

**Противовирусное действие систем CRISPR/Cas9 на модели вируса гепатита В****Научный руководитель – Чуланов Владимир Петрович***Зуева А.П.<sup>1</sup>, Костюшев Д.С.<sup>2</sup>*

1 - Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова, Биологический факультет, Кафедра вирусологии, Москва, Россия; 2 - Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова, Москва, Россия

Гепатит В - тяжелое заболевание, вызванное вирусом гепатита В (ВГВ). На сегодняшний день полная элиминация вируса невозможна, что обусловлено существованием стабильной внутриядерной формы генома вируса - кольцевой ковалентно замкнутой ДНК (ккзДНК) [4]. Технология сайт-специфических нуклеаз CRISPR/Cas9 позволяет вносить двуцепочечные разрывы в целевых сайтах генома ВГВ. Тем не менее, полного расщепления всех матриц ккзДНК ВГВ нуклеазами CRISPR/Cas9 добиться не удается [3]. Причинами этого могут быть особенности структуры ккзДНК, которые делают ее недоступной для действия нуклеаз в результате экранирующего действия связанных с ней гистоновых и негистоновых белков [2]. Целью данной работы был подбор РНК-проводников систем CRISPR/Cas9 к матрицам ДНК ВГВ и проверка эффективности их действия на модели ко-трансфекции клеток HepG2. Дизайн РНК-проводников проводили в программе Geneius и с помощью сервиса Broad Institute sgRNA Design Tool. Было подобрано 12 РНК-проводников *S.pyogenes* Cas9, 6 РНК-проводников *N.meningitidis* Cas9 и 6 РНК-проводников *S.thermophilus* Cas9 к различным участкам генома ВГВ. Клетки HepG2 трансфицировали плазмидами, кодирующими HBV-1.1mer, ПЦР-продуктами, содержащими U6-промотор и участком РНК-проводника, и плазмиду, кодирующую соответствующий Cas9 белок. Трансфекцию проводили при помощи реактива Lipofectamine 2000 по протоколу производителя. На третьи сутки после трансфекции нуклеиновые кислоты выделяли с помощью набора «АмплиПрайм РИБО-преп», изоляты обрабатывали ДНКазой I без РНКазной активности, производили перевыделение образцов и постановку реакции обратной транскрипции. Эффективность действия систем CRISPR/Cas9 оценивали по изменению экспрессии прегеномной РНК ВГВ с помощью ПЦР в режиме реального времени с зондами TaqMan. В результате эксперимента был произведен скрининг РНК-проводников на модели ВГВ *in vitro* и отобраны 4 наиболее эффективных РНК-проводника, мишенью которых являются сайты Р и С белков, а также участок энхансера I. Было достигнуто снижение уровня экспрессии прегеномной РНК на 78,7% ± 0,005; 85,2% ± 0,08; 87,7% ± 0,003; 86,8% ± 0,01. Помимо этого, комбинация РНК-проводника, мишенью которого является участок энхансера I с плазмидой, экспрессирующей белок HBx, увеличила эффективность его действия на 20%. Белок HBx увеличивает транскрипцию ВГВ и релаксирует конденсированную форму сссDNA [1]. Таким образом, были отобраны РНК-проводники, значительно снижающие экспрессию прегеномной РНК.

Авторы выражают благодарность д.м.н. Чуланову В.П. за консультации и помощь в подготовке публикаций. Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (грант №16-15-10426).

**Источники и литература**

- 1) Belloni L., Pollicino T. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function // Microbiology. 2009. V.106. No. 43. P. 19975–19979.

- 2) Bock CT., Schranz P., Schröder C.H., Zentgra, H. Hepatitis B virus genome is organized into nucleosomes in the nucleus of the infected cell // *Virus Genes*. 1994., V.8. No. 3. P. 215-229.
- 3) Seeger C., Sohn J.A. Targeting hepatitis b virus with crispr/cas9 // *Mol. Ther. Nucleic Acids*. 2004. V. 3. No. 12. e216.
- 4) Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA // *J. Hepatol*. 2005. V. 42. P. 302–308.