



ACADEMIA ROMÂNĂ

INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

Factori celulari implicați în infecția cu virusul hepatitei B

Coordonator științific:

C.S I Dr. Nichita Norica

Doctorand:

Popescu Mirela-Andreea

București

2024

Cuprins

| | |
|---|----|
| Scopul studiului | 2 |
| Capitolul I. Introducere | 3 |
| Ciclul de viață al VHB | 3 |
| Metabolismul lipidic în infecția cu VHB | 5 |
| | |
| Capitolul II. Materiale și metode | 8 |
| | |
| Capitolul III. Rezultate și discuții | |
| Silențierea tranzientă a genei SACM1L în linia celulară Huh7..... | 9 |
| Silențierea tranzientă a genei SACM1L în linia celulară HepG2.2.15..... | 10 |
| Secreția de SVP și ADN viral din celule Huh7 care au gena SACM1L silențiată stabil prin editare genetică CRISPR/Cas9..... | 12 |
| Recuperarea expresiei de Sac1 și a fenotipului celular prin producerea exogenă de Sac1-GFP în celule cu depleție stabilă de Sac1..... | 14 |
| Analiza anvelopării particulelor virale în celule Huh7 care au gena SACM1L silențiată stabil..... | 16 |
| Transportul proteinelor de anvelopă în celulele Huh7 care au gena SAC1 silențiată..... | 18 |
| Concluzii..... | 20 |
| Lista lucrărilor publicate | 21 |
| Mulțumiri | 22 |
| Bibliografie | 23 |

Scopul studiului

Până acum, aproximativ două miliarde de persoane au fost infectate cu Virusul Hepatic B (VHB), și se estimează că mai mult de 350 de milioane sunt purtători cronici ai virusului. Infecția cronică este cauza unor patologii hepatice severe, care evoluează de la inflamație și fibroză la ciroză și cancer hepatocelular (CHC), care duc la decesul a peste 1 milion de pacienți în fiecare an (WHO, 2017).

Infecția cu VHB poate fi prevenită prin vaccinare și poate fi, într-o anumită măsură, controlată prin tratament antiviral direct, dar nu este curabilă.

Infecția cu VHB stimulează sinteza acizilor grași, și intervine în metabolismul colesterolului și al picăturilor lipidice (“lipid droplets”, LD), în sensul că infecția cu VHB scade nivelul de colesterol și cantitatea de trigliceride din celule (Suliman et. al, 2019). Mecanismele prin care VHB modulează metabolismul lipidic nu sunt încă pe deplin înțelese, deși au fost investigate în studii numeroase pe modele celulare și animale. Concluziile acestora arată că replicarea VHB determină expresia unor proteine care stimulează lipogeneza și colesterologeneza (J Zhang et. al., 2021).

Proteinei Sac1, o fosfatidilinozitol fosfatază de tipul II, codificată de gena SACM1L, care catalizează defosforilarea în special a PI4P și la PI, influențând semnificativ metabolismul lipidic, în ciclul de viață al VHB.

Cercetări desfășurate în departamentul nostru au arătat că topologia proteinei de anvelopă “large” (L) a VHB depinde de nivelul intracelular de colesterol, astfel există o legătură directă între conținutul de colesterol de la nivelul membranelor celulare și eficiența asamblării virale (Dorobanțu C. et. al, 2011).

În ciuda conexiunilor existente evidente, până la data acestui studiu, modul în care PI și proteinele reglatoare ale acestor lipide afectează ciclul de viață al VHB nu a fost studiat.

În acest context, scopul acestei lucrări este de a investiga rolul Sac1 în ciclul de viață al VHB, folosind modele celulare care permit analiza moleculară detaliată a replicării, asamblării și secreției de particule virale.

Capitolul I. Introducere

Genomul VHB matur este reprezentat de o moleculă de ADN relaxat circular (ADNrc) de aproximativ 3.2 kilobaze (kb) lungime. VHB codifică șapte proteine virale pornind de la patru cadre de citire: P codifică polimeraza virală (pol), C codifică proteina de capsidă (HBc) și proteina HBe, sau HBeAg (o extensie a proteinei HBc la capătul N-terminal), X codifică proteina HBx (X) și S cele trei proteine de suprafață S (small), M (medium) și L (large). Acestea sunt sintetizate de la trei codoni start S, M și L și au secvența corespunzătoare proteinei S în comun, la capătul C-terminal. Proteina M are în plus, spre capătul N-terminal domeniul preS2, iar proteina L, domeniile preS1 și preS2 (Lambert și Prange, 2001 ; Tsukuda și Watashi, 2020). (Figura 1)

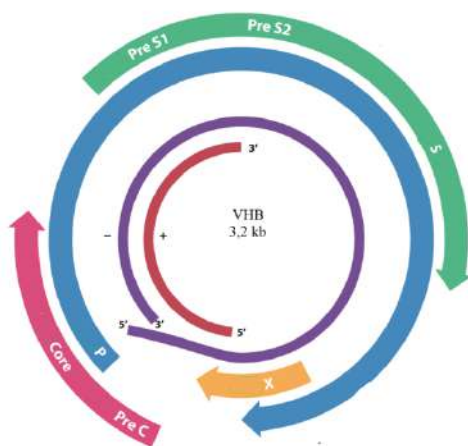


Figura 1. VHB codifică șapte proteine virale pornind de la patru cadre de citire diferite : Primul cadru codifică Polimeraza virală (Pol), al doilea cadru codifică proteina de capsidă (C) și proteina HBe (HBeAg), al treilea cadru codifică proteina HBx (X) și al patrulea cadru codifică trei proteine de suprafață care sunt sintetizate de la trei codoni start : S, M (domeniile preS2 și S) și L (domeniile preS1, preS2 și S). *Figură adaptată după Graham Colm, 2020*

Ciclul de viață al VHB

Interacția VHB cu HSPG, mai ales cu glypicanul 5, pe membrana celulară a hepatocitului, contribuie la concentrarea particulelor virale la nivelul membranei plasmatică facilitând legarea de receptorul NTCP și de co-receptorul recent identificat, anume, factorul epidermal de creștere (EGFR), care mediază internalizarea VHB prin endocitoză (Tian J. et., al., 2021). (Figura 2)

Acest complex de internalizare este asociat cu E-cadherina (o proteină dependentă de calciu necesară pentru adeziunea dintre celule). Această asociere permite relocalizarea NTCP pe membrana celulară bazolaterală, unde are loc infecția (Hu, Q et. al., 2020).

Complexul VHB-NTCP-EGFR este internalizat în celule, în principal prin endocitoză mediată de clathrină, deși implicarea domeniilor bogate în caveolină, de tip “lipid rafts” nu este exclusă (Macovei Alina et. al., 2010; Herrscher C. et. al., 2020). Interacția VHB cu clathrină este mediată de domeniul preS1 al proteinei de anvelopă L, care interacționează și cu proteina adaptor 2 (AP-2) în timpul internalizării în hepatocite. (Figura 2)

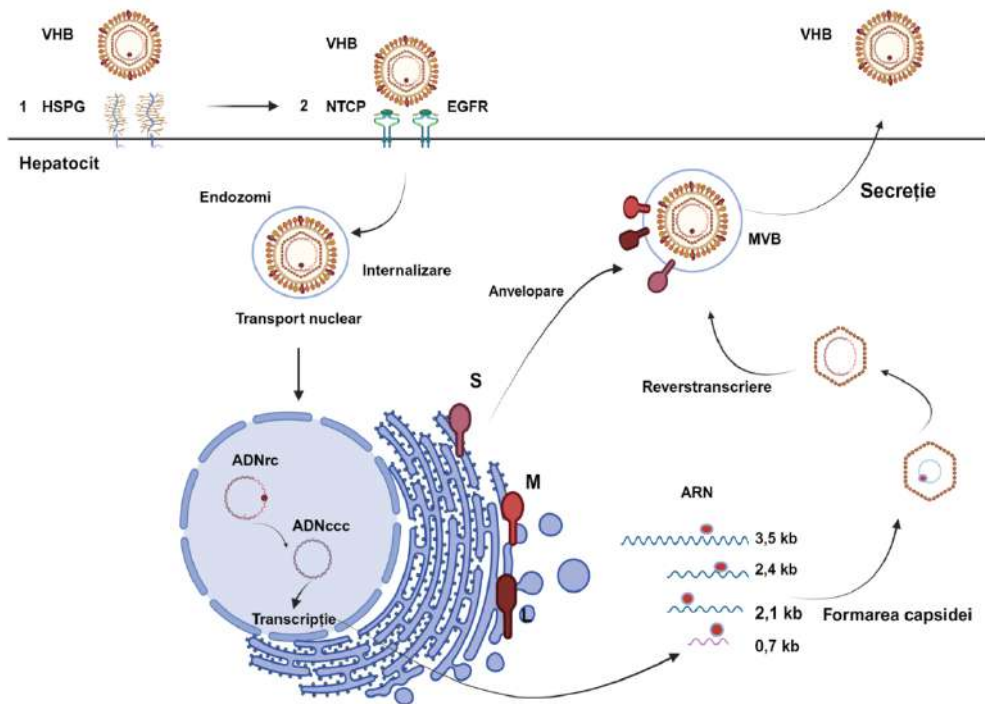


Figura 2. Ciclul de viață al VHB. Prima etapă este reprezentată de interacția virionilor cu receptorii celulari HSPG, EGFR și NTCP de pe membrana celulară a hepatocitului. Virusul este internalizat prin endocitoză, iar nucleocapsida este transportată la nucleu. În nucleu, ADNrc este reparat și se formează ADNccc, care constituie matricea pentru transcrierea a cinci tipuri de ARN. ARNpg și polimeraza virală sunt incluse în capsida virală, în care are loc reverstranscrierea și formarea ADNrc viral. Nucleocapsidele sunt anvelopate la nivelul MVB unde sunt transportate proteinele de suprafață S, M și L, sintetizate la nivelul RE. Particulele virale infecțioase formate sunt transportate la membrana celulară pe calea secretorie mediată de MVB-ESCRT (“Endosomal Sorting Complex Required for Transport”- complexul endosomal de sortare necesar pentru transport). În urma fuziunii MVB cu membrana plasmatică se eliberează exozomi care conțin particulele virale. *Imaginea a fost creată de autoarea acestei teze cu programul BioRender.com*

După internalizare, virusul anvelopat urmează calea endocitică fiind transportat la nivelul endozomilor timpurii care se maturează în endozomi târzii și endolizozomi, unde se presupune că ar avea loc eliberarea în citoplasmă a nucleocapsidei virale, mediate, cel mai probabil, printr-un proces de fuziune membranară (Iwamoto M. et. al., 2020).

După eliberarea din calea endosomală, nucleocapsida virală folosește rețeaua de microtubuli pentru transportul spre nucleu. În nucleu, ADNrc al VHB este convertit în ADNccc.

ADNccc constituie matricea pentru transcrierea a 5 tipuri de ARN, proces mediat de către ARN-polimeraza II, controlată de 4 promotori și doi enhanceri (Enhancer I și Enhancer II). (Prange R., 2012). **Promotorul Precore/core** determină sinteza ARN-ului pregenomic (ARNpg) de 3,5 kb care servește ca matrice pentru translația proteinelor HBc și a polimerazei virale dar și a ARN pre-core, care se suprapune aproape în întregime cu ARNpg și codifică pentru HBeAg. **Promotorii X, preS2 și preS1** determină sinteza ARN subgenomic de 0,7 kb, 2.1 kb și respectiv 2,4 kb care codifică pentru proteinele HBx, M, S și respectiv L (Rall L. B. et. al., 1983 ; Prange R., 2012 ; Wand J. et. al., 2020). (Figura 2). Transcripția ADNccc este reglată de numeroși factori celulari cu expresie fie ubicuitară, prezenți în toate tipurile de celule și implicați în diferite procese, cum ar fi proliferarea și diferențierea celulară sau răspunsul imun, fie strict specifici hepatocitelor (Turton K. L. et. al., 2020).

Metabolismul lipidic în infecția cu VHB

Mecanismele prin care infecția cu VHB afectează metabolismul lipidic din hepatocite au fost analizate pe linii celulare sau pe modele de șoareci transgenici. Astfel, s-a demonstrat că replicarea sau asamblarea VHB produc schimbări complexe în metabolismul lipidic al hepatocitelor, activând expresia proteinelor implicate în lipogeneză și colesterolgeneză, pe de o parte, și scăzând oxidarea acizilor grași și sinteza acizilor biliari, pe de altă parte (Yang F. et. al., 2008; Zhang J. et. al., 2021). Schimbări semnificative în metabolismul fosfolipidelor și sfingolipidelor au fost observate în hepatocite sau linii celulare derivate din tumori hepatice care au fost infectate sau transfectate cu VHB (Hyrina A et. al., 2022). De asemenea, concentrația sfingolipidelor din serul pacienților cu carcinom hepatocelular și mai ales, cei cu insuficiență

hepatică acută determinată de infecția cu VHB este semnificativ mai mare decât în cei sănătoși (Schoeman J. C. et. al., 2016). (Figura 3)

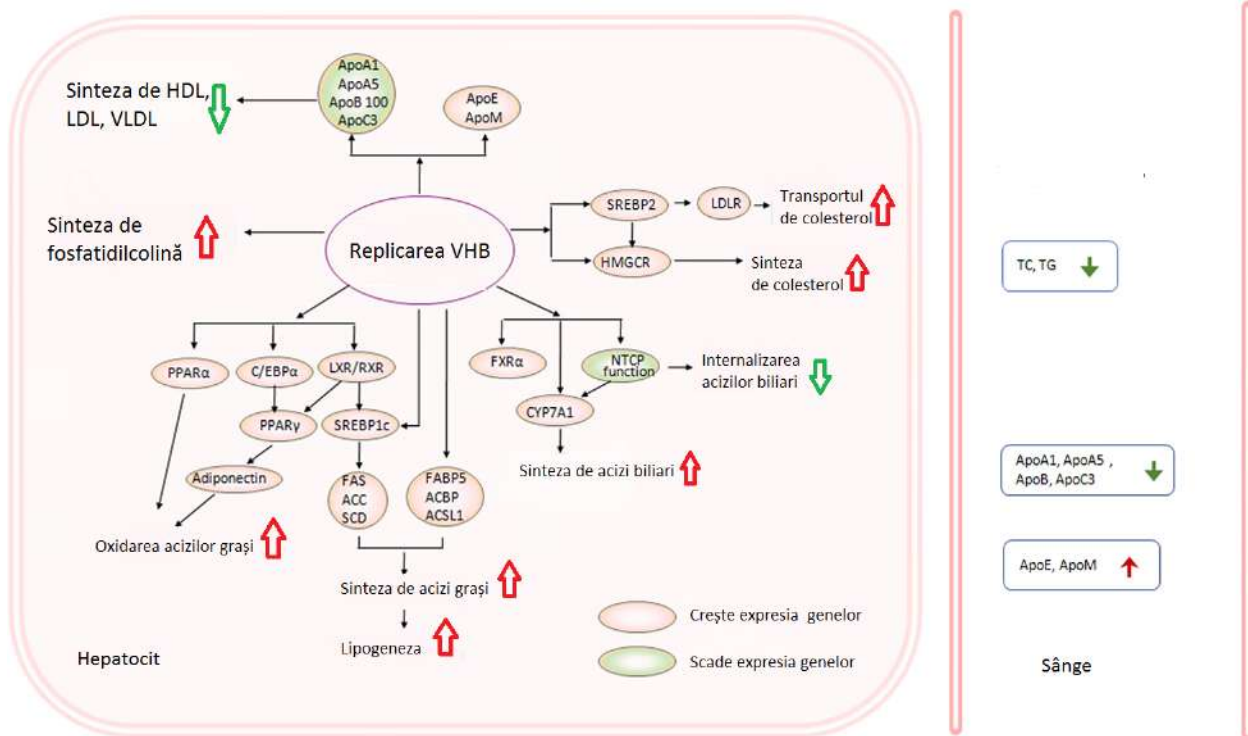


Figura 3. Virusul hepatitei B produce schimbări majore în metabolismul lipidic al hepatocitelor

În timpul infecției cu VHB scade sinteza de HDL, LDL și VLDL și internalizarea acizilor biliari. În același timp crește sinteza de fosfatidilcolină, sinteza de acizi grași, colesterol și oxidarea acizilor grași. Aceste modificări sunt determinate de scăderea sau creșterea activității unor gene prezentate în figură. *Figură adaptată după Zhang J. et. al., 2021*

Fosfatidilinositolfosfații (PIP) sunt derivați ai PI care reglează numeroase procese intracelulare, căi de semnalizare, organizarea citoscheletului, endo- și exocitoză, precum și autofagia. Celulele mamaliene produc 7 tipuri de PIP : fosfatidilinositol 3-fosfat (PI3P), fosfatidilinositol 4-fosfat (PI4P), fosfatidilinositol 5 fosfat (PI5P), fosfatidilinositol 3,5-bifosfat (PI3,5P₂), fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PI4,5P₂), fosfatidilinositol 3,4 bifosfat (PI3,4P₂), și fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PI3,4,5P₃), fiecare interacționând cu efectori specifici (Fruman D. Aet. al. 1998). Reglarea nivelului fiecăreia dintre aceste specii PI este esențială pentru transportul vezicular, apoptoză, metabolism, reorganizarea filamentelor de actină, proliferarea și semnalizarea celulară (Martin T. F. J. et. al., 1998).

PI4P este precursorul fosfatidilinositol-4,5-bifosfat (PI4,5P₂) și al fosfatidilinositol 3,4,5-trifosfat (PI3,4,5P₃) și este o moleculă cu rol esențial în semnalizarea celulară (Fruman D. Aet. al. 1998). Deși PI4P este localizat predominant în rețeaua trans-Golgi (TGN), nivele ridicate de PI4P se găsesc și la nivelul membranei plasmatică, iar o mică cantitate de PI4P se localizează în membranele altor organite intracelulare. Mai multe studii au arătat că Sac1 reduce nivelul de PI4P, realizând un gradient la nivelul căii secretorii care este folosit pentru transferul activ al altor lipide între diferite organite celulare, asigurând în acest fel homeostazia lipidelor în celulă (Guo S. et., al., 1999 ; Hughes W. E.et. al., 2000 ; Xu J. și Huang X., 2020). În celulele cu deficit de Sac1 din drojdii, insecte sau mamifere, PI4P se acumulează nu numai în RE și în Aparatul Golgi, dar și în compartimentele de la periferie, inclusiv veziculele secretorii, membrana plasmatică și lizozomi (Faulhammer F. et. al., 2007).

Având în vedere că proteinele virale beneficiază de aceleași mecanisme de transport ca și proteinele celulei gazdă, este de anticipat că depleția de Sac1, prin efectele pe care le determină asupra nivelului PI4P, va avea consecințe majore asupra ciclului de viață al VHB, ipoteză centrală a acestei teze de doctorat, care va fi verificată prin abordarea experimentală descrisă în capitolele următoare.

CAPITOLUL II. Materiale și metode

În acest studiu am analizat modul în care modularea expresiei genei SACM1L tranzientă sau stabilă interferează cu asamblarea și secreția particulelor virale și subvirale de VHB, utilizând modele celulare precum celulele Huh7, HEK293T, HepG2.2.15 și HepG2NTCP.

Silențierea genei SACM1L a fost obținută prin utilizarea de siARN sau prin utilizarea tehnicii de editare a genomului CRISPR/Cas9. Silențierea a fost confirmată în ambele cazuri prin western blot. Cantitatea de particule virale și subvirale și HBsAg din supernatantul celular a fost apoi analizată prin ELISA și cantitatea de ADN viral și ARNm prin qPCR. Prin experimentul de ultracentrifugare în gradient de zaharoză am determinat cantitatea de HBeAg. Prin experimente de imunoprecipitare, prin utilizarea anticorpilor specifici pentru proteinele virale, am cuantificat prin qPCR cantitatea de nucleocapside virale intracelulare și particule secretate.

În final, prin experimente de imunofluorescență am co-localizat Sac1 și PI4P cu proteine virale și markeri celulari pentru RE și MVB.

Capitolul III. Rezultate și discuții

Silențierea tranzientă a genei SACM1L în linia celulară Huh7

Pentru a analiza implicarea proteinei Sac1 în producția particulelor virale și subvirale ale VHB, celulele Huh7 au fost transfectate cu plasmidul pTriExHBV1.1 pentru 3 zile pentru a se permite o transfecție eficientă, în fiecare zi adăugându-se mediu proaspăt, apoi au fost tratate cu siARN SACM1L sau control siARN pentru 24 sau 48 de ore. Lizatele celulare au fost apoi analizate prin western blot. Așa cum se arată în figura 4A, proteina Sac1 a fost silențiată în linia celulară Huh7 cu aproximativ 85% față de linia control la 24 ore și 70% la 48 ore. În acest experiment, detecția calnexinei a fost folosită drept control de încărcare echivalentă a probelor. Cuantificarea particulelor subvirale prin ELISA (Fig. 4B) și a ADN viral conținut din nucleocapside prin qPCR (Fig. 4C) în supernatantul celulelor, indică o reducere semnificativă a acestora, mai evident la 24h. Foarte probabil, acest lucru se datorează silențierii mai eficiente a Sac1 în acest interval de timp. Aceste rezultate inițiale arată ca proteina Sac1 este implicată într-una din etapele din ciclul de viață al VHB, fiind necesare mai multe experimente pentru a elucidă mecanismul de acțiune.

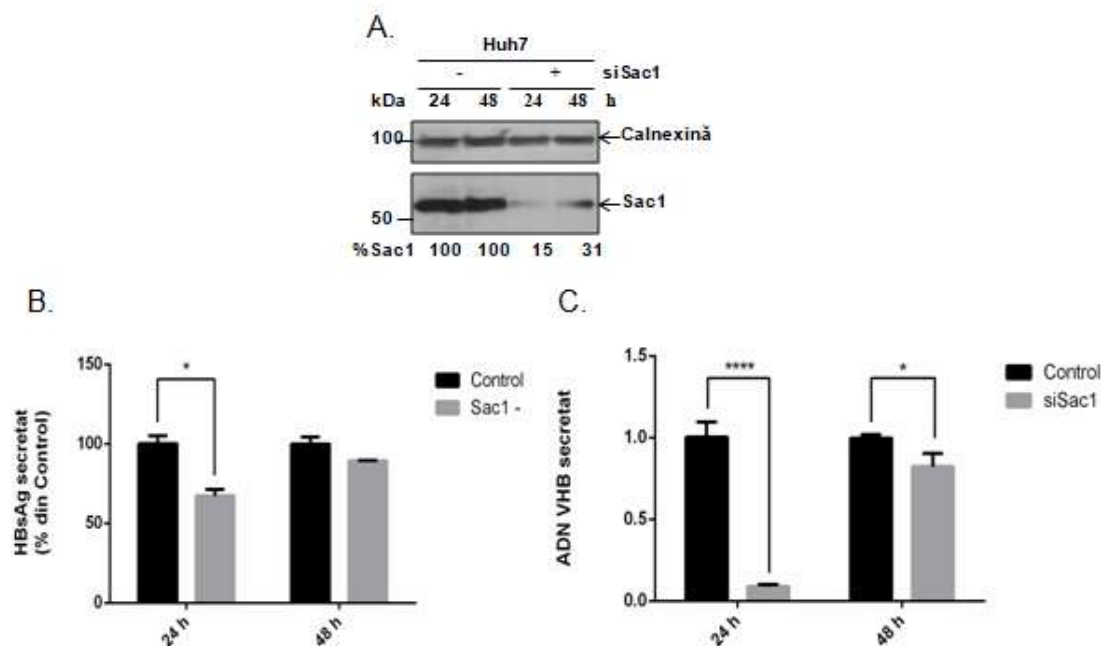


Figura 4. Efectul silențierii SACM1L asupra producției de SVP și ADN VHB. (A) Celulele Huh7 au fost transfectate cu pTriEx HBV 1.1, apoi tratate cu 25nM siARN Sac1 (-) sau siARN control la 3 zile post-transfecție. La 24 sau 48 ore după tratamentul cu siARN, celulele și supernatantele au fost recoltate. Cantități egale de proteine au fost migrate și separate electroforetic apoi detectate prin western blot, folosind calnexina drept control. Expresia de Sac1 din celulele tratate cu siARN Sac1(-) este raportată la celulele tratate cu siARN control și exprimată în procente. (B) Secreția de HBsAg a fost cuantificată prin ELISA la 24 și 48 ore post-transfecție cu siARN Sac1(-) și siARN control. (C) Particulele virale secretate sunt cuantificate prin real-time PCR la 24 și 48 ore post-transfecție cu siARN Sac1(-) și siARN control. $p < 0,05$ (*) și $p < 0,0001$ (****). *Figură adaptată după Popescu M. et al., 2022*

Silențierea tranzientă a genei SACM1L în linia celulară HepG2.2.15

Pentru a confirma rezultatele obținute în linia celulară Huh7 și corelația dintre nivelul de expresie al proteinei Sac1 și producția de particule virale și subvirale HBV, s-a realizat silențierea tranzientă a proteinei Sac1 în celulele HepG2.2.15. Această linie celulară conține genomul VHB, permițând astfel analiza etapelor de replicare și secreție ale ciclului de viață al virusului. Am ales această linie celulară pentru acest experiment deoarece nu mai era necesară transfecția cu plasmida pTriEx HBV 1.1, ci doar transfecția cu siARN pentru a silenția gena SACM1L. Astfel,

celulele nu s-ar fi putut diviza prea mult astfel încât silențierea cu siARN să nu fie eficientă. Expresia Sac1 a fost analizată în celulele HepG2.2.15 după tratamentul cu siARN la 24 de ore post-transfecție, prin western blot, cu anticorpi primari anti-Sac1 (Fig. 5A). Analiza Western blot a proteinelor de anvelopă ale VHB (L, M, S) din aceleași lizate celulare, folosind anticorpi care se leagă la domeniul S comun, indică o expresie similară în linia celulară de control și în celulele HepG2.2.15 silențiate (Fig. 5A).

Rezultatele obținute arată o ușoară creștere a proteinelor de anvelopă S, M și L, care sunt acumulate în celulele în care gena SACM1L a fost silențiată (Fig. 5A), sugerând că secreția proteinelor anvelopei VHB poate fi afectată în absența proteinei Sac1, rezultând acumularea intracelulară.

Modificările nivelurilor de proteine virale în mediul celular pot fi consecința mai multor procese: a) perturbarea traficului celular b) inhibarea transcripției ARN viral și implicit a sintezei proteinelor. Prin urmare, am decis să analizez nivelul transcripților virali intracelulari. ARN-ul intracelular a fost purificat în celulele control și în celulele cu gena SACM1L silențiată tranzient, și amplificat prin qPCR cu primeri specifici. Rezultatele obținute arată niveluri similare de ARN viral intracelular atât în probele control, cât și în probele cu gena SACM1L silențiată tranzient (Fig. 5B). Împreună cu datele experimentale din Fig. 5A care arată că sinteza proteinelor virale nu este modificată semnificativ între celulele cu gena SACM1L silențiată și celulele de control, aceste rezultate demonstrează că transcripția ARN și respectiv translația proteinelor de anvelopă nu sunt influențate de expresia proteinei Sac1.

Pentru a determina dacă nivelul Sac1 observat prin silențierea tranzientă (Fig. 5A) are un impact asupra producției de particule virale și subvirale VHB (SVP), au fost analizate în continuare probe din supernatantul celulelor HepG2.2.15. Pentru analiza particulelor virale, ADN viral a fost purificat din nucleocapside, urmat de cuantificare qPCR. Particulele subvirale au fost cuantificate prin ELISA care măsoară nivelul de HBsAg, constituentul major al acestora. Datele obținute au arătat o inhibare atât a particulelor subvirale (Fig. 5C) cât și a particulelor virale (Fig. 5D) produse în celulele HepG2.2.15 silențiate, confirmând rezultatele obținute în linia celulară Huh7.

Tehnica ELISA cuantifică secreția de particule subvirale HBV, o analiză prin care particulele de interes interacționează cu anticorpi monoclonali care recunosc conformația nativă a proteinei. Prin urmare, pentru a verifica dacă scăderea nivelului de secreție a particulelor subvirale și virale

observată anterior în linia celulară Huh7 cu proteina Sac1 silențiată, nu a fost cauzată de modificarea structurii HBsAg (caz în care antigenul nu ar mai fi recunoscut de anticorpii monoclonali pe care i-am folosit), am efectuat mai întâi un experiment de puls-chase, prin marcarea proteinelor în starea lor nativă. Celulele HepG2.2.15 au fost tratate cu 35S metionină/cisteină timp de 30 de minute pentru a radiomarca proteinele în timpul sintezei lor, apoi au fost lăsate timp de 3 ore în mediu suplimentat cu 10 mM L-metionină (Fig. 5E). Rezultatele au indicat o reducere importantă a proteinelor S, M și L în supernatant, confirmând efectul inhibitor observat anterior asupra SVP (Fig. 5C).

Pe lângă HBsAg, celulele infectate cu VHB produc și HBeAg, un derivat al proteinei core care, după extensia N-terminală, poate fi translocată în RE. HBeAg este procesat de furină la nivel trans-Golgi, care elimină o secvență de 34 de aminoacizi de la capătul C-terminal, după care antigenul matur este secretat (Messageot F. et. al., 2003). Astfel, cele două antigene VHB sunt secretate în urma unor procese diferite. Cuantificarea antigenului HBeAg în supernatantul celulelor HepG2.2.15 tratate cu siARN Sac1 și siARN control, arată cantități similare de proteină produse în celulele cu proteina Sac1 silențiată și în linia celulară control (Fig. 5F). Deoarece cele două antigene virale sunt exportate din celulă prin calea secretorie comună, acest rezultat sugerează un efect specific al silențierii Sac1 asupra HBsAg și nu o acțiune generală, nespecifică asupra traficului celular.

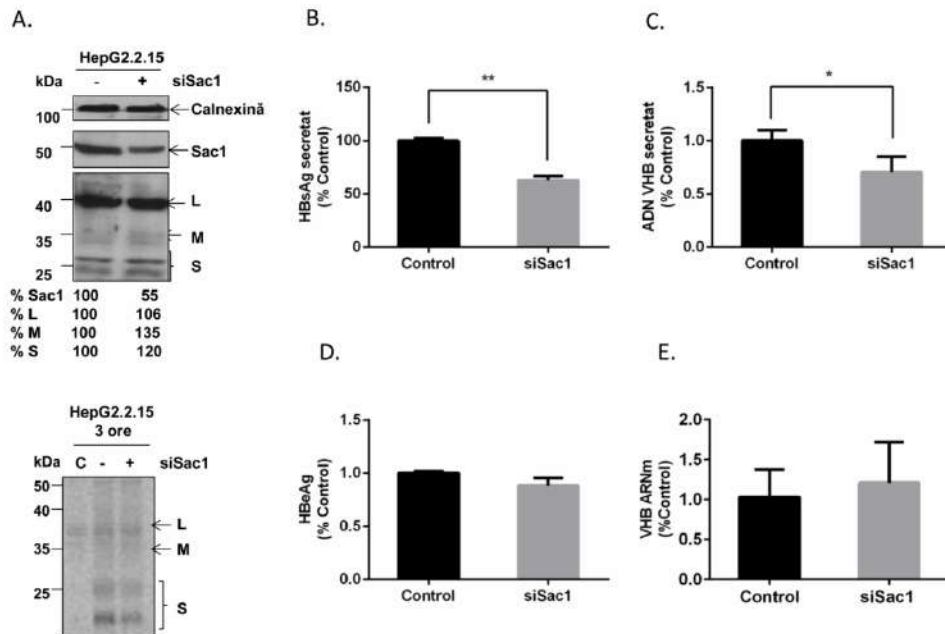


Figura 5. Efectul silențierii genei SACM1L în celulele HepG2.2.15. Celulele HepG2.2.15 au fost tratate cu siARN 25 nM sau siARN de control timp de 24 de ore. La 24 de ore după tratamentul cu siARN, celulele și supernatantele au fost recoltate. (A). Cantități egale de proteine au fost supuse analizei Western blot, folosind calnexină ca control al încărcării probei. (B) Cuantificarea ARNm viral intracelular a fost efectuată prin qPCR, la 24 de ore după transfecție. (C) Secreția de particule subvirale a fost analizată prin cuantificarea HBsAg prin ELISA, la 24 de ore după transfecție (D). Particulele virale secretate au fost cuantificate prin qPCR la 24 de ore post-transfecție cu siARN SACM1L și siARN control. (E) Celulele au fost radiomarcate cu 35S metionină/cisteină, iar supernatantele au fost imunoprecipitate cu un amestec de anticorpi anti-S și anti-preS1. (F) Cantitatea de HBsAg secretat a fost cuantificată la 24 de ore după transfecție cu ARNsi SACM1L (sau ARNsi de control). valoarea $p < 0,01$ (**) (C) și $p < 0,05$ (*) (D). *Figura adaptată după Popescu M. et al., 2022*

Secreția de SVP și ADN viral din celule Huh7 care au gena SACM1L silențiată stabil prin editare genetică CRISPR/Cas9

Experimentele anterioare folosind siARN pentru silențierea genei SACM1L indică o perioadă scurtă de timp în care reducerea expresiei Sac1 este semnificativă (24 sau 48 de ore posttransfecție). Această perioadă scurtă nu este suficientă pentru a putea analiza experimental „recuperarea” fenotipului inițial prin supraexpresia Sac1 în celulele cu proteina Sac1 silențiată endogen și pentru a investiga în detaliu mecanismul de acțiune care determină efectele observate în secreția de particule virale și subvirale. Din acest motiv, am folosit o linie celulară Huh7 cu gena SACM1L silențiată stabil cu tehnica de editare a genomului CRISPR/Cas9, obținută în departamentul nostru de colegul meu, David Patriche, într-un alt proiect. Metoda de obținere, secvențiere și caracterizare a acestor linii fac obiectul unei alte teze de doctorat.

Trei linii clonale, denumite Sac1(-) c1-3, au fost analizate inițial prin qPCR (Fig. 6A) și western blot (Fig. 6B) pentru a determina expresia Sac1 și eficiența silențierii genei la nivel de ARN și proteine virale. Una dintre liniile clonale numite Sac1(-)c1, care are o rată de creștere similară cu linia parentală Huh7, a fost selectată dintre cele 3 clone inițiale pentru experimente ulterioare și pentru a investiga mecanismul de acțiune al silențierii Sac1 asupra VHB.

După cum era de așteptat, expresia redusă a Sac1 a fost observată prin Western Blot în toate cele trei clone selectate inițial în raport cu controlul (Fig. 6B). Pentru a determina dacă silențierea stabilă a genei SACM1L produce aceleași efecte observate asupra VHB și producției de particule subvirale ca silențierea stabilă, celulele clonale Sac1(-)c1-c3 au fost transfectate cu plasmidul pTriExHBV1.1 timp de 24 de ore și supernatantele au fost analizate prin ELISA la 5 zile post-transfecție, pentru a permite acumularea de particule virale și subvirale. Rezultatele arată o reducere semnificativă a cantității de particule subvirale (SVP) în supernatantele celulelor clonale obținute prin tehnica de editare a genomului CRISPR/Cas9, determinată prin cuantificarea HBsAg (Fig. 6C).

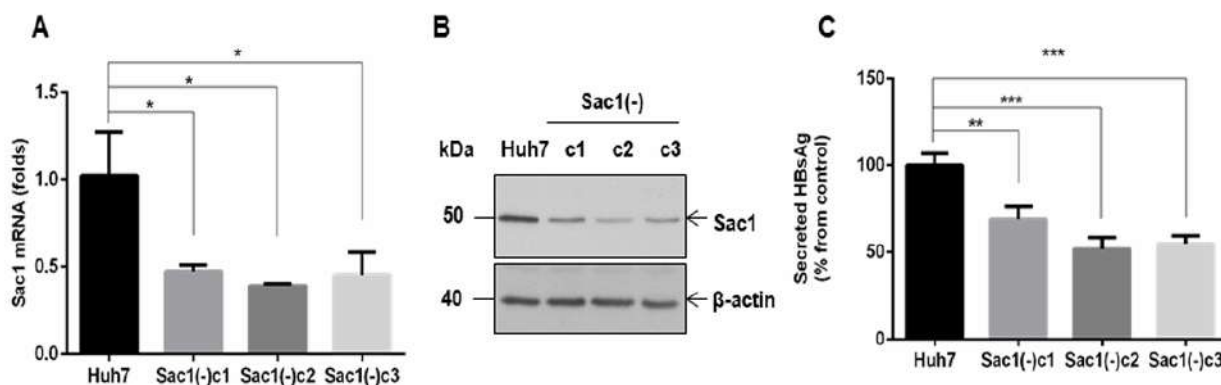


Figura 6. Efectul silențierii stabile a Sac1 prin editarea genomică CRISPR/Cas9 a fost investigat în celulele Huh7. (A) Cuantificarea ARNm Sac1 prin qPCR din clonele Huh7 Sac1(-) c1-c3 a fost efectuată prin qPCR. (B) Cantitatea de proteină Sac1 a fost cuantificată prin western blot, folosind actina ca control pentru încărcarea egală a probelor. (C) Celulele Huh7 Sac1(-) c1-c3 au fost transfectate cu plasmidul pTriExHBV1.1 timp de 24 de ore și apoi menținute în cultură pentru încă 5 zile. Secreția de HBsAg a fost cuantificată prin ELISA la 5 zile după transfecție. $p < 0,05$ (*) (A), valoarea $p < 0,01$ (**) și valoarea $p < 0,001$ (***) (C). Figura adaptată după Popescu M. et al, 2022

Recuperarea expresiei de Sac1 și a fenotipului celular prin producerea exogenă de Sac1-GFP în celule cu depleție stabilă de Sac1

Pentru a demonstra fără echivoc relația dintre producția de particule virale și subvirale ale VHB și nivelul de proteină Sac1 din celulă, s-a realizat un experiment de « recuperare a fenotipului » (« phenotype rescue »), în celule cu depleție de Sac1. Astfel, s-au adăugat cantități crescătoare de plasmid Sac1-GFP în linia clonală Sac1(-)c1, înainte și după transfecția cu plasmidul pTriExHBV1.1 care asigură replicarea virală. Acest mod de lucru a avut ca scop asigurarea unor nivele suficiente de Sac1 în timpul replicării VHB, care a fost analizată pe parcursul a 8 zile.

Expresia exogenă a Sac1-GFP confirmată prin Western Blot, arată o mobilitate electroforetică corespunzătoare unei mase moleculare mai mare decât a proteinei endogene, așa cum era de așteptat, datorită fuziunii cu GFP (Fig. 7A). Particulele virale și subvirale au fost analizate din supernatantul celulelor transfectate prin ELISA (Fig. 7B) și qPCR (Fig. 7C). Datele experimentale arată că atât nivelul de SVP (Fig. 7B) cât și de virioni (Fig. 7C) secretați din celulele Sac1(-)c1 în absența supraexpresiei de Sac1-GFP este semnificativ redus în comparație cu linia parentală Huh7. Este important de menționat că aceste rezultate confirmă efectul inhibitor obținut și în cazul experimentelor cu Sac1 silențiată tranzient în liniile celulare Huh7, HepG2.2.15.

Analiza secreției de particule subvirale și virale în linia clonală Sac1(-)c1 în prezență de Sac1-GFP, a arătat o normalizare a producției lor (Fig. 7B și 7C). Mai mult, acest efect de recuperare este mai accentuat la concentrații mai mari ale plasmidului Sac1-GFP. Concentrațiile relativ mari de plasmid Sac1-GFP necesare să compenseze efectul depleției Sac1 endogen pot fi explicate prin numărul mai mic de celule care exprimă simultan Sac1-GFP și genomul VHB post-transfecție, comparativ cu cele în care doar unul dintre plasmide a fost transfectat cu succes.

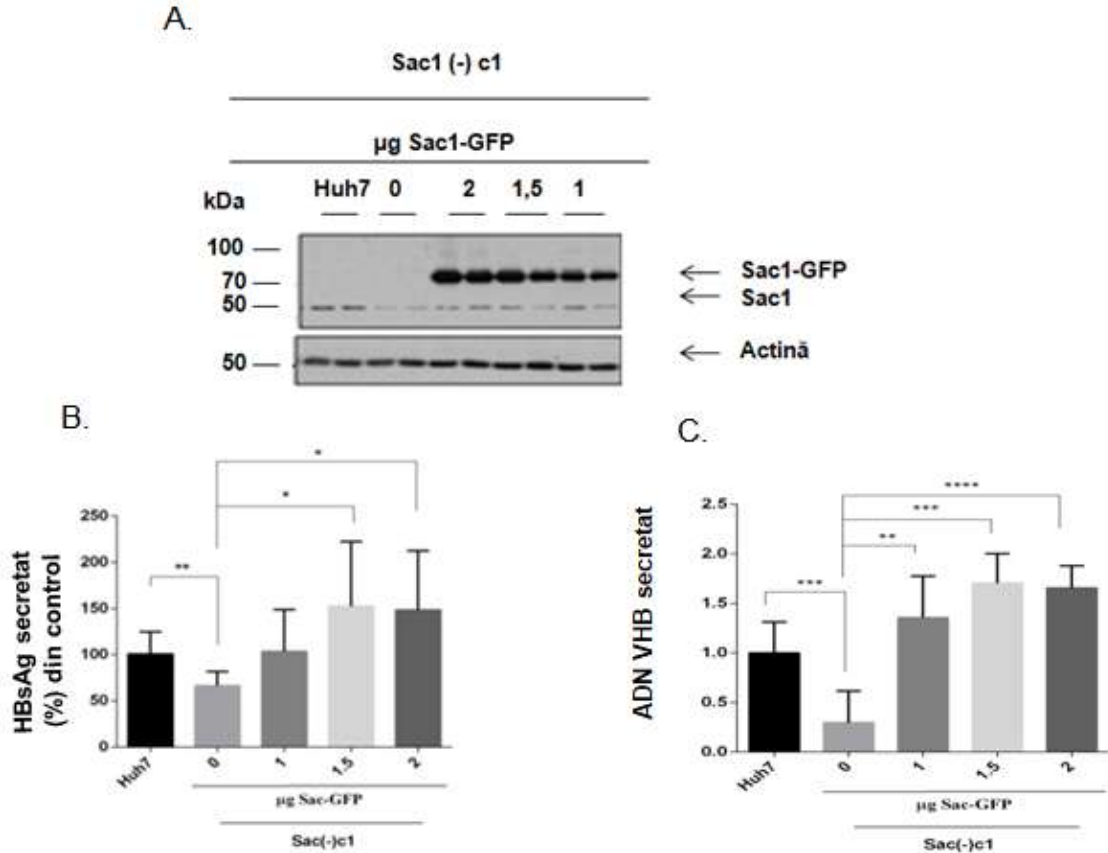


Figura 7. Recuperarea expresiei de Sac1 și a fenotipului celular prin producerea exogenă de Sac1-GFP în celule cu depleție stabilă de Sac1. Celulele Huh7 control și linia celulară Sac1(-)c1 au fost transfectate cu 2 µg plasmid pLNCX-GFP, drept control, sau cantități crescătoare de plasmid pLNCX-GFP-Sac1 pentru 24 ore. La o zi post-transfecție celulele au fost transfectate cu 0.3 µg pTriEx-HBV 1.1 pentru 5 zile, apoi au fost transfectate cu 2 µg plasmid pLNCX-GFP, sau cu cantități crescătoare de plasmid pLNCX-GFP-Sac1, prezentate în figură. Celulele și mediul au fost recoltate la 3 zile după ultima transfecție. (A) Lizatele celulare au fost analizate prin western blot pentru analiza expresiei proteinei Sac1 endogen și exogen (fuzionat cu GFP). Detecția actinei a fost folosită drept control de încărcare a probelor. (B) Secreția HBsAg a fost analizată în supernatantele celulelor prin ELISA, și exprimată ca procent din linia control Huh7. (C) Nucleocapsidele virale au fost purificate din supernatantul celulelor și cantitatea de ADN viral a fost cuantificată prin qPCR. Valoarea lui $p < 0,05$ (*), 0,01(**), 0,001 (***) și 0,0001 (****). *Figură adaptată după Popescu M. et al, 2022*

Analiza anvelopării particulelor virale în celule Huh7 care au gena SACM1L silențiată stabil

Numărul mai mic de particule VHB secretate din celulele clonale care au gena SACM1L silențiată tranzient sau stabil pot arăta o producere redusă, sau un transport perturbat spre spațiul extracelular. Pentru a discrimina între aceste posibilități este necesară și o analiză a nivelului intracelular de particule. De asemenea, particulele virale secretate pot fi complete (cu anvelopă) sau incomplete (nucleocapside fără anvelopă), iar metoda de cuantificare prin PCR, deoarece analizează strict genomul viral încapsidat, indiferent dacă este sau nu anvelopat, nu oferă informații despre finalizarea procesului de morfogeneză cu preluarea proteinelor de înveliș. Această diferențiere se poate face prin imunoprecipitarea lizatei celulare și supernatantelor cu anticorpi care recunosc specific forme diferite de asamblare a virusului, urmată de cuantificarea genomului viral precipitat în complexe anticorp-virus, prin qPCR. Celule control Huh7 și Sac1(-)c1 au fost mai întâi transfectate cu genomul VHB pentru inițierea replicării virale. Atât lizatele cât și supernatantele au fost apoi imunoprecipitate, fie cu anticorpi anti-core (care vor reacționa cu particule fără anvelopă, deoarece aceasta protejează capsida și implicit accesul anticorpilor), fie cu anti-pre-S1 care va reacționa exclusiv cu proteina L prezentă în anvelopa virală, excluzându-se astfel nucleocapsidele fără înveliș. După imunoprecipitare, complexe rezultate au fost capturate pe matrice de Sefaroză conjugată cu Proteina G și apoi eluate. Nucleocapsidele virale au fost purificate din complexe, iar ADN-ul viral a fost purificat și cuantificat prin qPCR. S-a observat o reducere modestă a numărului nucleocapsidelor, dar semnificativă a virionilor anvelopați în supernatantul celulelor Sac1(-)c1 în comparație cu celulele Huh7 control (Fig. 8A), ceea ce sugerează că efectul inhibitor al silențierii Sac1 asupra secreției VHB este predominant în ceea ce privește particulele anvelopate.

Analiza particulelor VHB la nivel intracelular a arătat o creștere semnificativă a particulelor lipsite de anvelopă în celulele Sac1(-)c1 (Fig. 8B), indicând că pierderea expresiei Sac1 nu afectează sinteza (replicarea) ADN-ului viral și asamblarea capsidei, în timp ce anveloparea particulelor virale este puternic perturbată, rezultând în acumularea acestora la nivel intracelular (Fig. 8C). Normalizarea particulelor anvelopate la cantitatea totală de particule cu nucleocapsidă, atât în mediul intracelular (Fig. 8B) cât și extracelular (Fig. 8D), precum și lipsa acumulării de particule anvelopate în celule depletate de Sac1 (Fig. 8B) susțin această ipoteză.

Aceste rezultate demonstrează că efectul proteinei Sac1 asupra secreției de particule virale, se datorează unei perturbări semnificative a procesului de anvelopare. Acest lucru poate fi consecința unui transport perturbat al proteinelor de anvelopă către corpii multiveziculari (MVB), unde are loc preluarea proteinelor de anvelopă de către nucleocapside sau a unei asamblări defectuoase la nivelul MVB, în cazul în care proteinele virale sunt corect transportate. Deoarece principalul substrat al Sac1 este PI4P cu rol esențial în traficul vezicular intracelular, în capitolele următoare am investigat efectul depleției de Sac1 asupra nivelului și localizării intracelulare a PI4P, pentru a descifra mecanismul inhibiției VHB.

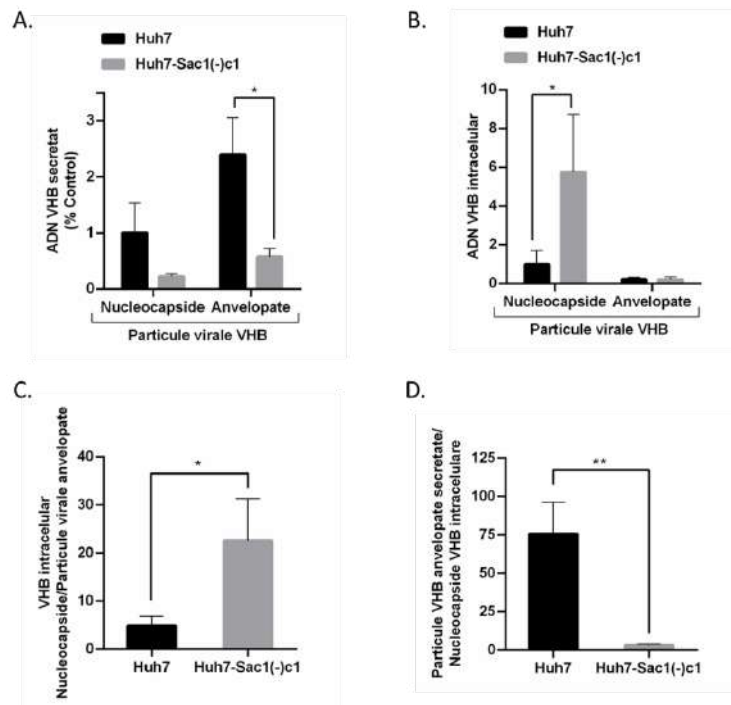


Figura 8. Analiza anvelopării particulelor virale în celule Huh7 care au gena SACM1L silențiată stabil. (A-D) Celulele Huh7 și Sac1(-)c1 au fost transfectate cu pGEM-4Z-HBV 1.3 WT sau plasmid P-null (control). Supernatantele au fost colectate la 3 sau 6 zile post-transfecție, iar celulele au fost recoltate la 6 zile post-transfecție. Mediul celular (A) și lizatele celulare (B) au fost supuse imunoprecipitării, folosind anticorpi anti-core sau anti-preS1. ADN-ul viral a fost purificat și cuantificat prin qPCR. Rezultatele obținute pentru linia celulară Sac1(-) c1 sunt raportate la linia Huh7. Raportul dintre nucleocapside și particule VHB cu înveliș a fost investigat în celule (C) și supernatante (D). Valoarea lui $p < 0,005$ (*) și $p < 0,01$ (**). *Figură adaptată după Popescu M. et al, 2022*

Transportul proteinelor de anvelopă în celulele Huh7 care au gena SAC1 silențiată

Silențierea Sac1 determină o creștere semnificativă a PI4P în celulele de drojdie, insecte sau mamifere, urmată de o redistribuire dezorganizată a fosfolipidelor în aparatul Golgi, RE, vezicule secretoare, endozomi târzii și membrana celulară (Liu Y. et. al., 2008). Pentru a determina consecințele silențierii Sac1 asupra localizării intracelulare PI4P, am efectuat experimente de microscopie de imunofluorescență, folosind celule Huh7 control și celule cu gena SACM1L silențiată stabil (linia celulară Sac1(-)c1). S-a observat că PI4P este distribuit în principal în RE în celulele Huh7 (Fig. 9, A și B, panelurile superioare). PI4P nu colocalizează semnificativ cu GRASP65, o proteină de membrană miristoilată localizată în cis-Golgi (Fig. 9A) și se suprapune parțial cu HBsAg (Fig. 9B), care este localizată predominant în RE și ERGIC. În celulele Sac1(-)c1, au fost observate cantități crescute și distribuția intracelulară predominantă a PI4P în structurile veziculare, confirmând efectele silențierii Sac1 (Fig. 9A și B, panelurile inferioare). Deoarece secreția proteinelor de anvelopă ale VHB a fost redusă semnificativ în celulele Sac1(-)c1, am investigat în continuare transportul proteinelor de anvelopă de la calea secretorie la MVB, organite implicate în asamblarea și secreția virionilor maturi, prin colocalizarea HBsAg cu CD63, o proteină din membranele MVB (Poles et al., 2009) (Fig. 9C)

Important, o parte din cantitatea totală de HBsAg a fost găsită în compartimentele CD63-pozitive din celulele Huh7 (Fig. 9C, panelul superior), demonstrând transportul proteinelor de anvelopă prin MVB. Această fracțiune scade în celulele cu proteina Sac1 silențiată. (Fig. 9C, panelul inferior). Pentru a confirma această observație, a fost efectuată o analiză cantitativă a colocalizării HBsAg/CD63 prin determinarea coeficientului de co-localizare M1 al lui Mander. Această analiză a indicat o reducere semnificativă a colocalizării celor două proteine în celulele Sac1(-)c1, comparativ cu controlul Huh7 (Fig. 9C, dreapta). Împreună, aceste rezultate sugerează că transportul proteinelor anvelopei HBV de la aparatul Golgi la MVB este afectat în celulele cu gena SACM1L silențiată.

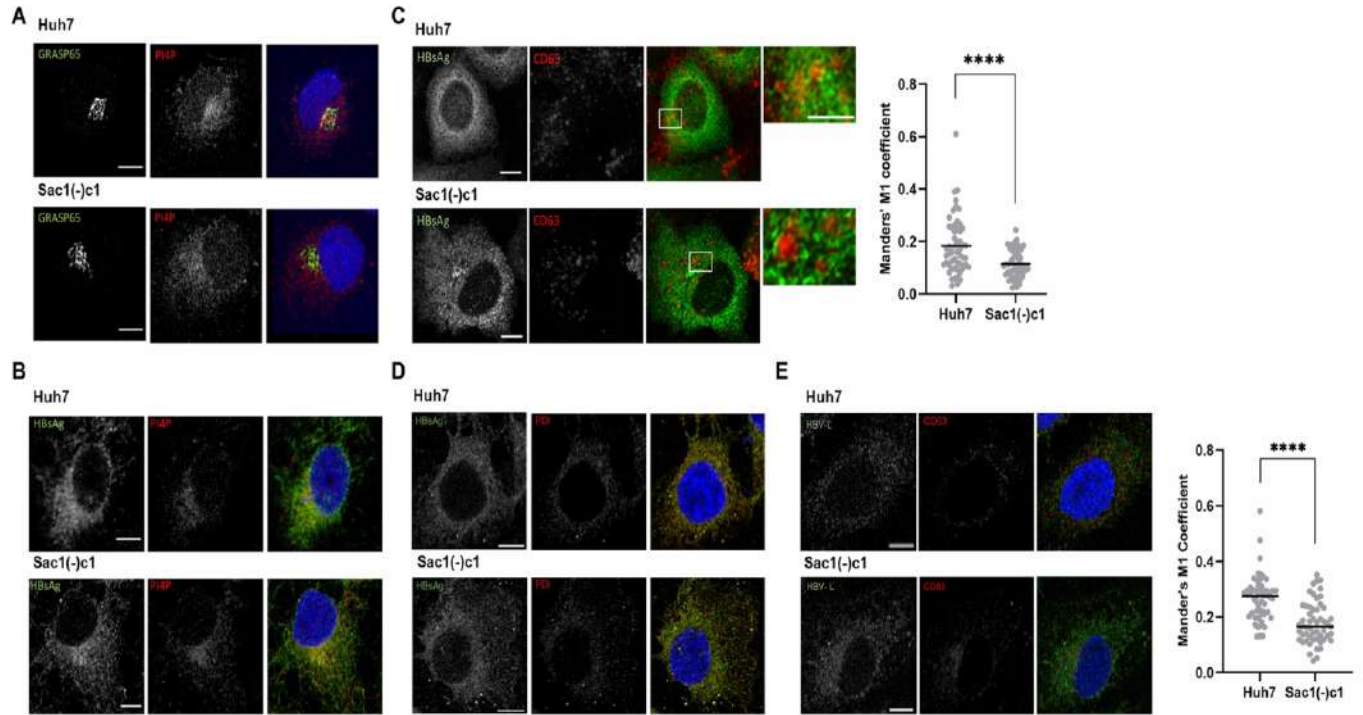


Figura 9. Microscopie de imunofluorescență în celule Huh7 cu gena SACM1L silențiată stabil. (A-C) Celulele Huh7 și Sac1(-)c1 au fost însămânțate pe lamele de microscop. Celulele au fost transfectate cu pTriExHBV1.1 timp de 48 de ore, apoi fixate și tratate cu anticorpi primari specifici, urmată de incubare cu anticorpi secundari conjugați Alexa Fluor 488 (verde) sau Alexa Fluor 594 (roșu). Nucleii au fost marcați cu DAPI (albastru). (A și B) Co-localizarea PI4P fie cu GRASP65 (A) fie cu HBsAg (B) în celulele Huh7 (panelurile superioare) și celulele Sac1 (-) c1 (panelurile inferioare). (C) Co-localizarea HBsAg cu CD63 în celulele Huh7 (panel superior) și Sac1 (-) c1 (panel inferior) și analiza coeficientului de co-localizare M1 al lui Mander (dreapta). Imaginile au fost obținute cu obiectivul 40x al microscopului Zeiss Axio Imager.M2. *Figură adaptată după Popescu M.A et. al., 2022*

Concluzii

Rezultatele publicate anterior au indicat un rol crucial pentru PIP4 în replicarea și morfogeneza virusurilor ARN, care se bazează pe formarea rețelelor membranare intracelulare. PI4P poate contribui la transportul proteinelor virale și concentrarea acestora la nivelul rețelelor membranare pentru sinteza eficientă a ARN viral. Studiul realizat în această teză de doctorat demonstrează pentru prima dată că, prin reglarea nivelurilor intracelulare de PI4P, proteina Sac1 este un factor implicat în morfogeneza VHB, care este un virus ADN. Rezultatele obținute în această lucrare sugerează că Sac1 și PI4P sunt factori celulari implicați în asamblarea și transportul HBsAg și a particulelor virale și evidențiază posibilitatea dezvoltării de noi strategii terapeutice care vizează această lipidă fosfatază. Mecanismul de acțiune propus pentru contribuția acestor factori în ciclul de viață al VHB este ilustrat schematic în Fig. 10.

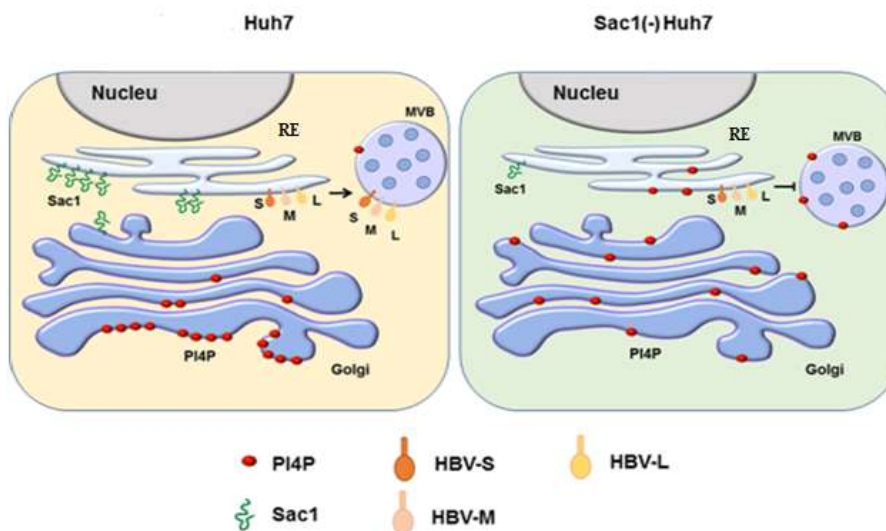


Figura 10. Mecanismul de acțiune propus pentru rolul Sac1 în ciclul de viață al VHB. Distribuția intracelulară a Sac1 și PI4P sunt în stransă legătură și se exclud reciproc. Sac1 localizat în RE promovează transportul eficient al PI4P între diferite compartimente celulare, în special la nivelul Golgi. În celulele cu deficit de Sac1 crește cantitatea intracelulară de PI4P care se redistribuie nespecific la nivelul organelor celulare. Transportul proteinelor VHB de anvelopă spre MVB este afectat, ceea ce rezultă în acumularea intracelulară de nucleocapside imature, neanvelopate.

Lista lucrărilor publicate în cadrul temei de doctorat

Publicații în reviste indexate ISI

1. **Sac1 phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatase is a novel host cell factor regulating hepatitis B virus particles assembly and release**

Popescu MA, Patriche D, Dobrica MO, Pantazica AM, Flintoaca Alexandru PR, Rouillé Y, Popescu CI, Branza-Nichita N. FI= 5.622

FEBS J. 2022 Jul 11. doi: 10.1111/febs.16575.

2. **Class II phosphatidylinositol 3-kinase 2β is a novel target for the potential development of antiviral drugs against the Hepatitis B virus**

David-Sebastian Patriche, Mirela-Andreea Popescu, Costin-Ioan Popescu, Norica Nichita

FARMACIA JOURNAL, 2022 FI= 1,6

Comunicări conferințe naționale

1. The role of phosphatidylinositol (Ptdins) phosphatase Sac1 in the HBV life cycle

Popescu Mirela Andreea, Patriche David-Sebastian, Popescu Costin Ioan, Nichita Norica

2. Class II phosphatidylinositol 3-kinases regulate HBV life cycle in hepatoma cell lines

David-Sebastian Patriche, Mirela-Andreea Popescu, Costin-Ioan Popescu, Norica Nichita

Mulțumiri

Realizarea acestei teze de doctorat a durat 6 ani, în care mi-am împărțit timpul între activitatea didactică ca profesor de biologie în învățământul preuniversitar și activitatea de student doctorand în cadrul departamentului de Glicoproteine Virale al Institutului de Biochimie al Academiei Române. Aș dori să-i mulțumesc coordonatorului meu științific Dr. Norica Nichita pentru că mi-a oferit posibilitatea de a-mi realiza studiile de doctorat în Institutul de Biochimie al Academiei Române. Până să lucrez în departamentul de glicoproteine virale, nu mai avusesem o astfel de experiență, de aceea sunt profund recunoscătoare pentru șansa primită. Le mulțumesc tuturor colegilor din departamentul de Glicoproteine Virale, dar și din celelalte departamente pentru îndrumarea științifică și asistența tehnică la partea experimentală a acestei lucrări. Îi mulțumesc Dr. Olivia Dobrică pentru ca am discutat protocoalele și m-a asistat și m-a îndrumat în realizarea mai multor experimente complexe; Dr. Cătălin Lazăr, pentru îndrumarea în realizarea unor experimente și provocările din discutarea aspectelor teoretice; Drd. David Patriche pentru realizarea liniilor stabile Huh7 cu depleție de Sac1; Dr. Ana-Maria Pantazică, care m-a învățat să realizez experimentele de pulse-chase, dar și alte protocoale, Dr. Ioan Popescu, pentru asistența în experimentele de imunofluorescență.

De asemenea, le sunt recunoscătoare colegilor mei profesori din școlile unde am lucrat pentru că m-au încurajat să-mi continui studiile doctorale, dar și foștilor și actualilor elevi cu care am avut o relație productivă, concretizată în distincții obținute la diferite concursuri sau olimpiade de biologie de către aceștia.

În cele din urmă, îi mulțumesc și sunt recunoscătoare familiei pentru înțelegere și suportul moral.

Bibliografie

- Dorobantu, C., Macovei, A., Lazar, C., Dwek, R. A., Zitzmann, N., & Branza-Nichita, N. (2011). Cholesterol depletion of hepatoma cells impairs hepatitis B virus envelopment by altering the topology of the large envelope protein. *Journal of virology*, 85(24), 13373-13383.
- Faulhammer, F., Kanjilal Kolar, S., Knödler, A., Lo, J., Lee, Y., Konrad, G., & Mayinger, P. (2007). Growth control of Golgi phosphoinositides by reciprocal localization of sac1 lipid phosphatase and pik1 4 kinase. *Traffic*, 8(11), 1554-1567.
- Fruman, D. A., Meyers, R. E., & Cantley, L. C. (1998). Phosphoinositide kinases. *Annual review of biochemistry*, 67(1), 481-507.
- Guo, S., Stolz, L. E., Lemrow, S. M., & York, J. D. (1999). SAC1-like domains of yeast SAC1, INP52, and INP53 and of human synaptojanin encode polyphosphoinositide phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 274(19), 12990-12995.
- Herrscher, C., Pastor, F., Burlaud Gaillard, J., Dumans, A., Seigneuret, F., Moreau, A., ...& Blanchard, E. (2020). Hepatitis B virus entry into HepG2 NTCP cells requires clathrin mediated endocytosis. *Cellular microbiology*, 22(8), e13205.
- Hu, Q., Zhang, F., Duan, L., Wang, B., Ye, Y., Li, P., ...& Chen, W. (2020). E-cadherin plays a role in hepatitis B virus entry through affecting glycosylated sodium-taurocholate cotransporting polypeptide distribution. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 10, 74.
- Hughes, W. E., Woscholski, R., Cooke, F. T., Patrick, R. S., Dove, S. K., McDonald, N. Q., & Parker, P. J. (2000). SAC1 encodes a regulated lipid phosphoinositide phosphatase, defects in which can be suppressed by the homologous Inp52p and Inp53p phosphatases. *Journal of Biological Chemistry*, 275(2), 801-808.
- Hyrina, A., Burdette, D., Song, Z., Ramirez, R., Okesli-Armlovich, A., Vijayakumar, A., ...& Holdorf, M. M. (2022). Targeting lipid biosynthesis pathways for hepatitis b virus cure. *Plos one*, 17(8), e0270273.
- Lambert, C., & Prange, R. (2001). MEMBRANE TRANSPORT, STRUCTURE, FUNCTION, AND BIOGENESIS-Dual topology of the hepatitis B virus large envelope

protein. Determinants influencing post-translational pre-S translocation. *Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22265-22272.

Macovei, A., Petrareanu, C., Lazar, C., Florian, P., & Branza-Nichita, N. (2013). Regulation of hepatitis B virus infection by Rab5, Rab7, and the endolysosomal compartment. *Journal of virology*, 87(11), 6415-6427.

Martin, T. F. J. (1998). Phosphoinositide lipids as signaling molecules: common themes for signal transduction, cytoskeletal regulation, and membrane trafficking. *Annual review of cell and developmental biology*, 14(1), 231-264.

Pols, M. S., & Klumperman, J. (2009). Trafficking and function of the tetraspanin CD63. *Experimental cell research*, 315(9), 1584-1592.

Schoeman, J. C., Hou, J., Harms, A. C., Vreeken, R. J., Berger, R., Hankemeier, T., & Boonstra, A. (2016). Metabolic characterization of the natural progression of chronic hepatitis B. *Genome medicine*, 8(1), 1-13.

Suliman, I., Abdelgelil, N., Kassamali, F., & Hassanein, T. I. (2019). The effects of hepatic steatosis on the natural history of HBV infection. *Clinics in Liver Disease*, 23(3), 433-450.

Tian, J., Li, C., & Li, W. (2021). Entry of hepatitis B virus: going beyond NTCP to the nucleus. *Current Opinion in Virology*, 50, 97-102.

Tsukuda, S., & Watashi, K. (2020). Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral research*, 182, 104925.

Turton, K. L., Meier-Stephenson, V., Badmalia, M. D., Coffin, C. S., & Patel, T. R. (2020). Host transcription factors in hepatitis B virus RNA synthesis. *Viruses*, 12(2), 160.

World Health Organization. (2017). *Global hepatitis report 2017*. World Health Organization.

Xu, J., & Huang, X. (2020). Lipid metabolism at membrane contacts: Dynamics and functions beyond lipid homeostasis. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 8, 615856.

Yang, F., Yan, S., He, Y., Wang, F., Song, S., Guo, Y., ... & Sun, S. (2008). Expression of hepatitis B virus proteins in transgenic mice alters lipid metabolism and induces oxidative stress in the liver. *Journal of hepatology*, 48(1), 12-19.

Zhang, J., Ling, N., Lei, Y., Peng, M., Hu, P., & Chen, M. (2021). Multifaceted interaction between Hepatitis B Virus infection and lipid metabolism in hepatocytes: A potential target of antiviral therapy for chronic Hepatitis B. *Frontiers in microbiology*, 12, 636897.