

---

*Rezumatul Tezei de Doctorat*

# Rolurile PRDM16 și TRB3 în patogeneza afecțiunilor hepatice

---

Doctorand **Andrei Băiceanu**

---

Conducător științific **Prof. Corina Ionescu, PhD**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# CUPRINS

<b>INTRODUCERE</b>	17
<b>STADIUL CUNOAȘTERII</b>	
<b>1. Ficatul</b>	21
1.1. Structură și organizare	21
1.2. Funcțiile ficatului	21
<b>2. Afecțiuni hepatice</b>	25
2.1. Contextul metabolic	25
2.2. NAFLD	26
2.3. NASH	28
2.4. Fibroza hepatică	30
2.5. Celule hepatice stelate	32
2.6. De ce studiul NAFLD și al fibrozei hepatice?	35
<b>3. PRDM16</b>	37
3.1. Familia PRDM	37
3.2. PRDM16	39
<b>4. TRB3</b>	45
4.1. Familia Tribbles – Structură și funcții	45
4.2. TRB3	46
<b>CONTRIBUȚIA PERSONALĂ</b>	
<b>1. Ipoteze și Obiective</b>	55
<b>2. Metodologie Generală</b>	55
<b>3. Studiul 1. O metodă robustă, rapidă și reproductibilă folosită pentru izolarea celulelor hepatice stelate din șoareci de tip C57/BL6</b>	59
3.1. Introducere	59
3.2. Ipoteza de lucru	60
3.3. Materiale și Metode	60
3.4. Rezultate	68

3.5. Discuții	73
3.6. Concluzii	76
<b>4. Studiul 2. PRDM16 mediază activarea celulelor hepatice stelate și fibrogenza hepatică</b>	77
4.1. Introducere	77
4.2. Ipoteza de lucru	78
4.3. Materiale și Metode	78
4.4. Rezultate	82
4.5. Discuții	90
4.6. Concluzii	91
4.7. Anexă	92
<b>5. Studiul 3. Expresia TRB3 în timpul activării celulelor hepatice stelate</b>	95
5.1. Introducere	95
5.2. Ipoteza de lucru	96
5.3. Materiale și Metode	96
5.4. Rezultate	100
5.5. Discuții	109
5.6. Concluzii	110
<b>6. Discuții generale</b>	111
<b>7. Concluzii generale</b>	115
<b>8. Originalitatea și contribuțiile inovative</b>	117
<b>BIBLIOGRAFIE</b>	119

**Cuvinte cheie:** Obezitate, Diabet, Încărcarea grasă non-alcoolică a ficatului (*i.e.* NAFLD), Steato-hepatită non-alcoolică (*i.e.* NASH), Celule hepatice stelate (CHS), Celule Kupffer (CK), Hepatocite, Fibroză hepatică, Matrice extra-celulară (MEC), PRDM16, TRB3

## INTRODUCERE

Afecțiunile hepatice cronice sunt o problemă majoră la nivel mondial, cu consecințe importante asupra sănătății publice, atât din punct de vedere financiar, cât și din punct de vedere medical și umanist. Acest tip de afecțiune, în anumite cazuri, poate evolua înspre ciroza sau chiar carcinom hepatocelular (CHC), două patologii care au o morbiditate și mortalitate ridicată (1). Încărcarea grasă a ficatului de natură non-alcoolică (*i.e.* NAFLD), este o afecțiune cronică hepatică, cu o prevalență în creștere la nivel mondial în ultimele 2 decenii. NAFLD este lipsită de simptome în cele mai multe cazuri, iar evoluția acesteia poate fi evaluată prin măsurarea nivelului de afectare hepatică. NAFLD pornește de la etapa de steatoză hepatică, evoluează la steato-hepatită non-alcoolică (NASH), și apoi spre fibroză, ciroză sau chiar CHC (în anumite contexte). NAFLD este considerată manifestarea hepatică a sindromului metabolic, cu consecințe importante asupra metabolismului lipidic și glucidic. Acest mecanism este bine prezentat în teoria celor „două lovituri” (*i.e.* de la „the tow hit theory”), postulată de către James *et co.* Prima lovitură este considerată a fi acumularea de grăsime în ficat care duce la dezvoltarea unui ficat gras (steatoza hepatică). A doua lovitură este apariția și progresia inflamației în ficat, promovând evoluția de la steatoză la NASH, forma mai severă a NAFLD (2). În NASH, triada alcătuită din 1. acumularea grăsimii, 2. inflamația la nivelul ficatului și 3. afectarea hepatocitară, joacă un rol negativ ce poate duce, în cele din urmă, la apariția fibrozei hepatice (3). La nivel mondial, prevalența NAFLD este în prezent estimată la aproximativ 25% din populație, cu diferențe importante în funcție de categoria în care se efectuează studiul (4). Acest lucru se datorează în principal schimbărilor în nutriție declanșate de consumul crescut de dieta tip „fast-food”.

## STADIUL CUNOAȘTERII

Fibroza hepatică este descrisă ca producția excesivă de matrice extra-celulară (MEC) sau țesut cicatricial din diferite surse, dintre care cea mai importantă este reprezentată de celulele hepatice stelate (CHS). Fibroza hepatică este un pas important în progresia NAFLD-NASH și, în anumite condiții, poate conduce la o progresie a bolii cu consecințe ireversibile asupra arhitecturii hepatice (5).

Până în prezent există mai multe teorii privind fiziopatologia și evoluția afecțiunilor cronice hepatice. Subiecte importante de cercetare se concentrează pe înțelegerea fiziopatologiei și a evoluției fibrozei hepatice în contextul încărcării grase a ficatului, *i.e.* NAFLD. Un punct cheie în înțelegerea acestui proces este identificarea mecanismului de activare a CHS și a producției consecutive de MEC. În această teză propunem să investigăm aceste mecanisme pentru a înțelege mai bine procesele implicate în evoluția fibrozei hepatice și pentru a identifica posibile viitoare ținte terapeutice pentru tratamentul acestei afecțiuni (6-8).

Pentru a studia aceste celule am dezvoltat o metodă îmbunătățită de izolare a CHS de la rozătoare utilizând o procedură de perfuzie și separare a celulelor (Studiul 1). Partea experimentală din teza mea de doctorat s-a axat pe studierea rolurilor a două proteine în fibroza hepatică, și anume a PRDM16 și TRB3. În literatură aceste două proteine au fost studiate în contextul procesului fibrotic în diferite modele la animale și la om. Prima proteină, PRDM16, un factor de transcripție, s-a dovedit a fi implicată în diferite tipuri de transformări celulare, care se aseamănă cu activarea CHS (Studiul 2). A doua proteină, o pseudokinază numită TRB3, a fost identificată ca fiind un factor cheie implicat în diferite procese fibrotice în alte organe, cum ar fi rinichii, inima și dermul (Studiul 3).

Aceste studii aduc noi informații în categoria cunoștințelor actuale cu privire la posibilele mecanisme de acțiune ale activării CHS în timpul fibrozei hepatice. Sper că prezenta lucrare va deschide calea către identificarea noilor oportunități de cercetare care vor contribui la îmbunătățirea înțelegerii fiziopatologiei și tratamentului fibrozei hepatice.

## CONTRIBUȚII PERSONALE

### Materiale și Metode

**Studiul 1:** Am perfuzat ficatul rozătoarelor folosind diferite enzime, așa cum este descris în partea de Materiale și Metode a Studiului 1 din teză. Am îmbunătățit o tehnică de perfuzie și izolare care folosește enzime de tip pronază și collagenază pentru a digera diferite celule din ficat (*i.e.* celulele care mențin structura hepatică) și ce permite izolarea exclusiv a CHS prin efectuarea unor centrifugări (inclusiv o ultracentrifugare cu gradient) și spălări ulterioare. Am evaluat puritatea lor și am folosit CHS izolate pentru a efectua diverse experimente.

**Studiile 2 și 3:** Am lucrat pe CHS primare, precum și pe GRX, o linie murină de CHS. Hepatocite primare, precum și celule Kupffer (CK) au fost utilizate pentru a studia expresia TRB3. Au fost folosite diferite modele animale (CCL<sub>4</sub>, MCD, dieta cu conținut ridicat de grăsimi și glucide) pentru a induce fibroza hepatică. Am lucrat în mod specific pe CHS, dar și pe hepatocite și CK. Pentru izolarea CHS am folosit protocolul descris în Studiul 1. Pentru restul experimentelor am folosit tehnici bine documentate de cuantificare a proteinelor și ARN-ului mesager (cuantificarea mRNA prin q-PCR), după cum este descris în secțiunea Materiale și Metode din Studiile 2 și 3 din teza de doctorat.

## **Studiul 1. O metodă robustă, rapidă și reproductibilă folosită pentru izolarea celulelor hepatice stelate din șoareci de tip C57/BL6**

**Ipoieza de lucru:** Scopul acestui studiu a fost de a dezvolta un protocol îmbunătățit, simplificat și reproductibil pentru a izola CHS de la șoareci de tip C57/BL6.

**Rezultate:** Folosind protocolul modificat, am reușit să izolăm, în medie,  $(1.02 \pm 0.34 \times 10^6)$  CHS pe șoarece ( $n = 11$ ). Puritatea celulelor a fost evaluată utilizând markeri celulari cum ar fi albumina pentru hepatocite și F4/80 pentru celulele Kupffer (CK). Desmina, un marker a CHS, a fost utilizată drept control pozitiv. Expresia mRNA a fost  $(1 \pm 0.24)$  pentru albumină,  $(1.39 \pm 0.32)$  pentru F4/80 și  $(271.48 \pm 7.8)$  pentru desmină. Am efectuat apoi un experiment de auto-activare, prin cultivarea CHS primare pe plăci de plastic. Am observat o schimbare a fenotipului celulelor, din celule sferice ce conțin lipide (ziua 1) spre celule în formă de stea, asemănătoare cu miofibroblaști ce conțin o cantitate scăzută de lipide (ziua 6). Rezultatele noastre arată că expresia genică a unor markeri ai activării CHS și ai producției de colagen (*i.e.*  $\alpha$ SMA, respectiv Col1 $\alpha$ 1 și Col3 $\alpha$ ) a fost semnificativ crescută în CHS în decurs de activare. Ca atare, în ziua 6 după cultură, expresia mRNA a fost crescută de până la  $(3.41 \pm 0.97)$  pentru  $\alpha$ SMA,  $(3.52 \pm 0.29)$  pentru Col1 $\alpha$ 1 și  $(2.29 \pm 0.52)$  pentru Col3 $\alpha$ 1 comparativ cu valoarea mRNA a aceluiași markeri în ziua 2. Apoi, am indus activarea CHS primare izolate folosind TGF $\beta$ 1, cea mai puternică citokină implicată în activarea CHS. În urma acestui tratament, expresia genică a fost semnificativ crescută pentru  $\alpha$ SMA  $(2.10 \pm 0.18)$ , Col1 $\alpha$ 1  $(2.29 \pm 0.14)$  și Col3 $\alpha$ 1  $(1.52 \pm 0.14)$  comparativ cu grupul martor. În cele din urmă, am testat sensibilitatea CHS izolate la transducția adenovirală. Un randament de transducție de aproximativ 40% până la 50% a fost observat în CHS în ziua 6 după transducție.

**Discuții și Concluzii:** Studiul 1 descrie un protocol îmbunătățit pentru izolarea CHS de la șoareci de tip C57/BL6, unul dintre cele mai frecvente tipuri de șoareci utilizați pentru studierea fibrozei hepatice. Comparativ cu celelalte protocoale deja publicate în literatura de specialitate, protocolul nostru prezintă toate detaliile necesare pentru obținerea unui număr constant de CHS viabile. Am obținut un număr ridicat de CHS folosind protocolul nostru și, astfel, celulele izolate sunt viabile, fracția celulară este pură și acestea pot fi utilizate pentru diverse experimente. Limitările protocolului nostru includ contaminarea în timpul procedurii din cauza utilizării incorecte a materialelor și o potențială variabilitate a numărului celulelor izolate atunci când sunt utilizați șoareci tineri ( $<3$  luni). În plus, grăsimea peritoneală excesivă ar putea să scadă vizibilitatea la nivelul venei hepatice în timpul perfuzării ficatului și, astfel, să limiteze capacitatea de perfuzare (de exemplu șoareci pe dieta MCD, șoareci obezi etc.). În cele din urmă, șoarecii cu fibroză hepatică avansată au o depunere excesivă de MEC, necesitând astfel un grad mai mare de digestie hepatică (trebuie luată în considerare creșterea volumului de enzime digestive).

## Studiul 2. PRDM16 mediază activarea celulelor hepatice stelate și fibrogenza hepatică

**Ipoteza de lucru:** Scopul Studiului 2 a fost de a cerceta rolul PRDM16 în activarea CHS în contextul fibrozei hepatice.

**Rezultate:** În primele experimente ne-am axat pe studierea expresiei genice a PRDM16 în ficatul unor modele de rozătoare cu fibroză hepatică indusă de tratamentul cu tetraclorură de carbon (CCL<sub>4</sub>). La aceste animale s-a observat o creștere a expresiei genice de până la 4x față de control. De asemenea, expresia proteică a PRDM16 a fost crescută semnificativ față de controlul corespunzător. Într-un mod similar, în ficatul total al șoarecilor hrăniți cu o dietă deficientă în metionină și colină (MCD) am observat că expresia mRNA a PRDM16 a fost de până la 2.8x mai mare comparativ cu probele control. Similar, în același experiment, expresia proteică a PRDM16 a fost semnificativ crescută la animalele hrănite cu dieta MCD față de animalele cu dieta normală. În al treilea model animal, șoarecilor li s-a indus fibroză hepatică de natură colestatică prin ligaturarea canalelor ductului biliar, blocând fluxul acizilor biliari la nivelul ficatului. În ziua zece, am observat o expresie genică crescută la aceste animale, atât pentru PRDM16 (4x), cât și pentru  $\alpha$ SMA (10x), comparativ cu animalele de control. În următoarea etapă experimentală ne-am axat atenția asupra expresiei PRDM16 în CHS ale animalelor tratate cu CCL<sub>4</sub>. Expresia mRNA a PRDM16 a fost mărită de până la 4.2x în CHS provenind de la animalele tratate cu CCL<sub>4</sub> comparativ cu animalele control. Am izolat celule hepatice de la animale sănătoase și le-am cultivat pe plăci de plastic pentru a declanșa un proces de auto-activare celulară. Expresia mRNA a PRDM16 în CHS activate a fost de până la 3x mai mare față de celulele inactive. Într-un alt experiment am stimulat activarea CHS prin tratarea acestora cu TGF $\beta$ 1. În celulele tratate cu această citokină am observat o expresie genică de 2x mai mare pentru PRDM16 comparativ cu celulele control. În următorul set de experimente am studiat expresia genică a PRDM16 și micro-ARN-ului (miR) 133 în timpul activării CHS. Am observat o creștere a PRDM16 de până la 4.2x în paralel cu o scădere a miR133 de până la 3x, în ziua 7 comparativ de ziua 0 (cultivarea celulelor). Următorul experiment a fost să blocam expresia genică a PRDM16, ceea ce a condus la o scădere semnificativă a expresiei mRNA a două tipuri de colagen (Col1a1 și Col3a1) în CHS. În final, printr-un experiment de imuno-precipitare am detectat o legătură la nivelul proteinelor SMAD3 și PRDM16.

**Discuții și Concluzii:** Am arătat pentru prima dată o corelație între expresia hepatică a PRDM16 și evoluția procesului de fibrogenză la nivelul ficatului. Explicația acestei corelații vine din rolul jucat de PRDM16 în activarea CHS, evenimentul inițiator al fibrogenzei. Am arătat că expresia PRDM16 este crescută în ficat, în mod special în CHS. Apoi, am arătat că PRDM16 este necesar pentru sinteza de colagen datorită activării CHS. Acest rol este, cel mai probabil, asigurat și prin interacțiunea sa cu SAMD3 (prima echipă care arată aceasta interacțiune în CHS).

### **Studiul 3. Expresia TRB3 în timpul activării celulelor hepatice stelate**

**Ipoieza de lucru:** Ipoieza de lucru a Studiului 3 a fost studierea rolului TRB3 în dezvoltarea fibrozei hepatice în contextul NAFLD-NASH.

**Rezultate:** Am analizat expresia TRB3 în ficatul total al animalelor cu fibroză hepatică. Expresia mRNA a TRB3 a fost de până la 10x mai mare în ficatul animalelor tratate cu CCL<sub>4</sub> comparativ cu animalele control, după 10 săptămâni de tratament. Expresia proteică a TRB3 a fost detectată prin imuno-histochimie și a prezentat un nivel scăzut în ficatul animalelor control, pe când, la animalele cu fibroză hepatică, expresia sa a fost semnificativ mai mare. Am studiat expresia TRB3 în diferite celule din ficat. În hepatocite expresia mRNA a TRB3 a fost semnificativ mai mare (de până la 5x) la animalele cu fibroză hepatică, comparativ cu animalele control. În CHS, la 4 săptămâni după debutul tratamentului cu CCL<sub>4</sub>, expresia mRNA a TRB3 a fost semnificativ mai mare la animalele fibrotice (de până la 60x) comparată cu animalele control. De asemenea, expresia mRNA a TRB3 a fost mai mare în CHS activate, atât în timpul auto-activării celulare, cât și în timpul activării induse de citokine. Nivelul expresiei mRNA a TRB3 a fost de 3x mai mare în cazul auto-activării și de 2x mai mare în CHS tratate cu TGFβ1 comparativ cu celulele control. Blocarea expresiei genice a TRB3 folosind o metodă siRNA a blocat aproape complet activarea CHS, observată printr-o scădere semnificativă a expresiei genice a markerilor de fibroză, αSMA, Col1a1, and Col3a1, atât în GRX (linie celulară) cât și în CHS primare.

**Discuții și Concluzii:** Obiectivul acestui studiu a fost studierea rolului TRB3 în fibroza hepatică. Experimentele noastre pe modele animale de fibroză hepatică au demonstrat că expresia genică a TRB3 este semnificativ crescută în ficatul animalelor cu fibroză indusă de tratament cu CCL<sub>4</sub>, comparativ cu cele fără fibroză. În plus, grupul nostru a identificat două surse pentru această creștere în ficat. Prima sursă este reprezentată de hepatocite, în care expresia TRB3 este crescută de până la 5x la animalele cu fibroză hepatică comparativ cu animalele fără fibroză. A doua sursă este reprezentată de CHS, în care expresia mRNA a TRB3 a fost crescută de până la 60x în celulele provenind de la animalele cu fibroză comparativ cu animalele sănătoase. Munca noastră demonstrează că expresia genică a TRB3 este considerabil crescută în mod special la nivelul CHS și invalidarea expresiei genice a TRB3 în CHS primare conduce atât la o scădere semnificativă a expresiei genice a markerilor de producție de colagen, cât și a markerilor de activare a CHS (*i.e.* αSMA și TGFβ1). Mai multe studii sunt necesare pentru a identifica mecanismul molecular de control al acestei acțiuni și potențialii parteneri ai TRB3 în activarea CHS și în propagarea semnalului fibrogenic.



## ORIGINALITATEA ȘI CONTRIBUȚIILE INOVATIVE

Aceasta muncă are mai multe elemente de originalitate. În primul rând, în decursul studiilor mele doctorale, alături de colegii mei, am reușit să îmbunătățim o metodă de izolare a CHS, una din cele mai dificile tipuri de celule de izolat și de purificat din ficat. Față de alte protocoale deja publicate, această metodă permite izolarea unui număr mai mare de CHS viabile, cu un timp de izolare și purificare acceptabil din punct de vedere tehnic. Acest protocol este descris în detaliu în Studiul 1 din teza de doctorat și are ca avantaje majore: rapiditatea, reproductibilitatea, și un nivel ridicat de granularitate a detaliilor din descrierea metodei de lucru. În Studiile 2 și 3 din teză ne-am axat pe înțelegerea rolurilor a două proteine, PRDM16 și TRB3, în fiziopatologia fibrozei hepatice din cadrul evoluției NAFLD și NASH. Este pentru prima dată când o echipă de cercetare studiază aceste proteine în CHS, drept dovadă că, până la prezenta lucrare de doctorat, expresia PRM16 și a TRB3 nu a fost cuantificată în CHS. De asemenea, suntem prima echipă care arătam că activarea CHS este complet blocată, *in vitro*, datorită invalidării expresiei genice a TRB3. Mai mult, suntem primii care demonstrează o legătură fizică între PRDM16 și SMAD3 în CHS, în contextul activării CHS stimulată de TGFβ1.

În concluzie, prin munca realizată pe parcursul doctoratului meu, am contribuit la înțelegerea mai bună a implicării PRDM16 și TRB3 în fibroza hepatică. Sperăm ca munca noastră să fie începutul unei cercetări care să elucideze complet mecanismul implicării acestor două proteine în fibroza hepatică și care să se traducă prin descoperirea unor ținte terapeutice noi pentru tratarea acestei probleme medicale.

## SELECTIVE REFERENCES

1. Mokdad AA, Lopez AD, Shahrzaz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med.* 2014;12:145.
2. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114(4):842-5.
3. Marra F, Lotersztajn S. Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. *Curr Pharm Des.* 2013;19(29):5250-69.
4. Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, Tiribelli C, Bellentani S. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int.* 2018;38 Suppl 1:47-51.
5. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut.* 2015;64(5):830-41.
6. NIH. NAFLD trials 2018 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=NAFLD&term=&cntry=&state=&city=&dist>.
7. NIH. NASH trials 2018 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=NASH&term=&cntry=&state=&city=&dist>.
8. NIH. Hepatic Fibrosis Trials 2018 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Liver+fibrosis&term=&cntry=&state=&city=&dist>.

---

*Summary of the PhD Thesis*

# The roles of PRDM16 and TRB3 in liver disease pathogenesis

---

PhD Student **Andrei Băiceanu**

---

Scientific supervisor **Prof. Corina Ionescu, PhD**

---



**UMF**  
UNIVERSITATEA DE  
MEDICINĂ ȘI FARMACIE  
IULIU HAȚIEGANU  
CLUJ-NAPOCA

# TABLE OF CONTENTS

<b>INTRODUCTION</b>	17
<b>REVIEW OF THE LITERATURE</b>	
<b>1. The Liver</b>	21
1.1. Structure and organization	21
1.2. Liver functions	21
<b>2. Liver Disease</b>	25
2.1. The metabolic context	25
2.2. NAFLD	26
2.3. NASH	28
2.4. Liver fibrosis	30
2.5. Hepatic stellate cells	32
2.6. Why study NAFLD in general and liver fibrosis in particular?	35
<b>3. PRDM16</b>	37
3.1. PRDM Family	37
3.2. PRDM16	39
<b>4. TRB3</b>	45
4.1. The Tribbles Family – Structure and functions	45
4.2. TRB3	46
<b>PERSONAL CONTRIBUTIONS</b>	
<b>1. Working hypothesis/Objectives</b>	55
<b>2. General methodology</b>	55
<b>3. Study 1. Development of a robust, fast, and reproducible method for isolating hepatic stellate cells from C57/BL6 mice</b>	59
3.1. Introduction	59
3.2. Working hypothesis	60

3.3. Materials and Methods	60
3.4. Results	68
3.5. Discussion	73
3.6. Conclusion	76
<b>4. Study 2. PRDM16 mediates hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis</b>	<b>77</b>
4.1. Introduction	77
4.2. Working hypothesis	78
4.3. Materials and Methods	78
4.4. Results	82
4.5. Discussion	90
4.6. Conclusion	91
4.7. Annex	92
<b>5. Study 3. TRB3 expression during hepatic stellate cell activation</b>	<b>95</b>
5.1. Introduction	95
5.2. Working hypothesis	96
5.3. Materials and Methods	96
5.4. Results	100
5.5. Discussion	109
5.6. Conclusion	110
<b>6. General Discussions</b>	<b>111</b>
<b>7. General Conclusions</b>	<b>115</b>
<b>8. Originality and innovative contributions of the thesis</b>	<b>117</b>
<b>REFERENCES</b>	<b>119</b>

**Key words:** Obesity, Diabetes, Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD), Non-alcoholic steatohepatitis (NASH), Hepatic stellate cell (HSC), Kupffer cells (KC), Hepatocytes, Liver fibrosis, Extracellular matrix (ECM), PRDM16, TRB3

## **INTRODUCTION**

Chronic liver disease (CLD) is a major burden worldwide, with important consequences on public health both from a financial perspective, as well as from a medical and humanistic point of view. CLD can evolve into end-stage liver diseases such as cirrhosis and even hepatocellular carcinoma (HCC), two conditions that have a high morbidity and mortality risk (1). Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) is a CLD, with an increased prevalence worldwide in the last 2 decades. NAFLD lacks symptoms in most cases and its evolution can be tracked by assessing the different stages of liver injury. NAFLD ranges from benign hepatic steatosis, to non-alcoholic steatohepatitis (NASH), and even fibrosis. In time, NAFLD can evolve in certain situations, to cirrhosis and even HCC. NAFLD is considered the hepatic manifestation of the metabolic syndrome with important consequences on lipid and glucose metabolism, well represented in the “two-hit” theory first postulated by Day and James. The first hit is considered the accumulation of fat in the liver, leading to fatty liver or hepatic steatosis. The second hit is triggered by the progression and development of inflammation in the liver which will drive the evolution from steatosis to NASH (2). NASH is the more severe form of NAFLD. In NASH, the triad of fat accumulation, liver inflammation, and hepatocyte injury plays a detrimental role, and can eventually lead to liver fibrosis, a more advanced form of liver injury (3). Worldwide, the average prevalence of NAFLD is currently estimated to be around 25% (4). This is due mainly to changes in the nutritional lifestyle triggered by the increased consumption of the Western Diet, also called the “fast-food” diet. During the evolution of NAFLD, an important event is the triggering of the hepatic fibrotic response, as defined by the excessive production of liver extra cellular matrix (ECM), a crucial step in the evolution of CLD.

## **LITERATURE REVIEW**

Liver fibrosis is described as the excessive production of ECM or scar tissue from difference cells, of which the most important one is represented by the hepatic stellate cells (HSCs). Liver fibrosis is an important step in the NAFLD-NASH progression and, in certain conditions, can lead to a disease progression with irreversible consequences on the liver architecture, in some cases leading to the development of cirrhosis or even HCC (5).

To date, there are several theories regarding the physiopathology and the evolution of CLD. Important research topics focus on understanding the physiopathology and evolution of liver fibrosis in the context of fatty liver disease. A key point in understanding this process is to identify the pathways through which HSCs activate and produce excessive scar tissue in the context of liver fibrosis. In this thesis we propose to investigate these pathways in order to better understand the processes

involved in liver fibrosis evolution and to identify possible therapeutic targets for the treatment of liver fibrosis (6-8).

In order to study these pathways, we first embarked on developing a repeatable and sustainable method to isolate hepatic stellate cells from mice and rats using an perfusion and isolation procedure which we improved (Study 1). The bulk of our research focused on studying the roles of two proteins known to be involved in fibrotic processes in different organs from several animal models and in humans. The first protein, a transcription factor called PRDM16, has been shown to be involved in different types of cell transformations, which resemble hepatic stellate cell activation (Study 2). The second protein, a pseudokinase called TRB3, has been identified as a key factor involved in different fibrotic processes in different organs in humans, such as the kidney, heart, and derma (Study 3).

The work that was done during my PhD will add to the current knowledge available in the literature regarding the pathways involved in hepatic stellate cell activation during liver fibrosis. We hope that this work will pave the way to the identification of new research opportunities, which will help advance the understanding of liver fibrosis evolution and treatment.

## **PERSONAL CONTRIBUTIONS**

### **Thesis hypothesis**

The main hypothesis of the thesis was to study the involvement of two proteins, PRDM16 and TRB3, in hepatic stellate cell activation and liver fibrosis development.

### **Materials and Methods**

**Study 1:** We perfused the livers of rodents using different enzymes, as described in the Materials and Methods part of Study 1, found in my PhD thesis. We improved a classic perfusion and isolation technique, which makes uses of Pronase, Collagenase, and a mix of the two to digest different cells in the liver (*i.e.* the cells that maintain the liver structure) and isolate only the hepatic stellate cells by performing multiple centrifugations (including a gradient ultracentrifugation) and subsequent washes. We then assessed their purity and we used the isolated cells to perform classic HSC experimentation. Finally, we tested the cells susceptibility to adenoviral transduction, a method commonly used to perform genetic modification experimentation.

**Studies 2 and 3:** We worked on primary mouse and rat cells, as well as on GRX, a murine cell line of HSCs. Primary hepatocytes and KCs were also used to study TRB3. Different animal models (CCL<sub>4</sub>, MCD, High-Fat Diet) were used in order to trigger the development

of liver fibrosis. We worked specifically on HSCs, but also on hepatocytes and KCs. For the isolation of HSCs we used the protocol described in Study 1. For the rest of the experimentation, we used well-documented mRNA and protein quantification techniques, as you can see documented in the extended Materials & Methods section of Studies 2 and 3 from my PhD thesis.

## **Study 1. Development of a robust, fast, and reproducible method for isolating hepatic stellate cells from C57/BL6 mice**

**Work hypothesis:** The aim of this study was to develop an improved protocol to isolate HSCs from C57/BL6 mice, which could be easily reproduced in other laboratories.

**Results:** Using our modified protocol, we managed to isolate, in average,  $(1.02 \pm 0.34 \times 10^6)$  HSCs per mouse ( $n=11$ ). The cell purity was assessed using cell markers such as albumin and F4/80 for known cell contaminants, such as hepatocytes and Kupffer Cells (KCs). As a positive control, a cell marker for HSCs was used (desmin). We observed a relatively low expression of both albumin ( $1 \pm 0.24$ ) and F4/80 ( $1.395 \pm 0.32$ ) in the isolated HSC fraction as compared to expression of desmin ( $271.48 \pm 7.8$ ). We then performed an auto-activation experiment, plating the isolated HSCs on plastic-coated dishes for up to 6 days. We observed a change in the cell phenotype, from lipid-droplet containing cells presenting a spherical shape (day 1) to myofibroblast-like star-shaped cells with low lipid content (day 6). Our results show that the expressions of  $\alpha$ SMA, Col1 $\alpha$ 1, and Col3 $\alpha$ 1 were also significantly increased over the 6 days culture period. As such, at day 6 after culture, mRNA expression was increased up to  $(3.41 \pm 0.97)$  for  $\alpha$ SMA,  $(3.52 \pm 0.29)$  for Col1 $\alpha$ 1, and  $(2.29 \pm 0.52)$  for Col3 $\alpha$ 1 compared to the expression of the same markers at day 2. We then activated the cells using TGF $\beta$ 1, the most potent cytokine involved in HSC activation. mRNA expressions of  $\alpha$ SMA ( $2.10 \pm 0.18$ ), Col1 $\alpha$ 1 ( $2.29 \pm 0.14$ ), and Col3 $\alpha$ 1 ( $1.52 \pm 0.14$ ), were all increased compared to the control group. Finally, we tested the susceptibility of the HSCs isolated using our protocol to adenoviral transduction. A transduction yield of approximately 40% to 50% was achieved in the isolated HSCs at day 6, following transduction.

**Discussions & Conclusions:** Our work describes an improved protocol for isolating HSCs from C57/BL6 mice, one of the most common mouse strains used to study HSCs and their activation during liver fibrosis. Compared to the other protocols already published in the literature, ours provides all the necessary details needed in order to obtain a consistently high number of viable HSCs. We obtained a consistently high number of HSCs using our modified protocol and the cells were pure, viable, and can be used for subsequent *in vitro* experimentations. Limitations of our protocol include contamination during the procedure due to misuse of material and variation in cell numbers when younger mice (< 3 months old) are used. In addition, excessive peritoneal

fat might obscure the visibility of the IVC and thus limit perfusion and clamping capabilities (*e.g.* mice on MCD diet, obese mice, etc.). Finally, mice with advanced hepatic fibrosis have excessive ECM deposition, thus requiring a higher degree of liver digestion (consider increasing digestion enzyme volumes).

## **Study 2. PRDM16 mediates hepatic stellate cell activation and liver fibrogenesis**

**Work hypothesis:** The aim of the present research was to study the role of PRDM16 in the activation of HSCs that takes place during liver fibrosis.

**Results:** In our first batch of experiments, we studied the expression of PRDM16 in the livers of rodents with hepatic fibrosis. In animals with CCL<sub>4</sub>-induced liver fibrosis we detected an increase in both mRNA (up to 4x), as well as protein expression for PRDM16 versus controls. Similarly, in mice fed with a methionine & choline-deficient (MCD) diet, the mRNA (up to 2.8x) and protein expression levels of PRDM16 were also increased, compared to control samples. In a third animal model of liver fibrosis, mice following biliary duct ligation (BDL), PRDM16 mRNA expression was also increased (up to 4x at day 10), along with markers of liver fibrosis, such as  $\alpha$ SMA (up to 10x at day 10), compared to controls. We then looked at PRDM16 expression patterns specifically in HSCs from fibrotic animals treated with CCL<sub>4</sub> and in HSCs that were cultured on plastic dishes (*auto-activation* of cells). In these cases, PRDM16 mRNA expression increased up to 4.2x in HSCs from fibrotic animals and 3x in HSCs which *auto-activated in vitro*. HSCs were stimulated with TGF $\beta$ 1 in order to activate them and we observed an increase in PRDM16 mRNA expression (up to 2x) as compared to controls. Next we looked at PRDM16 and miR133 mRNA expression during HSC activation and observed an increase of PRDM16 (up to 4.2x times at day 7) and a decrease in miR133 (up to 3x at day 7) versus day 0 (plating of cells). Next, we invalidated PRDM16, which led to a significant decrease in mRNA expression of both types of collagens (Col1a1 and Col3a1). We performed an immuno-precipitation experiment and detected an enrichment of SMAD3 proteins in the eluates corresponding to the Flag-PRDM16 fractions.

**Discussions & Conclusions:** Through these experiments, we showed a positive correlation between PRDM16 hepatic expression and liver fibrogenesis. We explain this correlation through the role played by PRDM16 in HSC activation, which is the initiating event of fibrogenesis. First, we showed that among cell populations that increase in number in the liver undergoing injury, PRDM16 expression is specifically induced in HSC. Secondly, by focusing on ECM synthesis, one of the features of HSC activation, we showed that PRDM16 is necessary for collagen expression and that this role is likely partly accomplished via cooperation between PRDM16 and SMAD3 (first team to show this in HSCs).



### **Study 3. TRB3 expression is linked to hepatic stellate cell activation and liver fibrosis**

**Work hypothesis:** The work hypothesis was to establish the role of TRB3 in the liver in the context of NASH and more precisely in fibrosis. Specifically, we looked at TRB3 expression in the whole liver, as well as in different cell types such as hepatocytes, KCs, and HSCs.

**Results:** To investigate the role of TRB3 in the pathogenesis of liver fibrosis we first analyzed TRB3 expression in total liver of fibrotic animals. Mice with CCL<sub>4</sub>-induced fibrosis had an increase expression of TRB3 in the total liver (up to 10x at 10 weeks of treatment) compared to controls. TRB3 proteins expression was detected by immunohistochemistry at very low levels in control animals, while in fibrotic animals its expression was significantly increased. Next, we studied the expression of TRB3 in different cell types. TRB3 mRNA expression was significantly increased (up to 5x) in isolated hepatocytes from fibrotic mice compared to control. In HSCs from fibrotic rats, TRB3 mRNA expression was highly increased compared to control (up to 60x at 4 weeks of CCL<sub>4</sub> treatment). TRB3 expression was increased in activated HSCs, both during auto-activation, as well as cytokine-induced activation. mRNA levels of TRB3 were increased up to 3x at day 6 of HSC auto-activation, while its expression was 2x higher versus controls in HSCs treated with TGFβ<sub>1</sub>. Invalidation of TRB3 using an SiRNA approach completely blocked HSC activation, as observed by a decrease of fibrogenic markers (αSMA, Col1a1, and Col3a1) both in GRX and in primary HSCs.

**Discussions & Conclusions:** The objectives of this study were to research the role of TRB3 in liver fibrosis. The experiments carried out with animal models of liver fibrosis proved that TRB3's expression is significantly increased in the total liver of fibrotic animals compared to control animals following CCL<sub>4</sub> treatment. Furthermore, we identified two sources for this increase in TRB3 expression in the total liver. As such, a significant TRB3 increase was observed in hepatocytes (5 fold vs control), as well as in primary HSCs (60 fold vs control at 4 weeks of treatment). Our study is the first to show that TRB3 is highly increased specifically in HSCs and that the invalidation of TRB3 in primary HSCs leads to a decrease in collagen-producing genes, as well as markers of HSC activation such as αSMA and TGFβ<sub>1</sub>. Further studies will need to investigate the specific molecular mechanisms and potential partners of TRB3 in pathways involved in HSC activation and liver fibrogenesis propagation.

## ORIGINALITY AND INNOVATIVE CONTRIBUTIONS

There are multiple facets highlighting the originality of this work. First, during my doctoral studies, along with my colleagues, we have continuously worked to improve the protocol to isolate HSCs, one of the most difficult cell types to isolate and purify. We have managed to increase the yield of viable isolated HSCs, thanks to modifications to the protocol, while keeping the perfusion time at a minimum. The protocol we have developed is detailed in Study 1. Its main advantages are rapidity, reproducibility, and the high level of experimentation detail. In Studies 2 & 3, we focused on the roles of two proteins, PRDM16 TRB3, respectively, in the physiopathology of liver fibrosis in the context of NAFLD and NASH. Our work is the first to focus on the study of these proteins, in this context. Neither of the two proteins have been studied in the context of liver fibrosis, and their expression levels have not been quantified in HSCs to date. This is the first time we identify a physical interaction between PRDM16 and SMAD3 in HSCs. Also, this is the first study to show that HSC activation in primary HSCs is completely blocked when TRB3 expression is invalidated in this cell type.

Taken altogether, we have managed to advance the understanding of the disease area, as well as the roles of the abovementioned proteins in organs and pathologies in which they were not studied before. We hope to pave the way for new, exciting work which can elucidate the mechanisms through which these two proteins act in HSC activation and liver fibrosis pathogenesis, paving the path to the discovery of a new treatment for this disease.

## SELECTIVE REFERENCES

1. Mokdad AA, Lopez AD, Shahraz S, Lozano R, Mokdad AH, Stanaway J, et al. Liver cirrhosis mortality in 187 countries between 1980 and 2010: a systematic analysis. *BMC Med.* 2014;12:145.
2. Day CP, James OF. Steatohepatitis: a tale of two "hits"? *Gastroenterology.* 1998;114(4):842-5.
3. Marra F, Lotersztajn S. Pathophysiology of NASH: perspectives for a targeted treatment. *Curr Pharm Des.* 2013;19(29):5250-69.
4. Araújo AR, Rosso N, Bedogni G, Tiribelli C, Bellentani S. Global epidemiology of non-alcoholic fatty liver disease/non-alcoholic steatohepatitis: What we need in the future. *Liver Int.* 2018;38 Suppl 1:47-51.
5. Lee YA, Wallace MC, Friedman SL. Pathobiology of liver fibrosis: a translational success story. *Gut.* 2015;64(5):830-41.
6. NIH. NAFLD trials 2018 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=NAFLD&term=&cntry=&state=&city=&dist>.
7. NIH. NASH trials 2018 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=NASH&term=&cntry=&state=&city=&dist>.
8. NIH. Hepatic Fibrosis Trials 2018 [Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?cond=Liver+fibrosis&term=&cntry=&state=&city=&dist>.