

Agata Budkowska^{1*}, Patrick Maillard¹, Farzin Roohvand^{1,2}

¹Institut Pasteur, Unité Hépacivirus et Immunité Innée, 25/28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France

²Pasteur Institute of Teheran, AIDS and Hepatitis Department, Pasteur Ave, Teheran, Iran

1. Wstęp. 2. Cykl replikacyjny wzv C. 3. Rola lipoprotein w cyklu wirusowym. 4. Nowe inhibitory zakażenia. 5. Blokowanie zakażenia działaniem na lipoproteidy. 6. Mikrotubule jako nowy cel terapeutyczny. 7. Wnioski i perspektywy

Quest for new ways to prevent Hepatitis C virus infections

Abstract: Hepatitis C virus infection is a major cause of chronic liver disease, which can evolve to steatosis, cirrhosis and primary liver cancer. No HCV vaccine is available and current treatment, based on alfa interferon in association with ribavirin, leads to virus clearance in 50–80% of cases, is expensive and has considerable side effects. This stimulates constant search of new targets for anti-viral approaches by improving our knowledge of the virus cell cycle.

HCV represents unique model of virus-cell interaction, due to the central role of lipoproteins in the virus life cycle. Virus morphogenesis, takes place in association with lipid droplets and very low density lipoproteins (VLDL) are required for the production and release of virus particles from infected cells. Our studies concentrate on the mechanism of virus cell entry, its interaction with receptors and the role of triglycerid rich lipoproteins associated with virus particles in the initiation of infection. Our group has identified lipoprotein lipase (LPL) as an inhibitor of HCV infection. Another subject is the intracellular transport of virus structural proteins along the cytoskeletal, elements, especially microtubules. We have shown that virus cell entry, its transport and secretion from infected cells require fully functional microtubules. In addition, HCV core protein has a capacity to bind to tubulin, increasing microtubule polymerisation and permitting its intracellular transport.

Thus, lipoproteins associated with infectious virus particles, which are required for virus cell entry and transport on the microtubule network might be considered as new and attractive therapeutic targets for the development of new drugs anti viral-approaches.

1. Introduction. 2. HCV replication cycle. 3. Role of lipoproteins in the HCV life cycle. 4. New inhibitors of infection. 5. Blocking infection by acting on lipoproteins. 6. Microtubules as a new therapeutic target. 7. Conclusion and perspectives

Słowa kluczowe: wirus wzv C, infekcja komórki, cykl replikacyjny, cele terapeutyczne

Key words: hepatitis C virus (HCV), cell infection, replication cycle, therapeutic targets

1. Wstęp

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (wzv C) pozostaje ważnym problemem zdrowia publicznego. Liczba nosicieli wzv C na świecie jest oceniana na 130–170 mln, a w rzeczywistości prawdopodobnie znacznie więcej, gdyż większość zakażeń wzv C jest bezobjawowa. W 60–80% przypadków zakażenie przechodzi w przewlekłą chorobę wątroby, a konsekwencją wieloletniego nosicielstwa może być steatoza, marskość lub pierwotny rak wątroby (hepatocarcinoma). Tylko 3% osób zakażonych, jest poddawane leczeniu, opartym na podawaniu interferonu alfa w połączeniu z rybawiryną, które prowadzi do eliminacji wirusa w 50–80% przypadków, zależnie od jego genotypu. Terapia aktualnie stosowana jest kosztowna i powoduje poważne efekty uboczne [1].

Pomimo ogromnych wysiłków ciągle nie dysponujemy profilaktyczną ani terapeutyczną szczepionką przeciwko wzv C. Ciągła zmienność wirusa oraz fakt,

że nie znamy dokładnie jego struktury i mechanizmów odpornościowych prowadzących do eliminacji wzv C z zakażonego organizmu, leżą u podstaw trudności w przygotowaniu szczepionki i ulepszenia istniejących metod leczenia. Wysoki procent pacjentów nieodpowiadających na aktualne sposoby leczenia, zmusza nas do stałego poszukiwania nowych metod terapeutycznych, a przede wszystkim do proponowania nowych celów naszej ingerencji poprzez dokładne poznawanie cyklu komórkowego wirusa wzv C. W dodatku wzv C posiada niezwykłą zdolność stymulowania przewlekłego zakażenia, poprzez permanentną ucieczkę spod kontroli mechanizmów odpornościowych gospodarza: wrodzonej odpowiedzi immunologicznej zakażonych hepatocytów, jak również odpowiedzi humoralnej i komórkowej układu immunologicznego adaptacyjnego [podsumowane w 2, 3].

Prace naszego zespołu koncentrują się na badaniu mechanizmu wnikania wirusa do komórki, jego interakcji z receptorami na powierzchni hepatocyta (komórki

* Autor korespondencyjny: Institut Pasteur, Unité Hépacivirus et Immunité Innée, 25/28 Rue du Dr. Roux, 75724 Paris, France; tel: 33-14568 8261; Fax: 33-14061 3012; e-mail: agata.budkowska@pasteur.fr

docelowej wzv C) i roli, jaką odgrywają lipoproteiny związane z cząstką wirusową w zapoczątkowaniu produktywnego zakażenia. Ten kluczowy etap cyklu wirusowego stanowi punkt centralny naszych badań, jako że ingerencja w jego przebieg może zablokować wczesne etapy zakażenia. Drugim tematem naszych badań jest mechanizm transportu wewnątrzkomórkowego komponentów strukturalnych wirusa na elementach cytoszkieletu – mikrotubulach, jako że wnikanie wirusa do komórki, jego transport, tworzenie kompleksów replikacyjnych, ale także późniejsze etapy cyklu takie jak morfogeneza i sekrecja cząstek wirusowych wymagają w pełni funkcjonalnych mikrotubul. Poznanie tych ważnych etapów cyklu, pozwoliło nam zaproponować dwa zasadnicze cele przyszłych interwencji terapeutycznych.

2. Cykl replikacyjny wzv C

Wzv C jest wirusem otoczkowym, z rodziny *Flaviviridae* (rząd *Hepacivirus*) zawierającym jednociowe RNA o polarności dodatniej, zbudowane z ok. 9000 nukleotydów. Wzv C jest wirusem zmiennym: mamy 7 genotypów i około 100 podtypów wirusa. W dodatku genom wirusowy, stale mutujący na skutek błędnej replikacji RNA podlega ciągłej ewolucji w zakażonym organizmie, a jego liczne formy („quasi-species”) są kolejno eliminowane przez odpowiedź immunologiczną [3]. Wirusowe RNA koduje jedną poliproteinę, zbudowaną z ok. 3000 aminokwasów, która jest dzielona przez proteazy komórkowe na 3 białka strukturalne: białko kapsydu oraz białka otoczki E1 i E2, a następnie przez proteazy wirusowe na białko P7 i 6 białek niestrukturalnych (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B) [4, 5]. Białka strukturalne tworzą cząstki wirusowe, podczas gdy białka niestrukturalne, np. helikaza-proteaza i RNA zależna RNA-polimeraza uczestniczą w replikacji genomu. Białka niestrukturalne NS2, NS3, NS5A and P7 uczestniczą również w produkcji zakaźnych cząstek wirusowych [6].

Cykl replikacyjny wirusa C przebiega całkowicie w cytoplazmie komórki wątroby (Rys. 1). Z przyczyn dotąd nieznanych jedynie człowiek i szympanś są wrażliwe na zakażenie, czynniki restrykcyjne są stale przedmiotem badań. Cykl wirusowy rozpoczyna interakcja wirusa z wieloma receptorami komórkowymi, a proces jego wnikania do komórki jest wieloetapowy. Biorą w nim udział proteoglikany (siarczany heparyny) [7], receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-R) [8], tzw. receptor „scavenger” (SR-BI) (oprócz głównego receptora wzv C, tetraspaniny CD-81 [10]. CD-81 tworzy kompleks i współdziała z receptorem SR-BI, ale co ważniejsze inicjuje kaskadę sygnalizacji komórkowej niezbędną do zapoczątkowania dalszych etapów

infekcji [11]. Wirus C wnika do komórki poprzez receptory umiejscowione w połączeniach ścisłych (tight junctions) „klaudynę” (CLD1) [12] i „okludynę” (OCLN) [13, 14]; ta ostatnia jest prawdziwym „kluczem” do rozpoczęcia infekcji.

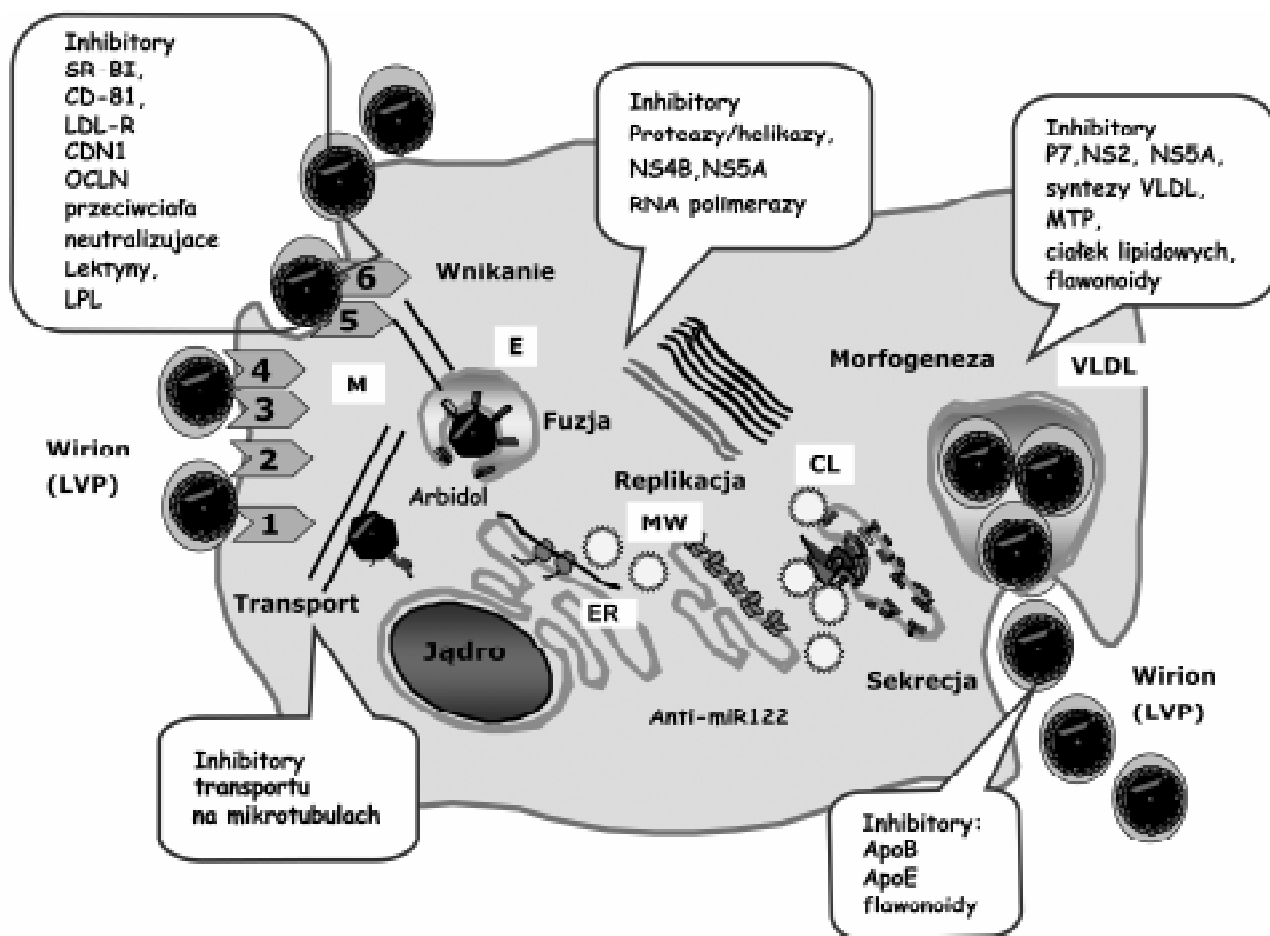
Wnikanie wirusa do komórki przebiega drogą endocytozy, zależnej od klatryny, która prowadzi do uwolnienia nukleokapsydu we wczesnych endosomach [15]. Fuzja białek otoczki z błoną endosomalną, jest zależna od niskiego pH i powoduje uwolnienie nukleokapsydu wirusowego umożliwiając tym samym ucieczkę wirusa od systemu degradacji lipoprotein w komórce wątroby.

Dalsze etapy cyklu to synteza i przetwarzanie poliproteiny, replikacja wirusowego RNA w tworach błoniastych zwanych „membranous webs” [16], a następnie morfogeneza cząstek wirusowych, ich transport i uwalnianie wirusa z zakażonej komórki w połączeniu z lipoproteinami o niskiej gęstości VLDL (patrz niżej).

3. Rola lipoprotein w cyklu wirusowym

Wirus wzv C reprezentuje zupełnie nowy i unikalny model interakcji wirusa z komórką docelową, poprzez centralną rolę lipoprotein w jego cyklu życiowym [17–19]. Ponieważ namnażanie się wirusa przebiega w wątrobie, głównym organie metabolizującym lipoproteiny, zakażenie wzv C powoduje poważne zmiany w ich metabolizmie, takie jak np. obniżone poziomy lipoprotein w przebiegu przewlekłej infekcji [20], lub gromadzenie się lipidów w komórkach parenchymalnych (steatoza) [21]. Z drugiej strony, replikacja wirusa C podlega regulacji przez kwasy tłuszczowe i proces geranylgeranylizacji [22], a morfogeneza wirusa przebiega w ścisłym kontakcie z ciałkami lipidowymi (lipid droplets), organellami wewnątrzkomórkowymi, magazynującymi neutralne lipidy [23, 24]. Tworzenie się cząstek wirusowych wymaga łączenia się białka nukleokapsydu z ciałkami lipidowymi: białko nukleokapsydu „mobilizuje” następnie białka niestrukturalne do membran, połączonych z ciałkami lipidowymi i zapoczątkowując w ten sposób proces morfogenezy [24].

Proces tworzenia zakaźnych cząstek wirusowych, ich transport i uwalnianie z zakażonej komórki wymaga ponadto ich połączenia z VLDL [25–27]. W rezultacie, zakaźne cząstki wirusowe, opuszczają zakażoną komórkę i krążą w surowicy ściśle związane z lipoproteinami bogatymi w trojglicerydy (TRL) [8, 28], tworząc tzw. „Viro-Lipo-Particles” (LVPs) [29], które niczym nie przypominają klasycznych wirionów. LVPs są utworzone przez lipoproteiny bogate w trojglicerydy (TRL) zawierające apolipoproteinę B (ApoB) and apolipoproteinę E (ApoE), nukleokapsydy wirusowe, oraz białka otoczki [29, 30]. Intrigującą sprawą jest obec-



Rys. 1. Cykl życiowy wirusa wzv C i jego potencjalne inhibitory

Wirus wzv C krąży w surowicy chorych w połączeniu z lipoproteinami zawierającymi ApoB i ApoE (głównie VLDL), tworząc tzw. Lipo-Virus Particles (LVPs). Początkowy etap wnikania wirusa do komórki docelowej (hepatocytu) jest zależny od lipoprotein, wiążących się z receptorem lekkich lipoprotein LDL-R (1) i/lub siarczanem heparyny (2). Wirus C może się również bezpośrednio wiązać z trzecim receptorem, SR-BI (3) poprzez lipoproteiny związane z cząstkami wirusowymi. SR-BI (3) tworzy kompleks z tetraspanina CD-81 (4) a interakcja wirusa z tą ostatnią, inicjuje sekwencje sygnalizacji niezbędnej do zapoczątkowania zakażenia. Wzvc wędruje następnie wraz z kompleksem SR-BI/CD-81 do połączeń ścisłych, gdzie reaguje z kolejnymi receptorami Klaudyna (CLDN1) (5) i okładyna (OKLN) (6). Wirus wnika do komórki drogą endocytozy, zależnej od klatryny i niskiego pH, po czym następuje fuzja glikoprotein otoczki z błoną endozomalną (E), uwolnienie nukleoekapsydu wirusowego. Wnikanie wirusa do komórki i jego wczesny transport zależą od sieci mikrotubul (M). Replikacja przebiega w błoniastych strukturach, zwanych „membranous web” (MW), a synteza białek w kontakcie z retikulum endoplazmatycznym (ER). Morfogeneza wymaga interakcji białek wirusowych (strukturalnych i niestrukturalnych) z ciałkami lipidowymi (CL), a następnie połączenia tworzących się cząstek wirusowych z VLDL, które warunkują ich sekrecję z zakażonej komórki. Zaznaczono również Arbidol (inhibitor fuzji) i anti-miR122 regulujący biosyntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu.

ność w LVPs ApoB48, produkowanej przez enterocyty, co mogłoby sugerować że część krążących cząstek wirusowych jest produkowana nie tylko w wątrobie, lecz również w enterocytach, wyłącznym miejscu syntezy ApoB48 [31].

4. Nowe inhibitory zakażenia

Wprowadzone w ostatnich latach dwa zasadnicze modele badań: tzw. replikony [32] dające możliwości analizy mechanizmu replikacji, ale przede wszystkim system produkcji wirusa C w komórkach hepatoma *in vitro* (tzw. model HCVcc), pozwalający na odtworzenie pełnego cyklu wirusa C [33, 34] – otworzyły nową epokę badań inhibitorów zakażenia komórki wzvc.

Inhibitory obecnie proponowane są skierowane głównie przeciwko nie-strukturalnym białkom wirusa niezbędnym do jego replikacji, a więc przeciw proteazie-helikazie wirusowej (NS3) i jej ko-faktorowi NS4A, jak również białku NS4B i uczestniczącym w formowaniu kompleksu replikacyjnego, RNA-zależnej RNA polimerazie (NS5B), i ostatnio opracowane środki przeciwko NS5A [6, 35].

Drugi typ leków aktualnie opracowywanych jest skierowany przeciwko białkom uczestniczącym w morfogenezie wzvc: p7 i NS2. Inny jeszcze typ leków blokuje syntezę i sekrecję VLDL zawierających ApoB (np. środki blokujące funkcję mikrosomalnego białka transportującego, Microsomal Transfer Protein, MTP) absolutnie niezbędnych do tworzenia zakaźnych wirionów.

Wiele badań prowadzonych aktualnie dotyczy leków blokujących proces wnikania wirusa do komórki: np. reagujących swoiście z niektórymi receptorami (jak CD-81 lub SR-BI lub ograniczających ich ekspresję na powierzchni komórki [posumowane w 18, 19, 35]. Rozważane jest użycie przeciwciał neutralizujących, które blokowałyby wczesne etapy cyklu ale następujące po adsorpcji wirusa na powierzchni komórki [36], lub też lektyn reagujących z glikoproteinami otoczki [37]. Niestety ogromna większość proponowanych leków ma właściwości toksyczne lub powoduje poważne efekty uboczne i jedynie nieliczne są dopuszczane do prób klinicznych [6, 35].

5. Blokowanie zakażenia działaniem na lipoproteiny

Charakterystyczną i unikalną cechą wzw C jest zależność procesu infekcji komórki od metabolizmu lipoprotein. W rozpoznawaniu wirusa i jego internalizacji uczestniczą więc receptory i cząsteczki pośredniczące również w metabolizmie lipoprotein, takie jak: proteoglikany (siarczan heparyny) [7] receptor dla lipoprotein o niskiej gęstości (LDL-R) [8] i receptor „scavenger” (SR-BI) [9], oprócz głównego receptora wzw C, tetraspaniny CD-81 [10] i receptorów umiejscowionych w połączeniach ścisłych [12–14].

Lipoproteiny, jak również ich podstawowe składniki białkowe (Apolipoproteiny) są uznanymi regulatorami zakażenia wzw C. Tak więc naturalne ligandy SB-BI, jak VLDL [39] jak również utlenione LDL, powstające w przebiegu zakażenia [40] są inhibitorami wnikania wirusa do komórki, podczas gdy ciężkie lipoproteiny (HDL) wzmagają infekcje, aktywując funkcje receptora SR-BI lub modyfikując strukturę błony komórkowej [41]. Apolipoproteiny ApoC1, ApoB czy ApoE [25, 26] są również naturalnymi regulatorami zakażenia.

Zaproponowane ostatnio środki regulujące metabolizm lipoprotein to małe si-RNA blokujące produkcję ApoB i ApoE, naringinina – flawonoid wpływający na sekrecję cząstek wirusowych, a przede wszystkim Mikro-RNA122 regulujące biosyntezę kwasów tłuszczowych i cholesterolu niezbędnych dla replikacji wirusa [35].

Nasze badania pokazały, że lipoproteiny o bardzo małej gęstości (VLDL), ściśle związane z cząstkami wirusowymi, rozpoznają receptor SR-BI na powierzchni komórki, wiążą się z nim i ułatwiają wnikanie wzw C do komórki [39]. Wirus więc nie oddziałuje pierwotnie z receptorem SR-BI poprzez białka E1 i E2 otoczki, lecz poprzez lipoproteiny zawierające ApoB wchodzące w skład jego struktury. Lipoproteiny również „transportują” cząstki wirusowe do komórki, ochraniając je jednocześnie przed atakiem przeciwciał neutrali-

zujących [39]. Grają w ten sposób zasadniczą rolę w mechanizmach ucieczki wirusa spod kontroli układu immunologicznego gospodarza. Obserwacje nasze wyjaśniają, dlaczego odpowiedź humoralna skierowana przeciwko białkom otoczki nie jest w stanie wyeliminować wirusa z zakażonego ustroju i dlaczego wirus może współistnieć z przeciwciałami potencjalnie neutralizującymi w surowicy chorych [36]. Dane te są również zgodne z wynikami eksperymentów na szympancach pokazujących, że białka otoczki używane jako immunogeny nie są w stanie zapewnić całkowitej ochrony przeciwko zakażeniu wirusem C, jedynie w najlepszym wypadku osłabić infekcję [42].

Badania nasze sugerują, że oddziaływanie na lipoproteiny związane z cząstkami wirusowymi mogłoby stanowić nowy cel terapeutyczny. Są one zgodne z obserwacjami, że lipoproteiny związane z wirusem warunkują jego zakaźność [43]. Prace nasze pokazały, że nie tylko naturalne ligandy receptora SR-BI blokują jego interakcje z wirusem [39], ale również przeciwciała skierowane przeciwko β -lipoproteinom, związanym z cząstką wirusową blokują infekcje w systemie HCVcc *in vitro* [44].

Wychodząc z założenia, że oddziaływanie na lipoproteiny związane z wirusem C może zmodyfikować przebieg infekcji, nasz zespół zidentyfikował nowy, naturalny inhibitor zakażenia wzw C – lipazę lipoproteinową (LPL) [44]. LPL jest enzymem lipolitycznym, kluczowym w metabolizmie lipoprotein. Oprócz aktywności lipolitycznej, hydrolizującej lipoproteiny bogate w trójglicerydy (VLDL i chylomikrony), enzym ten ma zdolność wprowadzania lipoprotein do komórki wątroby, kierując je na drogę degradacji. Mechanizm działania LPL polega na tworzeniu „pomostu” („bridging”) między lipoproteiną i siarczanem heparyny na powierzchni komórki, oraz wprowadzeniu lipoproteiny do jej wnętrza. Nasze badania wykazały, że LPL oddziałuje podobnie z wirusem C: LPL tworzy mianowicie „pomost” między lipoproteinami otaczającymi cząstkę wirusową i siarczanem heparyny na powierzchni hepatocyta, prowadząc do internalizacji wirusa do wnętrza komórki. Ta bardzo specjalna droga wnikania jest przeznaczona dla lipoprotein bogatych w trójglicerydy i zupełnie różna od normalnej drogi wnikania wirusa C do komórki. Dla wirusa wyprodukowanego w systemie doświadczalnym HCVcc [44] jak również w modelu doświadczalnym *in vivo* (u myszy z przeszczepionymi komórkami wątroby ludzkiej) LPL jest efektywnym inhibitorem infekcji (M. Walic i wsp., manuskrypt w przygotowaniu). I to nie aktywność lipolityczna enzymu powoduje neutralizację wirusa, lecz właśnie jego druga funkcja, tzw. „bridging”: LPL wprowadzając wirusa C do komórki drogą przeznaczoną dla lipoprotein prowadzi prawdopodobnie do jego degradacji a więc do

poronnej infekcji. Ta hipoteza jest badana aktualnie przez nasz zespół.

Nasze badania sugerują, że lipoproteiny związane z zakaźną cząstką wirusową, które umożliwiają jego prawidłowe wnikanie do komórki i zapewniają infekcyjność, mogą być rozważane, jako cel terapeutyczny przy opracowywaniu nowych metod leczenia zakażenia wirusem wzv C.

6. Mikrotubule jako nowy cel terapeutyczny

Inną szczególną cechą wirusa C jest zależność jego cyklu komórkowego od dynamicznych mikrotubul. Wiadomo, że replikacja wirusowego RNA przebiega w kompleksie replikacyjnym, usytuowanym w błonistych strukturach komórkowych zwanych „membranous web” [16]. Kompleksy replikacyjne podlegają transportowi, a ich dynamiczna organizacja jest ściśle związana z retikulum endoplazmatycznym, włóknami aktyny, oraz siecią mikrotubul [45, 46]. Jakkolwiek, sposób transportu komponentów strukturalnych wirusa C wewnątrz komórki pozostawał do niedawna nieznanym.

Liczne wirusy wymagają wewnątrzkomórkowego transportu ich białek za pośrednictwem mikrotubul – mechanizmy te jednakże zależą zwykle od tzw motorów mikrotubularnych, pośredniczących w transporcie: kinezyne lub dyneiny. W przypadku wirusa C, pokazaliśmy, że może on korzystać z sieci mikrotubul, używając dwóch różnych sposobów transportu jego białka nukleokapsydu: klasycznego, w którym uczestniczy dyneina [47], i zupełnie nowego, zależnego od mechanizmów polimeryzacji mikrotubul [48].

Przy współpracy z J. M c L a u c h l a n e m (University of Glasgow) pokazaliśmy że białko nukleokapsydu przemieszcza się w zakażonej komórce na sieci mikrotubul, koncentrując się w rejonie okołojądrowym, miejscu morfogenezy wirusa [47]. Transport ten zależy od dyneiny i uwarunkowany jest połączeniem białka kapsydowego z ciałkami lipidowymi, które używają ten typ transportu w komórce. Pokazaliśmy następnie, że oprócz tego „klasycznego” sposobu transportu, białko nukleokapsydu może wiązać się bezpośrednio z tubuliną, podstawowym składnikiem mikrotubul, zwiększając stopień ich polimeryzacji i umożliwiając w ten sposób transport nukleokapsydu za ich pośrednictwem w zakażonej komórce [48].

Destrukcja mikrotubul lub nawet lekka modyfikacja ich funkcji biologicznych takimi środkami jak vinblastyna czy taxol, powoduje dramatyczny spadek produkcji wirusa w hodowli komórkowej *in vitro* (model HCVcc) [48]. Używając modelu cząstek pseudotypowych (HCVpp) udowodniliśmy, że już najwcześniejszy etap wnikania wirusa do komórki, od momentu związania się cząstki wirusowej z błoną komórkową, do fuzji

białek otoczki z błoną endozomalną – wymaga pośrednictwa mikrotubul. Dalsze badania, z użyciem modelu infekcji HCVcc (JFH1) oraz podobnych środków chemicznych modyfikujących strukturę i/lub funkcje mikrotubul, pokazały, że również dalsze etapy cyklu, następujące kilka godzin po wniknięciu wirusa do komórki, wymagają nienaruszonych i w pełni funkcjonalnych mikrotubul. W dodatku transport na tym etapie zakażenia przebiega w sposób absolutnie oryginalny, gdyż jest zależny od polimeryzacji mikrotubul: a więc albo ich dynamiki albo jeszcze nie całkowicie poznanego procesu, zwanego „treadmilling” [49]. Przy tej okazji odkryliśmy unikalną właściwość białka nukleokapsydu wzv C: jego zdolność wiązania się bezpośrednio z tubuliną z bardzo wysokim powinowactwem. Wiążąc się z tubuliną białko nukleokapsydu zwiększa stopień polimeryzacji mikrotubul [48]. Obserwacje te sugerują, że białko nukleokapsydu posiada prawdopodobnie zdolność korzystania z tych szczególnych właściwości *in vivo*: łączenie się z siecią mikrotubul i uczestniczenie w procesie ich polimeryzacji umożliwiłoby transport białka nukleokapsydu w zakażonej komórce. Ten sposób przemieszczania jest bardzo oryginalny i znany zaledwie dla kilku białek wirusowych, takich jak białko Tat wirusa HIV, oraz dla dwóch białek wirusów roślinnych. Zgodnie z hipotezą, że taki proces mógłby mieć miejsce w zakażonej komórce, pokazaliśmy ko-lokalizację białka nukleokapsydu z siecią mikrotubul w zakażonych komórkach hepatoma, w mikroskopie konfokalnym, a co ciekawsze również połączenie białka nukleokapsydu z mikrotubulami, polimeryzowanymi w jego obecności, w mikroskopie elektronowym używając techniki immuno-elektromikroskopii i przeciwciał skierowanych przeciw białku kapsydu wzv C [48]. Inne nasze prace pokazały, że wirus C wykorzystuje również transport za pośrednictwem mikrotubul do formowania cząstek wirusowych i ich sekrecji z zakażonej komórki [47].

7. Wnioski i perspektywy

Dalsze postępy naszej wiedzy dotyczące mechanizmów prowadzących do rozpoczęcia zakażenia i dokładne poznanie cyklu komórkowego wirusa C pozwoli nam zaproponować nowe inhibitory i nowe sposoby terapeutyczne. Aby przeciwdziałać procesowi wnikania wirusa do komórki: cykliczne peptydy syntetyczne, lektyny lub środki wpływające na funkcję lub ekspresję receptorów wzv C, mogłyby być stosowane obok obecnie opracowywanych inhibitorów proteazy-helikazy lub RNA polimerazy. Wszystkie te środki byłyby prawdopodobnie stosowane w połączeniu z już istniejącym leczeniem wzv C, by podnieść jego efektywność [1, 6, 35].

Wirus zwz C bezspornie reprezentuje zupełnie nowy model oddziaływania wirusa z zakaźnym organizmem ze względu na centralną rolę lipoprotein w jego cyklu życiowym. Charakteryzuje go zależność strukturalna i funkcjonalna zakaźnych wirionów, krążących w surowicy od lipoprotein, a więc: wymaganie VLDL do tworzenia i sekrecji cząstek wirusowych, mechanizm zakażenia komórki zależny od lipoprotein i ich receptorów by osiągnąć efektywną infekcję, w końcu wpływ namnażania się wirusa na metabolizm lipidów i lipoprotein ustroju. Mimo wzrastającego uznania kluczowej roli lipoprotein w cyklu życiowym wirusa zwz C, struktura zakaźnej cząstki wirusowej, jak również procesy komórkowe prowadzące do jej produkcji i sekrecji stanowią najmniej znane etapy tego cyklu. Nawet jeżeli nie znamy wszystkich szczegółów tych procesów, nasze prace sugerują, że oddziaływanie na lipoproteiny związane z cząstkami wirusowymi, warunkujące jego potencjał zakaźny, mogłoby stanowić nowy cel terapeutyczny, zmierzający do zablokowania lub przynajmniej obniżenia poziomu infekcji.

Inna oryginalność zwz C stanowi zależność procesu infekcji oraz transportu komponent wirusa poprzez sieć mikrotubul na różnych etapach jego cyklu. Nasze obserwacje sugerują, że aby zakazić komórkę wirus zwz C może w sposób oryginalny wykorzystywać mechanizmy transportu na mikrotubulach zależne od ich polimeryzacji, w których białko nukleokapsydu wirusowego gra bardzo szczególną rolę.

Tak więc mikrotubule mogłyby stanowić również zupełnie nowy i interesujący cel terapeutyczny. Środki wpływające na strukturę lub funkcję mikrotubul są używane w leczeniu pewnych typów raka. Prace ostatnio prowadzone przez nasz zespół pozwoliły zidentyfikować fragment białka kapsydu zwz C, odpowiedzialny za jego interakcję z tubuliną i mikrotubulami (F. R o o h v a n d i wsp., w przygotowaniu). Przyszłe badania pokażą czy użycie tego fragmentu jako inhibitora pozwoli zablokować lub osłabić infekcję zwz C.

Piśmiennictwo

1. Zeuzem S., Berg T., Moeller B., Hinrichsen H., Mauss S., Wedemeyer H., Sarrazin C., Hueppe D., Zehnter E., Manns M.P.: Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J. Viral Hepatitis*. **16**, 75–90 (2009)
2. Gale M., Jr., Foy E., M.: Evasion of intracellular host defence by hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 939–45 (2005)
3. Rehermann B., Nascimbeni M.: Immunology of hepatitis B virus and hepatitis C virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* **5**, 215–29 (2005)
4. Bartenschlager R., Frese M., Pietschmann T.: Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv. Virus Res.* **63**, 71–180 (2004)
5. Brass V., Moradpour D., Blum H.E.: Molecular virology of hepatitis C virus (HCV), update. *Int. J. Med. Sci.* **3**, 29–34 (2006)
6. Lanford R.E., Evans M.J., Lohmann V., Lindenbach B., Gale M., Jr., Rehermann B., Chang K.M., Lemon S.M.: The accelerating pace of HCV research: a summary of the 15th International Symposium on Hepatitis C Virus And Related Viruses. *Gastroenterology*, **136**, 9–16 (2009)
7. Barth H., Baumert T.F. i wsp.: Cellular Binding of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Requires Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Biol. Chem.* **278**, 41003–41012 (2003)
8. Agnello V., Abel G., Elfahal M., Knight G.B., Zhang Q.X.: Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA*, **96**, 12766–71 (1999)
9. Scarselli E., Ansuini H., Cerino R., Roccasecca R.M., Acali S., Filocamo G., Traboni C., Nicosia A., Cortese R., Vitelli A.: The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J.* **21**, 5017–5025 (2002)
10. Pileri P., Abrignani S. i wsp.: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938–941 (1998)
11. Brazzoli M., Bianchi A., Filippini S., Weiner A., Zhu Q., Pizza M., Crotta S.: CD81 is a central regulator of cellular events required for hepatitis C virus infection of human hepatocytes. *J. Virol.* **82**, 8316–8329 (2008)
12. Evans M.J., von Hahn T., Tschernie D.M., Syder A.J., Panis M., Wolk B., Hatzioannou T., McKeating J.A., Bieniasz P.D., Rice C.M.: Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature*, **446**, 801–805 (2007)
13. Liu S., Yang W., Shen L., Turner J.R., Coyne C.B., Wang T.: Tight Junction proteins Claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are down-regulated during infection to prevent superinfection. *J. Virol.* **83**, 2011–2014 (2009)
14. Ploss A., Evans M.J., Gaysinskaya V.A., Panis M., You H., de Jong Y.P., Rice C.M.: Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature*, **457**, 882–886 (2009)
15. Blanchard E., Belouzard S., Goueslain L., Wakita T., Dubuisson J., Wychowski C., Rouille Y.: Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J. Virol.* **80**, 6964–6972 (2006)
16. Gosert R., Egger D., Lohmann V., Bartenschlager R., Blum E.H., Bienz K., Moradpour D.: Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harbouring subgenomic replicons. *J. Virol.* **77**, 5487–5492 (2003)
17. Andre P., Perlemuter G., Budkowska A., Brechot C., Lotteau V.: Hepatitis C virus particles and lipoprotein metabolism. *Sem. Liver Dis.* **25**, 93–104 (2005)
18. Burlone M.E., Budkowska A.: Hepatitis C virus cell entry: role of lipoproteins and cellular receptors. *J. Gen. Virol.* **90**, 1055–1070 (2009)
19. Budkowska A.: Mechanism of cell infection with hepatitis C virus (HCV) – a new paradigm in virus-cell interaction. *Polish J. Microbiol.* **58**, 93–8 (2009)
20. Petit J.M., Benichou M., Duvillard L., Jooste V., Bour J.B., Minello A., Verges B., Brun J.M., Gambert P., Hillon P.: Hepatitis C virus-associated hypobetalipoproteinemia is correlated with plasma viral load, steatosis, and liver fibrosis. *Am. J. Gastroenterol.* **98**, 1150–1154 (2003)
21. Roingard P., Houriou C.: Hepatitis C virus core protein, lipid droplets and steatosis. *J. Viral. Hep.* **15**, 157–164 (2007)
22. Kapadia S.B., Chisari F.V.: Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2561–2566 (2005)
23. Boulant S., Targett-Adams P., McLauchlan J.: Disrupting the association of hepatitis C virus core protein with lipid

- droplets correlates with a loss in production of infectious virus. *J. Gen. Virol.* **88**, 2204–2213 (2007)
24. Miyanari Y., Atsuzawa K., Usuda N., Watashi K., Hishiki T., Zayas M., Bartenschlager R., Wakita T., Hijikata M., Shimotohno K.: The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell. Biol.* **9**, 1089–1097 (2007)
 25. Huang H., Sun F., Owen D. M., Li W., Chen Y., Gale M., Jr., Ye J.: Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **104**, 5848–5853 (2007)
 26. Chang K.S., Jiang J., Cai Z., Luo G.: Human apolipoprotein e is required for infectivity and production of hepatitis C virus in cell culture. *J. Virol.* **81**, 13783–13793 (2007)
 27. Gastaminza P., Cheng G., Wieland S., Zhong J., Liao W., Chisari F.V.: Cellular determinants of hepatitis C virus assembly, maturation, degradation, and secretion. *J. Virol.* **82**, 2120–2129 (2008)
 28. Thomssen R., Bonk S., Propfe C., Heermann K.H., Kochel H.G., Uy A.: Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med. Microbiol. Immunol.* **181**, 293–300 (1992)
 29. Andre P., Komurian-Pradel F., Deforges S., Perret M., Berland J.L., Sodoyer M., Pol S., Brechot C., Paranhos-Baccala G., Lotteau V.: Characterization of Low- and Very-Low-Density Hepatitis C Virus RNA-Containing Particles. *J. Virol.* **76**, 6919–6928 (2002)
 30. Nielsen S.U., Bassendine M.F., Burt A.D., Martin C., Pumechokchai W., Toms G.L.: Association between hepatitis C virus and very-low-density lipoprotein (VLDL)/LDL analyzed in iodixanol density gradients. *J. Virol.* **80**, 2418–2428 (2006)
 31. Diaz O., Delers F., Maynard M., Demignot S., Zoulim F., Chambaz J., Trepo C., Lotteau V., Andre P.: Preferential association of Hepatitis C virus with apolipoprotein B48-containing lipoproteins. *J. Gen. Virol.* **87**, 2983–2991 (2006)
 32. Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110–113 (1999).
 33. Lindenbach B., Rice C.M. i wsp.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623–6, (2005)
 34. Wakita T., Liang T.J. i wsp.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature Med.* **11**, 791–796 (2005).
 35. Pawlotky J.M., Cocquerel L., Durantel D., Lavilette D., Lerat H., Pecheur E.I., Polyak S.J., Tautz N., Thimme R.: HCV Research 20 years after discovery: a summary of the 16th International Symposium on Hepatitis C Virus and Related Viruses, *Gastroenterology*, **138**, 6–12 (2010)
 36. Haberstroh A., Baumert T.F. i wsp.: Neutralizing host responses in hepatitis C virus infection target viral entry at postbinding steps and membrane fusion. *Gastroenterology*, **135**, 1719–1728 (2008)
 37. Helle F., Wychowski C., Vu-Dac N., Gustafson K.R., Voisset C., Dubuisson J.: Cyanovirin-N inhibits hepatitis C virus entry by binding to envelope protein glycans. *J. Biol. Chem.* **281**, 25177–25183 (2006)
 38. Ye J.: Reliance of host cholesterol metabolic pathways for the life cycle of hepatitis C virus. *PLoS Pathogen*, **3**, e108, (2007)
 39. Maillard P., Huby T., Andreo U., Moreau M., Chapman J., Budkowska A.: The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/ClA1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J.* **20**, 735–737 (2006)
 40. Von Hahn T., Lindenbach B.D., Boullier A., Quehenberger O., Paulson M., Rice C.M., McKeating J.A.: Oxidized low-density lipoprotein inhibits hepatitis C virus cell entry in human hepatoma cells. *Hepatology*, **43**, 932–942 (2006)
 41. Voisset C., Callens N., Blanchard E., Op De Beeck A., Dubuisson J., Vu-Dac N.: High density lipoproteins facilitate hepatitis C virus entry through the scavenger receptor class B type I. *J. Biol. Chem.* **280**, 7793–7799, (2005)
 42. Houghton M., Abrugiani S.: Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature*, **436**, 961–966 (2005)
 43. Lindenbach B., Rice C.M. i wsp.: Cell culture-grown hepatitis C virus is infectious in vivo and can be recultured in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **103**, 3805–3809 (2006)
 44. Andreo U., Maillard P., Kalina O., Walic M., Meurs E., Martinot M., Marcellin P., Budkowska A.: Lipoprotein lipase mediates hepatitis C virus (HCV) cell entry and inhibits HCV infection. *Cell Microbiol.* **9**, 2445–56 (2007)
 45. Lai C.K., Jeng K.S., Machida K., Lai M.M.: Association of hepatitis C virus replication complexes with microtubules and actin filaments is dependent on the interaction of NS3 and NS5A. *J. Virol.* **82**, 8838–8848 (2008)
 46. Wolk B., Buchele B., Moradpour D., Rice C.M.: A dynamic view of hepatitis C virus replication complexes. *J. Virol.* **82**, 10519–10531 (2008)
 47. Boulant S., Douglas M.W., Moody L., Budkowska A., Targett-Adams P., McLauchlan J.: Hepatitis C Virus Core Protein Induces Lipid Droplet Redistribution in a Microtubule- and Dynein-Dependent Manner. *Traffic*, **9**, 1268–1282 (2008)
 48. Roohvand F., Maillard P., Lavergne J.P., Boulant S., Walic M., Andréo U., Goueslain L., Helle F., Mallet A., McLauchlan J., Budkowska A.: Initiation of hepatitis C virus infection requires the dynamic microtubule network: role of the viral nucleocapsid protein. *J. Biol. Chem.* **284**, 13778–13791 (2009)
 49. Rodinov V.I., Borisy G.G.: Microtubules treadmill *in vivo*. *Science*, **275**, 215–218 (1999)