

PB1.10. Interakce mezi HBV core, precore a proteinem X s buněčnými proteiny jako cíl pro vývoj inhibitorů (Pichová, Weber, Cvačka)

Cíle výzkumu

- Charakterizaci interakcí mezi HBc, HBx a HBe s buněčnými partnery.
- Identifikaci buněčných procesů regulovaných prostřednictvím HBc, HBx a HBe.
- Určení struktur jednotlivých komplexů virových a buněčných proteinů.
- Design nových typů inhibitorů cílených na destabilizaci komplexů virových a buněčných proteinů.

Výzkumný plán a metodologie

Detailní molekulární mechanismy, kterými jsou regulovány procesy HBV replikace včetně formace a degradace cccDNA, reaktivace HBV a modulace interakce viru s hostitelskou buňkou, zůstávají v současnosti neznámé. Důležitou roli v těchto procesech hrají proteiny HBV core, HBx a HBV precore prostřednictvím specifických interakcí s buněčnými partnery. Tyto interakce budou detailně charakterizovány za účelem jejich možné inhibice s terapeutickým účinkem.

Interakce HBV core proteinu s buněčnými partnery

Při charakterizaci buněčných partnerů interagujících s HBc v hepatocytech se nám pomocí hmotnostní spektrometrie podařilo identifikovat proteiny podílející se na: (i) ubiquitinylaci a proteasomální degradaci, (ii) epigenetické kontrole transkripce, (iii) postranlační modifikaci (např. methylaci) a (iv) karcinogenesi.

i) Proteiny ubiquitinylace a proteasomální degradace. Buněčná dráha zahrnující degradaci ubiquitinylovaných proteinů je často spojována s HBV replikací a produkcí viru. Naším cílem je charakterizace interakce HBc s FBXO3 (F-box-only protein 3) a ubiquitin konjugčním enzymem UBE2O včetně určení jejich vlivu na HBV transkripci, replikaci a produkci viru. Oba proteiny jsou součástí ubiquitin ligasových komplexů, kde FBXO3 zprostředkovává polyubiquitinylaci proteinů prostřednictvím SCF (SKP1-CUL1-F-box protein) a UBE2O zajišťuje především monoubiquitinylaci.

ii) Proteiny účastníci se epigenetické modifikace a transkripční kontroly. V současnosti existuje řada důkazů, že HBV replikace je regulována epigenetickými mechanismy a microRNA (shrnutí v¹). Některé proteiny (NP1L1, BCORL-1, and RUVBL1/RUVBL2), které se nám podařilo identifikovat pomocí MS analýzy, hrají roli v různých aspektech transkripční kontroly a epigenetických modifikací. Proto bude provedena charakterizace jejich interakce s HBc. V této souvislosti budou pomocí hmotnostní spektrometrie analyzovány i možné postranlační modifikace HBc proteinu (ubiquitinylace, methylace, fosforylace atd.).

iii) Proteiny účastníci se methylace argininů. Naše předběžné výsledky ukazují, že protein arginin methyltransferasa může mít negativní roli v replikaci HBV. PRMT5 je hlavním enzymem odpovědným za mono- a symetrickou dimethylaci argininových zbytků. PRMT5 se vyskytuje v komplexu s WD-repeat proteinem MEP50. Protein PRMT5 má mnoho funkcí (shrnutí v²). Naším cílem je charakterizace mechanismu, kterým PRMT5 inhibuje HBV replikaci a identifikace buněčných PRMT proteinů účastnících se methylace HBc.

iv) Proteiny účastníci se hostitelských obranných drah. NRDP1 (neuregulin receptor degradation protein 1) působí jako ubiquitin ligasa a reguluje degradaci cílených proteinů. Může podpořit TRIF-dependentní produkci interferonu typu I a inhibuje infekci způsobenou virem vesikulární stomatitidy. Nadto, bylo ukázáno, že NRDP1 podporuje aktivaci TBK1 a IRF3. Zde budeme analyzovat interakce HBc s ubiquitin ligasou E3 (NRDP1).

Interakce HBx s buněčnými partnery

HBx protein je schopen interagovat s celou řadou buněčných proteinů ovlivňujících transkripci, signální transdukcii, buněčný cyklus, apoptózu, degrační dráhy a genetickou stabilitu². Součástí navrhovaného projektu je detailní analýza interakcí HBx a proteinů účastnících se ubiquitin-proteasomové degradace, epigenetické kontroly a buněčné obrany.

i) *Ubiquitin-proteasomální degradace*. Nedávno objevená multimerní interakce mezi proteiny DDB1-HBx-Smc5/6 představuje kritický krok při regulaci transkripce HBV³. DDB1 (damaged DNA binding protein) funguje jako adaptorový protein pro Cullin-RING ubiquitin-E3 (CLR4E3) ligasový komplex, který zajišťuje ubiquitylaci a následnou proteasomální degradaci vybraných proteinů. Toho dokáže využít HBx, který prostřednictvím interakce s DDB1 směřuje funkci CLR4E3 na restriční komplex Smc5/6 a jeho degradaci. Bez tohoto kroku by Smc5/6 vázal HBV cccDNA a blokoval transkripci. O jednotlivých protein-protein interakcích důležitých pro tvorbu zmíněného komplexu je známo velmi málo⁴ a proto je důkladná analýza a charakterizace interakcí jednotlivých komponent Smc5/6, HBx a DDB1 součástí tohoto projektu.

ii) *Epigenetická kontrola prostřednictvím methylace*. Podle našich předběžných výsledků protein MEP50, koaktivátor methyltransferasy PRMT5, je novým interakčním partnerem HBx. Naším cílem je charakterizovat jejich vzájemnou vazbu a především možnost tvorby vyšších komplexů mezi HBV proteiny HBc a HBx spolu s methylsomem PRMT5-MEP50. Kromě toho je známa i další methyltransferasa PRMT, která působí jako negativní regulátor HBV transkripce a interaguje přímo s HBx proteinem⁵. Detaily této interakce stejně jako mechanismus působení HBx známy nejsou a představují potenciální cíl pro jejich studium a inhibici.

iii) *Obrana hostitele*. V této části projektu budeme analyzovat interakci mezi HBx a proteinem NRDP1, který je známým interakčním partnerem HBc (viz. 5.2.2.10.3.1). Cao a spol. nedávno publikovali, že HBx interaguje s NRDP1 a významně snižuje jeho stabilitu. Výsledkem je zvýšení aktivity proteinu ErbB3 a tím i rizika vzniku HCC spojeným s chronickou HBV infekcí⁶.

Pro ověření interakcí HBc a HBx proteinů s jejich buněčnými partnery bude použita koimunoprecipitace v HepG2-NTCP buňkách. Vliv těchto proteinů na HBV infekci/replikaci bude testován pomocí jejich overexprese a stejně tak blokováním jejich produkce (CRISPR/Cas9 systém). Jednotlivé interakce budou charakterizovány určením minimálních vazebných oblastí/domén obou proteinů. Pro tento účel budou využity série N- a C-koncových zkrácení proteinu v koimunoprecipitačních experimentech a takto identifikované regiony budou dále analyzovány mutační analýzou pro zjištění konkrétních motivů. Posttranslační modifikace proteinů budou analyzovány pomocí hmotnostní spektrometrie ve spolupráci s J. Cvačkou za využití spektrometru s vysokým rozlišením, který je součástí navrhovaných investic potřebných pro řešení projektu.

Pro získání strukturních informací ohledně HBc nebo HBx interakcí budou klonovány, exprimovány a purifikovány jednotlivé proteiny nebo jejich domény. Expresce součástí Smc5/6 komplexu bude prováděna v *E. coli* podle procedury popsané v Roy a spol.⁷ DDB1 protein, MEP50 a NRDP1 včetně jejich modifikovaných variant budou produkovány v hmyzích buňkách. K purifikaci jednotlivých proteinů bude využito FPLC. Pro analýzu interakcí budou využity techniky SPR, AlphaScreen a NMR titrační experimenty ve spolupráci s V. Veverkou. Struktura studovaných komplexů bude určována pomocí rentgenové difrakční krystalografie ve spolupráci s P. Řezáčovou. Na základě krystalových struktur HBc a HBx s jejich ligandy bude ve spolupráci s J. Vondráškem použito molekulární modelování pro detailní analýzu vybraných strukturních motivů.

Zrání HBV precore proteinu a vliv buněčných partnerů na jeho lokalizaci

Budeme analyzovat proces zrání a sekrece precore proteinu a sledovat buněčné mechanismy, jejichž pomocí jsou různé formy tohoto proteinu distribuovány do jednotlivých buněčných organel. Zaměříme se na identifikaci buněčných interakčních partnerů a strukturních motivů, které jsou pro tyto interakce klíčové.

Konkrétně budeme provádět frakcionace metabolicky značených buněčných linií produkujících HBe, sledovat buněčnou dráhu tohoto proteinu a lokalizaci jeho jednotlivých forem. Tyto experimenty budou podpořeny kolokalizačními studiemi za použití imunofluorescenčního barvení buněk analyzovaných na nově zakoupeném konfokálním mikroskopu. Protože HBe obsahuje disulfidický můstek, který je zásadní pro jeho strukturu, budeme sledovat zrání tohoto proteinu v závislosti na redoxních podmínkách buňky a budeme hledat interagující oxidoreduktázy zodpovědné za jeho stabilní prostorovou konformaci. Pomocí hmotnostní spektrometrie a imunoprecipitačních experimentů budeme hledat i další buněčné proteiny podílející se na směřování jednotlivých forem HBe do různých buněčných organel. Stabilně transfekované hepatocyty inducibilně produkující HBe (HepaRG-TR-E, Tet-on) budou použity

pro sledování efektu tohoto proteinu na genovou expresi. Změny v transkriptomickém profilu budou sledovány pomocí RNA sekvenování. Vybrané geny a jejich produkty budou dále charakterizovány ve vztahu k chronickému stádiu hepatitidy B a karcinogenezi.

Mezi další cíle projektu patří především design sloučenin specificky narušujících tvorbu komplexů mezi virovými a buněčnými proteiny. V současnosti je již znám potenciál nízkomolekulárních látek jako účinných inhibitorů protein-protein interakcí (PPI). Jejich účinek je založen na tom, že i rozsáhlá rozhraní mezi interagujícími proteiny obsahují relativně malé části, které zajišťují vysokou specifitu této vazby⁸. Proto budeme testovat ÚOCHB knihovnu nízkomolekulárních látek za účelem určení schopnosti těchto sloučenin inhibovat studované protein-protein interakce. Vlastní analýza inhibičních schopností jednotlivých molekul bude prováděna s využitím fluorescenčního rezonančního přenosu energie (FRET) mezi testovanými proteiny. Vliv selektovaných látek na HBV infekci bude dále testován v tkáňových kulturách HepG2-NTCP buněk. Modifikace a syntéza aktivních látek bude prováděna skupinami P. Majera a U. Jahna. Tento projekt zahrnuje intenzivní využití FPLC a preparativního LC chromatografu, které jsou uvedeny mezi navrhovanými investičními položkami.

- [1] Zhang, X.; Hou, J.; Lu, M., Regulation of hepatitis B virus replication by epigenetic mechanisms and microRNAs. *Front Genet* 2013, 4, 202.
- [2] Stopa, N.; Krebs, J. E.; Shechter, D., The PRMT5 arginine methyltransferase: many roles in development, cancer and beyond. *Cell Mol. Life Sci* 2015, 72 (11), 2041-2059.
- [3] Decorsiere, A.; Mueller, H.; van Breugel, P. C.; Abdul, F.; Gerossier, L.; Beran, R. K.; Livingston, C. M.; Niu, C.; Fletcher, S. P.; Hantz, O.; Strubin, M., Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor. *Nature* 2016, 531 (7594), 386-389.
- [4] Li, T.; Robert, E. I.; van Breugel, P. C.; Strubin, M.; Zheng, N., A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat. Struct. Mol. Biol* 2010, 17 (1), 105-111.
- [5] Benhenda, S.; Ducroux, A.; Riviere, L.; Sobhian, B.; Ward, M. D.; Dion, S.; Hantz, O.; Protzer, U.; Michel, M. L.; Benkirane, M.; Semmes, O. J.; Buendia, M. A.; Neuveut, C., Methyltransferase PRMT1 is a binding partner of HBx and a negative regulator of hepatitis B virus transcription. *J Virol* 2013, 87 (8), 4360-4371.
- [6] Cao, K.; Gong, H.; Qiu, Z.; Wen, Q.; Zhang, B.; Tang, T.; Zhou, X.; Cao, T.; Wang, B.; Shi, H.; Wang, R., Hepatitis B virus X protein reduces the stability of Nrdp1 to up-regulate ErbB3 in hepatocellular carcinoma cells. *Tumour. Biol* 2016.
- [7] Roy, M. A.; Dhanaraman, T.; D'Amours, D., The Smc5-Smc6 heterodimer associates with DNA through several independent binding domains. *Sci. Rep* 2015, 5, 9797.
- [8] Jubb, H.; Higuieruelo, A. P.; Winter, A.; Blundell, T. L., Structural biology and drug discovery for protein-protein interactions. *Trends Pharmacol. Sci* 2012, 33 (5), 241-248.

Časový plán

Interakce HBV core proteinu s buněčnými partnery

2018-2022

- Identifikace, ověřování a charakterizace hostitelských proteinů interagujících s HBc.
- Analýza komplexního vlivu buněčných proteinů interagujících s HBc na replikaci HBV.
- Charakterizace posttranslačních modifikací HBc proteinu a jejich vliv na jeho epigenetickou funkci v životním cyklu HBV.
- Identifikace interagujících domén HBc.

2021-2022

- Testování známých modulátorů HBc funkce a testování nových kandidátů v ÚOCHB knihovně nízkomolekulárních látek.
- Analýza a optimalizace látek s požadovaným účinkem.

Interakce HBx proteinu s buněčnými partnery

2018-2022

- Ověřování a charakterizace interakcí mezi HBx a hostitelskými proteiny (v tkáňových kulturách).

- Identifikace minimálních oblastí HBx požadovaných pro interakci.
- Optimalizace testovací procedury a počáteční testování ÚOCHB knihovny nízkomolekulárních látek.

2019-2022

- Určení strukturních základů studovaných interakcí pomocí NMR a rentgenové strukturní analýzy.
- Testování inhibitorů interakcí mezi HBx a hostitelskými proteiny – identifikace látek vhodných pro další modifikace a vývoj.

Zrání HBV precore proteinu a vliv buněčných partnerů na jeho lokalizaci

2018-2022

- Mapování buněčné dráhy HBe, hledání interagujících partnerů a ověření těchto interakcí.

2019-2022

- Sekvenace transkriptomu a analýza genové exprese.

2020-2022

- Strukturní charakterizace interakcí mezi precore proteinem a jednotlivými buněčnými partnery, molekulární modelování a návrh inhibitorů.

Plánované publikace a patenty

Publikace (Jimp)

	Jimp	<i>Journal of Virology</i> <i>Virology</i> <i>Journal of Molecular Biology</i> <i>Journal of Biological Chemistry</i>
2018	2	
2019	2	
2020	2	
2021	3	
2022	3	
Celkem	12	

Zahraniční spolupráce

- Centrum výzkumu rakoviny – CRCL, Univerzita Lyon, Francie
- Univerzita Heidelberg, Oddělení molekulární virologie, Německo
- Gilead Sciences, USA, analýza interakcí HBV proteinů s buněčnými proteiny, které lze využít pro vývoj specifických inhibitorů