



ACADEMIA ROMÂNĂ
Școala de Studii Avansate a Academiei Române
Institutul de Biochimie

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**Căi de semnalizare la nivelul Reticulului Endoplasmatic
induse de infecția cu Virusul Hepatitei B umane (VHB)**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT
CS I Dr. Norica Nichita

DOCTORAND
Ghionescu Alina-Veronica

2024

CUPRINS (TEZA IN EXTENSO)

Listă Figuri.....	4
Listă Tabele.....	6
Listă abrevieri.....	7
Rezumat.....	13
Capitolul 1 INTRODUCERE	16
1.1. Infecția cu Virusul Hepatitei B (VHB).....	16
1.1.1. Impactul global al infecției cu VHB.....	16
1.1.2. Structura și ciclul de viață al VHB	17
1.1.3. Modele experimentale pentru studiul VHB.....	23
1.1.4. Tratamente antivirale.....	24
1.2. Carcinomul hepatocelular (HCC).....	26
1.2.1. Incidența la nivel global	26
1.2.2. Factorii de risc în dezvoltarea HCC	26
1.2.3. Rolul sistemului imun în HCC	27
1.2.4. Tratamentul și chemorezistența în carcinomului hepatocelular	28
1.3. Căi de semnalizare la nivelul reticulului endoplasmatic induse de patologii hepatice	30
1.3.1. Generalități	30
1.3.2. Mecanismul de semnalizare prin UPR	31
1.3.3. Rolul ERAD în patologii hepatice.....	35
1.3.4. Mecanismul de autofagie în patologii hepatice	37
1.4. Scopul studiului	41
Capitolul 2 MATERIALE ȘI METODE.....	43
2.1. Linii celulare.....	43
2.2. Generarea liniei celulare stabile cu depleție de EDEM3 (HepaRG ^{EDEM3KO})	43
2.3. Transfecția și tratamentul liniilor celulare.....	44
2.4. Probele clinice	44

2.5. <i>Western blot</i>	46
2.6. Fraționarea subcelulară.....	49
2.7. Imunoprecipitare.....	49
2.8. Izolarea ARN total.....	49
2.9. Revers-transcrierea ADNc și analiza <i>real-time</i> qPCR	51
2.10. Imunofluorescență	52
2.11. Analiza apoptozei celulare prin citometrie în flux	52
2.12. Infecția cu VHB a celulelor HepaRG	53
2.13. Cuantificarea antigenului HBs prin ELISA.....	53
2.14. Cuantificarea interferon β și IL-6 prin ELISA	54
2.16. <i>In-cell</i> ELISA pentru cuantificarea receptorului NTCP	54
2.15. Izolarea ADN viral din nucleocapside și cuantificarea prin qPCR	55
2.16. Evaluarea promotorilor VHB	56
2.17. Amplificarea și purificarea plasmidelor	57
2.18. Prelucrarea și analiza datelor transcriptomice din baze de date publice	57
2.19. Analiza statistică.....	58
Capitolul 3 REZULTATE	59
3.1. Căile de semnalizare asociate RE sunt activate în hepatocite primare infectate cu VHB.....	59
3.2. Nivelul de expresie a EDEM3 este crescut la pacienții cu infecție virală VHB	60
3.3. Obținerea liniei celulare cu knockout de EDEM3 prin tehnologie CRISPR/Cas9..	62
3.4. Infecția și replicarea VHB sunt semnificativ crescute în celulele HepaRG care supraexprimă EDEM3	63
3.5. Supraexpresia de EDEM3 diminuează stresul de la nivelul RE în celulele HepaRG	65
3.6. Rolul supraexpresiei de EDEM3 asupra căii de semnalizare ERAD în celulele HepaRG	67
3.7. Autofagia nedegradativă este activată în celulele HepaRG care supraexprimă EDEM3	68
3.8. Depleția de EDEM3 crește stresul din RE.....	71
3.9. Kifunensina induce stres la nivelul RE.....	75
3.10. Nivelul de expresie a EDEM3 crește la pacienții cu HCC	76

3.11. Modularea sistemului imun în linia hepatică HepaRG cu supraexpresie de EDEM3	79
3.12. Nivelul de expresie a EDEM3 este asociat cu o rată de supraviețuire scăzută la pacienții cu HCC	81
3.13. Expresia EDEM3 este asociată cu rezistența la sorafenib.....	83
3.14. Semnificația clinică a căii de semnalizare ERAD în HCC.....	85
3.15. Căile de semnalizare asociate ERAD în HCC.....	88
3.16. Sistemul imun este inhibat în clusterul <i>high-ERAD</i>	90
Capitolul 4 DISCUȚII.....	96
CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE	100
BIBLIOGRAFIE	102
Mulțumiri	127
Listă de lucrări publicate.....	128
Participări la conferințe	129

Scopul studiului

La nivel mondial, 1,5 milioane de noi infecții cu virusul hepatitei B (VHB) sunt raportate anual (Hsu et al., 2023) și este agentul cauzal al hepatitei B acută sau cronică, care poate conduce la ciroză hepatică sau carcinom hepatocelular (HCC). Tratamentele actuale pentru pacienții cu infecții cronice cu VHB nu oferă o vindecare completă, însă cercetarea interacțiunilor dintre virus și celula gazdă poate conduce la dezvoltarea de noi ținte terapeutice (Jiang et al., 2021). Genomul particulei virale este reprezentat de ADN circular relaxat (ADNrc), împachetat în interiorul unei nucleocapside, care este înconjurată de un bistrat lipidic și glicoproteine de anvelopă (S, M, L). Acestea din urmă, înainte să fie împachetate în particule virale, sunt translocate în reticulul endoplasmatic (RE), unde suferă procese de N-glicozilare, pliere și oligomerizare (Tsukuda and Watashi, 2020).

Studii anterioare au demonstrat că acumularea acestor proteine virale induce stres în RE și activează *Unfolded Protein Response* (UPR), însoțit de creșterea nivelului de expresie a manozidazelor din familia *Endoplasmic Reticulum (ER) Degradation Enhancing Alpha-Mannosidase Like Protein* (EDEEM). Glicoproteinele greșit pliate sunt procesate de aceste manozidaze care acționează asupra glicanilor N-legați, producând substrate pentru *ER-Associated Degradation* (ERAD). Virusurile pot dobândi mecanisme pentru manipularea UPR în beneficiul lor. În cazul VHB, s-a observat că activarea proteinelor EDEM determină degradarea proteinelor de suprafață (S, L) și creșterea secreției proteinei M secretate (Lazar et al., 2012, Lazar et al., 2017). Date anterioare din grupul nostru au arătat că supraexpresia proteinei EDEM3 determină creșterea replicării virale și a nivelului particulelor subvirale (SVPs) secretate (Teză de doctorat-Dr. Mihaela Uță).

Scopul acestui studiu a fost de a investiga mecanismele prin care ERAD, în principal proteina EDEM3, intervine în ciclul de viață al VHB. Astfel, au fost folosite linii celulare susceptibile infecției cu VHB, probe de țesut hepatic, dar și date transcriptomice și proteomice din baze de date publice. Expresia genică a EDEM3 a fost măsurată pe mai multe tipuri de țesut hepatic infectate sau neinfectate cu VHB și confirmată prin analiza bazelor de date publice. În plus, procesele moleculare de la nivelul RE, implicate în ciclul de viață al VHB, au fost investigate în liniile celulare cu expresie modulată de EDEM3.

Aceste rezultate au condus la un alt scop al acestui studiu, și anume de a investiga rolul ERAD în HCC, prin analiza bazelor de date transcriptomice. Genele asociate ERAD identificate au fost corelate cu cei mai importanți factori implicați în managementul HCC.

Capitolul 1. Introducere

VHB este un virus hepatotrop, care aparține familiei *Hepadnaviridae*, descoperit de către Blumberg și colaboratorii ca „antigenul Australia” (Blumberg et al., 1967, Seeger and Mason, 2000). Genomul viral are o structură compactă, formată dintr-o moleculă de ADN circular relaxat (ADNrc), cu o lungime de aproximativ 3,2 kb (kilobaze), compus dintr-o catenă sens incompletă (catena pozitivă) și o catenă antisens completă (catena negativă). Acesta este împachetat în interiorul unei nucleocapside, care este înconjurată de un bistrat lipidic și proteine de suprafață (Tsukuda and Watashi, 2020).

Ciclul de viață al VHB cuprinde o serie de etape unice și complexe, fiecare critică pentru replicarea și persistența virusului. Aceste etape includ internalizarea particulelor virale în hepatocitele gazdă, transportul intracelular al nucleocapsidei virale direcționate către nucleul celulei gazdă, transformarea ADNrc într-o formă circulară covalentă închisă (ADNccc), transcrierea și translația proteinelor virale, transcrierea inversă a ARN pregenomic în ADNrc, asamblarea și secreția particulelor virale (Seeger and Mason, 2015).

Molecula de ADNccc se asociază cu proteine virale și factori ai celulei gazdă și se organizează în minicromozomi. Este menținută în nucleu și funcționează ca matriță pentru transcrierea virală, pe o perioadă mai lungă de timp. Persistența și localizarea acestei forme intermediare de ADN viral în hepatocitele infectate este provocarea majoră pentru terapiile antivirale (Xia and Guo, 2020).

Conform celor mai recente statistici, peste 50% dintre cazurile de HCC din întreaga lume sunt cauzate de infecția cu VHB. Acest agent patogen poate promova transformarea malignă a celulelor hepatice prin activarea diferitelor mecanisme pro-tumorale, reglarea instabilității genomului din celula gazdă și remodelarea epigenetică (starea de metilare, modificarea post-translațională a histonelor sau inducerea de onco-microARN) (Jiang et al., 2021). Mai mult decât atât, integrarea ADN viral în genomul celulei gazdă conduce la activarea expresiei oncogenelor (TERT - *Telomerase Reverse Transcriptase*, TP53 - *Tumor Protein P53*, MYC - *MYC Proto-Oncogene*, BHLH *Transcription Factor* (Peneau et al., 2022). De asemenea, HBx activează transcrierea genelor implicate în mai multe căi de semnalizare pro-tumorale, inclusiv JUN - *Jun Proto-Oncogene*, AP-1 *Transcription Factor Subunit*, FOS - *Fos Proto-Oncogene*, AP-1 *Transcription Factor Subunit*, MYC și TP53 (Jiang et al., 2021). Sistemul imun joacă un rol important în dezvoltarea HCC, astfel, efectul inhibitor al VHB asupra secreției de citokine și activității celulelor NK (natural killer) sau T reglatoare, conduce la inflamație cronică și dezvoltarea HCC (Jiang et al., 2021).

Celulele hepatice sintetizează o cantitate crescută de proteine secretorii (aproximativ 13 milioane de proteine secretorii pe minut), având în vedere activitatea metabolică ridicată a ficatului. Astfel, acesta prezintă o susceptibilitate ridicată la perturbarea mecanismelor de la nivelul RE (Duwaerts and Maier, 2021). Conform mai multor studii, stresul la acest nivel provoacă o serie de reacții în cascadă care afectează ficatul (Maier and Malhi, 2019, Zhang et al., 2022). Pe de altă parte, în timpul regenerării acestui organ, hepatocitele se află într-o stare activă de proliferare, care este asociată cu o creștere a sintezei proteice, ce conduce la stresul RE și UPR, pentru a susține supraviețuirea celulelor (Rutkowski and Kaufman, 2007).

Glicozilarea reprezintă cea mai întâlnită modificare post-translațională (50% dintre proteinele sintetizate sunt glicozilate) și se bazează pe atașarea covalentă a lanțurilor polizaharidice (glicani) la proteine, modulându-le structura și funcția (Dwek, 1996, Lin and Lubman, 2024). Cele mai cunoscute forme de glicozilare implică legarea N-glicanilor la resturi de asparagină sau legarea O-glicanilor la resturi de serină sau treonină. N-glicozilarea presupune 3 etape: sinteza glicanului pe un schelet lipidic (Dol-PP), transferul pe lanțul polipeptidic nascent și procesarea la nivelul RE - Aparat Golgi (Lin and Lubman, 2024).

În urma translocării proteinei nou sintetizate la nivelul lumenului RE, complexul oligozaharil-transferazei recunoaște Asn-X-Ser/Thr (X reprezintă orice aminoacid cu excepția Pro) și atașează covalent lanțul Glc3Man9GlcNAc2 (Zhang and Kaufman, 2006). Ulterior, glicanul este remodelat de o serie de enzime (Guay et al., 2023). Mai precis, este tăiat rapid și secvențial de glucozidazele I și II (GI și GII) pentru a genera o formă monoglucozilată (GlcMan9GlcNAc2), care reprezintă substrat pentru lectinele chaperon, calnexină (CNX) și calreticulină (CRT), ce contribuie la plierea proteinei. Reducerea restului de glucoză terminal de către GII determină disocierea de CNX/CRT. Astfel, dacă glicoproteina eliberată este corect pliată, în urma interacției cu manozidaza I a RE (ERManI/ManIB1), se îndepărtează manoză terminală, rezultând forma Man8GlcNAc2 (M8B) și va fi transportată către aparatul Golgi. În caz contrar, este recunoscută de către UDP-glucoză glicoprotein-glicozil transferaze (UGGT1 și UGGT2), reglicozilată și reîntră în ciclul CNX/CRT (Adams et al., 2019).

După îndepărtarea resturilor de glucoză, EDEM2 poate catalizeaza îndepărtarea primului rest de manoză din structura N-glicanilor, în timp ce EDEM1 și EDEM3 procesează fragmentul oligozaharidic până la Man5-7GlcNAc2. De asemenea, aceste manozidaze se asociază cu oxidoreductaze cu scopul de a-și îndeplini funcția. Astfel, toate manozidazele EDEM se asociază cu *thioredoxin domain containing 11* (TXNDC11); EDEM1 și EDEM2 cu *Protein disulfide isomerase* (PDI); EDEM3 cu *thioredoxin domain containing 5*

(ERp46/TXNDC5), în timp ce EDEM1 cu *DnaJ heat shock protein family (Hsp40) member C10* (DNAJC10/ERdj5). În continuare, asupra formei Man5-7GlcNAc2 acționează *osteosarcoma amplified 9, ER lectin* (OS-9) și *endoplasmic reticulum lectin 1* (XTP3-B/ERLEC1), care interacționează cu proteina *suppressor of Lin-12-like* (Sel1L) și ulterior cu *synoviolin* (Hrd1/ SYVN1), o proteină esențială a canalului de retrotranslocare (dislocon) (Christianson et al., 2008, Carvalho et al., 2010, Tax et al., 2019).

Procesul de retrotranslocare a substratului în citosol are loc cu ajutorul mai multor proteine: Derlin 1, Derlin 2, Derlin 3, Sec61, *valosin-containing protein-interacting membrane protein* (VIMP), *ancient ubiquitous protein 1* (AUP1), *ubiquitin recognition factor in ER associated degradation 1* (UFD1/Npl4) sau *autocrine motility factor receptor* (AMFR/gp78) (Olzmann et al., 2013). Toate ramurile ERAD (ERAD-M pentru substraturile din membrana RE sau ERAD-L pentru substraturile din lumen) se asociază cu AAA-ATPaza citosolică (VCP/p97), care mediază transportul către citosol (Radhakrishnan et al., 2014).

În ultima etapă, enzima E1 activează ubiquitina printr-o reacție dependentă de ATP, cu formarea unui intermediar E1-ubiquitină activă; ubiquitina activă este transferată la enzima de conjugare E2, formând cu aceasta o legătură covalentă. De asemenea, substratul de degradat formează un complex cu ligaza E3, care prezintă o afinitate ridicată pentru E2. Ubiquitina activată este transferată la enzima E3, care catalizează atașarea covalentă la substratul țintă. Acesta este ubiquitinilat și recunoscut de proteazom pentru degradare. Pentru a menține un nivel suficient de ubiquitină liberă în celulă, lanțurile de poliubiquitină sunt îndepărtate prin acțiunea deubiquitinazelor (DUB) (Glickman and Ciechanover, 2002, Gong et al., 2016).

Numeroase componente ERAD sunt conservate la mamifere, în special, Hrd1 și Sel1L (Vembar and Brodsky, 2008). În hepatocite, Hrd1/Sel1L reglează răspunsurile de *fasting* și *feeding* prin factorul de transcripție CREBH care, la rândul său, activează transcripția factorului FGF21 - *Fibroblast growth factor 21*, un reglator cheie al căilor metabolice hepatice (Bhattacharya et al., 2018). Deleția completă a genelor Hrd1 sau Sel1L la șoareci conduce la letalitate embrionară, evidențiind rolul lor în embriogeneză (Francisco et al., 2010). În celulele canceroase, supresoarele tumorale (PTEN - *phosphatase and tensin*, FOXO- *forkhead box protein O*, WNT5A - *Wingless-Type MMTV Integration Site Family, Member 5A* sau TP53) sunt substraturi de degradare ale Hrd1 (Yamasaki et al., 2007, Liu et al., 2018, Bhattacharya et al., 2022), iar degradarea acestora promovează proliferarea celulelor canceroase hepatice atât *in vivo*, cât și *in vitro*, invazia vasculară, angiogeneza și metastazarea (Ji et al., 2021). O altă componentă ERAD raportată în HCC este *tripartite*

motif-containing 25 (TRIM25), care activează ERAD (Zhang et al., 2020) și inhibă *type I transmembrane protein inositol requiring 1* (IRE1 α), promovând supraviețuirea și creșterea celulelor tumorale (Liu et al., 2020).

De asemenea, supraexpresia de OS-9 a fost detectată în țesutul tumoral și adiacent al pacienților cu recurență comparativ cu cei fără recurență. În plus, prin teste *in vitro*, s-a demonstrat că modularea pozitivă a nivelului de expresie OS-9 promovează capacitatea de migrare și invazie a celulelor HCC (Wei et al., 2022). În contrast, gp78, care funcționează upstream față de Hrd1 (Olzmann et al., 2013), atunci când este silențiată, inhibă ERAD, ceea ce conduce la stres cronic, promovând steatohepatita non-alcoolică (NASH) și HCC (Zhang et al., 2015).

În plus, pentru asigurarea metabolismului rapid și eficient, celulele tumorale își reglează procesele de poliubiquitinare sau monoubiquitinare în timpul tumorigenezei, deoarece asamblarea lanțurilor de ubiquitină necesită o cantitate crescută de energie. Astfel, în celulele metastatice a fost observată o creștere a procesului de monoubiquitinare global, care este suficient pentru funcționarea celulei (Ji et al., 2021).

Mai multe studii au arătat faptul că infecția cu virusul VHB declanșează creșterea nivelului de expresie a mai multor markeri ERAD. De asemenea, s-a observat că supraexpresia tranzitorie a proteinelor EDEM determină reducerea nivelurilor intracelulare ale proteinelor de anvelopă S și L, însoțită de o scădere a SVP secretate (Lazar et al., 2012, Lazar et al., 2017). Wang și colaboratorii au raportat rolul Sel1L, o altă componentă ERAD, în infecția cu VHB. Astfel, cantitățile de ARN, ADN și proteine virale au fost reduse semnificativ prin supraexpresia Sel1L în celulele Huh7 transfectate tranzient cu un plasmid ce conține genomul viral și în linia celulară HepG2.2.15. Modularea expresiei Sel1L prin silențiere tranzientă a condus la blocarea ERAD, la activarea mecanismului de control a RE - ERQC (*ER quality control*) și a procesului de autofagie (Wang et al., 2019).

Datorită unei ratei de proliferare, celulele canceroase se confruntă adesea cu afectarea generării de ATP, hipoxie și mutații specifice care pot perturba homeostazia RE și pot declanșa activarea UPR, ERAD sau autofagie (Tsai and Weissman, 2010). Modularea componentelor din aceste căi reprezintă strategii terapeutice importante pentru activarea căilor apoptotice în celulele maligne (Clarke et al., 2014).

Mai multe studii au arătat faptul că infecția cu VHB induce stres la nivelul RE și stimulează etapele timpurii ale autofagiei, care susțin replicarea și secreția virală. De asemenea, în infecție a fost observată activarea UPR, promovarea proliferării celulare și în final, inducerea proceselor de carcinogeneză. UPR activează căile de semnalizare asociate,

inclusiv ERAD, pentru a restabili homeostazia celulei (Lin et al., 2020, Chen and Cubillos-Ruiz, 2021, Wang et al., 2022). De asemenea, acționează prin diferite mecanisme pentru îndepărtarea proteinelor acumulate sau pliate greșit prin creșterea capacității de pliere sau reducerea translației proteinelor (Cao and Kaufman, 2012).

Mecanismul UPR promovează atât un răspuns adaptativ al celulei, care favorizează creșterea tumorii și chemorezistența, dar și moartea celulară în condiții de stres prelungit (Stefani et al., 2012). Acest fapt reprezintă provocarea majoră în utilizarea sa pentru terapia HCC, într-o manieră dependentă de caracteristicile micromediului tumoral. Așadar, în acest studiu am avut ca scop înțelegerea rolului căii de degradare ERAD în infecția cu VHB și în dezvoltarea HCC.

Capitolul 2. Materiale și metode

Expresia genică a EDEM3 a fost măsurată pe mai multe tipuri de țesut hepatic infectate sau neinfectate cu VHB. Mai mult, rezultatele au fost confirmate prin analiza unei baze de date transcriptomice ce a inclus hepatocite primare infectate. De asemenea, în liniile hepatice cu supraexpresie de EDEM3 au fost investigate mai multe mecanisme moleculare care afectează VHB, precum: UPR, ERAD și autofagie. Pentru validarea acestor rezultate a fost generată o linie cu knockout de EDEM3 prin tehnologia CRISPR/Cas9. Datorită modificării fenotipului acestor celule și datorită imposibilității de a menține această linie în cultură mai multe pasaje, a fost investigat procesul de apoptoză. În plus, pentru a investiga rolul ERAD în HCC, a fost analizată corelația dintre expresia genelor din această cale de semnalizare și datele clinico-patologice ale pacienților cu această patologie, în mai multe seturi de date transcriptomice publice.

Capitolul 3. Rezultate

Pentru a pune în evidență interacțiunile complexe dintre căile de semnalizare asociate RE în infecția cu VHB, am selectat și analizat baze de date publice de pe platforma GEO (*Gene Expression Omnibus*, <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>), ce au inclus date de expresie genică obținute prin secvențierea întregului transcriptom. Setul de probe analizat, GSE183156 a cuprins 6 probe de hepatocite primare, dintre care trei infectate cu VHB și trei neinfectate, colectate la 28 de zile post-infecție. Analiza datelor prin metode de *clustering* folosind programul R, a arătat o creștere semnificativă a genelor asociate cu mecanismele UPR, ERAD și autofagie, în celulele infectate cu VHB față de celule neinfectate. În plus,

expresia genică ridicată de EDEM3 a fost în concordanță cu rezultate obținute anterior în departamentul nostru (Lazar et al., 2012, Lazar et al., 2017).

Pentru a valida rezultatele obținute *in vitro*, am cuantificat nivelul de expresie a genei EDEM3 prin RT-*real-time* qPCR, în probe de țesut hepatic: 10 N și 50 NAT, 25 infectate cu VHB (NAT +) și 25 neinfectate (NAT -). Prin analiza rezultatelor obținute s-a observat faptul o expresie ridicată a EDEM3 în probele NAT cu/fără VHB în comparație cu N și de asemenea, că transcriptul EDEM3 crește mai mult în țesuturile infectate cu VHB (Figura 1.A). Acest fapt indică o posibilă implicare a acestei molecule în infecția cu VHB și în procesul de dezvoltare a patologiilor hepatice cronice.

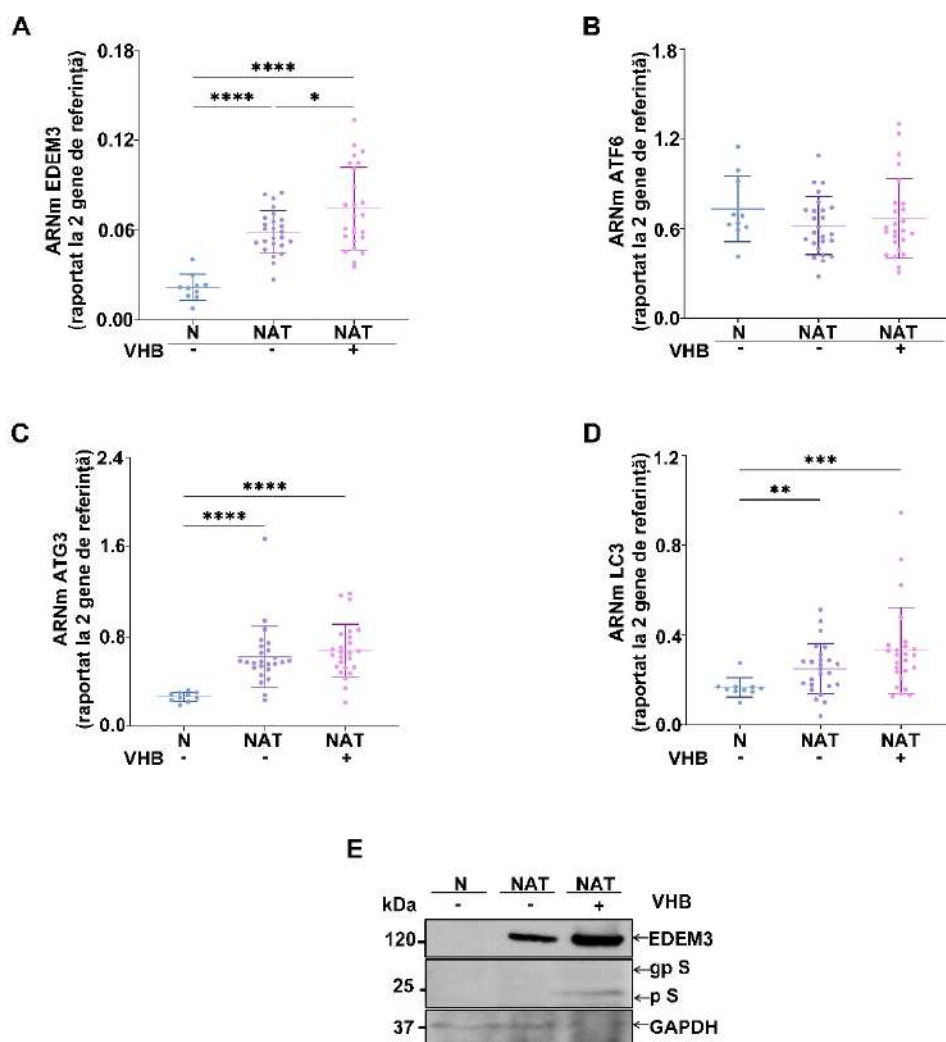


Figura 1. Analiza de markeri UPR și de autofagie în probe de țesut non-tumoral la pacienții HCC cu infecție VHB comparativ cu cei neinfecțați. Expresia genelor (A) EDEM3, (B) ATF6, (C) ATG3 și (D) LC3 a fost cuantificată în următoarele tipuri de probe: țesut hepatic normal – N (n=10) și țesut hepatic non-tumoral adiacent tumorii – NAT de la pacienți cu HCC infectați cu VHB (n=25) și pacienți neinfecțați (n=25), prin

RT-*real-time* qPCR și folosind formula de calcul $2^{-\Delta Ct}$. Expresia transcripturilor a fost normalizată la genele de referință GAPDH și TBP. Fiecare *scatter plot* ilustrează mediana și deviația standard a valorilor de expresie genică. Analiza statistică s-a realizat folosind testul Student *t unpaired* (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$; ****, $p < 0.0001$). (E) Evaluarea proteinelor EDEM3, VHB-S -forma neglicozilată (p S) și VHB-S -forma glicozilată (gp S) prin Western blot. Probele de țesut hepatic N, NAT VHB (-) și NAT VHB (+) au fost lizate, procesate și detectate cu anticorpi specifici. GAPDH a fost folosit drept control de încărcare.

De asemenea, în aceleași probe de țesut am cuantificat genele implicate în procesele UPR (ATF6), respectiv autofagie (LC3, ATG3). Spre deosebire de creșterea semnificativă a acestora în hepatocitele infectate pe termen scurt (28 de zile), în probele de țesut hepatic infectat cu VHB, nu a fost observată o modificare semnificativă din punct de vedere statistic a nivelurilor de transcripturi comparativ cu probele de țesut neinfectate. Totuși, în cazul celor doi markeri de autofagie, expresiile genice au crescut în probele NAT, comparativ cu probele de N (Figura 1.B-D).

Mai mult decât atât, nivelul relativ al proteinei EDEM3 a fost analizat prin Western blot pe probe de țesut hepatic (N, NAT-, NAT+) și a fost confirmat rezultatul obținut la nivel transcripțional (Figura 1.E). Aceste rezultate pun în evidență activarea diferită a mecanismului UPR în infecția cronică, spre deosebire de infecția acută și sugerează un rol potențial al moleculei EDEM3 în dezvoltarea patologiilor hepatice cronice.

Având în vedere aceste observații, am generat o linie stabilă cu depleție de EDEM3 (HepaRG^{EDEM3KO}) prin tehnologia CRISPR/Cas9 pentru investigarea funcției acestei proteine în celulele hepatice HepaRG. Liniile celulare cu supraexpresie de EDEM3 (HepaRG^{EDEM3}), respectiv control (HepaRG^C) au fost obținute anterior acestui studiu.

Consecințele modulării EDEM3 asupra ciclului de viață al VHB, în celule hepatice, au fost examinate anterior de către Dr. Mihaela Uță în cadrul programului de doctorat. Cuantificarea nivelurilor de expresie a antigenului HBs și a moleculelor de ADN viral izolate din virionii anvelopați imunoprecipitați, a evidențiat o creștere a acestora în HepaRG^{EDEM3} în infecția cu VHB, comparativ cu linia control. Pentru a verifica dacă efectele observate sunt datorate expresiei crescute a receptorului VHB (NTCP) în linia HepaRG^{EDEM3}, comparativ cu HepaRG^C, acesta a fost cuantificat prin analiza in-cell ELISA în cadrul studiului de față. Rezultatele nu au arătat o modificare a NTCP între cele două linii celulare. De asemenea, pentru a investiga nivelul de internalizare a VHB, am analizat nivelul de ADN

viral intracelular la 24 h post-infecție, care nu a indicat o diferență semnificativă între cele două linii HepaRG. Aceste rezultate sugerează faptul că EDEM3 nu este implicat în etapa de internalizare a ciclului viral, fiind în concordanță cu rezultatele obținute anterior în laboratorul nostru.

În continuare, având în vedere aceste rezultate, am investigat efectul opus asupra VHB, și anume al depleției de EDEM3. După mai multe încercări de optimizare, linia celulară HepaRG^{EDEM3 KO} nu a putut fi menținută într-o stare diferențiată o perioadă suficientă de timp pentru a finaliza procesul de diferențiere, timp de 14 zile, datorită apariției modificărilor fenotipice și a procesului de apoptoză.

Mai multe studii au raportat faptul că VHB poate dobândi mecanisme pentru manipularea UPR în beneficiul său, astfel fiind observată o activare a căilor de semnalizare de la nivelul RE, atât în infecția cu VHB (Wang et al., 2022), cât și în tumorigeneză (Wei and Fang, 2021). Pentru înțelegerea mecanismului prin care EDEM3, intervine în ciclul de viață al VHB, au fost investigate consecințele supraexpresiei de EDEM3 asupra UPR. Astfel, căile de semnalizare IRE1 α , ATF6 și PERK au fost analizate în celulele HepaRG prin *Western blot*. Rezultatele obținute arată faptul că, în timp ce nivelul de expresie a markerilor ATF6 și BiP a rămas nemodificat, expresiile GRP-94, PERK, eIF2 α și IRE1 α au fost atenuate în celulele HepaRG^{EDEM3}, comparativ cu HepaRG^C (Figura 2).

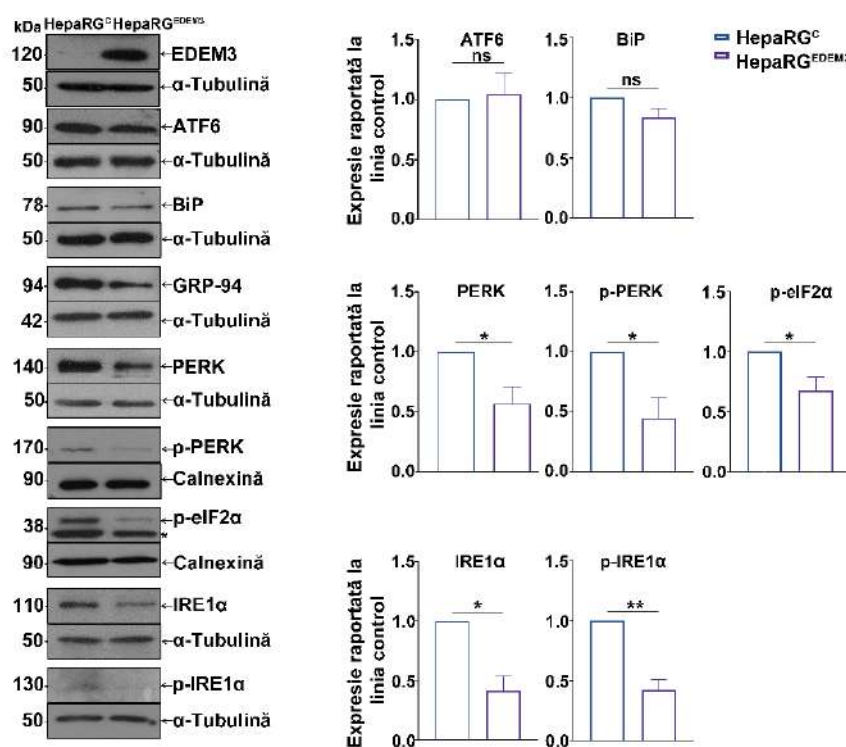


Figura 2. Expresia markerilor UPR în celulele HepaRG cu supraexpresie de EDEM3. Lizatele celulelor HepaRG^C și HepaRG^{EDEM3} au fost investigate prin Western blot cu anticorpii corespunzători. α -tubulina, β -actina sau calnexina au fost utilizate drept control de încărcare. Benzile corespunzătoare proteinelor de interes au fost cuantificate utilizând programul ImageJ și normalizate la controalele interne corespunzătoare. Asteriscul indică o bandă nespecifică a anticorpului anti-p-eIF2 α . În imaginea din dreapta sunt reprezentate cuantificările markerilor UPR, iar graficele reprezintă mediana și deviația standard a nivelurilor de expresie relativă din 3 experimente independente. Analiza statistică s-a realizat folosind testul Student *t unpaired*. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

În continuare, am investigat efectul supraexpresiei EDEM3 asupra căii de semnalizare ERAD prin *Western blot*. Nivelul de expresie al OS-9, XTP3-B și Sel1L a fost similar în cele două linii celulare, în timp ce Hrd1 a fost semnificativ crescut în linia cu supraexpresie de EDEM3 (Figura 3). Această proteină a fost asociată anterior cu degradarea Rheb, un activator al mTOR, iar creșterea expresiei acesteia în linia HepaRG^{EDEM3} indică o posibilă inhibare a căii de semnalizare mTOR.

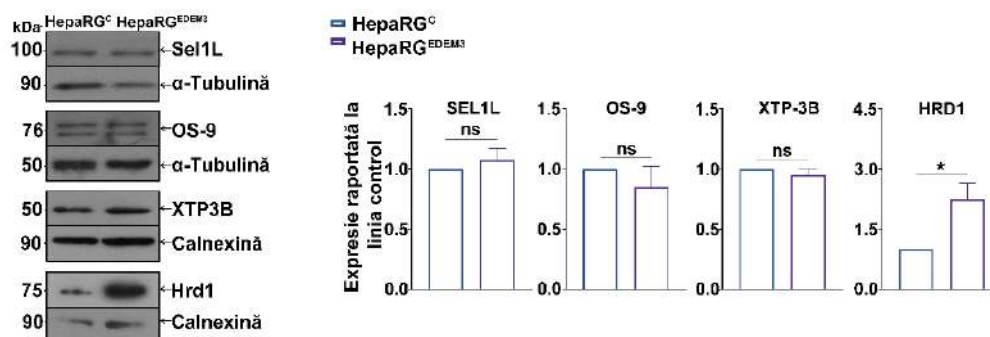


Figura 3. Expresia markerilor ERAD în celulele HepaRG cu supraexpresie de EDEM3. Nivelul proteic al markerilor ERAD (Sel1L, OS-9, XTP3-B și Hrd1) a fost analizat prin Western blot cu anticorpii specifici. α -tubulina sau calnexina au fost utilizate drept control de încărcare. Benzile corespunzătoare proteinelor de interes au fost cuantificate utilizând programul ImageJ și normalizate la controalele de încărcare corespunzătoare. În imaginea din dreapta sunt reprezentate cuantificările markerilor ERAD, iar graficele reprezintă mediana și deviația standard a nivelurilor de expresie relativă din 3 experimente independente. Analiza statistică s-a realizat folosind testul Student *t unpaired*. (*, $p < 0.05$).

Autofagia secretorie promovează asamblarea nucleocapsidelor, replicarea virală și secreția particulelor virale (Chu et al., 2022, Wang et al., 2022). Pentru a investiga dacă EDEM3 afectează procesul de autofagie, liniile celulare HepaRG^C și HepaRG^{EDEM3} au fost transfectate cu plasmidul pEGFPC1-LC3, care codifică markerul de autofagie LC3. Tratatamentul celulelor cu clorochină (CQ), un inhibitor care blochează fuziunea autofagozomului cu lizozomul (Mauthe et al., 2018), a fost inclus drept control pozitiv în acest experiment. Prin microscopie confocală s-a pus în evidență apariția unui număr mare de autofagozomi marcați cu LC3 în linia celulară cu supraexpresie de EDEM3, în timp ce aceștia au fost slab detectabili în linia celulară control. Mai mult decât atât, EDEM3 nu a fost co-localizată cu LC3 (Figura 4).

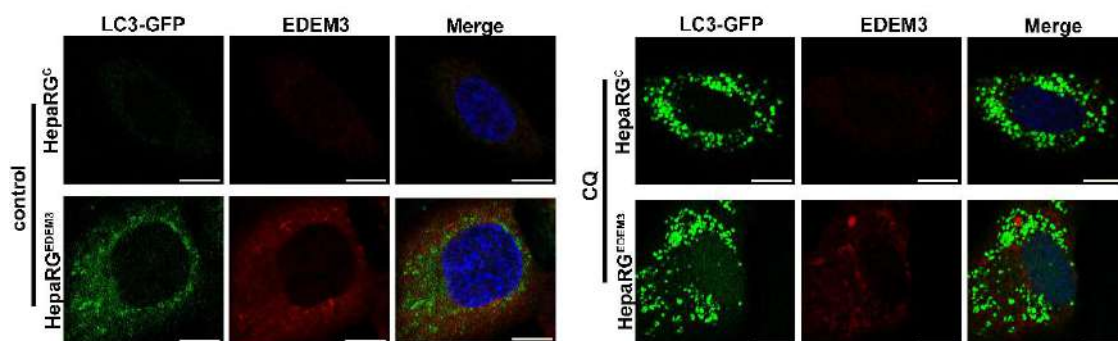


Figura 4. Nivelul de expresie a LC3 crește în celule cu supraexpresie de EDEM3.

Celulele hepatice HepaRG^C și HepaRG^{EDEM3} au fost transfectate cu plasmidul pEGFPC1-LC3. După 6 h de la transfecție, celulele au fost incubate cu 10 μ M clorochină (CQ), pentru 24 h. Expresia proteinei EDEM3 (roșu) a fost pusă în evidență cu anticorpi specifici, iar nucleii au fost marcați cu DAPI. Bara de scalare este 10 μ m.

Acest rezultat a fost confirmat prin analiza *Western Blot*, unde s-a observat o creștere a conversiei LC3I la LC3-II în linia celulară HepaRG^{EDEM3} și în tratamentul cu TM, inclus în experiment drept control pozitiv (Wang et al., 2022) (Figura 5.A).

Deoarece autofagia este puternic inhibată de mTOR (Rabanal-Ruiz et al., 2017, Saxton and Sabatini, 2017), a fost investigată expresia proteinei totale, dar și a formei fosforilate, în celulele HepaRG^{EDEM3}. Așa cum era de așteptat, expresia fosfo-mTOR a fost scăzută în aceste celule, în timp ce proteina totală mTOR a rămas nemodificată (Figura 5.A). În plus, Rheb a prezentat o expresie scăzută în linia celulară HepaRG^{EDEM3} (Figura 5.B). Astfel, se poate presupune că expresia Hrd1 crescută determină o scădere a Rheb. Mai mult, nivelul proteomic al markerului de autofagie degradativă, ApoE, a fost ridicat în linia HepaRG^{EDEM3} în comparație cu linia celulară HepaRG^C (Figura 5.B). Aceste rezultate

sugerează că supraexpresia EDEM3 crește autofagia secretorie de către axa Hrd1/Rheb/mTOR.

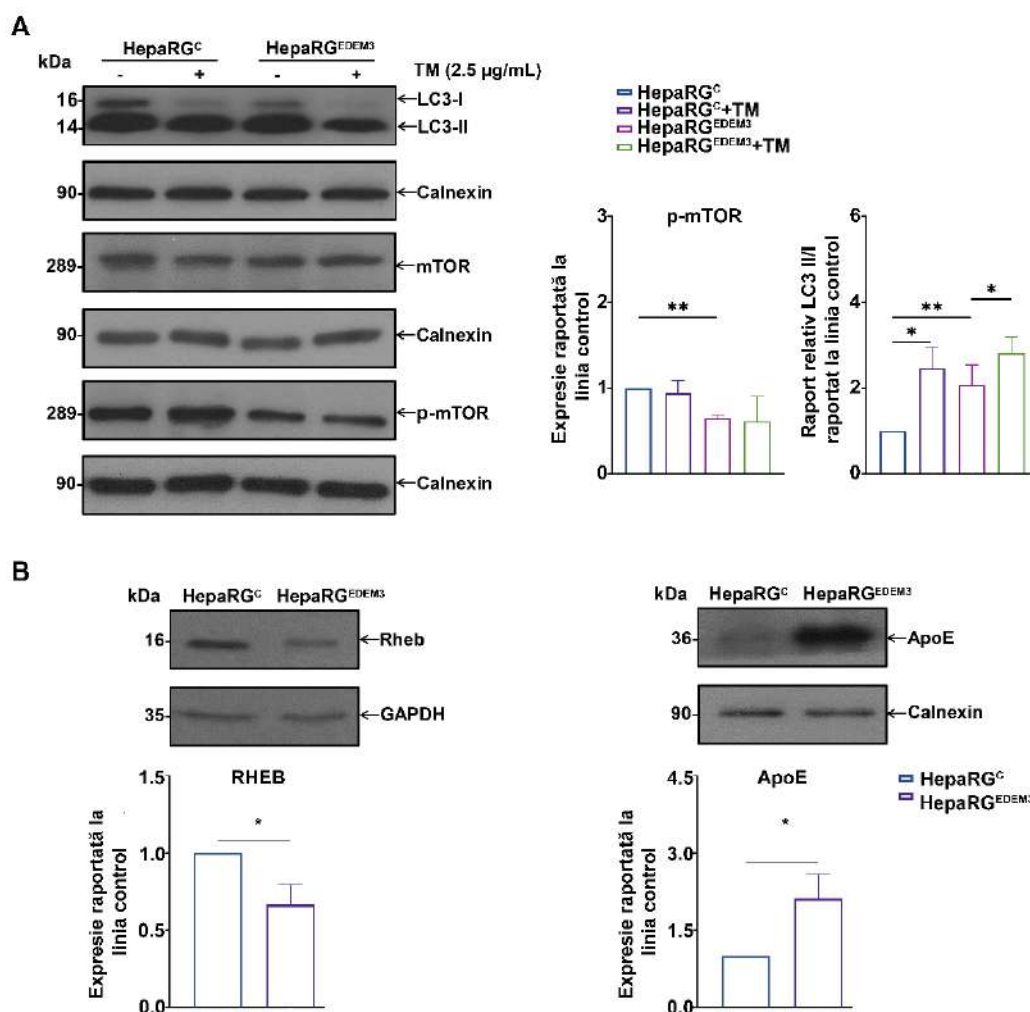


Figura 5. Expresia EDEM3 promovează autofagia secretorie în celulele hepatice HepaRG. Lizate de celule HepaRG^C și HepaRG^{EDEM3} tratate/netratate cu 2.5 µg/mL TM pentru 6 h, au fost investigate prin *Western blot*. Proteinele (A) LC3, mTOR și p-mTOR, respectiv (B) Rheb și ApoE, au fost detectate folosind anticorpi specifici. Pentru normalizare, calnexina sau GAPDH au fost utilizate drept control intern. Benzile corespunzătoare proteinelor de interes au fost cuantificate folosind programul ImageJ. În imagine sunt reprezentate cuantificările markerilor din 3 experimente independente, sub formă de *bar charts*, ce reprezintă mediana și deviația standard. Analiza statistică s-a realizat folosind testul Student *t unpaired*. (*, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$).

Pentru a confirma rolul EDEM3 asupra căilor de semnalizare de la nivelul RE, mecanismele de UPR și autofagie au fost investigate în celule HepaRG^{EDEM3 KO}. În timpul amplificării celulelor HepaRG^{EDEM3 KO}, a fost observată o reducere notabilă a viabilității,

după pasajul 10. În consecință, experimentele au fost efectuate pe aceste celule la pasaje inferioare (4–5), fie în prezența, fie în absența TM, iar rezultatele au indicat activarea semnalizării IRE1 α și PERK.

Li et al. au raportat faptul că stresul cronic de la nivelul RE conduce la activarea pro-apoptozei (Li et al., 2019). Prin urmare, datorită expresiei crescute a markerilor UPR și a prezenței fenotipului modificat, a fost investigat procesul de apoptoză în HepaRG^{EDEM3KO}. Prin analiza Western Blot am observat că proteinele pro-apoptotice, p53 și Bax (Stefani et al., 2012) au un nivel de expresie ridicat (Figura 6). De asemenea, experimentele de citometrie în flux au indicat un procent mai mare de celule apoptotice în linia celulară HepaRG^{EDEM3KO}.

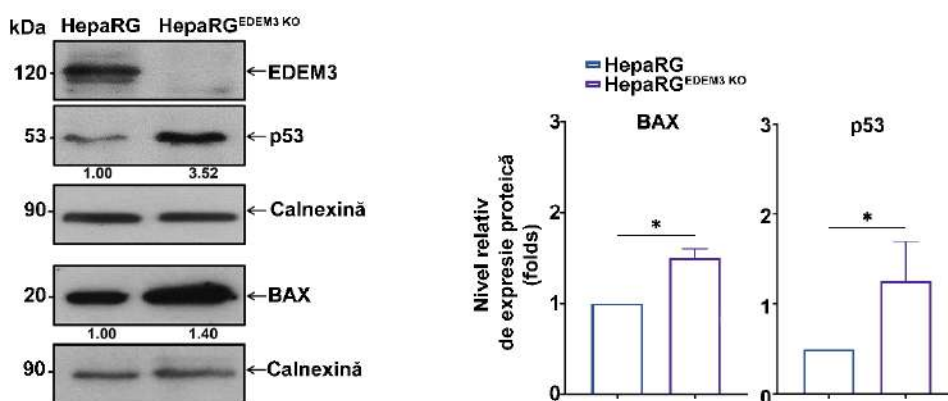


Figura 6. Depleția de EDEM3 activează molecule implicate în procesul de apoptoză în linia celulară HepaRG .

Lizate de celule HepaRG și HepaRG^{EDEM3 KO} au fost investigate prin *Western blot*.

Markerii de apoptoză p53 și BAX au fost detectați cu anticorpi specifici. Pentru normalizare, calnexina a fost folosită drept control intern. Benzile corespunzătoare proteinelor de interes au fost cuantificate folosind programul ImageJ. În partea dreaptă a imaginii sunt reprezentate cuantificările markerilor sub formă de *bar charts*, ce ilustrează mediana și deviația standard din 3 experimente independente. Analiza statistică s-a realizat folosind testul Student *t unpaired*. (*, $p < 0.05$).

Infecția cronică cu VHB este un factor de risc pentru HCC (Arbuthnot and Kew, 2001). Nivelul de expresie genică crescut al EDEM3 în probele NAT, comparativ cu probele N (Figura 7.A) sugerează că această moleculă contribuie la dezvoltarea HCC. Pentru a investiga această ipoteză, profilul de expresie genică a EDEM3 a fost evaluat în 50 de probe tumorale HCC și în 50 de probe NAT, prin *RT-real-time qPCR*. Rezultatele obținute au indicat o expresie ridicată a transcriptului în probele T, comparativ cu NAT și o scădere

semnificativă a markerului de autofagie LC3 în probele T. În schimb, nivelurile de expresie a genelor ATG3 și ATF6 au rămas nemodificate (Figura 7.A). Expresia proteică a EDEM3 a fost detectată în 12 probe de țesut hepatic (6 NAT și 6 T). Rezultatele au confirmat efectul observat la nivel transcriptomic (Figura 7.B). În continuare, a fost analizată semnificația clinică a profilului de expresie EDEM3 la pacienții cu HCC. Analiza bazelor de date publice a indicat că pacienții cu un nivel ridicat de EDEM3 prezintă o rată de supraviețuire scăzută, dar EDEM3 nu este un biomarker independent de prognostic. Ivestigarea corelației dintre profilul de expresie a EDEM3 și răspunsul celulelor hepatice la sorafenib a fost investigată în mai multe baze de date. Rezultatele au arătat o reducere semnificativă a nivelului de expresie EDEM3 după tratament, ceea ce confirmă observațiile obținute *in vitro*, conform cărora depleția de EDEM3 este corelată negativ cu procesul de apoptoză.

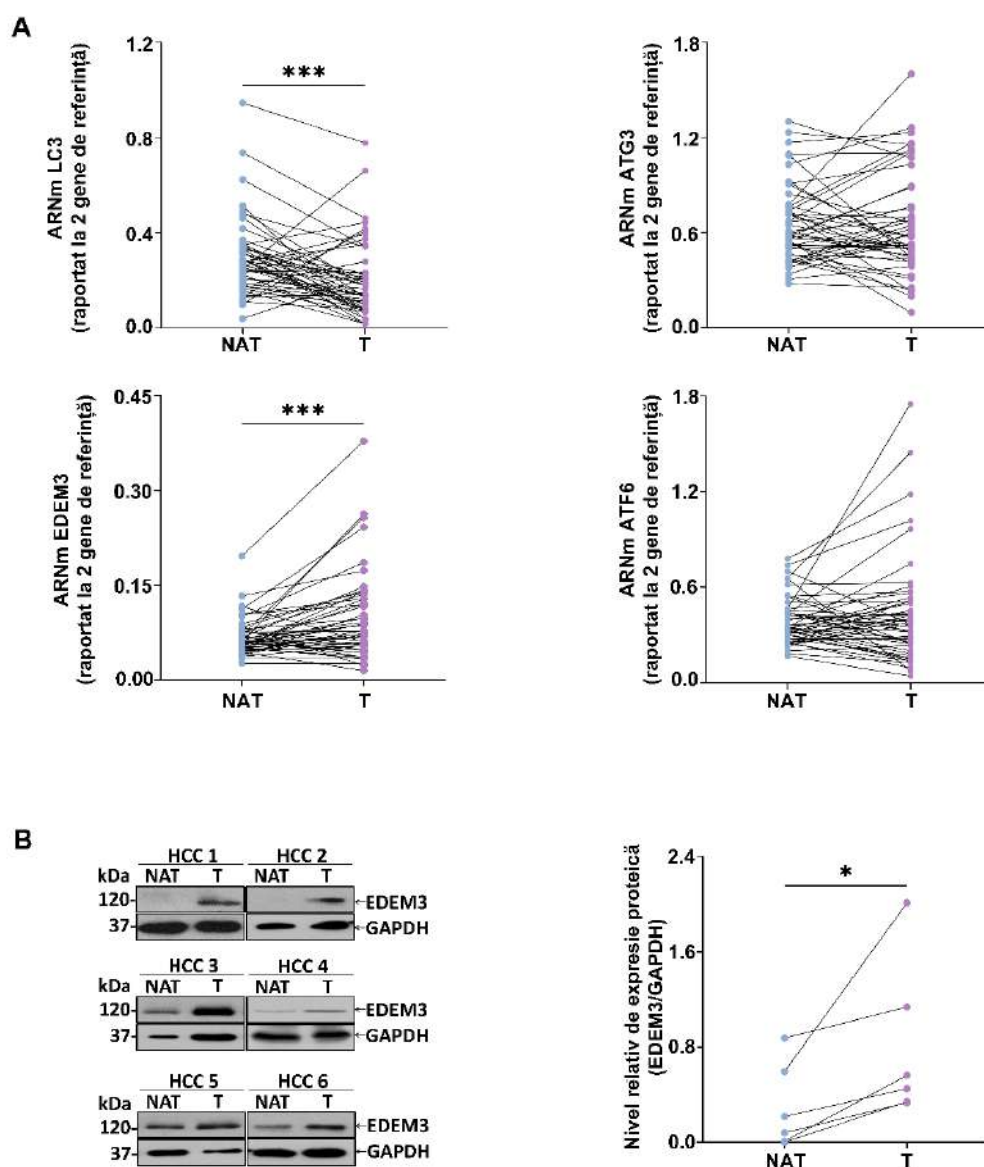


Figura 7. Nivelul de expresie a EDEM3 crește în probele de țesut tumoral la pacienții cu HCC.

(A) Nivelurile de expresie genică a LC3, ATG3, EDEM3 și ATF6 au fost analizate în țesuturi hepatice non-tumorale adiacente tumorii – NAT (n=50), respectiv țesuturi hepatice tumorale -T (n=50), prin RT-*real-time* qPCR și folosind formula de calcul $2^{-\Delta Ct}$. Normalizarea rezultatelor s-a realizat folosind 2 gene de referință, GAPDH și TBP. Analiza statistică s-a realizat folosind testul *t paired* (***, $p < 0.001$). (B) Evaluarea expresiei proteice a EDEM3 prin *Western blot* în 6 probe pereche de țesut hepatic, NAT și T. Probele au fost lizate și detectate cu anticorpi specifici. GAPDH a fost folosit drept control de încărcare. În imaginea din dreapta este reprezentată cuantificarea expresiei proteice, în care, analiza statistică s-a realizat folosind testul Student *t paired*. (*, $p < 0.05$).

Pentru a confirma aceste rezultate și în cazul pacienților cu HCC, a fost analizată baza de date GSE109211, care a inclus probe tumorale de la 21 de pacienți sensibili la sorafenib, respectiv 46 de pacienți rezistenți. Analiza datelor a indicat o creștere a transcriptului de EDEM3 la pacienții cu rezistență la sorafenib. Acest rezultat este în conformitate cu un studiu recent, care a raportat, de asemenea, faptul că profilul transcriptomic crescut al EDEM3 este asociat cu radiorezistența, în cancerul de prostată (Scott et al., 2022). Aceste date indică faptul că EDEM3 ar putea fi un potențial biomarker al rezistenței la terapie, ipoteză care necesită investigații suplimentare prin analiza mai multor probe de țesut și prin testarea culturilor primare tumorale (modele 2D sau 3D) provenite de la pacienți cu HCC care prezintă sensibilitate/rezistență la tratament.

Pentru a investiga rolul ERAD în HCC, am analizat genele exprimate diferențial (DEG) asociate cu ERAD, aparținând mai multor cohorte de secvențiere a întregului transcriptom. Datele obținute au sugerat implicarea a 10 gene (HSPA4, HSPA5, ERDJ3/DNAJB11, HYOU1, BAG2, CANX, SEC61A1, NEDD4, NPLOC4 și PSMD4), pe lângă EDEM3, în procesul de tumorigeneză. Nivelul de expresie a acestor gene asociate ERAD a fost semnificativ crescut în probele de țesut tumoral comparativ cu țesutul non-tumoral adiacent. Mai mult decât atât, probele tumorale din lotul de pacienți din TCGA-LIHC a putut fi împărțit în două clustere, pe baza expresiei celor 11 gene în: *high-ERAD* (toate genele supraexprimate) și *low-ERAD* (expresie scăzută a tuturor genelor). Analiza caracteristicilor clinico-patologice ale pacienților cu HCC pe baza acestei semnături a indicat faptul că grupul de pacienți din clusterul *high-ERAD* prezintă o rată de supraviețuire mai

mică, această semnătură fiind un factor de prognostic independent și de asemenea, rezistență la terapie.

Reducerea infiltratului imun de la nivelul micromediului tumoral (TME) a fost considerată una dintre principalele cauze ale chemorezistenței (Fu et al., 2019). Astfel, reducerea sistemului imun în clusterul *high-ERAD* indică faptul că acești pacienți pot avea un răspus redus la terapiile cu sorafenib și TACE.

CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE

În studiul de față a fost investigată calea de semnalizare ERAD în afecțiunile hepatice. În principal, au fost identificate mecanismele asociate RE, prin care EDEM3 intervine în ciclul de viață al VHB și în tumorigeneză. Profilul de expresie transcriptomic al EDEM3 este crescut în probele de țesut NAT infectate cu VHB, comparativ cu probele NAT neinfectate. Cu toate acestea, o creștere importantă a fost observată în probele tumorale comparativ cu cele non-tumorale. Aceste rezultate au condus la ipoteza implicării acestei molecule în dezvoltarea patologiilor hepatice cronice.

Mai mult decât atât, prin modularea expresiei EDEM3 în linia celulară HepaRG, a fost pus în evidență un rol important al acestei molecule în procesele de supraviețuire celulară. Prin supraexpresia de EDEM3 s-a observat o reducere a stresului de la nivelul RE și o reglare negativă a căii de semnalizare UPR. Totuși, datele au arătat o creștere semnificativă a procesului de autofagie secretorie și inhibarea procesului de degradare lizosomală. Această modulare a fluxului autofagic de către EDEM3 poate explica infecția virală crescută în linia HepaRG cu supraexpresie de EDEM3, rezultate obținute anterior în grupul nostru. La nivel molecular, aceste mecanisme sunt coordonate de axa de semnalizare EDEM3-Hrd1-Rheb-mTOR, care a fost evidențiată în acest studiu. Rezultatele au fost confirmate pe linia celulară cu depleție de EDEM3 generată, în care am observat prezența unui stres cronic la nivelul RE și inducerea mecanismului de apoptoză. Aceste rezultate indică faptul că EDEM3 are un rol protector asupra celulelor hepatice, astfel promovând probabil procesele pro-tumorale. Această ipoteză va fi investigată în studii viitoare prin modularea expresiei EDEM3 în celule hepatice tumorale și analiza proceselor de invazie, migrare, metastazare sau EMT.

În acest studiu a fost evaluată pentru prima dată, asocierea caracteristicile clinico-patologice ale pacienților cu HCC cu nivelul de expresie genică al EDEM3, în baze de date transcriptomice. Astfel, rezultatele au arătat faptul că pacienții cu expresie crescută de EDEM3 prezintă o rată de supraviețuire scăzută și rezistență la tratament cu sorafenib,

propunând EDEM3 ca un posibil biomarker al răspunsului la terapie. Această ipoteză va fi investigată în continuare, pe un lot prospectiv de pacienți cu HCC, care vor fi selectați pe baza mai multor aspecte clinico-patologice. În plus, o altă perspectivă a acestui studiu este investigarea rolului EDEM3 în dezvoltarea tumorilor HCC *in vivo*, prin testarea capacității celulelor tumorale cu expresie modulată de EDEM3 de a dezvolta tumori în modele murine. De asemenea, având vedere rezultatele obținute *in vitro*, țintirea directă a EDEM3 în celulele infectate sau tumorale, ar putea induce procese necrotice la nivelul ficatului prin activarea mecanismelor de stres la nivelul RE și de apoptoză. Așadar, abordarea unei reglări indirecte, care să restabilească profilul de expresie al EDEM3 similar condițiilor normale, va fi investigată.

Mai mult decât atât, în acest studiu, pe baza analizei transcriptomice a mai multor loturi de pacienți din baze de date publice, am identificat o semnătură de 11 gene asociate ERAD implicate în HCC. Aceste gene pot discrimina țesutul tumoral față de țesutul non-tumoral pe baza profilului de expresie, având un potențial rol în diagnosticul HCC. Prin metode de clusterizare nesupravegheată, cu ajutorul celor 11 gene, tumorile HCC au fost clasificate în *high-ERAD* și *low-ERAD*. Aceste clustere au influențat caracteristicile clinico-patologice ale pacienților cu HCC, astfel clusterul *high-ERAD* a fost asociat semnificativ cu un infiltrat imun scăzut, o creștere a markerilor EMT, a rezistenței la terapie și cu un prognostic redus. Aceste observații obținute *in silico* vor fi validate inițial la nivel proteomic prin experimente *in vitro* pe linii celulare hepatice tumorale tratate cu diferiți agenți anti-tumoral. În plus, vor fi investigate posibilitatea modulării nivelului de expresie al acestor molecule și efectul asupra sensibilității celulelor la tratament.

În concluzie, studiile viitoare pot conduce la deslușirea rolului pe care îl au aceste molecule în HCC și la posibilitatea utilizării lor drept biomarkeri sau ținte terapeutice. Identificarea efectelor modulării expresiei genice a celor 11 gene sau a inhibitorilor specifici în experimente pe culturi primare hepatice și modele murine, pot extinde înțelegerea mecanismului ERAD în patologia HCC.

Mulțumiri

În primul rând, aș dori să îmi exprim recunoștința conducătorului de doctorat, Dr. Norica Nichita pentru tema de cercetare, susținere și îndrumarea științifică pe parcursul acestor ani. Vă mulțumesc pentru oportunitatea desfășurării activităților științifice în cadrul Departamentului de Glicoproteine Virale, din cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române.

Aș dori să mulțumesc Dr. Simona Dima pentru îndrumare și pentru posibilitatea de a realiza experimente în cadrul Centrul de Excelență în Medicină Translațională (CEMT).

În continuare aș dori să mulțumesc Dr. Mihaela Uță pentru suportul moral și tehnic în vederea realizării experimentelor și pentru sprijinul constant. De asemenea, mulțumesc Dr. Șorop Andrei, Dr. Cătălin Lazăr, Dr. Olivia Dobrică și Dr. Petruța Alexandru pentru colaborare, discuțiile științifice și încurajările din timpul perioadei de doctorat.

Aș vrea să mulțumesc Dr. Daniela Lixandru și Dr. Costin-Ioan Popescu pentru posibilitatea implicării mele în cadrul proiectelor științifice și pentru sprijinul acordat. Totodată, mulțumesc tuturor colegilor din cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române pentru ajutor și suport, în special Dr. Livia Sima, Dr. Ana-Maria Pantazică, Drd. Ștefania Buzățoiu, Dr. Gabriela Chirițoiu, Dr. Lia Cucoș, Dr. Marioara Chirițoiu, Cristina Scurtu și doamnei tehnician Emilia Ardelean.

De asemenea, mulțumesc familiei și prietenilor pentru înțelegerea și încurajările de-a lungul acestor ani.

Listă lucrări publicate în cadrul temei de doctorat

1. **Ghionescu A.-V.***, Sorop A.*, Linioudaki E., Coman C., Savu L., Fogarasi M., Lixandru D., Dima S.O., A predicted epithelial-to-mesenchymal transition-associated mRNA/miRNA axis contributes to the progression of diabetic liver disease. *Scientific Reports*. **2024**. Acceptat spre publicare. **IF 3.8, Q1, AIS 1.059**
2. **Ghionescu A.-V.***, Sorop A.*, Dima S.O. The pivotal role of EMT-related noncoding RNAs regulatory axes in hepatocellular carcinoma. *Front Pharmacol*. **2023**. 14, 1270425, doi:10.3389/fphar.2023.1270425, **IF 4.4, Q1, AIS 0.961**

Lucrări în curs de publicare în cadrul temei de doctorat:

3. **Ghionescu A.-V.***, Uță M.*, Sorop A., Lazar C., Flintoaca-Alexandru P.R., Chiritoiu G., Sima L., Petrescu S.M., Dima S.O., Branza-Nichita N. The endoplasmic reticulum degradation-enhancing α -mannosidase-like protein 3 attenuates the unfolded protein response and has pro-survival and pro-viral roles in hepatoma cells and hepatocellular carcinoma patients. În revizie la jurnalul *Journal of Biomedical Science*. **IF 9.0, Q1, AIS 2.372**

Lucrări publicate în domeniul temei de doctorat:

4. Constantinescu D.R.*, Sorop A.*, **Ghionescu A.-V.***, Lixandru D., Herlea V., Bacalbasa N., Dima S.O. EM-transcriptomic signature predicts drug response in advanced stages of high-grade serous ovarian carcinoma based on ascites-derived primary cultures. *Front Pharmacol*. **2024**, 6;15:1363142. doi: 10.3389/fphar.2024.1363142. **IF 4.4, Q1, AIS 0.961**
5. Uță M., **Ghionescu A.**, Popa C., Nichita N., Coriu D. Investigation of Molecular Mechanisms Involved in Hepatitis B Virus Associated B-cell Non-Hodgkin Lymphoma (B-NHL). *Documenta Haematologica -Revista Romana de Hematologie*. **2023**, 1(2), doi: <https://doi.org/10.59854/dhrrh.2023.1.2.59>. **BDI**
6. Bucataru I.C., Dragomir I., Asandei A., Pantazica A.-M., **Ghionescu A.**, Branza-Nichita N., Park Y., Luchian T. Probing the Hepatitis B Virus E-Antigen with a Nanopore Sensor Based on Collisional Events Analysis. *Biosensors*. **2022**, 12(8):596, doi: 10.3390/bios12080596, **IF 4.9, Q1, AIS 0.765**

*prim autor cu contribuție egală

BIBLIOGRAFIE

- ADAMS, B. M., OSTER, M. E. & HEBERT, D. N. 2019. Protein Quality Control in the Endoplasmic Reticulum. *Protein J*, 38, 317-329.
- ARBUTHNOT, P. & KEW, M. 2001. Hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *Int J Exp Pathol*, 82, 77-100.
- BHATTACHARYA, A., SUN, S., WANG, H., LIU, M., LONG, Q., YIN, L., KERSTEN, S., ZHANG, K. & QI, L. 2018. Hepatic Sel1L-Hrd1 ER-associated degradation (ERAD) manages FGF21 levels and systemic metabolism via CREBH. *EMBO J*, 37.
- BHATTACHARYA, A., WEI, J., SONG, W., GAO, B., TIAN, C., WU, S. A., WANG, J., CHEN, L., FANG, D. & QI, L. 2022. SEL1L-HRD1 ER-associated degradation suppresses hepatocyte hyperproliferation and liver cancer. *iScience*, 25, 105183.
- BLUMBERG, B. S., GERSTLEY, B. J., HUNGERFORD, D. A., LONDON, W. T. & SUTNICK, A. I. 1967. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 66, 924-31.
- CAO, S. S. & KAUFMAN, R. J. 2012. Unfolded protein response. *Curr Biol*, 22, R622-6.
- CARVALHO, P., STANLEY, A. M. & RAPOPORT, T. A. 2010. Retrotranslocation of a misfolded luminal ER protein by the ubiquitin-ligase Hrd1p. *Cell*, 143, 579-91.
- CHEN, X. & CUBILLOS-RUIZ, J. R. 2021. Endoplasmic reticulum stress signals in the tumour and its microenvironment. *Nat Rev Cancer*, 21, 71-88.
- CHRISTIANSON, J. C., SHALER, T. A., TYLER, R. E. & KOPITO, R. R. 2008. OS-9 and GRP94 deliver mutant alpha1-antitrypsin to the Hrd1-SEL1L ubiquitin ligase complex for ERAD. *Nat Cell Biol*, 10, 272-82.
- CHU, J. Y. K., CHUANG, Y. C., TSAI, K. N., PANTUSO, J., ISHIDA, Y., SAITO, T. & OU, J. J. 2022. Autophagic membranes participate in hepatitis B virus nucleocapsid assembly, precore and core protein trafficking, and viral release. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 119, e2201927119.
- CLARKE, H. J., CHAMBERS, J. E., LINIKER, E. & MARCINIAK, S. J. 2014. Endoplasmic reticulum stress in malignancy. *Cancer Cell*, 25, 563-73.
- DUWAERTS, C. C. & MAIERS, J. L. 2021. ER Disposal Pathways in Chronic Liver Disease: Protective, Pathogenic, and Potential Therapeutic Targets. *Front Mol Biosci*, 8, 804097.
- DWEK, R. A. 1996. Glycobiology: Toward Understanding the Function of Sugars. *Chem Rev*, 96, 683-720.

- FRANCISCO, A. B., SINGH, R., LI, S., VANI, A. K., YANG, L., MUNROE, R. J., DIAFERIA, G., CARDANO, M., BIUNNO, I., QI, L., SCHIMENTI, J. C. & LONG, Q. 2010. Deficiency of suppressor enhancer Lin12 1 like (SEL1L) in mice leads to systemic endoplasmic reticulum stress and embryonic lethality. *J Biol Chem*, 285, 13694-703.
- FU, Y., LIU, S., ZENG, S. & SHEN, H. 2019. From bench to bed: the tumor immune microenvironment and current immunotherapeutic strategies for hepatocellular carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res*, 38, 396.
- GLICKMAN, M. H. & CIECHANOVER, A. 2002. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol Rev*, 82, 373-428.
- GONG, B., RADULOVIC, M., FIGUEIREDO-PEREIRA, M. E. & CARDOZO, C. 2016. The Ubiquitin-Proteasome System: Potential Therapeutic Targets for Alzheimer's Disease and Spinal Cord Injury. *Front Mol Neurosci*, 9, 4.
- GUAY, K. P., KE, H., CANNIFF, N. P., GEORGE, G. T., EYLES, S. J., MARIAPPAN, M., CONTESSA, J. N., GERSHENSON, A., GIERASCH, L. M. & HEBERT, D. N. 2023. ER chaperones use a protein folding and quality control glyco-code. *Mol Cell*, 83, 4524-4537 e5.
- HSU, Y. C., HUANG, D. Q. & NGUYEN, M. H. 2023. Global burden of hepatitis B virus: current status, missed opportunities and a call for action. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 20, 524-537.
- JI, F., ZHOU, M., SUN, Z., JIANG, Z., ZHU, H., XIE, Z., OUYANG, X., ZHANG, L. & LI, L. 2021. Integrative proteomics reveals the role of E3 ubiquitin ligase SYVN1 in hepatocellular carcinoma metastasis. *Cancer Commun (Lond)*, 41, 1007-1023.
- JIANG, Y., HAN, Q., ZHAO, H. & ZHANG, J. 2021. The Mechanisms of HBV-Induced Hepatocellular Carcinoma. *J Hepatocell Carcinoma*, 8, 435-450.
- LAZAR, C., MACOVEI, A., PETRESCU, S. & BRANZA-NICHITA, N. 2012. Activation of ERAD pathway by human hepatitis B virus modulates viral and subviral particle production. *PLoS One*, 7, e34169.
- LAZAR, C., UTA, M., PETRESCU, S. M. & BRANZA-NICHITA, N. 2017. Novel function of the endoplasmic reticulum degradation-enhancing alpha-mannosidase-like proteins in the human hepatitis B virus life cycle, mediated by the middle envelope protein. *Cell Microbiol*, 19.
- LI, Y., XIA, Y., CHENG, X., KLEINER, D. E., HEWITT, S. M., SPROCH, J., LI, T., ZHUANG, H. & LIANG, T. J. 2019. Hepatitis B Surface Antigen Activates

- Unfolded Protein Response in Forming Ground Glass Hepatocytes of Chronic Hepatitis B. *Viruses*, 11.
- LIN, Y. & LUBMAN, D. M. 2024. The role of N-glycosylation in cancer. *Acta Pharm Sin B*, 14, 1098-1110.
- LIN, Y., ZHAO, Z., HUANG, A. & LU, M. 2020. Interplay between Cellular Autophagy and Hepatitis B Virus Replication: A Systematic Review. *Cells*, 9.
- LIU, L., LONG, H., WU, Y., LI, H., DONG, L., ZHONG, J. L., LIU, Z., YANG, X., DAI, X., SHI, L., REN, M. & LIN, Z. 2018. HRD1-mediated PTEN degradation promotes cell proliferation and hepatocellular carcinoma progression. *Cell Signal*, 50, 90-99.
- LIU, Y., TAO, S., LIAO, L., LI, Y., LI, H., LI, Z., LIN, L., WAN, X., YANG, X. & CHEN, L. 2020. TRIM25 promotes the cell survival and growth of hepatocellular carcinoma through targeting Keap1-Nrf2 pathway. *Nat Commun*, 11, 348.
- MAIERS, J. L. & MALHI, H. 2019. Endoplasmic Reticulum Stress in Metabolic Liver Diseases and Hepatic Fibrosis. *Semin Liver Dis*, 39, 235-248.
- MAUTHE, M., ORHON, I., ROCCHI, C., ZHOU, X., LUHR, M., HIJLKEMA, K. J., COPPES, R. P., ENGEDAL, N., MARI, M. & REGGIORI, F. 2018. Chloroquine inhibits autophagic flux by decreasing autophagosome-lysosome fusion. *Autophagy*, 14, 1435-1455.
- OLZMANN, J. A., KOPITO, R. R. & CHRISTIANSON, J. C. 2013. The mammalian endoplasmic reticulum-associated degradation system. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 5.
- PENEAU, C., IMBEAUD, S., LA BELLA, T., HIRSCH, T. Z., CARUSO, S., CALDERARO, J., PARADIS, V., BLANC, J. F., LETOUZE, E., NAULT, J. C., AMADDEO, G. & ZUCMAN-ROSSI, J. 2022. Hepatitis B virus integrations promote local and distant oncogenic driver alterations in hepatocellular carcinoma. *Gut*, 71, 616-626.
- RABANAL-RUIZ, Y., OTTEN, E. G. & KOROLCHUK, V. I. 2017. mTORC1 as the main gateway to autophagy. *Essays Biochem*, 61, 565-584.
- RADHAKRISHNAN, S. K., DEN BESTEN, W. & DESHAIES, R. J. 2014. p97-dependent retrotranslocation and proteolytic processing govern formation of active Nrf1 upon proteasome inhibition. *Elife*, 3, e01856.
- RUTKOWSKI, D. T. & KAUFMAN, R. J. 2007. That which does not kill me makes me stronger: adapting to chronic ER stress. *Trends Biochem Sci*, 32, 469-76.

- SAXTON, R. A. & SABATINI, D. M. 2017. mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell*, 168, 960-976.
- SCOTT, E., GARNHAM, R., CHEUNG, K., DUXFIELD, A., ELLIOTT, D. J. & MUNKLEY, J. 2022. Pro-Survival Factor EDEM3 Confers Therapy Resistance in Prostate Cancer. *Int J Mol Sci*, 23.
- SEEGER, C. & MASON, W. S. 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64, 51-68.
- SEEGER, C. & MASON, W. S. 2015. Molecular biology of hepatitis B virus infection. *Virology*, 479-480, 672-86.
- STEFANI, I. C., WRIGHT, D., POLIZZI, K. M. & KONTORAVDI, C. 2012. The role of ER stress-induced apoptosis in neurodegeneration. *Curr Alzheimer Res*, 9, 373-87.
- TAX, G., LIA, A., SANTINO, A. & ROVERSI, P. 2019. Modulation of ERQC and ERAD: A Broad-Spectrum Spanner in the Works of Cancer Cells? *J Oncol*, 2019, 8384913.
- TSAI, Y. C. & WEISSMAN, A. M. 2010. The Unfolded Protein Response, Degradation from Endoplasmic Reticulum and Cancer. *Genes Cancer*, 1, 764-778.
- TSUKUDA, S. & WATASHI, K. 2020. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res*, 182, 104925.
- VEMBAR, S. S. & BRODSKY, J. L. 2008. One step at a time: endoplasmic reticulum-associated degradation. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 9, 944-57.
- WANG, J., LI, J., WU, J., DONG, M., SHEN, Z., LIN, Y., LI, F., ZHANG, Y., MAO, R., LU, M. & ZHANG, J. 2019. Host Gene SEL1L Involved in Endoplasmic Reticulum-Associated Degradation Pathway Could Inhibit Hepatitis B Virus at RNA, DNA, and Protein Levels. *Front Microbiol*, 10, 2869.
- WANG, X., WEI, Z., CHENG, B., LI, J., HE, Y., LAN, T., KEMPER, T., LIN, Y., JIANG, B., JIANG, Y., MENG, Z. & LU, M. 2022. Endoplasmic reticulum stress promotes HBV production by enhancing use of the autophagosome/multivesicular body axis. *Hepatology*, 75, 438-454.
- WEI, J. & FANG, D. 2021. Endoplasmic Reticulum Stress Signaling and the Pathogenesis of Hepatocarcinoma. *Int J Mol Sci*, 22.
- WEI, X., YANG, M., PAN, B., ZHANG, X., LIN, H., LI, W., SHU, W., WANG, K., KHAN, A. R., ZHANG, X., CEN, B. & XU, X. 2022. Proteomics-based identification of the role of osteosarcoma amplified-9 in hepatocellular carcinoma recurrence. *Hepatol Commun*, 6, 2182-2197.

- XIA, Y. & GUO, H. 2020. Hepatitis B virus cccDNA: Formation, regulation and therapeutic potential. *Antiviral Res*, 180, 104824.
- YAMASAKI, S., YAGISHITA, N., SASAKI, T., NAKAZAWA, M., KATO, Y., YAMADERA, T., BAE, E., TORIYAMA, S., IKEDA, R., ZHANG, L., FUJITANI, K., YOO, E., TSUCHIMUCHI, K., OHTA, T., ARAYA, N., FUJITA, H., ARATANI, S., EGUCHI, K., KOMIYA, S., MARUYAMA, I., HIGASHI, N., SATO, M., SENOO, H., OCHI, T., YOKOYAMA, S., AMANO, T., KIM, J., GAY, S., FUKAMIZU, A., NISHIOKA, K., TANAKA, K. & NAKAJIMA, T. 2007. Cytoplasmic destruction of p53 by the endoplasmic reticulum-resident ubiquitin ligase 'Synoviolin'. *EMBO J*, 26, 113-22.
- ZHANG, J., GUO, J., YANG, N., HUANG, Y., HU, T. & RAO, C. 2022. Endoplasmic reticulum stress-mediated cell death in liver injury. *Cell Death Dis*, 13, 1051.
- ZHANG, K. & KAUFMAN, R. J. 2006. Protein folding in the endoplasmic reticulum and the unfolded protein response. *Handb Exp Pharmacol*, 69-91.
- ZHANG, L., AFOLABI, L. O., WAN, X., LI, Y. & CHEN, L. 2020. Emerging Roles of Tripartite Motif-Containing Family Proteins (TRIMs) in Eliminating Misfolded Proteins. *Front Cell Dev Biol*, 8, 802.
- ZHANG, T., KHO, D. H., WANG, Y., HARAZONO, Y., NAKAJIMA, K., XIE, Y. & RAZ, A. 2015. Gp78, an E3 ubiquitin ligase acts as a gatekeeper suppressing nonalcoholic steatohepatitis (NASH) and liver cancer. *PLoS One*, 10, e0118448.