

# Воздействие на ковалентно замкнутую кольцевую ДНК вируса гепатита В — заветная цель на пути к излечению гепатита В

Julie Lucifora<sup>1,2,3,†</sup>, Ulrike Protzer<sup>4,5,\*</sup>

**Ключевые слова:** вирус гепатита В, кзкДНК, печень.

Получено 2 декабря 2015 г.;  
получено с поправками 27 января  
2016 г.; принято в печать  
3 февраля 2016 г.

<sup>1</sup> Cancer Research Center of Lyon  
(CRCL), Lyon 69008, France

<sup>2</sup> INSERM U1052, CNRS UMR-5286,  
Lyon 69008, France

<sup>3</sup> University of Lyon, Universite Claude-  
Bernard (UCBL), 69008 Lyon, France

<sup>4</sup> Institute of Virology, Technische  
Universitat Munchen/Helmholtz  
Zentrum Munchen, Trogerstrasse 30,  
81675 Munich, Germany

<sup>5</sup> German Center for Infection Research  
(DZIF), Munich Site, Germany

<sup>†</sup> Автор получил стипендию EASL  
для молодых ученых в 2015 г.

\* Автор, ответственный за пере-  
писку. Адрес: Institute of Virology,  
Technische Universitat Munchen/  
Helmholtz Zentrum Munchen,  
Trogerstr. 30, D-81675 Munchen,  
Germany. Tel.: +49 8941406886;  
fax: +49 8941406823.  
E-mail: protzer@tum.de (U. Protzer).

**Сокращения:** АЗА — фермент-ката-  
литический полипептид типа  
3А; dHepaRG — дифференциро-  
ванные клетки линии HepaRG;  
HBeAg — е-антиген вируса гепа-  
тита В; HBsAg — поверхностный  
антиген вируса гепатита В; HBV —  
вирус гепатита В; HNF — ядерный  
фактор гепатоцитов; HuHEP —  
гуманизированная химерная  
печень; IFN — интерферон; IL —  
интерлейкин; LT $\beta$ R — рецептор  
 $\beta$ -лимфотоксина; NTCSP — на-  
трий-таурохолат котранспортный  
полипептид; RCA — амплифика-  
ция по типу катящегося кольца;  
TNF — фактор некроза опухолей;  
кзкДНК — ковалентно замкнутая  
кольцевая ДНК; ПГЧ — первич-  
ный гепатоцит человека; ПЦР —  
полимеразная цепная реакция;  
ркДНК — рыхлая кольцевая ДНК.

## Реферат

Вирус гепатита В (HBV) внедряет ковалентно замкнутую кольцевую ДНК (кзкДНК) в ядра инфицированных клеток. Будучи центральной транскрипционной матрицей, мини-хромосома кзкДНК служит ключевым промежуточным звеном в жизненном цикле HBV. Расположение в ядре делает кзкДНК труднодоступной мишенью для противовирусных препаратов и иммунного ответа, в связи с чем кзкДНК служит тем фактором, который обуславливает хроническое течение инфекции. Хотя пока мало известно о механизмах образования кзкДНК, в настоящее время накопились данные о регуляции транскрипции кзкДНК. Появились сообщения о первых терапевтических методах, направленных на кзкДНК. В настоящем обзоре обобщены знания относительно биологии кзкДНК и представлены последние терапевтические стратегии, направленные на кзкДНК, цель которых — излечение HBV-инфекции.

© 2016 European Association for the Study of the Liver.

## Введение

Вирус гепатита В (HBV) оптимизировал свой жизненный цикл для длительного персисти-рования в печени. С этой целью вирус образует форму плазмидоподобной ковалентно замкнутой кольцевой ДНК (кзкДНК). кзкДНК HBV служит матрицей для транскрипции всех РНК HBV и формирования новых вирусов. кзкДНК HBV сохраняется в ядре инфицированных клеток в виде эписомной (т. е. неинтегрированной) ДНК, ассоциированной с гистонами. Она определяет выработку вирусных антигенов, таких как е-антиген (HBeAg) и поверхностный антиген (HBsAg) вируса гепатита В, а также дочерних вирионов. В отличие от кзкДНК только часть ДНК, содержащейся в инфицированных вирионах, является двухцепочечной, образующей рыхлую кольцевую ДНК (ркДНК) в результате обратной транскрипции прегеномной РНК.

С помощью доступных сегодня противовирусных препаратов невозможно полностью излечить HBV-инфекцию, поскольку они воздействуют на обратную транскрипцию, последний этап в жизненном цикле вируса, и не влияют на транскрипционную матрицу кзкДНК. Аналоги нуклеозидов и нуклеотидов, такие как ламивудин, энтекавир или тенофовир, могут эффективно подавлять высвобождение дочерних вирионов и, соответственно,

виремию, но не влияют ни на персисти-рование кзкДНК, ни на экспрессию и секрецию HBsAg или HBeAg. Точно так же ни ингибиторы проникновения, ни модификаторы сборки капсида (новые противовирусные препараты, находящиеся в стадии клинической разработки) не воздействуют на кзкДНК (см. статью Durantel и Zoulim [71]). Поэтому при использовании этих препаратов необходимо продолжительное лечение, что требует больших материальных затрат, сопровождается проблемами, связанными с приверженностью пациента к лечению, и может привести к формированию резистентности вируса [1]. Терапия интерфероном (IFN)- $\alpha$ , который также одобрен для лечения HBV-инфекции и характеризуется прямым противовирусным и иммуномодулирующим действием, может привести к элиминации HBsAg и даже к эрадикации вируса у части больных, однако его применение ограничено ввиду развития тяжелых побочных эффектов [2]. В связи с этим удаление кзкДНК из инфицированных клеток является той целью, к которой необходимо стремиться для полного излечения HBV-инфекции. В настоящем обзоре представлена характеристика различных экспериментальных моделей исследования кзкДНК, а также существующих на сегодня знаний о биологии кзкДНК и возможных терапевтических методов воздействия на нее.

## Экспериментальные модели для изучения кзкДНК

Ранее количество моделей для изучения судьбы кзкДНК *in vitro* и *in vivo* было весьма ограниченным (см. статью Allweiss и Dandri [70]). Только три модели клеточных культур: первичные гепатоциты тупайи или человека (ПГЧ) и дифференцированные клетки линии HeraRG (dHeraRG) — использовались для имитации HBV-инфекции *in vitro* и, следовательно, для репликации HBV с естественной транскрипционной матрицы кзкДНК. Эти модели требуют больших затрат и используются только в специализированных лабораториях. Недавнее открытие натрий-таурохолатного котранспортного пептида (NTCP) в качестве ключевого рецептора HBV [3] позволило создать новые клеточные линии, поддерживающие HBV-инфекцию и дающие возможность изучения кзкДНК *in vitro*.

Несмотря на появившуюся возможность проведения краткосрочных экспериментов за счет ускорения развития HBV-инфекции (и, соответственно, достижения более высоких уровней кзкДНК) в клеточных линиях NuH7, HeraRG и (особенно) HepG2, гиперэкспрессирующих NTCP [3, 4], опыты по изучению судьбы и регуляции кзкДНК продолжают вызывать трудности. Поддержание инфекции более чем на месяц возможно только в культуре клеток линии HeraRG и дополнительно осложняется их способностью дифференцироваться в два различных типа клеток (билиарноподобные и гепатоцитоподобные клетки) и тем, что в них устанавливаются низкие уровни кзкДНК (табл. 1). Другие клеточные линии продолжают делиться, что приводит к потере кзкДНК (см. ниже) и, соответственно, к дополнительному усложнению исследования. Необходимо отметить, что, несмотря на недавние достижения, модели HBV-инфекции *in vitro* все еще остаются недостаточно эффективными, требуя применения избыточного количества вирусного материала (100–10 000 вирионов на клетку в зависимости от характера материала, типа клеток и используемого протокола инфекции) и полиэтиленгликоля для слияния вирусов с клетками. Кроме того, эффективность распространения HBV в культуре клеток, в отличие от других вирусов, пока не доказана.

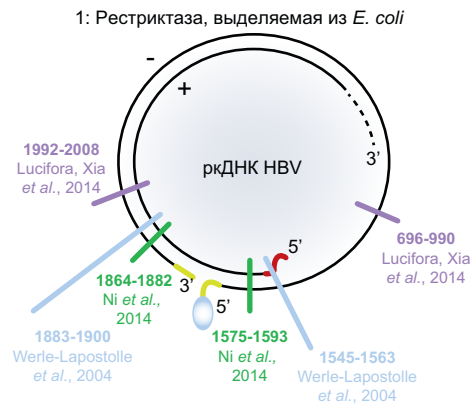
Недостатками моделей *in vivo* является строгая специфичность видов HBV, которые инфицируют только человека или приматов. Исследования, выполненные у шимпанзе, внесли большой вклад в наше понимание взаимоотношений вируса и организма хозяина [5], однако недавно были запрещены [6]. Тогда как гепатоциты шимпанзе поддерживают репликацию HBV [7–9], таких обезьян, как макаки и бабуины, которые часто используются для исследований, невозможно инфицировать HBV из-за различий в белковых последовательностях NTCP [10]. Тем не менее макаки, экспрессирующие человеческий NTCP, представляют собой многообещающую экспериментальную модель. Мышьяные гепатоциты с пересаженным NTCP поддерживают проникновение HBV, но не дают возможности для внедрения кзкДНК [11], вероятно, в связи с отсутствием ключевых факторов, принимающих участие в ядерном транспорте ркДНК или в конверсии ркДНК в кзкДНК. Химерные мыши с гуманизированной печенью (HuНЕР) позволяют проводить длительные исследования кзкДНК [13], однако являются иммунодефицитными и из-за технических проблем и вопросов, связанных со стоимостью, не могут использоваться в крупномасштабных экспериментах. Поэтому знания относительно биологии кзкДНК, ее регуляции и жизненного цикла будут в значительной степени способствовать дальнейшему усовершенствованию моделей HBV-инфекции.

## Трудности выявления кзкДНК HBV

С учетом низкого числа копий кзкДНК HBV *in vitro* (см. табл. 1) и *in vivo* выявление кзкДНК представляет весьма сложную задачу. Средние уровни составляют от 0,01 до 1 копии на клетку в печени HBV-инфицированных людей и мышей HuНЕР [13]. Это означает, что только часть клеток была на самом деле инфицирована HBV, а методы выявления кзкДНК на клеточном уровне отсутствуют. Более того, необходимость отделения кзкДНК от практически идентичной вирусной линейной ДНК или ркДНК усложняет задачу, поскольку последние два варианта в избытке присутствуют внутри вирионов и вирусных капсидов в ци-

**Таблица 1. Уровень кзкДНК и расчетное время поддержания HBV-инфекции в различных моделях *in vitro* и *in vivo***

	Число инфицированных клеток	Уровень кзкДНК (среднее число копий на ядро)	Поддержание инфекции
ПГЧ	20–100 %	1–2	2–3 нед. [58]
dHeraRG	5–20 %	0,2–0,5	> 6 мес. [40]
HepG2-NTCP	50–100 %	1–5	10–15 дней [4]
Мыши HuНер	100 %	1–2	> 4 мес. [13]



**Рис. 1. Праймеры кзкДНК в кПЦР, сшивающие разрывы в ркДНК.** Примеры праймеров кПЦР, созданных для селективной амплификации кзкДНК на основе ркДНК. Праймеры, обозначенные фиолетовым цветом, используются с интеркалирующими агентами ДНК. Праймеры, обозначенные синим и зеленым цветом, используются в комбинации с определением зондов.

#### Ключевой момент

кзкДНК служит ключевым промежуточным звеном в жизненном цикле вируса. Она персистирует в виде эписомы в ядрах инфицированных клеток.

#### Ключевой момент

Точное количественное определение уровня кзкДНК HBV остается сложной задачей, и существует острая необходимость в создании единых протоколов.

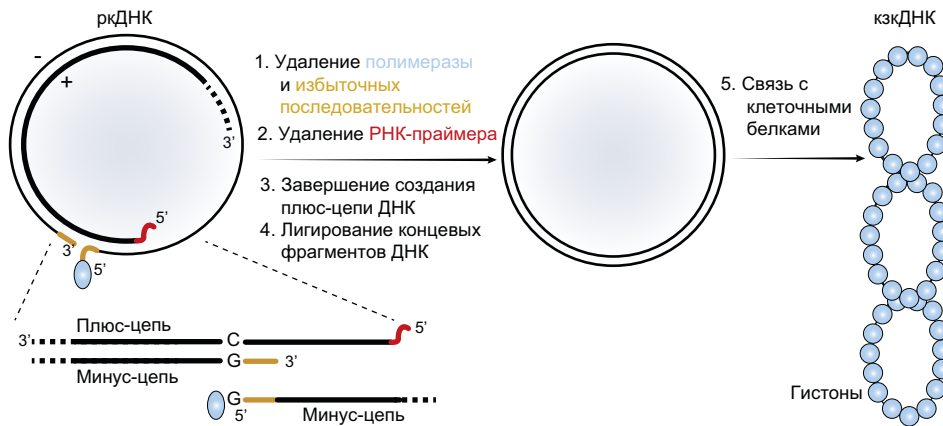
топлазме инфицированных клеток. Хотя для разделения ркДНК, линейной и суперскрученной кзкДНК может использоваться блоттинг по Саузерну, он обладает низкой чувствительностью. Для повышения чувствительности были разработаны методы селективной количественной полимеразной цепной реакции (кПЦР) кзкДНК, основанные на применении праймеров (или зондов), сшивающих разрыв в ркДНК и выполняющих гибридизацию до участка разрыва (рис. 1). Учитывая паразитические технические успехи в развитии методов ПЦР в последние годы [15], чувствительность при обнаружении кзкДНК уже не представляет проблему. Специфичность методов ПЦР для выявления кзкДНК, однако, продолжает вызывать серьезное беспокойство, и точное количественное определение кзкДНК осложняется ложноположительным обнаружением ркДНК HBV, которая в избытке присутствует в инфицированных клетках. Имеются сообщения о том, что амплификация по типу катящегося кольца (RCA) вместе с гнездовой ПЦР или без нее повышает специфичность выявления кзкДНК [16–18], однако этот метод не получил широкого распространения. Для повышения специфичности могут также использоваться методы выделения только ядерной ДНК [19], применение безопасной для плазмид ДНКазы, расщепляющей только линейную вирусную ДНК, но не ркДНК [20], а также Т5-экзонуклеазы, которая расщепляет ркДНК, но не затрагивает кзкДНК (Xia et al., в печати). Необходимо отметить, что эти экзонуклеазы обладают различной эффективностью в зависимости от типа и количества «контаминирующей» ДНК.

Сегодня в лабораториях используются разные протоколы, а единый стандарт до сих пор не выработан. Даже протокол выделения ДНК может повлиять на выявление кзкДНК за счет образования разрывов в молекулах кзкДНК. Это может сделать их восприимчивыми к воздействию эндонуклеаз, помешать выявлению с помощью RCA и изменить их поведение в фильтрующем геле перед проведением блоттинга по Саузерну. С учетом вариабельности результатов количественного определения кзкДНК разработка стандартных протоколов имеет первостепенное значение.

#### Образование кзкДНК HBV в ядре

В ходе инфекции кзкДНК образуется как плазмидоподобная эписома в ядрах клеток организма хозяина из генома ркДНК, содержащейся в проникающих в клетку вирионах. Кроме того, кзкДНК может образоваться из капсидной ркДНК, которая реимпортируется в ядро после образования в инфицированной клетке. Недавно кзкДНК была обнаружена в клеточной линии мышечных гепатоцитов, иммортилизованных за счет стабильной экспрессии трансформирующего фактора роста- $\alpha$  человека [12], что подтверждает тот факт, что факторы человеческого организма имеют существенное значение для образования кзкДНК, а точнее — для дестабилизации зрелых нуклеокапсидов. Клеточные сигналы внутриядерной локализации в богатом аргинином С-концевом домене ядерного белка HBV [21] активируют транспорт ркДНК-содержащего капсида HBV к ядру, где он прикрепляется к нуклеопорину 153 и дезинтегрируется [22]. После перемещения в ядро происходит превращение генома ркДНК в кзкДНК посредством многоэтапного процесса, который пока по большей части остается нерасшифрованным, хотя имеется предположение о связи этого механизма с механизмами репарации ДНК [23].

Прежде всего ркДНК должна отсоединиться от полимеразы HBV и ее РНК-праймера, которые являются продуктами обратной транскрипции, происходящей в вирусном капсиде. Так образуется безбелковая форма ркДНК (называемая также депротенинизированной ркДНК). Безбелковая ркДНК может персистировать в ядре перед превращением в кзкДНК и даже была обнаружена в цитоплазме [24–26]. Затем неполная плюс-цепь (с «пробелом») и концевая избыточность в минус-цепи (с «разрывом») должны быть восстановлены (рис. 2). Недавно было обнаружено, что тирозин-ДНК-фосфодиэстераза (ТДП)-2 может прицельно расщеплять связь тирозин-ДНК с высвобождением полимера-



**Рис. 2. Схематическое представление конверсии ркДНК в кзкДНК.** (1) Удаление вирусной полимеразы, присоединенной к 5'-концу минус-цепи ДНК, и одной из избыточных последовательностей. (2) Удаление праймера РНК, присоединенного к 5'-концу плюс-цепи. (3) Заполнение и завершение создания плюс-цепи ДНК вируса. (4) Лигирование концевых фрагментов плюс- и минус-цепей ДНК. (5) После образования кзкДНК закручивается в суперспираль и связывается с белками, такими как гистоны, в целях формирования так называемой мини-хромосомы кзкДНК.

зы из ркДНК HBV [27]. Тот факт, что нокаутированные с помощью ТДП2 клетки линии HepG2-NTCP, созданные с помощью метода, который основан на использовании системы CRISPR/Cas9, сохраняют восприимчивость к HBV-инфекции [28], указывает на существование альтернативных путей нуклеолитического расщепления пока еще неизвестными эндонуклеазами. При сравнении образования кзкДНК HBV и утиного вируса гепатита В (DHBV) был обнаружен неожиданный вклад самого вируса в этот процесс. ркДНК DHBV, но не HBV эффективно превращались в кзкДНК в тех же клетках [20]. Линейная ДНК HBV, которая, по всей вероятности, является случайным побочным продуктом обратной транскрипции, не может быть транскрибирована сама по себе, но способна образовывать кзкДНК-подобные молекулы путем негомологичного соединения концов. Однако большинство из этих молекул будет функционально неэффективно [23].

### Структура и регуляция кзкДНК HBV

После образования кзкДНК персистирует в качестве эписомы в ядрах инфицированных клеток, а вирусные мРНК транскрибируются клеточной РНК-полимеразой II. Молекула кзкДНК организуется в хроматиноподобную структуру, которая при электронной микроскопии дает характерную картину «узлов на веревке» [29, 30]. К ней прикрепляются гистоны и другие белки организма хозяина [31]. В последние годы были предприняты серьезные усилия для того, чтобы продемонстрировать, что транскрипционная активность кзкДНК

регулируется «гистоновым кодом» как *in vitro*, так и *in vivo* [19, 32, 33]. С помощью метода иммунопреципитации хроматина (ИПХ) был продемонстрирован рекрутинг гистонов H3 и H4, обнаружено несколько клеточных факторов транскрипции (включая CREB, ATF, STAT1/2) и ферментов, модифицирующих гистоны (таких, как CBP, p300, PCAF/GCN5, HDAC1, hSirt1, PRMT1). Установлена также их связь с изменением транскрипционной активности кзкДНК [19, 32, 34]. С использованием ИПХ с последующим применением метода секвенирования нового поколения была составлена первая полногеномная карта посттрансляционных модификаций гистонов [35]. С помощью этой карты было обнаружено, что хроматин HBV обладает рядом общих признаков с клеточным хроматином, в частности маркерами сцепления границ для достижения транскрипции. Однако для хроматина HBV характерен недостаточный уровень посттрансляционных модификаций гистонов, активность которых связана с репрессией транскрипции. Наличие этих модификаций в клеточном хроматине имеет ключевое значение для контроля над транскрипцией [35]. При применении для изучения вновь инфицированных клеток HepG2-NTCP, ПГЧ или HBV-инфицированной ткани печени этот анализ показал наличие общих признаков в организации хроматина кзкДНК, а также характеристик, являющихся уникальными для источника кзкДНК [35]. Это подчеркивает значение повторного проведения экспериментов и указывает на необходимость подтверждения результатов с помощью разных моделей.

Несмотря на название «мини-хромосома», кзкДНК HBV в отличие от хромосом не содер-

**Ключевой момент**  
кзкДНК HBV преобразуется в хроматиноподобную структуру, транскрипционная активность которой зависит от «гистонового кода».

**Ключевой момент**  
Клеточные факторы, так же как и вирусный белок HBx, играют важную роль в контроле над транскрипцией HBV.

Обзор

жит точки начала репликации и не обладает сигналом ядерного удержания. Поэтому она не может реплицироваться в инфицированных гепатоцитах самостоятельно и теоретически подлежит удалению из ядер после деления клетки. В связи с этим персистенция кзкДНК основывается на ее стабильности в ядре и на ее пополнении посредством реимпорта ркДНК из капсидов цитоплазмы после деления клетки. Период полужизни кзкДНК HBV пока точно не установлен. Он колеблется в зависимости от воспалительной активности, приводящей к обновлению гепатоцитов. Возобновление репликации HBV после отмены аналогов нуклеозидов (нуклеотидов) и следы ДНК HBV, которые продолжают регистрироваться в течение многих лет после окончания острой инфекции [37], однако, указывают на то, что кзкДНК HBV длительно сохраняется в печени человека и может персистировать десятилетиями. *In vitro* кзкДНК также характеризуется высокой стабильностью [38, 39] независимо от ее транскрипционной активности, что было продемонстрировано в клетках линии HераRG, инфицированных HBx-дефицитным HBV, не способным транскрибировать мРНК [40]. Учитывая отсутствие способности к самостоятельному поддержанию, теоретически кзкДНК должна была бы исчезать после деления клетки, например, в случае регенерации печени. Однако некоторые молекулы кзкДНК могут выживать после митоза, несмотря на резкое снижение общего уровня кзкДНК после индукции деления клетки [41–45]. Это может быть обусловлено восполнением посредством реимпорта ркДНК из вновь образующихся вирусных капсидов внутрь ядра.

В результате применения комбинации методов *in vitro*, включая анализ изменения электрофоретической подвижности и анализ защиты ДНК, было обнаружено, что ряд факторов транскрипции связывается с регулирующими HBV элементами [46]. Среди них наиболее значимыми ядерными факторами для транскрипции HBV являются HNF1 $\alpha$  и HNF4 $\alpha$  (ядерные факторы гепатоцитов) [46, 48]. Вирусные белки также играют важную роль в структуре кзкДНК и контроле над ней. В частности, неструктурный белок HBx связывается с кзкДНК и имеет существенное значение для инициации и поддержания транскрипции с кзкДНК [40]. На самом деле в эксперименте с инфицированием клеток dHeraRG HBx-дефицитным мутантным HBV, в котором экспрессия HBx регулируется тетрациклином, мы показали, что транскрипция вирусной РНК точно повторяет включение и выключение экспрессии HBx [40]. В ходе использования этой модели оказалось, что транскрипция HBV подавляется в отсутствие HBx, а не при изменении функционирования HBx, что и служит

типичным вирусным трансаактиватором. Это подавление транскрипции характеризуется образованием более компактной структуры кзкДНК [49], связанной с репрессивными эпигенетическими маркерами [32, 49] на кзкДНК, которые отсутствуют в присутствии HBx [35]. Интересно отметить, что HBx поддерживает экспрессию генов с помощью постоянного механизма, воздействующего конкретно на матрицу эписомной ДНК, и требует присоединения HBx к клеточному белку DDB1 (белок, связывающийся с поврежденной ДНК) в комплексе убиквитинлигазы E3 [50]. Результаты проведенных недавно исследований свидетельствуют о том, что HBx блокирует клеточные факторы, подавляющие транскрипцию с кзкДНК, такие как SETDB1 [49] и спиндлин 1 [51], а также другие важные факторы, о которых сообщалось на последней конференции, посвященной HBV (данные будут вскоре опубликованы).

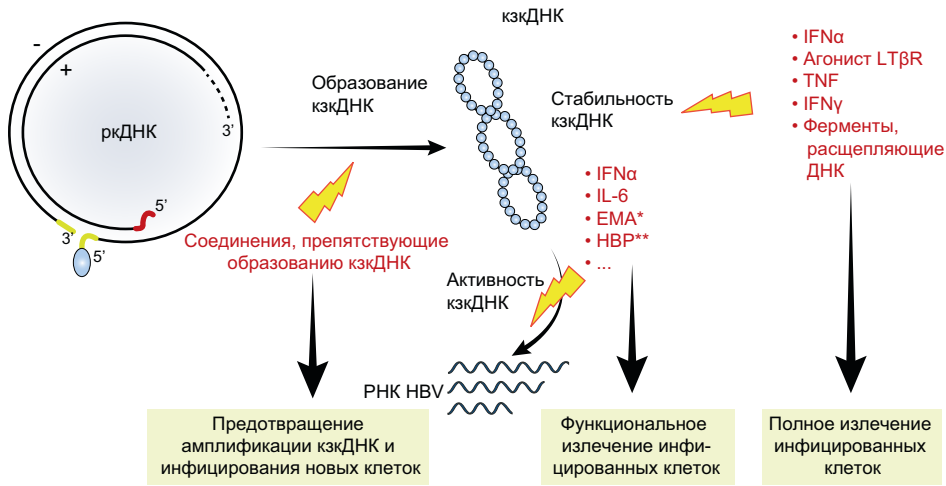
Помимо HBx ядерный белок HBV (HBc) присоединяется к кзкДНК, что приводит к изменению промежутков между нуклеосомами в нуклеопротеиновом комплексе HBV [31]. Предметом споров пока остается вопрос о том, регулирует ли HBc и транскрипцию с кзкДНК. С одной стороны, было обнаружено, что HBc повреждает профиль метилирования кзкДНК и за счет этого поддерживает перmissive эпигенетический статус в критическом участке кзкДНК [52]. С другой стороны, недавно было описано сокращение привлечения HBc на кзкДНК в HBx-негативных вирусах, однако не было доказано, что этот феномен определяет неспособность кзкДНК к транскрипции [49]. Вопросы, касающиеся происхождения HBc, присоединяющегося к кзкДНК (т. е. происходит ли он из проникающего вируса или в результате вирусной репликации), кинетики его привлечения на кзкДНК и стабильности после присоединения к кзкДНК, остаются нерешенными. Ответы на эти вопросы, несомненно, помогут понять роль этого белка в регуляции кзкДНК. Поскольку HBc играет важную роль в структуре кзкДНК и/или контроле над ней, то было также высказано предположение, что модификаторы сборки капсида, которые в настоящее время проходят стадию клинической разработки, также оказывают влияние на кзкДНК [62]. Однако это еще предстоит доказать.

### Воздействие на кзкДНК для излечения HBV-инфекции

В настоящее время существует несколько методов, направленных на кзкДНК: подавление образования, блокирование функции и индукция распада (рис. 3).

#### Ключевой момент

В последнее время были разработаны потенциальные стратегии направленного воздействия на кзкДНК.



**Рис. 3. Направленное воздействие на кзкДНК в целях излечения HBV-инфекции**

EMA — средство эпигенетической модификации; HBP — активация партнера связывания HBx; LT $\beta$ R — рецепторы лимфотоксина  $\beta$ .

Обнаружено, что два структурно родственных двузамещенных сульфонидами (ДЗС) препятствуют конверсии ркДНК в кзкДНК [38]. Учитывая предполагаемую роль ответа на повреждение ДНК в этом процессе, вирусные белки или вещества, препятствующие этому ответу, также должны нарушать конверсию ркДНК в кзкДНК. Принимая во внимание длительный период полужизни кзкДНК, однако, эти соединения могут быть эффективными только при назначении в начальный период HBV-инфекции или во время интенсивного обновления гепатоцитов.

После образования кзкДНК ее транскрипцию можно подавить с помощью цитокинов. Например, мы продемонстрировали, что интерлейкин (IL)-6 подавляет транскрипцию кзкДНК путем сокращения уровня ключевых факторов транскрипции HNF1 $\alpha$  и HNF4 $\alpha$  за счет активации сигнального пути MAPK [53]. В результате HNF1 $\alpha$  и HNF4 $\alpha$  не присоединяются к кзкДНК, что сопровождается перераспределением STAT3 с кзкДНК на гены-мишени клеточного IL-6 [48]. Установлено также, что транскрипцию кзкДНК можно остановить путем применения IFN- $\alpha$  или низкомолекулярных веществ, направленных на ферменты, модифицирующие хроматин [34, 54–56]. В результате проведения полногеномного картирования модификаций гистонов в инфицированных клетках было выявлено большее число активных модификаций хроматина HBV, которое можно сократить путем активации сигнальных путей естественного иммунитета, а также с помощью низкомолекулярных эпигенетических модифицирующих средств [35]. Это подтверждает идею о том, что регуляция транскрипции кзкДНК, основанная на воздействии на хроматин, может иметь те-

рапевтическое значение. Лучшее понимание функции белка HBx и его взаимодействия с DDB1 в комплексе убиквитинлигазы E3 [57], которые могут вызывать деградацию белков организма хозяина, контролирующих HBV, может способствовать выявлению новых мишеней для создания противовирусных препаратов. Поскольку стратегии, направленные на подавление транскрипции кзкДНК, будут давать только временный эффект, с их помощью, вероятно, можно будет достичь только функционального излечения HBV-инфекции.

Удаление кзкДНК из ядра инфицированных клеток представляется более перспективным подходом, поскольку это приведет к достижению устойчивого контроля над HBV и даже к полному излечению HBV-инфекции. При проведении экспериментов у шимпанзе было показано, что не только подавление репликации HBV, но и сокращение уровня кзкДНК HBV возникают перед развитием резко выраженной цитотоксичности Т-лимфоцитов, что приводит к повреждению печени при остром гепатите [5]. Это свидетельствует о том, что на пул кзкДНК можно воздействовать с помощью нецитолитических механизмов с участием цитокинов, таких как интерфероны или фактор некроза опухолей (TNF) [5]. Недавно мы показали, что индукция внутрипеченочного противовирусного иммунного ответа (с помощью высоких доз IFN- $\alpha$  или агонистов LT $\beta$ R) может вызывать стимуляцию нецитолитического распада кзкДНК в инфицированных клетках *in vitro* [58]. Активация ядерных дезаминаз, таких как APOBEC3A (A3A) и APOBEC3B (A3B), приводила к дезаминированию кзкДНК и существенному сокращению ее уровня [58]. Несмотря на то что A3A- или A3B-опосредованное дезаминирование игра-

ло важную роль, точные пути и ферменты, принимающие участие в последующих звеньях деградации ДНК HBV, еще предстоит расшифровать. По-видимому, они участвуют в репарации путем удаления оснований или нуклеотидов. Необходимо также установить, возможна ли полная элиминация кзкДНК или останется часть, рефрактерная к лечению. Устранение кзкДНК изучалось в зависимости от активности Т-лимфоцитов. Мы обнаружили, что цитокины IFN- $\gamma$  и TNF, производимые Т-лимфоцитами, стимулируют А3А и А3В синергичным образом [59]. Для того чтобы определить, способствуют ли эти или другие вырабатываемые Т-лимфоцитами цитокины удалению кзкДНК из клетки нецитолитическим способом, мы применили систему, позволяющую отдельно оценить цитолитическую и нецитолитическую функции Т-лимфоцитов. Мы использовали Т-лимфоциты с химерными антигенными рецепторами [60, 61], которые распознают HBsAg на поверхности клеток и могут быть специфическим образом стимулированы. Тогда как при прямом контакте в совместной культуре Т-лимфоциты убивали HBV-инфицированные клетки, в этом эксперименте они были способны лишь выделять цитокины. Тем не менее устранение кзкДНК из клеток наблюдалось в обоих случаях и было, несомненно, А3А/А3В-зависимым [59]. Таким образом, HBV-специфические Т-лимфоциты были способны устранять HBV как цитолитическим, так и нецитолитическим способом. Это свидетельствует о возможности деградации кзкДНК нецитолитическим способом и может служить подтверждением эффективности подходов к излечению HBV-инфекции путем терапевтической вакцинации, перенаправления Т-лимфоцитов или использования других стратегий активации иммунных клеток, таких как блокада PD-1 или лиганда PD-1 [71]. Существует риск того, что активация иммунитета может привести к повреждению тканей при длительной стимуляции и неэффективной элиминации HBV [64].

В качестве альтернативы в настоящее время в стадии разработки находятся ферменты, расщепляющие ДНК, включая хоуминг-эндо-нуклеазы или мегануклеазы, цинк-пальцевые

нуклеазы, TAL-эффекторные нуклеазы (TALEN) и белки, ассоциированные с системой CRISPR-9 (Cas9), специфически направленные на кзкДНК HBV [63–69]. Клиническая разработка этих интересных методов, однако, ограничена в связи с риском побочных эффектов, вызывающих повреждение клеточной ДНК. Помимо этого эффективная направленная доставка препаратов ко всем инфицированным клеткам в настоящее время невозможна, и применение указанных методов потребует использования генно-терапевтического подхода.

В целом необходимы дальнейшие фундаментальные и более подробные молекулярные исследования для оценки клинического потенциала новых противовирусных стратегий, обсуждавшихся в настоящем обзоре, с целью полного излечения HBV-инфекции.

### Спонсоры

Работа в лаборатории авторов выполнялась при поддержке Европейской ассоциации по изучению печени (EASL), Центра по изучению инфекционных болезней Германии (DZIF), Французского агентства по изучению СПИДа и вирусных гепатитов (ANRS), фонда FINOVI, Французской ассоциации по изучению рака (ARC), Ассоциации Гельмгольца, Министерства по образованию и научным исследованиям Германии (BMBF), Министерства экономики Германии (BMWi) и Фонда научных исследований Германии (DFG).

### Конфликты интересов

Авторы, принимавшие участие в настоящем исследовании, заявляют об отсутствии конфликтов интересов в отношении финансирования и написания статьи.

### Благодарности

Авторы выражают благодарность Judith Fresquet за помощь в составлении рис. 1.

### Литература

- [1] Trepo C, Chan HL, Lok A. Hepatitis B virus infection. *Lancet* 2014;384(9959):2053–2063.
- [2] Wursthorn K, Lutgehetmann M, Dandri M, Volz T, Buggisch P, Zollner B, et al. Peginterferon alpha-2b plus adefovir induce strong cccDNA decline and HBsAg reduction in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology* 2006;44:675–684.
- [3] Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife* 2012;1:e00049.
- [4] Ni Y, Lempp FA, Mehrle S, Nkongolo S, Kaufman C, Falth M, et al. Hepatitis B and D viruses exploit sodium taurocholate co-transporting polypeptide for species-specific entry into hepatocytes. *Gastroenterology* 2014;146:1070–1083.
- [5] Guidotti LG, Rochford R, Chung J, Shapiro M, Purcell R, Chisari FV. Viral clearance without destruction of infected cells during acute HBV infection. *Science* 1999;284:825–829.
- [6] Harrington M. State of the (research) chimp. *Lab Animal* 2012;41:31.
- [7] Gheit T, Sekkat S, Cova L, Chevallier M, Petit MA, Hantz O, et al. Experimental transfection of *Macaca sylvanus* with cloned human hepatitis B virus. *J Gen Virol* 2002;83:1645–1649.

- [8] Lucifora J, Vincent IE, Berthillon P, Dupinay T, Michelet M, Protzer U, et al. Hepatitis B virus replication in primary macaque hepatocytes: crossing the species barrier toward a new small primate model. *Hepatology* 2010;51:1954–1960.
- [9] Dupinay T, Gheit T, Roques P, Cova L, Chevallier-Queyron P, Tasahsu SI, et al. Discovery of naturally occurring transmissible chronic hepatitis B virus infection among *Macaca fascicularis* from Mauritius Island. *Hepatology* 2013;58:1610–1620.
- [10] Yan H, Peng B, He W, Zhong G, Qi Y, Ren B, et al. Molecular determinants of hepatitis B and D virus entry restriction in mouse sodium taurocholate cotransporting polypeptide. *J Virol* 2013;87:7977–7991.
- [11] Li H, Zhuang Q, Wang Y, Zhang T, Zhao J, Zhang Y, et al. HBV life cycle is restricted in mouse hepatocytes expressing human NTCP. *Cell Mol Immunol* 2014;11:175–183.
- [12] Cui X, Guo JT, Hu J. Hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation in immortalized mouse hepatocytes associated with nucleocapsid destabilization. *J Virol* 2015;89:9021–9028.
- [13] Allweiss L, Volz T, Lutgehetmann M, Giersch K, Bornscheuer T, Lohse AW, et al. Immune cell responses are not required to induce substantial hepatitis B virus antigen decline during pegylated interferon-alpha administration. *J Hepatol* 2014;60:500–507.
- [14] Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology* 2004;126:1750–1758.
- [15] Mu D, Yan L, Tang H, Liao Y. A sensitive and accurate quantification method for the detection of hepatitis B virus covalently closed circular DNA by the application of a droplet digital polymerase chain reaction amplification system. *Biotechnol Lett* 2015;37:2063–2073.
- [16] Margeridon S, Carrouee-Durantel S, Chemin I, Barraud L, Zoulim F, Trepo C, et al. Rolling circle amplification, a powerful tool for genetic and functional studies of complete hepatitis B virus genomes from low-level infections and for directly probing covalently closed circular DNA. *Antimicrob Agents Chemother* 2008;52:3068–3073.
- [17] Zhong Y, Han J, Zou Z, Liu S, Tang B, Ren X, et al. Quantitation of HBV covalently closed circular DNA in micro formalin fixed paraffin-embedded liver tissue using rolling circle amplification in combination with real-time PCR. *Clin Chim Acta* 2011;412:1905–1911.
- [18] Zhong Y, Hu S, Xu C, Zhao Y, Xu D, Zhao Y, et al. A novel method for detection of HBVcccDNA in hepatocytes using rolling circle amplification combined with in situ PCR. *BMC Infect Dis* 2014;14:608.
- [19] 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;130:823–837.
- [20] Kock J, Rosler C, Zhang JJ, Blum HE, Nassal M, Thoma C. Generation of covalently closed circular DNA of hepatitis B viruses via intracellular recycling is regulated in a virus specific manner. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001082.
- [21] Li HC, Huang EY, Su PY, Wu SY, Yang CC, Lin YS, et al. Nuclear export and import of human hepatitis B virus capsid protein and particles. *PLoS Pathog* 2010;6:e1001162.
- [22] Schmitz A, Schwarz A, Foss M, Zhou L, Rabe B, Hoellenriegel J, et al. Nucleoporin 153 arrests the nuclear import of hepatitis B virus capsids in the nuclear basket. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000741.
- [23] Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut* 2015;64:1972–1984.
- [24] Guo H, Jiang D, Zhou T, Cuconati A, Block TM, Guo JT. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. *J Virol* 2007;81:12472–12484.
- [25] Guo H, Mao R, Block TM, Guo JT. Production and function of the cytoplasmic deproteinized relaxed circular DNA of hepadnaviruses. *J Virol* 2010;84:387–396.
- [26] Guo H, Xu C, Zhou T, Block TM, Guo JT. Characterization of the host factors required for hepadnavirus covalently closed circular (ccc) DNA formation. *PLoS One* 2012;7:e43270.
- [27] Koniger C, Wingert I, Marsmann M, Rosler C, Beck J, Nassal M. Involvement of the host DNA-repair enzyme TDP2 in formation of the covalently closed circular DNA persistence reservoir of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2014;111:E4244–E4253.
- [28] Cui X, McAllister R, Boregowda R, Sohn JA, Ledesma FC, Caldecott KW, et al. Does tyrosyl DNA phosphodiesterase-2 play a role in hepatitis B virus genome repair? *PLoS One* 2015;10:e0128401.
- [29] Newbold JE, Xin H, Tencza M, Sherman G, Dean J, Bowden S, et al. The covalently closed duplex form of the hepadnavirus genome exists in situ as a heterogeneous population of viral minichromosomes. *J Virol* 1995;69:3350–3357.
- [30] Bock CT, Schranz P, Schroder CH, Zentgraf H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell. *Virus Genes* 1994;8:215–229.
- [31] Bock CT, Schwinn S, Locarnini S, Fyfe J, Manns MP, Trautwein C, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol* 2001;307:183–196.
- [32] 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;106:19975–19979.
- [33] Benhenda S, Ducroux A, Riviere L, Sobhian B, Ward MD, Dion S, et al. Methyltransferase PRMT1 is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription. *J Virol* 2013;87:4360–4371.
- [34] Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, et al. IFN-alpha inhibits HBV transcription and replication in cell culture and in humanized mice by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest* 2012;122:529–537.
- [35] Tropberger P, Mercier A, Robinson M, Zhong W, Ganem DE, Holdorf M. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2015;112:E5715–E5724.
- [36] Zoulim F. Hepatitis B virus resistance to antiviral drugs: where are we going? *Liver Int* 2011;31:111–116.
- [37] Rehermann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med* 1996;2:1104–1108.
- [38] Cai D, Mills C, Yu W, Yan R, Aldrich CE, Saputelli JR, et al. Identification of disubstituted sulfonamide compounds as specific inhibitors of hepatitis B virus covalently closed circular DNA formation. *Antimicrob Agents Chemother* 2012;56:4277–4288.
- [39] Zhou T, Guo H, Guo JT, Cuconati A, Mehta A, Block TM. Hepatitis B virus e antigen production is dependent upon covalently closed circular (ccc) DNA in HepAD38 cell cultures and may serve as a cccDNA surrogate in antiviral screening assays. *Antiviral Res* 2006;72:116–124.
- [40] Lucifora J, Arzberger S, Durantel D, Belloni L, Strubin M, Levrero M, et al. Hepatitis B virus X protein is essential to initiate and maintain virus replication after infection. *J Hepatol* 2011;55:996–1003.
- [41] Lutgehetmann M, Volz T, Kopke A, Broja T, Tigges E, Lohse AW, et al. In vivo proliferation of hepadnavirus-infected hepatocytes induces loss of covalently closed circular DNA in mice. *Hepatology* 2010;52:16–24.
- [42] Guo JT, Pryce M, Wang X, Barrasa MI, Hu J, Seeger C. Conditional replication of duck hepatitis B virus in hepatoma cells. *J Virol* 2003;77:1885–1893.
- [43] Reaiche-Miller GY, Thorpe M, Low HC, Qiao Q, Scougall CA, Mason WS, et al. Duck hepatitis B virus covalently closed circular DNA appears to survive hepatocyte mitosis in the growing liver. *Virology* 2013;446:357–364.
- [44] Summers J, Jilbert AR, Yang W, Aldrich CE, Saputelli J, Litwin S, et al. Hepatocyte turnover during resolution of a transient hepadnaviral infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100:11652–11659.
- [45] Allweiss L, Volz T, Giersch K, Lohse AW, Petersen J, Lutgehetmann M, et al. 127 Proliferation of hepatitis B virus infected human hepa-



- toocytes induces suppression of viral replication and rapid cccDNA decrease in humanized mice. *J Hepatol* 2013;58:S56–S57.
- [46] Quasdorff M, Protzer U. Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J Viral Hepat* 2010;17:527–536.
- [47] Quasdorff M, Hosel M, Odenthal M, Zedler U, Bohne F, Gripon P, et al. A concerted action of HNF4alpha and HNF1alpha links hepatitis B virus replication to hepatocyte differentiation. *Cell Microbiol* 2008;10:1478–1490.
- [48] Palumbo GA, Scisciani C, Pediconi N, Lupacchini L, Alfalate D, Guerrieri F, et al. IL6 inhibits HBV transcription by targeting the epigenetic control of the nuclear cccDNA minichromosome. *PLoS One* 2015;10:e0142599.
- [49] Riviere L, Gerossier L, Ducroux A, Dion S, Deng Q, Michel ML, et al. HBx relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J Hepatol* 2015;63:1093–1102.
- [50] van Breugel PC, Robert EI, Mueller H, Decorsiere A, Zoulim F, Hantz O, et al. Hepatitis B virus X protein stimulates gene expression selectively from extrachromosomal DNA templates. *Hepatology* 2012;56:2116–2124.
- [51] Ducroux A, Benhenda S, Riviere L, Semmes OJ, Benkirane M, Neuveut C. The Tudor domain protein Spindlin1 is involved in intrinsic antiviral defense against incoming hepatitis B Virus and herpes simplex virus type 1. *PLoS Pathog* 2014;10:e1004343.
- [52] Guo YH, Li YN, Zhao JR, Zhang J, Yan Z. HBc binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics* 2011;6:720–726.
- [53] Hosel M, Quasdorff M, Wiegmann K, Webb D, Zedler U, Broxtermann M, et al. Not interferon, but interleukin-6 controls early gene expression in hepatitis B virus infection. *Hepatology* 2009;50:1773–1782.
- [54] Protzer U, Nassal M, Chiang PW, Kirschfink M, Schaller H. Interferon gene transfer by a hepatitis B virus vector efficiently suppresses wild-type virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96:10818–10823.
- [55] Belloni L, Palumbo GA, Valente S, Rotili D, Pediconi N, Mai A, et al. Mimicking Interferon- $\alpha$  (IFN $\alpha$ ) inhibitory activity on hepatitis B virus (HBV) transcription and replication by targeting the epigenetic control of nuclear cccDNA minichromosome with epigenetic small molecules. *Hepatology* 2012;56:369A.
- [56] Liu F, Campagna M, Qi Y, Zhao X, Guo F, Xu C, et al. Alpha-interferon suppresses hepatitis B virus transcription by altering epigenetic modification of cccDNA minichromosomes. *PLoS Pathog* 2013;9:e1003613.
- [57] Li T, Robert EI, van Breugel PC, Strubin M, Zheng N. A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat Struct Mol Biol* 2010;17:105–111.
- [58] 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;343:1221–1228.
- [59] Xia Y, Stadler D, Lucifora J, Reisinger F, Webb D, Hosel M, et al. Interferon- $\gamma$  and tumor necrosis factor- $\alpha$  produced by T cells reduce the HBV persistence form, cccDNA, without cytolysis. *Gastroenterology* 2016;150:194–205.
- [60] Bohne F, Chmielewski M, Ebert G, Wiegmann K, Kurschner T, Schulze A, et al. T cells redirected against hepatitis B virus surface proteins eliminate infected hepatocytes. *Gastroenterology* 2008;134:239–247.
- [61] Krebs K, Bottinger N, Huang LR, Chmielewski M, Arzberger S, Gasteiger G, et al. T cells expressing a chimeric antigen receptor that binds hepatitis B virus envelope proteins control virus replication in mice. *Gastroenterology* 2013;145:456–465.
- [62] Belloni L, Li L, Palumbo GA, Chirapu SR, Calvo L, Finn MG, et al. HAPs hepatitis B virus (HBV) capsid inhibitors block core protein interaction with the viral minichromosome and host cell genes and affect cccDNA transcription and stability. *Hepatology* 2013;54:277A.
- [63] Cradick TJ, Keck K, Bradshaw S, Jamieson AC, McCaffrey AP. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther* 2010;18:947–954.
- [64] Schiffer JT, Swan DA, Stone D, Jerome KR. Predictors of hepatitis B cure using gene therapy to deliver DNA cleavage enzymes: a mathematical modeling approach. *PLoS Comput Biol* 2013;9:e1003131.
- [65] Chen J, Zhang W, Lin J, Wang F, Wu M, Chen C, et al. An efficient antiviral strategy for targeting hepatitis B virus genome using transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther* 2014;22:303–311.
- [66] Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbuthnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Mol Ther* 2013;21:1889–1897.
- [67] Seeger C, Sohn JA. Targeting hepatitis B virus with CRISPR/Cas9. *Mol Ther Nucleic Acids* 2014;3:e216.
- [68] Kennedy EM, Bassit LC, Mueller H, Kornepati AV, Bogerd HP, Nie T, et al. Suppression of hepatitis B virus DNA accumulation in chronically infected cells using a bacterial CRISPR/Cas RNA-guided DNA endonuclease. *Virology* 2015;476:196–205.
- [69] Dong C, Qu L, Wang H, Wei L, Dong Y, Xiong S. Targeting hepatitis B virus cccDNA by CRISPR/Cas9 nuclease efficiently inhibits viral replication. *Antiviral Res* 2015;118:110–117.
- [70] Allweis L, Dandri M. Experimental in vitro and in vivo models for the study of human hepatitis B virus infection. *J Hepatol* 2016;64:S17–S31.
- [71] Durantel D, Zoulim F. New antiviral targets for innovative treatment concepts for hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *J Hepatol* 2016;64:S117–S131.