

## BIOLOŠKE OSOBITOSTI HEPATITIS C VIRUSA

## BIOLOGICAL PROPERTIES OF HEPATITIS C VIRUS

Irena Hrstić<sup>A</sup>, Boris Vucelić<sup>A</sup>

### SAŽETAK

Mehanizam infekcije, umnažanje virusa u ciljnim stanicama, tvrdokornost infekcije, te posljedično patogeneza kronične jetrene bolesti, nedovoljno su poznati. Hepatitis C virus (HCV) tvori malena jednolančana pozitivna RNA koja se svrstava u rod *Hepacivirus* u porodici *Flaviviridae*. Genom virusa sadrži 9600 nukleotida koji – u ovisnosti o genotipu – sintetiziraju poliprotein od približno 3000 aminokiselina. Razlikuje se 6 glavnih HCV genotipova (1 – 6), te više podtipova (a – c). Tijekom godina infekcije, virus u domaćinu postoji u obliku genetski različitih čestica nazvanih kvazivrstama. Virus hepatitisa C jest hepatotropni virus, stoga se glavina njegova umnažanja zbiva u hepatocitu. No, u manjim količinama može se naći i u mononuklearnim stanicama periferne krvi, te u limfnim čvorovima, stoga su i to prirodne ciljane stanice virusa. Poznavanje životnoga ciklusa virusa uglavnom je hipotetsko, s obzirom na nedostupnost učinkovite kulture stanica za istraživanja *in vitro*.

**Ključne riječi:** hepatitis C virus, genom, heterogenost, genotip, kvazispicijes, kinetika

### ABSTRACT

The mechanisms of hepatitis C virus infection (HCV) and replication in targeted cells, the mechanism of persistent viral infection and the pathogenesis of HCV hepatic disease are poorly understood. HCV is a small-enveloped virus containing a positive-sense, single-stranded (RNA). It is classified in the separate genus *Hepacivirus* in the *Flaviviridae* family. HCV genome contains approximately 9600 nucleotides that encode a polyprotein of around 3000 amino acids depending on the genotype. The various genotypes are distributed into 6 main types (1-6) with various subtypes (a-c). Within its hosts HCV exists as a pool of genetically distinct but closely related variants called quasispecies. Hepatocytes appear to be the major site of HCV replication, but peripheral blood mononuclear cells and lymph nodes are also natural target cells. Because of the lack of convenient *in vitro* tissue culture systems for efficient virus propagation the current understanding of the molecular mechanisms of HCV replication is mainly hypothetical.

**Key words:** hepatitis C virus, genome, heterogeneity, genotype, quasispecies, kinetics

### UVOD

Virus hepatitisa C (HCV) otkriven je godine 1989<sup>1</sup>. Za razumijevanje prirodnoga tijeka infekcije, presudno je važno poznavanje bioloških osobitosti virusa. Mehanizam infekcije, umnažanje virusa u ciljnim stanicama, tvrdokornost infekcije, te posljedično patogeneza kronične jetrene bolesti nedovoljno su poznati, budući da se zasnivaju na činjenicama kliničkih ispitivanja tijekom "samo" 18 godina. Poznavanje trodimenzionalne strukture HCV proteina i konstitucijskih nukleinskih kiselina, prvi je korak u proizvodnji učinkovitih antivi-

<sup>1</sup>Zavod za gastroenterologiju, Klinika za unutrašnje bolesti, KBC Zagreb – Rebro

Primljeno: 2. kolovoza 2007.

Prihvaćeno: 10. kolovoza 2007.

Adresa za dopisivanje: mr. sc. Irena Hrstić, dr. med., Zavod za gastroenterologiju, Klinika za unutrašnje bolesti, KBC Zagreb – Rebro, Kišpatićeva 12, 10000 Zagreb, tel.: 01 238 83 14, faks: 01 242 0100, e-mail: ihrstic@inet.hr

rusnih lijekova. Između ostaloga, sve navedeno umnogome usporava i razvoj tehnologije za proizvodnju cjepiva protiv tog virusa.

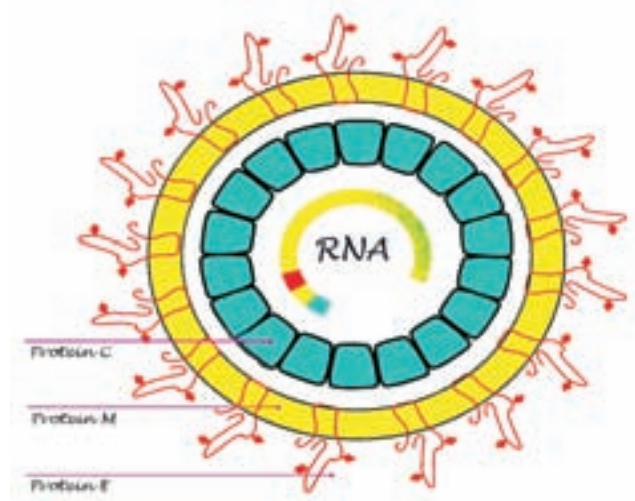
## BIOLOŠKE OSOBITOSTI VIRUSA

Virus koji pripada rodu *Hepacivirus* u porodici *Flaviviridae*, tvori jednolančana RNA. Elektronskim mikroskopom do sada je vizualizirana tek djelomična čestica virusa okrugla oblika, približnoga promjera 50 nm (slika 1.)<sup>2</sup>.

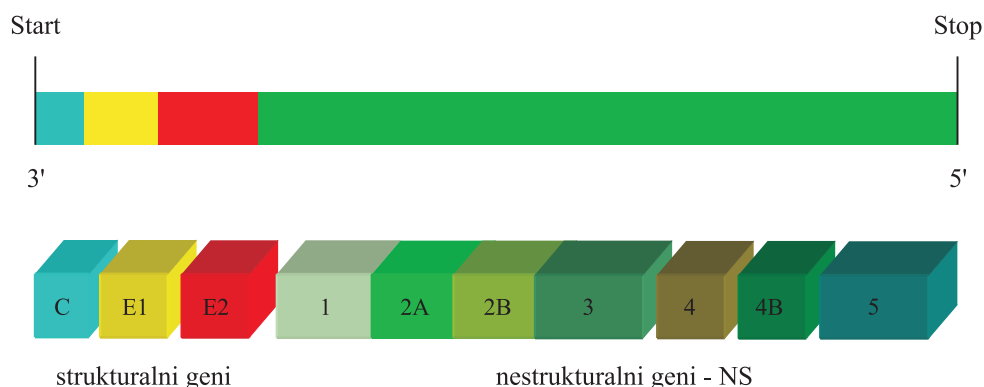
Daljnja istraživanja otežava nepostojanje odgovarajućega medija za uzgoj HCV-a u kulturi stanica, te nedostatak eksperimentalnoga životinjskoga modela. Nemogućnost vizualizacije posljedica je i činjenice da se u serumu nalazi tek mala količina virusnih čestica, što je ispod

osjetljivosti dostupnih imunoloških testova (manje od  $10^5$  u serumu zaražene osobe, manje od  $10^6$  CID-a = "chimpanzee-infective doses")<sup>2</sup>.

Molekularnim kloniranjem virusnoga genoma uz pomoć rekombinantne DNA, identificirani su mnogobrojni enzimatski procesi odgovorni za umnožavanje virusa. Genom virusa tvori jednolančana RNA približne duljine 9600 nukleotida (slika 2.), te nosi dugački otvor za čitanje (engl. open-reading frame, ORF). ORF je odgovoran za sintezu poliproteina od 3010 do 3033 aminokiselina, i razlikuje se ovisno o genotipu virusa. Sastoji se od strukturnih proteina koji uz glikoproteine E1 i E2 tvore nuklearnu kapsulu. Ostatak poliproteinskoga lanca genoma tvore nestrukturni NS proteini kojima je glavna svrha umnožavanje virusa<sup>4</sup>. NS5A nedavno je označen kao mogući medijator



Slika 1. Izgled čestice HCV-a – čestica okrugla oblika, približnoga promjera 50 nm  
Picture 1 Structure of HCV – particle is shaped like a ball, 50 nm in diameter.



Slika 2. Dio poliproteinskoga lanca genoma HCV-a – tvori ga jednolančana RNA približne duljine 9600 nukleotida. Otvor za čitanje odgovoran je za sintezu strukturnih i nestrukturnih proteina.  
Picture 2 Part of HCV genome – virus genome is consists of a positive-sense RNA molecule approximately 9600 nucleotides in length. Open reading frame is responsible for synthesis of structural and non-structural proteins.

otpornosti na interferon  $\alpha$ . NS5B jest RNA polimeraza koja se generira tijekom umnožavanja virusa, i čijom bi inhibicijom antivirusna terapija bila u potpunosti djelotvorna.

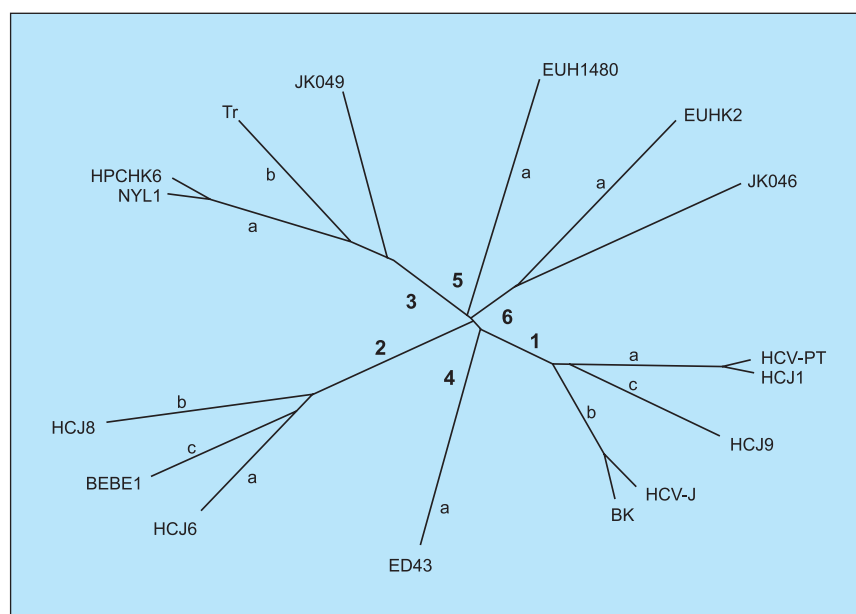
### HETEROGENOST VIRUSA

Genetska heterogenost virusa prvi je put uočena usporedbom molekularne sekvence HCV-a iz Japana s prototipom HCV-a iz SAD-a. Međusobna je podudarnost iznosila 79%<sup>3</sup>. Daljnjom usporedbom pojedinih virusnih genoma nametnula se potreba za podjelom HCV-a u skupine, odnosno na genotipove označene arapskim brojevima od 1 do 6 na osnovi glavnih lanaca, te u podskupine, odnosno na podtipove označene slovima od a do c, ovisno o postotku sličnosti s određenom glavnom genotip-

skom podskupinom (slika 3.)<sup>4</sup>. Podjela na genotipove važna je zbog epidemiološkoga praćenja, ali i zbog različita odgovora na dostupnu antivirusnu terapiju. Dok se pojedini genotipovi u nukleotidnomu slijedu razlikuju do 30%, podtipovi se međusobno razlikuju u približno 20%.

Genotipovi 1a, 1b, 2a i 2b široko su rasprostranjeni, a genotipovi 5a i 6a nalaze se u ograničenim zemljopisnim područjima (Tajland, Vijetnam, Burma). U Hrvatskoj prevladava genotip 1b, a usporedbeni podaci sa susjednim zemljama izneseni su u tablici 1<sup>5</sup>.

Velika razgranatost virusnoga stabla, ovisno o genotipu i podtipovima, najvjerojatnije je posljedica dugotrajne prisutnosti virusa u ljudi (možda dulje od 400 godina)<sup>3</sup>. Usporedbom virusnih



Slika 3. Genotipsko stablo HCV-a – prvu razinu heterogenosti tvori 6 glavnih genotipova  
Picture 3 HCV genotype tree – first level of heterogeneity is consists of 6 major genotypes.

Tablica 1. Distribucija HCV genotipova u Hrvatskoj  
Table 1 Genotype distribution in Croatia

Genotip/Genotype	Postotak/Percent	Spol/Gender		Dob/Age (medijan)
		Žene/Female (%)	Muškarci/Male (%)	
1	58,8	69,1	54,7	42
2	2,2	3,9	1,6	33
3	35,6	24,0	40,2	32
4	3,4	3,0	3,5	31

sekvenci bolesnika s kroničnim hepatitisom C tijekom 17-godišnjega praćenja, ustanovljeno je da tijekom godine dana prosječna izmjena virusne sekvence iznosi od 0,14% do 0,19%<sup>6</sup>.

Virusno umnožavanje kodirano je RNA polimerazom (NS5B), a sam je proces podložan mnogobrojnim pogreškama prepisivanja, odnosno mutacijama, što posljedično dovodi do pojave tzv. kvazivirata. Upravo sposobnost brze mutacije, te promjene u strukturnim E1 i E2 proteinima kojima se omogućuje djelovanje stvorenih neutralizirajućih antitijela u humoralnu imunome odgovor, razlogom su tvrdokornosti infekcije<sup>7</sup>. Prvih 27 aminokiselina E2 glikoproteina tvore hipervarijabilnu regiju 1 (HVR1) koja je odgovorna za čak 80% različitosti u rasporedu aminokiselina.

#### KINETIKA VIRUSA

Dok u neliječenih bolesnika stupanj viremije pokazuje minimalnu kolebljivost, u liječenih se bolesnika stupanj viremije bitno mijenja<sup>8</sup>. Kinetička istraživanja pokazuju da je minimalna dnevna produkcija viriona uz oslobađanje iz inficirane stanice 1010 – 1012 viriona na dan, a poluvrijeme života tih čestica iznosi nekoliko sati<sup>9</sup>. U odnosu prema farmakokinetici interferona  $\alpha$  čiji se učinak opaža 9 sati nakon prve primjene, daljnji pad viremije ima konkavnu krivulju (slika 4.)<sup>9</sup>.

– Prva faza: tijekom prvoga terapijskoga dana dolazi do izrazito brzoga opadanja viremije, koje

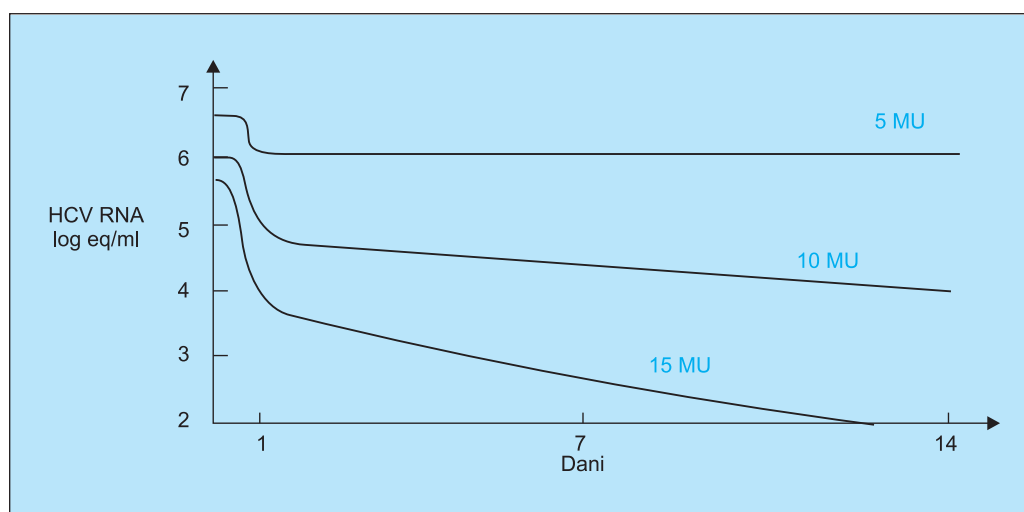
je statistički bitno različito s obzirom na primjenu različitih doza interferona  $\alpha$  (5 MU i 10 MU).

– Druga faza: tijekom drugoga terapijskoga dana i poslije, opadanje viremije mnogo je sporije, uza statistički zanemarljivu razliku između različitih terapijskih doza interferona  $\alpha$ .

Dok se prva faza opaža u svih liječenih bolesnika, druga faza izostaje u bolesnika koji ne reagiraju na terapiju takozvanih non-respondera<sup>9</sup>. Uz to što postoji zamjetna i brza izmjena viriona, jednako se događa i s inficiranom stanicom, te poluvrijeme života inficirane stanice iznosi 2,5 – 5 dana<sup>10,11</sup>.

#### ŽIVOTNI CIKLUS VIRUSA

Hepatitis C virus jest hepatotropni virus, stoga se glavna njegova umnažanja događa u hepatocitu. No, u manjim količinama može se naći u mononuklearnim stanicama periferne krvi i u limfnim čvorovima, stoga su i to prirodne ciljane stanice virusa. Poznavanje životnoga ciklusa virusa uglavnom je hipotetsko, s obzirom na nedostupnost učinkovite kulture stanica za istraživanja *in vitro*<sup>12</sup>. Najmanje poznata činjenica jest mehanizam ulaska u ciljnu stanicu. Vezanjem uza ciljnu stanicu, najvjerojatnije dolazi do međureakcije E1 i E2 proteina ovojnice s unutarstaničnim receptorskim mehanizmima. Nakon endocitoze ili E1 ili obaju endoproteina (E1 i E2), dolazi do spajanja virusne membrane s membranom endosoma, te oslobađanja



Slika 4. Kinetika viremije u odnosu prema farmakokinetičkom djelovanju interferona  $\alpha$ : prvu fazu tvori brzi pad količine virusnih čestica već nakon prvoga dana primjene lijeka (statistički različit, ovisno o dozi). Tu fazu slijedi usporeniji pad viremije u sljedećim danima (statistički nebitna razlika među dozama).

Picture 4 Viral kinetics according to interferon  $\alpha$ : first phase is fast and appear just after first application (decline depends of administered dose); second phase is much slower and statistically non different between administered doses

virusne RNA. Proteini E1 i E2 ostaju vezani uz membranu endoplazmatskoga mrežastoga tkiva. Cijepanjem poliproteina virusnoga genoma celularnim i virusnim proteazama, nastaju virusni proteini usko vezani uz unutarstanične membrane. Nestrukturalni HCV proteini NS3-NS5B, najvjerojatnije tvore replikacijski sklop koji implementira i neke zasad nepoznate unutarstanične komponente domaćina. U tom je sklopu pozitivno usmjeren RNA predložak za sintezu negativno usmjerenoga RNA koji pak nadalje služi kao predložak za sintezu novoga pozitivnoga RNA virusa. Svaka faza životnoga ciklusa virusa potencijalna je ciljna faza za učinkovitu antivirusnu intervenciju. U proizvodnji antivirusnih lijekova, najintenzivnije se istražuju tri glavna, dosad poznata antivirusna enzima (NS3 serinska proteaza, NS3 helikaza i NS5B RNA-ovisna RNA polimeraza).

Patogeneza jetrenoga oštećenja najvjerojatnije jest posljedica izravna citopatskoga učinka virusnih proteina i imunosnih mehanizama domaćina, posredovanih citotoksičnim limfocitima (CTL) i citokinima.

#### LITERATURA

1. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby LR, Bradley DW, Houghton M. Isolation of cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-62.
2. Rasenack J, ur. *Viral Hepatitis Diagnostics*, Diagnostic Falk Foundation; 7<sup>th</sup> edition 1999:17.
3. Choo QL, Richman KH, Han JH, i sur. Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:2451-5.
4. Simmonds P. HCV heterogeneity: the science and the practice. U: Simmonds P, Marcellin P, ur. *Hepatitis C: A series of topical reviews*, 4<sup>D</sup> Communications, Oxford;1998:5.
5. Esteban JI, Lopez-Talavera JC, Genesca J, i sur. High rate of infectivity and liver disease in blood donors with antibodies to hepatitis C virus. *Ann Intern Med* 1991;115:443-9.
6. Smith DB, Pathirana S, Davidson F, i sur. The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 1997;78:321-8.
7. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson C, i sur. Evidence for immune selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants: potential role in chronic HCV infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 1992;89:3468-72.
8. Nguyen TT, Sedghi-Vaziri A, Wilkes LB, i sur. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepatitis* 1996;3:75-8.
9. Zeuzem S, Schmidt JM, Lee J-H, Ruster B, Roth WK. Effect of interferon-alfa on the dynamics of hepatitis C turnover *in vivo*. *Hepatology* 1996;23:366-71.
10. Neumann AU, Lam NP, Dahari H, i sur. Hepatitis C viral dynamics *in vivo* and the antiviral efficacy of interferon-alfa therapy. *Science* 1998;282:103-7.
11. Bekkering FC, Brouwer JT, Schalm SW, Elewant A. Hepatitis C: viral kinetics (letter). *Hepatology* 1997;26:1691-3.
12. Penin Francois. Structural biology of hepatitis C virus. *Clin Liver Dis* 2003;7:1-21.