



ACADEMIA ROMÂNĂ
INSTITUTUL DE BIOCHIMIE

Teză de doctorat

REZUMAT

**Interacția dintre proteinele structurale și cele
nonstructurale ale Virusului Hepatitei C
și aplicații biomedicale**

Coordonator științific:

Dr. Andrei Jose Petrescu

Candidat:

Drd. Ovidiu Constantin Vlaicu

București, 2018

Cuprins

Cuprins	2
Obiectivele cercetării	3
Capitolul 1. Aspecte teoretice despre VHC	4
1.1 Structura și ciclul de viață al Virusului Hepatitei C	4
1.2 Rolul fosfatidilinositidelor în ciclul de viață al VHC	6
1.3 Sisteme de complementare pentru VHC	6
Capitolul 3. Repliconi subgenomici și sisteme de <i>trans</i>-complementare pentru studiul ciclului de viață al VHC	7
3.1 Validarea funcțională prin IP a diferitelor genoame ale VHC care prezintă inserții potrivite în proteinele virale NS2 și NS5A, utilizate în identificarea de proteinelor endogene implicate	7
3.2 Dezvoltarea unui sistem de <i>trans</i> -complementare pentru imagistica în timp real a proteinelor virale core și NS5A	9
3.3 Validarea sistemului de <i>trans</i> -complementare pentru analiza dinamicii proteinei NS5A în diferite etape din ciclul de viață al VHC	12
Capitolul 4. Identificarea PI3KC2 ca un reglator pentru ciclul de viață al VHC	14
4.1 Izoformele PI3K clasa II sunt implicate în ciclul de viață al VHC	14
4.2 Regiunea N-terminală a PI3KC2α este implicată în procesele de asamblare/secreție a VHC	18
Capitolul 5. Discuții	22
Lista publicațiilor și participărilor la conferințe științifice	26
Mulțumiri	28
Referințe	29

Obiectivele cercetării

Infecția cu VHC constituie o provocare din punct de vedere medical și reprezintă o problemă de sănătate publică la scară largă având în vedere că peste 170 de milioane de oameni sunt infectați cu acest virus pe plan mondial. Astfel, înțelegerea mecanismelor moleculare de interacțiune între virus și gazdă sunt importante pentru identificarea de ținte noi de tratament al cancerului hepatic indus de către VHC și noi factori de prognostic ai patologiei hepatice.

Această teză își propune să optimizeze tehnici de identificare a factorilor endogeni implicați în diversele etape ale ciclului de viață al VHC. Pentru aceasta voi folosi cromatografia de afinitate AP (engl. *affinity purification*) urmată de analiza de spectrometrie de masă (AP-MS) și determinarea interactomului endogen pentru diferite proteine virale implicate în morfogeneza VHC, cum ar fi NS2 și NS5A. .

Primul obiectiv al tezei va fi construirea de virusuri recombinante funcționale cu inserții potrivite pentru AP în poziții permissive din structura acestor proteine virale. Virusurile recombinante vor fi utilizate pentru caracterizarea interactorilor endogeni ai proteinelor virale într-un sistem de cultură celulară care produce virioni infecțioși.

Al doilea obiectiv al tezei va fi realizarea unui sistem inductibil de *trans*-complementare pentru proteina de capsidă a VHC care va permite separarea temporară a etapei de replicare de cea de asamblare a VHC. Se va selecta o o linie celulară stabilă și inductibilă pentru proteina de capsidă în scopul identificării complexelor proteine virale-proteine endogene dar și în scopul imagisticii în timp real a proteinelor virale NS5A și core.

Al treilea obiectiv al tezei este validarea și caracterizarea funcțională a factorilor endogeni identificați anterior prin AP-MS. Imi voi concentra eforturile pe proteine implicate în metabolismul lipidic deoarece homeostazia lipidelor este esențială în patologia hepatică.

Capitolul 1 Aspecte teoretice despre Virusul Hepatitei C

1.1 Structura și ciclul de viață al Virusului Hepatitei C

Infecția cu virusul Hepatitei C (VHC) constituie o problemă serioasă de sănătate publică, afectând între 170-200 de milioane de oameni din întreaga lume. Pe termen lung, acesta poate determina steatoză, fibroză hepatică, ciroză și carcinom hepatocelular (Levrero, 2006). Descoperit în 1989 (Choo *et al.*, 1989), VHC face parte din familia *Flaviviridae*. Genomul său este alcătuit dintr-o catenă de ARN cu polaritate pozitivă. Familia *Flaviviridae* are trei genuri: Flavivirus (Virusul Febrei Galbene, west Nile și Virusul Dengue), Pestivirus (Virusul Diareei Bovine, Virusul Pestei Porcine Clasice) și Hepacivirus. Împreună cu VHG (Virusul Hepatitei G), VHC face parte din genul *Hepacivirus* (Kapour, 2011).

Infecția cu VHC afectează metabolismul lipidic și în special homeostazia colesterolului (Popescu *et al.*, 2014). Asocierea VHC cu modificări ale metabolismului lipidic prezintă anumite particularități în clinică. În biopsii de ficat ale pacienților infectați cu VHC se observă o creștere a lipidelor neutre în citoplasma hepatocitului. De asemenea, infecția virală este asociată cu steatoză hepatică, apariția frecventă a hipobetalipoproteinemiei și reducerea colesterolului în sângele circulant (Rodgers *et al.*, 2012). Tratamentul cu interferon- α și ribavirină echilibrează nivelul de colesterol și lipoproteine din serul pacienților infectați cu virus (Corey *et al.*, 2009). Virusul purificat din serul pacienților infectați prezintă o densitate mică a virionilor dar și o asociere a acestora cu apolipoproteinele (André *et al.*, 2002). 25 de ani de cercetări în domeniul VHC au clarificat unele mecanisme moleculare virale, printre care și asocierea virusului cu metabolismul lipidic (Popescu *et al.*, 2011). Dezvoltarea unui sistem de culturi celulare care permite replicarea și asamblarea virusului *in vitro*, a condus la înțelegerea implicării lipidelor în ciclul de viață al VHC (Lindenbach *et al.*, 2005).

Înainte de dezvoltarea unui sistem de culturi celulare care să permită studiul *in vitro* al virusului, cercetătorii au caracterizat virionii pornind de la izolate virale ale pacienților infectați cronic sau modele animale, ca de exemplu cimpanzeul. Studiile în gradient de sucroză au arătat că particula virală are o densitate mică, cuprinsă între 1.03 g/cm³ și 1.2 g/cm³ iar densitatea particulei este invers proporțională cu infecțiozitatea acesteia (Pumeechockchai *et al.*, 2002). Sistemul de culturi celulare a permis purificarea particulelor VHC și caracterizarea acestora.

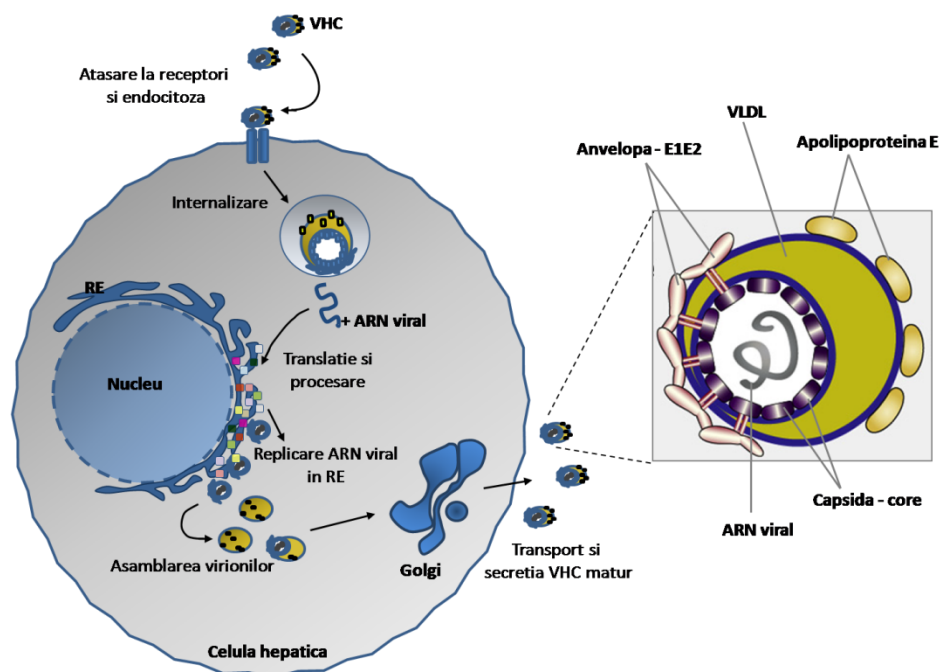


Figura 1. Ciclul de viață și structura VHC. Particula lipovirală se atașează de receptorii specifici prezenți la suprafața celulei hepatice și se internalizează printr-un proces de endocitoză mediat de clatrină. Acidifierea endozomului determină eliberarea ARN viral în citoplasmă. Ribozomii celulei gazdă recunosc ARN viral și încep să-l traducă la nivelul RE. În urma translației se formează o poliproteină virală care va fi scindată proteolitic în zece proteine virale distincte. Proteinele virale intervin direct în replicarea și asamblarea virusului ajutate indirect de către cele celulare. Atât replicarea cât și asamblarea VHC au loc la nivelul RE. Particulele virale sunt transportate și secretate de aparatul Golgi și eliberate în mediul extracelular unde se pot atașa la o altă celulă hepatică. Din punct de vedere structural, particula lipovirală prezintă o parte lipidică alcătuită din VLDL și anumite proteine specifice printre care și ApoE. Componenta virală propriu-zisă prezintă o anvelopă virală formată din glicoproteinele E1E2 și o nucleocapsidă alcătuită din proteina core și ARN viral (Adaptată după Dubuisson and Cosset, 2014).

Particulele VHC prezintă un diametru de 50-80 nm (Catanese, Loureiro, *et al.*, 2013), fiind constituite dintr-o singură catenă de polaritate pozitivă de ARN. Molecula de ARN împreună cu proteina de capsidă (proteina core) a virusului formează nucleocapsida (Vieyres, Dubuisson and Pietschmann, 2014). Aceasta este înconjurată de o membrană lipidică, numită anvelopă virală, la nivelul căreia sunt ancorate glicoproteinele virale de anvelopă E1 și E2 (Vieyres, Dubuisson and Pietschmann, 2014). O particularitate a VHC este aceea că în timpul asamblării, virionii se asociază cu apolipoproteine, cum sunt apoE, apoB, apoA1, apoC1, apoC2 și apoC3 (André *et al.*, 2002). Studiile realizate în sisteme de cultură celulară au evidențiat prezența în compoziția VHC a VLDL (eng. *very low density lipoproteins*) și LDL (eng. *low density lipoproteins*) împreună cu esterii ai colesterolului (Merz *et al.*, 2011) (Figura 1).

Glicoproteinele de anvelopă ale VHC reprezintă determinanții majori în internalizarea virionului (Dubuisson and Cosset, 2014). Acestea sunt implicate în legarea de receptor și mediază procesul de fuziune dintre anvelopa virală și membrana celulară a endozomului.

1.2 Rolul fosfatidilinositidelor în ciclul de viață al VHC

Replicarea dar și asamblarea VHC sunt dependente de metabolismul lipidic și în particular de acumularea LD în celulele hepatice. Fosfoinozitidele (PI) reprezintă o clasă de fosfolipide localizate în diferite membrane iar nivelul acestora de expresie este reglat de către kinaze, respectiv fosfataze specifice. PI sunt implicate în majoritatea proceselor celulare, cum ar fi formarea citoscheletului celular, citokineza, formarea lumenului RE dar și în mecanismele care implică reglarea transcripțională. PI sunt derivați fosforilați ai fosfatidilinositol. Fosforilarea și defosforilarea PI este mediată de diferite kinaze sau fosfataze, distribuite specific la nivelul celulei, care determină direcționarea acestora în diferitele compartimente celulare. Procesul de formare a diferitelor PI (mono-, di-, trifosfat), la nivelul celulei mamaliene, este mediat de 19 kinaze respectiv 28 de fosfataze (Balla, 2013). PI sunt mesageri secundari responsabili de transmiterea și propagarea semnalului de la receptorii celulari către proteinele efectoare, inducând astfel răspunsul celulei la un anumit stimul. PI interacționează cu proteinele efectoare prin intermediul domeniilor de legare specifică, permițând interacția cu diferitele membrane și determinând astfel reglarea răspunsului indus de către stimul (Kutateladze, 2010). Un alt rol al PI este cel de reglatori spațio-temporali al câtorva proteine implicate în traficul vezicular (cum ar fi PI4P și PI3P), rearanjarea citoscheletului [PI(4,5)P2], controlul polarității, migrarea, proliferarea și diferențierea celulară [PI(3,4)P2, PI(3,4,5)P3] (Brachmann *et al.*, 2005).

1.3 Sisteme de complementare pentru VHC

Complementarea este un mecanism genetic care apare în mod natural la virusuri determinând salvarea (engl. *rescue*) funcțională a genoamelor defective sau mutante. Datorită dezvoltării tehnicilor de biologie moleculară și a sistemelor de culturi celulare, a fost posibilă adaptarea acestui fenomen pentru studiile *in vitro*. În experimentele convenționale, care

presupun complementarea unui genom defectiv sau a unei proteine, s-a reușit salvarea prin intermediul genomului "sălbatic" (engl. *wild type* - wt). În virusologie, complementarea este o unealtă genică folosită pentru a investiga funcționalitatea unei proteine sau replicarea și asamblarea particulelor virale. De asemenea, acest mecanism constituie un model pentru construirea de virusuri defective, care nu prezintă anumite proteine virale.

O particularitate a familiei *Flaviviridae* o reprezintă replicarea ARN viral în compartimente veziculate ("*membranous web*") induse de către proteinele virale. Mai mult decât atât, o serie de virusuri care au genom ARN pozitiv, cum ar fi *Picornaviridae*, *Alphaviridae*, *Coronaviridae* și *Flaviviridae* care au capacitatea de a asambla particulele virale prin expresia proteinelor structurale *in trans*, independent de proteinele care intervin în replicarea moleculelor de ARN viral (Puig-Basagoiti *et al.*, 2005). Aceste particule virale secretate sunt capabile de o singură rundă de infecție. De asemenea, acest sistem de *trans*-încapsidare poate fi utilizat și în producerea de vaccinuri (Zhou *et al.*, 2011).

În concluzie, sistemele de *trans*-complementare care pentru proteinele VHC au arătat următoarele aspecte:

- mutațiile din anumite zone ale proteinei NS5A sau întreaga deleție a domeniului III pot fi complementate de secvența NS3-5B;
- proteina NS2 poate fi *trans*-complementată de către omologul său wt;
- proteina de capsidă a VHC poate fi *trans*-complementată de către forma wt, cu precizarea faptului că pozițiile 170 și 174-177 din structura proteinei sunt înalt conservate;

Capitolul 3 Repliconi subgenomici și sisteme de *trans*-complementare pentru studiul ciclului de viață al VHC

3.1 Validarea funcțională prin IP a diferitelor genoame ale VHC, care prezintă inserții potrivite în proteinele virale NS2 și NS5A, utilizate în identificarea de proteine endogene implicate în ciclul de viață al VHC

Pentru a investiga interacțiunea dintre proteinele celulare și cele nonstructurale ale VHC, mai multe grupuri de cercetători au optat pentru expresia proteinelor virale într-un sistem heterogen, urmat de purificarea complexelor prin AP-MS sau analiza dublu hibrid (engl. *two-*

hibrid analysis) (Ramage *et al.*, 2015). Avantajul utilizării acestor sisteme constă în creșterea probabilității de a identifica interactori direcți ai proteinelor virale însă, pe de altă parte, relevanța biologică este limitată. Utilizarea sistemul de culturi celulare pentru VHC permite identificarea factorilor endogeni implicați în special în etapele de asamblare și secreție ale virusului.

Deoarece etapele târzii din ciclul de viață al VHC sunt mai puțin cunoscute, interesul pentru proteinele virale NS2 și NS5A, care sunt esențiale procesului de asamblare, este prioritar. Prin tehnici de biologie moleculară, au fost introduse inserții viabile de tip AP (engl. *affinity purification*) în poziții permissive din structura a două proteine virale (NS2 și NS5A). Impreună cu alte grupuri de cercetare, am observat că regiunea N-terminală a proteinei NS2 permite introducerea inserțiilor ceea ce conduce la investigarea amănunțită a procesului de asamblare al VHC (Stapleford KA și colab., 2011). Astfel, am putut insera o secvență de HA și una de StrepII pentru a crea virusul JFH-1^{HAStrepNS2} (HSNS2). Pentru proteina NS5A, am folosit datele raportate anterior în literatura de specialitate, care au demonstrat că o deleție compensatorie de 40 de aminoacizi din domeniul III al proteinei virale și o inserție de tip FLAG-Strep-Strep sunt optime pentru funcționalitatea genomului JFH-1^{FLAGstrepstrepNS5A} (FSSNS5A) (Gottwein *et al.*, 2011) (Figura 2A). Funcționalitatea acestor genoame virale modificate (HSNS2 și FSSNS5A) a fost testată, în sistemul nostru de studiu al VHC, prin comparație cu genomul viral JFH-1^{wt} (CSA4) (Figura 2B). Rezultatele funcționale de infectivitate au demonstrat că ambele genoame virale, la nivelul cărora s-au introdus inserții, sunt comparabile, din punct de vedere al titrului viral, cu controlul (CSA4).

Pentru a valida utilitatea virusurilor recombinante în determinarea interacțiilor proteine celulare-virale, celule Huh-7 au fost electroporate cu ARN viral iar la 72-96h post-electroporare s-a realizat liza celulară. Lizatele celulare au fost supuse tehnicii de IP prin AP urmată de analiza WB, în vederea identificării interactorilor virali (Figura 2D). Astfel, proteina virală NS2 a reușit să formeze complexe proteice cu alte proteine ale VHC printre care E2 și NS3, așa cum a fost descris anterior (Popescu *et al.*, 2011; Stapleford and Lindenbach, 2011). Deleția compensatorie de 40 de aminoacizi din proteina NS5A a determinat migrarea mai rapidă a proteinei în gelul de PAA, după cum se poate observa în figura 2C, iar eficiența tehnicii de IP a fost demonstrată prin lipsa acestei forme în lizatul post-IP (Figura 2C).

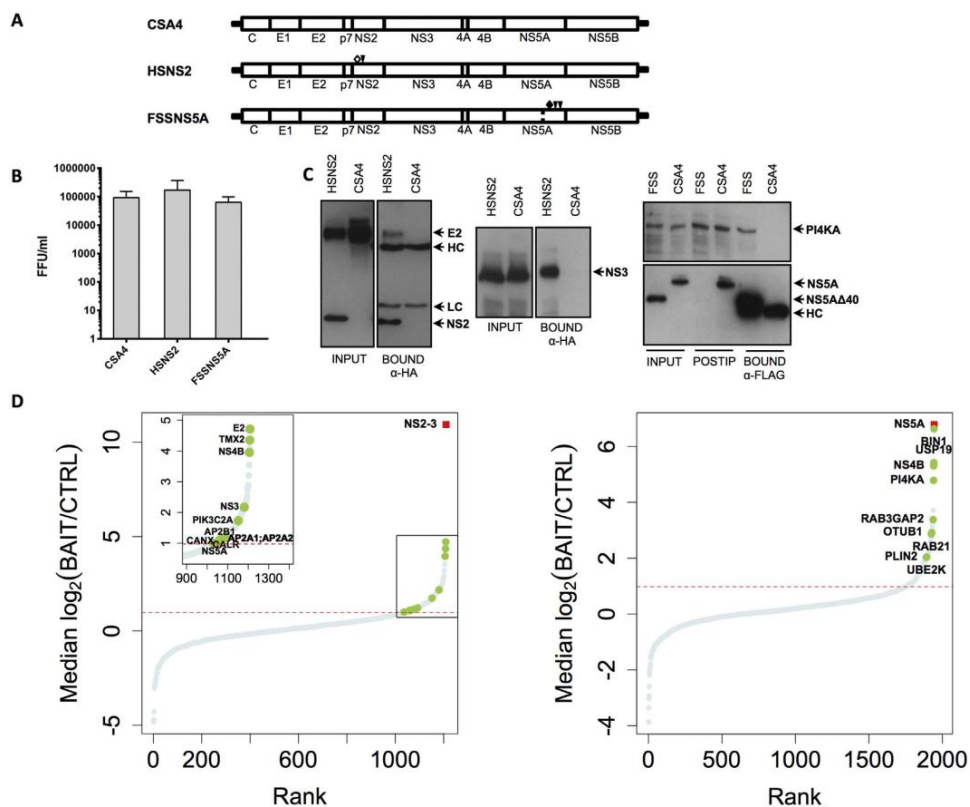


Figura 2. Interactorii pentru proteinele virale NS2 și NS5A. A) Reprezentare schematică a ARN viral JFH-1 care prezintă diferite inserții în proteinele virale NS2 și NS5A (HA- romb alb; StrepII- săgeată neagră; FLAG- romb negru). B) Determinarea prin FFU a titrului extracelular în celule Huh-7 electroporate cu diferite ARN viral. C) Analiza lizatelor celulare imunoprecipitate cu diferiți anticorpi (anti-HA, anti-FLAG) urmată de detecția prin WB a diferitelor proteine (E2, NS2, NS3, NS5A, PI4KA). D) Reprezentare S-plot a interactorilor identificați prin LC-MS/MS pentru proteinele virale NS2 și NS5A. LC- IgG lanț ușor; HC- IgG lanț greu; Linia întreruptă - pragul de detecție; pătratul roșu – proteina virală cu care s-au imunoprecipitat complexe proteice; bulinele verzi – principalele proteine endogene identificate prin LC-MS/MS; bulinele albastre – alte proteine endogene identificate prin LC-MS/MS. (După Vlaicu *et al.*, 2017)

3.2 Dezvoltarea unui sistem de *trans*-complementare pentru imagistica în timp real a proteinelor virale core și NS5A

Pentru a înțelege mai clar natura interacției virus-celulă gazdă, am dezvoltat un sistem prin care se pot identifica complexe proteine virale-proteine endogene, în probe de celule vii sau fixate. Astfel, pentru imagistica în timp real a proteinelor NS5A și core, am adaptat un sistem de *trans*-complementare pentru repliconii subgenomici core defectivi. Raționamentul prin care am ales imagistica în timp real a proteinei NS5A ține de implicarea acesteia într-un complex multifuncțional prin care VHC dezvoltă un mecanism împotriva terapiei anti-virale. Mecanismul

de rezistență a proteinei NS5A împotriva terapiei anti-virale precum și interacția acesteia cu alte proteine și implicit dinamica complexelor virus-proteine celulare au fost postulate în literatura de specialitate (Chukkapalli *et al.*, 2015). Cea de-a doua proteină virală a căreia i-am urmărit dinamica este proteina core deoarece, în timpul asamblării VHC, aceasta interacționează cu proteina NS5A (Masaki *et al.*, 2008). Astfel, am construit repliconi subgenomici core defectivi (Δ core) care prezintă inserții de tip EGFP în proteina NS5A (EGFPNS5A) sau genoame virale care posedă inserții de TC în proteina core dar și EGFP în NS5A (TCcoreEGFPNS5A). Mai mult decât atât, pentru sistemul de *trans*-complementare am fuzionat, într-un ADN plasmidic, doar proteina core cu un insert de TC susceptibil la marcarea fluorescentă *in vivo* a celulelor transfectate (Eyre *et al.*, 2014). Inițial am verificat expresia proteinei TCcore (pcDNA4-TCcore) comparativ cu proteina core (pcDNA4-core), prin transfecție în celule Huh-7. Expresia proteinei TCcore a fost detectată prin WB, la 24h post-transfecție, cu anticorpi anti-core, iar în figura 3B se poate observa diferența de masă moleculară dintre proteina fuzionată și cea wt (Figura 3B).

Scopul inițial al sistemului de *trans*-complementare pentru proteina TCcore a fost acela de a dezvolta o linie celulară stabilă și inductibilă pentru proteina fuzionată (TCcore) dar din păcate nicio clonă celulară nu a prezentat expresie proteică. Astfel, toate experimentele de imagistică în real pentru proteina TCcore au fost realizate în sistem de expresie tranzient. Cum se poate observa în figura 3C infectivitatea particulelor virale secretate de către celulele electroporate cu JFH-1^{TCcoreEGFPNS5A} este comparativă atât cu genomul CSA4 cât și cu JFH-1^{EGFPNS5A} ceea ce demonstrează că cele două inserții nu afectează ciclul de viață al virusului și funcționalitatea particulelor virale.

Cuantificarea producției de VHCtcp a presupus electroporarea celulelor Huh-7 cu repliconul JFH-1 ^{Δ coreEGFPNS5A} urmat de transfecție, la 48 de ore post-electroporare, cu vectorul pcDNA4^{TCcore}. La 72 de ore post-transfecție mediul celular a fost recoltat și s-a titrat infectivitatea virusului prin tehnica FFU (Figura 3C dreapta). După cum se poate observa în figura 3C, celulele transfectate cu proteina de capsidă a virusului, au reușit să secrete VHCtcp, comparativ cu cele transfectate cu ADN plasmidic martor. Acest experiment demonstrează faptul că transfecția tranzitorie poate fi utilizată ca un sistem de *trans*-complementare pentru imagistica în timp real a proteinei NS5A în timpul replicării (transfecție cu ADN plasmidial control) sau asamblării virusului (transfecție cu pcDNA4^{TCcore}).

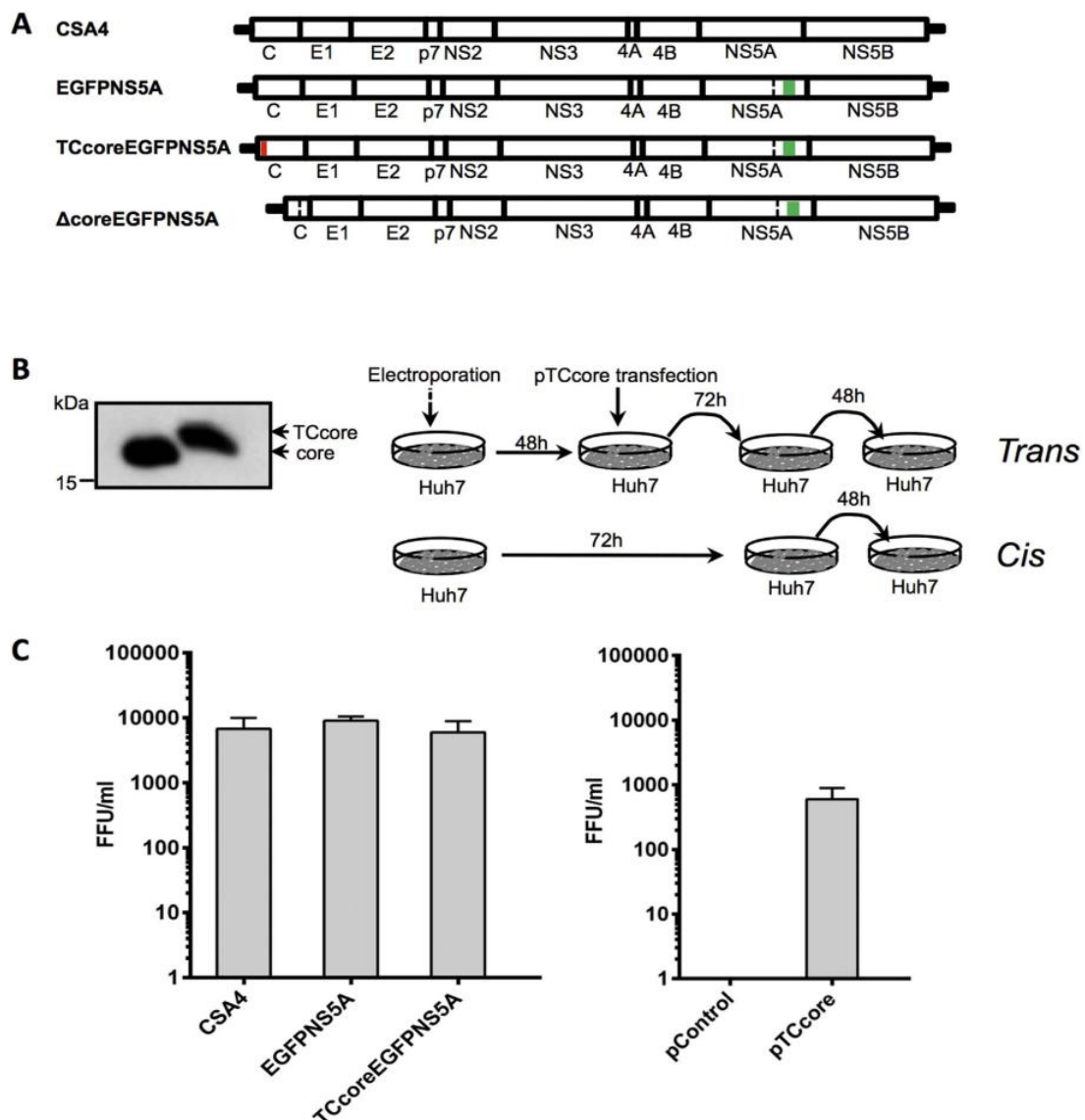


Figura 3. Sistemul de *trans*-complementare al proteinei TCcore pentru imagistica în timp real. A) Reprezentare schematică a genoamelor virale (CSA4, EGFNS5A, TCcoreEGFNS5A) sau a repliconilor subgenomici (Δ coreEGFNS5A) care prezintă diferite inserții în proteina core și NS5A (EGFP- bară verde, TC- bară roșie). B) Analiza prin WB a expresiei proteinei core în celule Huh-7 transfectate cu pcDNA4-core sau pcDNA4-TCcore (stânga). Reprezentarea schematică a determinării titrului extracelular în sistemului de *cis*- și *trans*-complementare pentru proteina TCcore (dreapta). Celule Huh-7 au fost electroporate cu genoame virale (CSA4, EGFNS5A, TCcoreEGFNS5A) iar la 72h post-electroporare , a fost determinat titrul extracelular (*cis*). Celule Huh-7 au fost electroporate cu repliconul subgenomic Δ coreEGFNS5A iar la 48h post-electroporare, celulele au fost transfectate cu pcDNA4 (pControl) sau pcDNA4-TCcore (pTCcore). Determinarea titrului extracelular s-a realizat la 72h post-transfecție (*trans*). D) Cuantificarea titrului extracelular în sistemul de *cis*-complementare (stânga) și *trans*-complementare (dreapta). (După Vlaicu *et al.*, 2017)

3.3 Validarea sistemului de *trans*-complementare pentru analiza dinamicii proteinei NS5A în diferite etape din ciclul de viață al VHC

După verificarea funcționalității sistemului de *trans*-complementare pentru proteina TCcore, următoarea etapă a constat în localizarea subcelulară a proteinelor virale. Așadar, celule Huh-7 au fost electroporate cu JFH-1^{ΔcoreEGFPNS5A} iar la 48 de ore post-electroporare s-a realizat transfecția cu ADN plasmidic pcDNA4^{TCcore}. La 48 de ore post-transfecție celulele au fost marcate *in vivo* cu ReAsH sau fixate și suspuse incubării cu anticorp anti-core (Figura 4A). Celulele fixate au fost analizate prin microscopie confocală. Rezultatele au arătat că expresia proteinei fuzionate TCcore, în celule electroporate, induce relocalizarea LD în zona perinucleară prin delimitarea unei zone de 5μm în jurul nucleului (Figura 4B stânga). Mai mult decât atât, expresia proteinei TCcore dar și localizarea sa în jurul LD determină recrutarea proteinei NS5A în vecinătatea LD (Figura 4B dreapta), proces asemănător unei interacții directe demonstrate anterior de către Miyanari în 2007 (Miyanari *et al.*, 2007) și Masaki în 2008 (Masaki *et al.*, 2008).

După verificarea funcționalității sistemului de *trans*-complementare și identificarea localizării subcelulare a proteinelor virale, similar cu virusul CSA4, următoarea etapă de studiu a constat în imagistica în timp real a proteinei EGFPNS5A în vedea stabilirii dinamicii acesteia în celule netransfectate sau transfectate cu proteina fuzionată TCcore. Pentru a compara sistemul de *trans*-complementare cu infecția cu virus CSA4, am ales electroporarea celulelor Huh-7 cu genomul viral JFH-1^{EGFPNS5A}. Pentru a menține aceleași condiții de imagistică, celule Huh-7 au fost electroporate cu JFH-1^{ΔcoreEGFPNS5A} și transfectate cu pcDNA4-TCcore (core+) sau netransfectate (core-) în aceeași populație celulară. Se pot identifica celulele care nu exprimă proteina fuzionată TCcore datorită faptului că agentul de colorare ReAsH nu determină marcarea proteinei. Mai mult decât atât, celulele care nu exprimă proteina de capsidă a VHC prezintă o relocalizare a LD și NS5A perinucleară aparte față de cele care exprimă proteina core (Figura 4).

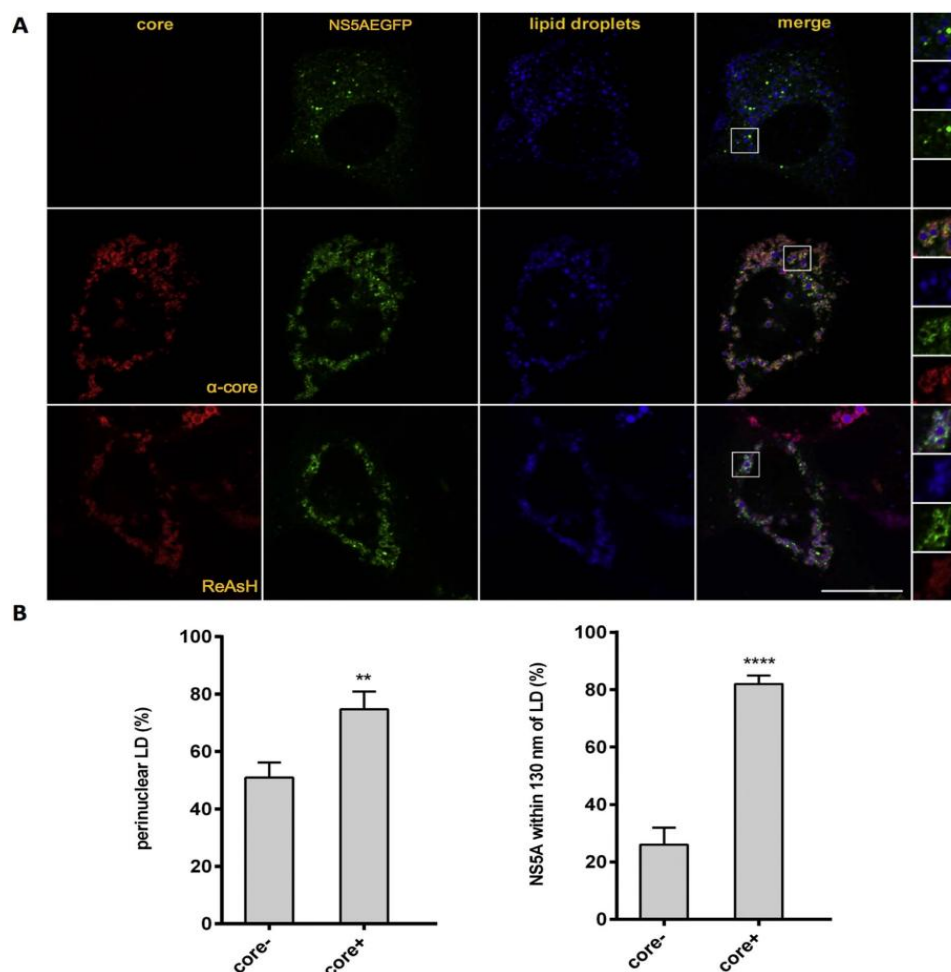


Figura 4. Localizarea subcelulară a proteinelor VHC în sistemul de *trans*-complementare. A) Expresia prin IF a proteinei NS5A (verde), core (roșu) și LD (albastru) în celule Huh-7 electroporate cu repliconul subgenomic Δ coreEGFPNS5A și transfectate la 24h post-electroporare cu pcDNA4-TCcore. Marcarea cu anticorpi, respectiv ReAsH și LipidTOX Deep Red Neutral Lipid s-a realizat la 48h post-transfecție. Bara, 20 μ m. B) Cuantificarea LD localizate perinuclear în celule care exprimă proteina TCcore (core+) sau nu (core-) (stânga). Cuantificare co-localizării proteinei NS5A în jurul LD care au un diametru mai mare de 130nm, în celule care exprimă proteina TCcore (core+) sau nu (core-). (** p<0.01, **** p<0.0001). (După Vlaicu *et al.*, 2017)

În concluzie, metodele prezentate în această parte a tezei pot fi utilizate în identificarea de interactori ai proteinelor VHC într-un sistem relevant din punct de vedere biologic. Mai mult decât atât, optimizarea sistemului de *trans*-complementare permite analiza dinamicii interactorilor în diferite etape din ciclul de viață al virusului. Datorită caracteristicilor VHC, aceste sisteme pot fi aplicate și altor ARN virusuri cu un potențial ridicat în identificarea de biomarkeri moleculari care interferează cu ciclul de viață al virusului.

Capitolul 4 Identificarea PI3KC2 ca un reglator pentru ciclul de viață al VHC

4.1 Izoformele PI3K clasa II sunt implicate în ciclul de viață al VHC

Din același raționament precizat la secțiunea 3, prin tehnici de biologie moleculară am introdus inserții cum ar fi HA, Strep II și FLAG în poziții permissive de la capătul N-terminal al proteinei virale NS2. Pornind de la genomul viral JFH-1^{CSA4} am creat trei genoame virale care prezintă diferite inserții la nivelul proteinei NS2 (HSNS2, HFNS2 și FNS2) (Vlaicu *et al.*, 2017). Funcționalitatea acestor genoame virale modificate este prezentată în partea 3 de rezultate a prezentei lucrări. Datele obținute în urma identificării interactorilor endogeni pentru proteina virală NS2, au evidențiat implicarea PI3KC2 α în ciclul de viață al VHC (Vlaicu *et al.*, 2017).

Pentru a determina importanța PI3K clasa II în ciclul de viață al VHC, am optimizat un protocol care presupune transfecția celulelor Huh-7 cu siRNA timp de 48 de ore, în scopul reducerii semnificative a expresiei proteinei de interes. La 48 de ore post-transfecție, celulele au fost inoculate cu VHC (CSA4) timp de 4 ore (MOI=0.5), urmată de o a doua transfecție cu siRNA (a se vedea secțiunea Materiale și Metode, Transfecția siRNA, Protocol 1). La 72 de ore post-inoculare, mediul celular a fost recoltat determinându-se titrul extracelular iar celulele au fost lizate, analizându-se prin WB expresia proteică și prin FFU titrul intracelular (Figura 5A). Rezultatele obținute prin WB au arătat că scăderea intracelulară a izoformelor α și γ ale PI3K clasa II reduc semnificativ expresia proteinelor virale E2 și NS5A, în timp ce izoforma β nu prezintă modificări în expresia celor două proteine virale, comparativ cu siCTR (Figura 5B). Două proteine endogene (PI4KA și ApoE), care influențează semnificativ două dintre etapele ciclului de viață al VHC, au fost folosite ca și controale pentru replicarea (PI4KA), respectiv asamblarea (ApoE) virusului. După cum se poate observa în figura 5B, reducerea proteinei PI4KA inhibă replicarea virusului în timp ce absența ApoE inhibă asamblarea sa (Figura 5B).

Următoarea etapă a studiului a constat în stabilirea implicării acestor izoforme în etapele de internalizare/replicare precum și secreție/infectivitate a VHC. Pentru studiul etapei de internalizare/replicare, la 48 de ore post-inoculare celulele Huh-7 transfectate cu siRNA și infectate cu virus CSA4 (a se vedea Protocol 1), au fost fixate cu metanol apoi incubate cu anticorp anti-E1, respectiv anticorp secundar fluorescent, conform tehnicii de IF. Pentru analiza etapei de secreție a VHC, am recoltat la 72 de ore post-inoculare, mediul celulelor transfectate cu siRNA și am infectat celule Huh-7 naive. După cum se poate observa în figura 5C, toate

izoformele PI3KC2 afectează diferit cele două etape din ciclul de viață al VHC. Astfel, reducerea expresiei izoformelor PI3KC2 determină o scădere diferită a procesului de internalizare/replicare a VHC, comparativ cu siCTR (Figura 5C). Pe de altă parte, cuantificarea etapelor de asamblare/secreție a VHC a arătat că reducerea izoformelor α și γ ale PI3KC2 determină o creștere a secreției VHC de aproximativ șase ori comparativ cu siCTR (Figura 5C). În schimb, siRNA pentru izoforma β a PI3KC2 nu prezintă o modificare semnificativă în ceea ce privește această etapă a replicării VHC (Figura 5C). S-au folosit siRNA control pentru fiecare etapă din ciclul de viață a virusului. Astfel, pentru etapa de internalizare s-a folosit siRNA pentru proteina CD81, reprezentând receptorul principal de legare a virusului iar siPI4KA pentru replicarea genomului viral în timp ce siApoE a fost utilizat pentru etapa de asamblare a virionului. Profilurile analizei prin citometrie în flux a celulelor infectate cu virus, pentru etapa de internalizare/replicare dar și asamblare/secreție, sunt prezentate în figura 5D.

În continuare, am cuantificat numărul de particule virale infecțioase prezente atât în interiorul celulelor transfectate cu siRNA și inoculate cu virus dar și secretate în mediul extracelular. Comparativ cu siCTR, nicio izoformă a PI3KC2 nu prezintă modificări semnificative în ceea ce privește titrul intracelular al virusului. Pe de altă parte, când titrul extracelular a fost măsurat, reducerea expresiei izoformelor α și γ a PI3KC2 a determinat o creștere de aproximativ cinci ori a numărului de particule virale infecțioase secretate în mediul de cultură, comparativ cu siCTR (Figura 5E). Interesant este faptul că siRNA pentru izoforma β a PI3KC2 determină o scădere de aproximativ o sută de ori a titrului viral extracelular (Figura 5E). Acest rezultat sugerează o posibilă implicare a izoformelor PI3KC2 în etapele târzii ale ciclului de viață al VHC.

Rezultatele publicate de către Maehama T și colab. în anul 2013 au arătat că izoforma β a PI3KC2 afectează internalizarea VHCpp (Maehama *et al.*, 2013). Pentru a analiza în amănunt implicarea izoformelor PI3KC2 în ciclul de viață al virusului, am caracterizat fiecare etapă a acestuia. Astfel, folosind sistemul de producție al pseudoparticulelor virale (VHCpp, genotip 2a) și Protocolul 2, am evidențiat faptul că reducerea expresiei izoformelor α și γ a PI3KC2 determină o scădere mai pronunțată a internalizării virale comparativ cu siCTR, în timp ce izoforma β a kinazei prezintă doar o ușoară scădere (Figura 5F). Aceste diferențe se pot explica datorită localizării subcelulare a izoformelor PI3KC2. Se poate afirma că izoformele α și γ , care sunt localizate la nivelul membranei celulare, afectează semnificativ internalizarea virusului în timp ce izoforma β , localizată în lumenul RE, nu influențează acest proces. Scăderea cu aproximativ 20% a activității luciferazei, în cazul izoformei β , se poate explica prin faptul că

siPI3KC2 β influențează negativ și izoforma α a proteinei. siCD81 a fost folosit ca un control pozitiv al internalizării virale dependente de receptor iar VSVG ca un control al transfecției și secreției pseudoparticulelor. Nu există diferențe statistic relevante între semnalul chemiluminiscent al VSVG în niciuna dintre condițiile de producție a VHCpp, ceea ce demonstrează că acest proces s-a realizat uniform iar rezultatele obținute sunt veridice (Figura 5F).

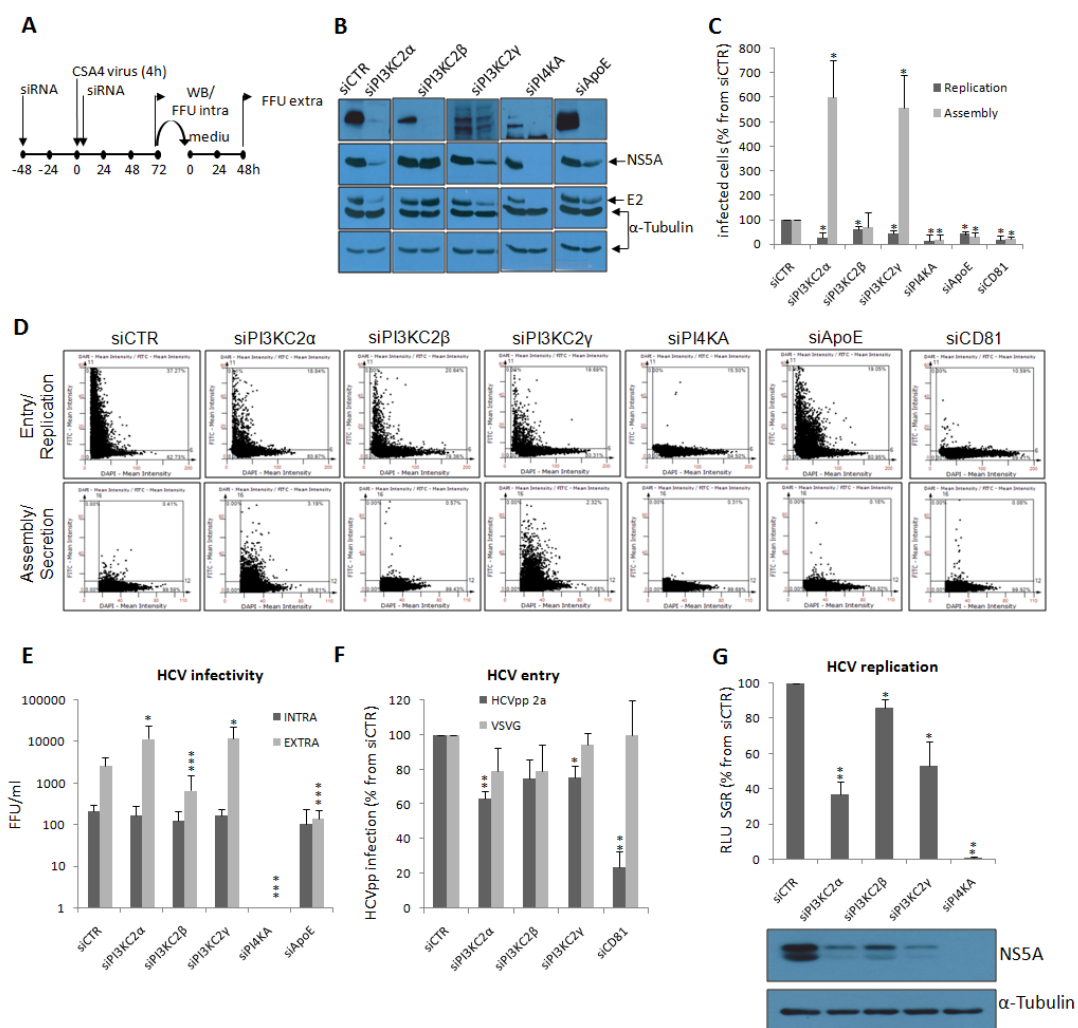


Figura 5. PI3K2 reglează diferit ciclul de viață al VHC. A) Reprezentare schematică a protocolului utilizat pentru analiza etapei de internalizare/replicare și asamblare/secreție a VHC. Celule Huh-7 au fost transfectate cu siRNA pentru proteina țintă urmată la 48 de ore post-transfecție de o inoculare cu virus CSA4 timp de 4 ore. Imediat după inoculare, celulele au fost supuse unei noi runde de transfecție cu siRNA. La 72 de ore post-inoculare, celulele și mediul celular au fost recoltate pentru analiza WB și FFU. B) Analiza WB a expresiei proteinelor endogene și a celor virale în celule Huh-7 supuse schemei de protocol din figura A. C) Analiza cuantificării prin citometrie în flux a celulelor transfectate cu siRNA și inoculate cu virus la 48 de ore post-inoculare pentru etapa de internalizare/replicare respectiv asamblare/secreție conform protocolului prezentat în figura A. D) Profilurile celulelor Huh-7 supuse schemei de protocol din

figura A și analizate prin citometrie în flux. E) Cuantificarea prin FFU a titrului intracelular și extracelular al celulelor Huh-7 supuse schemei de protocol din figura A. F) Cuantificarea prin testul VHCpp a internalizării pseudoparticulelor virale în celule Huh-7 supuse protocolului 2 de transfecție și normalizate la siCTR și VSVG. G) Cuantificarea activității luciferazice a replicării VHC în celule Huh-7 supuse protocolului 3 de transfecție și normalizate la siCTR (sus). Analiza WB a expresiei proteinei virale NS5A în aceleași celule Huh-7 supuse protocolului 3 având drept control proteina α -tubulină (jos). Aceste rezultate sunt prezentate ca medie \pm SD ($n \geq 3$ experimente independente; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$, *** $p < 0.0005$).

Pentru a observa implicarea izoformelor PI3KC2 strict în etapa de replicare a VHC, am urmat protocolul 3 prezentat la secțiunea Materiale și Metode. Celule Huh-7 transfectate cu siRNA au fost electroporate cu JFH-1^{SGR_RLuc_3-5B} (genotip 2a), urmată de cuantificarea activității luciferazei la 48 de ore post-electroporare. Analiza RLU a evidențiat o scădere a semnalului chemiluminiscent pentru toate siRNA corespunzând izoformelor kinazei dar mai pronunțat pentru izoformele α și γ , în concordanță cu expresia redusă a proteinei NS5A (Figura 5G). siPI4KA a fost folosit ca un control al replicării virusului, inhibând complet acest proces. Aceste rezultate sugerează că reducerea expresiei izoformelor α și γ ale PI3KC2 inhibă replicarea virusului cu aproximativ 50%, în timp ce scăderea expresiei izoformei β determină o ușoară inhibiție a replicării cu aproximativ 15%, comparativ cu siCTR (Figura 5G). O posibilă explicație a diferitelor nivele de expresie a activității luciferazice este corelată cu localizarea subcelulară a izoformelor acestei proteine. Din analiza expresiei proteinei NS5A se poate observa că siPI3KC2 α și γ determină o reducere semnificativă a proteinei virale, în timp ce siPI3KC2 β prezintă o influență mai slabă, comparativ cu siCTR (Figura 5G).

Din rezultatele obținute se pot concluziona următoarele:

- reducerea semnificativă a expresiei intracelulare a proteinelor PI3KC2 α și γ determină o scădere pronunțată a expresiei proteinelor virale, corelată cu scăderea replicării ARN viral;
- siPI3KC2 β nu pare să influențeze expresia proteinelor virale NS5A și E2;
- activitatea de secreție a VHC prezintă o creștere semnificativă în cazul celulelor transfectate cu siRNA pentru izoformele α și γ a PI3KC2, în schimb izoforma β pare să inhibe această etapă;
- titrul intracelular nu a fost afectat pentru niciuna dintre transfecțiile cu siRNA pentru PI3KC2, în schimb numărul de particule virale infecțioase secretate în mediul extracelular a crescut de aproximativ cinci ori pentru celulele transfectate cu siPI3KC2 α , respectiv siPI3KC2 γ ;
- siPI3KC2 β influențează negativ titrul extracelular, determinând o scădere a virusului secretat în mediul de cultură;

- celulele transfectate cu siRNA pentru izoformele α și γ ale PI3KC2 inhibă internalizarea VHC în timp ce izoforma β nu influențează acest proces;
- replicarea ARN viral este pregnant afectată de către siPI3KC2 α respectiv siPI3KC2 γ , comparativ cu izoforma β care nu exercită un efect considerabil;

4.2 Regiunea N-terminală a PI3KC2 α este implicată în procesele de asamblare/secreție a VHC

Rezultatele obținute în urma analizei domeniilor izoformei α a PI3KC2 au evidențiat implicarea acestei proteine în etapele târzii ale ciclului de viață a VHC. Pentru a identifica regiunea din structura acestei proteine care interacționează cu complexul viral NS2 și implicit reglează activitatea proceselor de asamblare/secreție a virusului, am construit proteine PI3KC2 α himere și mutante pe care le-am inserat într-un ADN plasmidic (pLNCX2). Astfel, utilizând tehnici de biologie moleculară, am fuzionat proteina GFP cu regiunea N-terminală a proteinei PI3KC2 α construind astfel ADN plasmidic pLNCX2-GFP-PI3KC2 α^{WT} (WT). Datorită faptului că această proteină prezintă activitate enzimatică, catalizând reacția de producere a PI3P dar și PI3,4P(2), am construit o proteină mutantă pLNCX2-GFP-PI3KC2 α^{M1} (M1), în care situsul enzimatic a fost modificat pentru a produce doar PI3P. Scopul utilizării proteinei M1 a fost acela de a stabili dacă produsul enzimatic PI3,4P(2) este implicat în procesul de asamblare/secreție a VHC. Mai mult decât atât, prin intermediul ADN plasmidic pLNCX2-GFP-PI3KC2 α^{M2} (M2), în care situsul enzimatic este neutralizat, am vrut să determinăm dacă activitatea enzimatică a PI3KC2 α , indiferent de produsul obținut, este necesară în etapele târzii ale ciclului viral. O proteină PI3KC2 α mutantă în care regiunea N-terminală a fost înlăturată [pLNCX2-GFP-PI3KC2 α^{Δ} (Δ)] a fost construită în scopul identificării regiunii necesare reglării negative a asamblării/secreției VHC. După cum se poate observa în figura 6A, au fost construite patru proteine fuzionate în regiunea N-terminală cu proteina GFP, fiecare prezentând o particularitate (Figura 6A).

Deoarece experimentele au fost realizate în sistem tranzitoriu de expresie proteică, am optimizat un protocol de co-transfecție a siRNA și ADN plasmidic prezentat la secțiunea Materiale și Metode, Transfecție siRNA, Protocol 4. Astfel, celule Huh-7 au fost însămânțate 24 de ore înainte de inoculare cu CSA4 timp de 4 ore, urmată de co-transfecția cu siRNA și ADN plasmidic conform protocolului 4 (Figura 6B). Celule Huh-7 și mediul extracelular au fost recoltate la 72 de ore post-inoculare, analizându-se prin WB expresia proteinelor PI3KC2 α , NS5A, E1, α -tubulină iar prin IF titrul extracelular.

Normalizarea eficienței de transfecție a ADN plasmidic s-a realizat prin IF pentru proteina GFP dar și pentru proteina virală E1. Astfel, la 72 de ore post-inoculare, celulele Huh-7 supuse protocolului 4 de transfecție au fost fixate cu PFA 4% și incubate cu anticorp anti-E1 respectiv anticorp secundar fluorescent, conform protocolului de IF prezentat la secțiunea Materiale și Metode. În figura 6C se poate observa că toate probele au fost transfectate în aceleași condiții (markerul fluorescent GFP) și infectate în același mod (antigenul E1) (Figura 6C).

Analiza WB a proteinelor M1 respectiv M2, a evidențiat că activitatea enzimatică a PI3KC2 α nu este implicată în ciclul de viață al VHC. Astfel, celulele Huh-7 supuse protocolului 4 de transfecție au fost recoltate la 72 de ore post-inoculare și lizate cu un tampon de liză conform metodei descrise la secțiunea Materiale și Metode. După cum se poate observa în figura 6D, celulele Huh-7 au fost co-transfectate cu siCTR sau siPI3KC2 α și ADN plasmidic pentru fiecare dintre proteinele PI3KC2 α mutante. pLNCX2-GFP a reprezentat ADN plasmidic martor (Figura 6D). Incubarea membranei de WB cu anticorp anti-GFP evidențiază faptul că toate plasmidele au fost transfectate în celule Huh-7. Deoarece proteinei Δ îi lipsește regiunea N-terminală, aceasta prezintă o diferență de masă moleculară comparativ cu proteinele WT, M1 și M2. Incubarea membranei de WB cu anticorp anti-PI3KC2 α evidențiază scăderea expresiei endogene a PI3KC2 α (coloana din dreapta), comparativ cu celulele Huh-7 transfectate cu siCTR (coloana din stânga). Se poate observa că expresia proteinei endogene PI3KC2 α în celulele transfectate cu siPI3KC2 α este absentă, în timp ce proteina PI3KC2 α mutantă (GFP-PI3KC2 α) este prezentă (Figura 6D). Analizând expresia proteinei virale NS5A, se poate observa că etapa de replicare a virusului nu este profund afectată (Figura 6D). Comparând expresia proteinei virale E1 din probele siCTR/GFP (co-transfecție siCTR și pLNCX2-GFP) și siCTR/WT (co-transfecție siCTR și pLNCX2-GFP-PI3KC2 α ^{WT}) se observa o scădere considerabilă în cea de-a doua probă, ceea ce sugerează o afectare negativă a procesului de asamblare/secreție a VHC (Figura 6D). Mai mult decât atât, comparând expresia proteinei virale E1 din probele siPI3KC2 α /WT (co-transfecție siPI3KC2 α și pLNCX2-GFP-PI3KC2 α ^{WT}) cu celelalte proteine mutante (co-transfecție siPI3KC2 α /M1, M2 și Δ), se poate observa că în proba siPI3KC2 α / Δ nivelul expresiei proteinei de anvelopă crește, ceea ce poate sugera o implicare a domeniului N-terminal al proteinei PI3KC2 α în reglarea asamblării/secreției VHC.

Expresia exogenă a proteinei PI3KC2 α ^{WT} în celule Huh-7 transfectate cu siCTR, determină o scădere a secreției particulelor virale, detectată prin cuantificarea titrului extracelular comparativ cu siCTR/GFP (Figura 6E). Deși s-a utilizat protocolul 4 de transfecție, se poate

observa în figura 6E o creștere a titrului viral în celule co-transfectate cu siPI3KC2 α /GFP, ceea ce se corelează cu rezultatele obținute în celule Huh-7 care au fost supuse protocolului 1 de transfecție. Salvarea titrului viral s-a obținut în celulele Huh-7 co-transfectate cu siPI3KC2 α /WT, comparativ cu siCTR/GFP (Figura 6E). Aceste rezultate evidențiază faptul că deși celula nu mai exprimă forma endogenă a PI3KC2 α (celule transfectate cu siPI3KC2 α), introducerea sa exogenă (celule transfectate cu WT) determină compensarea funcției proteinei, neafectând ciclul de viață al VHC.

Cuantificarea titrului extracelular al celulelor Huh-7 în care expresia endogenă a PI3KC2 α a fost inhibată iar expresia exogenă a fost exprimată, prin co-transfecția proteinelor M1, M2 respectiv Δ (siPI3KC2 α /WT, M1, M2, Δ), a confirmat rezultatul analizei de WB. După cum se poate observa în figura 6F, numărul de particule virale nu a fost afectat în momentul introducerii în celulă a proteinelor M1 respectiv M2, comparativ cu siPI3KC2 α /WT (Figura 6F). O creștere a secreției virale cu aproximativ 50% a fost observată în celulele Huh-7 co-transfectate cu siPI3KC2 α / Δ comparativ cu siPI3KC2 α /WT, ceea ce întărește ipoteza implicării regiunii N-terminale a proteinei în etapele târzii ale ciclului de viață al VHC (Figura 6F).

Rezultatele obținute în urma analizei proteinelor PI3KC2 α mutante au evidențiat următoarele aspecte:

- expresia exogenă a PI3KC2 α , indiferent de mutațiile prezente, nu afectează expresia proteinei NS5A și implicit replicarea virusului;
- scăderea titrului viral în celule Huh-7 co-transfectate cu siCTR/WT indică faptul că supra-expresia proteinei PI3KC2 α inhibă procesele târzii din ciclul de viață al VHC;
- salvarea (engl. *rescue*) fenotipului viral a fost obținut în celule Huh-7 în care s-a realizat inhibarea proteinei endogene și expresia sa exogenă (co-transfecție siPI3KC2 α /WT);
- funcția enzimatică a PI3KC2 α nu este implicată în reglarea ciclului viral în schimb domeniul N-terminal al proteinei pare a influența acest proces.

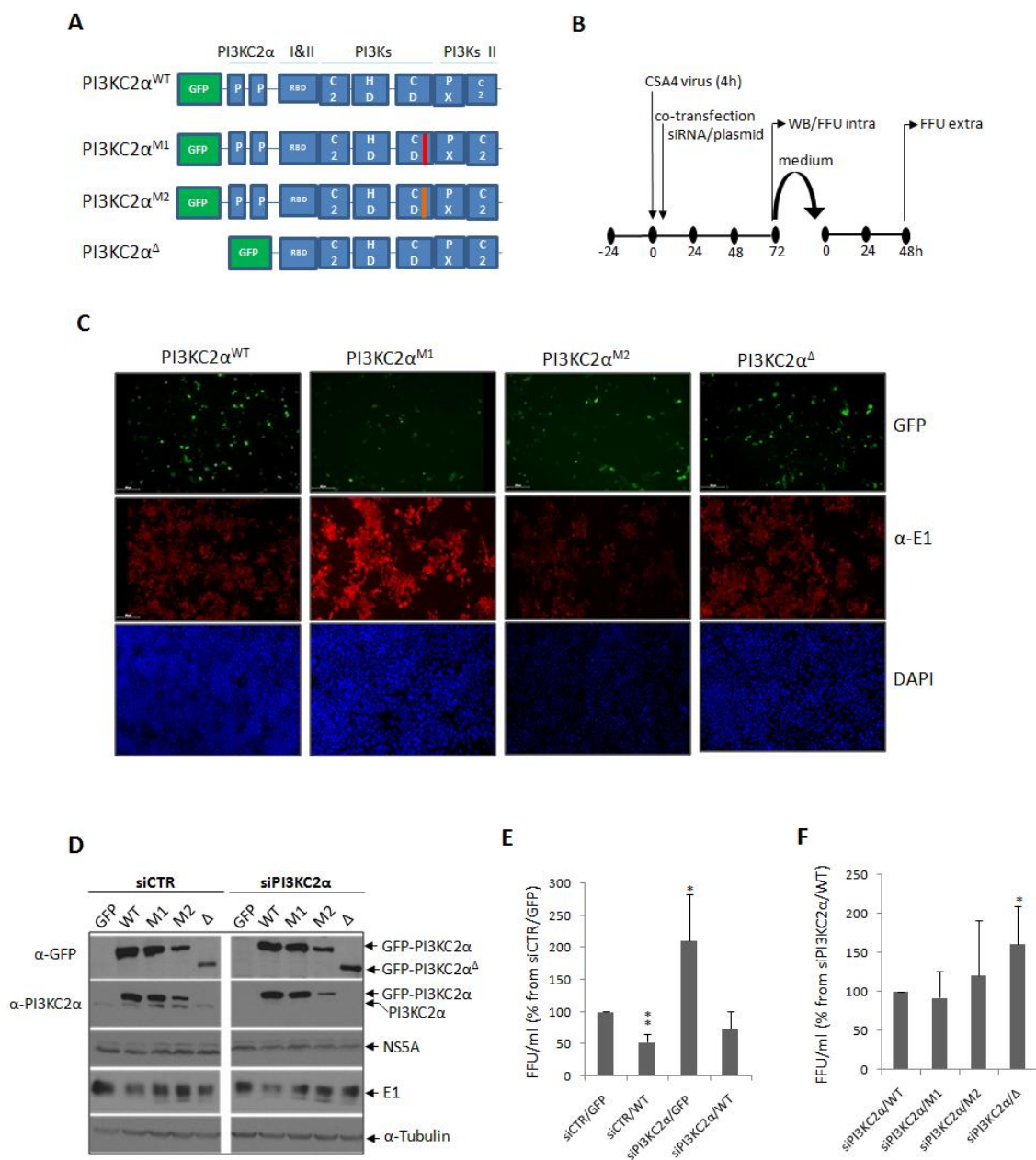


Figura 6. PI3KC2 α interacționează cu proteina NS2 iar domeniul N-terminal al PI3KC2 α este implicat în etapele târzii ale ciclului de viață al VHC. A) Reprezentare schematică a proteinelor PI3KC2 α mutante. B) Reprezentare schematică a protocolului utilizat pentru salvarea fenotipului viral. Celule Huh-7 au fost inoculate cu virus CSA4 timp de 4 ore urmată de o etapă de co-transfecție cu siRNA și ADN plasmidic. La 72 de ore post-transfecție celulele și mediul celular au fost recoltate pentru analiza WB și FFU. C) Analiza prin IF a expresiei proteinelor GFP și E1 în celule Huh-7 supuse co-transfecției și inoculării virale utilizând protocolul 4. Nucleii celulelor au fost marcați cu DAPI. D) Analiza WB a expresiei proteinelor endogene și a celor virale în celule Huh-7 supuse schemei de protocol din figura B. E, F) Cuantificarea prin FFU a titrului extracelular al celulelor Huh-7 supuse schemei de protocol din figura B. Aceste rezultate sunt prezentate ca medie \pm SD ($n \geq 3$ experimente independente; * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

Capitolul 5 Discuții

Această lucrare este alcătuită din două părți majore. Prima parte se referă la construirea și verificarea funcționalității unor genoame virale care prezintă diferiți inserți, într-un sistem de *trans*-complementare pentru VHC (Vlaicu *et al.*, 2017). Construirea genoamelor virale la nivelul cărora au fost inserate diferite secvențe utilizate în identificarea de proteine endogene sau imagistica fluorescentă, au permis caracterizarea acestora într-un sistem de *cis*-complementare (Figura 2 A, B). Confirmarea, prin IP/WB urmată de LC-MS/MS, a câtorva proteine identificate și de către alte grupuri de cercetare (Miyanari *et al.*, 2007; Popescu *et al.*, 2011; Stapleford and Lindenbach, 2011) au condus la validarea sistemului celular de studiu al VHC. În urma analizei rezultatelor prin LC-MS/MS, a fost obținută o listă de proteine endogene care ar putea să interacționeze cu proteinele virale determinând reglarea ciclului de viață al VHC. Printre aceste proteine a fost prezentă și PI3KC2 α (Figura 2 D).

Dezvoltarea unui sistem inductibil de *trans*-complementare pentru proteina de capsidă a VHC a permis studiul în amănunt a mecanismelor de replicare respectiv asamblare a virusului (Figura 3). Linia celulară de *trans*-complementare (Huh-7^{Tetcore}) a permis obținerea unor VHCtcp, prin intermediul diferitelor genoame core defective care prezintă inserți în proteinele virale NS2 sau NS5A (Figura 3).

Pentru studiul imagisticii în timp real al diferitelor proteine virale (core și NS5A), am comparat două sisteme de complementare (*cis* și *trans*) (Figura 4). Obținerea genoamelor virale care prezintă diferiți inserți, susceptibili pentru marcarea *in vivo* a proteinelor, a condus la secreția de HCVtcp pentru proteina fuzionată TCcore (Figura 4C). Aceste rezultate sunt primele care demonstrează *trans*-complementarea proteinei fuzionate TCcore într-un sistem de transfecție tranzient.

Imagistica în timp real pe celule Huh-7 a evidențiat o creștere a numărului de LD precum și a asocierii LD-NS5A în celule în care expresia proteinei de capsidă este prezentă (Figura 4). Mai mult decât atât, rezultatele au evidențiat o creștere a dinamicii complexelor virale în celule în care expresia proteinei de capsidă este absentă (core -) comparativ cu celule în care proteina core își exercită funcția (core +). Aceste date sunt în strânsă legătură cu tiparul de localizare a proteinei NS5A dar și a LD în celule Huh-7 în care expresia proteinei core este absentă (core -).

Localizarea în jurul nucleului celulei a proteinelor core, NS5A dar și a LD, sunt aspecte definitorii pentru infecția cu VHC (Figura 4).

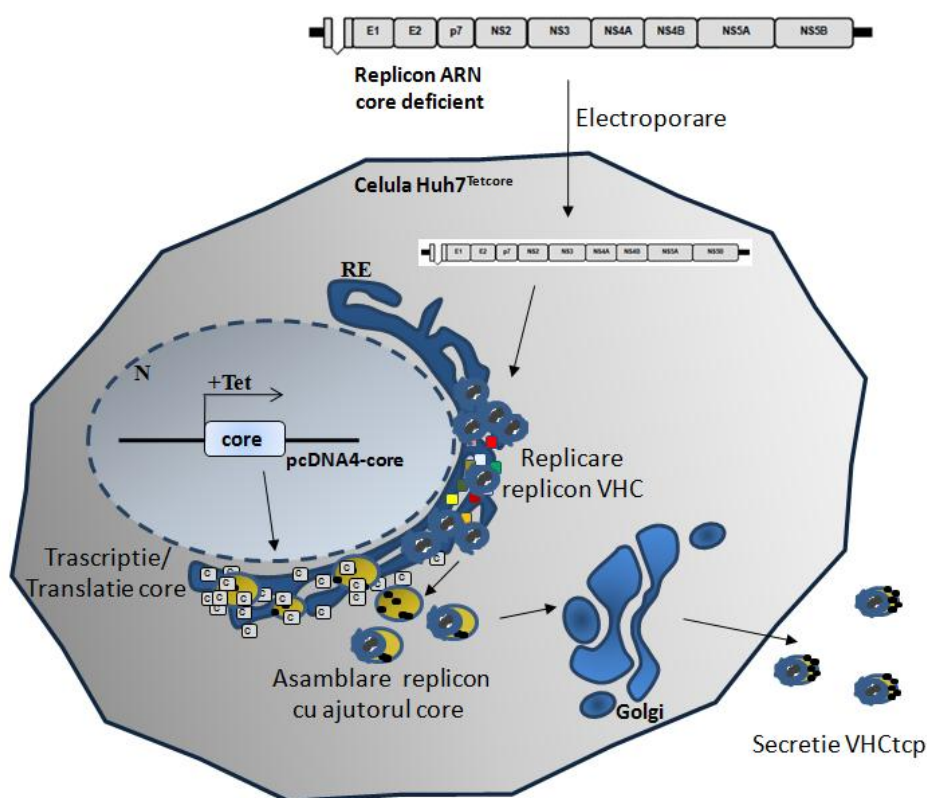


Figura 7. Sistemul inductibil de *trans*-complementare pentru proteina de capsidă a VHC utilizând repliconi subgenomici core defectivi. Linia Huh-7^{Tetcore} prezintă inserat stabil în nucleul celulei gena care codifică pentru proteina core a VHC. Tetraciclină adăugată în mediul de cultură derepresează promotorul genei determinând transcripția/translația proteinei de capsidă. Introducerea în celulă, prin electroporare, a repliconilor subgenomici core defectivi determină asamblarea acestora cu ajutorul expresiei inductibile a proteinei core și secreția VHCtcp în exteriorul celulei. Particulele virale secretate sunt capabile de o nouă rundă de infecție în celule Huh-7 dar lipsa genei core din structura genomului viral nu permite asamblarea și secreția virală.

Toate rezultatele generate în capitolul 3 al acestei lucrări au condus la dezvoltarea unui sistem care permite studiul diferențial dintre etapa de replicare și asamblare a VHC. Astfel, a fost posibilă evidențierea unei proteine cu funcție kinazică (PI3KC2 α), care reglează ciclul de viață viral. Celulele Huh-7 transfectate cu siRNA pentru izoformele kinazei au demonstrat că replicarea virusului este inhibată diferit în momentul în care expresia proteinei este profund afectată, în schimb procesul de asamblare este reglat în funcție de localizarea celulară a fiecărei

kinaze în parte. Astfel, datorită localizării la nivelul membranei celulare a izoformelor α și γ a PI3KC2, procesul de internalizare al virusului este facilitat, probabil datorită interacției cu clatrina. Acest aspect a fost observat și de către alte grupuri de cercetare care s-au focalizat pe PI3KC2 β (Maehama *et al.*, 2013).

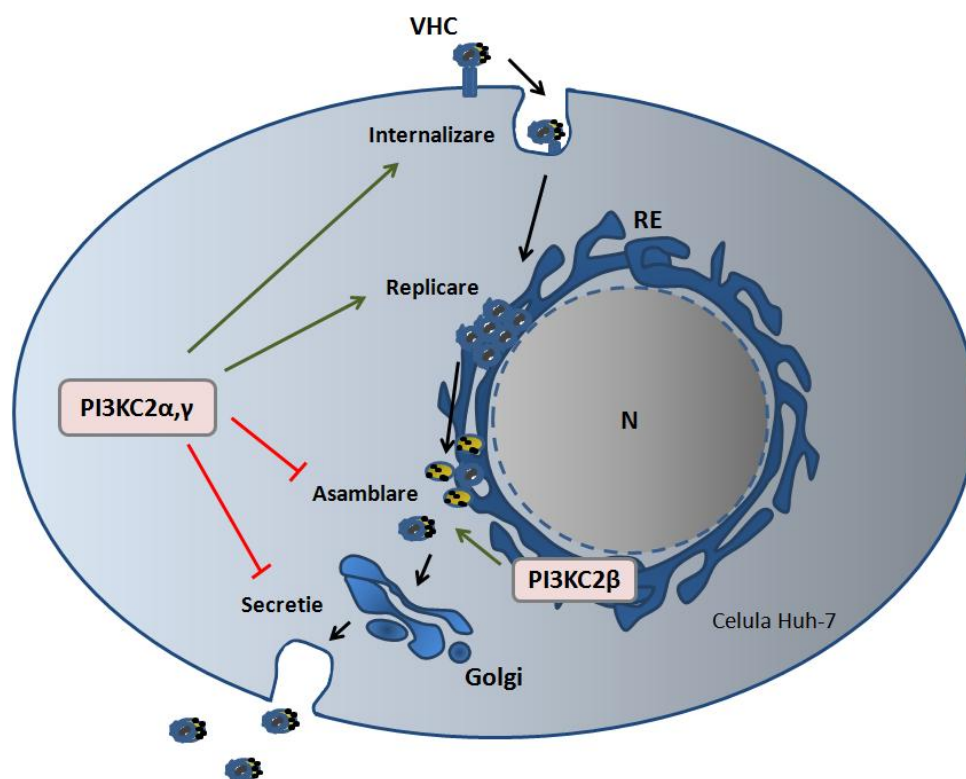


Figura 8. Mecanismul prin care PI3KC2 reglează diferite etape din ciclul de viață al VHC. Localizarea citosolică a PI3KC2 α și γ facilitează internalizarea virusului în celulă precum și replicarea acestuia. Procesele de asamblare respectiv secreție a VHC sunt inhibitate de către aceste două izoforme dar stimulate de către PI3KC2 β , datorită localizării sale la nivelul RE.

Analiza replicării ARN viral a întărit ipoteza conform căreia procesele timpurii din ciclul de viață a virusului (internalizare, replicare) sunt favorizate de către izoformele α și γ a PI3KC2 în timp ce procesele de asamblare respectiv secreția particulelor virale sunt inhibitate. Pe de altă parte, prezența la nivelul RE a PI3KC2 β , facilitează procesele târzii din ciclul de viață viral, determinând o asamblare/secreție a virionilor mai eficientă (Figura 8).

Studiile de mutageneză care au fost realizate pe PI3KC2 α , au condus la emiterea unei ipoteze conform căreia domeniul N-terminal al kinazei pare să interacționeze cu proteina NS2

reglând astfel procesul de asamblare. Se pare că activitatea enzimatică a kinazei nu pare a influența ciclul de viață al virusului. Cu toate acestea, sunt nevoie de analize suplimentare pentru a stabili cu exactitate dacă doar domeniul N-terminal al PI3KC2 α este implicat în legarea de clatrină și implicit favorizarea internalizării virusului sau există și alți factori endogeni care sunt implicați.

Pe de altă parte, sunt nevoie de studii amănunțite care să elucideze interacția cu proteinele virale. Ipoteza conform căreia, PI3KC2 α interacționează indirect într-un complex proteic cu proteina NS2 trebuie demonstrată prin identificarea proteinei de legătură dintre acestea. Dacă într-adevar domeniul N-terminal este cel responsabil de această legătură sau există alți factori care să influențeze procesul de asamblare al VHC.

În cadrul acestei teze s-au optimizat mai multe sisteme de culturi celulare ale VHC bazate pe izolatul JFH-1 care permit:

a) investigarea secvențială a etapelor din ciclului de viață al VHC în condiții de biosecuritate redusă ;

b) identificarea de factori endogeni implicați în diversele etape ale ciclului de viață VHC.

Sistemul de *trans*-complementare a proteinei de capsidă VHC prezentat în capitolul 3 permite folosirea în tandem a tehnicilor de proteomică și imagistică pentru a investiga evenimente moleculare asociate infecției VHC (Vlaicu *et al.*, 2017).

Pentru a identifica noi factori endogeni implicați în infecția VHC cu potențial rol în procesul de carcinogeneză indusă de virus, s-a folosit o abordare de proteomică de descoperire bazată pe identificarea *de novo* a interactorilor proteinelor virale, într-un sistem celular care produce particule infecțioase fiind biologic relevant. După identificarea proteinelor prin cromatografie de afinitate urmată de analiza de spectrometrie de masă, s-a efectuat o caracterizare funcțională amplă a PI3KC2 α , optimizându-se teste de "loss of function" și "gain of function" ce vor putea fi aplicate oricărei ținte identificate.

În concluzie, lucrarea prezentă descrie pentru prima dată rolul diferențiat al izoformelor PI3KC2 în ciclul de viață VHC, ceea ce aduce noutate în înțelegerea legăturii dintre calea endocitică și etapele târzii ale ciclului de viață VHC (asamblare și secreție). În plus, VHC poate fi utilizat ca model pentru înțelegerea funcției PI3K de clasa II, care sunt puțin caracterizate.

Lista publicațiilor și participărilor la conferințe științifice

Publicații

1. Ovidiu Vlaicu, Tudor Selescu, Florin Pastrama, Cristian Munteanu, Laura Riva, Jean Dubuisson, Yves Rouille, Costin-Ioan Popescu; Novel replicons and *trans*-encapsidation systems for Hepatitis C Virus proteins live imaging and virus-host interaction proteomics. *Journal of Virological Methods* 246, 2017, 42–50. ISI: 1.7 (2016)
2. Anca Coman, Codruta Paraschivescu, Niculina Hadade, Andrei Juncu, Ovidiu Vlaicu, Costin-Ioan Popescu, Mihaela Matache; New acyloxymethyl ketones: useful probes for cystein protease profiling. *Synthesis* 48, 2016, 3917-3923. ISI: 2.6 (2016)
3. Costin-Ioan Popescu, Laura Riva, Ovidiu Vlaicu, Rayan Farhat, Yves Rouillé and Jean Dubuisson; Hepatitis C virus life cycle and lipid metabolism (Review). *Biology*, 2014, 3, 892-921. ISI: 0

Publicatii in pregatire:

4. Ovidiu Vlaicu, Florin Pastrama, Leontina Banica, Simona Paraschiv, Dan Otelea, Claire Gondeau, Charles-Henry, Tarik Asselah, Yves Rouilles, Jean Dubuisson, Costin-Ioan Popescu; Phosphoinositide 3-kinases class II regulate Hepatitis C virus assembly and secretion.

Conferințe principale

1. Functional JFH1 based recombinant viruses with insertions suitable for “in vivo” imaging and proteomic analysis; Ovidiu Vlaicu, Sandrine Belouzard, Leontina Banica, Dan Otelea, Jean Dubuisson and Costin-Ioan Popescu; Poster, ANRS, Paris, 23-24 jan. 2014
2. Hepatitis C cell culture system - a valuable tool for understanding viral resistance mechanisms; Ovidiu Vlaicu, Leontina Banica, Simona Paraschiv, Dan Otelea and Costin-Ioan Popescu; Poster, “Al VII-lea Congres National HIV/SIDA cu participare internationala”, Sibiu, 29-31 mai 2014;
3. Inducible *trans*-encapsidation system for Hepatitis C Virus allows temporal separation between the different stages in the viral life cycle; Ovidiu Vlaicu, Leontina Banica, Dan Otelea, Andrei-Jose Petrescu and Costin-Ioan Popescu; Poster, The Annual International Conference of

the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology and Workshop “Viral hepatitis- from cell culture to clinic”, Baile-Felix, 05-07 iunie 2014;

4. Interactomics and live imaging as tools for identification and characterization of endogenous factors involved in Hepatitis C Virus life cycle; Ovidiu Vlaicu, Florin Pastrama, Cristian Munteanu, Georgiana Toma, Simona Paraschiv, Dan Otelea, Andrei-José Petrescu, Costin-loan Popescu, Poster, Symposium Nicolae Cajal, Bucharest, 2015;

5. Live imaging of Hepatitis C Virus NS5A and CORE proteins in a *trans*-complementation system; Ovidiu Vlaicu, Tudor Selescu, Andrei Juncu, Yves Rouille, Andrei-Jose Petrescu, Costin-loan Popescu, Poster, The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Bucharest, 17-19 sept. 2015;

6. Investigation of hepatitis c virus-host interaction using interactomics and functional genomics techniques in infectious virions producing cells; Ovidiu Vlaicu, Florin Pastrama, Cristian Munteanu, Leontina Banica, Simona Paraschiv, Laura Riva, Yves Rouille, Jean Dubuisson and Costin-loan Popescu, Oral presentation, The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Bucharest, 17-19 sept. 2015;

7. Genomic telaprevir resistance and phenotyping of the resistance mutations in hepatitis c virus cell culture system; Emil Neaga, Andrei Juncu, Ovidiu Vlaicu, Leontina Banica, Simona Paraschiv, Dan Otelea and Costin-loan Popescu, Poster, The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Bucharest, 17-19 sept. 2015;

8. High throughput screening assay for identification of new chemical scaffolds which inhibit HCV NS2 cystein protease activity; Andrei Juncu, Ovidiu Vlaicu, Alina Bora, Liliana Pacureanu, Costin-loan Popescu, Poster, The Annual International Conference of the Romanian Society of Biochemistry and Molecular Biology, Bucharest, 17-19 sept. 2015;

9. Temporal analysis of the hepatitis C NS5A interactome in infectious virions producing cells; Ovidiu Vlaicu, Florin Pastrama, Cristian Munteanu, Costin-loan Popescu; Poster, 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, 9-13 oct. 2015;

10. Identification of PI3KC2 α as a hepatitis C NS2 complex interactor which is involved in the viral replication; Ovidiu Vlaicu, Florin Pastrama, Cristian Munteanu, Leontina Banica, Simona Paraschiv, Dan Otelea, Yves Rouille, Jean Dubuisson, Costin-loan Popescu, Poster, 22nd International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, Strasbourg, 9-13 oct. 2015;

Mulțumiri

Adresez mulțumiri Dr. Andrei Jose Petrescu pentru coordonarea și îndrumarea pe tot parcursul celor 5 ani de doctorat.

De asemenea, mulțumesc Dr. Costin Ioan Popescu fără de care nu aș fi putut să abordez subiectul VHC și mai mult decât atât, cercetarea acestuia la nivel fundamental. Îndrumările practice și discuțiile efervescente, după fiecare experiment realizat în laborator, m-au determinat să-mi conturez idei proprii referitoare la procesele celulare care au loc în urma infecției virale.

Doresc să adresez mulțumiri grupului de Glicoproteine Virale din cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române (Catalin, Alina, Ramona, Olivia, Andrei, Radu) care mi-a oferit prilejul să-mi construiesc actuala teză de doctorat, punându-mi la dispoziție întregul suport tehnic și științific. De asemenea, cu ajutorul întâlnirilor științifice săptămânale și a criticilor constructive ale doamnei Dr. Norica Nichita, am reușit să-mi dezvolt și mai mult gândirea analită și să-mi deschid orizonturile în domeniul virusologiei și biologiei celulare.

Mulțumiri aparțin aduc grupului de Genetică Moleculară din cadrul Institutului National de Boli Infecțioase "Prof. Dr. Matei Bals" (Dr. Dan Otelea, Dr. Simona Paraschiv, Dr. Leontina Banica, Dr. Emil Neaga, Mama Noz și întregului colectiv) care mi-au permis să-mi realizez experimentele ce au presupus manipularea cu VHC fulminant, fără de care actuala teză nu s-ar fi concretizat.

De asemenea, mulțumesc Dr. Florin Pastrama și Dr. Cristian Munteanu pentru ajutorul oferit pentru întreaga parte tehnică și interpretativă legată de spectrometria de masă și tehnica de IP. Mulțumesc Dr. Livia Sima pentru suportul tehnic și ajutorul oferit în ceea ce privește parte de citometrie în flux și analiza cantitativă a datelor obținute la Tissue Facs. Mulțumesc Dr. Simona Ghenea și Dr. Tudor Selescu pentru contribuția obținerii și analizei datelor de microscopie confocală.

Mulțumesc tuturor colegilor din cadrul Institutului Pasteur din Lille, Franta (Dr. Jean Dubuisson, Dr. Yves Rouille, Dr. Laura Riva și întregului colectiv) pentru întreg ajutorul oferit pe tot parcursul celor 5 ani. Alături de aceștia, mulțumesc tuturor colegilor din cadrul Institutului de Biochimie al Academiei Române pentru întreaga colaborare și îndrumare (Emilia, Gabi, Mari, Cristi-Naruto, Florentina, Rodica, Aura, Ioana, Paula, Marius și întregului colectiv).

Adresez mulțumiri tuturor persoanelor cu care am avut plăcerea să abordez partea științifică a tezei în afara cadrului instituțional.

În încheiere, îi mulțumesc lui Evangeline, fără de care nimic nu s-ar fi realizat.

Referinte

1. André, P. *et al.* (2002) 'Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology, 76(14), pp. 6919–6928. doi: 10.1128/JVI.76.14.6919-6928.2002.
2. Balla, T. (2013) 'Phosphoinositides: Tiny Lipids With Giant Impact on Cell Regulation', *Physiological Reviews*. Bethesda, MD: American Physiological Society, 93(3), pp. 1019–1137. doi: 10.1152/physrev.00028.2012.
3. Brachmann, S. M. *et al.* (2005) 'Role of Phosphoinositide 3-Kinase Regulatory Isoforms in Development and Actin Rearrangement', *Molecular and Cellular Biology*. American Society for Microbiology, 25(7), pp. 2593–2606. doi: 10.1128/MCB.25.7.2593-2606.2005.
4. Catanese, M. T. *et al.* (2013) 'Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 110(23), pp. 9505–9510. doi: 10.1073/pnas.1307527110.
5. Choo, Q. L. *et al.* (1989) 'Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome', *Science*, 244(4902), p. 359 LP-362. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/244/4902/359.abstract>.
6. Chukkapalli, V. *et al.* (2015) 'Daclatasvir inhibits hepatitis C virus NS5A motility and hyper-accumulation of phosphoinositides', *Virology*, 476, pp. 168–179. doi: 10.1016/j.virol.2014.12.018.
7. Corey, K. E. *et al.* (2009) 'Hepatitis C Virus Infection and Its Clearance Alter Circulating Lipids: Implications for Long Term Follow-up', *Hepatology (Baltimore, Md.)*, 50(4), pp. 1030–1037. doi: 10.1002/hep.23219.
8. Dubuisson, J. and Cosset, F. L. (2014) 'Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle - An update', *Journal of Hepatology*. European Association for the Study of the Liver, 61(1), pp. S3–S13. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.
9. Eyre, N. S. *et al.* (2014) 'Dynamic Imaging of the Hepatitis C Virus NS5A Protein during a Productive Infection', *Journal of Virology*. Edited by M. S. Diamond. 1752 N St., N.W., Washington, DC: American Society for Microbiology, 88(7), pp. 3636–3652. doi: 10.1128/JVI.02490-13.
10. Gottwein, J. M. *et al.* (2011) 'Development and Application of Hepatitis C Reporter Viruses with Genotype 1 to 7 Core-Nonstructural Protein 2 (NS2) Expressing Fluorescent Proteins or Luciferase in Modified JFH1 NS5A', *Journal of Virology*. 1752 N St., N.W., Washington, DC: American Society for Microbiology, 85(17), pp. 8913–8928. doi: 10.1128/JVI.00049-11.
11. Kapoor, A. *et al.* (2011) 'Characterization of a canine homolog of hepatitis C virus', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 108(28), pp. 11608–11613. doi: 10.1073/pnas.1101794108.

12. Kutateladze, T. G. (2010) 'Translation of the phosphoinositide code by PI effectors', *Nature chemical biology*, 6(7), pp. 507–513. doi: 10.1038/nchembio.390.
13. Levrero, M. (2006) 'Viral hepatitis and liver cancer: the case of hepatitis C', *Oncogene*, 25(27), pp. 3834–3847. doi: 10.1038/sj.onc.1209562.
14. Lindenbach, B. D. *et al.* (2005) 'Complete Replication of Hepatitis C Virus in Cell Culture', *Science*, 309(5734), p. 623 LP-626. Available at: <http://science.sciencemag.org/content/309/5734/623.abstract>.
15. Maehama, T. *et al.* (2013) 'Biochemical and Biophysical Research Communications A class II phosphoinositide 3-kinase plays an indispensable role in hepatitis C virus replication', *Biochemical and Biophysical Research Communications*. Elsevier Inc., 440(1), pp. 150–156. doi: 10.1016/j.bbrc.2013.09.048.
16. Masaki, T. *et al.* (2008) 'Interaction of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 5A with Core Protein Is Critical for the Production of Infectious Virus Particles', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology (ASM), 82(16), pp. 7964–7976. doi: 10.1128/JVI.00826-08.
17. Merz, A. *et al.* (2011) 'Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome', *The Journal of Biological Chemistry*. 9650 Rockville Pike, Bethesda, MD 20814, U.S.A.: American Society for Biochemistry and Molecular Biology, 286(4), pp. 3018–3032. doi: 10.1074/jbc.M110.175018.
18. Miyanari, Y. *et al.* (2007) 'The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production', 9(9). doi: 10.1038/ncb1631.
19. Popescu, C.-I., Rouillé, Y. and Dubuisson, J. (2011) 'Hepatitis C Virus Assembly Imaging', *Viruses*. Molecular Diversity Preservation International (MDPI), 3(11), pp. 2238–2254. doi: 10.3390/v3112238.
20. Popescu, C.-I. *et al.* (2011) 'NS2 Protein of Hepatitis C Virus Interacts with Structural and Non-Structural Proteins towards Virus Assembly', *PLoS Pathogens*. Edited by C. M. Walker. San Francisco, USA: Public Library of Science, 7(2), p. e1001278. doi: 10.1371/journal.ppat.1001278.
21. Popescu, C.-I. *et al.* (2014) 'Hepatitis C Virus Life Cycle and Lipid Metabolism', *Biology*. Edited by A. Graham. MDPI, 3(4), pp. 892–921. doi: 10.3390/biology3040892.
22. Puig-Basagoiti, F. *et al.* (2005) 'High-Throughput Assays Using a Luciferase-Expressing Replicon, Virus-Like Particles, and Full-Length Virus for West Nile Virus Drug Discovery', *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. American Society for Microbiology, 49(12), pp. 4980–4988. doi: 10.1128/AAC.49.12.4980-4988.2005.
23. Pumeekochchai, W. *et al.* (2002) 'Hepatitis C Virus Particles of Different Density in the Blood of Chronically Infected Immunocompetent and Immunodeficient Patients: Implications for Virus Clearance by Antibody', 342(January), pp. 335–342. doi: 10.1002/jmv.10208.

24. Ramage, H. R. *et al.* (2015) 'A Combined Proteomics/Genomics Approach Links Hepatitis C Virus Infection with Nonsense-Mediated mRNA Decay', *Molecular cell*, 57(2), pp. 329–340. doi: 10.1016/j.molcel.2014.12.028.
25. Rodgers, M. A. *et al.* (2012) 'Lipid metabolite profiling identifies desmosterol metabolism as a new antiviral target for hepatitis C virus', *Journal of the American Chemical Society*, 134(16), pp. 6896–6899. doi: 10.1021/ja207391q.
26. Stapleford, K. A. and Lindenbach, B. D. (2011) 'Hepatitis C Virus NS2 Coordinates Virus Particle Assembly through Physical Interactions with the E1-E2 Glycoprotein and NS3-NS4A Enzyme Complexes ', *Journal of Virology*. American Society for Microbiology (ASM), 85(4), pp. 1706–1717. doi: 10.1128/JVI.02268-10.
27. Vieyres, G., Dubuisson, J. and Pietschmann, T. (2014) 'Incorporation of Hepatitis C Virus E1 and E2 Glycoproteins: The Keystones on a Peculiar Virion', *Viruses*. MDPI, 6(3), pp. 1149–1187. doi: 10.3390/v6031149.
28. Vlaicu, O. *et al.* (2017) 'Novel replicons and trans-encapsidation systems for Hepatitis C Virus proteins live imaging and virus-host interaction proteomics', *Journal of Virological Methods*. doi: 10.1016/j.jviromet.2017.04.009.
29. Zhou, X. *et al.* (2011) 'A Possible Geographic Origin of Endemic Hepatitis C Virus 6a in Hong Kong: Evidences for the Association with Vietnamese Immigration', *PLoS ONE*. Edited by A. Bertoletti. San Francisco, USA: Public Library of Science, 6(9), p. e24889. doi: 10.1371/journal.pone.0024889.