

Interacción del virus de la hepatitis C con la membrana celular

P. Sanz-Cameno^b, M.J. Borque^b, L. García-Buey^a y R. Moreno-Otero^a

Unidades de ^aHepatología y ^bBiología Molecular. Hospital Universitario de la Princesa, Universidad Autónoma de Madrid. España.

INTRODUCCIÓN

La infección por el virus de la hepatitis C (VHC) constituye un importante problema sociosanitario, ya que afecta a un 3% de la población mundial. Este virus origina una hepatitis crónica en un amplio porcentaje de las personas que sufren una infección aguda¹ y presenta una considerable tasa de evolución a cirrosis y hepatocarcinoma². Además, está estrechamente relacionado con el desarrollo de determinadas enfermedades extrahepáticas, como crioglobulinemias de tipo II y III, que se caracterizan por la activación policlonal de linfocitos B y la producción de autoanticuerpos³.

El VHC es un miembro de la familia *Flaviviridae* cuyo genoma está constituido por ARN de cadena sencilla y polaridad positiva. En su secuencia genómica se distingue una sola fase de lectura abierta, flanqueada en sus extremos por dos regiones no traducidas (5' y 3' UTR), que codifica una poliproteína precursora de los distintos péptidos enzimáticos y estructurales del virus (fig. 1).

A pesar de la elevada prevalencia de la infección y de sus graves consecuencias clínicas, el ciclo infectivo del VHC se desconoce en gran medida debido a la ausencia de sistemas eficaces para su cultivo *in vitro*. El VHC es un virus eminentemente hepatotropo, aunque cada vez se observa un mayor número de tipos celulares permisivos, como linfocitos B, macrófagos y leucocitos polimorfonucleares⁴.

Un acontecimiento primordial para que se produzca la infección radica en la unión efectiva del VHC a la superficie de la célula huésped. Para ello, es necesario que exista un reconocimiento específico entre las glucoproteínas estructurales que conforman la cubierta del virus y determinadas moléculas de la membrana celular. Después, el VHC ha de penetrar en la célula mediante alguno de los siguientes procesos dependientes de energía: *a*) translocación de la partícula viral completa a través de la membrana

celular; *b*) endocitosis mediada por receptores celulares, o *c*) fusión de la envoltura del virus con la membrana de la célula, para lo que es necesaria la existencia de alguna proteína viral capaz de realizar este proceso. Una vez en el citoplasma, el VHC se desprende de su envoltura y expone su genoma para que se produzcan los procesos de traducción y replicación. Posteriormente tiene lugar el ensamblaje del virus y su salida de la célula a través del sistema vesicular de secreción celular (fig. 2).

PROTEÍNAS ESTRUCTURALES DEL VHC

El procesamiento de la poliproteína precursora, mediado por una combinación de proteasas virales y del huésped, genera 10 proteínas distintas; de éstas, cuatro tienen características estructurales: *core*, que forma la nucleocápside; E1 y E2, que constituyen la envoltura; y p7, cuya función es aún desconocida. Las proteínas E1 y E2 presentan múltiples residuos susceptibles de glucosilación y sus regiones carboxiterminales son de naturaleza hidrófoba⁵. Estas glucoproteínas son las responsables en teoría de establecer la interacción con el huésped, ya que permanecen expuestas en la superficie viral mediante la formación de protuberancias a través de la envoltura. La expresión transitoria de ambas proteínas en cultivos celulares ha revelado que la formación de heterodímeros no covalentes constituye, probablemente, el complejo funcional en la superficie viral, ya que la existencia de agregados covalentes parece corresponder a su producción excesiva en los sistemas de expresión empleados^{6,7}. A pesar de la gran variabilidad de secuencias que presentan estas proteínas, atribuible a la elevada presión inmunológica a la que están sometidas⁸, su exposición en la superficie del virus también determina su más que probable implicación en el reconocimiento de la célula huésped.

RECEPTORES CELULARES DEL VHC

La expresión diferencial de estas moléculas (receptores) en función de la especie y del tipo celular es uno de los factores más influyentes en la restricción del huésped y

Correspondencia: Dr. R. Moreno Otero.
Unidad de Hepatología (planta 3.^a).
Hospital Universitario de la Princesa.
Diego de León, 62. 28006 Madrid.
Correo electrónico: morenootero@teleline.es

Recibido el 8-2-2002; aceptado para su publicación el 9-2-2002.

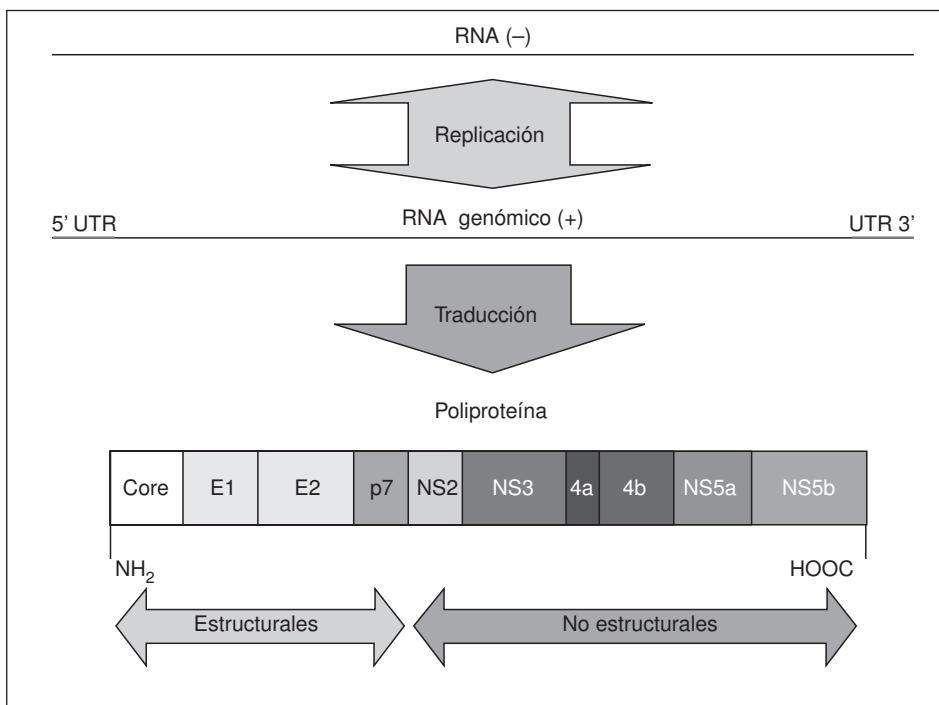


Fig. 1. Genoma del virus de la hepatitis C.

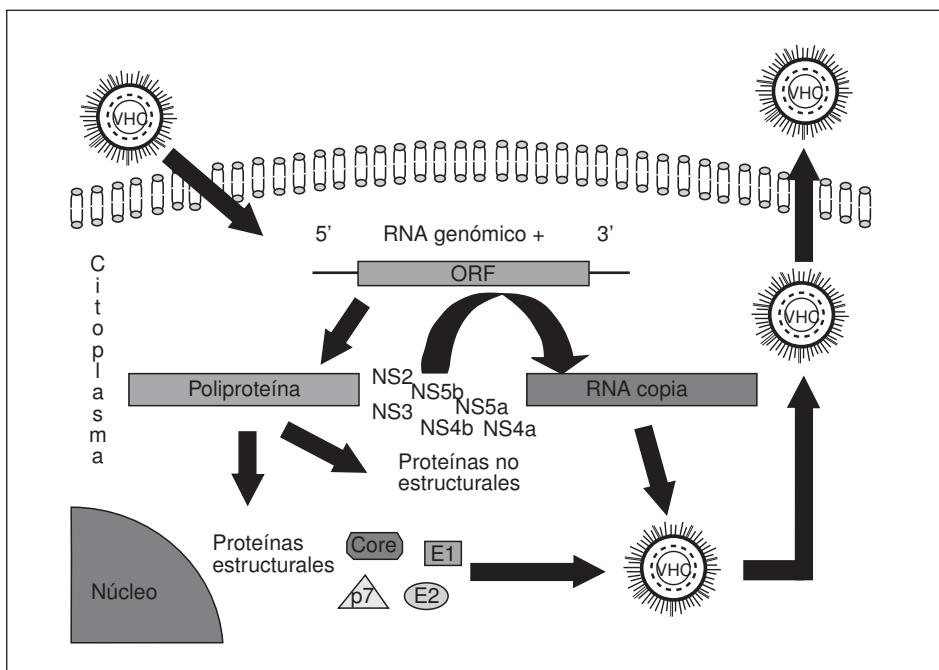


Fig. 2. Ciclo infectivo del virus de la hepatitis C.

del tejido susceptible de ser infectado por el virus, además de ser en gran parte responsable de su patogenicidad. Se han propuesto diversos receptores celulares del VHC (fig. 3); probablemente, todos participan en el anclaje celular del virus, bien de forma secuencial o actuando independientemente. La existencia de diversos accesos puede constituir una ventaja evolutiva considerable y es una estrategia empleada por numerosos microorganismos.

De forma similar a otros virus de la familia *Flaviviridae*, como el virus del dengue, el VHC puede fijarse a las moléculas de heparán sulfatos (HS) que, aunque con algunos cambios de estructura y complejidad, están presentes en todas las membranas celulares. En este sentido, se ha descrito la existencia de dominios de unión a este tipo de glucosaminoglicanos (GAG) en el VHC⁹. La elevada carga negativa de estas sustancias es capaz de establecer una interacción de naturaleza electrostática con dominios proteicos ricos en residuos básicos. Por tanto, estas moléculas pueden actuar como receptores de baja afinidad al aglutinar, de forma reversible, gran cantidad de partículas virales en la superficie celular y así facilitar su interacción con otros receptores más específicos.

También se ha postulado la capacidad de diversos virus, entre ellos los pertenecientes a la familia *Flaviviridae*, para asociarse a lipoproteínas de baja densidad (LDL) en sangre, pudiendo utilizar la endocitosis de estas proteínas mediada por sus receptores como vehículo para la invasión celular. Así, se ha identificado primero la asociación entre el VHC y las LDL en suero humano y posteriormente la interacción entre el VHC o el complejo VHC-LDL con el receptor celular de las LDL (LDL_r)¹⁰⁻¹¹. La evidencia directa de la entrada del VHC en la célula a través de estos receptores se observó por su inhibición,

de forma dependiente de la dosis, al preincubar las células con diversas concentraciones de anticuerpos frente al LDL_r. Sin embargo, este sistema no debe ser el único eficiente para la entrada de dichos virus, según revelan los estudios realizados en una línea de fibroblastos carente de este tipo de receptores¹². Otra circunstancia que sugiere la existencia de receptores adicionales para el VHC ha surgido de la incapacidad de las LDL para bloquear total-

mente la unión de este virus a la membrana celular de la línea humana de linfocitos T, MOLT-4¹³. La interacción específica del VHC con la superficie celular parece estar mediada por la glucoproteína estructural E2 que, según se ha comprobado en estudios recientes, puede desempeñar un papel decisivo en el anclaje del virus a la membrana. Así, en el trabajo desarrollado por Rosa et al¹⁴ en 1996 se observó que solamente la proteína recombinante E2 expresada en células de mamífero, no así la expresada en levaduras o en células de insecto, se unía con alta afinidad a la superficie celular de líneas derivadas de linfoma y hepatocarcinoma humano. En otro estudio realizado por el mismo grupo¹⁵ se demostró que la proteína E2 del VHC era capaz de interaccionar eficazmente con la molécula de membrana celular CD81 en la superficie de la línea celular MOLT-4. Posteriormente, en el dominio extracelular de mayor tamaño (LEL o EC2) de CD81 se mapearon algunos de los residuos más importantes para su unión a la glucoproteína E2 y se sugirió la importancia de su conformación tridimensional¹⁶. Este dominio está ampliamente conservado en humanos y en chimpancés, las únicas especies susceptibles de ser infectadas por el VHC. Sin embargo, el hecho de que se haya detectado la existencia de unión entre la proteína E2 y el dominio EC2 de hepatocitos de monos tamarinos¹⁷ sugiere que dicha interacción no es suficiente para el establecimiento de la infección por el VHC¹⁸.

Por otra parte, los ensayos de la expresión de E2 en líneas celulares de mamífero han revelado que la región hipervariable (HVR1), situada en su extremo aminoterminal, no interviene en la interacción con el dominio EC2 de CD81, al igual que tampoco la zona hidrofóbica carboxiterminal¹⁹. En cambio, esta última parece estar implicada en la interacción con la región transmembrana de E1 para la formación del heterodímero funcional de la envoltura viral²⁰.

CONSECUENCIAS DE LA INTERACCIÓN E2-CD81

La proteína CD81, también denominada TAPA-1²¹, es uno de los miembros de la familia tetraspán que engloba a un conjunto de proteínas transmembrana de estructura similar (fig. 4) implicadas en procesos celulares tan importantes como activación, proliferación, adhesión y motilidad²²⁻²³, y que adquieren suma trascendencia en el correcto funcionamiento del sistema inmunológico. Estas moléculas (tetraspáninas) presentan una elevada capacidad de asociación a miembros de su misma familia y a otras proteínas, principalmente integrinas β 1, constituyendo grandes complejos moleculares de membrana celu-

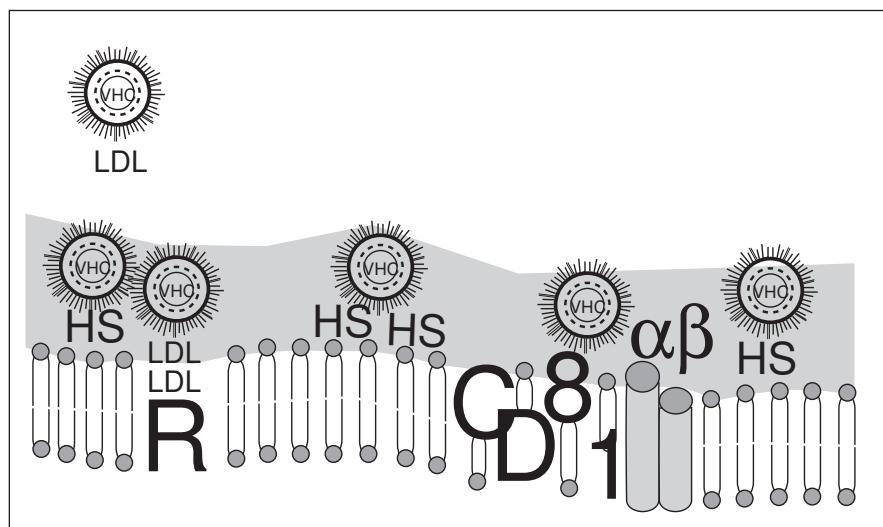


Fig. 3. Receptores celulares del virus de la hepatitis C. CD81 asociado a una integrina.

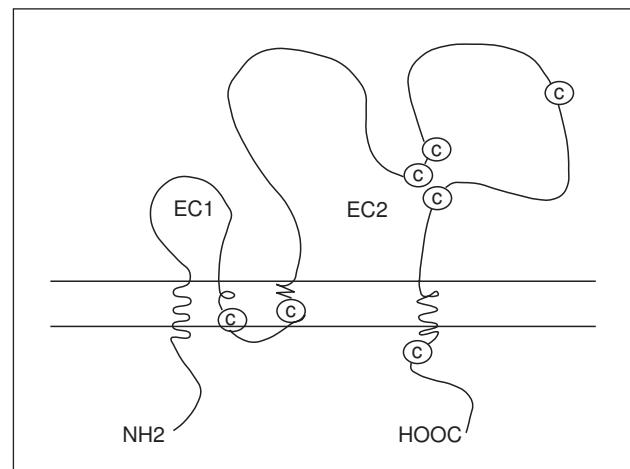


Fig. 4. Estructura de las tetraspáninas. EC1 y EC2: lazos extracelulares 1 y 2. C: cisteínas.

lar, cuya existencia en múltiples tipos celulares indica su importancia fisiológica generalizada. La amplia gama de procesos en los que han sido involucradas las tetraspáninas parece estar relacionada con la variedad de moléculas a las que se asocian, por lo que se ha postulado que su misión principal es localizar y facilitar ciertas interacciones moleculares para la formación de complejos funcionales²⁴. La multitud de asociaciones que CD81 es capaz de establecer se confirma por la variedad de efectos que pueden generar distintos anticuerpos frente a esta molécula y se ha comprobado que su interacción con la glucoproteína E2 del VHC es capaz de reproducir muchos de ellos¹⁶. Esta circunstancia puede explicar parte de la fisiopatología del VHC, ya que los procesos celulares en los que están implicados los complejos multiproteicos constituidos por CD81 pueden ser alterados en la interacción con el virus.

El VHC condiciona un aumento de la expresión de CD81 en las células mononucleares, como linfocitos B y T. Se

sabe que la unión física de CD81 con CD19, CD21 y Leu-13 en la superficie de los linfocitos B es de gran relevancia funcional para el desarrollo y diferenciación de estas células²⁵, ya que este complejo está involucrado en la amplificación de la cascada de señalización generada a través del receptor de las células B. Por tanto, la unión de la glucoproteína E2 a CD81 en la superficie de los linfocitos B puede desencadenar una serie de acontecimientos que permitan explicar la elevada prevalencia de infección por el VHC en pacientes con enfermedades linfoproliferativas²⁶. Además, la interacción del VHC con CD81 en las células B determina que se pongan en marcha los procesos de activación y proliferación linfocitarios responsables del desarrollo de trastornos proliferativos o de fenómenos autoinmunes²⁷. Por otra parte, CD81 se asocia en los linfocitos T a las moléculas CD4 y CD8, generando una señal coestimuladora junto a CD3²⁸. La unión de E2 a CD81 en células T humanas genera un importante incremento de su proliferación, al disminuir el umbral necesario para la expresión del receptor de interleucina 2 (IL-2r) y aumentar la síntesis de IL-2. Asimismo, dicha interacción induce la síntesis de interferón-gamma (IFN- γ) e IL-4 y aumenta la regulación negativa del receptor de las células T (TCR); ambos fenómenos poseen la capacidad de facilitar la expansión clonal de células que reciben estímulos subóptimos, como los que se pueden originar por la exposición excesiva de autoantígenos en el hígado dañado por el VHC. Así, la coestimulación de células T autorreactivas por el VHC puede contribuir tanto en el daño hepático como en los fenómenos de autoinmunidad observados en la hepatitis crónica C²⁷. Además, en estudios recientes se ha demostrado que tanto los anticuerpos anti-CD81 como la proteína E2 del VHC son capaces de inhibir la activación y proliferación de las células *natural killer* (NK)²⁹, así como la producción temprana de IFN- γ por estas células³⁰, constituyendo otro mecanismo empleado por el VHC para evadir la respuesta inmunitaria.

NUEVAS PERSPECTIVAS PREVENTIVAS Y TERAPÉUTICAS

Aunque el tratamiento de la hepatitis crónica C ha mejorado notablemente en los últimos años, debido a la combinación del INF- γ con el análogo nucleosídico ribavirina, la respuesta terapéutica es aún bastante reducida y el elevado coste farmacológico determina que no siempre dicho tratamiento sea accesible para los enfermos de los países subdesarrollados³¹. Estos y otros factores han determinado que el conocimiento de los distintos receptores que puede utilizar el VHC para entrar en la célula o para generar determinados estímulos patológicos constituya un objetivo prioritario para la comunidad científica.

La amplia distribución tisular de los distintos receptores celulares del VHC mencionados³² no explica de momento su marcado tropismo hepático y sugiere que otros factores, hepáticos o virales, deben estar involucrados en el establecimiento de esta infección³³. La generación de virus que expresan proteínas quiméricas compuestas por el do-

mino transmembrana de la proteína G del virus de la estomatitis vesicular (VSV) con los dominios extracelulares de las proteínas E1 o E2 del VHC indica que ambas tienen capacidad de unión a los proteoglicanos de la superficie celular y que E1 es el principal responsable de la interacción con los LDLr, como se demuestra por la inhibición de la entrada de los virus químéricos que expresan E1 al bloquear este receptor con sus ligandos o con anticuerpos específicos. De forma similar, los virus que expresan E2 no son capaces de penetrar en las células cuando éstas son tratadas previamente con anticuerpos frente a CD81 o cuando las partículas virales son enfrentadas al dominio EC2 de CD81 antes de su interacción con las células³⁴. Posteriormente, se ha observado que la mayor infectividad de estos virus recombinantes, VSV-VHC, se produce cuando expresan ambas glucoproteínas, E1 y E2, al mismo tiempo³⁵.

La composición de los complejos multiproteicos constituidos por CD81 puede ser bien distinta en función del tipo o estadio celular, y es probable que uno o más de sus componentes participe junto a esta tetraspanina en el anclaje del virus³⁶. El incremento de la afinidad de algunos anticuerpos por E2 cuando esta molécula se ha unido a CD81 refuerza la idea de la existencia de un cambio conformacional provocado por dicha interacción, lo que puede ser determinante para la subsiguiente unión de E2 a otras moléculas³⁷.

Por otra parte, se ha constatado recientemente la capacidad del tratamiento con INF- γ más ribavirina para regular *in vivo* e *in vitro* la expresión de CD81 en la membrana de hepatocitos y linfocitos humanos, y cómo dicha regulación es dependiente del genotipo del VHC³⁸. La regulación negativa de la expresión de CD81 con dicha combinación terapéutica determina una reducción del daño necroinflamatorio hepático y una mejoría de los trastornos linfoproliferativos y autoinmunes asociados. Por tanto, la interacción del VHC con CD81 quizás no sea suficiente para la permisividad de la célula¹⁸, pero la caracterización de las moléculas asociadas a dicha tetraspanina en la membrana celular puede ser fundamental para el conocimiento del mecanismo de entrada y la colonización celular del VHC³⁹ y, por tanto, para el desarrollo de nuevas estrategias preventivas y terapéuticas. Como se ha comentado, algún componente de los complejos macromoleculares de membrana celular constituidos por CD81 puede participar en la formación o mantenimiento de una conformación determinada para la unión del VHC e incluso ser responsable, junto a esta tetraspanina, del procesamiento celular del virus o de parte de su fisiopatología al alterar la señalización celular mediada por estas proteínas, tanto en las células hepáticas como en las del sistema inmunológico.

Agradecimiento

Este trabajo ha sido subvencionado en parte con fondos del proyecto de investigación FIS número 01/0392 concedido al Dr. R. Moreno Otero.

BIBLIOGRAFÍA

- Van der Poel CL, Cuypers HT, Reesink HW. Hepatitis C virus six years on. *Lancet* 1994;344:1475-9.
- Hoofnagle JH. Hepatitis C: the clinical spectrum of disease. *Hepatology* 1997;26:15S-20S.
- Agnello V, Chung RT, Kaplan LM. A role for hepatitis C virus infection in type II cryoglobulinemia. *N Engl J Med* 1992; 327:1490-5.
- Lerat H, Rumin S, Habersetzer F, Berby F, Trabaud MA, Trepo C, et al. In vivo tropism of hepatitis C virus genomic sequences in hematopoietic cells: influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998;91:3841-9.
- Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* 1998;72:2183-91.
- Choukhi A, Pillez A, Drobecq H, Sergheeraert C, Wychowski C, Dubuisson J. Characterization of aggregates of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 1999;80:3099-107.
- Dubuisson J. Folding, assembly and subcellular localization of hepatitis C virus glycoproteins. *Curr Top Microbiol Immunol* 2000;242:135-48.
- Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, Nakazawa T, Hijikata M, Ohkoshi S, et al. Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:3923-30.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Lindhardt RJ, et al. Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997; 3:866-71.
- Thomassen 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 (Berl)* 1993;182:329-34.
- Thomassen R, Bonk S, Propfe C, Heermann KH, Kochel HG, Uy A. Association of hepatitis C virus in human sera with beta-lipoprotein. *Med Microbiol Immunol (Berl)* 1992;181:293-300.
- Agnello V, Abel G, Elfahal M, Knight GB, Zhang QX. Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999;96: 12766-71.
- Wunschmann S, Medh JD, Klinzmann D, Schmidt WN, Stapleton JT. Characterization of hepatitis C virus (HCV) and HCV E2 interactions with CD81 and the low-density lipoprotein receptor. *J Virol* 2000;74:10055-62.
- Rosa D, Campagnoli S, Moretto C, Guenzi E, Cousens L, Chin M, et al. A quantitative test to estimate neutralizing antibodies to the hepatitis C virus: cytofluorimetric assessment of envelope glycoprotein 2 binding to target cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996;93:1759-63.
- Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, et al. Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 1998; 282:938-41.
- Flint M, Maidens C, Loomis-Price LD, Shotton C, Dubuisson J, Monk P, et al. Characterization of hepatitis C virus E2 glycoprotein interaction with a putative cellular receptor, CD81. *J Virol* 1999;73:6235-44.
- Allander T, Forns X, Emerson SU, Purcell RH, Bukh J. Hepatitis C virus envelope protein E2 binds to CD81 of tamarins. *Virology* 2000;277:358-67.
- Meola A, Sbardellati A, Bruni Ercole B, Cerretani M, Pezzanera M, Ceccacci A, et al. Binding of hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 does not correlate with species permissiveness to infection. *J Virol* 2000;74:5933-8.
- Forns X, Allander T, Rohwer-Nutter P, Bukh J. Characterization of modified hepatitis C virus E2 proteins expressed on the cell surface. *Virology* 2000;274:75-85.
- Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, Dubuisson J. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* 2000;74:3623-33.
- Oren R, Takahashi S, Doss C, Levy R, Levy S. TAPA-1, the target of an antiproliferative antibody, defines a new family of transmembrane proteins. *Mol Cell Biol* 1990;10:4007-15.
- Wright MD, Tomlinson MG. The ins and outs of the transmembrane 4 superfamily. *Immunol Today* 1994;15:588-94.
- Berditchevski F, Zutter MM, Hemler ME. Characterization of novel complexes on the cell surface between integrins and proteins with 4 transmembrane domains (TM4 proteins). *Mol Biol Cell* 1996;7:193-207.
- Maecker HT, Todd SC, Levy S. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J* 1997;11:428-42.
- Horvath G, Serru V, Clay D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. CD19 is linked to the integrin-associated tetraspans CD9, CD81, and CD82. *J Biol Chem* 1998;273:30537-43.
- Hausfater P, Rosenthal E, Cacoub P. Lymphoproliferative diseases and hepatitis C virus infection. *Ann Med Interne (Paris)* 2000;151:53-7.
- Wack A, Soldaini E, Tseng C, Nuti S, Klimpel G, Abrignani S. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 provides a co-stimulatory signal for human T cells. *Eur J Immunol* 2001;31:166-75.
- Todd SC, Lipps SG, Crisa L, Salomon DR, Tsoukas CD. CD81 expressed on human thymocytes mediates integrin activation and interleukin 2-dependent proliferation. *J Exp Med* 1996; 184:2055-60.
- Tseng CT, Klimpel GR. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J Exp Med* 2002;195:43-50.
- Crotta S, Stilla A, Wack A, D'Andrea A, Nuti S, D'Oro U, et al. Inhibition of natural killer cells through engagement of CD81 by the major hepatitis C virus envelope protein. *J Exp Med* 2002;195:35-42.
- McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, Shiffman ML, Lee WM, Rustgi VK, et al. Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 1998; 339:1485-92.
- Levy S, Todd SC, Maecker HT. CD81 (TAPA-1): a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu Rev Immunol* 1998;16:89-109.
- Takikawa S, Ishii K, Aizaki H, Suzuki T, Asakura H, Matsuura Y, et al. Cell fusion activity of hepatitis C virus envelope proteins. *J Virol* 2000;74:5066-74.
- Meyer K, Basu A, Ray R. Functional features of hepatitis C virus glycoproteins for pseudotype virus entry into mammalian cells. *Virology* 2000;276:214-26.
- Matsuura Y, Tani H, Suzuki K, Kimura-Someya T, Suzuki R, Aizaki H, et al. Characterization of pseudotype VSV possessing HCV envelope proteins. *Virology* 2001;286:263-75.
- Petracca R, Falugi F, Galli G, Norais N, Rosa D, Campagnoli S, et al. Structure-function analysis of hepatitis C virus envelope-CD81 binding. *J Virol* 2000;74:4824-30.
- Flint M, McKeating JA. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol* 2000;10:101-17.
- Kronenberger B, Ruster B, Elez R, Weber S, Piiper A, Lee JH, et al. Interferon alfa down-regulates CD81 in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 2001;33:1518-26.
- Sanz-Cameno P, Majano P, García-Monzón C, Lo Iacono O, Borque MJ, Moreno-Otero R. Expresión de integrinas $\beta 1$, CD81 y otras tetraspan en líneas celulares hepáticas: interacción con la glicoproteína E2 del virus de la hepatitis C (VHC). *Gastroenterol Hepatol* 2001;24:89A.