

Replikační cyklus HCV

V.Němeček

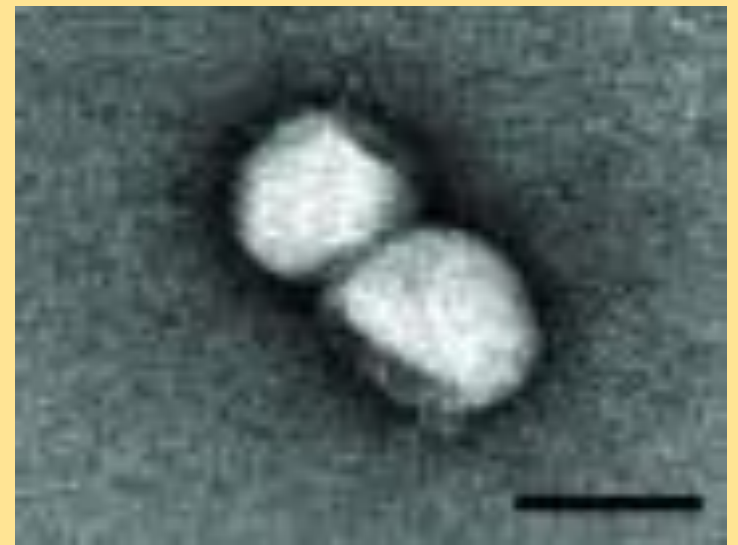
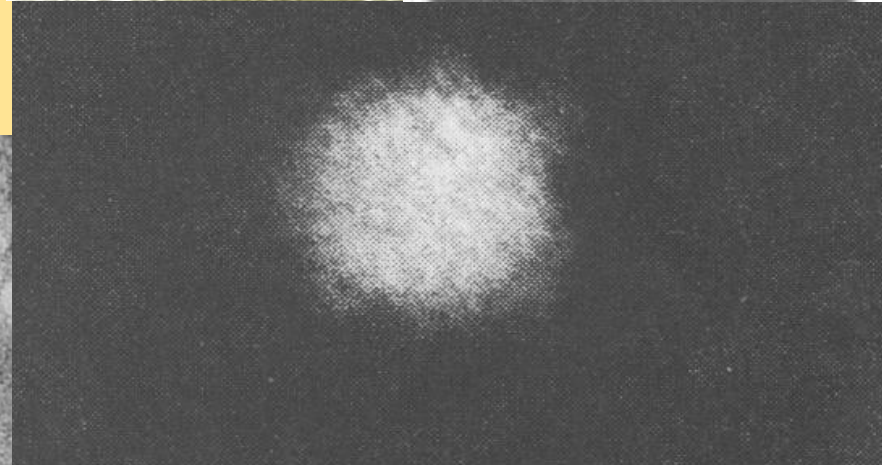
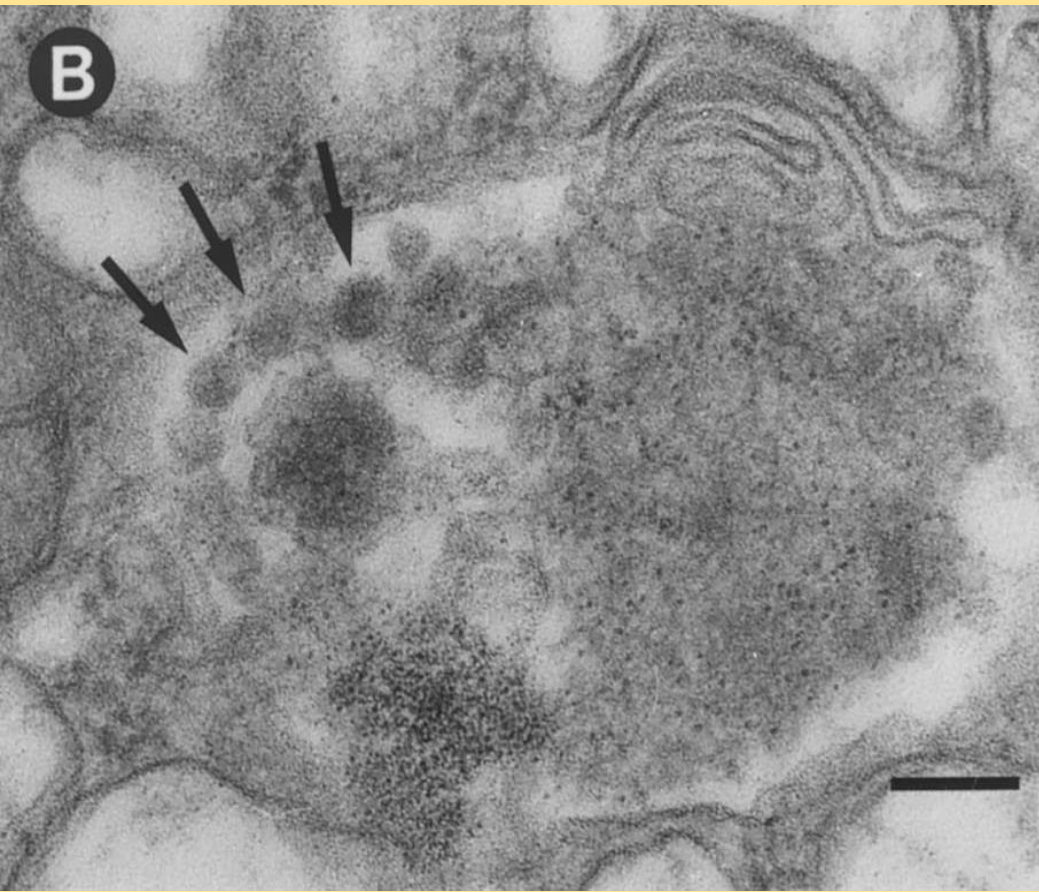
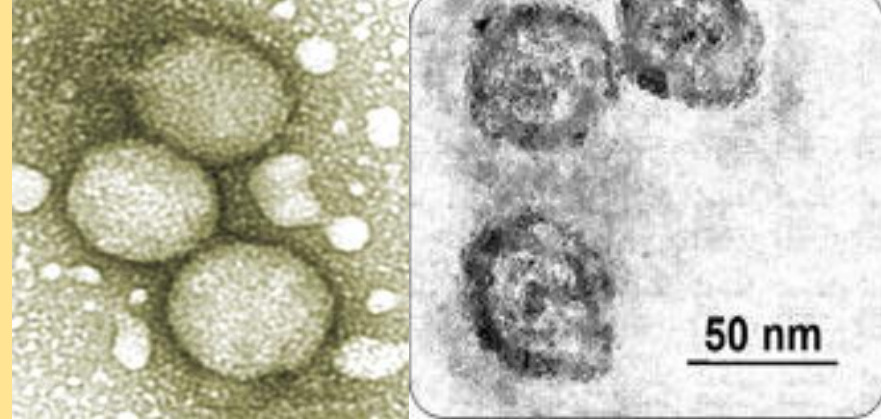
NRL pro virové hepatitidy, SZÚ

Poznání replikace HCV podmiňoval vývoj systémů umožňujících množení viru v buněčné kultuře

- konstrukce subgenomového replikonu, který se sám amplifikuje v kultuře lidských hepatomových buněk, zjištění jak se replikuje HCV RNA
(*R. Bartenschlager, Heidelberg*)
- studovat celý replikační cyklus HCV umožnila konstrukce molekulárního klonu JFH-1 (Japanese Fulminant Hepatitis), který po transfekci se do buněk Huh 7.5 se silně replikuje a vede k produkci infekčních virových částic (*Wakita T., Tokyo*)
- replikace klonu HCV i v imunosuprimovaných chimerických myších s játry s lidskými hepatocyty

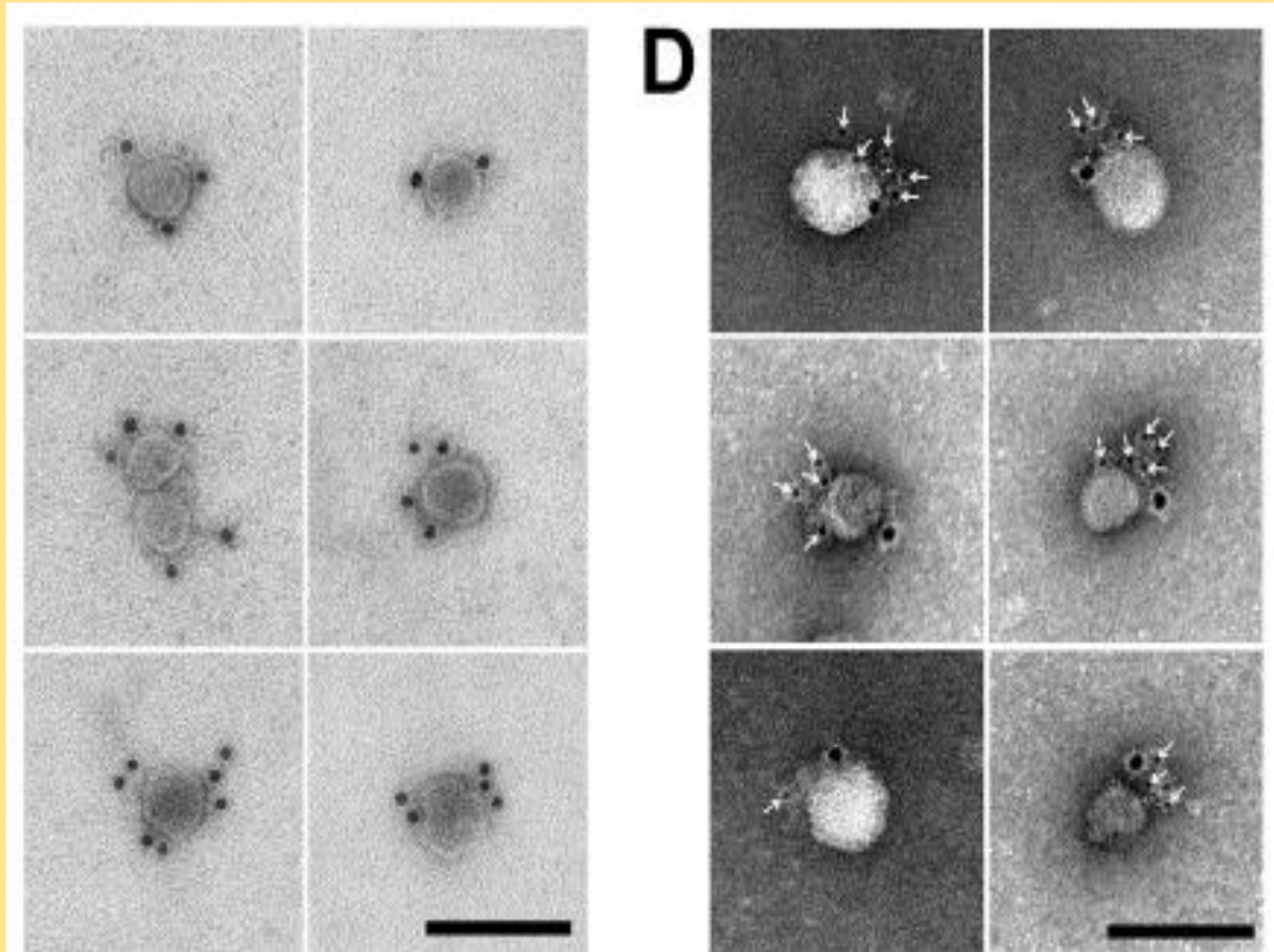


HCV- EM virových částic
v šimpanzím hepatocytu (B),
viru z buněčných kultur



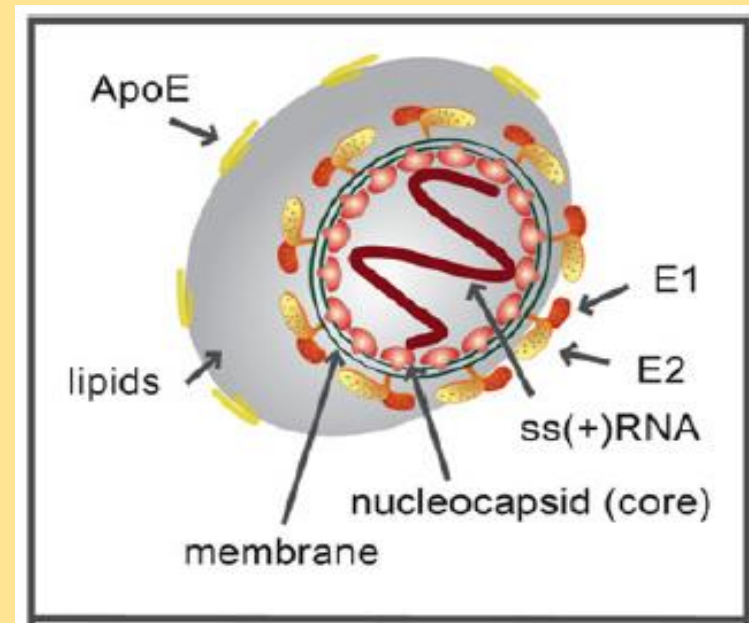
Imunoelektronmikroskopický průkaz obalového proteinu E2 a apolipoproteinu E (D)

Gastaminza, et al.: J Virol. 2010 November; 84(21):10999-11009



Vlastnosti virových částic

- in-vivo: infekční i neinfekční částice (v poměru $\approx 1:100$)
- densita HCV částic v krvi pacientů heterogenní (mezi 1,1 – 1,3 g/ml), čím menší hustota tím vyšší infekčnost
- velikost částic in vivo cca 45 - 80nm,
- tvar sférický, pleomorfní, infekční částice s membránovým obalem
- integrální součástí infekčních částic jsou, triglyceridy, apo E a apoB, tzn. utváření infekčních částic je svázáno s mechanismy biosyntézy lipidů s velmi nízkou hustotou (VLDL)

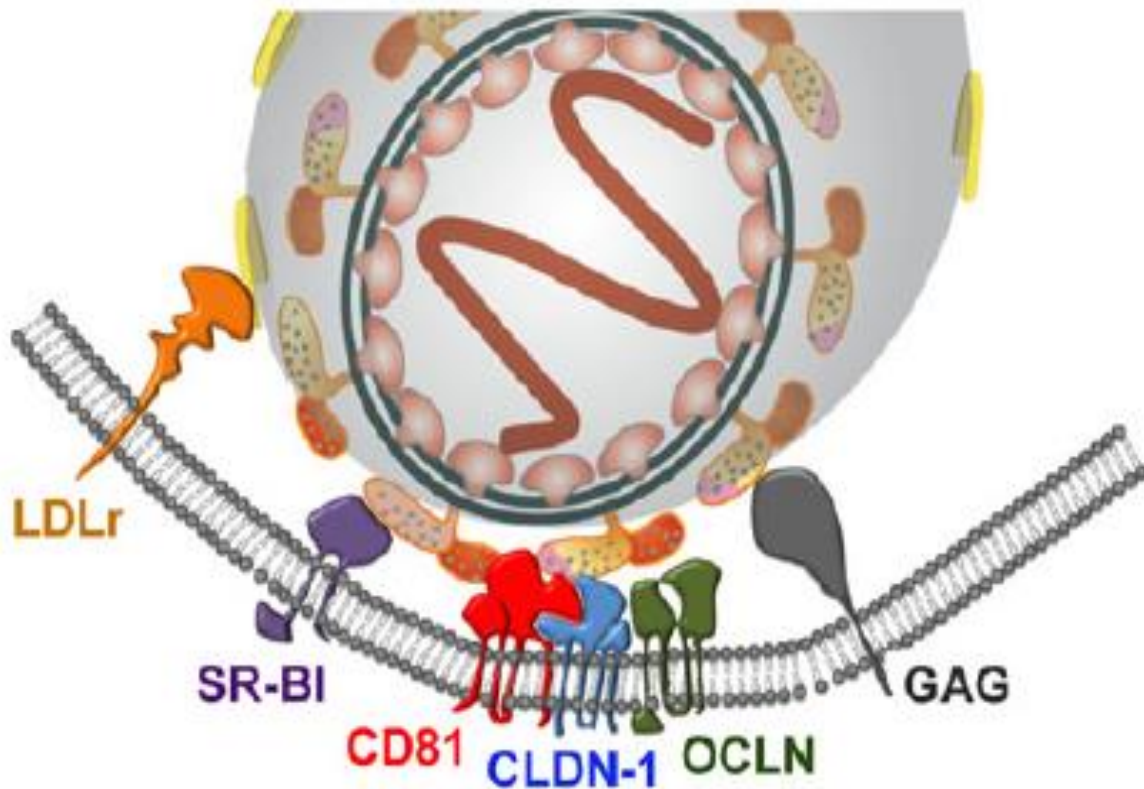


Struktura viru a vazba na hepatocyt

- nukleokapsidový protein core
- obalové proteiny E1, E2
- lipidová kapkénka s apolipoproteiny

LDL receptor

GAG glykosoaminoglykany



SR-BI scavenger
receptor BI

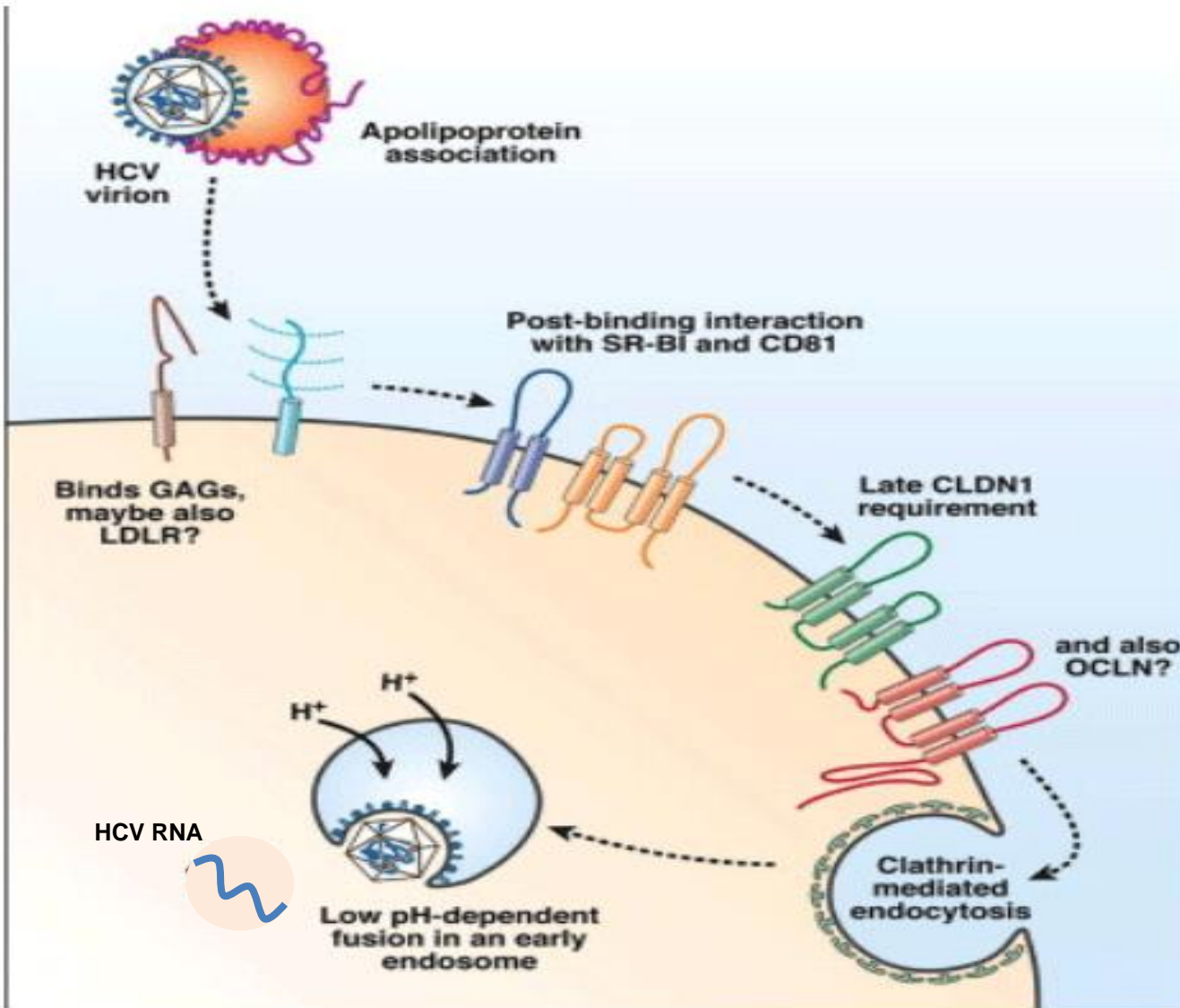
CD81 tetraspanin

CLDN-1 Claudin

OCLN Occludin

Clatrinový typ
endocytózy

Vniknutí viru do hepatocytu

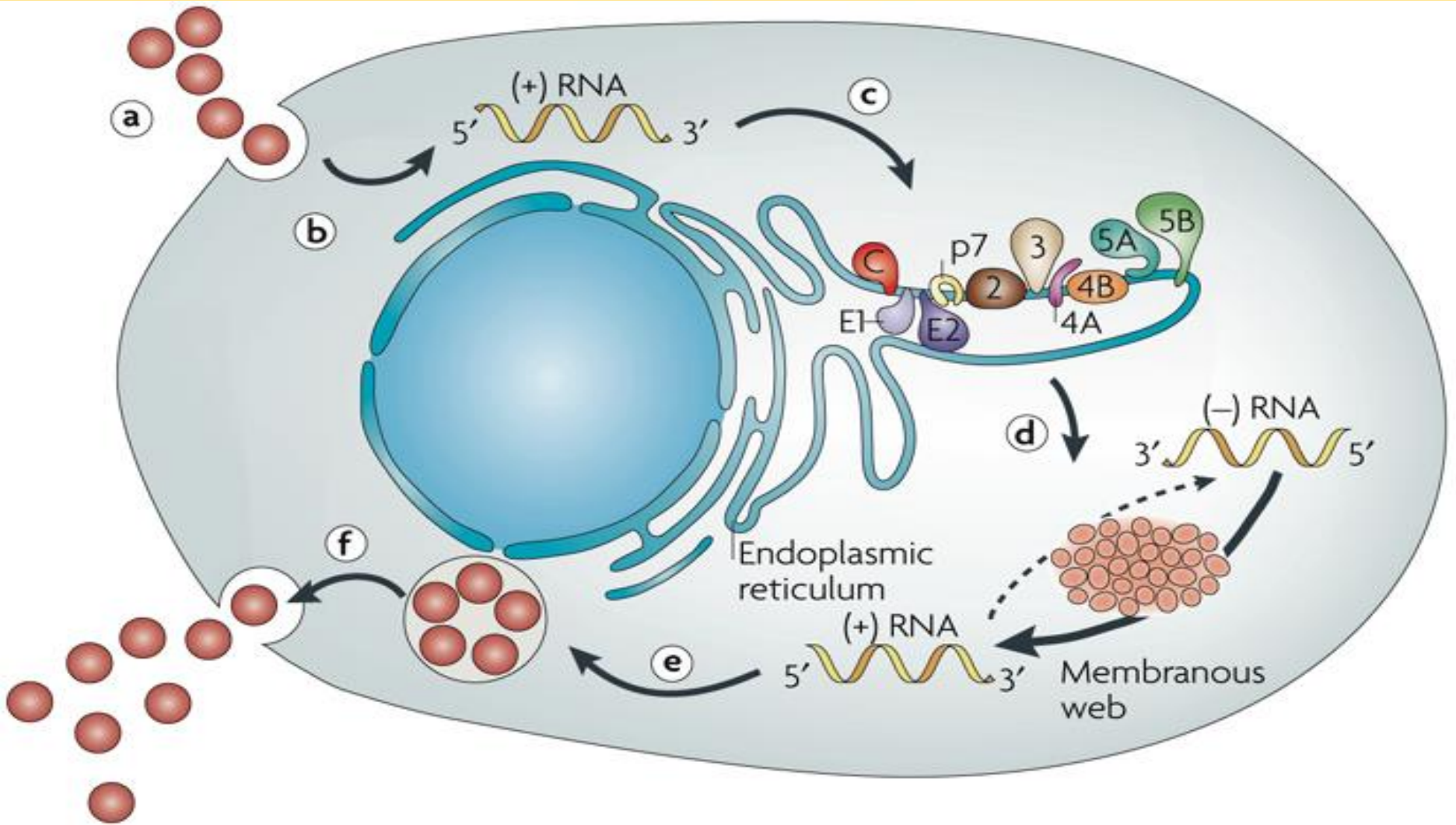


Endocytóza
clatrinového typu

Fuze membrány viru
a endosomu

Uvolnění HCV RNA
do cytoplasmy

Replikace HCV

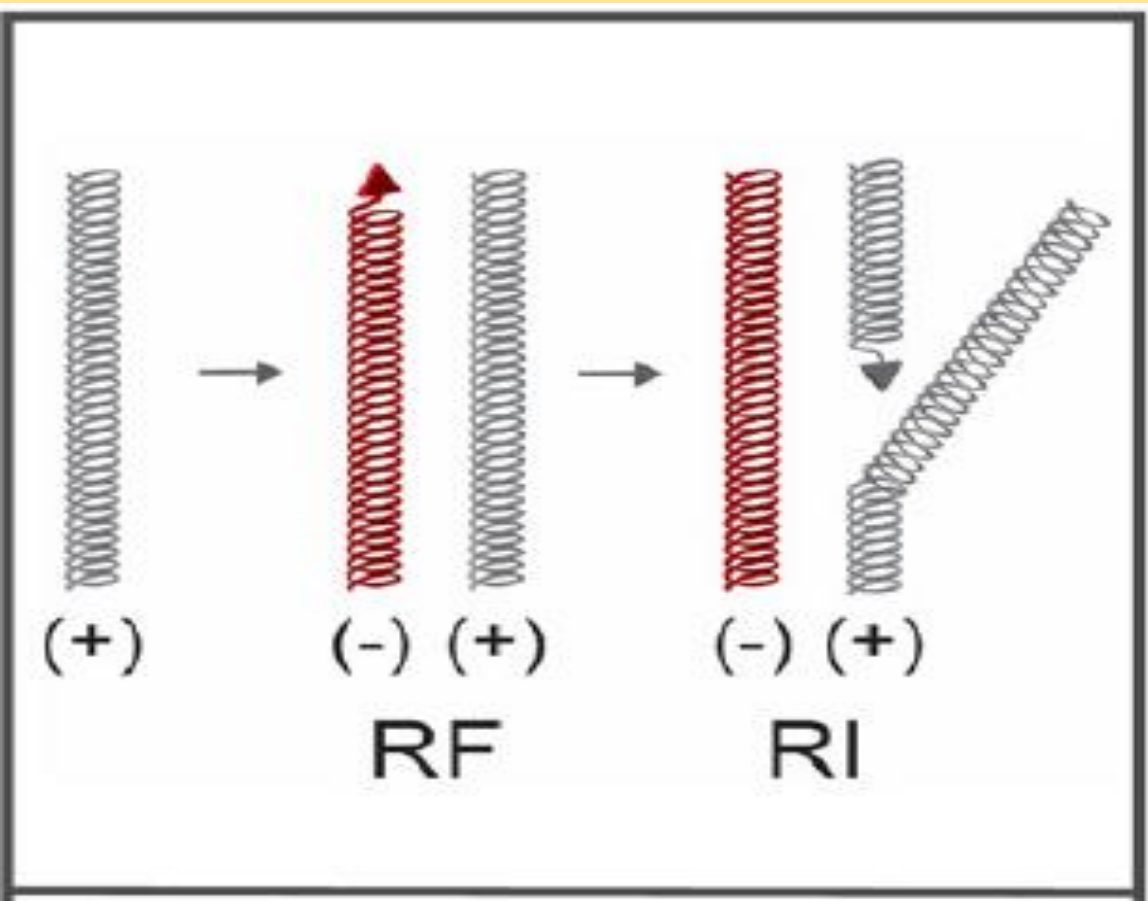


D. Moradpour, F. Penin & Ch.M. Rice
Nature Reviews Microbiology 5, 453-463 (June 2007)

Replikace HCV RNA

virionová HCV RNA (+)

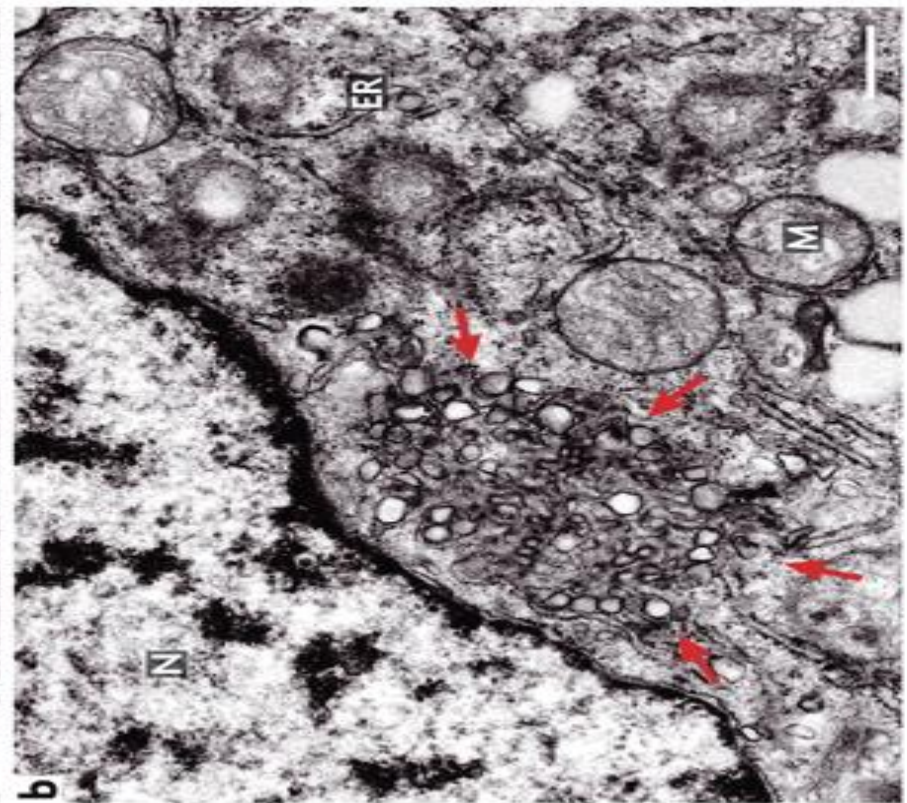
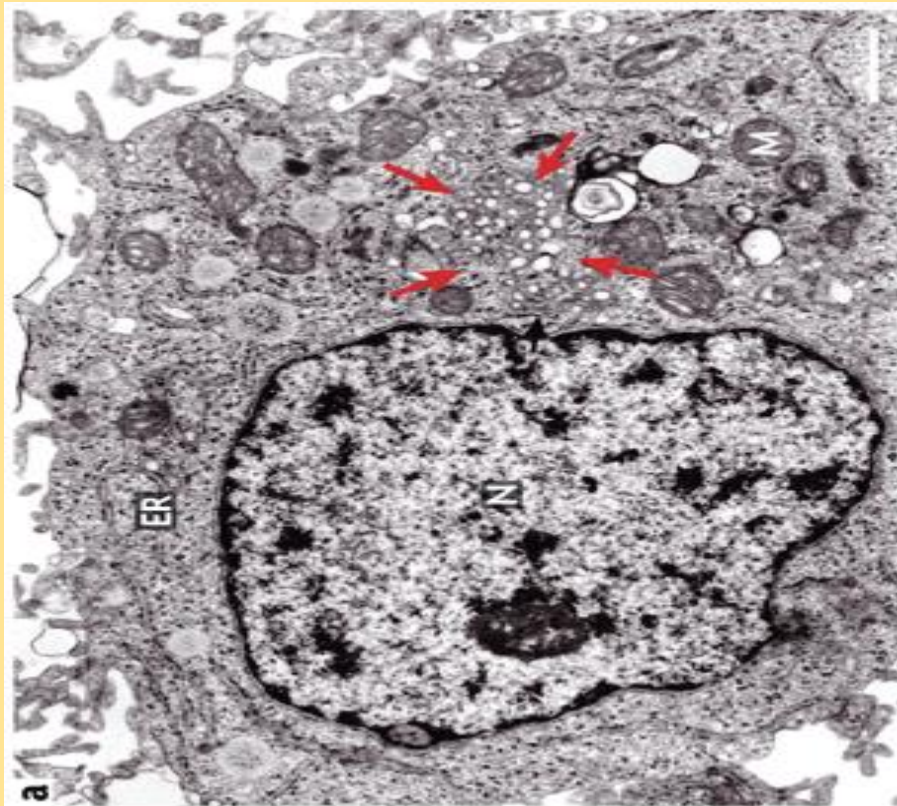
přímo umožňuje syntézu virových proteinů
na ribosomu



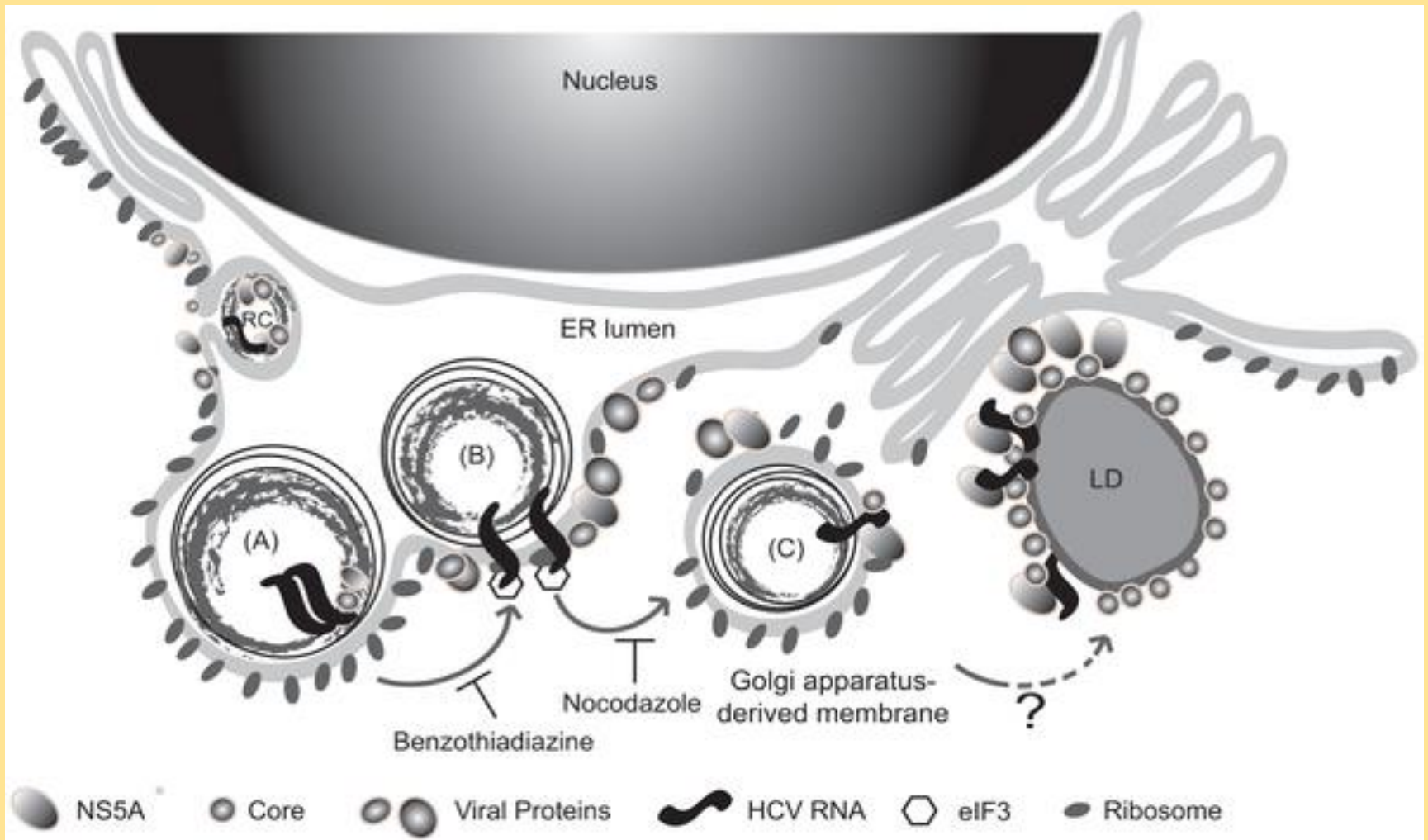
virová RNA polymeráza
syntetizuje (-) řetězec
replikační forma (RF) ds
podle (-) řetězce
syntetizuje RNA
polymeráza (+)
řetězce sloužící k:

- syntéze proteinů HCV**
- replikaci RNA**
- vytváření nových virových částic**

Replikace, transkripce i translace HCV RNA probíhá kolokalizovaně v endoplamatickém retikulu.
Replikační komplex (replicosome)



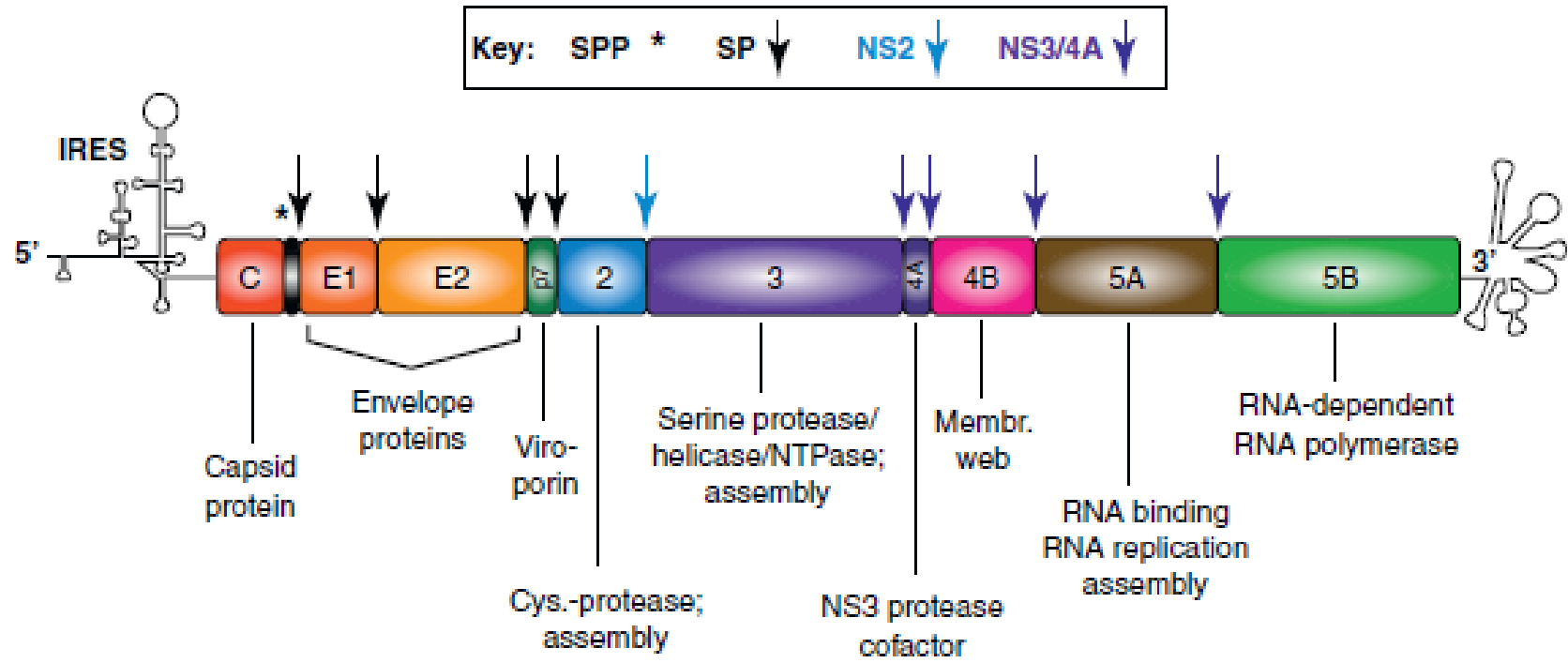
Navrhovaný model of propojení replikace/translace HCV RNA.



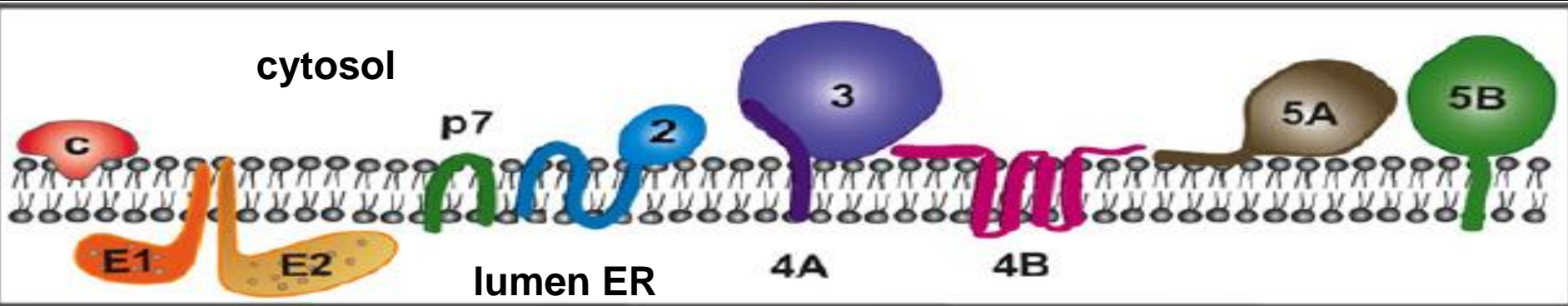
Liu HM, Aizaki H, Machida K, Ou J-HJ, et al. (2012) Hepatitis C Virus Translation Preferentially Depends on Active RNA Replication. PLoS ONE 7(8): e43600. doi:10.1371/journal.pone.0043600
<http://www.plosone.org/article/info:doi/10.1371/journal.pone.0043600>

Syntéza virových proteinů a jejich lokalizace v membráně ER

IRES, polyprotein, štěpení na funkční proteiny, strukturní, nestructurní proteiny,

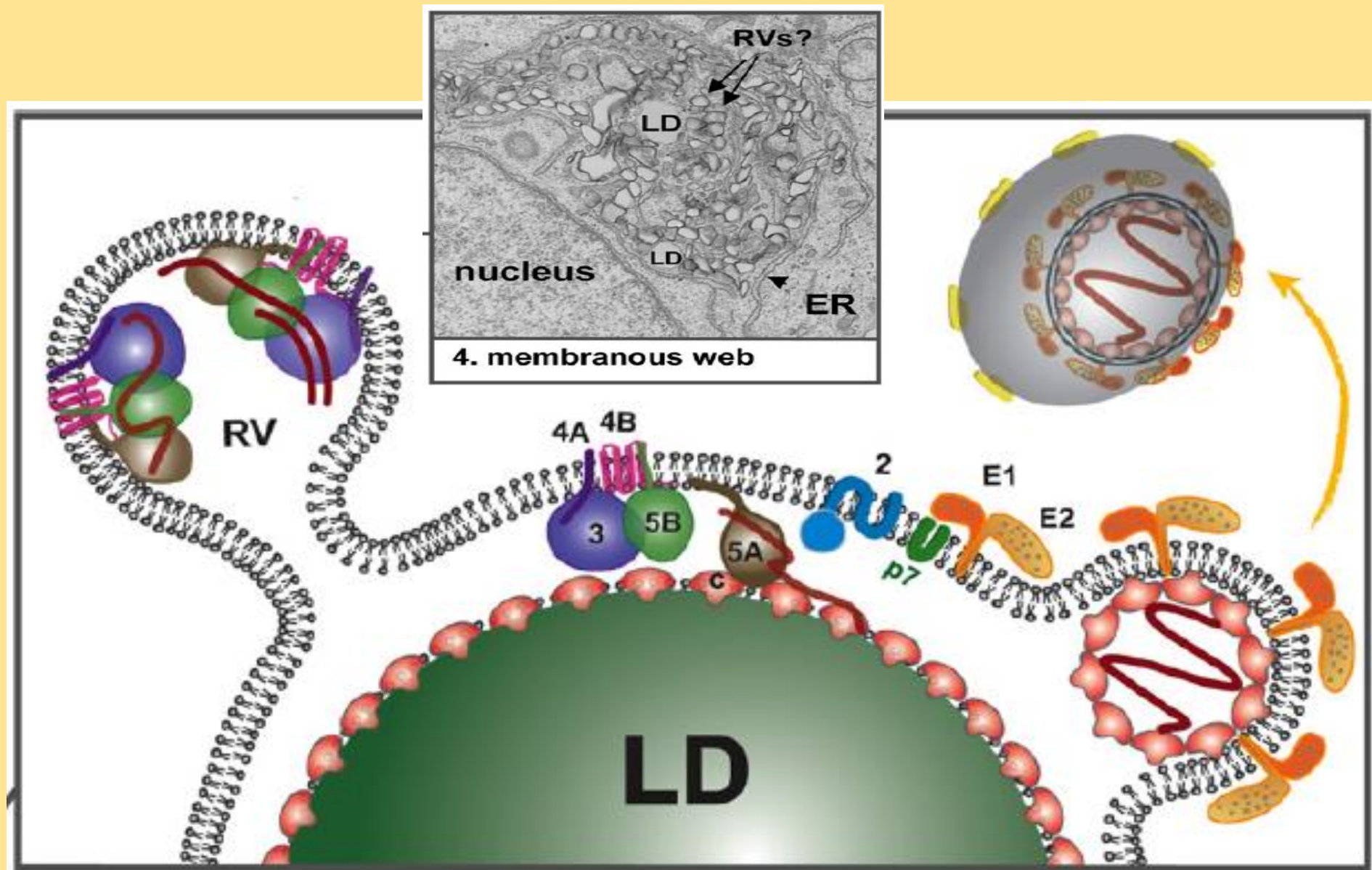


TRENDS in Microbiology

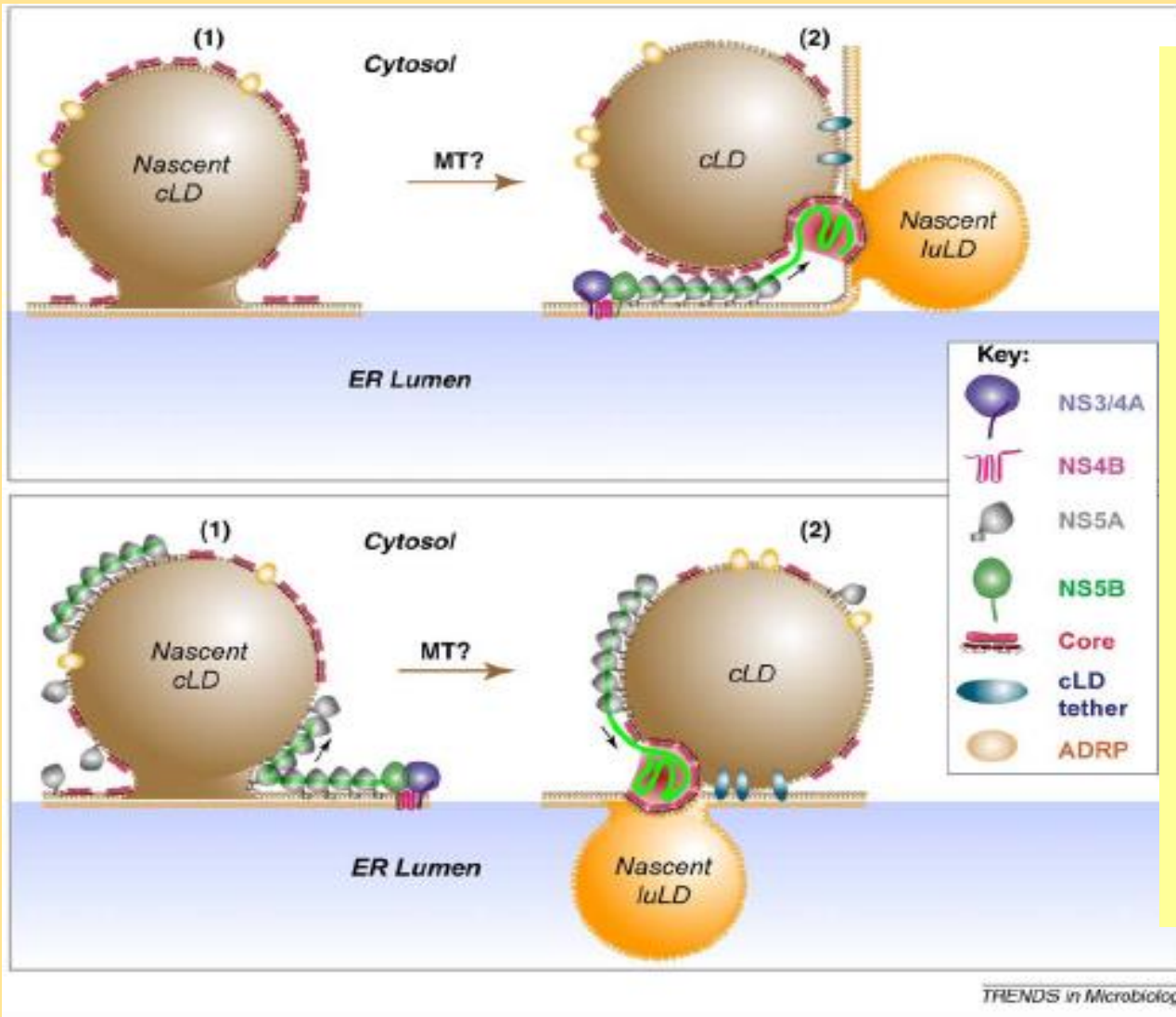


Syntéza HCV RNA v replikačních vesikulech (RV) membránového „webu“, role cytosolových tukových kapének (LD)

Nature Reviews Microbiology 5, 453-463 (June 2007)



Iniciace utváření virionu - vznik virové kapsidy



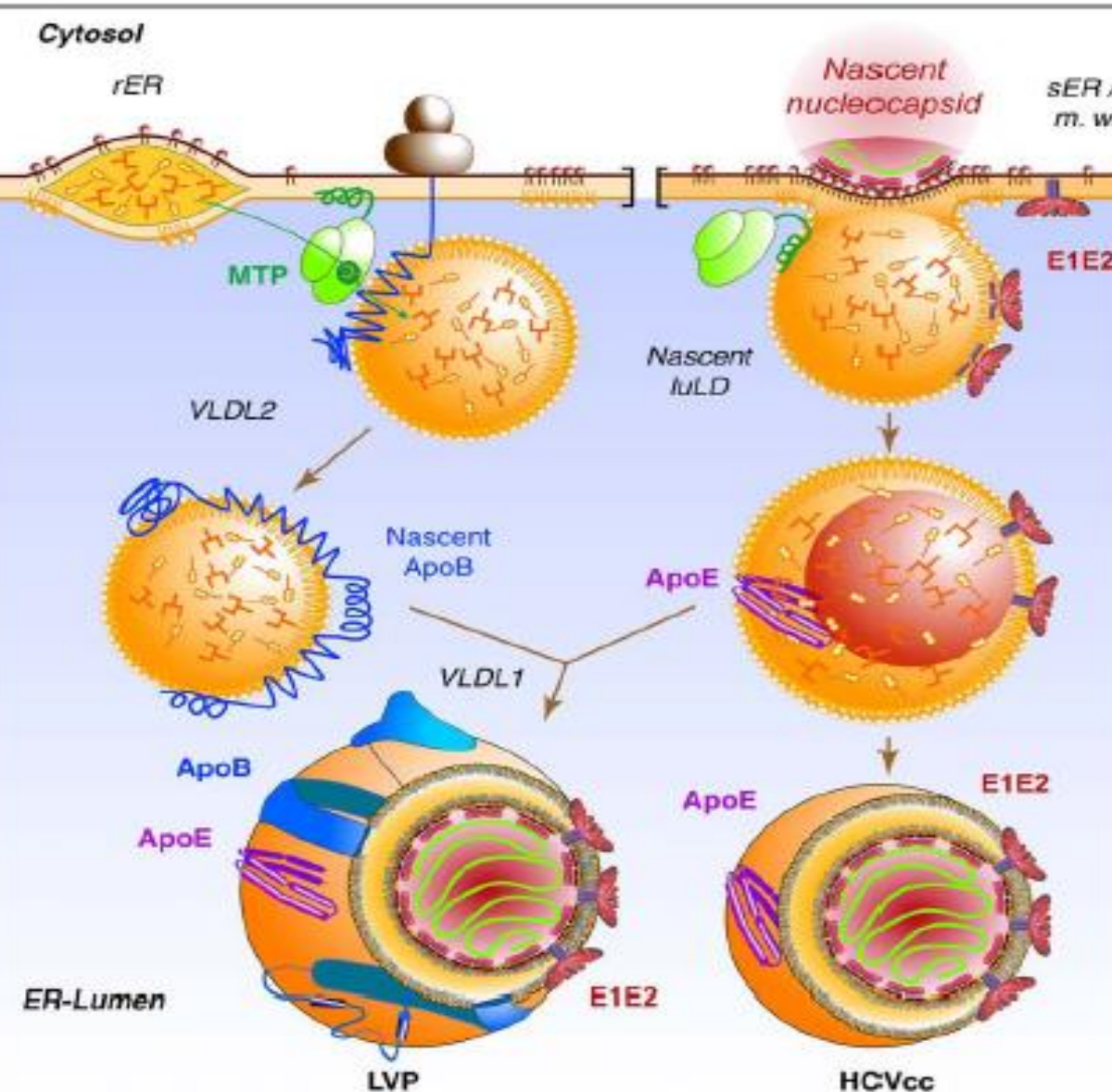
Dva modely tvorby virové nukleokapsidy a role NS5A proteinu při iniciaci tvorby kapsidy horní model

NS5A na membráně ER dolní model

NS5A na LD

nukleokapsida „pučí“ do lumen ER v závislosti na syntéze VLDL, MTP (protein transferující mikrosomální triglyceridy) a apoE

Utváření virové částice



Obalování kapsidy membránou s obalovými proteiny E1 a E2 při pučení do luminální lipidové kapénky

Fuze částice s VLDL1

Vznik lipidické virové částice LVP (s apoE a apoB)

Při replikaci v buněčných kulturách se vytváří částice HCVcc nefuzované s VLDL1

Densita HCV částic v krvi heterogenní (mezi 1,08 – 1,29 g/ml), čím menší hustota tím vyšší infekčnost

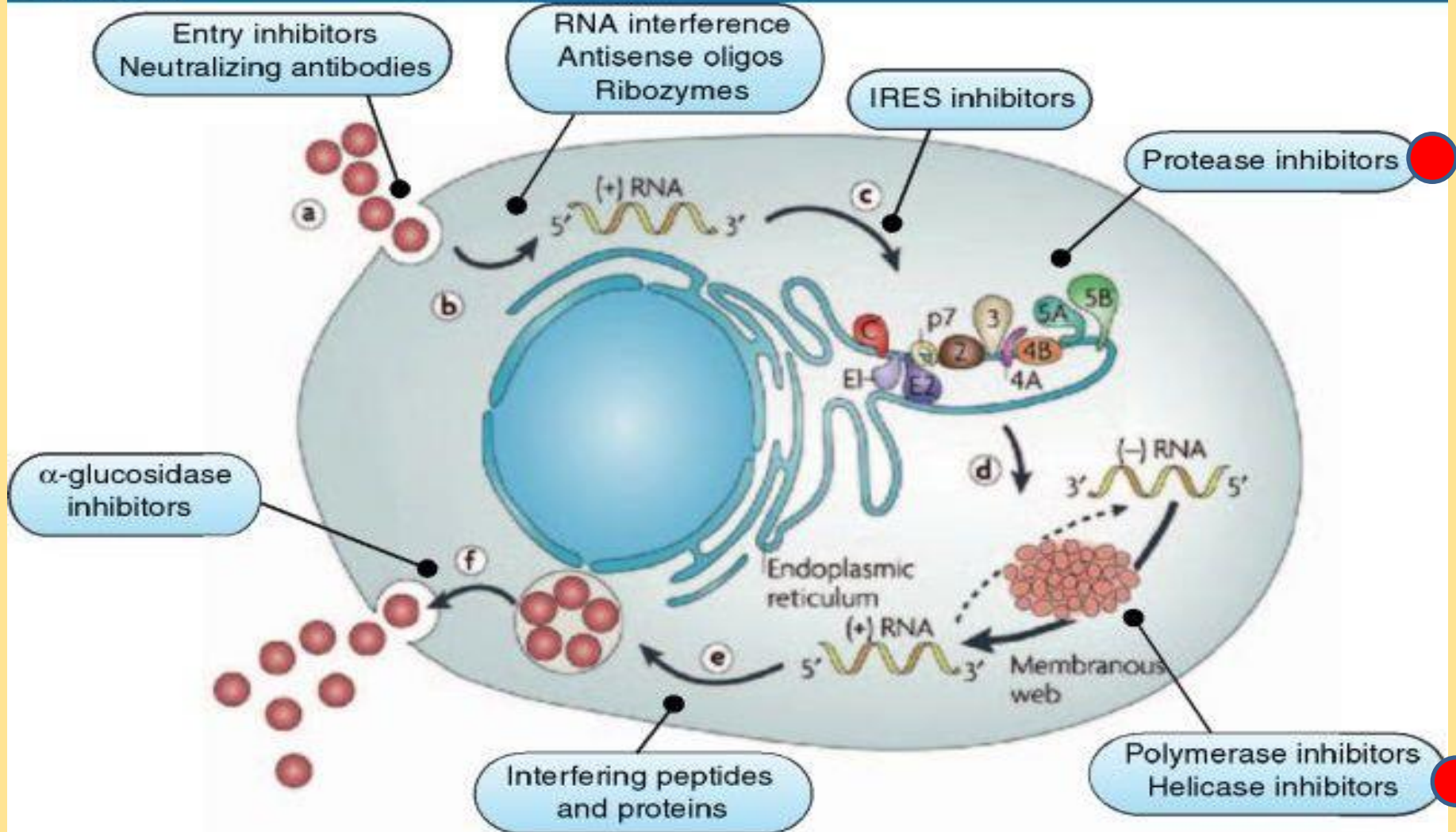
apoE integrální součástí částic, částice s apoB mají vyšší infekčnost

velikost LVP cca 100nm

Exocytóza HCV

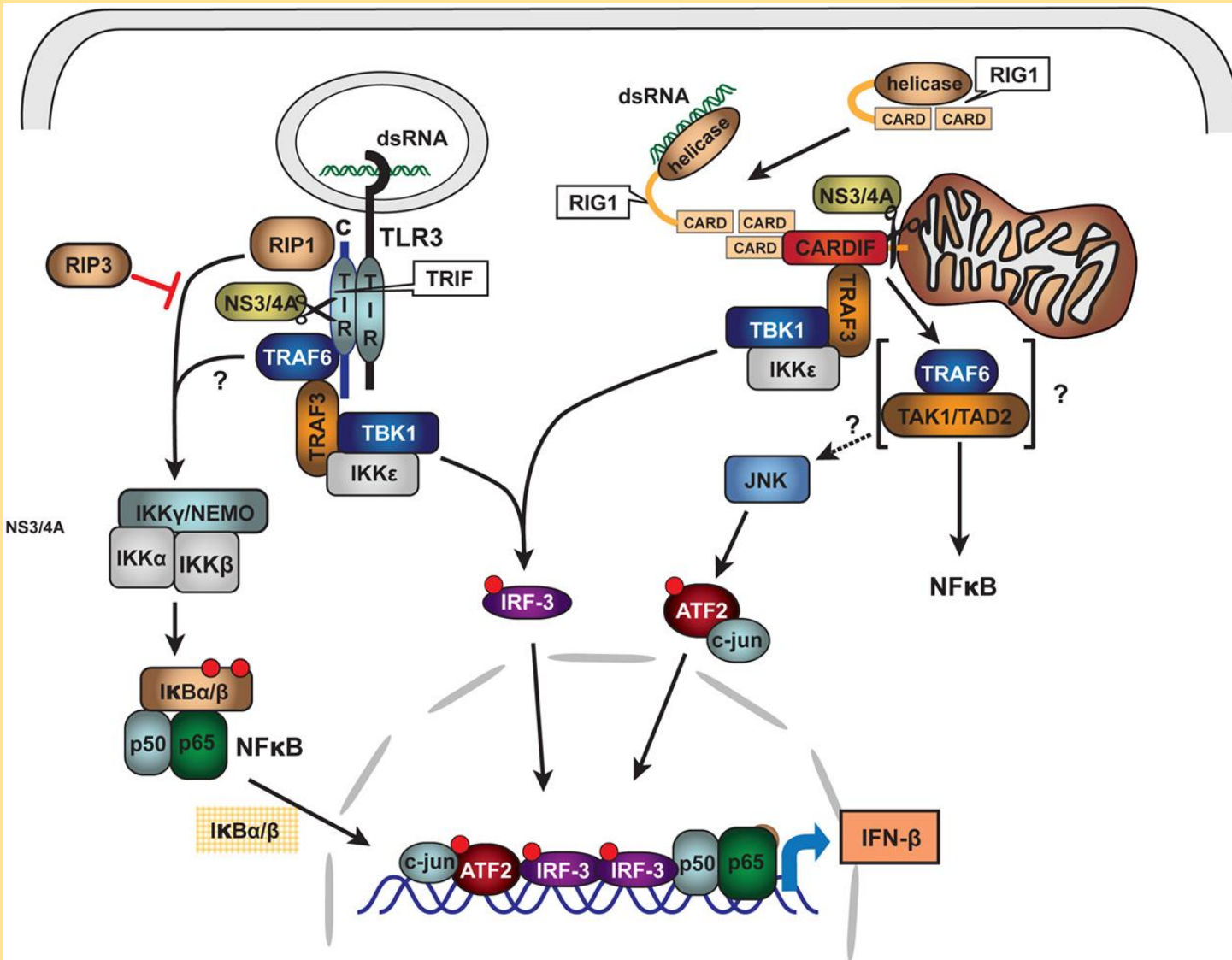
Možné cíle pro terapeutické zásahy

Medscape



HCV protein NS3/NS4A potlačuje přirozenou imunitu proti HCV infekci

(J.G. Bode et al., Archives of Biochemistry and Biophysics 462 (2007) 254–265)



dsRNA dvouřetězcová RNA

TLR toll-like receptor

TIR toll/interleukin receptor

RIG1 retinoic acid inducible gene

CARD caspase recruitmen domain

CARDIF CARD adaptor indukující IFN β

dsRNA dvouřetězcová RNA

IRF-3 IFN regulační faktor

Děkuji za pozornost