宿主因子参与HBV cccDNA形成和转录

贺锐, 刘实*

武汉大学病毒学国家重点实验室, 武汉 430072

* 联系人, E-mail: liushi_liushi@whu.edu.cn

2019-03-28 收稿, 2019-05-01 修回, 2019-05-05 接受, 2019-05-27 网络版发表

摘要 乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是引起乙肝的病原体. HBV基因组是一个不完全双链环状DNA (relaxed circular DNA, RC-DNA). 当HBV在宿主细胞中复制时, 首先RC-DNA需要转化为共价闭合环状DNA (covalently closed circular DNA, cccDNA), 后者作为HBV的转录模板, 产生病毒的亚基因组和各种mRNA. 其中, pgRNA作为逆转录模板逆转录负链DNA, 继而合成正链DNA, 最后组装成新的RC-DNA. cccDNA的存在是干扰素(IFNs)、核苷类似物(NAs)等药物无法彻底消除乙肝抗原、治愈乙肝的重要原因. HBV cccDNA的形成和转录过程受到许多宿主因子的调控, 本文从乙肝病毒的感染和复制特征出发, 总结了在各个过程中参与HBV cccDNA形成和转录的宿主因子, 对有关HBV cccDNA形成的具体过程以及调控机制的研究具有一定指导意义.

关键词 HBV, cccDNA形成, cccDNA转录, 宿主因子

乙型肝炎病毒(hepatitis B virus, HBV)是嗜肝DNA病毒科的典型代表, 是一种有包膜的正二十面体病毒. 乙肝是全国最为普遍的病毒感染性疾病之一, 乙肝慢性感染患者有极大的风险罹患肝硬化、肝功能衰竭、肝癌等. 目前针对乙肝的治疗药物主要有IFN- α 和核苷酸类似物(NAs), 但是二者仅能起到抑制病毒复制的作用, 很难从根本上消除病毒. NAs主要作用是抑制HBV聚合酶发挥作用, 阻止病毒的逆转录过程. 停止使用NAs后, HBV的复制情况又重新恢复, 延长NAs处理也很难使HBs抗原完全清除^[1].

在HBV复制过程中, cccDNA作为RNA的转录模板发挥着重要作用. 由于cccDNA本身不包含复制区, 不具有复制的功能, 它在细胞核中的存在仅依靠自身稳定性和病毒基因组RC-DNA的转化. NAs等药物不能彻底消除病毒的重要原因就在于cccDNA的存在, 而HBV复制在停止使用NAs之后反复的现象也说明cccDNA寿命较长, 很难自发地或者通过天然免疫途径降解.

INF- α 处理能通过抑制转录因子STAT1, STAT2与cccDNA的结合以及调节表观修饰等方式抑制cccDNA转录, 降低pgRNA的产量^[2]. 也有研究发现TNF- α 和IFN- γ 处理使细胞内HBV DNA, cccDNA和e抗原含量减少, 这种影响cccDNA稳定性的机制与细胞中的两种脱氨基酶APOBEC3A(A3A)和APOBEC3B(A3B)有关^[3]. 这两种酶使DNA序列上出现脱嘌呤或脱嘧啶位点(AP位点), 继而导致cccDNA序列稳定性降低甚至降解. 激活的T细胞就可以通过分泌INF- γ 和TNF- α 发挥上述功能^[4]. 以上的研究对以cccDNA为靶标的药物研发和治疗提供了新思路.

在cccDNA形成和转录过程中, 许多宿主因子被病毒“绑架”参与了病毒的复制, 在宿主因子的“帮助”下, cccDNA才得以长期存在于细胞中且难以被药物彻底消除^[5]. 本文从HBV的复制循环出发, 总结了在HBV复制的各个过程中发挥作用的宿主因子, 以期能更深入地了解cccDNA形成和转录的具体机制.

引用格式: 贺锐, 刘实. 宿主因子参与HBV cccDNA形成和转录. 科学通报, 2019, 64: 3091–3100

He R, Liu S. Host factors involved in HBV cccDNA formation and transcription (in Chinese). Chin Sci Bull, 2019, 64: 3091–3100, doi: 10.1360/N972019-00269

1 HBV感染和复制循环概述

完整的HBV毒粒(又称Dane颗粒)外面有脂质包膜结构,其中嵌入了HBV的3种表面蛋白,分别是S (small)、M (middle)和L (large),这3种蛋白具有相同的C末端结构域,而N末端存在差异。HBV核壳是由核心蛋白组成的正二十面体结构,内部是HBV的不完全双链的环状DNA (又称RC-DNA)基因组。由于两条DNA链不等长(负链DNA略长于正链DNA)使得负链DNA不能与正链互补配对的部分形成一个单链区;同时,由于HBV基因组结构是不封闭的环状,负链DNA 5'末端和3'末端相互靠近但不共价连接,其5'末端共价连接着病毒聚合酶P蛋白^[6]。HBV基因组包含4个开放阅读框(open reading frames, ORFs),分别是S、C、P和X区。S区编码preS1, preS2结构域和表面蛋白S (HBs Ag); C区编码核心蛋白C (HBcAg)和HBcAg; P区编码病毒DNA多聚酶P蛋白; X区编码一个碱性多肽,即X蛋白(HBX),它在HBV复制过程中发挥着重要作用^[7]。

当HBV感染宿主细胞时,其包膜表面L蛋白N端preS1结构域和细胞表面的受体NTCP (sodium taurocholate cotransporting polypeptide)发生相互作用,介导病毒脱去包膜,使病毒毒粒以内吞的方式进入细胞^[8,9]。进入细胞后的毒粒通过核心蛋白与核孔复合物(nuclear pore complex, NPC)相关蛋白的作用介导病毒基因组通过核孔进入细胞核,而病毒核壳被脱去。在此过程中,核心蛋白并没有全部脱去,而是部分跟随基因组一同进入细胞核,在后续的cccDNA形成和修饰过程中发挥作用。

进入细胞核的RC-DNA首先需要移除其上的特殊结构,例如负链DNA 5'末端共价连接的P蛋白、正链DNA 5'末端的一小段RNA序列等,接着由宿主DNA聚合酶、参与DNA修复或有其他功能的宿主因子等参与RC-DNA的修复,形成共价闭环环状的cccDNA。cccDNA并不是单独存在的,其上结合着许多组蛋白和非组蛋白,甚至包括HBV的核心蛋白和X蛋白^[10]。这些修饰使得HBV cccDNA以微型染色体(minichromosome)的形式存在于宿主细胞核中,并可以利用宿主转录酶进行正常转录。

HBV cccDNA的转录需要许多转录因子的作用,HBV 编码的X蛋白也在其中发挥着重要的作用。当缺少HBX时,cccDNA处于一种沉默的状态,不能被转录;HBX降解某些抑制转录复合物(如SMC5/6)或与某些转

录因子、染色质重塑因子相互作用,促进cccDNA转变为“活化”的状态,激活转录^[11,12]。cccDNA转录产物包括大小为3.5 kb的前基因组RNA (pregenomic RNA, pgRNA)和分别为2.4, 2.1, 0.8 kb的亚基因组RNAs (sub-genomic RNAs)。这些mRNA同细胞中的其他宿主mRNA一样,都有5'帽子和3'poly(A)尾巴修饰。其中pgRNA也作为逆转录模板。

pgRNA 5'端形成一个茎环结构(ϵ),该结构是pgRNA 核壳化的信号。HBV DNA多聚酶P结合在 ϵ 结构处,使得pgRNA与P一同包装进入由核心蛋白组成的、新形成的HBV核壳中。 ϵ 结构处的P蛋白末端结构域蛋白(TP)的酪氨酸残基提供3'-OH,作为蛋白质引物起始逆转录,合成负链DNA。负链DNA最初3~4个碱基是以 ϵ 区域的RNA为模板,随后引物转移至靠近pgRNA 3'端的直接重复区(DR1*),继续进行负链DNA的延伸合成。当负链DNA合成结束后,具有RNaseH活性的P蛋白RH结构域降解pgRNA,但是保留了5'端帽子结构和一小段RNA (包含DR1区),它作为复制引物合成正链DNA。

5'-cap的RNA引物转移到负链DNA上的DR2区(DR2是DR1*下游的一段重复序列),开始正链DNA的延伸合成(少数情况下,发生原位合成,结果是合成double-stranded linear DNA即dsl DNA),当正链延伸到DR1*时,负链DNA 3'端的DR1回折与新合成的正链的DR1*互补配对,使得正链的延伸有了新的模板。正链继续延伸合成,但是正链只延伸了部分负链长度就停止了,因此在负链存在一部分单链区。

HBV通过上述过程重新形成了自己的基因组RC-DNA。由于其复制过程中的诸多特殊过程,使得其形成了负链DNA 5'端存在一个DR1*冗余区(r)且共价连接着P蛋白、正链DNA 5'端有一小段RNA结构、负链DNA 5'端和3'端不共价连接、末端两侧分别存在两个重复序列(DR1和DR2)、正链DNA较短等特殊构造。

完成了基因组重新合成的病毒毒粒作为成熟的毒粒可以重新进入细胞核,进一步扩增病毒基因组;或者在内质网获得包膜后释放到细胞外。HBV复制循环图示见图1。

2 宿主因子在cccDNA形成过程中的作用

在HBV RC-DNA进入细胞核之后,接着需要进行RC-DNA向cccDNA的转化。首先,RC-DNA需要通过多种酶反应移除其上限制转化的特殊结构,比如负链DNA上共价连接的病毒聚合酶。在正常细胞中,这种

图 1 (网络版彩色) HBV复制循环图示. (a) HBV表面蛋白L与细胞表面NTCP受体发生相互作用; (b) HBV脱去包膜进入细胞; (c) HBV基因组RC-DNA进入细胞核; (d) RC-DNA转化为cccDNA; (e) cccDNA转录为各种病毒RNA; (f) 4种RNA运输到细胞质; (g) pgRNA翻译产生核心蛋白HBc和聚合酶蛋白P; (h) 2.1 kb RNA和2.4 kb RNA翻译产生表面蛋白HBs; (i) 0.8 kb RNA翻译产生HBX蛋白; (j) 聚合酶P、含有 ϵ 结构的pgRNA一同包装进入新形成的病毒核壳中; (k) 表面蛋白运输到内质网表面; (l) HBX蛋白参与cccDNA转录调控; (m) 负链DNA合成, RNA降解; (n) 正链DNA合成, 形成RC-DNA; (o) 成熟的核壳获得包膜; (p) 新形成的成熟病毒核壳中的基因组RC-DNA重新进入细胞核; (q) 有包膜的HBV分泌到细胞外

Figure 1 (Color online) Simplified scheme of the HBV infectious cycle. (a) Interaction between HBV surface protein L and the receptor protein on the surface of cells, NTCP; (b) entry and release envelope; (c) RC-DNA enters cell nucleus; (d) RC-DNA converts to cccDNA; (e) transcription of viral RNAs; (f) transportation of four RNAs into cytoplasm; (g) translation of core protein (HBc) and polymerase (P) from pgRNA; (h) translation of HBs from 2.1 kb RNA and 2.4 kb RNA; (i) translation of HBx from 0.8 kb RNA; (j) co-packaging of P and pgRNA with ϵ into the new forming viral nucleocapsids; (k) transportation of HBs to the surface of the endoplasmic reticulum; (l) HBx participates in the regulation of cccDNA transcription; (m) minus DNA synthesis, RNA degradation; (n) plus DNA synthesis, RC-DNA formation; (o) Envelopment of mature nucleocapsids; (p) newly forming mature nucleocapsids leave RC-DNA into cell nucleus; (q) secretion of new HBV virions

DNA与蛋白质以5'磷酸酪氨酸键连接的模式类似于拓扑异构酶与DNA的连接. 拓扑异构酶在解放DNA超螺旋的拓扑压力时, 需要在其中一条DNA链(TOP1)或两条DNA链(TOP2)上造成切口, 将DNA链与自身相连, 然后再将切开的DNA链以拓扑学压力更小的方式重新连接^[13]. 当这个重新连接的过程出现差错, 拓扑异构酶就会一直与DNA连接, 其中拓扑异构酶 I 与DNA 3'相连, 拓扑异构酶 II 与DNA 5'端相连. 在细胞中, 清除这两种结构依赖于一种酪氨酸DNA磷酸二酯酶(tyrosyl-DNA-phosphodiesterase, TDP), 其中TDP1识别并切开3'磷酸酪氨酸键, 将TOP I 释放; TDP2识别5'磷酸酪氨酸键, 将TOP II 释放^[14]. 有研究表明, HBV RC-DNA上聚合酶结构的移除与上述过程类似, TDP1和TDP2在其中发挥着重要作用, 敲低TDP2的表达水平减缓了RC-

DNA向cccDNA的转化^[15].

除了RC-DNA上的聚合酶结构外, 正链DNA 5'端的RNA短序列也是限制cccDNA形成的因素. 这段RNA序列与负链DNA 5'端的冗余区(r)会形成一个5'-flap结构. 一种flap结构特异性的核酸内切酶(flap structure-specific endonuclease, FEN) FEN1在移除flap结构、促进RC-DNA向cccDNA转化的过程中发挥作用^[16]. FEN1在DNA复制过程中, 有消除滞后链中RNA引物的作用, 与RNaseH、DNA连接酶等共同作用促进冈崎片段的成熟. 使用FEN1的抑制子PDPT或采用siRNA, shRNA, CRISPR/Cas9等基因编辑的方式敲低或敲除FEN1会对cccDNA的形成造成一定程度的抑制.

RC-DNA特殊结构去除后, 接下来要修补单链区, 将DNA末端共价连接, 形成cccDNA. 宿主DNA损伤应

答系统(host DNA damage response, DDR)很可能参与了这个过程. 细胞中存在的应对较大的DNA损伤(比如双链断裂、单链区)的修复机制主要有3种, 即传统的非同源末端连接(c-NHEJ)、替代性末端连接(alt-EJ)、同源重组(HR)^[17]. DNA上的损伤部位首先被监视器识别标记, 然后招募或激活某些丝氨酸/苏氨酸激酶, 后者招募效应蛋白参与DNA修复. 细胞中主要的损伤监视器有Ku70/Ku80(c-NHEJ途径)、PARP1(alt-EJ途径)、MRN复合物(HR途径); 激酶有DNA-PK, ATM, ATR, 分别应用于上述3个途径; 效应蛋白有DNA连接酶IV, III, I, 以及MDC1, 53BP1, Rad51等, 但是大部分与DNA修复相关的宿主因子在HBV cccDNA形成过程中的作用仍有待探究. 有研究表明, Ku80在dsDNA环化形成cccDNA过程中起作用, 但是由dsDNA环化形成的cccDNA常存在缺陷, 这并不是传统的cccDNA形成方式^[18]. 也有研究发现, PRPF31 (pre-mRNA processing factors 31)通过与HBX相互作用促进了cccDNA的形成, 但是PRPF31主要在RNA剪切过程中发挥作用, 其具体对cccDNA的影响尚未明确^[19].

除了DNA损伤修复机制外, 许多宿主DNA聚合酶的作用对cccDNA形成也是至关重要. 有研究发现, 在HepG2-NTCP细胞中, DNA聚合酶 κ (DNA polymerase κ , POLK)在cccDNA形成过程中起重要作用^[20], 使用siRNA敲低POLK水平或使用CRISPR/Cas9系统敲除其表达都对RCA-DNA转化为cccDNA的过程起到了一定抑制作用. 同时发挥作用的还有POLH(DNA polymerase eta)和POLL(DNA polymerase lambda).

3 宿主因子在cccDNA表观修饰中的作用

HBV编码的X蛋白可以通过调节cccDNA表观修饰的作用调控cccDNA的转录过程. 当HBX存在时, cccDNA才能正常转录^[7]. 有研究表明, 一种染色体复合物smc5/6 (structural maintenance of chromosomes)的存在抑制了cccDNA的转录, 而HBX可以通过与宿主因子DDB1(damage-specific DNA-binding protein 1, DDB1)相互作用, 后者连接一个E3泛素连接酶, 从而使smc5/6复合物泛素化并通过蛋白酶体方式降解^[11]. DDB1是E3连接酶CRL4的适配子蛋白, DDB1需要与作为底物受体的DCAFs(DDB1-CUL4 associated factors)相互作用以完成对靶蛋白的泛素化, 而DDB2蛋白常作为这种底物受体发挥作用. HBX与DDB2蛋白存在一个相同的结构域, 因此HBX可以代替DDB2与DDB1结合,

从而介导smc5/6的泛素化降解^[21].

除了起抑制作用的smc复合物, cccDNA组蛋白修饰的改变也影响着它的转录. cccDNA上结合着许多组蛋白和非组蛋白成分, 细胞组蛋白乙酰基转移酶CBP, p300和PCAF/GCN5, 以及组蛋白去乙酰化酶HDAC1和hSirt1 都被招募到cccDNA, 形成微型染色体的组分. 组蛋白H3和H4的乙酰化水平对cccDNA结构改变, 激活转录有一定影响. 组蛋白乙酰基转移酶CBP/p300被招募到cccDNA, 对cccDNA转录起正调控作用, 而去乙酰化酶HDAC1起负调控作用, HDAC1的抑制子蛋白(VPA和TSA)会提高组蛋白H3和H4乙酰化水平和转录产物水平^[22]. 有研究表明, 组蛋白乙酰基转移酶的招募依赖于HBV 核心蛋白的作用. HBV核心蛋白(HBc)是cccDNA结合蛋白, HBc的C末端结构域(CTD)是精氨酸富集的, 并且倾向于结合在cccDNA CpG区域^[23]. 核心蛋白与cccDNA的结合会招募组蛋白乙酰基转移酶, 后者使组蛋白乙酰化而促进转录. 使用核心蛋白CTD区域的突变体则会降低组蛋白乙酰基转移酶的结合, 参与这种结合的酶有CBP, p300, PCAF等^[24].

也有学者通过siRNA筛选的方式发现了另外两种乙酰基转移酶的作用, 使用RNAi分别敲除HAT1和KAT8都会导致pgRNA产量大幅度降低. 这说明HAT1和KAT8在调节cccDNA转录过程中发挥作用. 通过转录因子表达水平实验分析, shRNA敲低HAT1和KAT8表达会使转录因子HNF4 α 和PPARGC的转录水平降低, 揭示了这两种酶通过影响这两种转录因子的方式诱导cccDNA转录^[25].

一般来说, 我们通常认为去乙酰化酶通过对组蛋白的去乙酰化负调控cccDNA的转录(比如HDAC1). 然而, 去乙酰化酶sirt1却对cccDNA的转录起到正调节的作用. Sirt1可以通过激活转录因子PGC-1 α , FXR α 和c-Jun来激活HBV的转录和复制^[26]. Sirt1促进了HBX以及许多共激活因子, 比如PGC-1 α 和FXR α 的招募, 而Sirt1与HBX协同作用会大幅度提高pgRNA的产量, 二者共同促进preC启动子的转录^[27].

组蛋白的甲基化修饰对cccDNA的转录也有一定的调节作用, 比如H3K9甲基化(H4K9me)与H3, H4去乙酰化共同作用, 使转录受到强烈的抑制. H3K9me是异染色质常见的标志物, 它的形成与甲基转移酶setDB1和异染色质蛋白HP1的招募有关^[28]. 当有HBX存在时, H4K9me水平会有所降低, 目前有研究发现一种去甲基化酶LSD1(lysine-specific demethylase-1, LSD1)被HBX

招募到病毒的启动子区域, 去甲基化H3K9me2, 使转录激活。同时HBX也招募一种甲基转移酶set1A, 后者使H3K4三甲基化。H3K4me是转录激活的标志^[29]。

4 参与cccDNA转录过程的转录因子

HBV基因组上的转录调节元件有4个启动子和2个增强子。preC启动子(或称为core启动子)起始3.5 kb的pgRNA转录; preS1启动子起始2.4 kb RNA转录; preS2/S启动子起始2.1 kb RNA的转录; X启动子起始0.7 kb RNA的转录。增强子Enh I位于X启动子上游, 调控X启动子活性; Enh II位于preC启动子上游部分, 调节preS1和core启动子的活性^[30]。

cccDNA的转录需要许多宿主转录因子的作用, 这些转录因子可以分为普遍分布的转录因子和肝组织富集的转录因子。正调节cccDNA转录的普遍分布的转录因子概述如下。

TBP (TATA binding protein)在细胞中特异性结合DNA上的TATA框序列。在HBV基因组中, TBP结合在HBV preS2/S启动子区域类似TATA框的序列和起始子序列来增强启动子的活性^[31]。

核因子NF-1 (nuclear factor 1)家族在许多细胞中参与许多基因的转录调节, NF-1在HBV基因组中有3个不同的结合位点, 其中最重要的调节HBV转录的位点是Enh I, 结合突变会导致3.5 kb RNA转录抑制^[32]。

Sp1 (specificity protein 1)在HBV基因组上有许多个结合位点, preS2/S, preS1, preC和Enh II都可以与Sp1结合。Sp1与Enh II结合几乎可以正调节HBV所有基因的转录, 而sp1在核心启动子的两个结合位点有不同的作用, 上游位点负调节S和X基因转录, 下游位点对以上两个基因转录无影响^[33]。

AP-1 (the activator protein 1)是一种异二聚体转录因子, 由c-Fos, c-Jun, ATF, JDP家族的蛋白构成, AP-1可以应答胰岛素刺激上调HBX蛋白的表达^[34]。AP-1还通过c-Jun结构域与core启动子结合, 同时与sirt1相互作用, 促进转录。当core启动子区域AP-1结合位点突变, sirt1对HBV复制的促进作用也消失了^[35]。

CREB (C-AMP-response element binding protein)结合HBV Enh I, 该区域含有HBV-CRE区域, 即CRREB结合区, 且是高度保守的。CREB的结合促进了HBV的转录, CERB突变则会导致HBV转录组、DNA、抗原水平全部降低^[36]。

参与cccDNA转录的肝富集的转录因子概述如下。

HNF3 (hepatocyte nuclear factor 3)结合于肝细胞特异性的调节区域序列, 且在肝细胞中富集。HNF3 α , HNF3 β , HNF3 γ 结合HBV Enh I^[37]; HNF3 α , HNF3 β 结合于Enh II^[38]和preS1。HNF3与增强子和启动子的结合都增强了他们的活性。但是研究也发现HNF3通过干扰RNA延伸抑制了pgRNA和pre-C RNA的合成^[39]。

HNF1 (hepatocyte nuclear factor 1)有2个亚型HNF1 α 和HNF1 β 。在肝细胞中, HNF1 α 结合在RNA聚合酶II富集的启动子区域, 调节肝细胞的分化和发育^[40]。在HBV基因组中, HNF1 α 激活了从preS1起始的转录, 而这种激活作用需要HNF1 α 与转录因子oct1协同作用^[41]。

HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4)作为核受体可形成同源二聚体, 或与RXR α (retinoic X receptor α)形成异源二聚体^[40]。HNF4 α 在肝细胞中参与肝细胞代谢、细胞分化、形成肝细胞上皮表型等过程中发挥调节作用。过表达HNF4 α 可以增强从preS1, preS2/S, preC的转录, 促进pgRNA的合成。HNF4 α 有两个结合位点, 第一个在core启动子区域, 另一个在Enh I/X启动子区域^[42]。core启动子区域的核受体应答元件NRRE_{preC}与HNF4 α 相互作用, 在激活pgRNA合成过程中发挥重要作用^[43]。

C/EBP (CAAT enhancer-binding protein)蛋白的 α 和 β 蛋白在肝细胞中形成同源或异源二聚体, 结合于序列特异性的DNA序列上调节肝细胞增殖、糖脂平衡等。在HBV基因组中, C/EBP结合于Enh II区域起到激活作用^[44]。

PPAR α (peroxisome proliferator-activated receptors)在肝组织中表达, 与RXR α 形成二聚体, 并在调节细胞分化和发育、糖代谢、脂代谢等过程中发挥着重要作用。PPAR α -RXR α 复合物可以增强从preS1, preC和X启动子起始的转录, 且过表达该复合物对pgRNA的转录起到激活作用^[42]。

FXR (farnesoid X receptor)是肝组织富集的转录因子, 其活性受胆汁酸的调节。与PPAR α 一样, FXR α 与RXR α 形成二聚体发挥作用, 在HBV基因组中结合Enh II和preC^[45]。

LRH-1或FTF (liver receptor homolog-1/Fetoprotein transcription factor)在核心启动子区域有两个高亲和力结合位点和一个低亲和力结合位点, FTF可以激活preC并与HNF4 α 协同作用激活pgRNA转录^[46]。

PGC-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1- α)是许多核受体的共激活因子, PGC-1 α

表1 参与HBV cccDNA形成和转录过程的宿主因子

Table 1 Host factors involved in HBV cccDNA formation and transcription processes

类别	宿主因子	功能概述
参与HBV cccDNA形成	TDP1	参与移除负链DNA 5'端的病毒P蛋白
	TDP2	参与移除负链DNA 5'端的病毒P蛋白
	FEN1	参与移除负链DNA 5'端的病毒P蛋白
	Ku70/Ku80	DNA损伤监视器, 通过c-NHEJ途径参与修复
	PARP1	DNA损伤监视器, 通过alt-EJ途径参与修复
	MRN复合物	DNA损伤监视器, 通过HR途径参与修复
	DNA-PK	DDR系统中的激酶, 招募效应蛋白参与DNA修复
	ATM	DDR系统中的激酶, 招募效应蛋白参与DNA修复
	ATR	DDR系统中的激酶, 招募效应蛋白参与DNA修复
	DNA ligase IV	DDR系统中的效应蛋白, 参与DNA损伤修复
	DNA ligase III	DDR系统中的效应蛋白, 参与DNA损伤修复
	DNA ligase I	DDR系统中的效应蛋白, 参与DNA损伤修复
	MDC1	DDR系统中的效应蛋白, 参与DNA损伤修复
	53BP1	DDR系统中的效应蛋白, 参与DNA损伤修复
	rad51	DDR系统中的效应蛋白, 参与DNA损伤修复
	PRPF31	与HBX相互作用促进cccDNA形成
	POLK	宿主DNA聚合酶, 参与DNA链合成
参与HBV cccDNA表观修饰	POLH	宿主DNA聚合酶, 参与DNA链合成
	POLL	宿主DNA聚合酶, 参与DNA链合成
	smc5/6	转录抑制复合物, 抑制cccDNA转录
	DDB1	与HBX相互作用, 招募泛素连接酶组分, 降解smc5/6复合物
	CBP	乙酰基转移酶活性, 促进组蛋白乙酰化, 促进转录
	p300	乙酰基转移酶活性, 促进组蛋白乙酰化, 促进转录
	PCAF/GCN5	乙酰基转移酶活性, 促进组蛋白乙酰化, 促进转录
	HAT1	乙酰基转移酶活性, 通过转录因子HNF4 α 和PPARGC促进转录
	KAT8	乙酰基转移酶活性, 通过转录因子HNF4 α 和PPARGC促进转录
	HDAC1	去乙酰化酶活性, 抑制组蛋白乙酰化, 抑制转录
	sirt1	去乙酰化酶活性, 与HBX相互作用激活转录
参与HBV cccDNA转录	LSD1	去甲基化酶活性, 去甲基化H3K9me2, 转录激活
	set1A	甲基化酶活性, H3K4三甲基化, 转录激活
	TBP	结合preS2/S启动子区域, 增强启动子活性
	NF-1	结合Enh I, 增强转录
	sp1	结合HBV 多个启动子和增强子位点, 正调节或负调节启动子活性
	AP-1	结合PreC启动子区域, 促进转录
	CREB	结合Enh I 促进转录
	HNF3	结合Enh I I、PreS1、Enh II, 增强转录
	HNF1	与oct1协同作用, 促进preS1启动子转录
	HNF4	增强从preS1、preS2/S、preC的转录
	C/EBP	结合于Enh II, 激活转录
	PPAR α	与RXR α 形成二聚体, 增强从preS1、preC和X启动子起始的转录
	FXR	与RXR α 形成二聚体, 结合Enh II和preC, 激活转录
	LRH-1	激活preC启动子, 与HNF4 α 协同作用激活pgRNA转录
	PGC-1 α	共激活因子, 与HNF4 α 或PPARs共同作用, 诱导HBV转录

与HNF4 α 或PPARs共同作用, 诱导HBV转录^[47].

综上所述, HBV转录激活需要许多宿主转录因子的作用, 且这些转录因子并不是单独作用于某一个启动子或增强子元件, 而是协同作用于多个元件. 其中, 结合preC启动子的转录因子有Sp1, AP-1, HNF-4, HNF3, PPAR α , FRX, FTF; 结合preS1的有sp1, HNF3, HNF1 α , HNF4 α , PPAR α ; 结合preS2/S的有sp1, TBP, HNF4 α ; 结合Enh I的有NF-1, CREB, HNF3; 结合Enh II的有sp1, HNF3, C/EBP, FRX. 当然HBV的转录一定还依赖于许多未发现或本文未提到的宿主因子的作用, 相关的机制仍有待进一步研究.

5 讨论与总结

HBV感染敏感细胞的起始首先通过与细胞表面受体NTCP结合, 以内吞方式进入细胞并脱去包膜, 然后病毒毒粒经过核孔复合物进入细胞核. 入核后的HBV RC-DNA转化为cccDNA. 这个过程首先需要去除RC-DNA上的特殊结构, 宿主因子TDP1和TDP2参与移除负链DNA 5'端共价结合的聚合酶组分, 核酸内切酶FEN-1参与移除正链DNA 5'端的RNA结构. 参与RC-DNA上缺口修复和单链区填补的宿主因子主要是DNA损伤修复应答(DDR)系统中发挥作用的因子, 比如损伤监视器Ku70/Ku80, PARP1, MRN复合物; 激酶ATM, ATR, DNA-PK; 效应蛋白DNA连接酶IV、III、I, MDC1, 53BP1, Rad51等. cccDNA的形成还需要宿主DNA聚合酶的作用, 例如聚合酶POLK, POLH, POLL.

参与cccDNA表观调控过程来影响cccDNA转录的宿主因子有与HBX相互作用的DDB1蛋白, 通过泛素化降解cccDNA上的抑制复合物smc5/6来激活cccDNA转录. 组蛋白乙酰基转移酶CBP, p300和PCAF/GCN5参与了与cccDNA结合的组蛋白H3, H4的乙酰化来促进转录; 另外两种乙酰基转移酶HAT1和KAT8则通过与转录因子HNF4A和PPARGC相互作用激活转录; sirt1通过促进转录因子PGC-1 α , FXR α 和c-Jun的招募来激活HBV的转录和复制. cccDNA组蛋白的甲基化修饰也调节着它的转录过程, 去甲基化酶LSD1和甲基转移酶

set1A分别通过去甲基化H3K9me2和使H3K4三甲基化激活转录.

参与cccDNA启动子的转录因子和共激活因子主要结合于cccDNA的4个启动子区域(preC, preS1, preS2/S, X)和2个增强子区域(Enh I, Enh II)发挥作用. 参与这一过程的普遍分布的转录因子有TBP, NF-1, sp-1, AP-1, CREB; 肝富集的转录因子有HNF3, HNF1 α , HNF4 α , C/EBP, PPAR α , FXR, LRH-1, PGC-1 α 等.

本文中提到的宿主因子以及作用概述列于表1. 许多宿主因子在细胞中发挥着各种各样的功能, 他们在HBV复制和转录过程中起到的作用也是多方面的. cccDNA上结合的组蛋白H3, H4的乙酰化促进了转录^[22], 但这种促进并不是绝对的. 有研究发现, TIP60复合物结合HBV preC启动子抑制转录. TIP60 (Tat-interacting protein 60 kD, TIP60)是NuA4复合物(nucleosomal acetyl-transferase of H4, NuA4)的催化亚基. TIP60具有乙酰基转移酶的活性, 过表达可以提高组蛋白H3, H4乙酰化水平, 同时招募一种转录因子Brd4, 后者可以抑制HBV转录^[48]. 由此可见组蛋白乙酰化水平对cccDNA转录的调节并非都是正调节, 转录因子的参与使转录过程也有被抑制的可能.

Sirt1作为一种去乙酰化酶可以与转录因子AP-1结构域c-Fos, c-Jun的锌指结构结合, 抑制AP-1的转录活性, 进而抑制AP-1的靶基因COX-2的表达^[49]. 然而在HBV感染细胞中, sirt1可以与HBX协同作用, 招募多种转录因子到cccDNA, 并通过激活AP-1来激活preC的转录^[27,35]. 由此可见许多宿主因子在调节HBV复制和转录的过程中的作用与其本身在细胞中发挥的作用不完全一致, 宿主因子之间的相互作用结果还与细胞环境有关.

利用基因组编辑的锌指核酸酶可以起到靶向HBV cccDNA治疗的效果, 共转染锌指对质粒和HBV基因组质粒可引起HBV基因组的切断, 但是上述效果也会引起宿主细胞修复系统介导的DNA损伤修复和断链重连^[50]. 由于宿主因子的功能多样性和相互作用复杂性, 我们还需要更加深刻和细致的研究, 本文所列出的细胞因子和作用方式可以为HBV cccDNA形成和转录特征的研究提供参考.

参考文献

- 1 Chevaliez S, Hézode C, Bahrami S, et al. Long-term hepatitis B surface antigen (HBsAg) kinetics during nucleoside/nucleotide analogue therapy: Finite treatment duration unlikely. *J Hepatol*, 2013, 58: 676–683
- 2 Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, et al. IFN- α 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
- 3 Lucifora J, Xia Y, Reisinger F, et al. Specific and nonhepatotoxic degradation of nuclear hepatitis B virus cccDNA. *Science*, 2014, 343: 1221–1228
- 4 Xia Y, Stadler D, Lucifora J, et al. Interferon- γ and tumor necrosis factor- α produced by T cells reduce the HBV persistence form, cccDNA, without cytolysis. *Gastroenterology*, 2016, 150: 194–205
- 5 Lempp F A, Mutz P, Lipps C, et al. Evidence that hepatitis b virus replication in mouse cells is limited by the lack of a host cell dependency factor. *J Hepatol*, 2016, 64: 556–564
- 6 Nassal M. Hbv cccDNA: Viral persistence reservoir and key obstacle for a cure of chronic hepatitis B. *Gut*, 2015, 64: 1972–1984
- 7 Belloni L, Pollicino T, De Nicola F, et al. Nuclear HBX binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2009, 106: 19975–19979
- 8 Baumert T F, Meredith L, Ni Y, et al. Entry of hepatitis B and C viruses — recent progress and future impact. *Curr Opin Virol*, 2014, 4: 58–65
- 9 Yan H, Zhong G, Xu G, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *eLife*, 2012, 1: e00049
- 10 Bock C T, Schwinn S, Locarnini S, et al. Structural organization of the hepatitis B virus minichromosome. *J Mol Biol*, 2001, 307: 183–196
- 11 Murphy C M, Xu Y, Li F, et al. Hepatitis B virus X protein promotes degradation of smc5/6 to enhance HBV replication. *Cell Rep*, 2016, 16: 2846–2854
- 12 Decorsière A, Mueller H, van Breugel P C, et al. Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature*, 2016, 531: 386–380
- 13 Chen S H, Chan N L, Hsieh T. New mechanistic and functional insights into DNA topoisomerases. *Annu Rev Biochem*, 2013, 82: 139–170
- 14 Pommier Y. Drugging topoisomerases: Lessons and challenges. *ACS Chem Biol*, 2013, 8: 82–95
- 15 Königer C, Wingert I, Marsmann M, et al. 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 USA*, 2014, 111: E4244–E4253
- 16 Kitamura K, Que L, Shimadu M, et al. Flap endonuclease 1 is involved in cccDNA formation in the hepatitis B virus. *PLoS Pathogens*, 2018, 14: e1007124
- 17 Schreiner S, Nassal M. A role for the host DNA damage response in hepatitis B virus cccDNA formation-and beyond? *Viruses*, 2017, 9: pii: E125
- 18 Guo H, Xu C, Zhou T, et al. Characterization of the host factors required for hepadnavirus covalently closed circular (ccc) DNA formation. *PLoS One*, 2012, 7: e43270
- 19 Kinoshita W, Ogura N, Watashi K, et al. Host factor PRPF31 is involved in cccDNA production in HBV-replicating cells. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 482: 638–644
- 20 Qi Y, Gao Z, Xu G, et al. DNA polymerase κ is a key cellular factor for the formation of covalently closed circular DNA of hepatitis B virus. *PLoS Pathogens*, 2016, 12: e1005893
- 21 Li T, Robert E I, van Breugel P C, et al. A promiscuous α -helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat Struct Mol Biol*, 2010, 17: 105–111
- 22 Pollicino T, Belloni L, Raffa 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
- 23 Guo Y H, Li Y N, Zhao J R, et al. HBC binds to the CpG islands of HBV cccDNA and promotes an epigenetic permissive state. *Epigenetics*, 2011, 6: 720–726
- 24 Chong C K, Cheng C Y S, Tsoi S Y J, et al. Role of hepatitis B core protein in HBV transcription and recruitment of histone acetyltransferases to cccDNA minichromosome. *Antivir Res*, 2017, 144: 1–7
- 25 Wang H, Liu K H, Fang B A M, et al. Identification of acetyltransferase genes (HAT1 and KAT8) regulating HBV replication by RNAi screening. *Cell Biosci*, 2015, 5: 66
- 26 Curtil C, Enache L S, Radreau P, et al. The metabolic sensors FXR α , PGC-1 α , and SIRT1 cooperatively regulate hepatitis B virus transcription. *FASEB J*, 2014, 28: 1454–1463
- 27 Deng J J, Kong K Y E, Gao W W, et al. Interplay between SIRT1 and hepatitis B virus X protein in the activation of viral transcription. *Biochim Biophys Acta*, 2017, 1860: 491–501
- 28 Rivière L, Gerossier L, Ducroux A, et al. HBX relieves chromatin-mediated transcriptional repression of hepatitis B viral cccDNA involving SETDB1 histone methyltransferase. *J Hepatol*, 2015, 63: 1093–1102
- 29 Alarcon V, Hernández S, Rubio L, et al. The enzymes LSD1 and Set1A cooperate with the viral protein HBX to establish an active hepatitis B viral chromatin state. *Sci Rep*, 2016, 6: 25901
- 30 Hensel K O, Rendon J C, Navas M C, et al. Virus-host interplay in hepatitis B virus infection and epigenetic treatment strategies. *FEBS J*, 2017, 284: 3550–3572
- 31 Bogomolski-Yahalom V, Klein A, Greenblat I, et al. The TATA-less promoter of hepatitis B virus S gene contains a TBP binding site and an active

- initiator. *Virus Res*, 1997, 49: 1–7
- 32 Ori A, Atzmony D, Haviv I, et al. An NF1 motif plays a central role in hepatitis B virus enhancer. *Virology*, 1994, 204: 600–608
 - 33 Li J, Ou J. Differential regulation of hepatitis B virus gene expression by the Sp1 transcription factor. *J Virol*, 2001, 75: 8400–8406
 - 34 Choi B H, Park C J, Rho H M. Insulin activates the hepatitis B virus X gene through the activating protein-1 binding site in HepG2 cells. *DNA Cell Biol*, 1998, 17: 951–956
 - 35 Ren J H, Tao Y, Zhang Z Z, et al. Sirtuin 1 regulates hepatitis B virus transcription and replication by targeting transcription factor ap-1. *J Virol*, 2014, 88: 2442–2451
 - 36 Kim B K, Lim S O, Park Y G. Requirement of the cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein for hepatitis B virus replication. *Hepatology*, 2008, 48: 361–373
 - 37 Chen M, Hieng S, Qian X, et al. Regulation of hepatitis B virus ENI enhancer activity by hepatocyte-enriched transcription factor HNF3. *Virology*, 1994, 205: 127–132
 - 38 Li M, Xie Y, Wu X, et al. HNF3 binds and activates the second enhancer, ENII, of hepatitis B virus. *Virology*, 1995, 214: 371–378
 - 39 Tang H, McLachlan A. Mechanisms of inhibition of nuclear hormone receptor-dependent hepatitis B virus replication by hepatocyte nuclear factor 3. *J Virol*, 2002, 76: 8572–8581
 - 40 Odom D T, Zizlsperger N, Gordon D B, et al. Control of pancreas and liver gene expression by HNF transcription factors. *Science*, 2004, 303: 1378–1381
 - 41 Zhou D X, Yen T S. The ubiquitous transcription factor Oct-1 and the liver-specific factor HNF-1 are both required to activate transcription of a hepatitis B virus promoter. *Mol Cell Biol*, 1991, 11: 1353–1359
 - 42 Raney A K, Johnson J L, Palmer C N, et al. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol*, 1997, 71: 1058–1071
 - 43 Yu X, Mertz J E. Distinct modes of regulation of transcription of hepatitis B virus by the nuclear receptors HNF4 and COUP-TF1. *J Virol*, 2003, 77: 2489–2499
 - 44 López-Cabrera M, Letovsky J, Hu K Q, et al. Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivates the enhancer element II of the hepatitis B virus. *Virology*, 1991, 183: 825–829
 - 45 Ramiere C, Scholtes C, Diaz O, et al. Transactivation of the hepatitis B virus core promoter by the nuclear receptor FXR. *J Virol*, 2008, 82: 10832–10840
 - 46 Gilbert S, Galarneau L, Lamontagne A, et al. The hepatitis B virus core promoter is strongly activated by the liver nuclear receptor fetoprotein transcription factor or by ectopically expressed steroidogenic factor 1. *J Virol*, 2000, 74: 5032–5039
 - 47 Shlomai A, Paran N, Shaul Y. PGC-1 controls hepatitis B virus through nutritional signals. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 16003–16008
 - 48 Nishitsuji H, Ujino S, Harada K, et al. TIP60 complex inhibits hepatitis B virus transcription. *J Virol*, 2018, 92: pii: e01788-17
 - 49 Zhang R, Chen H Z, Liu J J, et al. SIRT1 suppresses activator protein-1 transcriptional activity and cyclooxygenase-2 expression in macrophages. *J Biol Chem*, 2010, 285: 7097–7110
 - 50 Cradick T J, Keck K, Bradshaw S, et al. Zinc-finger nucleases as a novel therapeutic strategy for targeting hepatitis B virus DNAs. *Mol Ther*, 2010, 18: 947–954

Summary for “宿主因子参与HBV cccDNA形成和转录”

Host factors involved in HBV cccDNA formation and transcription

Rui He & Shi Liu*

State Key Laboratory of Virology, Wuhan University, Wuhan 430072, China

* Corresponding author, E-mail: liushi_liushi@whu.edu.cn

The genome of hepatitis B virus (HBV) is an incomplete double-stranded circular DNA, also known as relaxed circular (RC) DNA. RC-DNA needs to be converted to covalently closed circular (ccc) DNA during the replication process. cccDNA acts as the transcription template for viral RNAs. One of those viral RNAs, pgRNA, acts as the template in the reverse-transcription process, producing minus-DNA and plus-DNA. Subsequently, the two finally form RC-DNA and finish the viral genome replication process. The existence of cccDNA is the key obstacle for curing hepatitis type B and eliminating HBV antigen using medicines such as interferons or nucleos(t)ide analogues (NAs). Many host factors are involved in HBV cccDNA formation and transcription. We summarized some of these host factors and explained their related functions in HBV infection and replication, detailing the mechanisms of cccDNA formation and subsequent transcription.

When HBV enters host cells, its surface protein L interacts with the receptor NTCP on the cell surface, allowing HBV to enter through endocytosis and leaving its envelope behind. Subsequently, the HBV genome, the RC-DNA, enters the cell nucleus, and leaves the empty nucleocapsid behind. The genome RC-DNA must convert into cccDNA to start the replication process. Many host factors participate in this process in various ways, including helping to remove special constructions, fixing the gaps and the single strand areas. These host factors include TDP1, TDP2, FEN1 and factors involved in the DNA damage response (DDR) system. This process also requires host DNA polymerase to extend DNA sequences, including POLK, POLH and POLL.

cccDNA does not exist independently, but rather it exists in combination with many histones and nonhistones. The epigenetic modification of histone influences cccDNA transcription in various ways. For example, acetylation of H3 and H4 induces transcription and some acetylases such as CBP, p300, PCAF, HAT1, and KAT8 are involved. Interestingly, most of the host acetylases are recruited by two viral proteins, HBX and HBC, suggesting that these two virus proteins may help the virus to kidnap host factors for the benefit of the virus.

In addition to epigenetic modification, cccDNA transcription also requires many cis-elements and host transcription factors. Many ubiquitous and liver-enriched host factors such as NF-1, sp-1, TBP, CREB, HNF3, HNF1, HNF4, C/EBP, PPAR α , FXR, FTF, PGC-1 α combine with cis-elements in HBV genome, including promoter regions and enhancer regions. This combination induces or inhibits the cccDNA transcription process.

In truth, HBV cccDNA formation and transcription processes require more host involvement than this article mentions. Many new factors and interactions as well as key regulators still waiting to be discovered. This article may supply suggestions for research into the detailed mechanism of the two processes of HBV cccDNA.

HBV, cccDNA formation, cccDNA transcription, host factors

doi: [10.1360/N972019-00269](https://doi.org/10.1360/N972019-00269)