

Роль гиперэкспрессии ДНК-метилтрансфераз в персистенции кольцевой ковалентно замкнутой ДНК при хроническом гепатите В

Д.С. КОСТЮШЕВ¹, А.П. ЗУЕВА^{1,2}, С.А. БРЕЗГИН^{1,3}, А.Д. ЛИПАТНИКОВ^{1,4}, В.Н. СИМИРСКИЙ⁵,
D. GLEBE⁶, Е.В. ВОЛЧКОВА³, Г.А. ШИПУЛИН¹, В.П. ЧУЛАНОВ^{1,3}

¹ФБУН «Центральный научно-исследовательский институт эпидемиологии» Роспотребнадзора, Москва, Россия; ²ФГБОУ ВО «Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова», Москва, Россия; ³ФГАОУ ВО «Первый МГМУ им. И.М. Сеченова» Минздрава России, Москва, Россия; ⁴ФГБОУ ВО «Российский химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева» Минобрнауки России, Москва, Россия; ⁵ФГБУН «Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова» РАН, Москва, Россия; ⁶Гессенский университет им. Ю. Либиха, институт медицинской вирусологии, Гессен, Германия

Резюме

Цель исследования. Изучение роли ДНК-метилтрансфераз 1-го и 3А типов в жизненном цикле вируса гепатита В (HBV).

Материалы и методы. Клетки гепатомы человека HepG2, стабильно экспрессирующие геном HBV 1.1-мер, трансфицированы векторами, которые кодируют ДНК-метилтрансферазу-1 (ДНМТ1), ДНК-метилтрансферазу-3А (ДНМТ3А) или котрансфицированы обоими векторами. Определение общего числа копий ДНК HBV, уровней экспрессии прегеномной РНК (pgRNA), РНК, кодирующей S-белок (S-RNA), и уровень кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) методом количественного и полуколичественного анализа с помощью полимеразной цепной реакции в реальном времени с зондами TaqMan использовали для оценки действия ДНК-метилтрансфераз на жизненный цикл HBV.

Результаты. ДНМТ1 и ДНМТ3А в разной степени подавляют транскрипцию и репликацию HBV. Количество ккзДНК статистически значимо увеличивается под действием ДНМТ3А, но не изменяется под действием ДНМТ1.

Заключение. ДНМТ3А регулирует количество ккзДНК и является важным фактором персистенции HBV.

Ключевые слова: вирус гепатита В, хронический гепатит В, ккзДНК, прегеномная РНК, полимеразная цепная реакция, ДНК-метилтрансферазы.

Overexpression of DNA-methyltransferases in persistency of cccDNA pool in chronic hepatitis B

D.S. KOSTYUSHEV¹, A.P. ZUEVA^{1,2}, S.A. BREZGIN^{1,3}, A.D. LIPATNIKOV^{1,4}, V.N. SIMIRSKIY⁵, D. GLEBE⁶,
E.V. VOLCHKOVA³, G.A. SHIPULIN¹, V.P. CHULANOV^{1,3}

¹Central Research Institute of Epidemiology, Moscow, Russia; ²M.V. Lomonosov Moscow State University, Moscow, Russia; ³I.M. Sechenov First State Medical University, Moscow, Russia; ⁴D.I. Mendeleev University of Chemical Technology of Russia, Moscow, Russia; ⁵N.K. Koltsov Institute of Developmental Biology, Moscow, Russia; ⁶Justus-Liebig University of Giessen, Institute of Medical Virology, Giessen, Germany

Aim. To define the role of DNA-methyltransferases of type 1 and type 3A in hepatitis B viral cycle.

Materials and methods. Human hepatoma cells HepG2 with stable expression of 1.1-mer HBV genome were transfected with vectors encoding DNA-methyltransferase 1 (DNMT1), DNA-methyltransferase 3A (DNMT3A) or were co-transfected with these vectors. Total HBV DNA copy number, relative expression of pregenomic RNA (pgRNA), S-protein-encoding RNA (S-RNA) and cccDNA were analyzed by quantitative and semi-quantitative real-time PCR-analysis with TaqMan probes for assessment of DNMTs-mediated effects on HBV.

Results. DNMT1 and DNMT3A suppress HBV transcription and replication, though to different magnitude. cccDNA pool is enlarged statistically significantly ≈ 2 -fold ($P < 0.005$) after transfection of DNMT3A, but is unaltered under DNMT1 treatment.

Conclusion. DNMT3A regulates the size of cccDNA pool and is important for persistency of HBV infection.

Key words: hepatitis B virus (HBV), chronic hepatitis B (CHB), cccDNA, pgRNA, PCR, DNA-methyltransferases (DNMT).

ВГВ — вирусный гепатит В
ДНМТ — ДНК-метилтрансфераза
ккзДНК — кольцевая ковалентно замкнутая ДНК
ПЦР — полимеразная цепная реакция

ХГВ — хронический гепатит В
ккзДНК — кольцевая частично двухцепочечная ДНК
HBV — вирус гепатита В
pgRNA — прегеномная РНК

Вирус гепатита В (HBV) является высоко контагиозным вирусом, способным инфицировать человека и вызывать острый или хронический гепатит В (ХГВ). Случаи заражения вирусным гепатитом В (ВГВ) отмечаются по всему миру, с наибольшей распространенностью в странах Среднего и Ближнего Востока, Азии, странах Карибского Бассейна, Африки и Южной Америки. По данным ВОЗ, ежегодно регистрируются 350 млн новых случаев заражения ВГВ и около 1 млн человек ежегодно умирают от

его последствий, цирроза печени или гепатоцеллюлярной карциномы [1]. В Российской Федерации, как и в странах Западной Европы, США, Канаде, Австралии, мероприятия по вакцинации против HBV значительно снизили заболеваемость острым гепатитом В, однако ежегодно в нашей стране регистрируется более 40 тыс. новых случаев хронической инфекции HBV, основной причины цирроза и рака печени (гепатоцеллюлярной карциномы), причем 90% заболевших ВГВ — молодое трудоспособное население

ние. Распространенность ВГВ в Российской Федерации составляет 2% от общего населения страны, т.е. около 3 млн человек. Заболеваемость ВГВ — одна из самых серьезных проблем Российского здравоохранения [2].

Главная причина перехода ВГВ в хроническую форму заключается в активности особой стабильной формы ДНК вируса — кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК), которая, годами персистируя в гепатоцитах человека, вызывает их гибель или злокачественную трансформацию. Число копий ккзДНК в ядре клетки колеблется от 2 до 50, при этом молекулы ккзДНК не способны к репликации по полуконсервативному механизму, и каждая молекула ккзДНК образуется только из соответствующего предшественника — кольцевой частично двухцепочечной ДНК (кчдДНК). Главная сложность в эрадикации HBV при ХГВ — это стабильность молекулы ккзДНК и ее внутриядерная локализация [3].

В отличие от всех прочих короткоживущих транскриптов HBV и репликативных интермедиатов (двухцепочечной линейной и кольцевой кчдДНК) ккзДНК в покоящихся гепатоцитах может находиться в течение длительного времени, недостижимая для действия любых современных противовирусных средств даже в ходе продолжительных (от нескольких лет до десятилетий) курсов терапии [4].

Данные по наличию ккзДНК HBV у пациентов с ХГВ *in vivo* демонстрируют, что число копий ккзДНК коррелирует со статусом HBeAg и вирусной активностью. Большое число копий ккзДНК (1—40 на 1 клетку) определяется у позитивных по HBeAg пациентов на фоне высоких уровней общей внутриклеточной ДНК HBV (95—9,890 копии на 1 клетку) и ДНК HBV в сыворотке крови (10^7 — 10^9 копий/мл). При этом средние уровни ккзДНК примерно в 10 раз ниже у негативных по HBeAg пациентов [5, 6]. Уровни внутрипеченочной ккзДНК варьируют в широких пределах (0,003—6,8 копии на 1 клетку) в зависимости от активности заболевания, репликации и генетических особенностей вируса и объясняются значительной гетерогенностью данной группы пациентов. Тем не менее число копий ккзДНК оказывается меньше 0,1 копии на

клетку у негативных по HBeAg пациентов с низкой вирусемией [7]. Кроме того, более чем на 84% отмечено уменьшение числа копий ккзДНК у пациентов, находящихся на длительном (48 нед) лечении аналогами нуклеоз(т)идов [8]. Методом математического моделирования с использованием данных по ккзДНК от пациентов, находящихся на длительном лечении аналогами нуклеоз(т)ов, показано, что на полную элиминацию ккзДНК у пациентов с ХГВ может потребоваться до 14,5 года [9].

Таким образом, высокая персистенция ккзДНК — основной барьер на пути элиминации HBV и излечения от ХГВ. Персистенцию HBV традиционно объясняют персистенцией ккзДНК. Она существует в ядре гепатоцитов в виде мини-хромосомы, транскрибирует все типы вирусных РНК, включая прегеномную РНК (pgRNA), и может регулироваться эпигенетически, в том числе с помощью метилирования ДНК [10—13]. Недавно показано, что метилирование ДНК HBV играет роль в регуляции транскрипционной активности ккзДНК. Три принципиальных локуса генома HBV (островки CpG) могут метилироваться под действием ДНК-метилтрансфераз (ДНМТ) клетки [14, 15]. Метилированные матрицы ДНК HBV выявляются в сыворотке крови и биоптатах печени пациентов с ХГВ [16]. Кроме того, в гепатоцитах таких пациентов по сравнению со здоровыми людьми уровни экспрессии ДНМТ (ДНМТ1, ДНМТ3А, ДНМТ3В) повышены [17]. Полагают, что экспрессия ДНМТ клеткой может быть частью неспецифического внутриклеточного анти-HBV-ответа, призванного снизить транскрипцию вируса [13].

Экспериментальные методы лечения ХГВ, нацеленные на расщепление матриц ккзДНК, т.е. на устранение основной причины заболевания, не в состоянии полностью элиминировать ккзДНК. Среди наиболее перспективных стоит перечислить системы нуклеаз CRISPR/Cas, TALENs и активацию ферментов APOBECs. К причинам их неэффективности относят разнородность ккзДНК, т.е. подразумевается существование транзиторных (транскрипционно-активных) и стабильных (высокоперсистентных) форм ккзДНК. Последние резистентны к любому рода воздействиям [18—21]. Следует отметить, что у негативных по HBeAg пациентов уровни метилирования ккзДНК выше, а репликативная активность значительно ниже, чем у позитивных по HBeAg [22]. Предположительно оставшиеся, немногочисленные, метилированные матрицы ккзДНК у негативных по HBeAg пациентов могут относиться к высокоперсистентной популяции, представляющей наибольшую трудность для элиминации.

Понимание механизмов образования популяций ккзДНК и их особенностей необходимо для создания подходов к полной элиминации HBV и излечения ХГВ. Более того, использование подходов по эпигенетическому ремоделированию матриц ккзДНК может стать одним из методов комплексной терапии, направленной на полное выздоровление пациентов с ХГВ.

В данной работе мы использовали модель трансфекции клеток гепатомы человека HepG2 с активным циклом HBV и векторами, экспрессирующими ДНМТ 1-го и 3А

Сведения об авторах:

Зуева Анастасия Павловна — лаборант лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии; магистрант каф. вирусологии, биологический факультет МГУ им. М.В. Ломоносова

Брезгин Сергей Алексеевич — лаборант лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии;

Липатников Александр Дмитриевич — лаборант лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии; студент фак. химико-фармацевтических технологий и биомедицинских препаратов Российского химико-технологического университета им. Д.И. Менделеева

Симирский Владимир Николаевич — Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН

Glebe Dieter — Гиссенский университет им. Ю. Либиха, Институт медицинской вирусологии, руководитель Национального референс-центра по вирусам гепатита В и D

Шипулин Герман Александрович — рук. отдела молекулярной диагностики и эпидемиологии ЦНИИ эпидемиологии

Волчкова Елена Васильевна — зав. каф. инфекционных болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Чуланов Владимир Петрович — зав. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии; проф. каф. инфекционных болезней Первого МГМУ им. И.М. Сеченова

Контактная информация:

Костюшев Дмитрий Сергеевич — м.н.с. лаб. вирусных гепатитов ЦНИИ эпидемиологии; 111123 Москва, ул. Новогиреевская 3а; e-mail: dkostushev@gmail.com

типов, для изучения их влияния на показатели цикла HBV, особенно на количество ккзДНК.

Материалы и методы

Культура клеток и трансфекция. Клетки HepG2 с трансгеном 1.1-merHBV под индуцибельным промотором tet-on культивировали в среде DMEM high glucose (4,5 г/л глюкозы) («Thermo Fisher Scientific», США), 1% L-глутамина, 1% пен/стреп, 10% фетальной бычьей сыворотки, в 6-луночных планшетах. Трансфекцию плазмид pcDNA3/Мус-DNMT3A (предоставлена доктором Arthur Riggs (Addgene plasmid # 35521) и pcDNA3/Мус-DNMT1 (предоставлена доктором Arthur Riggs (Addgene plasmid # 36939) или котрансфекция обеими плазмидами проводили с помощью агента Lipofetamine 2000 («Sigma», США) по протоколу производителя за сутки до активации доксициклином по стандартному протоколу. Активация доксициклином цикла HBV продолжалась 24 ч. Первые сутки эксперимента — момент времени после изъятия доксициклина, 3-и сутки — 48 ч после изъятия доксициклина.

Выделение нуклеиновых кислот, обратная транскрипция, полимеразная цепная реакция (ПЦР). Нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора АмплиСенс «РИБО-преп», затем использовали для трех видов обработки: 1) обработка ДНКазой 1-го типа без РНКазной активности («Sigma»), повторное выделение с помощью набора АмплиСенс «РИБО-преп», обратная транскрипция при помощи набора АмплиСенс «Реверта L-100» и выявление с помощью ПЦР в реальном времени S-RNA и pgRNA с помощью специфических праймеров и зондов TaqMan, нормализация на мРНК GAPDH; 2) обработка ферментом Plasmid-safe ATP-dependent DNase, выявление ккзДНК с помощью специфических праймеров и зондов TaqMan, нормализация на β -глобин генома; 3) количественное определение ДНК HBV с помощью набора АмплиСенс «HBV-monitor-FRT», нормализация на число клеток.

Статистическая обработка данных. Результаты представлены как средние \pm стандартное отклонение трипликатов экспериментов. Использовали однофакторный дисперсионный анализ одно-сторонний ANOVA, статистическую значимость различий определяли с помощью однофакторного дисперсионного анализа, попарное апостериорное сравнение проводили с помощью критерия HSD Тьюки. Различия при $p < 0,05$ считали статистически значимыми. Обработку данных проводили в программе SPSS 18.0.

Результаты

Трансфекция ДНМТ1, ДНМТ3А и ДНМТ1/ДНМТ3А ингибирует репликацию ДНК HBV и экспрессию S-RNA к 3-м суткам исследования. Важно отметить, что в 1-е сутки продукция ДНК HBV и транскрипция вирусного генома практически не изменяется. К 3-м суткам исследования общее число копий ДНК HBV относительно контроля снижается примерно на 40% во всех группах после трансфекции ДНМТ, но это снижение не достигает статистической значимости в однофакторном дисперсионном анализе (рис. 1). Наиболее значительные изменения происходят с S-RNA, экспрессия которой снижается на 40–50% ($p < 0,01$ для ДНМТ1, $p < 0,005$ для ДНМТ3А и ДНМТ1/3А) (рис. 2). Однако при трансфекции ДНМТ1 уровни pgRNA не меняются столь существенно, а при трансфекции ДНМТ3А демонстрирует высокую вариабельность в результатах (рис. 3). Котрансфекция ДНМТ1 и ДНМТ3А снижает уровни детектируемой pgRNA примерно на 25%, но это изменение статистически незначимо. Следовательно,

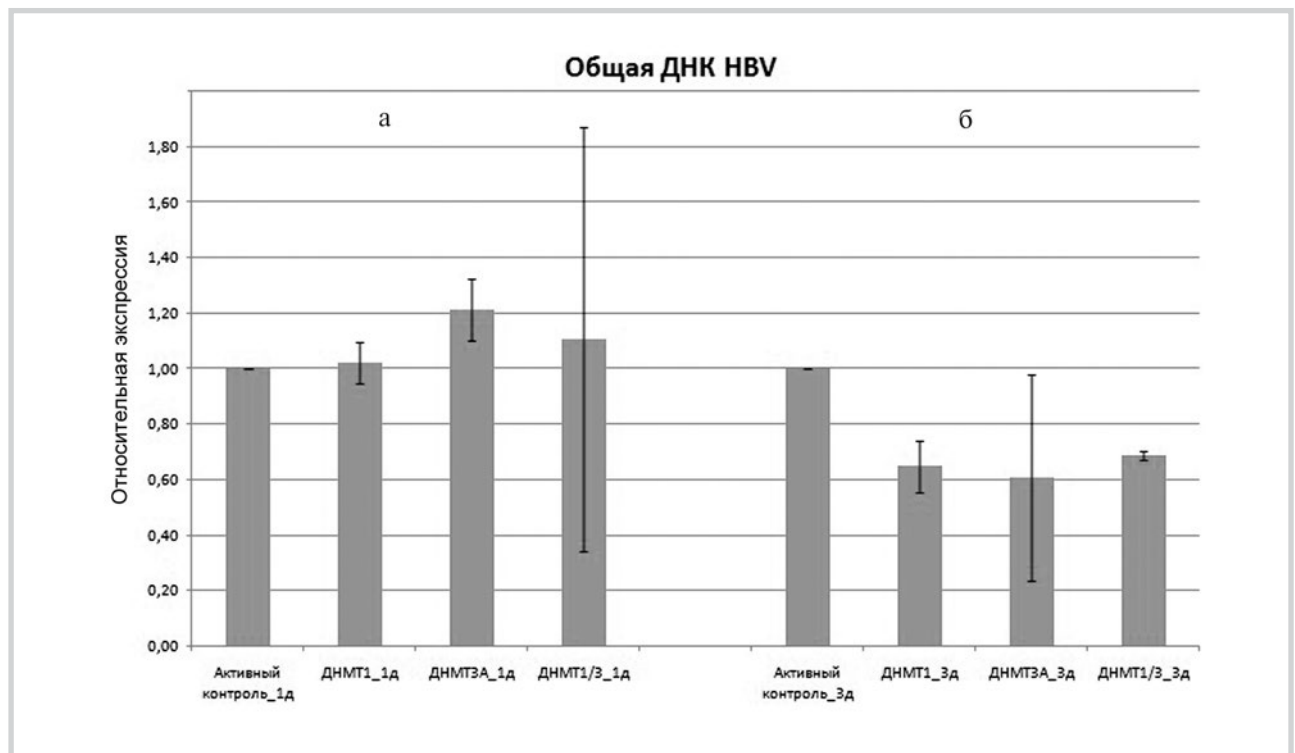


Рис. 1. Изменение уровней общей ДНК HBV (копии), нормализованные на число клеток (ед.), относительно контроля в 1-е (а) и 3-и (б) сутки после активации цикла HBV в клетках HepG2.

Здесь и на рис. 2—4: планки погрешностей соответствуют стандартным отклонениям ДНМТ1_1д/3д, ДНМТ3А_1д/3д, ДНМТ1/3_1д/3д — трансфекция клеток плазмидами, кодирующими ДНМТ1, ДНМТ3А или котрансфекция ДНМТ1 и ДНМТ3А соответственно.

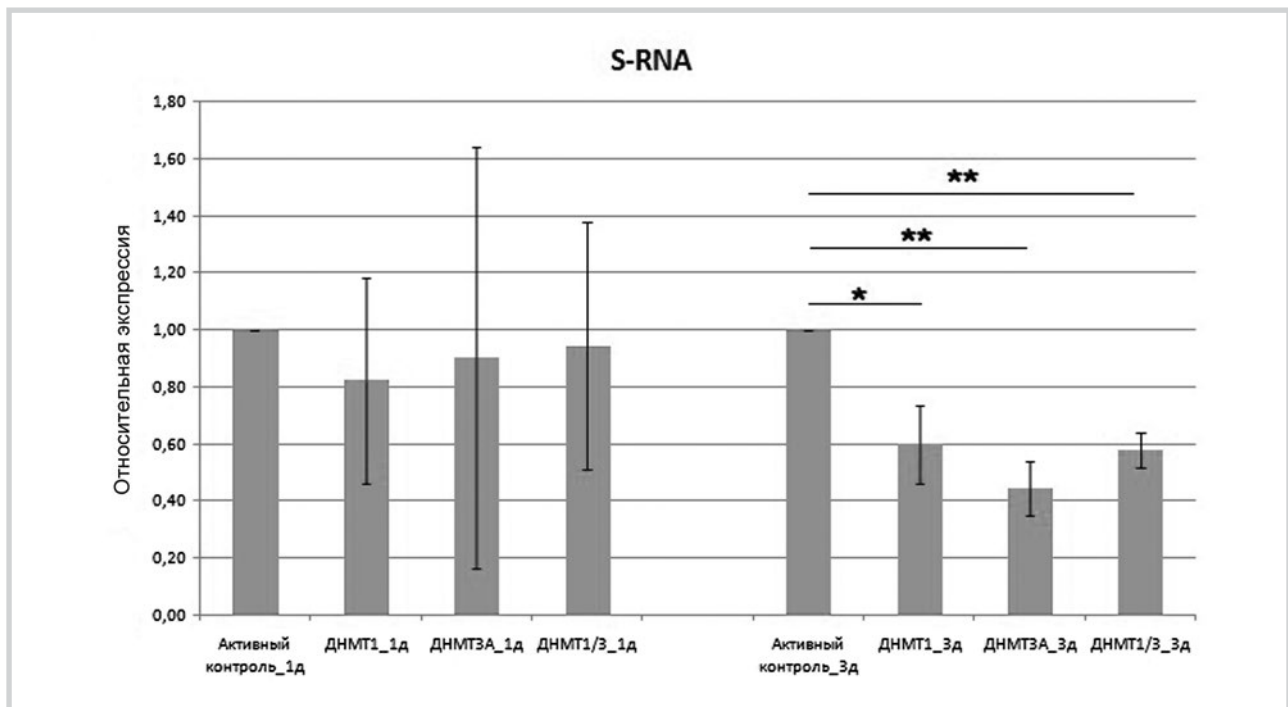


Рис. 2. Уровни относительной экспрессии S-RNA: экспрессия S-RNA относительно GAPDH в группах трансфекции на 1-е (а) и 3-и (б) сутки.

* — $p < 0,01$; ** — $p < 0,005$.

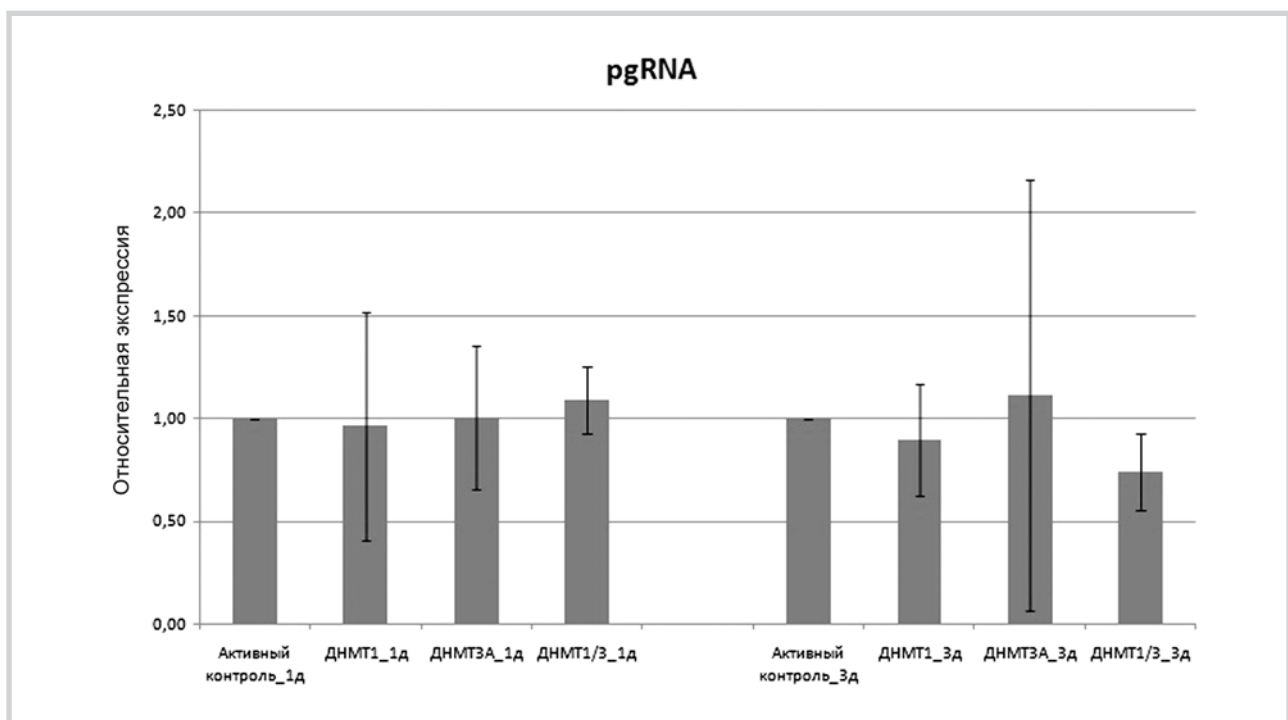


Рис. 3. Изменение относительной экспрессии pgRNA: уровни экспрессии pgRNA относительно GAPDH.

но, гиперэкспрессия ДНМТ1, ДНМТ3А и ДНМТ1/3А ингибирует транскрипцию и репликацию HBV.

Количество ккзДНК не изменяется при трансфекции ДНМТ1 (рис. 4). Однако в группе котрансфекции в клет-

ках с активированным циклом HBV незначительно снижено количество ккзДНК в 1-е сутки исследования. На 3-и сутки в группе котрансфекции количество ккзДНК не отличается от контроля. Наиболее существенно, что гипер-

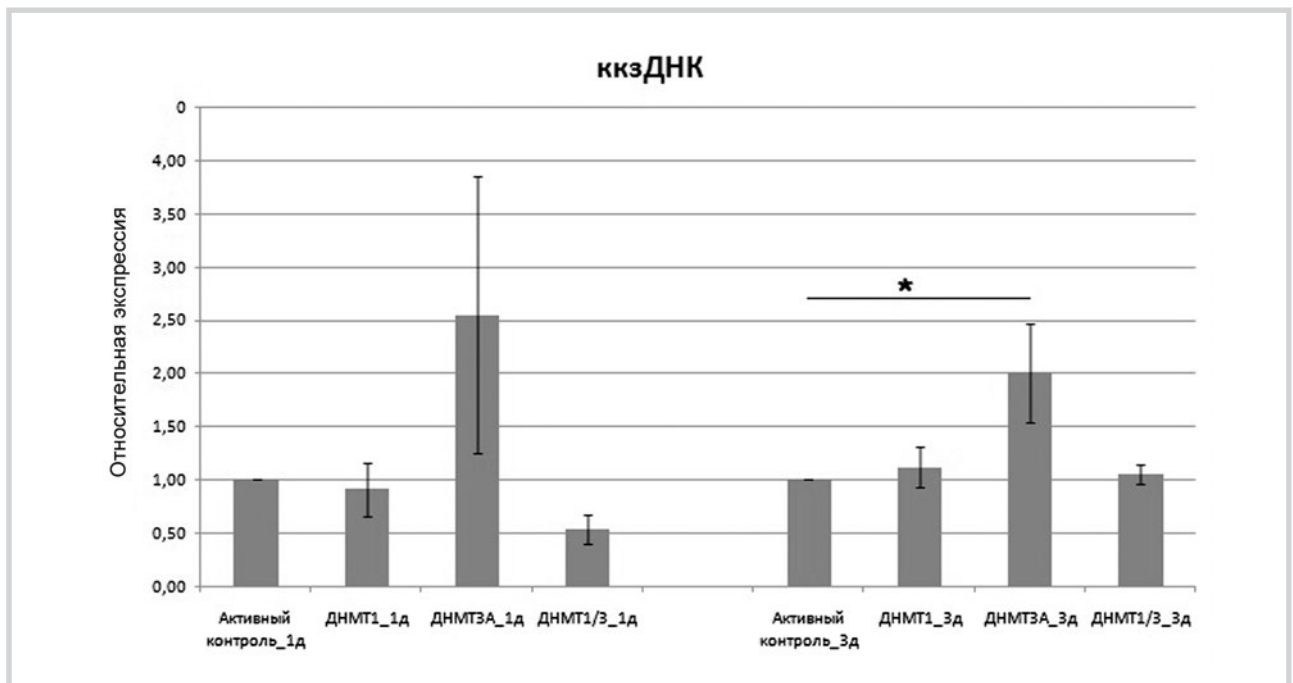


Рис. 4. Изменение уровней ккзДНК: уровни ккзДНК, нормализованные на относительное количество выявляемого при ПЦР β -глобина генома.

* — $p < 0,005$.

реэкспрессия ДНМТ3А приводит к значительному увеличению количества ккзДНК. Клетки HepG2 с активированным циклом HBV, которые были трансфицированы векторами, экспрессирующими ДНМТ3А, демонстрируют увеличение количества ккзДНК в 1-е сутки почти в 2,5 раза. Уровень ккзДНК остается увеличенным почти в 2 раза ($p < 0,005$) на 3-и сутки эксперимента.

Результаты наших и других исследований показали, что экспрессия ДНМТ1 и ДНМТ3А значительно увеличена в клетках, экспрессирующих HBV [23]. Считается, что инфицированные клетки могут метилировать ккзДНК HBV в ходе неспецифического внутриклеточного иммунного ответа, приводя к снижению репликации, транскрипции и продукции белков вируса. Пролонгированная активация ДНМТ при ХГВ вызывает гиперметилирование CpG-островков в геноме HBV [15].

Кроме того, гиперметилирование ккзДНК посредством ДНМТ может быть частью многоэтапного пути конверсии ккзДНК в высокоперсистентную форму. Аналогичный процесс установлен для некоторых других латентных вирусов, в том числе вируса Эпштейна—Барр [24].

Обсуждение

В соответствии с ранее опубликованными данными трансфекция клеток HepG2 матрицами HBV и векторами, экспрессирующими ДНМТ3А, приводит к снижению продукции вирусных белков и pgRNA [13]. Результаты данной работы значительно расширяют представление о

влиянии гиперэкспрессии ДНМТ на ккзДНК. Мы показали, что трансфекция ДНМТ1 и ДНМТ3А не только подавляет экспрессию S-RNA, но также снижает репликацию ДНК HBV и вместе с этим трансфекция ДНМТ3А значительно увеличивает количество ккзДНК. Стоит отметить, что гиперэкспрессия ДНМТ1 не изменяет количество ккзДНК. Ранее высказано предположение, что метилирование островков CpG ккзДНК является одним из механизмов, ответственных за персистенцию HBV. Мы полагаем, что длительная гиперэкспрессия ДНМТ3А может играть роль в генерации персистентной ккзДНК и влиять на переход ВГВ в хроническую форму. Кроме того, изменение статуса метилирования матриц ккзДНК может быть необходимым для полной элиминации матриц ккзДНК и полного излечения от ХГВ при использовании экспериментальных методов лечения, таких как системы нуклеаз CRISPR/Cas, TALENs, или при модуляции ферментов АРОВЕС.

Заключение

ДНМТ3А регулирует количество ккзДНК и является важным фактором персистенции HBV.

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

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

ЛИТЕРАТУРА/REFERENCES

- Custer B, Sullivan SD, Hazlet TK, Iloeje U, Veenstra DL, Kowdley KV. Global epidemiology of hepatitis B virus. *Journal of Clinical Gastroenterology*. 2004;38(10,Suppl.3):S158-168. <https://doi.org/10.1097/00004836-200411003-00008>
- Государственный доклад «О состоянии санитарно-эпидемиологического благополучия населения в Российской Федерации в 2013 году». Ссылка активна на 28.11.2016. Доступно по: http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1984 [State report «On the state of sanitary and epidemiological welfare of people in Russian Federation in 2013». Accessed at 28.11.2016. Available at: http://rospotrebnadzor.ru/documents/details.php?ELEMENT_ID=1984]
- Levero MI, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *Journal of Hepatology*. 2009;51(3):581-592. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2009.05.022>
- Nassal M. HBV cccDNA: viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*. 2015;64(12):1972-1984. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2015-309809>
- Laras AI, Koskinas J, Dimou E, Kostamena A, Hadziyannis SJ. Intrahepatic levels and replicative activity of covalently closed circular hepatitis B virus DNA in chronically infected patients. *Hepatology*. 2006;44(3):694-702. <https://doi.org/10.1002/hep.21299>
- Hung-Chih Yang and Jia-Hong Kao. Persistence of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in hepatocytes: molecular mechanisms and clinical significance. *Emerging Microbes and Infections*. 2014;3(9):e64. <https://doi.org/10.1038/emi.2014.64>
- Ying Chen, Johnny Sze, and Ming-Liang He. HBV cccDNA in patients' sera as an indicator for HBV reactivation and an early signal of liver damage. *World Journal of Gastroenterology*. 2004;10(1):82-85. <https://doi.org/10.3748/wjg.v10.i1.82>
- Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, Trepo C, Marcellin P, Goodman Z, Delaney WE 4th, Xiong S, Brosgart CL, Chen SS, Gibbs CS, Zoulim F. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*. 2004;126(7):1750-1758. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2004.03.018>
- Ganem D, Prince AM. Hepatitis B virus infection-natural history and clinical consequences. *New England Journal of Medicine* 2004;350:1118-1129. <https://doi.org/10.1056/nejm200409163511228>
- Philipp Tropberger, Alexandre Mercier, Margaret Robinson, Weidong Zhong, Don E Ganem, Meghan Holdorf. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proceedings of National Academy of Sciences*. 2015;112(42): E5715-5724. <https://doi.org/10.1073/pnas.1518090112>
- Lemonica Koumbi, and Peter Karayiannis. The Epigenetic Control of Hepatitis B Virus Modulates the Outcome of Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:1491. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2015.01491>
- Yi Tian, Weibing Yang, Jianxun Song, Yuzhang Wu, and Bing Ni. Hepatitis B Virus X Protein-Induced Aberrant Epigenetic Modifications Contributing to Human Hepatocellular Carcinoma Pathogenesis. *Molecular Cell Biology*. 2013;33(15):2810-2816. <https://doi.org/10.1128/MCB.00205-13>
- Perumal Vivekanandan, Hubert Darius-J Daniel, Rajesh Kanangai, Francisco Martinez-Murillo, and Michael Torbenson. Hepatitis B Virus Replication Induces Methylation of both Host and Viral DNA. *Journal of Virology*. 2010;84(9):4321-4329. <https://doi.org/10.1128/JVI.02280-09>
- Zhang Y, Mao R, Yan R, Cai D, Zhang Y, Zhu H, Kang Y, Liu H, Wang J, Qin Y, Huang Y, Guo H, Zhang J. Transcription of hepatitis B virus covalently closed circular DNA is regulated by CpG methylation during chronic infection. *PLoS One*. 2014;9(10): e110442. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0110442>
- Surbhi Jain, Ting-Tsung Chang, Sitong Chen, Batbold Boldbaatar, Adam Clemens, Selena Y. Lin, Ran Yan, Chi-Tan Hu, Haitao Guo, Timothy M. Block, Wei Song and Ying-Hsiu Su. Comprehensive DNA methylation analysis of hepatitis B virus genome in infected liver tissues. *Scientific Reports*. 2015;5(10478). doi:10.1038/srep10478
- 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. *Journal of Medical Virology*. 2009;81(7):1177-1183. <https://doi.org/10.1002/jmv.21525>
- Saito, Y., Y. Kanai, M. Sakamoto, H. Saito, H. Ishii, and S. Hirohashi. 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;33:561-568. <https://doi.org/10.1053/jhep.2001.22507>
- Sakuma T, Masaki K, Abe-Chayama H, Mochida K, Yamamoto T, Chayama K. Highly multiplexed CRISPR-Cas9-nuclease and Cas9-nickase vectors for inactivation of hepatitis B virus. *Genes Cells*. 2016;21(11):1253-1262. <https://doi.org/10.1111/gtc.12437>
- Li H, Sheng C, Liu H, Liu G, Du X, Du J, Zhan L, Li P, Yang C, Qi L, Wang J, Yang X, Jia L, Xie J, Wang L, Hao R, Xu D, Tong Y, Zhou Y, Zhou J, Sun Y, Li Q, Qiu S, Song H. An Effective Molecular Target Site in Hepatitis B Virus S Gene for Cas9 Cleavage and Mutational Inactivation. *International Journal of Biological Sciences*. 2016;12(9):1104-13. <https://doi.org/10.7150/ijbs.16064>
- Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, Zhang K, Stadler D, Cheng X, Sprinzl MF, Koppensteiner H, Makowska Z, Volz T, Remouchamps C, Chou WM, Thasler WE, Hüser N, Durantel D, Liang TJ, Münk C, Heim MH, Browning JL, Dejardin E, Dandri M, Schindler M, Heikenwalder M, Protzer U. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*. 2014;343(6176):1221-1228. <https://doi.org/10.1126/science.1243462>
- Bloom K, Ely A, Mussolino C, Cathomen T, Arbutnot P. Inactivation of hepatitis B virus replication in cultured cells and in vivo with engineered transcription activator-like effector nucleases. *Molecular Therapy*. 2013;21(10):1889-1897. <https://doi.org/10.1038/mt.2013.170>
- Guo Yi, 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. *Journal of Medical Virology*. 2009;81(7):1177-1183. <https://doi.org/10.1002/jmv.21525>
- Haiping Li, Fengmei Yang, Bo Gao, Zongtao Yu, Xiaobo Liu, Fei Xie, and Jicai Zhang. Hepatitis B virus infection in hepatocellular carcinoma tissues upregulates expression of DNA methyltransferases. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*. 2015;8(3):4175-4185.
- Hughes DJ, Mareddy EM, Dickerson CA, Yetming KD, Sample CE, Sample JT. Contributions of CTCF and DNA methyltransferases DNMT1 and DNMT3B to Epstein-Barr virus restricted latency. *Journal of Virology*. 2012;86(2):1034-1045. <https://doi.org/10.1128/JVI.05923-11>

Поступила 05.12.16