



ACADEMIA ROMÂNĂ

Școala de Studii Avansate a Academiei Române

Institutul de Biochimie al Academiei Române

REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT

**EDITĂRI GENETICE PENTRU STUDIUL PROTEINELOR
CELULARE IMPLICATE ÎN PATOLOGII**

CONDUCĂTOR DE DOCTORAT:

C.S I Dr. Nichita Norica

DOCTORAND:

Patriche David-Sebastian

2024

Cuprins

Cuprins	1
Mulțumiri.....	3
Scopul studiului	4
Introducere.....	5
1. Sinopsis teoretic.....	7
1.1. Bazele teoretice ale metodologiei investigațiilor de biochimie și biologie moleculară utilizate	7
1.2. Studiul VHB	7
1.2.1. Introducere.....	7
1.2.2. Structura VHB	8
1.3. Fosfatidilinositol 3-kinazele și fosfatidilinositol fosfatazele în studiul VHB	8
1.4. Studiul peptidei GLP1 în patologia diabetului zaharat.....	9
2. Materiale și metode	10
3. Rezultate și discuții.....	10
3.1. Investigarea rolului fosfatazei Sac1 și kinazelor (PI3KC2 β și PI3KC2 α) în ciclul de viață al VHB	10
3.1.1. Modularea stabilă a expresiei de Sac1 in celule Huh7 folosind tehnologia CRISPR/Cas9	10
3.1.2. Clonarea liniilor celulare cu expresie scăzută de Sac1	11
3.1.3. Modularea stabilă a expresiei PI3KC2 β in celule Huh7 folosind tehnologia CRISPR/Cas9	12
3.1.4. Analiza rolului PI3KC2 β în ciclul de viață al VHB	13
3.1.5. Analiza rolului PI3KC2 α în ciclul de viață al VHB	16
3.1.6. Modularea tranzientă a expresiei PI3KC2 β în celulele Huh7 prin silențiere și supraexpresie	16

3.2. Un nou sistem bazat pe fuziunea luciferazei cu peptidul GLP-1 - cu aplicații în descoperirea unor noi compuși naturali cu potențial anti-diabetic	21
4. Concluzii finale	23
Contribuții personale	24
Bibliografie.....	26

Mulțumiri

Aș vrea să mulțumesc doamnei conducător de doctorat Dr. Norica Nichita pentru îndrumarea constantă și răbdarea pe tot parcursul acestor ani, timp în care m-a ajutat să depășesc momentele dificile care apar în decursul oricărui doctorat.

De asemenea, vreau să îi mulțumesc îndrumătorului meu de doctorat, Dr. Costin-Ioan Popescu, pentru îndrumarea acordată la începutul perioadei mele de pregătire în Institutul de Biochimie, în studiul interacției VHC cu celula gazdă, care a continuat cu studiul asupra VHB, prezentat în această teză de doctorat.

Îi mulțumesc doamnei Dr. Florentina Pena pentru că mi-a oferit șansa să particip la proiectul său de cercetare, lucru care mi-a permis să studiez și o altă patologie și să progrez și mai mult în cariera de cercetător.

Mulțumesc doamnei Dr. Ștefana Petrescu și domnului Dr. Andrei Petrescu pentru că m-au ajutat să obțin finanțarea necesară implicării mele în proiectele desfășurate în Institutul de Biochimie.

Mulțumesc, de asemenea, pentru că mi-au oferit șansa să mă dezvolt prin participarea la proiectele lor de cercetare și pentru sfaturile utile primite, colegilor mei, Dr. Ioana Popa și Dr. Robi Tăcutu.

Mulțumesc tuturor colegelor mele care au contribuit alături de mine la realizarea lucrărilor pe care le-am publicat în cadrul acestui doctorat: Dr. Mirela Popescu, Dr. Olivia Dobrică, Dr. Ana Pantazică. Dr. Petruța Alexandru, Drd. Andreea Anghel, Dr. Rodica Badea, Dr. Gabriela Chirițoiu. Fără contribuția lor acest lucru nu ar fi fost posibil.

Mulțumesc prietenei mele Dr. Eliza Martin pentru sugestii și pentru ajutorul tehnic oferit la redactarea tezei.

Mulțumesc tuturor colegilor din trecut și din prezent de la Institutul de Biochimie care m-au ajutat, pentru sfaturile valoroase și pentru încurajările oferite în decursul anilor pentru realizarea experimentelor.

Mulțumesc familiei care mi-a fost alături pe tot parcursul acestui doctorat.

Scopul studiului

Diabetul zaharat și infecția cu virusul hepatic B (VHB) au un impact enorm asupra sănătății publice. La nivel global, incidența cumulată a acestora este de aproximativ 1/10, afectând 800 de milioane de oameni și provocând anual peste 8 milioane de decese (Organizația Mondială a Sănătății). Înțelegerea mecanismelor moleculare ale acestor patologii este esențială pentru tratament și conduce la progresul științific pentru control și, în cele din urmă, eradicare. În acest sens, dezvoltarea de tehnologii noi și modele experimentale relevante sunt cruciale pentru avansarea studiilor mecanistice. Progresul exponențial în domeniul geneticii din ultimele decenii a permis facilitarea acestor studii, deschizând noi orizonturi în ceea ce privește manipularea expresiei unor proteine de interes, prin modificarea rapidă și eficientă a informației genetice codificatoare.

În cadrul acestei lucrări au fost implementate două metode de alterare a expresiei unor gene de interes: sistemul „Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats”-CRISPR/Cas9 și transducția retrovirală. Au fost obținute prin CRISPR/Cas9 linii celulare clonale derivate de la celule de hepatom Huh7 cu expresie redusă a unor enzime implicate în metabolismul lipidic: Sac1 (o fosfatază care are ca substrat fosfatidil inositol -4-fosfat), PI3KC2 α și PI3KC2 β (fosfatidil inositol-3-kinaze, izoforme din clasa 2). În cazul enzimelor PI3KC2 β și PI3KC2 α studiul doctoral este o continuare a lucrării proprii de disertație în cadrul căreia secvențele „single guide” care țintesc genele PI3KC2 β și au fost clonate și unde s-a obținut o populație celulară neomogenă, cu expresie scăzută a proteinei PI3KC2 β („bulk”). Această populație a fost supusă unui proces de clonare, fiind obținute cu succes clone celulare lipsite complet de expresie pentru PI3KC2 β („knockout”). Pentru editarea genetică în scopul reducerii sintezei de proteine de interes, s-a realizat un design experimental care a condus la generarea mai multor secvențe „single guide” care țintesc gena *SACMIL*, urmată de clonarea acestora în vectorul pSpCas9-2A-Puro și obținerea de asemenea clone cu expresie redusă („knockdown”) de Sac1 și PI3KC2 α . Liniile generate în acest studiu au fost caracterizate la nivel molecular prin secvențiere, RT-qPCR și Western Blot. Pentru studii în care s-a urmărit recuperarea expresiei proteinelor țintă, gena codificatoare pentru Sac1 a fost clonată în fuziune cu secvența codificatoare pentru „Green Fluorescent Protein” (GFP), în vectorul de tip retroviral pLNCX2. Utilizând acest plasmid s-au obținut prin transducție retrovirală noi linii celulare Huh7 ce exprimă proteina de fuziune GFP-Sac1, pornind de la o clonă cu expresie redusă de Sac1. Totodată, au fost

obținute și clone celulare care exprimă din nou gena PI3KC2 β („rescue”), pornind de la clonele fără expresie („knockout”). Aceste linii celulare clonale nou generate au stat la baza unor studii funcționale privind rolul fosfatazei Sac1 și al kinazelor PI3KC2 α și PI3KC2 β în ciclul de viață al VHB. Analiza detaliată a rolului Sac1 în procesul de replicare, asamblare și trafic intracelular al particulelor VHB a fost investigat și prezentat în cadrul unei alte teze doctorale, de către colega mea, Dr. Mirela Popescu, pornind de la plasmidele de expresie și clonele celulare cu expresie modulată de Sac1 generate de mine (Popescu et al, 2022). Studiile mele, prezentate în această teză, s-au focusat pe analiza funcțională a kinazelor PI3KC2 α și PI3KC2 β și rolul acestora în infecția cu VHB, folosind ca sisteme de investigare liniile celulare modificate genetic generate. Mai mult, efectele observate a fost confirmate utilizând și o altă metodă de reducere a expresiei genice, în mod tranzient, prin interferența ARN (Patriche et al, 2022).

Expertiza mea în biologie moleculară a contribuit de asemenea la realizarea unui alt proiect în cadrul Institutului de Biochimie, în care s-a urmărit identificarea de noi compuși naturali cu activitate modulatorie asupra secreției de GLP-1, cu potențial rol în îmbunătățirea tratamentului diabetului zaharat de tip 2. În acest studiu am obținut prin transducție lentivirală o linie celulară GluTag, care asigură expresia citosolică de luciferază. În conjuncție cu o linie celulară GluTag raportor care secretă GLP-1 și luciferază în raport molar 1:1, această linie a fost folosită cu succes de către colegile mele pentru selecția rapidă („screening”) și validarea de modulatori ai secreției de GLP-1, conducând la publicarea unei lucrări unde sunt co-autor (Anghel et al, 2022). Aceste date vor fi folosite și prezentate în cadrul unei alte teze doctorale de către colega mea, Drd. Andreea Anghel.

Introducere

Această teză doctorală își propune implementarea unor tehnici de editare genetică, cum sunt sistemul CRISPR ("Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats") și transducția lentivirală pentru a facilita studiul a două patologii distincte care au un impact devastator asupra populației umane: hepatita B și diabetul zaharat.

La nivel global, în anul 2022, infecția cu virusul hepatic B (VHB) a condus la 1,1 milioane de decese, în principal din cauza cirozei și a cancerului hepatic. Se înregistrează aproximativ 1,2 milioane de noi cazuri de infecție anual. Alte 540 de milioane de oameni se

estimează că au un risc crescut de a dezvolta diabet zaharat, datorită toleranței la glucoză (Diabetes Atlas). În același an, în România au fost mai mult de 800 000 de bolnavi (Institutul Național de Sănătate Publică).

Studiul prezentat în această teză aduce contribuții asupra înțelegerii interacțiunii VHB-celulă gazdă, prin identificarea unor noi factori celulari implicați în ciclul său de viață. Acești factori sunt enzime care sunt implicate în metabolismul fosfatidilinositolului: Sac1 și izoformele α și β a fosfatidilinositol 3 kinazei de clasă 2 (PI3KC2 α și PI3KC2 β). Aceste studii s-au bazat pe obținerea de linii celulare clonale cu expresie scăzută (pentru Sac1) sau fără expresie (PI3KC2 β și PI3KC2 α), folosind tehnologia CRISPR, dar și modularea expresiei în mod transient prin experimente de supraexpresie și silențiere genetică, prin interferența ARN (Popescu et al, 2022; Patriche et al, 2022). Aceste enzime au fost identificate ca având un rol important în ciclul de viață al mai multor virusuri diferite (Polachek et al, 2016; Abere et al, 2018; O’Hanlon et al, 2019). Datorită interferenței infecției VHB cu metabolismul lipidic al celulei gazdă, ipoteza noastră de lucru a fost că fosfoinozotidele ar putea avea un rol major în etape distincte din ciclul de viață al VHB, atât direct (printr-un rol structural la nivelul membranelor celulare) cât și indirect, prin semnalizare celulară. Astfel, după generarea liniilor celulare modificate genetic, m-am focusat pe analiza funcțională a efectelor de modulare a expresiei proteinelor țintă asupra replicării, asamblării și traficului VHB (PI3KC2 α și PI3KC2 β).

Totodată, am adus contribuții într-un studiu care s-a axat pe obținerea unui sistem celular bazat pe secreția de luciferază în raport molar 1:1 cu hormonul GLP-1, în scopul identificării mai rapide a unor compuși cu activitate modulatorie asupra secreției de GLP-1. Acest hormon prezintă un rol cheie în patologia diabetului, reglând homeostazia glucozei. A fost obținută prin transducție lentivirală o linie celulară care exprimă luciferază citosolică, care a fost folosită pentru confirmarea activității compușilor selectați (Anghel et al, 2022).

1. Sinopsis teoretic

1.1. Bazele teoretice ale metodologiei investigațiilor de biochimie și biologie moleculară utilizate

Sistemul CRISPR face parte din „sistemul imunitar” al celulei procariote, care s-a dezvoltat pentru a proteja celula împotriva infecției cu fagi. Astfel, după infecția celulei gazdă cu un fag, fragmente din genomul său sunt digerate și integrate în genomul bacterian în locusuri de tip *CRISPR*, intercalate de către secvențe palindromice repetitive (Hille et al, 2018, Strich et al, 2019). Ulterior, acestea sunt transcrise împreună cu secvențele palindromice, procesate prin clivare și ulterior ghidează complexul enzimatic pentru a cliva specific secvențe din genomul fagului, recunoscute pe bază de complementaritate cu secvențele inserate în genomul bacterian în cadrul locusului CRISPR. Astfel este împiedicată progresia ciclului de viață al fagului pe baza unui tip de memorie imunologică (Hille et al, 2018). O secvență ARN este necesară în cadrul acestui proces, denumită tracrRNA (ARN CRISPR „trans activator”). Acest ARN hibridizează cu secvența repetitivă („spacer”), formând un complex și ghidând astfel enzima Cas9 spre a cliva orice secvență din genomul fagului care conține secvența de 20 de nucleotide complementară și secvența adiacentă PAM. (Jiang et al, 2017). Enzima Cas9 conține două domenii cu activitate nucleazică care clivează catena complementară și catena necomplementară cu secvența single guide (denumite RuvC și HNH) (Ma et al, 2014) Există mutații care inactivează câte un situs catalitic (D10A în domeniul RuvC și H840A în domeniul HNH) și astfel transformă enzima prin pierderea parțială a funcției de hidroliză în forme pe jumătate active, denumite „nickaze” (Cas9n), capabile de a scinda doar o singură catenă, nu ambele, precum forma de tip sălbatic. Acest sistem prezintă o specificitate mai mare pentru că sunt necesare două secvențe „single guide” (Ran et al, 2013).

1.2. Studiul VHB

1.2.1. Introducere

Aproximativ 250 de milioane de persoane suferă de infecție cronică cu VHB, iar anual sunt înregistrate peste un milion de cazuri noi de infecție la nivel global și peste un milion de decese ca urmare a cirozei și cancerului hepatic produse de infecția cu VHB, în ciuda faptului că există un vaccin extrem de eficient (Organizația Mondială a Sănătății).

Hepatita virală de tip B nu este curabilă în acest moment. Tratamentul pentru infecția cronică constă în administrarea de medicamente antivirale, cum ar fi tenofovirul sau entecavirul. După ce este început, tratamentul antiviral în general trebuie continuat pe tot parcursul vieții. (Organizația Mondială a Sănătății).

1.2.2. Structura VHB

VHB este un virus cu genom ADN, anvelopat, din familia Hepadnaviridae. În sângele pacienților infectați se disting două tipuri diferite de particule, de 42 de nm care conțin genomul viral și sunt infecțioase și particule de 22 de nm care nu conțin genomul viral și nu sunt infecțioase. (Tsukuda et al, 2020, Chai et al, 2008). Genomul are o lungime de aproximativ 3.2 de kpb și se prezintă sub formă de ADN relaxat circular care este parțial dublucatenar, având catena minus completă și catena plus incompletă. (Tong et al, 2016).

1.3. Fosfatidilinositol 3-kinazele și fosfatidilinositol fosfatazele în studiul VHB

Fosfatidilinositol 3-kinazele (PI3K) sunt enzime care fosforilează fosfatidil inositolul (PI), modificând compoziția membranelor celulare și așadar având roluri de importanță majoră în procese cum ar fi semnalizarea celulară sau traficul celular. Acestea sunt împărțite în 3 clase, după structură și specificitatea față de substrat. (Thibault et al, 2023). Fosfatidil inositol 3-kinazele de clasă II (PI3KC2) rămân clasa cea mai puțin studiată. Cu toate acestea, studii noi arată importanța tot mai mare a acestei clase în diverse procese, cum ar fi proliferarea, migrarea sau replicarea virală. Există 3 izoforme ale acestor enzime, denumite PI3KC2 α , PI3KC2 β și PI3KC2 γ , care au funcții distincte ce nu se suprapun. Producția de reacție sunt diferiți față de producția de reacție ai enzimelor de clasă I. Spre deosebire față de acestea din urmă, PI3KC2 produc PI 3-monofosfat și PI 3,4-difosfat, în timp ce enzimele de clasă I produc PI 3,4, 5-trifosfat, fapt ce indică acțiunea diferită a lor prin intermediul altor căi. În general, PI3KC1 au rol direct în semnalizarea celulară prin receptori legați la membrana plasmatică și GTP-aze, pe când PI3KC2 și PI3KC3 au roluri predominant în traficul intracelular (Yoshioka et al, 2021).

Fosfatazele implicate în metabolismul PI, au de asemenea funcții cruciale de semnalizare la nivelul membranelor celulare. Prin activitatea sa unică, de defosforilare a

fosfatidil inositol-4-fosfat (PI4P), Sac1 contribuie decisiv la menținerea nivelului intracelular de PI4P, reglând multiple procese celulare, printre care organizarea citoscheletului, traficul vezicular intermembranar, semnalizarea celulară (Del Bel et al, 2018). Toate aceste procese sunt relevante pentru interacția dintre un agent patogen și celula gazdă, motiv pentru care Sac1 a fost considerată o țintă posibilă pentru modularea infecției cu VHB.

1.4. Studiul peptidei GLP1 în patologia diabetului zaharat

Diabetul zaharat este o boală cronică ce se produce fie datorită distrugerii mediate autoimun a celulelor β din insulele Langerhans, rezultând lipsa producției de insulină (diabet zaharat de tip I) fie datorită rezistenței țesuturilor țintă la insulina produsă (diabet zaharat de tip II). Hiperglicemia este consecința acestor două afecțiuni în lipsa tratamentului și conduce la efecte grave asupra organismului precum neuropatie periferică, retinopatie, nefropatie sau complicații cardiovasculare (Krause et al 2023). În anul 2014 8,5% dintre adulți aveau diabet zaharat. În anul 2019 diabetul zaharat a fost cauza decesului a 1,5 milioane de oameni (OMS).

Peptidele GLP-1 și GLP-2 sunt peptide secretate de către celulele enteroendocrine L localizate predominant în intestinul subțire distal și colon în urma ingestiei de nutrienți. Împreună cu glucagonul își au originea în aceeași moleculă precursoră, proglucagonul, însă au funcții complet divergente. GLP-1 are funcție insulino-tropică și glucagonostatică (Marathea et al, 2013).

Secretia de GLP-1 poate fi stimulată de diverși nutrienți, cum ar fi glucoza, alte zaharide, acizi grași, amino acizi esențiali sau fibre. (Baggio et al, 2007). După secreție, timpul de înjumătățire al GLP-1 este foarte scurt, de 60-90 de secunde, datorită inactivării sale rapide de către enzima DPP-4 (dipeptidil peptidaza 4) (Hui, et al, 2002).

2. Materiale și metode

Am realizat modularea stabilă a expresiei genelor țintă prin implementarea unor tehnici de editare genetică cum ar fi sistemul CRISPR/Cas9 și transducția retrovirală în linia celulară Huh7. Secvențele care țintesc aceste gene au fost clonate, precum și gena de fuziune GFP-Sac1. Analiza expresiei acestor gene a fost realizată la nivel de ARN mesager prin RT-qPCR și la nivel proteic prin Western Blot. Liniile celulare obținute au fost utilizate ca model pentru studiul rolului PI3KC2 β în ciclul de viață al VHB. Nivelurile de particule subvirale au fost analizate prin ELISA și nivelurile de ADN viral au fost analizate prin qPCR.

Transducția retrovirală a fost utilizată și pentru obținerea liniei GluTag cu expresie citosolică de luciferază.

3. Rezultate și discuții

3.1. Investigarea rolului fosfatazei Sac1 și kinazelor (PI3KC2 β și PI3KC2 α) în ciclul de viață al VHB

Derivații de la fosfatidilinositol au fost identificați ca având un rol important în ciclul de viață al multor virusuri ARN cu sens pozitiv, cum sunt membri din familiile flavivirusurilor sau picornavirusurilor (Roulin et al., 2014; Li et al., 2014). În cadrul grupului, fosfataza Sac1 și fosfatidilinositol 3-kinazele au fost studiate în contextul impactului asupra ciclului de viață al VHC (date nepublicate) folosind ca model linia celulară Huh7. Această experiență anterioară cu aceste ținte a înlesnit efectuarea studiului asupra rolului lor în ciclul de viață al VHB.

3.1.1. Modularea stabilă a expresiei de Sac1 in celule Huh7 folosind tehnologia CRISPR/Cas9

Întrucât deleția homozigotă a genei Sac1 a fost descrisă anterior ca fiind letală (Liu et al, 2008) s-a urmărit obținerea clonelor celulare cu expresie scăzută și nu a clonelor

celulare fără expresie, de tip „knockout”. Pentru acest scop am folosit secvențe „single guide” care țintesc regiunea 5' netranscrisă (5'UTR), înainte de codonul start ATG al genei *SACMIL*, plecând de la ipoteza că astfel ar putea fi obținute clone doar cu expresie mai scăzută, viabile. Pentru aceasta, s-au selectat 4 secvențe „single guide” întrucât din punct de vedere experimental abilitatea unei secvențe „single guide” de a produce mutația dorită nu poate fi anticipată cu certitudine, doar prin analiza bazelor de date ale genomurilor de referință. Unul din motivele pentru aceasta, ar putea fi numărul mare de mutații pe care liniile celulare îl pot avea, în special datorită faptului că majoritatea sunt derivate de la diferite forme de cancer. Cele 4 secvențe au fost clonate în vectorul pSpCas9-2A-Puro. Pentru studii de „gain of function” s-a clonat Sac1 în fuziune cu GFP, rezultând vectorii pLNCX-GFP și pLNCX-GFP-Sac1.

3.1.2. Clonarea liniilor celulare cu expresie scăzută de Sac1

Dintre cele 4 secvențe single guide clonate în vectorul pSpCas-2A-Puro a fost selectată secvența TAGAGTTGTAGCCGAGGTGG întrucât aceasta avea cea mai mică probabilitate de a introduce mutații nespecifice în ADN genomic comparativ cu celelalte 3 secvențe single guide descrise anterior. A fost folosit un sistem CRISPR bazat pe enzima Cas9 derivată de la *S. pyogenes* de tip sălbatic, care clivează ambele catene de ADN și produce o tăiere cu capete drepte. În timpul și după selecția cu puromicină după transfecție s-a observat că un procent semnificativ din celule nu au supraviețuit, ceea ce ar putea fi explicat prin letalitatea deleției genei *SACMIL*. Celulele netransfectate nu au supraviețuit tratamentului cu puromicină, iar celulele transfectate nu au fost viabile datorită deleției homozigote. După eliminarea antibioticului de selecție din mediu, populația celulară obținută a fost clonată prin metoda diluțiilor seriale, obținându-se un număr de clone celulare care au fost ulterior testate pentru expresia de Sac1, atât la nivel de ARN cât și al expresiei proteice (Popescu et al, 2022). Clona cu expresie redusă Sac(-)c1 a fost transdusă cu particulele retrovirale obținute și în urma selecției pe bază de geneticină a fost obținută o

linie celulară cu expresie de proteină de fuziune GFP-Sac1. Expresia a fost confirmată prin Western Blot, obținându-se o bandă la masa de aproximativ 75 kDa, obținându-se clone cu expresie diferită de proteină de fuziune. Expresia a fost confirmată în triplicat biologic prin Western Blot utilizând atât anticorpi anti Sac1, cât și anticorpi anti GFP.

Analiza funcțională a liniilor stabile cu expresie modulată de Sac1 și consecințele acestei expresii asupra ciclului de viață al VHB, s-au investigat în cadrul unei alte teze de doctorat, de către colega mea, Popescu Mirela. Astfel s-a demonstrat faptul că Sac1 este un factor celular important în ciclul de viață al VHB, aceste date fiind confirmate și prin experimente de modulare a expresiei genice în tranzient. Datele obținute în aceste studii au fost publicate în revista Farmacia (Popescu et al, 2022).

3.1.3. Modularea stabilă a expresiei PI3KC2 β în celule Huh7 folosind tehnologia CRISPR/Cas9

Obținerea clonelor knockout pentru gena PI3KC2 β

O populație celulară derivată de la linia parentală Huh7 de tip „bulk”, cu expresie redusă a genei PI3KC2 β a fost obținută utilizând un sistem CRISPR/Cas9n (de tip „nickază”) în cadrul lucrării proprii de disertație, pornind de la design-ul și clonarea unor secvențe „single guide”. Pornind de la această populație heterogenă cu expresie redusă s-a realizat clonarea prin metoda diluțiilor seriale și a fost obținut un număr de clone cu expresie scăzută. Nivelul de expresie al acestei gene la nivel proteic a fost analizat prin Western Blot utilizând drept „loading control” tubulina și s-a arătat obținerea mai multor clone fără expresie de PI3KC2 β de tip „knockout”: b3, b5 și b6, precum și o clonă cu expresie redusă (b1) (**Figura 3.1**.) (Patriche et al, 2022).

Au fost obținute extracte proteice din celulele control Huh7 și patru clone celulare obținute prin CRISPR: b1, b3, b5 și b6. Au fost încărcate într-un gel de poli(acrilamidă) cantități egale din aceste extracte și expresia proteică a fost determinată prin Western Blot utilizând anticorpi specifici. Se evidențiază absența benzii de la aproximativ 190 kDa corespunzătoare genei PI3KC2 β în cazul clonelor b3, b5 și b6 și o intensitate mai redusă în cazul clonei b1 (**Figura 3.1**).

Analiza expresiei de PI3KC2 β în liniile celulare clonale Huh7

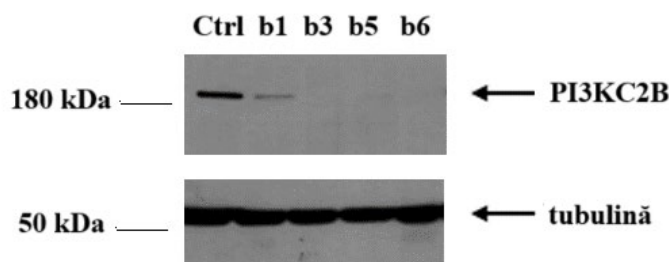


Figura 3.1. Analiza expresiei de PI3KC2 β în liniile celulare clonale Huh7. A fost confirmată absența sau reducerea expresiei de PI3KC2 β prin Western Blot în clonele analizate prin comparație cu celulele control (Huh7). Drept „loading control” a fost utilizată tubulina. Adaptat după Patriche et al., 2022.

3.1.4. Analiza rolului PI3KC2 β în ciclul de viață al VHB

Analiza secreției de particule virale și subvirale.

Liniile celulare obținute, cât și clonele fără expresie de PI3KC2 β au fost transfectate cu plamidul pTriEx-HBV1.1 ce conține întreg genomul VHB și s-a analizat dacă această deleție are impact asupra ciclului de viață al VHB. Linia celulară Huh7 este permisivă pentru replicarea VHB, însă nu poate facilita ciclul de viață complet al virusului. Așadar pentru studii care folosesc drept model linia celulară Huh7 este necesar să se transfecteze întreg genomul viral. Utilizând drept control linia parentală Huh7, s-a analizat prin ELISA cantitatea de particule subvirale secretate la două intervale de timp: la 7 și la 9 zile de la transfecție. S-a observat o scădere cu aproximativ 50% a cantității de particule subvirale secretate la ambele intervale de timp în cazul clonelor de tip „knockout” b3 și b5, dar și a populației „bulk” (**Figura 3.2**).

Totodată s-a cuantificat și secreția de ADN viral encapsidat la ziua 9 de la transfecție prin qPCR utilizând o curbă standard, atât secretat (**Figura 3.3**), cât și intracelular (**Figura 3.4B B**). S-a observat aceeași scădere de aproximativ 50% a nivelului de ADN viral. Analiza ADN viral la intervale mai scurte de timp de la transfecție poate avea o relevanță mai mică datorită posibilei contaminări cu ADN plasmidial care este amplificat, deoarece conține

întreg genomul VHB, inclusive regiunea țintită de primerii folosiți pentru analiză. A fost determinat prin ELISA și nivelul de antigen HBs intracelular tot în ziua 9 (Figura 3.4. A) (Patriche et al, 2022).

Secreția HBsAg din celule Huh7 knockout pentru PI3KC2 β .

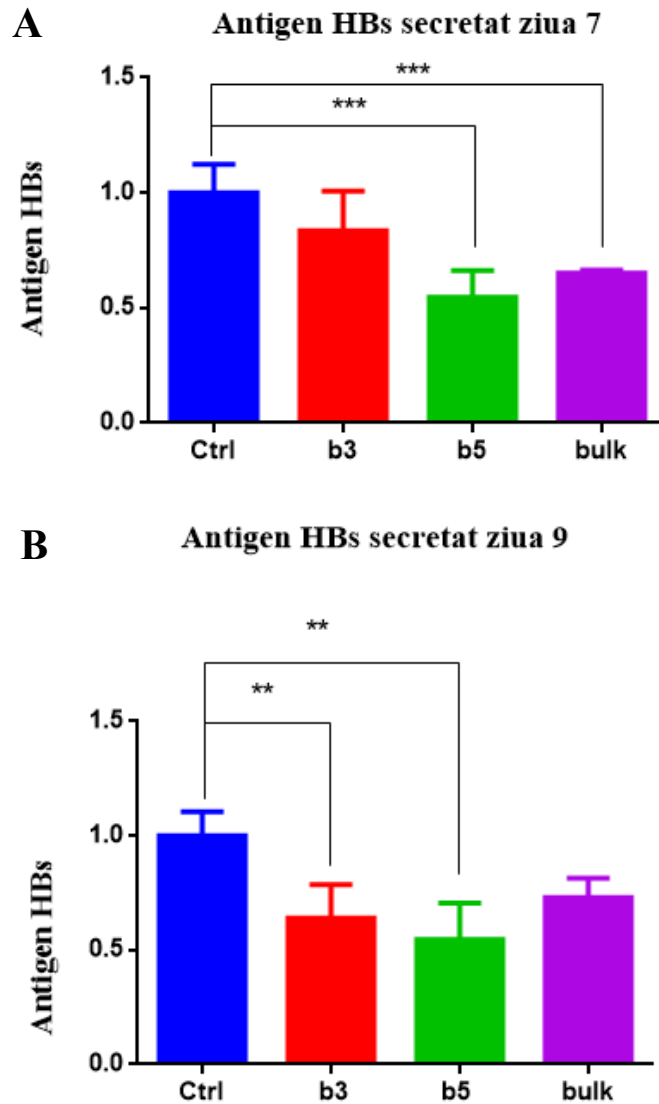


Figura 3.2. Secreția HBsAg din celule Huh7 „knockout” pentru PI3KC2 β . Celulele control și clonele de tip „knockout” b3, b5 și populația cu expresie redusă „bulk” au fost transfectate cu plasmidul pTriEx-HBV1.1 și s-a analizat secreția de antigen HBs prin ELISA în zilele 7 și 9 de la transfecție și s-a exprimat ca fracție din control. Au fost calculate valorile p utilizând testul „t student” pentru grupurile de replicate biologice. Adaptat după Patriche et al., 2022

Secreția de particule virale VHB din celule Huh7 „knockout” pentru PI3KC2β

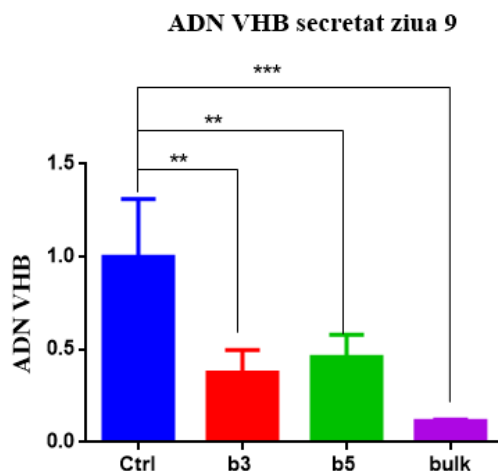


Figura 3.3. Secreția de particule virale VHB din celule Huh7 „knockout” pentru PI3KC2β. Au fost purificate nucleocapsidele VHB iar nivelurile de ADN viral secretat au fost determinate prin qPCR la ziua 9 de la transfecție și exprimate ca procent din control. Au fost comparate clonele „knockout” b3, b5 și populația cu expresie redusă „bulk” cu celulele control, reprezentate de linia parentală Huh7 (Ctrl). Valorile p pentru grupurile de replicare biologice au fost calculate utilizând testul t student. Adaptat după Patriche et al., 2022

Analiza antigenului HBs intracelular și cuantificarea particulelor virale VHB

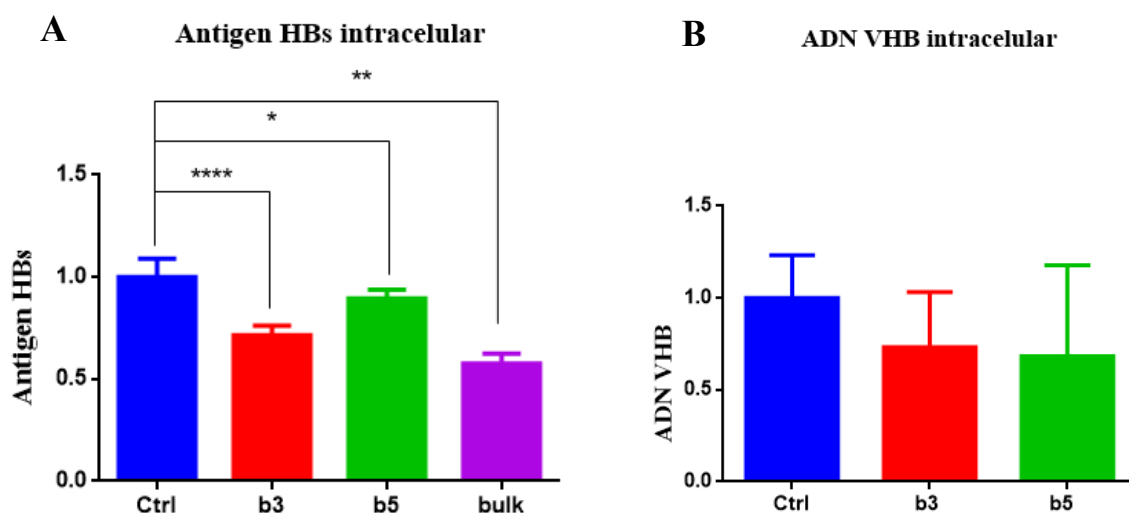


Figura 3.4. Analiza antigenului HBs intracelular și cuantificarea particulelor virale VHB. Celulele Huh7 „knockout” pentru PI3KC2β au fost transfectate cu plasmidul pTriEx-HBV1.1 și s-au analizat nivelurile de antigen HBs prin ELISA în ziua 9 (A) și nivelurile de particule virale VHB prin qPCR de la transfecție (B) și s-au exprimat ca fracție din control

(Ctrl). Au fost calculate valorile p utilizând testul „t student” pentru grupurile de replicare biologice. Adaptat după Patriche et al., 2022

3.1.5. Analiza rolului PI3KC2 α în ciclul de viață al VHB

A fost analizat impactul asupra ciclului de viață al VHB și al unei deleții a unei alte izoforme a genei PI3KC2, PI3KC2 α . Au fost obținute clone fără expresie pentru PI3KC2 α tot prin CRISPR/Cas9, pornind de la clonarea în vectorul pSpCas-2A-Puro și design-ul unor secvențe „single guide” ce țintesc izoforma α . După confirmarea obținerii clonelor celulare cu expresie redusă sau absentă s-au făcut studii funcționale asupra rolului în ciclul de viață al VHB, dar nu s-a putut pune în evidență un efect, probabil din cauza fenomenului de compensare des întâlnit în timpul selectării clonelor stabile cu expresie redusă sau fără expresie prin CRISPR/Cas9.

3.1.6. Modularea tranzientă a expresiei PI3KC2 β în celulele Huh7 prin silențiere și supraexpresie

Clonarea celulară poate avea frecvent ca efect nedorit și selectarea unor clone ce prezintă mutații aleatorii, multe dintre ele având un potențial efect asupra ciclului de viață viral. Pentru a valida aceste rezultate din clonele obținute prin CRISPR s-a studiat efectul scăderii expresiei genei PI3KC2 β într-un sistem tranzient utilizând silențierea prin „siRNA” („small interfering RNA”).

Astfel, celulele Huh7 au fost transfectate cu un „siRNA” control, ce nu are efecte de silențiere genetică și un „siRNA” care țintește gena PI3KC2 β . Totodată ele au fost transfectate și cu plasmidul pTriEx-HBV1. În ziua 5 a experimentului ele au fost tripsinizate, resuspendate și transfectate din nou cu „siRNA” pentru a menține scăzut nivelul de expresie. S-a analizat nivelurile de antigen HBs secretat (**Figura 3.5 A**), de antigen HBs intracelular (**Figura 3.5 B**) și de AND viral, obținându-se scăderi de aproximativ 25-40%, (**Figura 3.6**). Aceste scăderi mai reduse pot fi puse pe seama faptului că prin interferența ARN nu sunt reduse la zero nivelurile de expresie, ca în cazul liniilor de knockout, ci doar reduse.

Analiza antigenului HBs secretat și intracelular în linia celulară Huh7 în urma transfecției cu siRNA

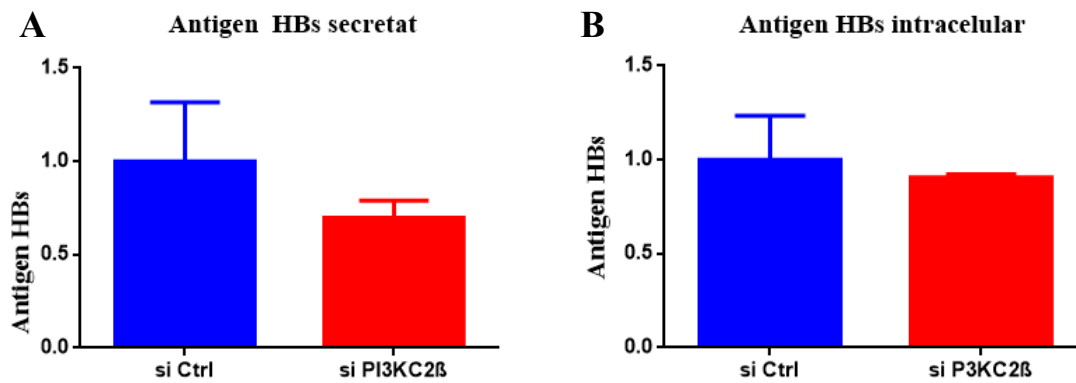


Figura 3.5. Analiza antigenului HBs secretat și intracelular în linia celulară Huh7 în urma transfecției cu siRNA. Celulele Huh7 au fost transfectate cu plasmidul pTriExHBV1.1 și cu „siRNA” control (Ctrl) și „siRNA” care țintește gena PI3KC2β. Au fost analizate prin ELISA nivelurile de antigen HBs secretate (A) și intracelulare (B) și s-au exprimat ca fracție din control.

Analiza particulelor virale VHB intracelulare în linia celulară Huh7 în urma transfecției cu siRNA

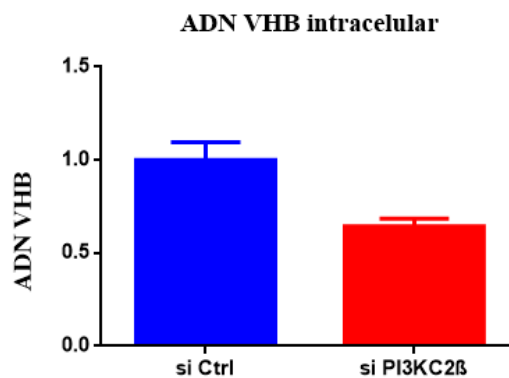


Figura 3.6. Analiza particulelor virale VHB intracelulare în linia celulară Huh7 în urma transfecției cu siRNA. Celulele Huh7 au fost transfectate cu plasmidul pTriExHBV1.1 și cu „siRNA” control (Ctrl) și „siRNA” care țintește gena PI3KC2β și au fost analizate prin qPCR nivelurile de particule virale VHB intracelulare și s-au exprimat ca fracție din control.

Au fost obținute extracte proteice din celulele Huh7 în urma transfecției cu siRNA control (siCtrl) și cu o secvență care țintește gena PI3KC2β (siPI3KC2β). Cantități egale au fost încărcate într-un gel de poliacrilamidă și expresia proteică a fost cuantificată prin Western Blot. Se observă scăderea intensității benzii de la aproximativ 190 kDa (corespunzătoare genei de interes) comparativ cu intensitatea benzii din control. (**Figura 3.7**).

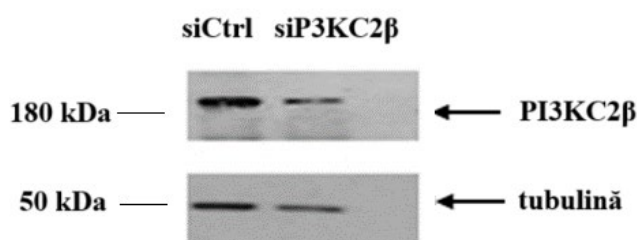
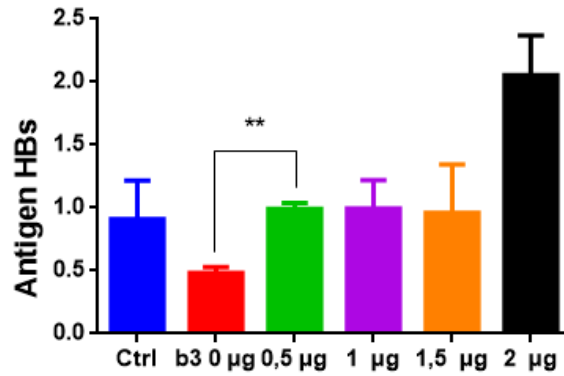


Figura 3.7. Analiza expresiei de PI3KC2β în liniile celulare clonală Huh7 în urma transfecției cu siRNA. A fost confirmată reducerea expresiei de PI3KC2β prin Western Blot în celulele transfectate cu „siRNA” care țintește gena de interes. Drept control au fost utilizate celulele Huh7 transfectate cu „siRNA” control. Drept genă de referință a fost utilizată tubulina.

Pentru a valida și mai departe aceste rezultate s-a realizat un experiment de recuperare a fenotipului „rescue” în sistem tranzient, prin care am urmărit să reintroduc gena PI3KC2β în celulele Huh7 fără expresie. Astfel, s-a selectat clona b3 (datorită similitudinii din punct de vedere al fenotipului și al vitezei de proliferare) și a fost transfectată cu cantități crescânde din plasmidul pMyc-DDK-PI3KC2β (Origene, nr. de catalog RC218354), care exprimă gena de interes și au fost analizate nivelurile de particule subvirale și ADN viral secretate. Pentru normalizare s-a adus concentrația totală de ADN transfectat pe godeu la 2μg folosind vectorul gol pcDNA3.1. Controlul este reprezentat de celulele Huh7 parentale transfectate doar vectorul gol pcDNA3.1. Se observă o creștere atât în cazul particulelor subvirale, cât și în cazul ADN viral direct proporțională cu cantitatea de plasmid ce exprimă PI3KC2β transfectat (**Figura 3.8, 3.9**).

A Antigen HBs secretat tranfecția 2 24h



B Antigen HBs secretat tranfecția 2 72h

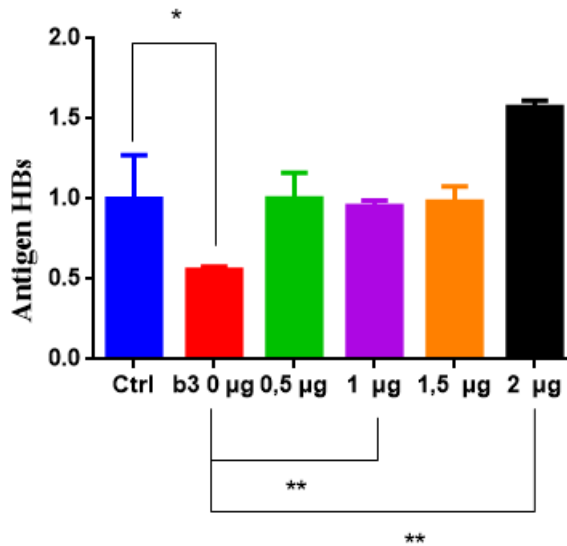


Figura 3.8. Analiza antigenului HBs secretat și în linia celulară Huh7 în urma experimentului de recuperare a fenotipului („rescue”). Au fost co-transfectate celulele Huh7 fără expresie de PI3KC2 β (clona b3) cu plasmidul pTriEx-HBV1.1 și cu cantități crescânde din plasmidul pMyc-DDK-PI3KC2 β . Cantitatea de ADN totală transfectată a fost adusă la 2 μ g/godeu utilizând vectorul gol pcDNA3.1. Drept control s-au folosit celulele Huh7 parentale transfectate cu 2 μ g de vector gol pcDNA3.1. A fost analizată prin ELISA secreția de antigen HBs secretat la 24(A) și 72(B) de ore post-transfecție. Valorile p pentru grupurile de replicate biologice au fost determinate utilizând testul „t student”.

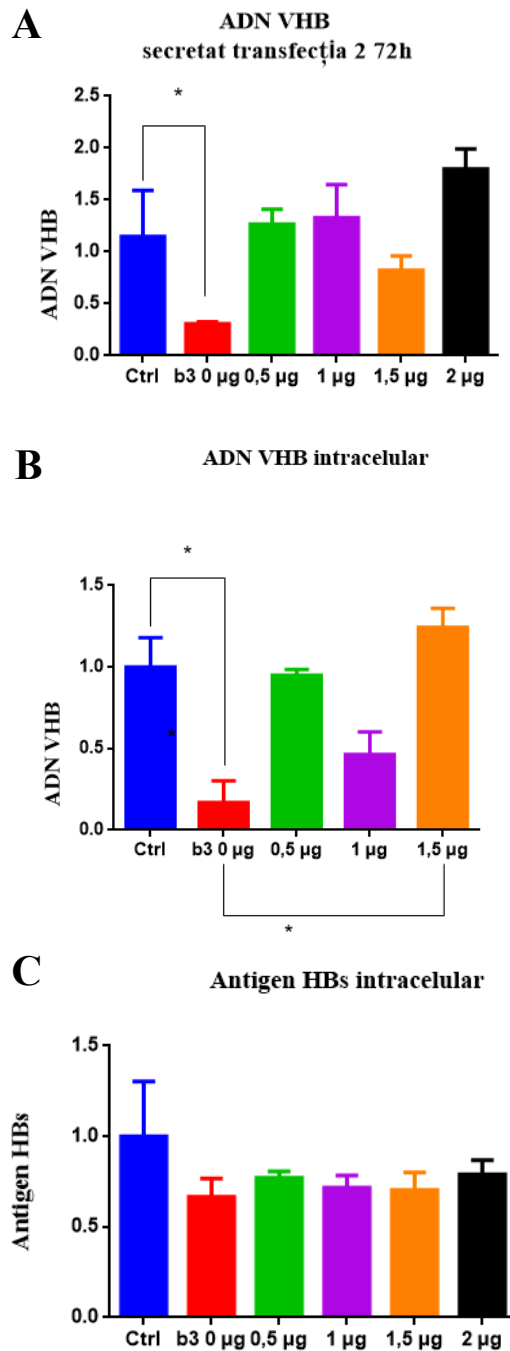


Figura 3.9. Analiza antigenului HBs intracelular precum și a particulelor virale VHB secretate și intracelulare în urma experimentului de recuperare a fenotipului („rescue”). Au fost co-transfectate celulele Huh7 fără expresie de PI3KC2 β (clona b3) cu plasmidul pTriEx-HBV1.1 și cu cantități crescânde din plasmidul pMyc-DDK-PI3KC2 β ce exprimă PI3KC2 β . Cantitatea de ADN totală transfectată a fost adusă la 2 μ g/godeu utilizând vectorul gol pcDNA3.1. Drept control s-au folosit celulele Huh7 parentale transfectate cu 2

μg de vector gol pcDNA3.1. A fost analizată prin qPCR (după 72 de ore post-transfecție) cantitatea de VHB atât extracelular (A) (secretat), cât și intracelular (B), precum și cantitatea de antigen HBs intracelulară prin ELISA (C). Valorile p pentru grupurile de replicare biologice au fost determinate utilizând testul „t student”. Adaptat după Patriche et al., 2022.

Expresia exogenă de PI3KC2 β conduce la recuperarea nivelurilor de particule virale și subvirale din control și în cazul punctelor de 1,5 sau 2 μg chiar la depășirea lor.

În concluzie s-a determinat că enzima PI3KC2 β are un rol important în ciclul de viață al VHB, în timp de izoforma α nu este implicată. Rolul acesta a fost confirmat prin mai multe metode de scădere a expresiei, în mod stabil sau tranzient. Mai mult, recuperarea fenotipului prin introducerea expresiei exogene întărește și mai mult această concluzie, a implicării sale în ciclul de viață viral al VHB. Calea de semnalizare mTOR/Akt este un regulator negativ al autofagiei, un proces esențial în ciclul de viață al acestui virus. Astfel, aceasta ar fi o posibilă explicație pentru scăderile de particule virale și subvirale observate, însă sunt necesare studii mai aprofundate asupra acestei ipoteze, ca o perspectivă a acestei lucrări (Patriche et al, 2022). Totodată trebuie investigat și rolul celei de a treia izoforme, izoforma γ .

3.2. Un nou sistem bazat pe fuziunea luciferazei cu peptidul GLP-1 - cu aplicații în descoperirea unor noi compuși naturali cu potențial anti-diabetic

Hormonul GLP-1 este o importantă țintă terapeutică în patologia diabetică, analogii sintetici ai acestuia de tipul semaglutidei și-au dovedit un important rol terapeutic (Rubino et al, 2021). O altă abordare este constituită de găsirea de molecule ce induc secreția de GLP-1. Pentru aceasta, un model celular important pentru testarea de molecule cu acțiune modulatorie este reprezentat de linia celulară enteroendocrină murină GLUTag, derivată de la o tumoră intestinală datorită faptului că redă în mod fidel secreția fiziologică de GLP-1 ca răspuns la diferite substanțe (Gil-Lozano et al, 2015). Luciferaza NanoLuc este cea mai nouă luciferază disponibilă comercial. Este o proteină de 19.1 kDa care folosește substratul furimazină și produce luminescență cu intensitate semnificativă (England et al, 2016).

Linia GLUTag reprezintă un model celular util în studiul compușilor cu activitate modulatorie asupra secreției de GLP-1. Însă impedimentele acestor studii sunt reprezentate

de protocolul mai laborios pentru determinarea acestei peptide, de costul ridicat (kit ELISA) (Anghel et al, 2022). A fost necesară dezvoltarea unui alt sistem pentru a facilita aceste experimente de secreție, pentru a reduce costurile și timpul de lucru și pentru a crește nivelul de încredere în datele obținute. Astfel a fost realizată prin transducție lentivirală o linie celulară care exprimă gena de fuziune preproglucagon-NanoLuc și care prezintă situsuri de clivare proteolitică, proteina fiind astfel scindată astfel încât sunt secretate în raport molar 1:1 luciferaza NanoLuc și GLP-1 (Anghel et al, 2022). Aceste rezultate au fost obținute de către colegile mele, Drd. Andreea Anghel, Dr. Rodica Badea, Dr. Gabriela Chirițoiu, Dr. Petruța Alexandru și Dr. Florentina Pena și vor fi detaliate în cadrul unei alte teze doctorale. Acest concept experimental al utilizării unei linii raportor bazate pe o luciferază a fost descris anterior pentru a studia secreția unei alte peptide implicate în patologia diabetului (Burns et. al., 2015)

Măsurarea activității luciferazei este direct proporțională cu nivelul de secreție al GLP-1 în cadrul acestui sistem. Însă testarea de noi compuși chimici utilizând ca model culturile celulare ridică problema toxicității care poate conduce la rezultate eronate prin liza celulelor și eliberarea luciferazei în mediu în mod nespecific împreună cu alte proteine celulare. Pentru a adresa această problemă, în cadrul lucrării doctorale, am obținut linia GLUTagNanoLuc (cu expresie citosolică de luciferază) prin transducție lentivirală utilizând vectorul pLenti6.2-Nanoluc-ccdB. Astfel, dacă un compus prezintă o astfel de toxicitate, va crește și activitatea luciferazei cu expresie citosolică. Linia aceasta reprezintă la rândul său un sistem convenabil pentru testarea toxicității compușilor. Mai mult, este cu atât mai importantă întrucât permite testarea aceasta în condiții experimentale care redau fidel pe cele din timpul experimentelor de secreție a GLP-1 (Anghel et al, 2022).

În concluzie, editarea genomului utilizând transducția a fost aplicată din nou pentru obținerea liniei control care exprimă luciferază citosolică, care a fost utilizată mai departe în fluxul de lucru experimental într-un studiu care a condus la identificarea de noi compuși naturali secretagogi ai GLP-1 și la obținerea unui sistem de linii celulare care permit screening-ul de compuși chimici. Mai mult, a fost optimizat un protocol de transducție lentivirală pentru această linie celulară, ceea ce permite aplicații pentru studiul altor proteine țintă celulare în patologia diabetului zaharat, dar și în alte patologii.

4. Concluzii finale

În cadrul tezei au fost aplicate tehnici de manipulare genetică, cum ar transducția lentivirală și sistemul CRISPR/Cas9 în scopul obținerii de linii celulare modificate genetic, care au fost folosite ca unelte importante în studii ale hepatitei B și a diabetului zaharat, aceste două patologii având o incidență cumulată uriașă, ele afectează aproximativ 800 de milioane oameni, reprezentând aproximativ 1/10 din populația planetei.

Au fost obținute prin intermediul CRISPR în linia celulară Huh7 clone cu expresie redusă sau fără expresie a genelor studiate. Aceste linii celulare produse au condus la descoperirea a doi factori celulari care sunt implicați în ciclul de viață al VHB: Sac1 și izoforma β a PI3K.

Totodată, au fost clonate și validate secvențe single guide pentru CRISPR, precum și gena de fuziune GFP-Sac1 într-un vector retroviral, care pot fi folosite și pentru generarea de clone cu expresie modificată în alte linii, pentru alte studii. Următorul pas ar fi obținerea unor clone celulare cu expresie redusă de PI3K β derivate de la linia HepG2-NTCP, care este permisivă pentru infecția cu VHB și astfel permite studierea întregului său ciclu de viață, spre deosebire de linia Huh7, care nu permite infecția.

Cercetările asupra acestor factori celulari enzimatici pot fi extinse prin căutarea de inhibitori ai lor în contextul infecției cu VHB, având în vedere că la momentul actual nu există un tratament medicamentos care să fie capabil să elimine infecția complet. Un alt dezavantaj al medicamentelor antivirale este că acestea țintesc enzime virale, iar genele virale suferă foarte frecvent mutații care conduc la rezistență, în timp ce genele gazdei au o frecvență foarte scăzută a mutațiilor. Totodată cercetările asupra acestor factori pot fi extinse și către VHD, întrucât co-infecția cu aceste două virusuri reprezintă cea mai gravă formă de hepatită virală.

În paralel am produs și o populație celulară derivată de la linia enteroendocrină GLUTag cu expresie de luciferază citosolică (GLUTag-NLuc), ce a fost utilizată pentru validarea unui sistem celular facil și economic într-un studiu care a identificat molecule naturale din plante care induc secreția GLP-1 (quercetina). Ca perspective, acest sistem poate fi folosit pentru identificarea de noi compuși cu acțiune modulatorie asupra secreției de GLP-1, care pot ulterior pot fi folosiți ca medicamente antidiabetice.

Contribuții personale

Pe parcursul tezei de doctorat am obținut personal următoarele rezultate originale:

1. Clonarea în vectorul pSpCas9BB2A-Puro a unor secvențe „single guide” cu design original, care țintesc gena codificatoare pentru proteina Sac1, folosind tehnologia CRISPR.
2. Obținerea prin CRISPR a unor clone cu expresie redusă („knockdown”) de Sac1 derivate de la linia Huh7, punerea în evidență a mutațiilor produse prin secvențiere, și caracterizarea moleculară a clonelor prin verificarea prin PCR cantitativ a scăderii nivelului de ARNm și verificarea scăderii expresiei proteice prin Western Blot.
3. Clonarea genei de fuziune GFP-Sac1 în vectorul pLNCX2, producția de particule retrovirale și utilizarea lor pentru a produce linii cu expresie a acestei proteine de fuziune.
4. Obținerea de clone cu expresie scăzută (“knockdown) sau fără expresie („knockout”) de PI3KC2 β pornind de la o populație celulară heterogenă cu expresie scăzută obținută anterior prin tehnologia CRISPR în linia Huh7, în cadrul tezei mele de disertație și verificarea nivelului de expresie proteică prin Western Blot.
5. Identificarea PI3KC2 β ca fiind un factor celular implicat în ciclul de viață al VHB utilizând aceste clone și prin experimente de recuperare a fenotipului prin expresia tranzientă de PI3KC2 β în celulele fără expresie de tip „knockout”. Aceste rezultate au fost validate și prin silențierea tranzientă prin intermediul interferenței ARN.
6. Obținerea unei populații celulare derivate de la linia GLUTag cu expresie de luciferază citosolică prin transducție utilizând particule lentivirale produse pornind de la vectorul pLenti6.2ccdB-Nanoluc.

Lista lucrărilor publicate în cadrul temei de doctorat

Publicații în reviste indexate ISI

1. **Sac1 phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatase is a novel host cell factor regulating hepatitis B virus particles assembly and release.**
Popescu MA*, Patriche DS*, Dobrica MO, Pantazica AM, Flintoaca Alexandru PR, Rouillé Y, Popescu CI, Branza-Nichita N. FEBS J. 2022 Jul 11. doi: 10.1111/febs.16575. [IF: 5.622]
2. **Class II phosphatidylinositol 3-kinase 2 β is a novel target for the potential development of antiviral drugs against the Hepatitis B virus.**
Patriche DS, Popescu MA, Popescu CI, Nichita N. Farmacia J, 2022 [IF: 1,6]
3. **Novel luciferase-based glucagon-like peptide 1 reporter assay reveals naturally occurring secretagogues.**
Anghel SA, Badea RA, Chiritoiu G, Patriche DS, Alexandru PR, Pena F. Br J Pharmacol. 2022 Oct;179(19):4738-4753. doi: 10.1111/bph.15896. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35736785. [IF: 9.47]

*co-prim autori cu contribuție egală

Comunicări conferințe naționale

1. **Class II phosphatidylinositol 3-kinases regulate HBV life cycle in hepatoma cell lines**
Patriche DS, Popescu MA, Popescu CI, Nichita N. Conferință RSBBM, Iași, 2019
2. **The role of phosphatidylinositol (Ptdins) phosphatase Sac1 in the HBV life cycle**
Popescu MA, Patriche DS, Popescu CI, Nichita N. Conferință RSBBM, Iași, 2019.

Bibliografie

Abere B, Samarina N, Gramolelli S, Rückert J, Gerold G, Pich A, Schulz TF. Kaposi's Sarcoma-Associated Herpesvirus Nonstructural Membrane Protein pK15 Recruits the Class II Phosphatidylinositol 3-Kinase PI3K-C2a To Activate Productive Viral Replication. *J Virol*. 2018 Aug 16;92(17):e00544-18. doi: 10.1128/JVI.00544-18. PMID: 29950425; PMCID: PMC6096797.

Anghel SA, Badea RA, Chiritoiu G, Patriche DS, Alexandru PR, Pena F. Novel luciferase-based glucagon-like peptide 1 reporter assay reveals naturally occurring secretagogues. *Br J Pharmacol*. 2022 Oct;179(19):4738-4753. doi: 10.1111/bph.15896. Epub 2022 Jul 21. PMID: 35736785.

Baggio LL, Drucker DJ. Biology of incretins: GLP-1 and GIP. *Gastroenterology*. 2007 May;132(6):2131-57. doi: 10.1053/j.gastro.2007.03.054. PMID: 17498508.

Chai N, Chang HE, Nicolas E, Han Z, Jarnik M, Taylor J. Properties of subviral particles of hepatitis B virus. *J Virol*. 2008 Aug;82(16):7812-7. doi: 10.1128/JVI.00561-08. Epub 2008 Jun 4. PMID: 18524834; PMCID: PMC2519590.

Del Bel LM, Brill JA. Sac1, a lipid phosphatase at the interface of vesicular and nonvesicular transport. *Traffic*. 2018 May;19(5):301-318. doi: 10.1111/tra.12554. Epub 2018 Mar 25. Erratum in: *Traffic*. 2019 Feb;20(2):181. doi: 10.1111/tra.12626. PMID: 29411923.

England CG, Ehlerding EB, Cai W. NanoLuc: A Small Luciferase Is Brightening Up the Field of Bioluminescence. *Bioconjug Chem*. 2016 May 18;27(5):1175-1187. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00112. Epub 2016 Apr 19. PMID: 27045664; PMCID: PMC4871753.

Gil-Lozano M, Brubaker PL. Murine GLUTag Cells. In: Verhoeckx K, Cotter P, López-Expósito I, Kleiveland C, Lea T, Mackie A, Requena T, Swiatecka D, Wichers H, editors. *The Impact of Food Bioactives on Health: in vitro and ex vivo models* [Internet]. Cham (CH): Springer; 2015. Chapter 21. PMID: 29787050

Hille, F., Richter, H., Wong, S. P., Bratovic, M., Ressel, S., & Charpentier, E. (2018). Review of The Biology of CRISPR-Cas : Backward and Forward]. *Cell*, 172(6), 1239–1259. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.11.032>

Hui H, Farilla L, Merkel P, Perfetti R. The short half-life of glucagon-like peptide-1 in plasma does not reflect its long-lasting beneficial effects. *Eur J Endocrinol*. 2002 Jun;146(6):863-9. doi: 10.1530/eje.0.1460863. PMID: 12039708.

Jiang F, Doudna JA. CRISPR-Cas9 Structures and Mechanisms. *Annu Rev Biophys*. 2017 May 22;46:505-529. doi: 10.1146/annurev-biophys-062215-010822. Epub 2017 Mar 30. PMID: 28375731.

Krause M, De Vito G. Type 1 and Type 2 Diabetes Mellitus: Commonalities, Differences and the Importance of Exercise and Nutrition. *Nutrients*. 2023 Oct 7;15(19):4279. doi: 10.3390/nu15194279. PMID: 37836562; PMCID: PMC10574155.

Li W. The hepatitis B virus receptor. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2015;31:125-47. doi: 10.1146/annurev-cellbio-100814-125241. Epub 2015 Oct 2. PMID: 26436705

Liu Y, Boukhelifa M, Tribble E, Morin-Kensicki E, Utrecht A, Bear JE, Bankaitis VA. The Sac1 phosphoinositide phosphatase regulates Golgi membrane morphology and mitotic spindle organization in mammals. *Mol Biol Cell*. 2008 Jul;19(7):3080-96. doi: 10.1091/mbc.e07-12-1290. Epub 2008 May 14. PMID: 18480408; PMCID: PMC2441670.

Ma Y, Zhang L, Huang X. Genome modification by CRISPR/Cas9. *FEBS J*. 2014 Dec;281(23):5186-93. doi: 10.1111/febs.13110. Epub 2014 Nov 7. PMID: 25315507.

Marathe CS, Rayner CK, Jones KL, Horowitz M. Glucagon-like peptides 1 and 2 in health and disease: a review. *Peptides*. 2013 Jun;44:75-86. doi: 10.1016/j.peptides.2013.01.014. Epub 2013 Mar 20. PMID: 23523778.

O'Hanlon R, Leyva-Grado VH, Sourisseau M, Evans MJ, Shaw ML. An Influenza Virus Entry Inhibitor Targets Class II PI3 Kinase and Synergizes with Oseltamivir. *ACS Infect Dis*. 2019 Oct 11;5(10):1779-1793. doi: 10.1021/acsinfecdis.9b00230. Epub 2019 Sep 9. PMID: 31448902.

Patriche, David. (2022). Class Ii Phosphatidylinositol 3-Kinase 2β Is A Novel Target For The Potential Development Of Antiviral Drugs Against The Hepatitis B Virus. *Farmacia*. 70. 266-271. 10.31925/Farmacia.2022.2.11.

Polachek WS, Moshrif HF, Franti M, Coen DM, Sreenu VB, Strang BL. High-Throughput Small Interfering RNA Screening Identifies Phosphatidylinositol 3-Kinase Class II Alpha as Important for Production of Human Cytomegalovirus Virions. *J Virol*. 2016 Aug 26;90(18):8360-71. doi: 10.1128/JVI.01134-16. PMID: 27412598; PMCID: PMC5008103.

Popescu MA, Patriche D, Dobrica MO, Pantazica AM, Flintoaca Alexandru PR, Rouillé Y, Popescu CI, Branza-Nichita N. Sac1 phosphatidylinositol 4-phosphate phosphatase is a novel host cell factor regulating hepatitis B virus particles assembly and release. *FEBS J*. 2022 Dec;289(23):7486-7499. doi: 10.1111/febs.16575. Epub 2022 Jul 22. PMID: 35816160.

Ran FA, Hsu PD, Lin CY, Gootenberg JS, Konermann S, Trevino AE, Scott DA, Inoue A, Matoba S, Zhang Y, Zhang F. Double nicking by RNA-guided CRISPR Cas9 for enhanced genome editing specificity. *Cell*. 2013 Sep 12;154(6):1380-9. doi: 10.1016/j.cell.2013.08.021. Epub 2013 Aug 29. Erratum in: *Cell*. 2013 Oct 10;155(2):479-80. PMID: 23992846; PMCID: PMC3856256.

Rubino D, Abrahamsson N, Davies M, Hesse D, Greenway FL, Jensen C, Lingvay I, Mosenzon O, Rosenstock J, Rubio MA, Rudofsky G, Tadayon S, Wadden TA, Dicker D; STEP 4 Investigators. Effect of Continued Weekly Subcutaneous Semaglutide vs Placebo on Weight Loss Maintenance in Adults With Overweight or Obesity: The STEP 4 Randomized Clinical Trial. *JAMA*. 2021 Apr 13;325(14):1414-1425. doi: 10.1001/jama.2021.3224. PMID: 33755728; PMCID: PMC7988425.

Strich JR, Chertow DS. CRISPR-Cas Biology and Its Application to Infectious Diseases. *J Clin Microbiol*. 2019 Mar 28;57(4):e01307-18. doi: 10.1128/JCM.01307-18. PMID: 30429256; PMCID: PMC6440769.

Thibault B, Ramos-Delgado F, Guillermet-Guibert J. Targeting Class I-II-III PI3Ks in Cancer Therapy: Recent Advances in Tumor Biology and Preclinical Research. *Cancers (Basel)*. 2023 Jan 27;15(3):784. doi: 10.3390/cancers15030784. PMID: 36765741; PMCID: PMC9913247.

Tong S, Revill P. Overview of hepatitis B viral replication and genetic variability. *J Hepatol*. 2016 Apr;64(1 Suppl):S4-S16. doi: 10.1016/j.jhep.2016.01.027. PMID: 27084035; PMCID: PMC4834849.

Tsukuda S, Watashi K. Hepatitis B virus biology and life cycle. *Antiviral Res*. 2020 Oct;182:104925. doi: 10.1016/j.antiviral.2020.104925. Epub 2020 Aug 28. PMID: 32866519.

Yoshioka K. Class II phosphatidylinositol 3-kinase isoforms in vesicular trafficking. *Biochem Soc Trans*. 2021 Apr 30;49(2):893-901. doi: 10.1042/BST20200835. PMID: 33666217; PMCID: PMC8106491.