

Rola receptorów komórkowych w zakażeniu wirusami HBV i HCV

Role of cellular receptors for binding and infection of HBV and HCV

Anna Parfieniuk, Anatol Panasiuk, Tadeusz Wojciech Łapiński, Robert Flisiak

Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku

Summary: Viral replication is a multistage process. The approved antiviral therapies for chronic hepatitis B or C are based on the modulation of immune responses or inhibition of viral enzymes. Inhibition of viral entry seems to be an attractive target for the development of new antivirals. Thus the identification of cellular receptors for HBV and HCV seems to be crucial for further studies. Of the cellular proteins proposed for HBV recognition and attachment are immunoglobulin A, interleukin 6, asialoglycoprotein receptor, heparan sulfate, apolipoprotein H, annexin V, carboxypeptidase D, and glycine decarboxylase. There are many membrane receptors proposed for the mediation of HCV entry, among them lectins (DC-SIGN, L-SIGN, ASGPr), heparan sulfate, LDL receptor, CD81, SR-B1, and claudin-1. A combination of standard therapies with new agents blocking viral entry could be beneficial for the effectiveness of treatment. However, these compounds are still in the preclinical phase of development.

Słowa kluczowe: receptory wejścia • HBV • HCV

Key words: entry receptors • HBV • HCV

Adres do korespondencji: Anna Parfieniuk, Klinika Chorób Zakaźnych i Hepatologii, Uniwersytet Medyczny w Białymstoku, ul. Żurawia 14, 15-540 Białystok, Polska, e-mail: anna.parfieniuk@gmail.com

Wstęp

Przebieg zakażenia wirusowego jest wieloetapowy, poprzez adsorpcję, penetrację, odpłaszczenie wirusa, produkcję białek wczesnych, replikację, produkcję białek późnych oraz składanie wirionów i ich uwalnianie z komórki. Poznanie cyklu replikacyjnego wirusów ukierunkowuje badania nad lekami przeciwwirusowymi działającymi w poszczególnych fazach. Ingerencja w procesy replikacji i produkcji białek wirusowych jest atrakcyjnym kierunkiem badań nad nowymi związkami o działaniu przeciwwirusowym. Jednak coraz większe zainteresowanie budzi mechanizm blokowania wejścia wirusów do komórek permissywnych. W pierwszym etapie zakażenia dochodzi do połączenia wirusa z odpowiednimi strukturami prezentowanymi na powierzchni komórek. Etap ten jest energetycznie niezależny, zaś zespolenie charakteryzuje się niskim powinowactwem cząstek względem siebie. Konsekwencją tego zjawiska jest wiązanie wirusa z odpowiednim specyficznym receptorem, który pośredniczy w kolejnych etapach przechodzenia wirusa do wnętrza komórki. Procesy te warunkują podatność organizmu gospodarza na zakażenie oraz wiążą się z tropizmem wirusa do określonych tkanek. Tropizm komórkowy wirusów otoczkowych jest uwarunkowany selektywnymi interakcjami po-

między glikoproteinami otoczki oraz specyficznymi receptorami na błonie komórkowej [1].

Zakażenie HBV

Dostępność kultur komórkowych, które umożliwiły pasażowanie wirusa zapalenia wątroby typu B (HBV), pozwoliła na zbadanie jego cyklu replikacyjnego. Opisano wiele powierzchniowych białek błonowych mogących służyć za receptor dla HBV, jednak, dotychczas nie potwierdzono ostatecznie ich roli w procesie zakażenia komórki. Sugerowano, że receptorem komórkowym dla domeny pre-S1 wchodzącej w skład nukleokapsydu jest m.in. immunoglobulina A, interleukina 6, receptor dla asialoglikoproteiny [2-4]. Najnowsze doniesienia wskazują na rolę siarczianu heparanu we wczesnej fazie adhezji HBV do komórki poprzez domenę pre-S1 [5]. Domena S, natomiast, ma powinowactwo do apolipoproteiny H oraz anneksyny V [6,7]. Badania nad replikacją hepadnawirusów przeprowadzone na modelu DHBV (duck hepatitis B virus) pomogły zidentyfikować białko umożliwiające fuzję wirusa z komórką gospodarza. Jest to karboksypeptydaza D (CPD), białko transbłonowe wykazujące wysokie powinowactwo do domeny pre-S. Obecność CPD była kluczowa dla fuzji wirusa z ko-

mórką, zaś przechodzenie HBV do komórki było blokowane za pośrednictwem przeciwciał skierowanych przeciw CPD [8]. Wykazano ponadto, że kofaktorem reakcji fuzji DHBV z komórką jest podjednostka P enzymu dekarboksylazy glicynowej (GDC) wykazującej powinowactwo do domeny pre-S. Białko to zidentyfikowano w dużej ilości w wątrobie, trzustce i nerkach. Zmniejszenie ekspresji GDC w komórce powodowało mniejszą inwazyjność zakażenia HBV, jednak nie eliminowało go całkowicie, zaproponowano więc teorię, zgodnie z którą GDC aktywuje proteolitycznie L-proteinę DHBV pośrednicząc w ten sposób w późnym etapie przechodzenia wirusa do komórki [9].

Zakażenie HCV

Badanie cyklu replikacyjnego wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) w przeszłości było utrudnione ze względu na brak odpowiednich modeli pasażowania wirusa na liniach komórkowych. W początkowym okresie badania były przeprowadzane z użyciem rozpuszczonej formy białka otoczkowego wirusa E2. Stworzenie pseudocząsteczki HCV (HCVpp; HCV pseudoparticle) zbudowanej z glikoprotein otoczkowych umieszczonych na rdzeniu retrowirusowym umożliwiło badanie receptorów komórkowych dla HCV. Kolejnym etapem było stworzenie systemu pasażu HCV na liniach komórkowych JFH-1 (Japanese case of acute fulminant hepatitis) (HCVcc; HCV cell culture), który umożliwił dokładną obserwację cyklu życiowego HCV [10–12].

Wejście wirusa do komórki jest implikowane przez kaskadę zjawisk zapoczątkowaną połączeniem glikoprotein otoczki z receptorami na błonie komórkowej gospodarza. Wykazano, że adhezji HCV do błony komórkowej pośredniczą C-lectyny: DC-SIGN (dendritic cell – specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing nonintegrin; CD 209) oraz L-SIGN (Liver/lymph node – specific intercellular adhesion molecule-3-grabbing integrin; CD209L) [13,14]. Lektyna DC-SIGN pośredniczy w interakcjach pomiędzy komórkami dendrytycznymi i limfocytami T. Natomiast cząstka L-SIGN występuje na komórkach tworzących śródbłonek zatok wątrobowych i bierze udział w interakcjach z komórkami Browicza-Kupffera. Głównym zadaniem C-lectyn jest wiązanie, internalizacja i w konsekwencji eliminacja patogenów, jednak niektóre wirusy nie ulegają degradacji w komórkach, wykorzystując C-lectyny jako receptory wejścia do komórek [15,16]. Wykazano, że C-lectyny wiążą glikoproteiny HCV, a następnie przekazują wiriony do sąsiadujących wrażliwych na zakażenie (permissywnych) komórek [16,17]. Receptor asialoglikoproteinowy (ASGPr) należący do grupy lektyn, obecny na komórkach mięszzowych wątroby fizjologicznie bierze udział w wychwytywaniu osoczowych lipoprotein. Istnieją dowody przemawiające za tym, że ASGPr bierze udział w procesie przechodzenia HCV do wnętrza komórki [18].

Glikozaminoglikany występujące na powierzchni komórek pełnią funkcję cząstek adhezyjnych dla różnych wirusów, w tym także dla HCV, który wykorzystuje cząsteczki heparyno-podobnych glikozaminoglikanów do połączenia się z komórkami docelowymi [19,20]. Wykazano, że siarczan heparanu, wykazujący wysokie powinowactwo do białka otoczkowego E2, w postaci wolnej blokował wejście HCV do komórki w sposób zależny od dawki. Natomiast degradacja siarczanu heparanu związanego z błonami komórkowymi redukowałą adsorpcję wirusa do komórek [21].

Receptor LDL (LDLr) bierze udział w transporcie lipoprotein o niskiej gęstości (LDL) do wnętrza komórek w przebiegu endocytozy. Po związaniu LDL z receptorem dochodzi do internalizacji kompleksów w postaci endosomów opłaszczonych klatryną. Badania wskazują, że LDLr bierze udział w zakażeniu komórek przez HCV pełniąc rolę receptora dla cząstek HCV o niskiej gęstości (wirus HCV związany z beta-lipoproteina) [22].

Białko powierzchniowe CD81 (tetraspanina; TAPA-1) występuje powszechnie na różnych komórkach ludzkich za wyjątkiem erytrocytów i trombocytów. Jest zaangażowane między innymi w zjawiska adhezji komórkowej, przemieszczania się komórek i przenoszenia sygnałów. Ponadto CD81 jest najlepiej zbadanym receptorem komórkowym dla HCV. Jednak z uwagi na powszechność ekspresji na różnych typach komórek białko to nie jest elementem inwazji HCV odpowiedzialnym za tropizm wirusa. Udowodniono, że glikoproteina otoczkowa E2 wirusa wiąże się specyficznie z wysokim powinowactwem z CD81 [23]. Rola CD81 jest zasadnicza w procesie zakażenia komórki przez wirus. W warunkach eksperymentalnych komórki pozbawione ekspresji CD81 były odporne na zakażenie HCV. Wykazano ponadto, że inwazyjność wirusa wzrasta przy zwiększonej ekspresji receptora CD81 na komórkach [24]. Jednak sama obecność CD81 okazała się niewystarczająca do zakażenia komórki przez wirus [25]. Badacze sugerują, że białko CD81 pełni rolę koreceptora w późnych etapach procesu przechodzenia wirusa do komórki. Z drugiej strony, stwierdzono obecność kompleksów HCV-CD81 powiązanych z egzosomami krążącymi we krwi obwodowej, za pośrednictwem których dochodzi do zakażenia permissywnych komórek [26]. SR-B1 (scavenger receptor class B type I) jest glikoproteina powierzchniową transportującą w warunkach fizjologicznych estry cholesterolu w błonie komórkowej. Posiada zdolności wiązania lipoprotein HDL oraz LDL. Wykazano dużą ekspresję SR-B1 na hepatocytach [27]. Cząsteczka SR-B1 została uznana za wysoce specyficzny receptor, o dużym powinowactwie, za pośrednictwem którego białko otoczkowe E2 HCV wiąże się z komórką bez udziału CD81 [28].

Wykazano, że ekspresja receptorów CD81 oraz SR-B1 jest niezbędna, jednak niewystarczająca do zakażenia komórki przez HCV. Ponadto receptory te występują powszechnie na komórkach różnych typów. Określony tropizm HCV do komórek wątroby oraz w mniejszym stopniu leukocytów i neurocytów determinuje poszukiwanie nowych specyficznych dla tych linii komórkowych receptorów dla HCV.

Najnowsze doniesienia dowodzą istnienia nowego koreceptora niezbędnego w procesie wejścia HCV do komórki. Tym zidentyfikowanym białkiem jest receptor kładyna-1 (CLDN1), składnik międzykomórkowych połączeń zamykających, wykazujący wysoką ekspresję w wątrobie i nerkach. W eksperymencie z użyciem linii komórkowych raka wątrobowokomórkowego udowodniono, iż oprócz CD81 i SR-B1, do zakażenia komórek przez HCV jest konieczny dodatkowy receptor – CLDN1. Komórki pozbawione tego receptora pozostawały odporne na zakażenie. Infekcja HCV jest determinowana przez sekwencję pierwszej zewnątrzkomórkowej pętli CLDN-1 – EL-1. Przeciwciała skierowane przeciw sekwencji EL-1 skutecznie blokowały zakażenie komórki przez HCV. Autorzy sugerują, że CLDN-1 bierze udział w późnych etapach przenikania wirusa do komórki, po adhezji i interakcji z receptorem CD81 [29]. Na podstawie ob-



serwacji, że ekspresja wszystkich trzech receptorów CD81, SR-B1 oraz CLDN-1 na niektórych ludzkich liniach komórkowych była niewystarczająca do zakażenia komórek przez HCV, badacze postulują istnienie dodatkowego niezidentyfikowanego dotychczas czynnika biorącego udział w zakażeniu komórki przez wirus zapalenia wątroby typu C [30,31]. Wśród wielu receptorów proponuje się również kładynę-6, kładynę-9 oraz okładynę [32].

Implikacje terapeutyczne – wnioski

Identyfikacja czynników umożliwiających przeniknięcie wirusów do komórek jest atrakcyjnym celem badań, ponieważ niesie za sobą istotne implikacje terapeutyczne. Dotychczasowe terapie przeciwwirusowe są ukierunkowane na immunomodulację odpowiedzi gospodarza na infekcję lub na hamowanie cyklu replikacyjnego wirusa poprzez blokowanie enzymów wirusowych. Skojarzona terapia, która działałaby na kilku różnych etapach zakażenia komórek przez wirusa, wydaje się być znacznie bardziej skuteczna, co potwier-

dzają obserwacje leczenia zakażenia HIV przez skojarzenie HAART z inhibitorami fuzji. Opracowanie inhibitorów wejścia wirusa HBV lub HCV jest jednym z celów badań nad lekami przeciwwirusowymi. Przedstawicielem tej nowej grupy leków jest związek o nazwie Myrcludex. Jest to acylowany peptyd zawierający aminokwasy 2–48 domeny preS1 wirusa HBV, który poprzez wiązanie się z receptorami dla HBV na powierzchni zdrowych komórek (w tym również hepatocytów), zapobiega wnikięciu wirusa i zakażeniu [33]. Rola tego związku, będącego w fazie badań przedklinicznych, w terapii przeciwwirusowej i profilaktyce poekspozycyjnej nie została dotychczas określona. Badania przedkliniczne z użyciem modeli zwierzęcych sugerują 100-krotnie większy potencjał przeciwwirusowy tej substancji w porównaniu ze znanymi inhibitorami wejścia wirusa nabytego zespołu niedoboru immunologicznego [34,35]. Identyfikacja receptorów wejścia dla HCV poszerzyła o nowe czynniki horyzonty leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu C, które w przyszłości mogą stać się jednym z elementów docelowych skojarzonej terapii przeciwwirusowej.

Piśmiennictwo:

1. Sattentau Q: Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses. *Nat Rev Microbiol*, 2008; 6: 815–26
2. Owada T, Matsubayashi K, Sakata H i wsp: Interaction between desialylated hepatitis B virus and asialoglycoprotein receptor on hepatocytes may be indispensable for viral binding and entry. *J Viral Hepat*, 2006; 13: 11–18
3. Neurath AR, Strick N, Sproul P: Search for hepatitis B virus cell receptors reveals binding sites for interleukin 6 on the virus envelope protein. *J Exp Med*, 1992; 175: 461–69
4. Pontisso P, Ruvoletto MG, Tiribelli C i wsp: The preS1 domain of hepatitis B virus and IgA cross-react in their binding to the hepatocyte surface. *J Gen Virol*, 1992; 73(Pt 8): 2041–45
5. Leistner CM, Gruen-Bernhard S, Glebe D: Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol*, 2008; 10: 122–33
6. Mehdi H, Yang X, Peebles ME: An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently. *Virology*, 1996; 217: 58–66
7. Gong ZJ, De Meyer S, van Pelt J i wsp: Transfection of a rat hepatoma cell line with a construct expressing human liver annexin V confers susceptibility to hepatitis B virus infection. *Hepatology*, 1999; 29: 576–84
8. Urban S, Schwarz C, Marx UC i wsp: Receptor recognition by a hepatitis B virus reveals a novel mode of high affinity virus-receptor interaction. *Embo J*, 2000; 19: 1217–27
9. Kielian M, Rey FA: Virus membrane-fusion proteins: more than one way to make a hairpin. *Nat Rev Microbiol*, 2006; 4: 67–76
10. Wakita T, Pietschmann T, Kato T i wsp: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat Med*, 2005; 11: 791–96
11. Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ i wsp: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, 2005; 309: 623–26
12. Lindenbach BD, Meuleman P, Ploss A i wsp: Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006; 103: 3805–9
13. Gardner JP, Durso RJ, Arrigale RR i wsp: L-SIGN (CD 209L) is a liver-specific capture receptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003; 100: 4498–503
14. Pohlmann S, Zhang J, Baribaud F i wsp: Hepatitis C virus glycoproteins interact with DC-SIGN and DC-SIGNR. *J Virol*, 2003; 77: 4070–80
15. Cambi A, Figdor CG: Levels of complexity in pathogen recognition by C-type lectins. *Curr Opin Immunol*, 2005; 17: 345–51
16. Cormier EG, Durso RJ, Tsamis F i wsp: L-SIGN (CD209L) and DC-SIGN (CD209) mediate transfection of liver cells by hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004; 101: 14067–72
17. Lozach PY, Amara A, Bartosch B i wsp: C-type lectins L-SIGN and DC-SIGN capture and transmit infectious hepatitis C virus pseudotype particles. *J Biol Chem*, 2004; 279: 32035–45
18. Saunier B, Triyatni M, Ulianich L i wsp: Role of the asialoglycoprotein receptor in binding and entry of hepatitis C virus structural proteins in cultured human hepatocytes. *J Virol*, 2003; 77: 546–59
19. Germi R, Crance JM, Garin D i wsp: Cellular glycosaminoglycans and low density lipoprotein receptor are involved in hepatitis C virus adsorption. *J Med Virol*, 2002; 68: 206–15
20. Germi R, Crance JM, Garin D i wsp: Receptors for hepatitis C virus: update data. *Gastroenterol Clin Biol*, 2001; 25: 1011–15
21. Barth H, Schafer C, Adah MI i wsp: Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem*, 2003; 278: 41003–12
22. Thomssen R, Bonk S, Thiele A: Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoproteins and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol*, 1993; 182: 329–34
23. Petracca R, Falugi F, Galli G i wsp: Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol*, 2000; 74: 4824–30
24. Koutsoudakis G, Herrmann E, Kallis S i wsp: The level of CD81 cell surface expression is a key determinant for productive entry of hepatitis C virus into host cells. *J Virol*, 2007; 81: 588–98
25. Masciopinto F, Freer G, Burgio VL i wsp: Expression of human CD81 in transgenic mice does not confer susceptibility to hepatitis C virus infection. *Virology*, 2002; 304: 187–96
26. Masciopinto F, Giovani C, Campagnoli S i wsp: Association of hepatitis C virus envelope proteins with exosomes. *Eur J Immunol*, 2004; 34: 2834–42
27. Acton S, Rigotti A, Landschulz KT i wsp: Identification of scavenger receptor SR-B1 as a high density lipoprotein receptor. *Science*, 1996; 271: 518–20
28. Scarselli E, Ansuini H, Cerino R i wsp: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J*, 2002; 21: 5017–25
29. Hamilton JP, Thuluvath PJ: Claudin-1 and its potential role in HCV entry: another piece of the puzzle. *J Clin Gastroenterol*, 2008; 42: 3–4
30. Evans MJ, von Hahn T, Tschernig DM i wsp: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, 2007; 7137: 801–5
31. Cocquerel L, Voisset C, Dubuisson J: Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol*, 2006; 87: 1075–84
32. Dubuisson J, Helle F, Cocquerel L: Early steps of the hepatitis C virus life cycle. *Cell Microbiol*, 2008; 10: 821–27
33. Petersen J, Dandri M, Mier W i wsp: Prevention of hepatitis B virus infection *in vivo* by entry inhibitors derived from the large envelope protein. *Nat Biotechnol*, 2008; 26: 335–41
34. Glebe D, Urban S: Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol*, 2007; 13: 22–38
35. Tillmann HL: Antiviral therapy and resistance with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol*, 2007; 13: 125–40