cycle with overexpression of all of the above factors, except for hnRNPA2B1.

The whole English version is available at http://pbmc.ibmc.msk.ru.

Keywords: hepatitis B; m6A factors; cccDNA; pgRNA

Funding. The work was supported by the Russian Science Foundation (project No. 22-75-10032, and by the academic leadership program Priority 2030 (Sechenov University).

Received: 13.09.2024; revised: 17.01.2025; accepted: 22.01.2025.