

**IDENTIFICATION OF NOVEL VIRAL-HOST
INTERACTIONS IN HEPATITIS B VIRUS REPLICATION
AND PATHOGENESIS OF HEPATITIS B VIRUS-
RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA**

SHIVAKSH AHLUWALIA



**KUSUMA SCHOOL OF BIOLOGICAL SCIENCES
INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI**

FEBRUARY 2022

© Indian Institute of Technology Delhi (IITD), New Delhi, 2022

**IDENTIFICATION OF NOVEL VIRAL-HOST
INTERACTIONS IN HEPATITIS B VIRUS REPLICATION
AND PATHOGENESIS OF HEPATITIS B VIRUS-
RELATED HEPATOCELLULAR CARCINOMA**

by

SHIVAKSH AHLUWALIA

Kusuma School of Biological Sciences

Submitted

**in fulfilment of the requirements of the degree of Doctor of Philosophy
to the**



INDIAN INSTITUTE OF TECHNOLOGY DELHI

FEBRUARY 2022

Dedicated to my MAA and PAA

This is to certify that the thesis titled “**Identification of novel viral-host interactions in hepatitis B virus replication and pathogenesis of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma**”, being submitted by **Mr. Shivaksh Ahluwalia** to the Indian Institute of Technology Delhi, for the award of the degree of “**Doctor of Philosophy**” is a record of the bonafide research carried out by him, which has been prepared under my supervision and guidance in conformity with rules and regulation of the Indian Institute of Technology Delhi, India. The results prescribed in it have not been submitted in part or full to any other University or Institute for the award of any Degree/Diploma.

Date:

New Delhi

Dr. Vivekanandan Perumal

Professor

Kusuma School of Biological Sciences

Indian Institute of Technology Delhi

New Delhi-110016, India

ACKNOWLEDGEMENTS

First I would like to thank my supervisor, **Prof Vivekanandan Perumal**, for giving me the opportunity to work under his guidance. His enthusiasm for research and scientific curiosity has been a constant source of motivation. His contagious optimism helped me maneuver numerous challenges, making this project possible. I am grateful to him for being patient with me and giving me the freedom to make mistakes, learn and grow as a researcher. His knowledge, creativity and timely humor made this journey an enjoyable learning experience. Beyond the lab, his conduct has taught me priceless lessons in kindness, confidence and humility.

I would like to extend my heartfelt gratitude to the members of my student research committee (SRC) – **Prof. Chinmoy Sankar Dey, Prof. Bishwajit Kundu and Prof. Ritu Kulshreshtha**. I found a great amount of encouragement and insight in their wisdom and vast experience. Their invaluable feedback over the years has significantly shaped and improved this project.

I am also grateful to all the faculty at Kusuma School of Biological Sciences for their support and access to their lab facilities when needed. I would also like to acknowledge the staff at Kusuma School of Biological Sciences, whose diligent work is vital for the smooth operation of the department.

I would also like to thank all the present and former members of my lab – **Dr. Banhi Biswas, Dr. Shivani Kumar, Dr. Nandhini Saranathan, Kiruthika Sankar, Ashish Kumar, Uzma Salim, Dipannita Ghosh, Dr. Shruti Chowdhari and Ishwarya** – for all the wonderful times we have shared and creating a stimulating lab environment for better research. I would like to especially thank **Dipannita** for listening to all my exaggerated grievances and always giving me her reliable suggestions. I am thankful to **Banhi** for helping me in the early days of my research, and leading by example in her lessons of perseverance and hard work. I would also

like to acknowledge the support of **Arpita Ghosh** for all her help with my experiments, and more importantly for her time-tested and ever-uplifting friendship.

I would like to acknowledge **Prof. Manidipa Banerjee** and all the members of her lab for their help with various resources over the years. I am especially grateful to **Dr Sukanya Ghosh** for her prudent advice over the past 5 years.

Finally, I would thank my family for all their love and support. My **mother's** tough, but unconditional love helped me stay resolute through this journey. I am grateful to my sister, **Ananta** for patiently listening to me, helping me laugh and stay positive over the years. I would also like to thank my brother, **Sushant** for all the wonderful conversations, which were a source of constant joy. Finally, I would thank my **MAA and PAA**, for believing in me and encouraging me to pursue this path. This could not have been possible without their guidance, unequivocal love and support.

Shivaksh Ahluwalia

ABSTRACT

Chronic infection with HBV (CHB) is the predominant risk factor for hepatocellular carcinoma (HCC). HCC is the most common type of liver cancer, associated with poor clinical outcome and a high mortality rate. Hence, it is important to understand host-virus interactions governing the role of HBV in hepatocarcinogenesis (detailed in section I) and HBV replication (detailed in section II), so as to identify novel biomarkers and develop better interventions to improve prognosis in HBV-related HCC.

(I) The Hepatitis B small surface antigen (HBsAg) is an HBV-encoded secretory protein and a major structural component of the HBV proteolipid envelope. Clinical and *in vivo* studies strongly support the role of HBsAg in hepatocarcinogenesis, however the underlying mechanisms remain largely unknown. Here, we tested the ability of HBsAg to regulate long non-coding RNAs (lncRNAs) in hepatocytes, and further investigated the role of HBsAg-mediated lncRNAs in HCC development. Publicly available microarray data from HepG2 cells overexpressing HBsAg identified LINC00665 as an HBsAg-regulated lncRNA. Furthermore, gene expression data from liver samples of HBV and HCC patients demonstrated that LINC00665 upregulated in HBV infection and HCC, specifically in HBV-related HCC. This was supported by our *in vitro* data which demonstrated that LINC00665 expression was upregulated in the presence of HBsAg in HepG2 and Huh7 cells, as well as in the presence of the HBV whole-genome in 3 different HBV cell culture models. Next, we evaluated the oncogenic potential of LINC00665 by its overexpression and CRISPRi-based knock-down in various cell-based assays. LINC00665 promoted cell proliferation, migration and colony formation, but inhibited cell apoptosis *in vitro*. Taken together, these results identified LINC00665 as a novel lncRNA through which HBV, specifically HBsAg can drive hepatocarcinogenesis in HBV-related HCC.

We wanted to further understand the mechanism by which HBsAg regulates oncogenic lncRNAs. The Nuclear Factor- κ B (NF- κ B) family of transcription factors (NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB, and c-Rel) are master regulators of inflammation, regeneration and immunomodulation in the liver. Previous studies suggest that LINC00665 is an NF- κ B responsive lncRNA. Furthermore, HBsAg has been shown to activate NF- κ B signaling in clinical studies, as well as in mouse models. Based on these findings, we hypothesized that HBsAg acts through the NF- κ B pathway to regulate LINC00665 expression. We first confirmed that HBsAg activates NF- κ B signaling *in vitro*, by demonstrating that HBsAg promoted the nuclear translocation of NF- κ B factors. Next, we observed that suppressing NF- κ B activity nullified HBsAg-induced LINC00665 transcription, as well as the HBsAg-mediated activation of the LINC00665 promoter in luciferase assays. This suggests that HBsAg acts through the NF- κ B pathway to regulate LINC00665. Furthermore, we identified multiple NF- κ B binding sites in the LINC00665 promoter and demonstrated their functional relevance. We used reporter assays to show that disrupting κ B sites abrogated the HBsAg-mediated activation of the LINC00665 promoter. Finally, we used ChIP to demonstrate HBsAg promotes enrichment of NF- κ B factors at the LINC00665 promoter in the presence of HBsAg. Taken together, this data suggests that HBsAg positively regulates oncogenic LINC00665 through the NF- κ B pathway, thereby identifying a novel mechanism by which HBsAg drives hepatocarcinogenesis. This work identifies HBsAg/NF- κ B/LINC00665 axis as a novel viral-host interaction driving hepatocarcinogenesis, thereby substantiating further studies on LINC00665 as a biomarker in HBV-related HCC.

(II) In addition to HBV-host interactions in HCC, we wanted to investigate novel-virus host interactions regulating HBV replication. Numerous studies have shown that nuclear receptors are essential modulators of HBV transcription, translation and ultimately HBV replication.

However, not all members of this superfamily have been explored for their ability to regulate HBV activity. Clinical studies support the role of Vitamin D and its cognate nuclear receptor, Vitamin D receptor (VDR), in regulating HBV activity in CHB. This antiviral role of vitamin D is widely attributed to VDR/Retinoid X Receptor (RXR)-mediated regulation of host immunomodulatory genes through Vitamin D Response Elements (VDREs) in their promoters. Here, we investigated the ability of calcitriol (metabolically activated Vitamin D) to directly regulate HBV transcription, translation and replication through the VDR signaling pathway. We observed that calcitriol selectively inhibited only the HBV-core promoter without affecting the HBV-PreS1, HBV-PreS2/S, or HBx promoters. We then identified a VDRE-cluster in the HBV-core promoter that is highly conserved across most HBV genotypes. Disruption of this VDRE-cluster abrogated calcitriol-mediated suppression of the HBV-core promoter, demonstrating its functional relevance. Furthermore, we use binding assays to show that VDR interacts directly with the VDRE-cluster in the HBV-core promoter independent of RXR. This demonstrates that calcitriol inhibits HBV-core promoter activity through a non-canonical calcitriol-activated VDR-pathway. Finally, we observed that calcitriol suppressed expression of the canonical HBV-core promoter transcripts, pregenomic RNA (pgRNA) and precore RNA (pcRNA) in multiple HBV cell culture models. Additionally, calcitriol inhibited the secretion of HBeAg and HBsAg (HBV-encoded proteins linked to poor disease prognosis), without affecting virion secretion. These results were corroborated in an HBV drug-resistant mutant, where calcitriol inhibited pgRNA, pcRNA, HBeAg and HBsAg, but not virion secretion. The ability of vitamin D to reduce HBeAg and HBsAg levels suggests a potential role for this micronutrient as a supplement along with anti-viral therapies for HBV, especially in drug-resistant mutants. Furthermore, this work identifies VDR as a novel nuclear receptor regulating HBV-core promoter activity and conceptually advances our understanding of the antiviral role of vitamin D from an immunomodulator to a direct regulator of viral activity

हेपेटाइटिस बी वायरस प्रतिकृति और हेपेटाइटिस बी वायरस से संबंधित हेपेटोसेलुलर कार्सिनोमा के रोगजनन में उपन्यास वायरल-होस्ट इंटरैक्शन की पहचान

एचबीवी के साथ पुराना संक्रमण हेपेटोसेलुलर कार्सिनोमा (एचसीसी) के लिए प्रमुख जोखिम पैदा करने वाला है। एचसीसी लीवर कैंसर का सबसे आम प्रकार है, जो खराब नैदानिक परिणामों और उच्च मृत्यु दर से जुड़ा है। इसलिए, हेपेटोकार्सिनोजेनेसिस (खंड I में विस्तृत) और HBV प्रतिकृति (खंड II में विस्तृत) में HBV की भूमिका को नियंत्रित करने वाले होस्ट-वायरस इंटरैक्शन को समझना महत्वपूर्ण है, ताकि नए बायोमार्कर की पहचान की जा सके और HBV में रोग के निदान में सुधार के लिए बेहतर हस्तक्षेप विकसित किया जा सके। संबंधित एच.सी.सी.

(I) हेपेटाइटिस बी छोटा सतह प्रतिजन (HBsAg) एक HBV-एन्कोडेड स्रावी प्रोटीन है और HBV प्रोटियोलिपिड लिफाफे का एक प्रमुख संरचनात्मक घटक है। नैदानिक और विवो अध्ययन हेपेटोकार्सिनोजेनेसिस में HBsAg की भूमिका का दृढ़ता से समर्थन करते हैं, हालांकि अंदर छिपे हुए तंत्र काफी हद तक अज्ञात हैं। यहां, हमने हेपेटोसाइट्स में लंबे गैर-कोडिंग आरएनए (lncRNAs) को विनियमित करने के लिए HBsAg की क्षमता का परीक्षण किया, और आगे HCC विकास में HBsAg-मध्यस्थता lncRNAs की भूमिका की जांच की। HBsAg को ओवरएक्सप्रेस करते हुए HepG2 कोशिकाओं से सार्वजनिक रूप से उपलब्ध माइक्रोएरे डेटा ने LINC00665 को HBsAg-विनियमित lncRNA के रूप में पहचाना। इसके अलावा, HBV और HCC रोगियों के जिगर के नमूनों से जीन अभिव्यक्ति डेटा ने प्रदर्शित किया कि LINC00665 HBV संक्रमण और HCC में अपग्रेड किया गया है, विशेष रूप से HBV- संबंधित HCC में। यह हमारे इन विट्रो डेटा द्वारा समर्थित था जिसने दिखाया कि LINC00665 अभिव्यक्ति को HepG2 और Huh7 कोशिकाओं में HBsAg की उपस्थिति के साथ-साथ 3 अलग-अलग HBV सेल संस्कृति मॉडल में HBV पूरे-जीनोम की उपस्थिति में अपग्रेड किया गया था। इसके बाद, हमने LINC00665 की ऑन्कोजेनिक क्षमता का मूल्यांकन इसके ओवरएक्सप्रेशन और CRISPRi-आधारित नॉक-डाउन द्वारा विभिन्न सेल-आधारित assays में किया। LINC00665 ने सेल प्रसार, माइग्रेशन और कॉलोनी गठन को बढ़ावा दिया, लेकिन इन विट्रो में सेल एपोप्टोसिस को रोक दिया। इन परिणामों को एक साथ लेने पर LINC00665 को एक नए lncRNA के रूप में पहचाना जिसके माध्यम से HBV, विशेष रूप से HBsAg, HBV से संबंधित HCC में हेपेटोकार्सिनोजेनेसिस चला सकता है।

हम उस तंत्र को और समझना चाहते थे जिसके द्वारा HBsAg ऑन्कोजेनिक lncRNAs को नियंत्रित करता है। न्यूक्लियर फैक्टर- κ B (NF- κ B) ट्रांसक्रिप्शन कारकों का परिवार (NF- κ B1, NF- κ B2, RelA, RelB, और c-Rel) लीवर में सूजन, पुनर्जनन और इम्यूनोमोड्यूलेशन के मास्टर रेगुलेटर हैं। पिछले अध्ययनों से पता चलता है कि LINC00665 एक NF- κ B उत्तरदायी lncRNA है। इसके अलावा, HBsAg को नैदानिक अध्ययनों के साथ-साथ माउस मॉडल में NF- κ B सिग्नलिंग को सक्रिय करने के लिए दिखाया गया है। इन निष्कर्षों के आधार पर, हमने अनुमान लगाया कि HBsAg LINC00665

अभिव्यक्ति को विनियमित करने के लिए NF- κ B मार्ग के माध्यम से कार्य करता है। हमने पहली बार पुष्टि की कि HBsAg इन विट्रो में NF- κ B सिग्नलिंग को सक्रिय करता है, यह प्रदर्शित करके कि HBsAg ने NF- κ B कारकों के परमाणु अनुवाद को बढ़ावा दिया है। इसके बाद, हमने देखा कि NF- κ B गतिविधि को दबाने से HBsAg-प्रेरित LINC00665 प्रतिलेखन, साथ ही luciferase assays में LINC00665 प्रमोटर के HBsAg की मध्यस्थता से एक्टिवेट किया। इससे पता चलता है कि HBsAg LINC00665 को विनियमित करने के लिए NF- κ B मार्ग के माध्यम से कार्य करता है। इसके अलावा, हमने LINC00665 प्रमोटर में कई NF- κ B बाइंडिंग साइटों की पहचान की और उनकी कार्यात्मक प्रासंगिकता का प्रदर्शन किया। हमने रिपोर्टर assays का उपयोग यह दिखाने के लिए किया कि B साइटों को बाधित करने से LINC00665 प्रमोटर के HBsAg-मध्यस्थता सक्रियण को निरस्त कर दिया गया। अंत में, हमने HBsAg को प्रदर्शित करने के लिए चिप का उपयोग किया, HBsAg की उपस्थिति में LINC00665 प्रमोटर पर NF- κ B कारकों के संवर्धन को बढ़ावा देता है। एक साथ लिया गया, यह डेटा बताता है कि HBsAg NF- κ B मार्ग के माध्यम से ऑन्कोजेनिक LINC00665 को सकारात्मक रूप से नियंत्रित करता है, जिससे एक उपन्यास तंत्र की पहचान होती है जिसके द्वारा HBsAg हेपेटोकार्सिनोजेनेसिस को चलाता है। यह कार्य HBsAg / NF- κ B / LINC00665 अक्ष को एक उपन्यास वायरल-होस्ट इंटरैक्शन ड्राइविंग हेपेटोकार्सिनोजेनेसिस के रूप में पहचानता है, जिससे HBV से संबंधित HCC में बायोमार्कर के रूप में LINC00665 पर आगे के अध्ययन की पुष्टि होती है।

एचसीसी में एचबीवी-होस्ट इंटरैक्शन के अलावा, हम एचबीवी प्रतिकृति को विनियमित करने वाले उपन्यास-वायरस होस्ट इंटरैक्शन की जांच करना चाहते थे। कई अध्ययनों से पता चला है कि परमाणु रिसेप्टर्स HBV प्रतिलेखन, अनुवाद और अंततः HBV प्रतिकृति के आवश्यक न्यूनाधिक हैं। हालांकि, एचबीवी गतिविधि को विनियमित करने की उनकी क्षमता के लिए इस सुपरफैमिली के सभी सदस्यों का पता नहीं लगाया गया है। नैदानिक अध्ययन सीएचबी में एचबीवी गतिविधि को विनियमित करने में विटामिन डी और इसके संज्ञेय परमाणु रिसेप्टर, विटामिन डी रिसेप्टर (वीडीआर) की भूमिका का समर्थन करते हैं। विटामिन डी की यह एंटीवायरल भूमिका व्यापक रूप से वीडिआर / रेटिनोइड एक्स रिसेप्टर (आरएक्सआर) के लिए जिम्मेदार है, जो उनके प्रमोटरों में विटामिन डी रिस्पॉंस एलिमेंट्स (वीडीआरई) के माध्यम से मेजबान इम्युनोमोडायलेटरी जीन के विनियमित विनियमन है। यहां, हमने वीडिआर सिग्नलिंग मार्ग के माध्यम से एचबीवी प्रतिलेखन, अनुवाद और प्रतिकृति को सीधे विनियमित करने के लिए कैल्सीट्रियोल (चयापचय रूप से सक्रिय विटामिन डी) की क्षमता की जांच की। हमने देखा कि कैल्सीट्रियोल ने HBV-PreS1, HBV-PreS2/S, या HBx प्रमोटरों को प्रभावित किए बिना केवल HBV-कोर प्रमोटर को चुनिंदा रूप से बाधित किया। फिर हमने एचबीवी-कोर प्रमोटर में एक वीडिआरई-क्लस्टर की पहचान की जो कि अधिकांश एचबीवी जीनोटाइप में अत्यधिक संरक्षित है। इस वीडिआरई-क्लस्टर के विघटन ने एचबीवी-कोर प्रमोटर के कैल्सीट्रियोल-मध्यस्थता दमन को निरस्त कर दिया, इसकी कार्यात्मक प्रासंगिकता का प्रदर्शन किया। इसके अलावा, हम एक साथ जोड़ने वाला assays का उपयोग यह दिखाने के लिए करते हैं कि VDR RXR से स्वतंत्र HBV-कोर प्रमोटर

में VDRE-क्लस्टर के साथ सीधे इंटरैक्ट करता है। यह दर्शाता है कि कैल्सीट्रियोल गैर-विहित कैल्सीट्रियोल-सक्रिय वीडिआर-मार्ग के माध्यम से एचबीवी-कोर प्रमोटर गतिविधि को रोकता है। अंत में, हमने देखा कि कैल्सीट्रियोल ने कई एचबीवी सेल संस्कृति मॉडल में कैनोनिकल एचबीवी-कोर प्रमोटर टेप, प्रीजेनोमिक आरएनए (पीजीआरएनए) और प्रीकोर आरएनए (पीसीआरएनए) की अभिव्यक्ति को दबा दिया। इसके अतिरिक्त, कैल्सीट्रियोल ने विषाणु स्राव को प्रभावित किए बिना HBeAg और HBsAg (HBV- एन्कोडेड प्रोटीन जो खराब रोग रोग से जुड़ा हुआ है) के स्राव को रोक दिया। इन परिणामों को एक HBV दवा-प्रतिरोधी म्यूटेंट में पुष्टि की गई थी, जहां कैल्सीट्रियोल pgRNA, PCRNA, HBeAg और HBsAg में बसा हुआ था, लेकिन विषाणु स्राव नहीं। एचबीईएजी और एचबीएसएजी स्तरों को कम करने के लिए विटामिन डी की क्षमता एचबीवी के लिए एंटी-वायरल उपचारों के साथ-साथ विशेष रूप से दवा प्रतिरोधी म्यूटेंट में पूरक के रूप में इस सूक्ष्म पोषक तत्व के लिए एक संभावित भूमिका का सुझाव देती है। इसके अलावा, यह कार्य वीडिआर को एचबीवी-कोर प्रमोटर गतिविधि को विनियमित करने वाले एक उपन्यास परमाणु रिसेप्टर के रूप में पहचानता है और अवधारणात्मक रूप से एक इम्युनोमोड्यूलेटर से वायरल गतिविधि के प्रत्यक्ष नियामक के लिए विटामिन डी की एंटीवायरल भूमिका की हमारी समझ को आगे बढ़ाता है

TABLE OF CONTENTS

Title	Page No.
Certificate	i
Acknowledgements	ii
Abstract	iv
Table of contents	xi
List of figures	xiv
List of tables	xvii
List of abbreviations	xviii
Chapter 1. Review of Literature	1
1.1 History of hepatitis B virus	2
1.2 Hepatitis B virus taxonomy and genotypes	3
1.3 Molecular biology of hepatitis B virus	3
1.3.1 Structure of the hepatitis B virus	3
1.3.2 The hepatitis B virus genome	5
1.3.3 Hepatitis B Virus promoters and regulatory elements	7
1.3.4 Hepatitis B Virus replication	9
1.4 Transmission and epidemiology of hepatitis B virus	11
1.5 Natural course of hepatitis B virus infection	11
1.6 Diagnosis of hepatitis B virus infection	13
1.7 Treatment of hepatitis B virus infection	15
1.8 Hepatocellular carcinoma	17
1.8.1 Epidemiology of hepatocellular carcinoma	17
1.8.2 Mechanisms in development of hepatocellular carcinoma	19
1.8.3 Pathogenies of hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma	21
1.8.4 Screening and diagnosis of hepatocellular carcinoma	25

TABLE OF CONTENTS

Title	Page No.
1.8.5 Treatment of hepatocellular carcinoma	25
1.8.6 Hepatitis B small surface antigen and its role in hepatocellular carcinoma	27
1.9 Long non-coding RNAs	29
1.10 Long non-coding RNAs in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma	31
1.11 Nuclear Receptors	35
1.11.1 Introduction to Nuclear receptors	35
1.11.2 Nuclear receptors in hepatitis B virus transcription	36
1.11.3 Vitamin D and its vitamin D receptor signaling pathway	38
1.11.4 Pathway for vitamin D production and metabolism	39
1.11.5 Vitamin D receptor signaling pathway	40
1.11.6 Vitamin D in the regulation of hepatitis B virus activity	42
Aims	46
Chapter 2. To identify HBsAg-mediated lncRNAs that drive hepatocarcinogenesis in HBV-related HCC	48
2.1 Introduction	49
2.2 Methods	51
2.3 Results	56
2.4 Discussion	71
2.5 Conclusion	73
Chapter 3. To elucidate the mechanism by which HBsAg regulates oncogenic lncRNAs.	75

TABLE OF CONTENTS

Title	Page No.
3.1 Introduction	76
3.2 Methods	78
3.3 Results	81
3.4 Discussion	88
3.5 Conclusion	91
Chapter 4. To investigate the role of a novel nuclear receptor in HBV transcription, translation and HBV replication.	92
4.1 Introduction	93
4.2 Methods	96
4.3 Results	102
4.4 Discussion	121
4.5 Conclusion	125
Chapter 5. Summary	127
References	134
Appendix	158
List of publications and conferences	225
Author's resume	226

LIST OF FIGURES

Fig. No.	Title	Page
Fig. 1.1	A schematic of HBV particles.	4
Fig. 1.2	The HBV genome structure	6
Fig. 1.3	HBV Promoters and transcriptome map	8
Fig. 1.4	The HBV lifecycle	10
Fig. 1.5	The four phases in the natural history of HBV infection	13
Fig. 1.6	Geographical distribution of liver cancer	18
Fig. 1.7	Mechanisms inducing nonresolving inflammation in hepatocarcinogenesis	20
Fig. 1.8	Stages of HCC and their treatment strategies	27
Fig. 1.9	Functional mechanisms of lncRNA	31
Fig. 1.10	Pathway for vitamin D production and metabolism	40
Fig. 1.11	The vitamin D receptor signaling pathway	41
Fig. 2.1	HBsAg regulates lncRNAs in HepG2 hepatoma cells.	58
Fig. 2.2	LINC00665 is an HBsAg-mediated lncRNA implicated in HBV-related HCC.	60
Fig. 2.3	HBsAg positively regulates LINC00665 in different hepatoma cell lines.	61
Fig. 2.4	HBV positively regulates LINC00665 in different cell culture models.	62
Fig. 2.5	LINC00665 overexpression enhances cell proliferation and colony formation.	64
Fig. 2.6	LINC00665 overexpression inhibits apoptosis.	65
Fig. 2.7	LINC00665 overexpression increases cell migration.	66
Fig. 2.8	LINC00665 was knocked down by CRISPRi.	67

LIST OF FIGURES

Fig. No.	Title	Page
Fig. 2.9	LINC00665 knockdown inhibits cell proliferation and colony formation.	69
Fig. 2.10	LINC00665 knockdown induces apoptosis.	70
Fig. 2.11	LINC00665 knockdown inhibits cell migration.	71
Fig. 3.1	HBsAg facilitates nuclear translocation of NF- κ B factors.	82
Fig. 3.2	Inhibition of NF- κ B pathway nullifies HBsAg-mediated upregulation of LINC00665 expression.	83
Fig. 3.3	Inhibition of NF- κ B pathway nullifies HBsAg-mediated upregulation of LINC00665 promoter.	84
Fig. 3.4	LINC00665 promoter contains κ B sites.	85
Fig. 3.5	Disrupting κ B sites in the LINC00665 promoter abrogates HBsAg-mediated positive regulation of LINC00665.	87
Fig. 3.6	HBsAg facilitates enrichment of NF- κ B factors at the LINC00665 promoter.	88
Fig. 4.1	Vitamin D signaling-pathway is active in hepatic cell lines.	102
Fig. 4.2	Calcitriol selectively suppresses the HBV-core promoter in luciferase assays.	104
Fig. 4.3	Identification of a VDRE-cluster in the HBV-core promoter that is conserved across most HBV genotypes.	106
Fig. 4.4	Mutations disrupting the HBV VDRE-cluster abrogates calcitriol-mediated suppression of the HBV-core promoter.	109

LIST OF FIGURES

Fig. No.	Title	Page
Fig. 4.5	Calcitriol does not regulate HBV genotype ‘G’ core promoter, which lacks VDREs	110
Fig. 4.6	VDR binds to VDREs in the HBV-core promoter independent of RXR.	112
Fig. 4.7	ChIP demonstrates that VDR binds to the HBV core promoter independent of RXR to regulate HBV-core promoter activity.	114
Fig. 4.8	Calcitriol suppresses transcription from the HBV core promoter in the full-length HBV genome.	116
Fig. 4.9	Calcitriol suppresses production of HBV secretory proteins.	117
Fig. 4.10	Calcitriol does not lead to a significant reduction in virion secretion.	118
Fig. 4.11	Calcitriol inhibits HBV-core promoter transcripts, HBV secretory proteins but not HBV virion secretion in HBV CYEI mutant.	120
Fig. 5.1	HBsAg-induced NF- κ B signaling upregulates oncogenic LINC00665, which drives hepatocarcinogenesis.	130
Fig. 5.2	Calcitriol inhibits HBV activity directly by the vitamin D signaling pathway.	132

LIST OF TABLES

Table No.	Title	Page No.
Table 1.1	Diagnostic biomarkers in HBV infection	14
Table 1.2	HBV regulated lncRNAs in HCC development	34
Table 1.3	Nuclear receptors that regulate HBV replication, along with their targeted HBV regulatory element and effect on HBV transcription.	37
Table 1.4	Clinical studies on the correlation between vitamin D and HBV activity	44
Table 3.1	Sequence and position of κ B sites relative to the TSS in the LINC00665 minimal promoter	86
Table 4.1	VDREs in HBV genotype ‘D’ core promoter.	105

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

25OHD	25-Hydroxyvitamin D
AALSD	The American Association for the Study of Liver Diseases
AFP	Alpha Fetoprotein
ALT	Alanine Aminotransferase
Au Ag	Australia antigen
BCP	Basal core promoter
CBP/p300	C-terminal binding protein
cccDNA	Covalently closed circular DNA
CHB	Chronic HBV infection
CHBV	Cranes hepatitis B virus
ChIP	Chromatin immunoprecipitation
CRE	cAMP-Response-Element
DAMP	Damage associated molecular patterns
DELncRNA	Differentially expressed lncRNA
DHBV	Pekin duck hepatitis B virus
DR5	Death Receptor 5
EBV	Epstein-Barr Virus
EGFR	Epidermal growth factor receptor
EMSA	Electromobility shift assay
ER	Endoplasmic Reticulum
Fas	Fas cell surface death receptor
FasL	Fas Ligand
GWAS	Genome-wide association studies
HBcAg	Hepatitis B core antigen
HBeAg	Hepatitis B e antigen
HBV	Hepatitis B virus
HBx	Hepatitis B X protein
HCC	Hepatocellular Carcinoma
HCV	Hepatitis C Virus
HSPG	Heparan sulphate proteoglycans
hTERT	Human telomerase reverse transcriptase
IFN	Interferon

ABBREVIATIONS AND SYMBOLS

IVT	<i>In vitro</i> translation
JTB	Jumping translocation breakpoint
KDa	Kilodalton
KRAB	Krüppel associated box
L/PreS1 protein	HBV large surface protein
lncRNA	Long Non-Coding RNAs
M/PreS2 protein	HBV middle surface protein
MICA A/B	Major histocompatibility complex class I-related molecules A and B
NASH	Non-alcoholic steatohepatitis
ncRNA	Non-coding RNAs
nm	Nanometre
NT-sgRNA	Non-targeting single guide RNA
NTCP	Sodium taurocholate co-transporting polypeptide
PAMP	Pathogen associated molecular patterns
PDGFR	Platelet-derived growth factor receptors
pgRNA	Pregenomic RNA
rcDNA	Relaxed circular DNA
RFA	Radiofrequency ablation
RXR	Retinoid X Receptor
S Protein/HBsAg	Hepatitis B small surface antigen
sgRNA	single guide RNA
STHBV	White storks hepatitis B virus
TACE	Trans-catheter arterial chemoembolization
TBP	TATA box-binding protein
TFIIB	Transcription factor IIB
TLR	Toll-like receptor
Treg	T Regulatory cell
μM	Micromolar
URR	Upstream regulatory region
VDR	Vitamin D Receptor
VEGFR	Vascular endothelial growth factor receptors
WHBV	Woodchuck hepatitis B virus
WHO	World Health Organization
