

ДНК-метилтрансфераза 3A подавляет транскрипцию и репликацию вируса гепатита В, но увеличивает пул ккзДНК на модели клеток HepG2-1.1merHBV in vitro

Научный руководитель – Костюшев Дмитрий Сергеевич

Брезгин Сергей Алексеевич

Студент (специалист)

Первый Московский государственный медицинский университет имени И.М. Сеченова,
Москва, Россия

E-mail: seegez@mail.ru

Установлено, что у больных хроническим гепатитом В вирусный белок X (HBx) способствует увеличению экспрессии ДНК-метилтрансферазы 3A [2], которая в свою очередь усиливает метилирование участков генома человека и кольцевой ковалентно-замкнутой ДНК (ккзДНК) вируса гепатита В (ВГВ) по островкам CpG. [1]. Действие ДНК-метилтрансферазы 3A на пул ккзДНК ранее изучено не было.

Эксперименты проводились на линии HepG2, содержащей 1.1mer геном ВГВ под tet-on промотором (HepG2-1.1merHBV). Клетки трансфицировали плазмидой, кодирующей DNMT3A, с использованием агента Lipofectamine 2000. Через 48 и 72 часа нуклеиновые кислоты выделяли набором "РИБО-Преп". Экспрессию мРНК HBs и прегеномной РНК анализировали методом ОТ-ПЦР в режиме «реального времени» относительно референсного гена Gapdh. Уровни ккзДНК определяли полуколичественно методом ПЦР после обработки ферментом PSAD, в качестве референсного гена использовали бета-глобин. Внутриклеточный и секретируемый HBs определяли методом ELISA с использованием коммерческого набора. Клеточный цикл анализировали методом FACS с помощью красителя DRAQ5.

На модели клеток человека HepG2-1.1merHBV выявлено, что гиперэкспрессия DNMT3A приводит к снижению экспрессии мРНК HBs-антигена на 55% ($p < 0,005$), прегеномной РНК на 18% (статистически не значимо), уровней суммарной ДНК вируса на 35% ($p < 0,01$), а количества внутриклеточного HBs-антигена на 47% ($p < 0,05$). Тем не менее, уровень ккзДНК ВГВ возрастает в ~2.5 раза к 48 часам после активации вирусного цикла и остается повышенным в 2 раза к 72 часам ($p < 0,005$).

Значительные изменения при действии DNMT3A происходят в клеточном цикле HepG2-1.1merHBV: переход основной части клеток из G0/G1 (90% в контрольном образце) в S (32%) и G2/M (21%) фазы.

Полученные результаты свидетельствуют о том, что увеличение экспрессии DNMT3A приводит к снижению транскрипции вирусных генов, но при этом увеличивает пул ккзДНК ВГВ. Этот механизм может быть связан с персистенцией ВГВ у больных хроническим гепатитом В.

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

Источники и литература

- 1) 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. V. 84. No. 9. P. 4321-4329.

- 2) Zhu Y.Z., Zhu R., Shi L.G., Mao Y., Zheng G.J., Chen Q., Zhu H.G. Hepatitis B virus X protein promotes hypermethylation of p16(INK4A) promoter through upregulation of DNA methyltransferases in hepatocarcinogenesis //Exp. Mol. Pathol. 2010. V. 89. No. 3. P. 268-75.