

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2018
УДК 616.36-002.2-022:578.891]-092

Костюшев Д.С.¹, Зуева А.П.^{1,2}, Брезгин С.А.^{1,3}, Липатников А.Д.^{1,4}, Волчкова Е.В.³, Малеев В.В.¹, Чуланов В.П.^{1,3}

РОЛЬ ДНК-МЕТИЛТРАНСФЕРАЗ В ЖИЗНЕННОМ ЦИКЛЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА В И ПАТОГЕНЕЗЕ ХРОНИЧЕСКОГО ГЕПАТИТА В

¹ФБУН «Центральный НИИ эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва;

²ФГБОУ ВПО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», 119991, г. Москва;

³ФГАОУ ВО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздрава России, 119991, г. Москва;

⁴ФГБОУ ВПО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева», 125047, г. Москва

Хронизация гепатита В связана с образованием вирусом гепатита В (HBV) персистентной формы вируса, кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК). Стабильность ккзДНК связана с внутриядерной локализацией и образованием мини-хромосомы, регулируемой эпигенетическими механизмами. Одним из основных механизмов эпигенетической регуляции является метилирование ДНК по CpG-островкам. При хроническом гепатите В уровни экспрессии ДНК-метилтрансфераз значительно повышены. Тем не менее роль ДНК-метилтрансфераз в жизненном цикле HBV и их действие на клетку остаются малоизученными. В этом обзоре представлены передовые достижения в изучении роли ДНК-метилтрансфераз при хроническом гепатите В и на моделях HBV *in vitro*.

Ключевые слова: обзор; вирус гепатита В; хронический гепатит В; ДНК-метилтрансферазы; транскрипция; метилирование; генотипы.

Для цитирования: Костюшев Д.С., Зуева А.П., Брезгин С.А., Липатников А.Д., Волчкова Е.В., Малеев В.В., Чуланов В.П. Роль ДНК-метилтрансфераз в жизненном цикле вируса гепатита В и патогенезе хронического гепатита В. *Вопросы вирусологии*. 2018; 63(1): 19-29. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-19-29>

Kostyushev D.S.¹, Zueva A.P.^{1,2}, Brezgin S.A.^{1,3}, Lipatnikov A.D.^{1,4}, Volchkova E.V.³, Maleyev V.V.¹, Chulanov V.P.^{1,3}

THE ROLE OF DNA-METHYLTRANSFERASES IN THE LIFE CYCLE OF HEPATITIS B VIRUS AND PATHOGENESIS OF CHRONIC HEPATITIS B

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation;

²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991, Russian Federation;

³I.M. Sechenov First State Medical University, Moscow, 119048, Russian Federation;

⁴D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, 125047, Russian Federation

Chronic hepatitis B is caused by a persistent form of hepatitis B virus, covalently closed circular DNA (cccDNA). Stability of cccDNA is associated with intracellular localization of cccDNA and formation of minichromosome, regulated by epigenetic mechanisms. One of the key mechanisms in epigenetics is methylation of DNA on CpG islands. Expression levels of DNA-methyltransferases (DNMTs) in chronic hepatitis B patients were shown to be upregulated. Nevertheless, the role of DNMTs in the life cycle of HBV and their effects on the cell remain elusive. In this review, we discuss latest achievements on the role of DNMTs in chronic hepatitis B and HBV *in vitro* models.

Keywords: hepatitis B virus; chronic hepatitis B; DNA-methyltransferases; γ -H2AX; transcription; HBsAg; methylation; genotypes.

For citation: Kostyushev D.S., Zueva A.P., Brezgin S.A., Lipatnikov A.D., Volchkova E.V., Maleyev V.V., Chulanov V.P. The role of DNA-methyltransferases in the life cycle of hepatitis B virus and pathogenesis of chronic hepatitis B. *Voprosy Virusologii (Problems of Virology, Russian journal)*. 2018; 63(1): 19-29. (In Russ.). DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-19-29>

For correspondence: Dmitry S. Kostyushev, junior scientist, Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, 111123, Russian Federation. E-mail: dk@rcvh.ru

Information about authors:

Kostyushev D.S., <http://orcid.org/0000-0002-1851-7441>; Volchkova E.V., <http://orcid.org/0000-0003-4581-4510>;

Maleyev V.V., <http://orcid.org/0000-0002-8508-4367>; Chulanov V.P., <http://orcid.org/0000-0001-6303-9293>

Acknowledgment. This work was supported by the Russian Science Foundation (Grant No. 16-15-10426).

Conflict of interest. The authors declare no conflict of interest.

Received 16 April 2017

Accepted 20 June 2017

Введение

Гепатит В — тяжелое заболевание, вызываемое вирусом гепатита В (HBV). HBV относится к семейству He-

padnaviridae, род *Orthohepadnaviridae*, и характеризуется высокой ткане- и видоспецифичностью, уникальной организацией генома и механизмом репликации. Суще-

Для корреспонденции: Костюшев Дмитрий Сергеевич, мл. науч. сотр., ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, 111123, г. Москва. E-mail: dk@rcvh.ru

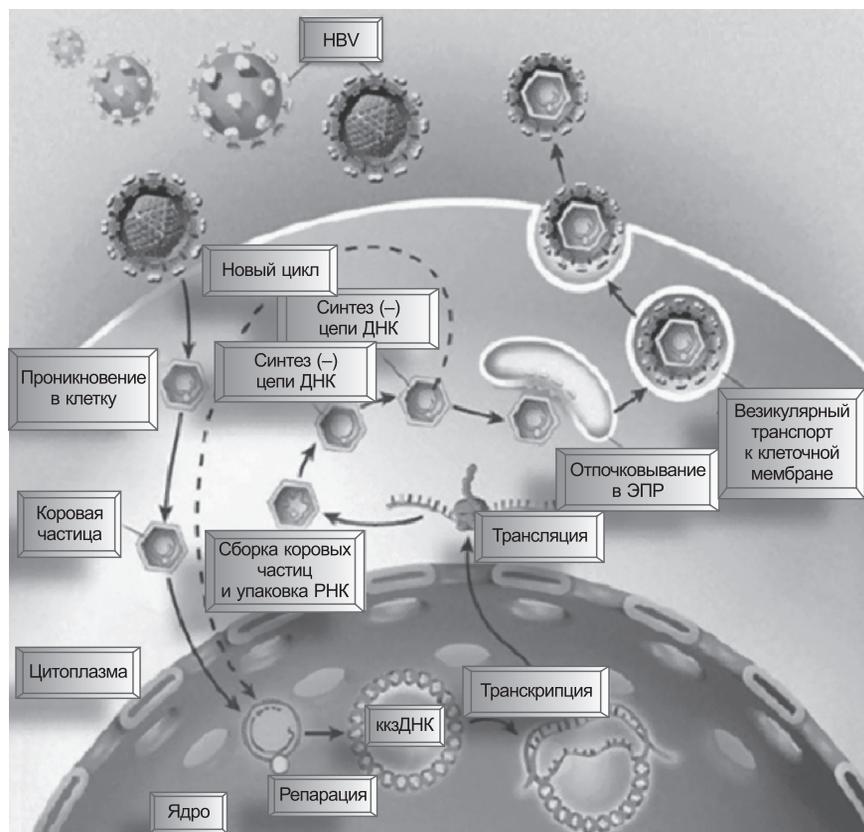


Рис. 1. Жизненный цикл HBV. ккзДНК является матрицей для транскрипции всех РНК HBV, включая пРНК. ЭПР — эндоплазматический ретикулум.

ствует 9 генотипов HBV (А — I), различие в нуклеотидных последовательностях между разными генотипами составляет около 8% [1].

По всему миру более 350 млн человек страдают от хронического гепатита В (ХГВ), который является причиной гибели более 1 млн человек ежегодно, что связано с исходами заболевания, такими как цирроз печени и гепатоцеллюлярная карцинома [2]. Несмотря на наличие эффективных программ вакцинации, ни один из современных методов терапии не приводит к полному излечению пациентов с ХГВ. Непосредственной причиной хронической инфекции и персистенции вируса в клетке является особая форма генома HBV, кольцевая ковалентно-замкнутая ДНК HBV (ккзДНК) (рис. 1) [3]. Матрицы ккзДНК способны в течение неограниченного срока находиться в ядре гепатоцитов и поддерживать репликацию вируса. ккзДНК существует в виде минихромосомы в комплексе с белками вируса, гистоновыми и негистоновыми белками клетки (рис. 2) [4].

ДНК-метилтрансферазы (ДНМТ) гиперэкспрессируются при инфицировании клеток HBV *in vitro* [5] и *in vivo* в гепатоцитах пациентов с ХГВ [6]. Увеличение уровней продукции ДНМТ обычно связывают с неспецифическим противовирусным ответом клетки. Действительно, ДНМТ могут метилировать ДНК HBV, подавлять транскрипцию вирусных мРНК и репликацию HBV [7, 8]. Длительная активация ДНМТ приводит к высокой частоте метилирования генома клеток, а также дисрегуляции многочисленных внутриклеточных процессов, связанных с трансформацией клеток и развитием рака.

В этом обзоре мы рассматриваем последние данные о механизмах активации ДНМТ, влиянии ДНМТ на жизненный цикл вируса, различиях в профилях метилирования ккзДНК среди разных генотипов HBV, действии ДНМТ и HBV на генетическую стабильность клеток и перспективах применения результатов исследований, касающихся метилирования ккзДНК, в разработке методов лечения ХГВ. В обзоре использованы как данные наиболее значимых работ, посвященных HBV, так и наши экспериментальные данные.

Жизненный цикл и структура HBV

HBV — ДНК-содержащий вирус млекопитающих. Основная форма генома представляет собой релаксированную кольцевую частично двухцепочечную ДНК (кчДНК), размер которой составляет примерно 3,2 кб (см. рис. 2). Цепи ДНК асимметричны, что является уникальной особенностью гепаднавирусов: цепь с негативной полярностью является полноразмерной, положительная цепь ДНК HBV имеет размер 1100—2600 нуклеотидов (нт). Незавершенная плюс-цепь всегда содержит одинаковый 5'-конец, в то время как 3'-конец обычно вариателен и может иметь разную длину. 5'-концы обеих цепей содержат прямые повторы

и регионы коротких повторяющихся последовательностей, которые являются ключевыми для репликации вирусного генома.

Минус-цепь незамкнута, содержит небольшой избыточный регион длиной 8—10 нт, к которому прикреплена субъединица полимеразы. Плюс-цепь кэпирована олигорибонуклеотидом на 5'-конце [9].

Образование ккзДНК

Точный механизм синтеза ккзДНК пока изучен недостаточно. Для конверсии кчДНК в ккзДНК необходима разборка нуклеокапсида и транспорт кчДНК в ядро. Депротенинизированная форма кчДНК является функциональным предшественником ккзДНК. Завершение синтеза плюс-цепи ДНК — важный шаг, ведущий к депротенинизации генома и структурным изменениям нуклеокапсида (табл. 1).

Таблица 1

Этапы конверсии кчДНК в ккзДНК

Этапы	События в процессе конверсии кчДНК в ккзДНК
1	Удаление Р-белка с 5'-конца минус-цепи ДНК
2	Удаление короткого РНК-олигомера, используемого для синтеза плюс-цепи ДНК
3	Удаление части минус-цепи ДНК с концевой избыточностью
4	Лигирование цепей ДНК

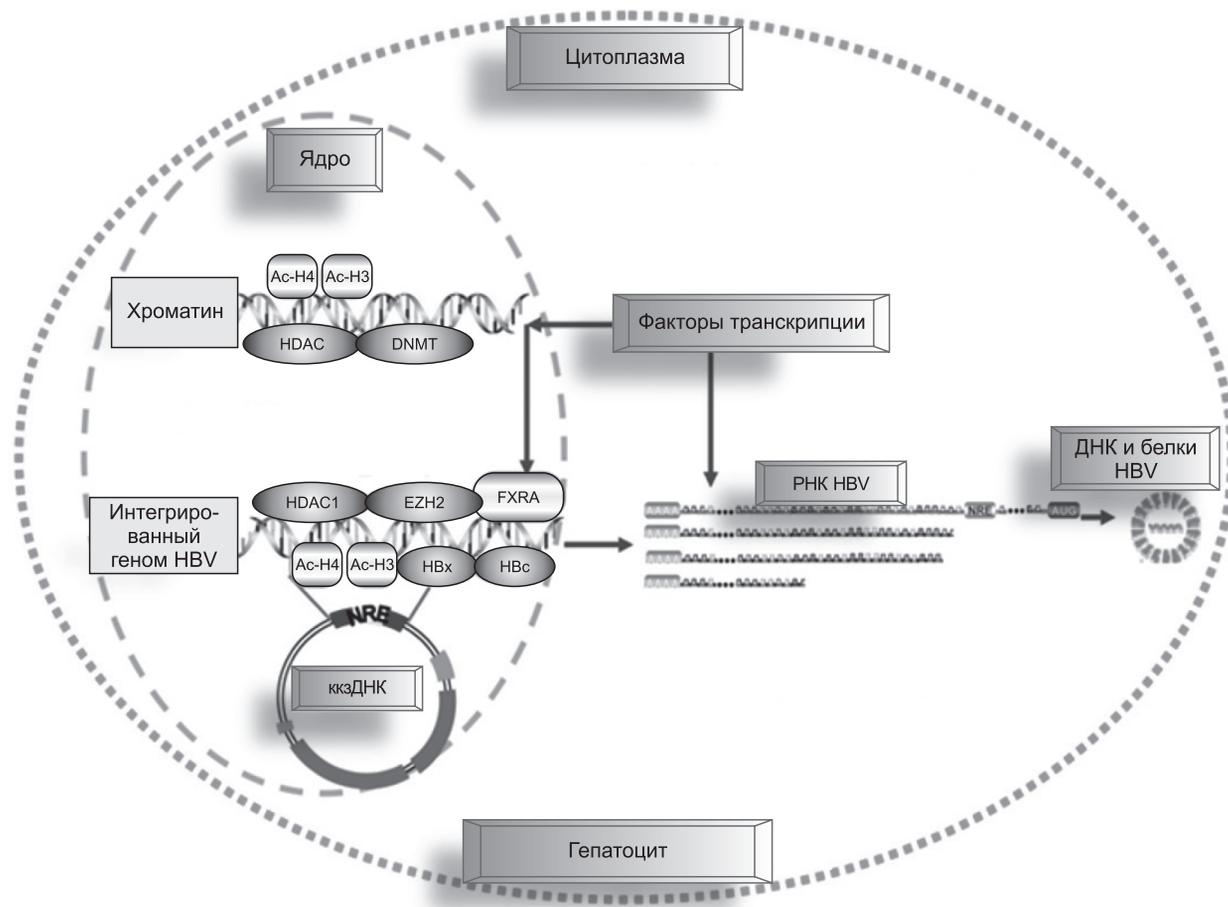


Рис. 2. Эпигенетическая регуляция активности ккзДНК HBV.

ДНК вируса гепатита В может интегрироваться в геном гепатоцитов и формировать минихромосомы ккзДНК в ядре. ккзДНК служит матрицей для вирусной транскрипции, образования ДНК и продукции белков вируса. Активность ккзДНК и интегрированной формы ДНК вируса гепатита В регулируется эпигенетическими механизмами клетки (HDAC1, DNMT) и белками вируса (HBx, HBc).

Сигналы ядерной локализации (NLS) на С-концах HBc-белка обеспечивают взаимодействие капсида с клеточными кариоферинами и способствуют импорту депротенинизированной формы ккзДНК в ядро для образования ккзДНК [4]. Синтезированная *de novo* ккзДНК ассоциируется с гистонами и существует в виде минихромосомы. Обычно в ядре гепатоцита находится до 50 копий ккзДНК, в то время как число копий ккзДНК на моделях HBV в культурах клеток человека *in vitro*, обычно используемых для изучения цикла и действия противовирусных препаратов, оказывается значительно ниже [10].

Геном эукариот представляет собой плотно упакованный хроматин, единицей строения которого является нуклеосома. Каждая нуклеосома состоит из гистоновых белков (по 2 копии каждого из 4 гистонов: H2A, H2B, H3 и H4 в одной нуклеосоме) и 200 пар оснований ДНК. ккзДНК также имеет нуклеосомную организацию и ассоциирована с гистоновыми и негистоновыми белками. Она формирует в ядре типичную структуру «бусин на нитке» и существует в виде минихромосомы. Известно, что в структуру минихромосомы входят HBc и HBx [11] (см. рис. 2). Также подтверждено наличие факторов транскрипции клетки CREB, YY1, STAT1 и STAT2, а также хроматинремоделирующих факторов PCAF, p300/

CBP, HDAC1, SIRT1 и EZH2 [12]. HBc в структуре минихромосомы связывается с двухцепочечной ДНК вируса, что приводит к уменьшению расстояния между нуклеопротеиновыми комплексами на 10%. Как и в хроматине клетки, характер модификации гистонов и расположение нуклеосом играют важную роль в регуляции транскрипции [13].

Регуляция активности ккзДНК

Поскольку ккзДНК существует в виде минихромосомы, ее транскрипционная активность регулируется эпигенетическими механизмами. Гистоновые и негистоновые белки напрямую или за счет белок-белковых взаимодействий связываются с ДНК вируса (рис. 3). Как и в ДНК клетки, ацетилирование гистонов может регулировать транскрипционную активность ккзДНК. T. Pollicino и соавт. [11] подтвердили справедливость этого утверждения как на модельных системах *in vitro*, так и *in vivo* в печени хронически инфицированных пациентов, используя технологию ChIP и антитела к ацетилированным формам H3 и H4. Высокая активность ацетилтрансфераз PCAF и p300/CBP форсирует вирусную репликацию, в то время как привлечение гистондеацетилазы HDAC1 к ккзДНК, напротив, обеспечивает низкий уровень репликации *in vitro*. Чтобы экспериментально

подтвердить это, были использованы ингибиторы гистоновых деацетилаз I и III класса — трихостатин А и никотинамид соответственно. Обработка этими факторами приводит к ацетилированию гистона H4 и повышению уровня репликации HBV. Таким образом, было высказано предположение, что подавление репликации вируса происходит по уже известным механизмам ремоделирования хроматина.

Помимо посттрансляционных модификаций гистонов, ДНК HBV и, в частности, ккзДНК может регулироваться метилированием по CpG-островкам. Механизмы активации ДНМТ и особенности метилирования генома HBV будут рассмотрены ниже. Отметим, что функционально активация экспрессии ДНМТ при инфицировании HBV может быть связана с неспецифическим противовирусным ответом инфицированных клеток на проникновение вируса. ккзДНК, единственная матрица для считывания РНК HBV, гиперметируется по CpG-островкам, при этом подавляется транскрипция и репликация. Помимо этого, неблагоприятным исходом активации ДНМТ является метилирование генома гепатоцитов пациентов с ХГВ, что может негативно влиять на экспрессию функционально значимых генов, приводить к дисрегуляции клеточной деятельности, а также способствовать повреждению ДНК клетки. В целом кумулятивный эффект факторов HBV *per se* и активации ДНМТ, в частности, усугубляет повреждение генома клеток и ускоряет процессы, связанные с развитием фиброза и гепатоцеллюлярной карциномы. Кроме того, метилирование ккзДНК может рассматриваться как один из механизмов формирования эпигенетически репрессированных молекул ккзДНК. Таким образом, ДНМТ могут участвовать в персистенции вирусной инфекции.

HBV стимулирует экспрессию ДНМТ

Процессы конденсации хроматина ккзДНК имеют ключевое значение в регуляции экспрессии вирусных РНК и продукции вирусных белков. Степень компактизации ккзДНК определяется эпигенетическими модификациями ккзДНК и связанных с ней белков. Именно она определяет доступность ккзДНК для регуляторных факторов транскрипции.

Метилирование — распространённый механизм защиты клеток эукариот в ответ на проникновение чужерод-

ной ДНК и вирусных геномов. Многие промоторы генов в геноме клеток и вирусов богаты CpG-динуклеотидами или группами CpG-динуклеотидов, так называемыми CpG-островками. Метилирование цитидина в островках CpG подавляет экспрессию генов и способствует гетерохроматизации.

ДНК-метилирование происходит за счет действия ДНМТ, непосредственных эффекторов, которые осуществляют ферментативное присоединение метильных групп к цитидину, и метил-CpG-связывающих белков, роль которых сводится к распознаванию паттернов метилирования [14]. Семейство ДНМТ состоит из ДНМТ1, ДНМТ2, ДНМТ3А, ДНМТ3В и ДНМТ3L. ДНМТ1 относится к поддерживающим ДНК-метилтрансферазам. В процессе деления клеток ДНМТ1 метилирует гемиметилированные островки CpG. ДНМТ3А и ДНМТ3В являются *de novo* ДНК-метилтрансферазами, они могут метилировать как неметилированные, так и гемиметилированные островки CpG. ДНМТ2 и ДНМТ3L не способны к метилированию ДНК, но выполняют другие важные функции [15].

Ранее было установлено, что инфицирование клеток HBV стимулирует экспрессию ДНМТ, в особенности ДНМТ3А/В и ДНМТ1. Более высокие уровни экспрессии ДНМТ детектируются в гепатоцитах пациентов с ХГВ в сравнении с контрольной группой [16]. Последние исследования убедительно показали, что профиль метилирования островков CpG в ккзДНК и, следовательно, активность вирусного цикла связаны с репликацией вируса и активностью ДНМТ. Метилированные геномы HBV обнаружены в сыворотке и биоптатах печени пациентов с ХГВ. Все больше сведений указывает на то, что увеличение экспрессии ДНМТ может быть частью неспецифического анти-HBV-ответа клетки хозяина, т. е. частью внутриклеточной иммунной системы. Предыдущие работы показали, что метилирование ДНК HBV снижает вирусную мРНК, продукцию вирусного белка и прегеномной РНК (пгРНК) [17]. На клетках гепатомы человека HepG2 *in vitro* было показано, что через 2—4 сут после инфицирования HBV в клетках наблюдается увеличение уровней экспрессии ДНМТ [18]. В наших работах также было показано, что на модели клеток HepG2, трансфицированных плазмидой с геномом 1.1merHBV, HBV индуцирует экспрессию ДНМТ1

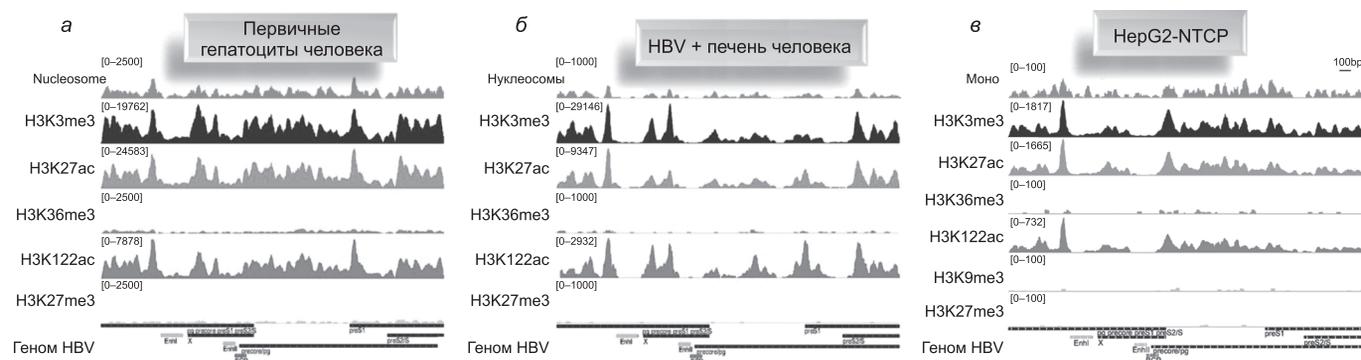


Рис. 3. Посттрансляционные модификации гистонов в ккзДНК HBV. ChIP-Seq-анализ ккзДНК с маркерами эухроматина (H3K4me3, H3K27ac, H3K36me3, H3K122ac) и гетерохроматина (H3K9me3, H3K27me3) на первичных гепатоцитах пациента с HBV (а), инфицированной HBV печени человека (б) и клетках HepG2-NTCP с HBV (в).

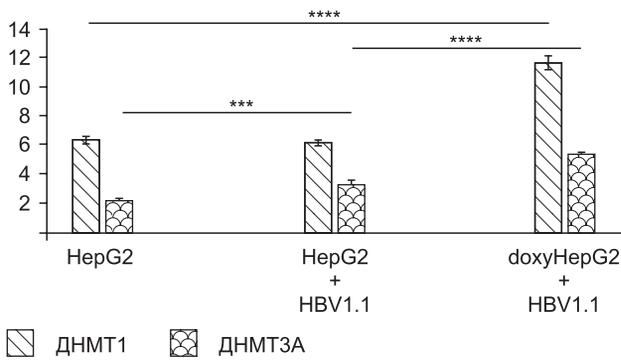


Рис. 4. Повышение уровней экспрессии генов ДНМТ1 и ДНМТ3А при репликации HBV. HepG2: клетки гепатомы; HepG2 + HBV1.1: клетки HepG2, трансфицированные геномом HBV1.1; doxyHepG2 + HBV1.1: клетки HepG2, трансфицированные геномом HBV1.1 с активным промотором tet-on.

и ДНМТ3А в различной степени и с разной динамикой (рис. 4) [19]. Белок HBx HBV участвует в многочисленных внутриклеточных процессах, а именно в регуляции транскрипции HBV, контроле за степенью гетерохроматизации ккзДНК. Отмечена роль HBx-белка в трансформации клеток, регуляции клеточного цикла, апоптоза и пр. Продукция HBx в клетках *per se*, т. е. без активной инфекции HBV на модели трансфекции, стимулирует продукцию ДНМТ и усиливает метилирование CpG-островков в геноме клеток [19]. При этом белок HBx может как напрямую активировать экспрессию ДНМТ1 и ДНМТ3А/В [20], так и действовать на процессы ДНК-метилирования опосредованно, за счет привлечения ДНМТ к промоторам генов [21]. Y. Zhu и соавт. [22] показали, что трансфекция клеток HepG2 плазмидой, кодирующей HBx, приводит к 1,5- и 1,7-кратному повышению экспрессии ДНМТ1 и ДНМТ3А соответственно.

На нашей модели HepG2-1.1merHBV, трансфицированной HBx, при активации цикла HBV происходит 2,5-кратная ($p < 0,01$) индукция экспрессии ДНМТ1. Экспрессия ДНМТ3А также усиливается, но не достигает статистической значимости. Следовательно, результаты наших и других исследований продемонстрировали, что экспрессия ДНМТ1 и ДНМТ3А усиливается в клетках, инфицированных HBV. Ключевым фактором гиперэкспрессии ДНМТ является HBx-белок HBV [6].

Метилирование ДНК HBV

Метилирование CpG-островков ДНК HBV способствует уменьшению продукции вирусных белков. Гиперметилирование островков CpG ДНК HBV подавляет синтез HBsAg [23] и снижает уровень экспрессии HBeAg [24]. Трансфекция метилированной формы ДНК HBV в клетки HepG2 приводит к снижению уровня экспрессии мРНК вируса, а также образования HBsAg

и HBcAg [25]. Котрансфекция ДНК HBV с ДНМТ3А (ДНК-метилтрансферазой) ассоциирована со снижением продукции HBsAg и HBeAg [18].

HBx может подавлять транскрипцию HBV, в том числе привлекая к минихромосоме белки ДНМТ1, ДНМТ3А1 и ДНМТ3А2. Доказано, что HBx вызывает эпигенетические изменения, включая изменения в метилировании ДНК, модификацию гистонов, а также экспрессию микроРНК [19]. HBx может снижать экспрессию ДНМТ3А, индуцируя образование miR-101 [26]. Таким образом, HBx обеспечивает эпигенетический контроль ккзДНК, регулируя взаимодействие хроматин-ремоделирующих белков с ДНК HBV.

Метилирование последовательностей ДНК HBV, интегрированных в геном клеток, было впервые описано более 20 лет назад в работах R. Miller и W. Robinson [27]. Кроме того, анализ статуса метилирования эписомальных форм генома HBV показал, что неинтегрированные формы также могут метилироваться в гепатоцитах пациентов и на моделях HBV *in vitro* [28]. Важно, что метилированию подвергается ккзДНК HBV. Таким образом, регулируется образование всех видов мРНК HBV, включая пгРНК.

В целом метилирование ДНК является CpG-специфичным, поэтому плотность и расположение CpG-динуклеотидов и CpG-островков может напрямую влиять на возможность и степень метилирования генома HBV. Как показано ранее, большинство изолятов HBV содержат 3 CpG-богатых региона. Островок I перекрывается с областью начала S-гена, островок II охватывает регионы энхансера I и промотора X-гена, а островок III находит-

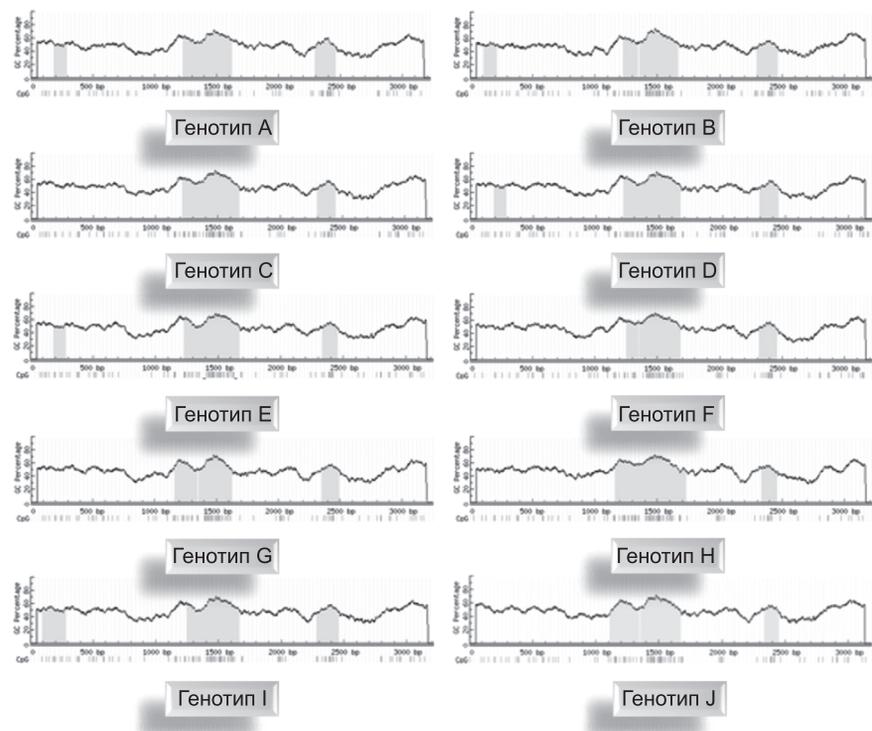


Рис. 5. Распределение CpG-островков в геноме HBV различных генотипов. Вертикальная ось соответствует процентной доле GC, горизонтальная относится к нуклеотидной последовательности генома HBV. CpG-островки I, II и III выделены серым цветом. Отдельные вертикальные линии обозначают CpG-динуклеотиды [32 с модификациями].

Таблица 2

Расположение и размер трёх традиционных и новых островков CpG в нуклеотидных последовательностях HBV различных генотипов

Гено-тип	CpG-островок I		CpG-островок II		CpG-островок III		Новые CpG-островки	
	локализация, нт	средний размер, нт	локализация, нт	средний размер, нт	локализация, нт	средний размер, нт	локализация, нт	средний размер, нт
A	94—303	151	1215—1671	424	2276—2460	149	—	—
B	109—289	121	1175—1679	444	2298—2462	146	300—633; 1926—2043	109
C	60—626	124	1035—1732	442	2121—2458	162	2874—2989	105
D	94—288	110	1205—1671	419	2250—2458	150	467—589	122
E	184—577	102	1223—1673	409	2334—2456	122	—	—
F	—	—	1202—1672	347	2257—2462	153	1921—2038	111
G	186—297	111	1663—1906	466	2341—2494	145	—	—
H	332—436	105	1106—1728	518	2336—2464	120	1933—2035	103
I	98—283	138	1248—1678	422	2252—2456	186	—	—
J	—	—	1111—1671	561	2335—2446	112	—	—

ся в регионе промотора Sp1 и старт-кодона P-гена [29, 30]. Роль островков I и III в регуляции HBV остается не совсем ясной. Низкая плотность CpG в островке I обуславливает слабое влияние метилирования островка на регуляцию вирусного цикла. Значительных корреляций между состоянием метилирования островка III и циклом HBV также выявлено не было. Напротив, метилирование островка II подавляет транскрипцию S-гена и коррелирует с низким уровнем продукции или отсутствием HBsAg. Предполагается, что гиперметилирование островка II может также подавлять транскрипцию *pre-C/C*-гена и снижать продукцию HBeAg [24].

Работы двух групп исследователей, изучавших образцы от пациентов с ХГВ из Азии, подтвердили, что метилирование ккзДНК происходит в большинстве клинических образцов и негативно влияет на репликацию HBV. В отличие от этого изучение статуса метилирования ДНК

HBV с образцами из Франции показало, что геном HBV редко становится мишенью ДНК-метилтрансфераз в образцах печени от пациентов с ХГВ [31]. Только 14% метилирования происходит по островку I, 0,6% — по островку II и 3,7% — по островку III. Причиной противоречивых результатов может быть высокая генетическая гетерогенность геномов HBV и как следствие неоднородное распространение CpG-островков у пациентов из разных регионов (рис. 5). Известно, что в Азии преобладают генотипы B и C HBV, в то время как во Франции — генотипы A и D, более типичные для остальной части Европы [1].

На основании допущения, что степень метилирования ккзДНК может сильно варьировать среди разных генотипов HBV, Y. Zhang и соавт. [31] методом компьютерного анализа изучили различия в плотности CpG-динуклеотидов среди генотипов HBV (табл. 2; рис. 6). В результате оказалось, что 45% последовательностей HBV содержат 3 традиционных CpG-островка, тогда как 47% последовательностей HBV содержат только 2 островка (II и III). Предположительно низкая плотность CpG-динуклеотидов в некоторых генотипах оказывается слишком низкой в островке I. В отличие от островка I области островков II и III более консервативны среди генотипов. Помимо этого Y. Zhang и соавт. обнаружили 3 новых островка CpG, названные IV, V и VI соответственно. Островок IV обнаружен в геноме HBV генотипов B, C и D, он расположен между островками I и II, перекрывается с S- и P-генами. Островок V выявлен в геноме HBV генотипов B, H и F, расположен между энхансером II и кор-промотором и sp1, перекрываясь с С-геном. Островок VI идентифицирован в геноме HBV генотипа C, располагается в sp2, перекрывается с *preS1* и P-генами. Вероятно, эти островки также могут являться мишенями для метилирования ДНК, однако их роль в регуляции цикла HBV остается неизученной. Возможно, гиперметилирование островка V может блокировать инициацию транскрипции С-гена, а метилирование островка VI подавлять экспрессию мРНК 2.1 [31].

Распределение CpG-островков различается между генотипами HBV. Это говорит о том, что метилирование ДНК может регулировать транскрипцию HBV в различной степени у различных генотипов. Данным открытием можно объяснить противоречивые результаты различ-

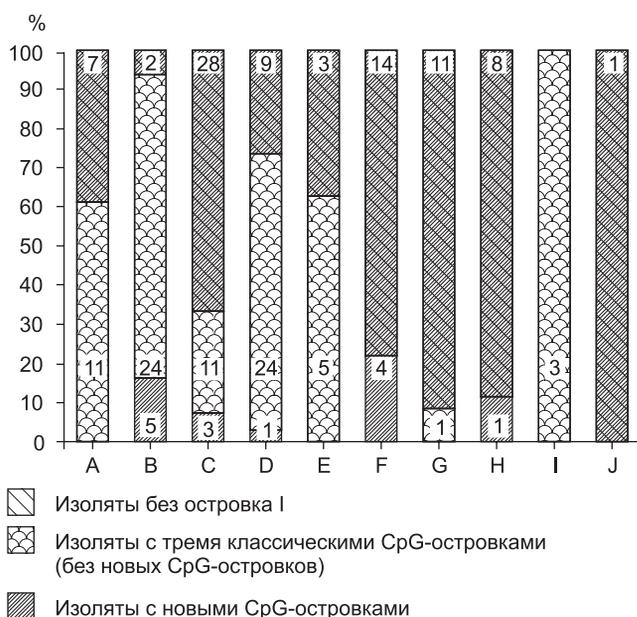


Рис. 6. Доля геномов HBV А—J без CpG-островка I, с тремя традиционными CpG-островками, с новыми CpG-островками.

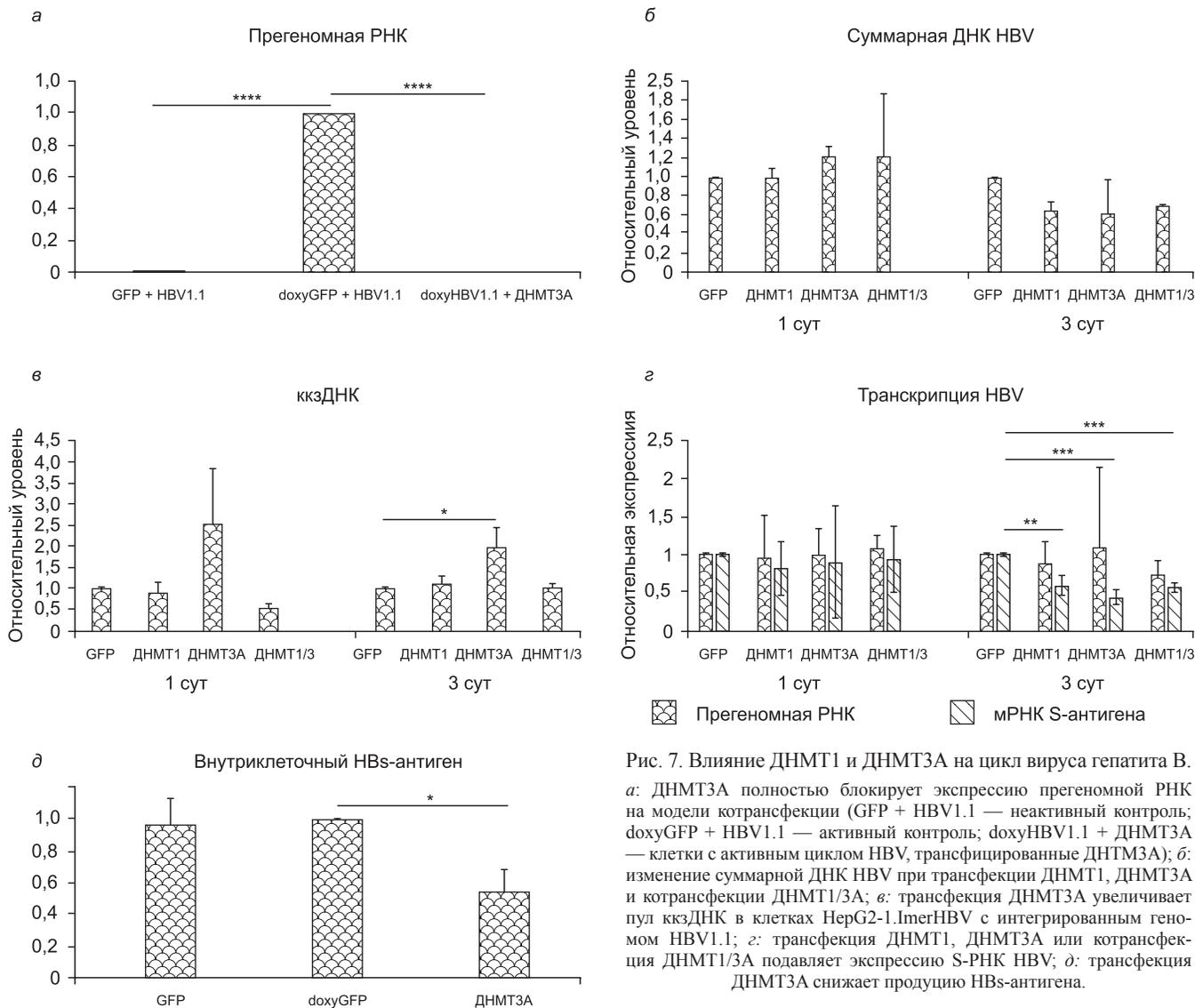


Рис. 7. Влияние DNMT1 и DNMT3A на цикл вируса гепатита В. *а*: DNMT3A полностью блокирует экспрессию прегеномной РНК на модели котрансфекции (GFP + HBV1.1 — неактивный контроль; doxyGFP + HBV1.1 — активный контроль; doxyHBV1.1 + DNMT3A — клетки с активным циклом HBV, трансфицированные DNMT3A); *б*: изменение суммарной ДНК HBV при трансфекции DNMT1, DNMT3A и котрансфекции DNMT1/3A; *в*: трансфекция DNMT3A увеличивает пул ккзДНК в клетках HepG2-1.1merHBV с интегрированным геномом HBV1.1; *г*: трансфекция DNMT1, DNMT3A или котрансфекция DNMT1/3A подавляет экспрессию S-РНК HBV; *д*: трансфекция DNMT3A снижает продукцию HBs-антигена.

ных исследований, в которых анализировали метилирование HBV ДНК на HBV различных генотипов.

Влияние метилирования генома HBV на жизненный цикл вируса

DNMT3A/B и DNMT1 могут напрямую связываться с ккзДНК. Метод анализа ChIP-ПЦР показал, что количество ккзДНК, связавшееся с DNMT, значительно возрастает к 3—4-м суткам после инфицирования клеток Huh7 в культуре [32]. Следовательно, HBV стимулирует продукцию DNMT, которые в свою очередь связываются с матрицами ккзДНК, метилируют геном HBV по CpG-островкам и подавляют транскрипцию.

Хотя влияние трансфекции DNMT3A на транскрипцию HBV было изучено ранее [18], мы впервые показали, что трансфекция DNMT1, DNMT3A и котрансфекция DNMT1/DNMT3A ингибируют продукцию ДНК HBV и влияют на размер пула ккзДНК. К 3-м суткам после трансфекции клеток HepG2-1.1merHBV плазмидами, кодирующими соответствующие DNMT, уровень ДНК HBV снижался примерно на 40% ($p < 0,05$) во всех вариантах трансфекции, при этом транскрипция S-РНК

снижалась наиболее заметно, сокращаясь на 40—50% ($p < 0,01$). Экспрессия пгРНК снижалась не так существенно, примерно на 25%, но статистически не достоверно. Из этого следует, что DNMT1, DNMT3A и котрансфекция DNMT1/DNMT3A подавляют транскрипцию и репликацию HBV (рис. 7).

В свою очередь при более детальном исследовании влияния гиперэкспрессии DNMT на уровни ккзДНК на модели HepG2-1.1merHBV с помощью высокочувствительного метода детекции ккзДНК после обработки ферментом Plasmid-Safe DNase [19] было установлено, что DNMT1 не влияет на размер пула ккзДНК, однако DNMT3A, напротив, значительно увеличивает пул ккзДНК. Трансфекция клеток HepG2-1.1merHBV плазмидой, кодирующей DNMT3A, вызывает примерно 2,5-кратное увеличение пула ккзДНК уже в 1-е сутки после трансфекции. Возрастание пула ккзДНК сохраняется на 3-и сутки после трансфекции (увеличение примерно в 2 раза) ($p < 0,005$).

В своих работах мы показали, что трансфекция DNMT1 и DNMT3A значительно подавляет не только уровни экспрессии S-РНК, но также уровни ДНК HBV, и вместе с этим трансфекция DNMT3A удваивает пул ккзДНК в

Таблица 3

Эффекты пролонгированной гиперэкспрессии ДНМТ при ХГВ

Позитивные эффекты	Негативные эффекты
<p>Подавление транскрипции и репликации HBV</p>	<p>Образование персистентного пула ккзДНК:</p> <ul style="list-style-type: none"> • метилирование CpG-островков ккзДНК стимулирует модификацию гистонов мини-хромосом и усиление компактизации ккзДНК. <p>Повреждение генома и риск трансформации клеток:</p> <ul style="list-style-type: none"> • дизрегуляция экспрессии генов, многие из которых участвуют в развитии гепатоцеллюлярной карциномы; • повреждение генома клеток (индукция разрывов хромосом). <p>Метилирование промоторов генов в геноме гепатоцитов:</p> <ul style="list-style-type: none"> • затрудняет регенерацию печени; • увеличивает повреждение гепатоцитов, связанное с HBV; • способствует развитию цирроза.

сравнении с контролем. Как было сказано выше, метилирование островков CpG в геноме ккзДНК может служить одним из механизмов, ответственных за персистентность HBV. Мы предполагаем, что длительная гиперэкспрессия ДНМТ3А может играть определенную роль в образовании персистентного пула ккзДНК и участвовать в хронической инфекции HBV.

Метилирование генома клетки при инфекции HBV

Как было сказано выше, HBx-белок HBV индуцирует экспрессию ДНМТ1, ДНМТ3А/В и других ДНК-метилтрансфераз. Поскольку ДНМТ не действуют на ДНК HBV селективно, увеличение уровней продукции ДНМТ приводит к метилированию генома инфицированных клеток, в частности промоторов некоторых генов-супрессоров опухолей [18]. Вместе с этим ДНМТ могут метилировать промотор uPA, ключевого регулятора HGF. Метилирование промотора uPA наблюдается в 99,7% случаев у пациентов с ХГВ. Гипоактивация HGF затрудняет регенерацию печени и способствует развитию фиброза [34]. Другой механизм действия HBx заключается в связывании ДНМТ3А напрямую. В норме ДНМТ3А связана с регионами генов IGFBP3 и CDH6. В присутствии HBx ДНМТ3А диссоциирует с промотором этих генов, повышая экспрессию IGFBP3 и CDH6 [21].

Нестабильность генома при инфекции HBV: действие HBx и ДНМТ

Нестабильность генома играет ключевую роль в злокачественной транс-

формации клеток и развитии рака. Гепатоцеллюлярная карцинома, одно из самых тяжелых и распространенных последствий ХГВ, характеризуется большой нестабильностью генома в некоторых участках хромосом [35]. Известно, что HBx-белок играет важную роль в канцерогенезе при хронической инфекции HBV. Этот белок относится к многофункциональным трансаktivаторам, его влияние распространяется на репликацию вируса, регуляцию транскрипции как ккзДНК, так и многих генов клетки, прогрессирование клеточного цикла, репарацию ДНК, апоптоз (может служить как проапоптотическим, так и антиапоптотическим фактором) и стабильность генома [36]. HBx-белок участвует в дупликации центросом, вызывает aberrантное формирование веретена деления, неправильную агрегацию хромосом при митозе и повышает риски анеуплоидии. Цитоплазматический HBx-белок индуцирует окислительный стресс, продукцию активных форм кислорода (АФК) и повреждение генома клеток. Так, в экспериментах *in vitro* с белком HBx с сигналом ядерной локализации образования АФК не происходит (рис. 8). Напротив, HBx-белок с сигналом ядерного экспорта вызывает значительное образование АФК и индуцирует образование γ -H2AX-фокусов (фокусов фосфорилированного гистона H2AX, ассоциированного с двухцепочечными разрывами генома) [35]. Позитивные и негативные аспекты гиперэкспрессии ДНМТ представлены в табл. 3.

Недавно в масштабном исследовании с использованием ядерно-магнитно-резонансной метаболомики было впервые изучено действие HBx на метаболизм клеток HepG2 и SK-HEP-1. Эпизодическая продукция HBx в клетках нарушает метаболизм глюкозы, липидов, аминок-

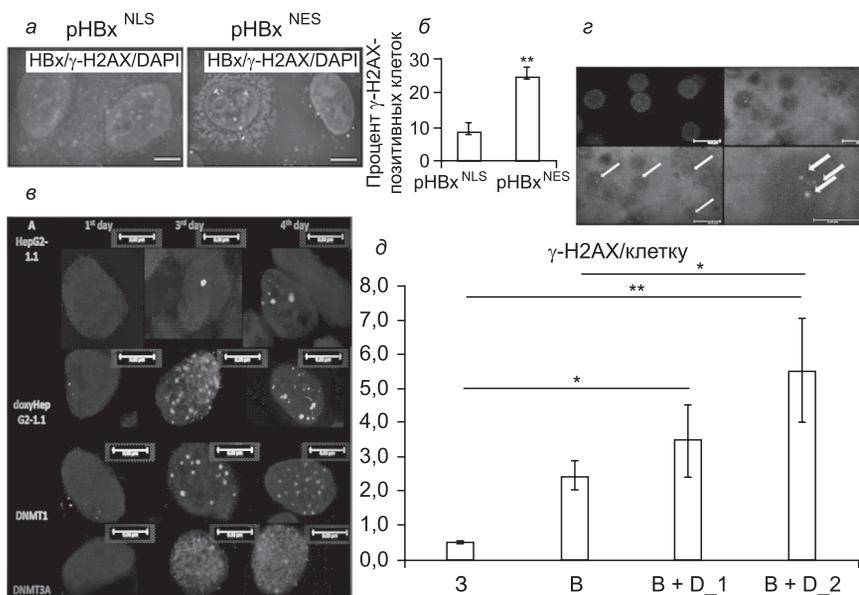


Рис. 8. Вирус гепатита В вызывает образование фокусов гистона γ -H2AX, ассоциированного с двухцепочечными разрывами ДНК.

а: только цитоплазматический белок HBx, но не внутриядерный HBx (HBx-NLS) вызывает образование фокусов γ -H2AX (ярко-белые фокусы в ядре) [36 с модификациями]; *б*: процентная доля клеток с γ -H2AX-фокусами, трансфицированными HBx-NES и HBx-NLS [36 с модификациями]; *в*: образование фокусов γ -H2AX в клетках HepG2-1. ImeHBV с активным циклом HBV, трансфицированных ДНМТ1 или ДНМТ3А; *г*: окрашивание гепатоцитов пациента с хроническим гепатитом В на γ -H2AX гистон (стрелками указаны фокусы γ -H2AX); *д*: среднее число фокусов на клетку в гепатоцитах человека без заболеваний печени (3), пациента с ХГВ (В) и пациентов с ХГВ и коинфекцией вирусом гепатита дельта (В + D).

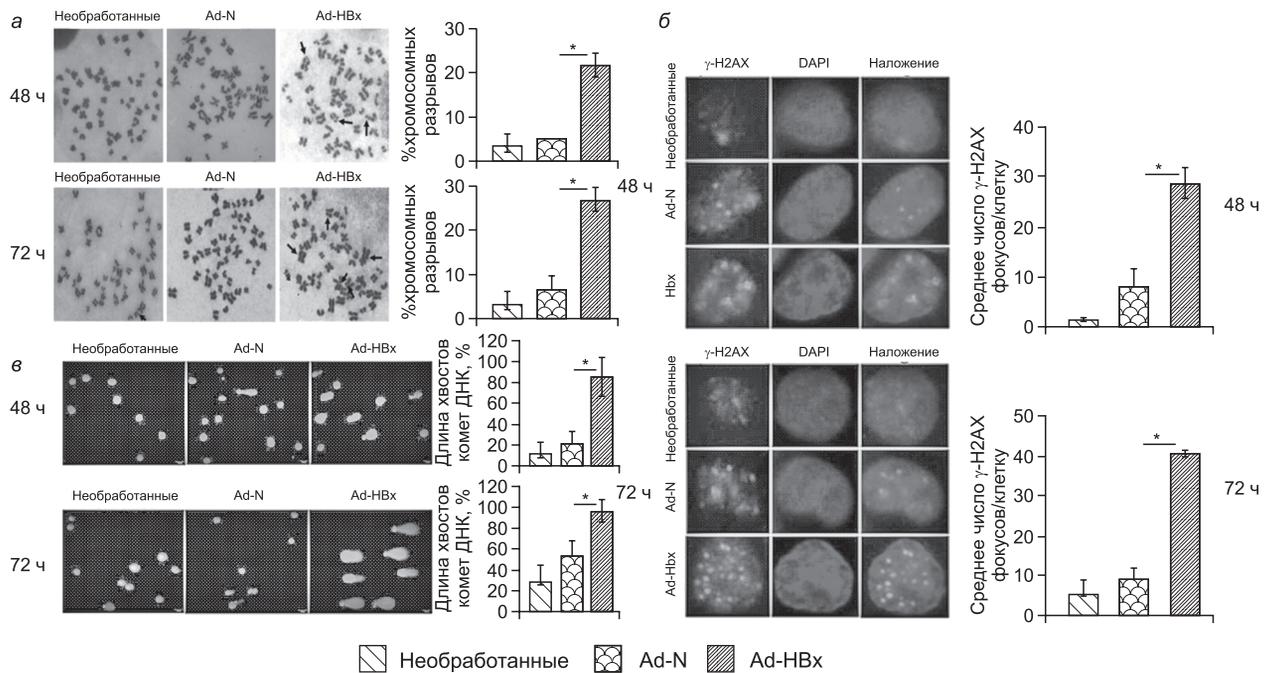


Рис. 9. Генотоксическое действие HBx-белка HBV.

а: хромосомные разрывы в клетках HepG2, инфицированных плазмидами с Ad-HBx и контролем Ad-N. Слева представлены изображения метафазных хромосом. Стрелки указывают на разрывы в хромосомах. Справа приведены процентные доли хромосомных разрывов; б: повреждение ДНК в клетках HepG2 по длине ДНК-комет. Слева представлены изображения ДНК-комет, справа — длина хвостов ДНК в процентах; в: результаты вестерн-блоттинга HBx, H2AX и γ-H2AX в клетках HepG2 после обработки Ad-HBx и Ad-N. Слева представлены флуоресцентные изображения, справа — расчёт среднего числа фокусов γ-H2AX на клетку.

кислот и особенно нуклеиновых кислот и синтез ДНК. Установлено, что значительные изменения происходят в экспрессии 966 генов, экспрессия 381 усилена более чем в 2 раза, а экспрессия еще 585 генов снижается примерно в 2 раза в сравнении с контролем. В той же работе продукция HBx-белка индуцирует масштабные хромосомные aberrации (рис. 9). Доля клеток с разрывами хромосом в метафазе составила $21,67 \pm 2,89$ и $26,67 \pm 2,89\%$ через 48 ч после трансдукции HepG2 и SK-HEP-1 соответственно. Через 72 ч после трансдукции эти значения составляли $15,00 \pm 5,00$ и $16,67 \pm 5,77\%$. Кроме того, увеличивается как общее повреждение ДНК, продемонстрированное с помощью оценки длины хвостов комет (comet assay), так и число двухцепочечных разрывов по окраске на фосфорилированный гистон у H2AX. Фосфорилированная форма гистона H2AX (γ-H2AX) участвует в регуляции репарации ДНК и часто используется для оценки повреждения ДНК. Ранее было показано, что число фокусов γ-H2AX и уровень белка γ-H2AX значительно повышены у пациентов с диспластическими узлами, гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК) и в неопухолевых тканях пациентов с ГЦК. Некоторые авторы предлагают использовать γ-H2AX для оценки рисков развития ГЦК [37].

В наших работах установлено, что активация HBV на модели клеток HepG2-1.imerHBV с регулируемым tet-оп-промотором вызывает образование многочисленных фокусов γ-H2AX. Кроме того, ряд факторов, включая гиперэкспрессию HBx-белка, ДНМТ3А и ДНМТ1, могут усиливать повреждение генома, вызывать образование многочисленных γ-H2AX-фокусов и изменять экспрессию генов, ассоциированных с DDR (MRE11, DNA-PKcs) [38]. Мы обнаружили, что многочисленные фокусы γ-H2AX генерируются в активных клетках уже на 3-и

сутки эксперимента. Количество спонтанных фокусов γ-H2AX также немного увеличивается, но остается значительно меньшим по сравнению с клетками с активной инфекцией HBV (2—6 фокусов на клетку против 13—16 фокусов на клетку; $p < 0,001$). Трансфекция ДНМТ1 и ДНМТ3А вызывает значительное увеличение числа фокусов γ-H2AX к 4-м суткам, что сравнимо с клетками, гиперэкспрессирующими HBx.

Роль ДНМТ в сигнальных каскадах DDR может заключаться в гиперметилировании DDR-кодирующих генов и тем самым в нарушении клеточного ответа на повреждение ДНК. В физиологических условиях DDR действует через несколько реакций, включая детекцию поврежденной ДНК, репарацию ДНК и процессы, регулирующие остановку клеточного цикла или гибель клетки. Например, ДНМТ1 может метилировать гемиметилированные локусы генов и таким образом ингибировать транскрипцию либо напрямую участвовать в DDR [39]. Индукция оксидативного стресса при обработке пероксидом водорода приводит к привлечению ДНМТ1 к поврежденному хроматину и, возможно, к aberrантному метилированию ДНК и подавлению транскрипции [40]. Тип повреждения ДНК генома при инфекции HBV (по крайней мере частично) сходен с обработкой пероксидом, наблюдаемой в работе S. Kim и соавт. [35]. Это говорит о том, что продукция АФК в ответ на цитоплазматический HBx может вызывать HBV-связанное повреждение генома хозяина.

Впервые мы продемонстрировали, что трансфекция ДНМТ1 и ДНМТ3А при активной инфекции HBV стимулирует значительное увеличение формирования фокусов γ-H2AX к 4-м суткам. Среднее количество фокусов γ-H2AX варьирует от $24,8 \pm 1,25$ для ДНМТ1 до $26,2 \pm 1,27$ для ДНМТ3А. Эти количества сравнимы с таковыми

ми HBx-трансфекции (27,1 ± 1,64). Помимо этого мы показали, что γ -H2AX-фокусы детектируются у пациентов с ХГВ, причем число этих фокусов значительно выше у пациентов с коинфекцией вируса гепатита дельта.

Следовательно, HBx дизрегулирует многочисленные процессы клеток и индуцирует повреждение генома; стимулирует продукцию ДНМТ, которые оказывают аддитивное негативное действие на репарацию двухцепочечных разрывов. Усиленное повреждение генома клеток у пациентов с коинфекцией HBV пока остаётся неизученным, но скорее всего оно связано с ДНК-повреждающим действием самого дельта-агента.

Заключение

Ранее было высказано предположение, что гиперэкспрессия ДНМТ может участвовать в персистенции ккзДНК, поддержании и контроле пула ккзДНК [40]. Однако влияние ДНМТ на размер пула ккзДНК впервые было описано нами на модели клеток HepG2-1.1merHBV после трансфекции ДНМТ3А. Кроме того, метилирование CpG-островков в ккзДНК может дополнительно служить сигналом для привлечения гистонмодифицирующих и хроматинремоделлирующих комплексов и метилирования гистонов, связанных с ккзДНК. Метилирование гистонов еще больше снижает транскрипцию мишени и усиливает степень компактизации ккзДНК. Высокая стабильность и низкая доступность ккзДНК даже для экспериментальных воздействий, таких как технологии АРОВЕС-деаминаз [41] и сайт-специфических нуклеаз [42], остаются главной проблемой на пути разработки эффективного метода лечения ХГВ и элиминации ккзДНК. Релаксирование генома ккзДНК при помощи факторов эпигенетического ремоделирования может способствовать достижению более высоких показателей нуклеолитического расщепления HBV и разработкам селективных и эффективных препаратов для лечения ХГВ.

Финансирование. Исследование выполнено при поддержке гранта РФ №16-15-10426.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Sunbul M. Hepatitis B virus genotypes: Global distribution and clinical importance. *World J. Gastroenterol.* 2014; 20(18): 5427—34.
- Ganem D., Prince A.M. Hepatitis B virus infection — natural history and clinical consequences. *New Engl. J. Med.* 2004; 350(11): 1118—29.
- Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J. Hepatol.* 2005; 42(3): 302—8.
- Zhang X., Hou J., Lu M. Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Front. Genet.* 2013; 4: 202.
- Liu X., Xu Q., Chen W., Cao H., Zheng R., Li G. Hepatitis B virus DNA-induced carcinogenesis of human normal liver cells by virtue of nonmethylated CpG DNA. *Oncol. Rep.* 2009; 21(4): 941—7.
- Li H., Yang F., Gao B., Yu Z., Liu X., Xie F. et al. Hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma tissues upregulates expression of DNA methyltransferases. *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015; 8(3): 4175—85.
- Guo Y.H., Li Y.N., Zhao J.R., Zhang J., Yan Z. Hbc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics.* 2011; 6(6): 720—6.
- Koumbi L., Karayiannis P. The epigenetic control of hepatitis B virus modulates the outcome of infection. *Front. Microbiol.* 2015; 6: 1491.
- Haines K.M., Loeb D.D. The sequence of the RNA primer and the DNA template influence the initiation of plus-strand DNA synthesis in hepatitis B virus. *J. Mol. Biol.* 2007; 370(3): 471—80.
- Wong D.K., Yuen M.F., Yuan H., Sum S.S., Hui C.K., Hall J. et al. Quantitation of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B patients. *Hepatology.* 2004; 40(3): 727—37.
- Pollicino T., Belloni L., Raffa G., Pediconi N., Squadrito G., Raimondo G. et al. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA-bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology.* 2006; 130(3): 823—37.
- Belloni L., Pollicino T., De Nicola F., Guerrieri F., Raffa G., Fanciulli M. et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2009; 106(47): 19975—9.
- Bock C.T., Schwinn S., Locarnini S., Fyfe J., Manns M.P., Trautwein C. et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J. Mol. Biol.* 2001; 307(1): 183—96.
- Egger G., Liang G., Aparicio A., Jones P.A. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature.* 2004; 429(6990): 457—63.
- Jurkowska R., Jeltsch A. Silencing of gene expression by targeted DNA methylation: concepts and approaches. *Methods Mol. Biol.* 2010; 649: 149—61.
- Saito Y., Kanai Y., Sakamoto M., Saito H., Ishii H., Hirohashi S. Expression of mRNA for DNA methyltransferases and methyl-CpG-binding proteins and DNA methylation status on CpG islands and pericentromeric satellite regions during human hepatocarcinogenesis. *Hepatology.* 2001; 33(3): 561—8.
- Vivekanandan P., Thomas D., Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *J. Infect. Dis.* 2009; 199(9): 1286—91.
- Vivekanandan P., Daniel H.D., Kannangai R., Martinez-Murillo F., Torbenson M. Hepatitis B virus replication induces methylation of both host and viral DNA. *J. Virol.* 2010; 84(9): 4321—9.
- Tian Y., Yang W., Song J., Wu Y., Ni B. Hepatitis B virus X protein-induced aberrant epigenetic modifications contributing to human hepatocellular carcinoma pathogenesis. *Mol. Cell. Biol.* 2013; 33(15): 2810—6.
- Zhu Y.Z., Zhu R., Fan J., Pan Q., Li H., Chen Q. et al. Hepatitis B virus X protein induces hypermethylation of p16(INK4A) promoter via DNA methyltransferases in the early stage of HBV-associated hepatocarcinogenesis. *J. Viral. Hepat.* 2010; 17(2): 98—107.
- Zheng D.L., Zhang L., Cheng N., Xu X., Deng Q., Teng X.M. et al. Epigenetic modification induced by hepatitis B virus X protein via interaction with de novo DNA methyltransferase DNMT3A. *J. Hepatol.* 2009; 50(2): 377—87.
- Zhu Y.Z., Zhu R., Shi L.G., Mao Y., Zheng G.J., Chen Q. et al. Hepatitis B virus X protein promotes hypermethylation of p16(INK4A) promoter through upregulation of DNA methyltransferases in hepatocarcinogenesis. *Exp. Mol. Pathol.* 2010; 89(3): 268—75.
- Vivekanandan P., Kannangai R., Ray S.C., Thomas D.L., Torbenson M. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples. *Clin. Infect. Dis.* 2008; 46(8): 1227—36.
- Guo Y., Li Y., Mu S., Zhang J., Yan Z. Evidence that methylation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in liver tissues of patients with chronic hepatitis B modulates HBV replication. *J. Med. Virol.* 2009; 81(7): 1177—83.
- Vivekanandan P., Thomas D., Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *J. Infect. Dis.* 2009; 199(9): 1286—91.
- Wei X., Xiang T., Ren G., Tan C., Liu R., Xu X. et al. miR-101 is down-regulated by the hepatitis B virus x protein and induces aberrant DNA methylation by targeting DNA methyltransferase 3A. *Cell. Signal.* 2013; 25(2): 439—46.
- Miller R.H., Robinson W.S. Integrated hepatitis B virus DNA sequences specifying the major viral core polypeptide are methylated in PLC/PRF/5 cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 1983; 80(9): 2534—8.
- Vivekanandan P., Thomas D., Torbenson M. Hepatitis B viral DNA is methylated in liver tissues. *J. Viral. Hepat.* 2008; 15(2): 103—7.
- Kaur P., Paliwal A., Durantel D., Hainaut P., Scoazec J.Y., Zoulim F. et al. DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection. *J. Infect. Dis.* 2010; 202(5): 700—4.
- Kim J.W., Lee S.H., Park Y.S., Hwang J.H., Jeong S.H. et al. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology.* 2011; 54(6): 316—25.
- Zhang Y., Li C., Zhang Y., Zhu H., Kang Y., Liu H. et al. Comparative Analysis of CpG Islands among HBV Genotypes. *PLoS ONE.* 2013; 8(2): e56711.
- Lin S.C. *Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Associated with Methylated Histones H3 and H4 and Heterochromatin*

- Complex Proteins: Implication of Their Roles in Viral Replication (Thesis)*. Hong Kong; 2017.
33. Hughes D.J., Marendy E.M., Dickerson C.A., Yetming K.D., Sample C.E., Sample J.T. Contributions of CTCF and DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3B to Epstein-Barr virus restricted latency. *J. Virol.* 2012; 86(2): 1034–45.
 34. Park E.S., Park Y.K., Shin C.Y., Park S.H., Ahn S.H., Kim D.H. et al. Hepatitis B virus inhibits liver regeneration via epigenetic regulation of urokinase-type plasminogen activator. *Hepatology.* 2013; 58(2): 762–76.
 35. Kim S., Lee H.S., Ji J.H., Cho M.Y., Yoo Y.S., Park Y.Y. et al. Hepatitis B virus X protein activates the ATM-Chk2 pathway and delays cell cycle progression. *J. Gen. Virol.* 2015; 96(8): 2242–51.
 36. Zhu M., Guo J., Li W., Lu Y., Fu S., Xie X. et al. Hepatitis B virus X protein induces expression of alpha-fetoprotein and activates PI3K/mTOR signaling pathway in liver cells. *Oncotarget.* 2015; 6(14): 12196–208.
 37. Matsuda Y., Wakai T., Kubota M., Osawa M., Takamura M., Yamagawa S. et al. DNA Damage Sensor γ -H2AX Is Increased in Preneoplastic Lesions of Hepatocellular Carcinoma. *ScientificWorld Journal.* 2013; 2013: 597095.
 38. Ha K., Lee G.E., Pali S.S., Brown K.D., Takeda Y., Liu K. et al. Rapid and transient recruitment of DNMT1 to DNA double-strand breaks is mediated by its interaction with multiple components of the DNA damage response machinery. *Hum. Mol. Genet.* 2011; 20(1): 126–40.
 39. O'Hagan H.M., Wang W., Sen S., Destefano Shields C., Lee S.S., Zhang Y.W. et al. Oxidative damage targets complexes containing DNA methyltransferases, SIRT1 and polycomb members to promoter CpG islands. *Cancer. Cell.* 2011; 20(5): 606–19.
 40. Jin B., Robertson K.D. DNA Methyltransferases (DNMTs), DNA Damage Repair, and Cancer. *Adv. Exp. Med. Biol.* 2013; 754: 3–29.
 41. Lucifora J., Xia Y., Reisinger F., Zhang K., Stadler D., Cheng X. et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science.* 2014; 343(6176): 1221–8.
 42. Ran F.A., Hsu P.D., Wright J., Agarwala V., Scott D.A., Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. *Nat. Protoc.* 2013; 8(11): 2281–308.

Поступила 16.04.17
Принята в печать 20.06.17

ОРИГИНАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

© КОЛЛЕКТИВ АВТОРОВ, 2017
УДК 578.833.26:578.53

Дёмина Т.В.¹, Козлова И.В.^{2,3}, Ткачёв С.Е.⁴, Дорощенко Е.К.², Лисак О.В.², Савинова Ю.С.², Сунцова О.В.²,
Верхозина М.М.⁵, Джиоев Ю.П.³, Парамонов А.И.², Киселёв Д.О.³, Злобин В.И.³

ОПРЕДЕЛЕНИЕ И СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ ГЕНОМНОЙ СТРУКТУРЫ СИБИРСКИХ ШТАММОВ ВИРУСА КЛЕЩЕВОГО ЭНЦЕФАЛИТА ЕВРОПЕЙСКОГО СУБТИПА

¹ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского», 664038, г. Иркутск;
²ФГБНУ «Научный центр проблем здоровья семьи и репродукции человека», 664003, г. Иркутск;
³ФГБОУ ВО «Иркутский государственный медицинский университет», 664003, г. Иркутск
⁴ФГБНУ «Институт химической биологии и фундаментальной медицины» СО РАН, 630090, г. Новосибирск;
⁵ФБУЗ «Центр гигиены и эпидемиологии в Иркутской области», 664047, г. Иркутск

Вирус клещевого энцефалита (ВКЭ, TBEV) делится на 3 субтипа: дальневосточный (ВКЭ-ДВС, TBEV-FE), европейский (ВКЭ-Евр, TBEV-Eur) и сибирский (ВКЭ-Сиб, TBEV-Sib). В России их также принято называть соответственно генотипами 1, 2 и 3. Географически ВКЭ-Евр доминирует в Центральной и Северной Европе, но его представители встречаются и восточнее — по южной части лесной зоны внетропической Евразии вплоть до Восточной Сибири и Южной Кореи. Однако штаммы, изолированные за пределами Европы, остаются малоизученными. В предлагаемом исследовании определено 8 и сопоставлено 13 полных геномов сибирских изолятов ВКЭ-Евр. Анализ 152 депонированных в GenBank полногеномных последовательностей ВКЭ показал, что ВКЭ-Евр на территории всего евроазиатского ареала обладает более высокой степенью стабильности кодирующей части генома (3,1% различий) по сравнению с ВКЭ-ДВС (6,6%) и ВКЭ-Сиб (7,8%). При этом максимальные показатели различий отмечаются не между европейскими и сибирскими штаммами, как можно было бы ожидать, а между представителями из Европы. Это штаммы Mandl-2009 из Норвегии и Нург из Чешской Республики. Исследованные штаммы из Сибири входят в состав компактного генетического кластера из 42 штаммов ВКЭ-Евр и подразделяются на 2 субкластера — западносибирский и восточносибирский варианты. Эти варианты отличаются по сочетаниям аминокислотных замен во всех белках, кроме NS2B. Западносибирский вариант в основном циркулирует на территории Алтая, а ближайшим родственником его представителей является штамм Absettarov из европейской части России. Штаммы, аналогичные восточносибирскому варианту европейского субтипа, зафиксированы на Алтае (штамм 84.2, 2007) и в Беларуси (N256, предположительно 1940).

Ключевые слова: клещевой энцефалит; вирус клещевого энцефалита; генотип; субтип; генетическая вариативность; полипротеин; аминокислотные замены.

Для цитирования: Дёмина Т.В., Козлова И.В., Ткачёв С.Е., Дорощенко Е.К., Лисак О.В., Савинова Ю.С., Сунцова О.В., Верхозина М.М., Джиоев Ю.П., Парамонов А.И., Киселёв Д.О., Злобин В.И. Определение и сравнительный анализ геномной структуры сибирских штаммов вируса клещевого энцефалита европейского субтипа. *Вопросы вирусологии.* 2018; 63(1): 29-36. DOI: <http://dx.doi.org/10.18821/0507-4088-2018-63-1-29-36>

Для корреспонденции: Дёмина Татьяна Васильевна, д-р биол. наук, проф. каф. фак. биотехнологии и ветеринарной медицины при ФГБОУ ВО «Иркутский государственный аграрный университет им. А.А. Ежевского», 664038, г. Иркутск. E-mail: demina2006@mail.ru