

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Biologie



**Petra Vávrová**

Interakce proteinů viru hepatitidy B s mechanismy přirozené imunity  
Interaction of hepatitis B virus proteins with mechanisms of innate immunity

Bakalářská práce

Školitel: RNDr. Ivan Hirsch, CSc.

Praha, 2017

### *Poděkování*

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Ivanu Hirschovi, CSc. za vstřícnost a cenné rady při psaní této bakalářské práce. Dále bych chtěla poděkovat také své rodině a přátelům za veškerou podporu.

### Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 22. 8. 2017

Podpis

## **Abstrakt**

Cílem práce je provedení literární rešerše interakce proteinů viru hepatitidy B s mechanismy přirozené imunity. Důraz bude kladen na srovnání role virových proteinů před a po exportu z infikované buňky. Vzhledem ke klíčové roli cccDNA pro udržení HBV v lidském organismu, bude studován vliv restričních faktorů na možnosti její destrukce a eradikace. V práci bude zohledněn vliv virových proteinů během akutní, chronické a okultní infekce.

## **Klíčová slova**

virus hepatitidy B (HBV); replikační cyklus, restriční faktory; Toll-like receptory; kovalentně uzavřená kruhová DNA HBV (cccDNA); replikace a transkripce; akutní, chronická a okultní infekce HBV

## **Abstract**

Specific aim of this bibliographic research is to elucidate interaction of hepatitis B virus proteins with mechanisms of the innate immunity. The work will specially analyze the role of viral proteins before and after their transport from the infected cell. Because of the central role of cccDNA for virus persistence in human organism, the work will study the effects of restriction factors on its possible destruction and eradication. The research will be focused on the effect of viral proteins during acute, chronic and occult infection.

## **Keywords**

hepatitis B virus (HBV); replication cycle; restriction factors; Toll-like receptors, covalently closed circular HBV DNA (cccDNA); replication and transcription; acute, chronic and occult infection with HBV

## Obsah

1 Úvod.....	1
2 Struktura genomu a virové částice viru hepatitidy B (HBV) .....	1
3 Replikační cyklus HBV .....	3
4 Přirozená imunita .....	5
4.1 PRRs.....	6
4.1.1 Toll-like receptory .....	6
4.1.2 RIG-I-like receptory .....	7
4.1.3 ALR receptory.....	7
4.1.4 NOD-like receptory .....	8
4.2 Interferony .....	8
5 Proteiny viru HBV a jejich interakce s přirozenou imunitou.....	10
5.1 HBx .....	11
5.2 HBV RNA-dependentní-DNA-polymeráza .....	13
5.3 HBcAg.....	16
5.4 HBsAg.....	18
6 Závěr.....	20
7 Použitá literatura .....	22

## Seznam zkratek

<b>ALR</b>	Absent from melanoma 2 (AIM2)-like receptor	„Absence z melanomu 2 (AIM2)-like receptor“
<b>APOBEC</b>	Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide	Katalytický polypeptid enzymu upravujícího mRNA pro apolipoprotein B
<b>CARD</b>	Caspase-recruitment domain	Oblast rekrutující kaspázu
<b>cccDNA</b>	Covalently closed circular DNA	Kruhová kovalentně uzavřená DNA
<b>DDB1</b>	Damaged DNA Binding Protein1	Protein 1 vázající se na poškozenou DNA
<b>DNA</b>	Deoxyribonucleic Acid	Deoxyribonukleová kyselina
<b>HBcAg</b>	Hepatitis B virus core antigen	Kapsidový protein/antigen viru hepatitidy B
<b>HBsAg</b>	Hepatitis B virus surface antigen	Povrchový protein/ antigen viru hepatitidy B
<b>HBV</b>	Hepatitis B Virus	Virus hepatitidy B
<b>HBx</b>	Hepatitis B virus x protein	X protein viru hepatitidy B
<b>HBXIP</b>	HBx interacting protein	Protein interagující s HBx
<b>HCC</b>	Hepatocellular Carcinoma	Hepatocelulární karcinom
<b>HIV</b>	Human Immunodeficiency Virus	Virus lidské imunitní nedostatečnosti
<b>IFN</b>	Interferon	Interferon
<b>ISG</b>	Interferon Stimulated Genes	Interferony stimulované geny
<b>MVB</b>	Multivesicular Bodies	Multivesikulární tělíska

<b>NOD</b>	Nucleotide-binding oligomerization domain	Oligomerizační doména vázající nukleotid
<b>NRTI</b>	Nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors	Nukleos(t)idový inhibitor reverzní transkriptázy
<b>PAMPs</b>	Pathogen-Associated Molecular Patterns	Struktury typické buňky patogenů
<b>PGN</b>	Peptidoglykan	Peptidoglykan
<b>pgRNA</b>	Pre-genomic RNA	Pregenomová RNA
<b>PRRs</b>	Pathogen Recognition Receptors	Receptory rozpoznávající patogeny
<b>PRMT5</b>	Protein arginine methyltransferase 5	Protein arginin methyltransferáza 5
<b>rcDNA</b>	Relaxed circular DNA	Relaxovaná cirkulární DNA
<b>RLR</b>	RIG-I-like receptor	RIG-I-like receptory
<b>Smc</b>	Structural Maintenance of Chromosomes	Strukturální údržba chromosomů
<b>TLR</b>	Toll-like Receptor	Toll-like receptory

## 1 Úvod

Virus hepatitidy B (HBV) je malý obalený DNA virus, který se řadí do čeledi *Hepadnaviridae*. HBV pro dokončení své replikace vyžaduje reverzní transkripci probíhající v pozdní fázi na základě transkribované pregenomové RNA. Tento virus sám o sobě není nebo je jen mírně cytopatický, ale u infikovaných jedinců zvyšuje riziko vzniku cirhózy jater nebo hepatocelulárního karcinomu (HCC). Za tato poškození je však zodpovědná především imunitní odpověď hostitele a ne samotný virus. Přestože byl tento virus objeven již v roce 1966 a od roku 1982 je dostupná vakcína, je HBV stále jedním z nejzávažnějších onemocnění na světě. Přibližně 250 milionů lidí má chronickou Hepatitidu B a více než 780 tisíc lidí zemře každý rok kvůli nemocem, které se pojí s HBV, jako je již zmiňovaná cirhóza jater nebo hepatocelulární karcinom. V současné době léčba zahrnuje inhibici reverzní transkripce. Některé ze způsobů inhibice jsou popsány zde v práci.

Imunitní systém má za úkol bránit tělo proti napadení patogeny. Musí umět rozeznávat staré, poškozené nebo mutované buňky a odstranit je, ale musí umět rozeznat i buňky, které jsou zdravé a ty chránit. Imunitní systém má dvě složky a to imunitu adaptivní a přirozenou, které jsou spolu provázané a přestože každá složka má jiný mechanismus fungování, dohromady slouží k ochraně organismu. Bez správného fungování mechanismů přirozené imunity je pro organismus téměř nemožné se bránit vůči cizímu agens, protože bez přirozené imunity, jakožto první obrané linie nemůže fungovat ani adaptivní imunita.

Významnou složkou přirozené imunity jsou buněčné restrikční faktory, které mají velkou roli při boji proti virům. Cílem této práce je ukázat, jak některé proteiny viru hepatitidy B interagují s restrikčními faktory a jaký to má vliv na replikaci samotného viru.

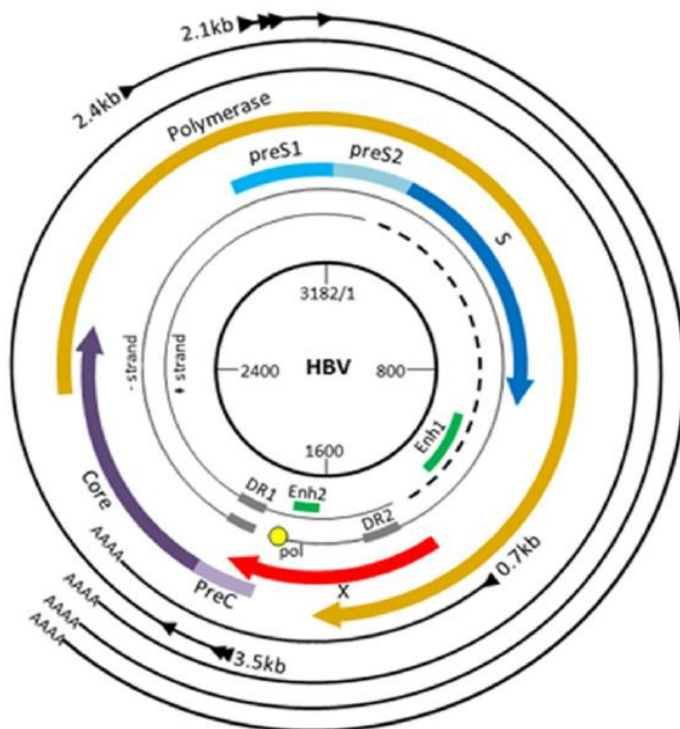
## 2 Struktura genomu a virové částice viru hepatitidy B (HBV)

Dříve, než byl objeven samotný virus HBV, byl koncem padesátých let v krvi australských domorodců a některých pacientů trpících hepatitidou nalezen Baruchem Blumbergem a Harvey Alterem specifický protein, který byl později identifikován jako povrchový antigen HBV, HBsAg (Patlak et al., 2000). Až v roce 1966 byl objeven malý obalený DNA virus hepatitidy B, jenž řadíme do rodiny *Hepadnaviridae* (rod *Orthohepadnavirus*) a který společně s hepatitidou C je nejčastější příčinou onemocnění jater u lidí (Choo et al., 1989).



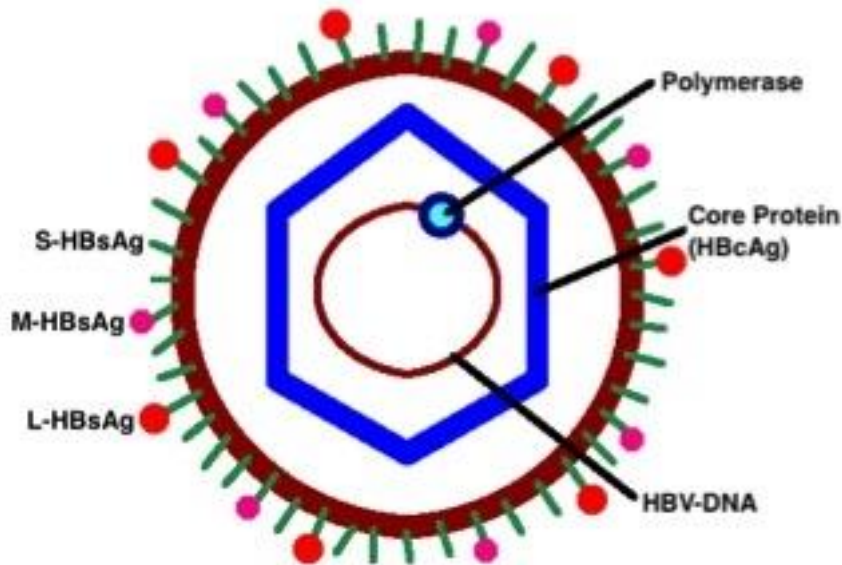
Hepadnaviridae mají velmi málo hostitelských druhů, které mohou infikovat (některé druhy primátů, hlodavců a ptáků), ve kterých primárně napadají hepatocyty (Wei and Tiollais, 1999). HBV způsobuje akutní i chronickou infekci. Chronická infekce může být provázena cirhózou a může končit hepatocelulárním karcinomem (HCC) (Zhang and Hu, 2015).

Genomová DNA HBV (cca 3,2 kbp) je relaxovaná, kruhová a částečně dvouvláknová, kde minus řetězec je kompletní a na jeho 5'konci je kovalentně navázána virová reverzní transkriptáza. Na 5'konci druhého nekompletního řetězce je připojený RNA oligomer, který je odvozený od 5'konce pre-genomové RNA (pgRNA) a slouží jako primer pro syntézu plus řetězce. Od ostatních virů se liší svojí replikační strategií, která využívá reverzní transkripci, aniž by docházelo k integraci retrotranskribované DNA do hostitelského genomu (Obrázek 1).



Obrázek 1: Organizace genomu HBV. Černý kruh uprostřed znázorňuje kompletní negativní řetězec a nekompletní pozitivní řetězec. Také obsahuje čtyři promotory řídicí expresi genů (polymerázu, S - obalový, X - pro gen X a kapsidový), které se překrývají, dále dvě oblasti enhancerů (Enh1, Enh2) a dvě přímé repetice (DR1, DR2). Čtyři ORF rámce jsou naznačeny barevnými šipkami, ten který je značen červeně, je přítomen ve všech čtyřech mRNA HBV. Během replikace viru je jeho genom převeden do kovalentně uzavřené cirkulární (ccc) DNA, která slouží jako templát pro transkripci. Černé tenké vnější šipky označují čtyři hlavní transkripty. Převzato z (Minor and Slagle, 2014).

Celý virion s nukleovou reverzní transkriptázou obaluje ikosahedrální kapsidové core a lipidové pouzdro, které obsahuje malé (S), střední (M) a velké (L) glykoproteiny povrchového antigenu HBV (HBsAg) nutné pro rozpoznání a vstup do hostitelských buněk (Obrázek 2) (shrnutí v Kao and Chen, 2006).



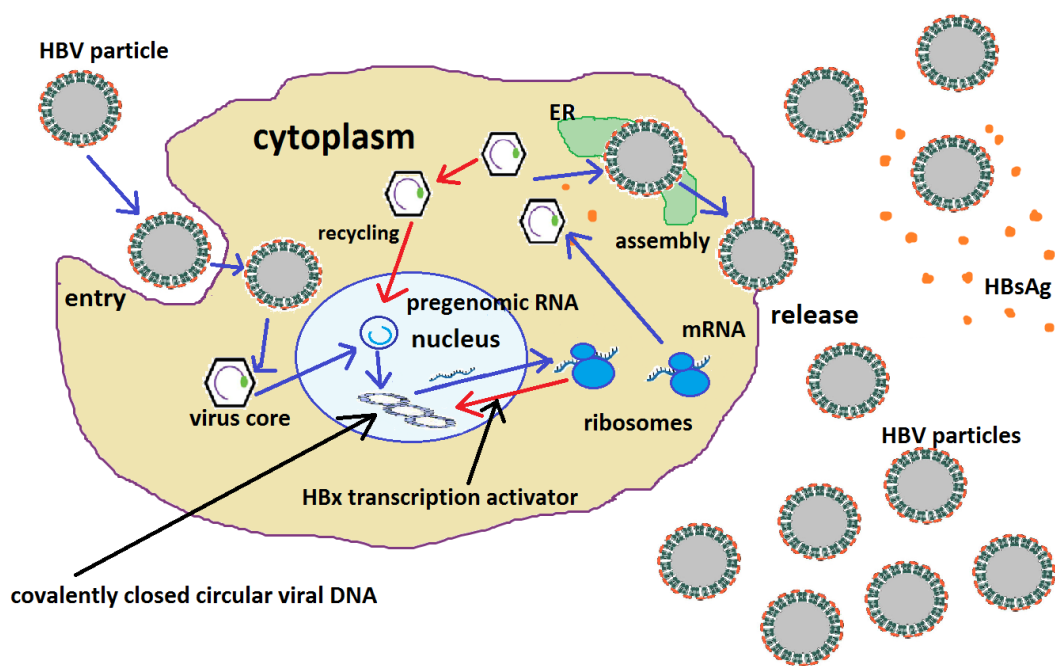
Obrázek 2: Struktura virové částice. Částečně dvouvláknová virová DNA s polymerázou je obalena kapsidovým proteinem (HBcAg), který tvoří ikosahedrální strukturu kapsidy. Ta je pak obalena hostitelskou membránou a virovými malými (S), středními (M) a velkými (L) HBsAg glykoproteiny, které vznikají na endoplasmatickém retikulu pomocí sub-genomové RNA, která slouží jako mRNA pro jejich syntézu (Lepore et al., 2015).

### 3 Replikační cyklus HBV

Infekce virem hepatitidy B může, ale nemusí být cytopatická a také může být kombinací obojího (Zhang and Hu, 2015). Samotné poškození jater je způsobeno především reakcí cytotoxických T-lymfocytů. Záleží na množství naakumulovaného virového produktu, který je často spojován s replikační aktivitou viru HBV v jednotlivých infikovaných hepatocytech pacienta. Účinnost replikace závisí na kombinaci faktorů virových a faktorů hostitelské buňky, které mohou znemožnit viru se v ní replikovat tím, že zamezí přístup k mechanismům potřebným k replikaci.

Virus rozpoznává cílové buňky interakcí virionu s heparansulfátovými proteoglykany, které jsou na povrchu hepatocytů (obrázek 3). Poté se přichytí k hepatocytu díky N-koncové pre-S1

doméně L-proteinu (což je velký povrchový glykoprotein HBsAg) a také díky antigenní smyčce (AGL-antigenic loop) S-proteinu (což je malý obalový glykoprotein HBsAg) (Sureau and Salisse, 2013). V dalším kroku se naváže na polypeptid kotransportující taurocholát sodný (NTCP), který se jakožto membránový protein vyskytuje pouze v hepatocelulární tkáni (Yan et al., 2012). Po vstupu do hepatocytu dochází v cytoplasmě k rozbalení lipidového pouzdra a transportu nukleokapsidy do jádra, kde je relaxovaná cirkulární DNA (rcDNA) převedena pomocí hostitelských reparačních enzymů na kovalentně uzavřenou cirkulární DNA (cccDNA). cccDNA je poté využívána jako templát pro syntézu všech RNA a replikaci, což zprostředkovává hostitelská DNA dependentní RNA polymeráza II (DdRp II). Transkripce se spouští díky čtyřem promotorům, jejichž oblasti se překrývají a jsou značeny jako P pro polymerázu, S – surface/obalové, X – pro X gen a C – core/kapsidové (Lau and Wright, 1993).



Obrázek 3: Replikační cyklus viru hepatitidy B. Po vstupu do buňky je do cytosolu uvolněna nukleokapsida, která je transportována do jádra. Poté je virová DNA převedena do kovalentně uzavřené kruhové DNA (cccDNA). cccDNA je poté používána jako templát pro transkripci virových RNA. Pre-genomová RNA (pgRNA) je společně s HBV polymerázou zabalena do nukleokapsidy. Ta je poté v endoplasmatickém retikulu obalena lipidickým pouzdrům a následně opouští buňku nebo se může vrátit do jádra, kde napomáhá k produkci další cccDNA (Benhenda et al., 2009).

Z těchto proteinů vzniká pre-genomová RNA (pgRNA), která je předlohou pro reverzní transkripci a sub-genomové mRNA, které jsou zapotřebí k translaci obalových proteinů a mRNA pro protein X. pgRNA je poté enkapsidována do nových nukleokapsid, které jsou tvořeny z HBcAg, kde je následně pomocí reverzní transkripce převedena do mínus vlákna DNA. Po dokončení retrotranskripce mínus vlákna pgRNA do 5'konce, je 17 až 18 bází 5'konce pgRNA, CAP a přímá repetice (DR1) degradováno pomocí RNázy H. Zbylá část pgRNA je využívána pro syntézu plus vlákna. Po cirkularizaci molekuly (plus vlákno dosáhne k 5'konci mínus vlákna) dochází k translokaci a následnému pokračování elongace plus vlákna (obrázek 3). Při opouštění buňky virem nedochází k jejímu poškození (shrnutí v Seeger and Mason, 2000).

#### **4 Přirozená imunita**

Přirozená imunita nebo také nespecifická neklonální vrozená imunita se vyskytuje u všech mnohobuněčných organismů a je evolučně starší, než imunita adaptivní (specifická). Je založena na fungování imunitních mechanismů v infikovaných buňkách a specializovaných buněk přítomných v organismu, které reagují na strukturní nebo funkční znaky patogenů nebo poškozené buňky, bez toho aniž by měli předchozí zkušenost s daným agens a aniž by docházelo k jejich klonální expanzi. Mechanismy přirozené imunity jsou tvořeny jednak mechanismy aktivními přímo v patogenem infikované buňce, nezávislými na účasti ostatních buněk, jednak mechanismy spojenými s aktivitou specializovaných imunitních buněk, jako jsou makrofágy, dendritické buňky nebo NK buňky. Mechanismy lze rozdělit na dvě složky, a to buněčnou a humorální. Mezi specializované buněčné složky patří fagocytující a endocytozující buňky a buňky cytotoxické (natural killers) a mezi humorální složky patří interferony, prozánětlivé cytokiny, chemokiny, komplementový systém, lektiny a jiné sérové proteiny, histaminy a lipidické zánětlivé mediátory. Odpověď nespecifické imunity na přítomnost patogenu nebo poškozené buňky je velmi rychlá, řádově v minutách.

Cizorodé agens je rozpoznáváno pomocí fylogeneticky konzervovaných struktur důležitých pro přežití mikroorganismů. Nazývají se molekulární znaky asociované s patogenem (Pathogen-Associated Molecular Patterns (PAMP)) a řadí se mezi ně lipoproteiny, flagelin, polysacharidy, nukleové kyseliny, glykolipidy a další (shrnutí v Turvey and Broid, 2010). PAMPy jsou vždy rozeznány nehledě na to, jestli jsou z mrtvého, či živého organismu nebo z organismu, který se právě replikuje či nereplikuje. Buňky mají specifické receptory pro

různé PAMPy. Tyto receptory jsou označovány jako PRR (Pathogen Recognition Receptor) a ty jsou druhově specifické, konstitutivně exprimovány a zajišťují specifickou reakci proti danému PAMP. PRR jsou různých typů: Toll-like receptory (TLR), receptory rozpoznávající lektiny typu C (CLR), receptory pro cytosolickou DNA, RIG-I-like receptory (RLR), ALRs – absent from melanoma 2 (AIM2)-like receptors nebo STING-mediated receptors a NOD-like receptory (NLR) (shrnutí v Iwasaki and Medzhitov, 2015).

## **4.1 PRRs**

Dlouhou dobu se předpokládalo, že imunitní systém virus hepatitidy B v brzké fázi infekce nedetekuje, protože se HBV dokáže receptorům zneviditelnit. Toto bylo vysvětleno způsobem virové replikace, při které se genom viru replikuje v uzavřených nukleokapsidách a díky tomu virová polyadenylovaná mRNA s čepičkou nezpůsobí aktivaci interferonu pomocí RIG-I (Wieland et al., 2004). Antigeny HBV jsou rozpoznány až po několika týdnech, kdy do jater vstupují CD8<sup>+</sup> T-lymfocyty, které tento antigen rozpoznají, zahájí cytotoxickou reakci proti infikovaným buňkám a spustí necytopatickou interferonovou odpověď (Thimme et al., 2003). Jak existence adaptivní cytotoxické reakce, tak interferonová odpověď indikují, že některé PRRs HBV aktivuje i v brzké fázi, infekce a to přímo v hepatocytech. Virové PAMPy interagují s PRR a tím aktivují produkci prozánětlivých cytokinů a interferonů (shrnutí v Kawai and Akira, 2006). V této kapitole uvádím interakce HBV s mechanismy přirozené imunity, u nichž dosud není specifikován virem HBV kódovaný protein za interakci zodpovědný.

### **4.1.1 Toll-like receptory**

Toll-like receptory (TLR) hrají klíčovou roli v přirozené imunitě, jsou evolučně velmi staré a rozeznávají řadu chemických struktur, které jsou charakteristické pro různé patogeny. TLR je několik (u člověka TLR1-10) a každý z nich rozpoznává různé PAMPs pomocí svých ektodomén (Isogawa et al., 2005). TLR3 je specifický pro rozpoznání dsRNA, TLR7 pro rozpoznání ssRNA a TLR9 rozpoznává CpG dinukleotidy v nemetylovaných virových DNA a dvouřetězcovou virovou DNA. TLR3, TLR7 a TLR9 spouštějí dráhu, která vede k produkci IFN-I a III (lambda (IFN- $\lambda$ )) (shrnutí v Kawai and Akira, 2006). Při nekrotickém nebo stresovém poškození tkáně jsou uvolňovány endogenní ligandy, které stimulují TLR, podobně jako PAMP. Některé TLR se nacházejí na povrchu buňky a jiné (TLR3, 7, 8, 9) v endosomech, kde jsou vhodné podmínky pro interakci s ligandy, které byly uvolněny

z pohlcených mikroorganismů. K aktivaci těchto receptorů dochází po expresi prozánětlivých cytokinů a některých kostimulačních a adhezivních receptorů na povrchu APC.

Schopnost kontrolovat replikaci HBV byla zkoumána pro TLR2, TLR3, TLR4, TLR5, TLR7 a TLR9. Do HBV transgenní myši byly nitrožilně vpraveny ligandy specifické pro tyto receptory. Ukázalo se, že všechny ligandy, až na ligandy TLR2 inhibovaly během 24 hodin necytopaticky replikaci HBV v játrech v závislosti na interferonu typu I (IFN-I, IFN- $\alpha/\beta$ ). Tato schopnost TLR ligandů by mohla být využita jako nová strategie v léčbě chronické infekce HBV (Isogawa et al., 2005).

#### **4.1.2 RIG-I-like receptory**

RIG-I-like receptory (RLRs) mají velký význam při rozeznávání virové RNA, a také při spouštění a upravování imunitní odpovědi na infekci. RLR jsou 3 druhy: MDA5, RIG-I a LGP2 (Loo and Gale, 2011). Všechny RLR obsahují N-terminální caspase-recruitment doménu (CARDs) a DExD/H-box helicase doménu (Sato et al., 2010). Tyto receptory rozeznávají ligandy virové RNA nebo samotnou RNA v cytoplasmě, aby mohly zaměřit přirozenou imunitu, zánět a spustit genovou expresi ke kontrole infekce. Velmi důležité je, že RIG-I-like receptory spolupracují s Toll-like receptory a ostatními signálními molekulami způsobem, který vede ke koordinované akci přirozené a adaptivní imunity. Regulace imunity RIG-I-like receptory má několik stupňů a sahá od autoregulace po ligandy a interakci společných faktorů a posttranslační modifikace (Loo and Gale, 2011). Jak bude uvedeno dále, RIG-I inhibuje interakci s polymerázou HBV replikaci HBV a jeho aktivita je naopak inhibována proteinem HBx.

#### **4.1.3 ALR receptory**

ALRs – absent from melanoma 2 (AIM2)-like receptory patří do skupiny HIN-200 proteinů, do kterých jsou zahrnuté také MNDA, IFI16 a IFIX, které se vyskytují u člověka. Tyto proteiny indukují interferon (ISG) s 200-aminokyselinou repeticí na C-konci, které se říká HIN doména. AIM2 byl nedávno v několika studiích identifikován jako cytosolický sensor, který se dokáže vázat pomocí C-koncové HIN domény na dsDNA (Hornung, Ablasser, Charrel-Dennis et al., 2009).

AIM2 rozpoznává v ledvinách cytoplasmatickou HBV DNA. Vazba mezi AIM2 a HBV DNA může vést k aktivaci kaspázy-1 a následné maturaci a sekreci IL-1 $\beta$ . Tyto procesy vedou ke

vzniku zánětů, které mohou být zodpovědné za poškození v ledvinách, jenž je vidět u pacientů s virem hepatitidy B asociovaným s glomerulonefritidou (HBV-GN) (Du, Zhen, Zheng, Ma and Chen, 2013). Ve studii Du, Zhen, Zheng, Ma a Chen (2013) bylo ukázáno, že exprese AIM2 je vysoká v pacientech s HBV-GN a také má důležitou funkci ve vývoji a pokroku zánětu. Skutečnost, že v *in vitro* studovaných buněčných systémech uniká HBV DNA nacházející se v nukleokapsidách nebo v jádře detekci AIM2, vyvolává pochybnosti, zdali AIM2 při HBV-GN interaguje s virovou DNA (jak předpokládá výše uvedená studie) nebo s hostitelskou DNA uvolňovanou z poškozených buněk. Špatné rozeznání cytoplasmatické DNA pomocí AIM2 přispívá ke vzniku dermatitid, artrózy, lupénky a dalších autoimunitních zánětlivých onemocnění (Man, Karki and Kanneganti, 2016).

#### **4.1.4 NOD-like receptory**

NOD-like receptory se nacházejí v cytoplasmě a jejich název je odvozen od strukturní domény, kterou obsahují (NOD - nucleotide-binding oligomerization domain). Tyto receptory se zřejmě nacházejí u všech mnohobuněčných organismů včetně rostlin. Jsou přítomny ve fagocytujících buňkách a také v epitelálních buňkách. NOD receptory hrají velkou roli při rozeznávání intracelulárních bakterií. Mezi nimi, NOD1 obsahuje NOD doménu, caspase-recruitment doménu (CARD) a C-terminální LRR doménu. Nedávné studie ukázaly, že přílišná exprese NOD1 umožní buňkám reagovat na produkci peptidoglykanu (PGN) (Girardin et al., 2003). NOD2 vykazuje podobné strukturní vlastnosti jako molekula NOD1, ale na rozdíl od NOD1 obsahuje dvě CARD domény v N-terminální oblasti (shrnutí v Takeda and Akira, 2005). Studium NLR v patogeneze hepatitidy B je stále v počátečních fázích (Chen et al., 2016).

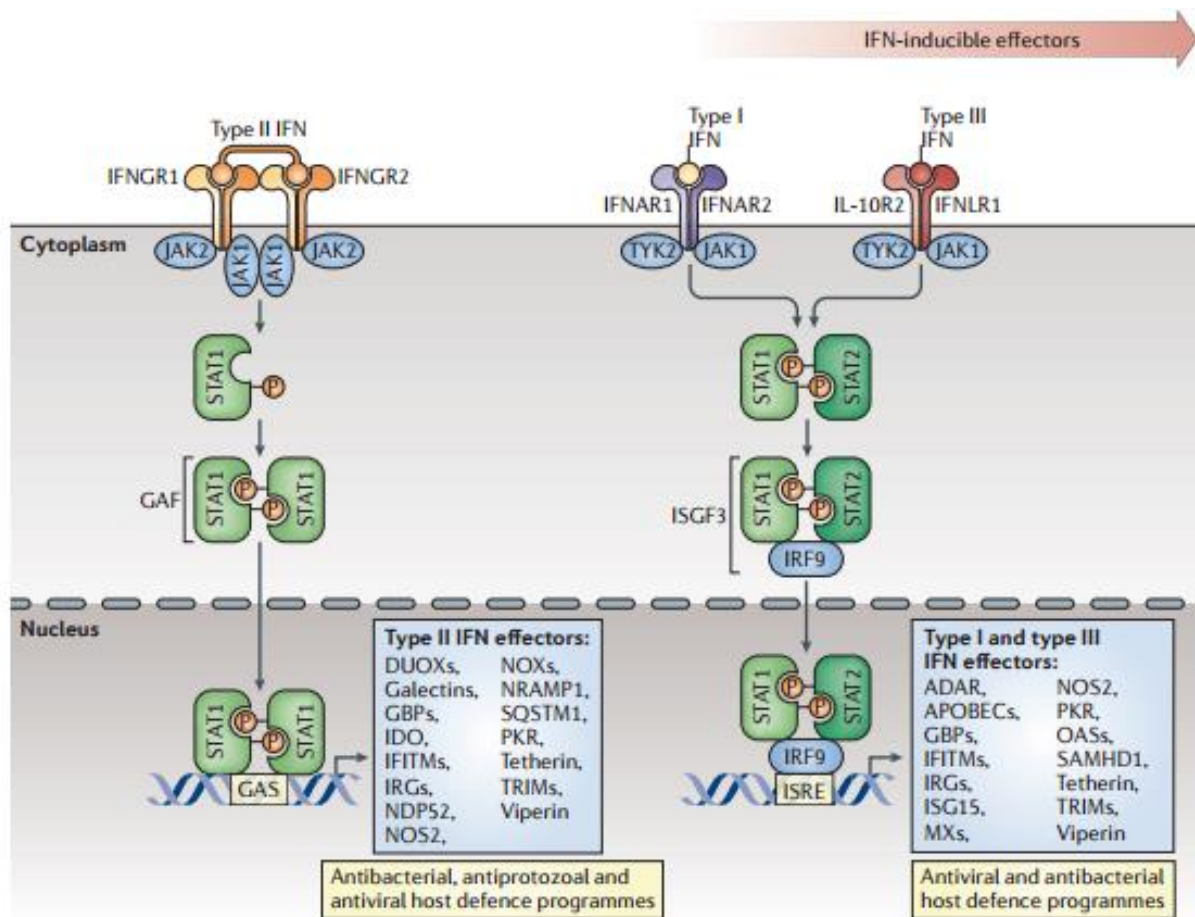
#### **4.2 Interferony**

Interferony jsou rozpustné proteiny, které jsou velmi účinné a významné pro obranu proti virovým infekcím. Řadí se mezi cytokiny a jsou velmi důležitou složkou přirozené imunity společně s dalšími proteiny, jako jsou TNF (tumor necrosis factor) a IL (interleuktiny) (Scragg, 1999; cit. dle Gun et al., 2014). Interferony aktivují imunitní systém a indukují produkci antivirových restrikčních faktorů, což vede k expresi interferonem stimulovaných genů (ISG) (shrnutí v Tomasello et al., 2014). Tři známé typy interferonů rozdělujeme podle receptorů: IFN typu I (IFN $\alpha/\beta$ ; IFN $\alpha$  je 13 druhů, IFN $\beta$  je pouze jeden a IFN $\epsilon$  je také jeden druh a ten se nachází pouze v ženských reprodukčních orgánech), IFN typu II (IFN- $\gamma$ ) a IFN

typu III (IFN- $\lambda$ , který má 4 druhy IFN- $\lambda$ ,) (Obrázek 4). Interferony samy o sobě nemají antivirový účinek, ale jsou hlavními regulátory antivirové odpovědi. U všech typů IFN existují odlišnosti, které je definují. IFN typu I mají silné antivirové schopnosti, stimulují aktivitu NK a dendritických buněk, inhibují virovou replikaci a zvyšují expresi MHC I molekul (shrnutí v Goodbourn, Didcock and Randall, 2000). IFN- $\alpha$ , společně s IFN- $\lambda$ , také potlačuje transkripci viru hepatitidy B tak, že pomocí HBV ISRE segmentem (interferon-sensitive response element) zprostředkuje nasednutí STAT1 a STAT2 na cccDNA (shrnutí v Pei, Chen and Lu, 2014). IFN typu II je produkován TH1 buňkami, NK buňkami nebo cytotoxickými T-lymfocyty a jeho produkce se spouští díky rozpoznání infikovaných nebo atypických buněk. IFN typu III je produkován leukocyty a epiteliálními buňkami (stejně jako IFN typu I) okamžitě po rozpoznání virové infekce a na rozdíl do IFN typu I obsahují introny (shrnutí v Goodbourn, Didcock and Randall, 2000). IFN-I a III mají mnoho znaků společných a jedním z nich je například schopnost spuštění stejné signální kaskády, která produkuje stejné efektorové geny, i když jsou aktivovány odlišnými receptory (shrnutí v Durbin et al., 2013, obrázek 4). Odlišnost těchto typů IFN je také v jejich produkci v závislosti na konkrétních buněčných typech a v umístění daných receptorů. Receptory pro interferon typu I (IFNAR1 a IFNAR2) jsou na povrchu všech jaderných buněk a jejich exprese není omezená na žádný konkrétní buněčný typ. Zatímco receptor pro interferonovou odpověď typu III (IFNLR) je na všech epiteliálních buňkách a jejich exprese je omezena na bílé krvinky, a to především na dendritické buňky typu 2, epiteliální buňky, T-lymfocyty a NK buňky. Oba tyto interferony (typu I a III) díky svému výskytu v trámčitém epitelu jater hrají důležitou roli v obraně proti viru hepatitidy B (shrnutí v Lin and Young, 2014 a v Durbin et al., 2013; MacMicking, 2012).

Efektory interferonové signalizace jsou interferonem stimulované geny (ISG, Obrázek 4). Většina virových restrikčních faktorů patří mezi ISG.





Obrázek 4: Interferony mají tři typy receptorů. Receptor pro IFN typu II je tetramer složený ze dvou IFN $\gamma$  receptorových dimerů (dvou řetězců IFNGR1 a dvou řetězců IFNGR2 (receptory pro interferon  $\gamma$ )). Receptor pro IFN typu I je heterodimer, který je složený z IFN $\alpha/\beta$  receptoru 1 (IFNAR1 a IFNAR2 (receptory pro interferon  $\alpha/\beta/\epsilon$ )). Receptor pro IFN typu III je komplex IL 10 receptoru 2 asociovaný s receptorem pro IFN $\lambda$  (IFNLR1-receptor pro interferon  $\lambda$ ). Převzato a upraveno z (MacMicking, 2012).

## 5 Proteiny viru HBV a jejich interakce s přirozenou imunitou

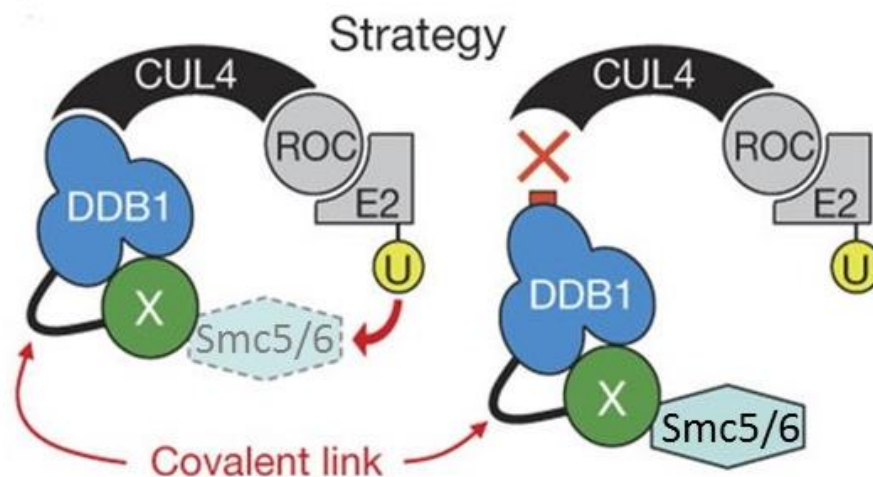
Jak bylo již dříve zmíněno, přirozená imunita zasahuje hned po infekci a omezuje tím šíření patogenu a podporuje vývoj odpovědi adaptivní imunity. Samotná antivirová odpověď během rané fáze infekce je charakteristická aktivací dendritických buněk, NK buněk a produkcí interferonu typu I (IFN $\alpha/\beta$ ) a III a prozánětlivých cytokinů. Při replikaci viru může být přímo spuštěna produkce IFN $\alpha/\beta$  a to díky buněčným mechanismům reprezentovaným signalizací PRR, které detekují přítomnost virové DNA nebo RNA (shrnutí v Bertoletti and Gehring,

2006). Díky rozpoznání stres indukujících molekul nebo modulací množství MHC I molekul na povrchu infikovaných buněk se aktivují NK buňky (Moretta et al., 2005).

Jádrem této práce je první bariéra, se kterou se nitrobuněčný parazit setkává. Ta se nachází až přímo v infikovaných buňkách. Sama buňka rozdělením svého buněčného prostoru vytváří mnoho bariér a překážek pro virus, které musí HBV překonat, aby se mohl replikovat v buněčném jádře. Toto je hlavní obranný mechanismus samotné buňky (Randow et al., 2013). Tento vnitřní obranný mechanismus má schopnost rozpoznat virové komponenty, vyvolat apoptozu infikované buňky, zablokovat replikaci a sestavení virové částice uvnitř buňky a její uvolnění ven. Stejně jako pro ostatní viry, hrají i v případě antivirové odpovědi proti HBV centrální úlohu PRR. Na konci signalizace PRR dochází k tvorbě restrikčních faktorů, vlastních efektorů imunitní odpovědi. Specifické restrikční faktory jsou zaměřené na specifické skupiny virů a vyskytují se v určitých buněčných typech (shrnuto v Yan and Chen, 2012). Restrikční faktory efektivně a přímo snižují infekčnost viru a díky jejich expresi jsou často pevně spojeny s odpovědí přirozené imunity (Ballana and Esté, 2015).

## **5.1 HBx**

Protein HBx je nestruturním proteinem viru hepatitidy B, který má velmi důležitou roli při replikaci viru v HepG2 buňkách (u savců) a jaterních onemocnění spojených s HBV. Mnoho aktivit se pojí k expresi HBx, nicméně molekulární mechanismy těchto aktivit nejsou známy (McClain, Clippinger, Lizzano and Bouchard, 2007). HBx je multifunkční protein, který aktivuje buněčné signální dráhy (Bouchard, Puro, Wang and Schneider, 2003). Je dlouhý 154 aminokyselin a projevuje se nepřímou či přímou interakcí s hostitelskými faktory, které modulují velké množství buněčných procesů. Protein X zasahuje do signální transdukce, transkripce, apoptózy, proteinové degradace, chromozomální stability a buněčného cyklu (Tang, Oishi, Kaneko and Murakami, 2006). Přesněji interaguje heterodimerní komplex proteinu X s cílovým buněčným proteinem HBXIP (HBx interacting protein) tak, že dereguluje formaci mitotického vřeténka a dynamiky centrosomu (Wen, Golubkov, Strongin, Jiang and Reed, 2008). Další interakce zahrnuje DDB1 (Damaged DNA Binding Protein1) a zde HBx přesměrovává ubiquitin ligásovou aktivitu CUL4-DDB1 E3 komplexu, která se vyskytuje při intracelulární regulaci replikace, transkripce, signální transdukce a oprav DNA (obrázek 5) (Li, Robert, Breugel, Strubin and Zheng, 2010).



Obrázek:5 Na obrázku je znázorněna strategie, kterou HBx může interagovat se svým substrátem, pouze pokud je substrátová ubiquitinace blokována a pokud je HBx navázán na DDB1. Kovalentní spojení mezi DDB1 a HBx nutí tyto dva proteiny interagovat a tím předejít interakci HBx s endogenní DDB1. Dále je na obrázku znázorněn E3ubiquitin ligázový komplex (CUL4,ROC,E2,U) a smc5/6. (převzato a upraveno z Decorsière et al., 2016).

Velmi důležitá je interakce HBx s komplexem Smc5/6 (Structural maintenance of chromosomes), což je restriční faktor, který potlačuje transkripci viru hepatitidy B a je příbuzný kohezinu a kondenzinu a také přispívá k opravám DNA (Lehmann, 2005). Smc5/6 však na rozdíl od ostatních restričních faktorů není ISG. Jeho antivirové schopnosti jsou potlačeny virovým proteinem HBx (Decorsière et al., 2016). Vliv interakce HBx se Smc5/6 a význam degradace Smc5/6 na patogenezi hepatitidy B byl dlouho neznám (Ju et al., 2013; Jacome et al., 2015). Nedávno však Decorsière et al., (2016) zjistili, že Smc5/6 v nepřítomnosti HBx má schopnost inhibovat expresi extrachromosomální DNA a znemožňuje tak transkripci HBV.

HBx zůstává funkčně aktivní v HBV DNA, která je během hepatocelulární karcinogeneze integrována do buněčné DNA. HBx protein podporuje buněčný cyklus, inaktivuje negativní růstové regulace, váže se a inhibuje expresi p53 tumor supresorového genu a ostatních tumor supresorových genů (Kew, 2011). Výsledky studie, kterou provedli Waris, Huh and Siddiqui (2001) ukázaly, že HBx interaguje s voltage anion kanálem mitochondrií známý jako VDAC3 in vitro i in vivo.

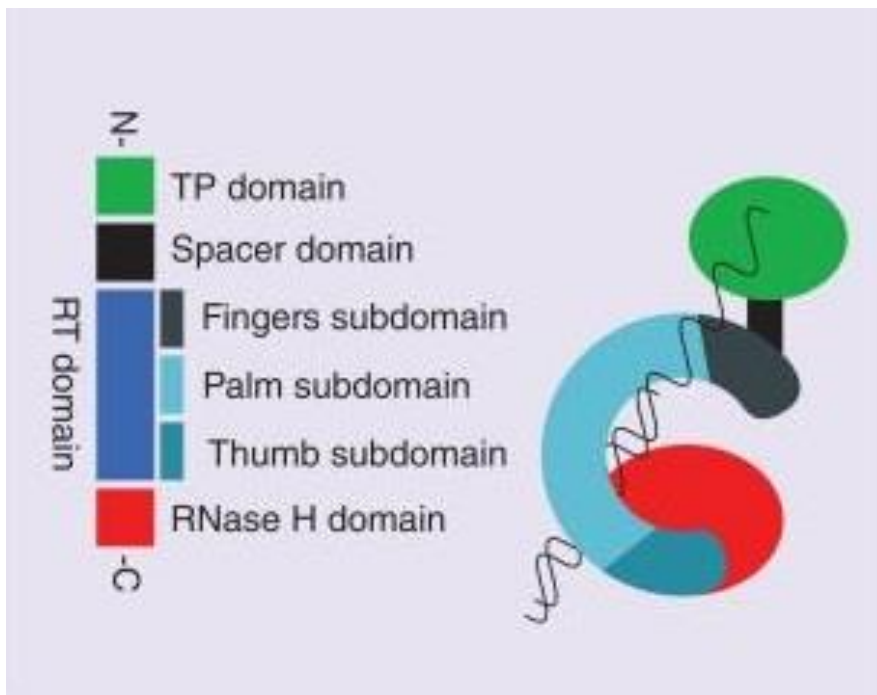
Další významnou funkcí HBx je jeho vazba na adaptorovou molekulu IPS-1, která přenáší signál z receptoru RIG-I na indukci IFN-I/III (Kumar et al., 2011; Han et al. 2011). HBx tímto mechanismem blokuje jednu ze signalizačních drah vedoucích k tvorbě IFN- $\beta$ .

Protein HBx ukázal zdokonalenou interakci s tetherinem v hepatocytech. Ve studii LV. et al. (2015) bylo pozorováno, že tetherin zabraňuje produkci HBV v intracelulárních MVB. Zároveň má ale HBV schopnost inaktivovat tetherin pomocí neobvyklého mechanismu, který vyžaduje specifické hepatocytické prostředí. Porozumění jak tetherin vyvolává restrikcii HBV může poskytnout nový směr pro léčbu HBV.

## **5.2 HBV RNA-dependentní-DNA-polymeráza**

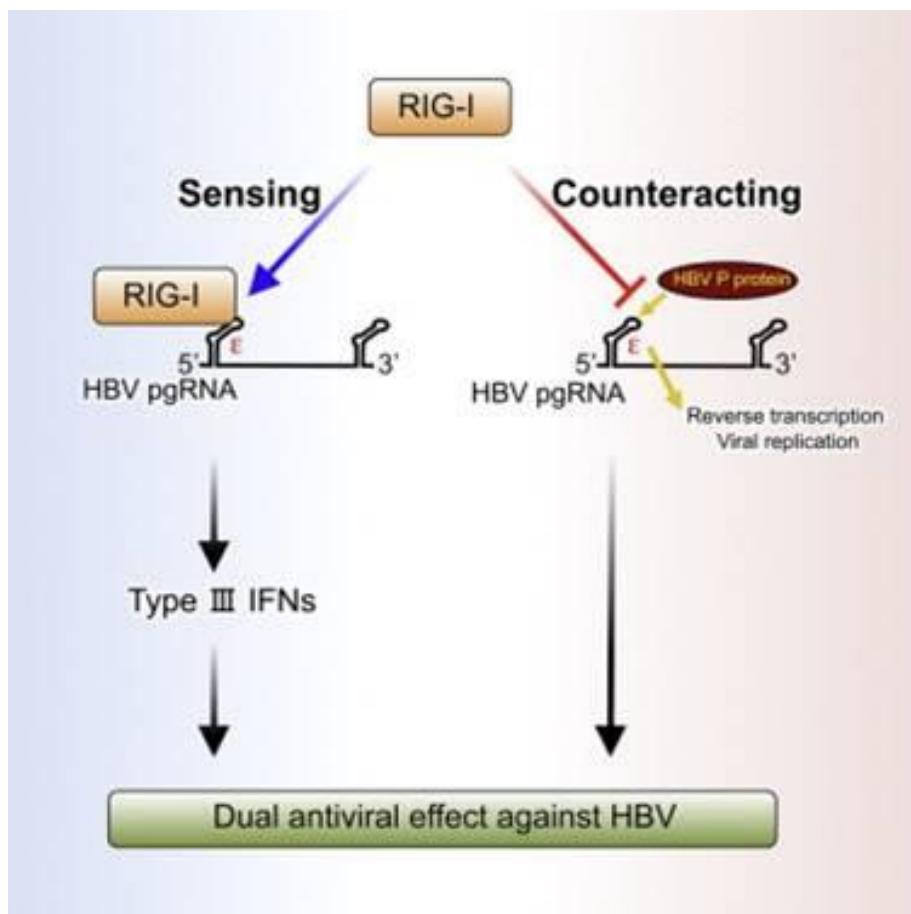
DNA polymeráza HBV (HBp nebo HBV Pol/RT) má několik důležitých motivů a domén, které definují její funkci a odhalují možnosti, na které je možné se zaměřit při léčbě HBV. Konkrétně jsou to 4 domény (Obrázek 6), a to terminální protein na amino konci (TP doména), RT doména, spacer doména a RNÁsová H doména na karboxylovém konci. Pro fungování polymerázy je nejdůležitější TP, RT a RNÁsová H doména. Léky proti HBV jsou inhibitory reverzní transkriptázy HBV, které byly vyvinuty jako analogy nukleos(t)idů (nucleos(t)ide reverse transcriptase inhibitors, NRTI). To jsou inhibitory polymerázy a reverzní transkripce DNA i RNA dependentní DNA polymerázové aktivity (Clark and Hu, 2015). NRTI může kvůli virovým mutacím ztrácet na efektivnosti. Virová polymeráza má velkou tendenci mutovat kvůli nedostatku schopnosti kontrolovat chyby při čtení kódu během replikačního cyklu. To zapříčiňuje velmi časté mutace s četností přibližně  $2 \times 10^5$  DNA bází (Nowak et al., 1996).

Tato polymeráza je jediný enzymaticky aktivní protein, který se účastní mnoha procesů během virové replikace. K vytvoření infekce se cccDNA udržuje v jádře infikované buňky. Na základě cccDNA je transkribována hostitelskými faktory jak pgRNA, tak ostatní virové mRNA (Hu and Anselmo, 2000). DNA genom viru hepatitidy B je replikován přes reversní transkripci pgRNA za použití DNA polymerázy (Jones, Boregowda, Spratt and Hu, 2012). Při replikaci se 5'oblast na pgRNA, která nese enkapsidační signál  $\epsilon$  podílí na signalizaci a následné indukci IFN  $\lambda$ . Zároveň tato 5'koncová oblast pgRNA váže HBV polymerázu, která zahajuje reverzní transkripci genomu HBV do konečné DNA podoby (Obrázek 7).



Obrázek 6: Na obrázku jsou znázorněny čtyři domény (TP doména, která je důležitá pro DNA syntézu, spacer doména, RT doména a RNase H doména, která je důležitá pro odstranění templátové RNA, včetně tří RT poddomén. Negativní řetězec DNA je připojen na TP a RNA nebo DNA prochází skrz RT doménu, která syntetizuje DNA. V této doméně dochází k nejvíce nukleotidovým interakcím. (převzato a upraveno z Clark and Hu, 2015).

Interakce RIG-I s  $\epsilon$ RNA zabrání interakci virové polymerázy s 5'koncovou oblastí pgRNA a tím zabrání proběhnutí reverzní transkripce pgRNA (Obrázek 7). Tato akce však není závislá na zprostředkované IFN  $\lambda$  odpovědi (Sato et al., 2015). Je třeba podotknout, že RIG-I, který je PRR, je v tomto případě restričním faktorem. K úniku před antivirovou odpovědí, využívá HBV jednak přímo virovou polymerázu k blokování TLR3 a RIG-I receptorů (Yu et al., 2010), jednak přerušení signalizace RIG-I vazbou HBx na adaptorovou molekulu IPS-1 (Kumar et al., 2011; Han et al. 2011).



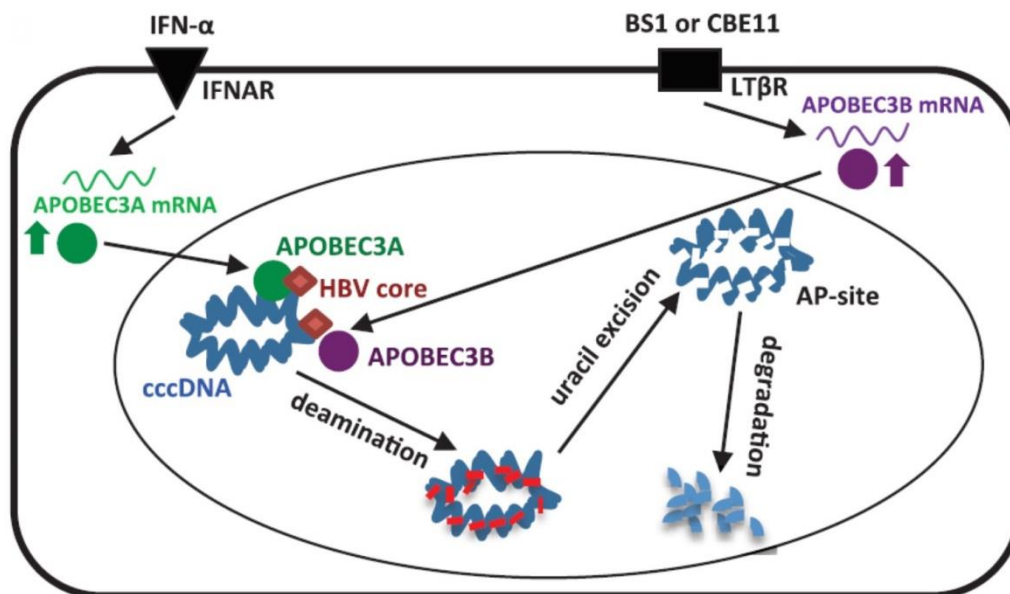
Obrázek 7: Toto je schéma, kde je znázorněno rozpoznávání 5'koncové části pgRNA v místě s enkapsidačním signálem ( $\epsilon$ ) RIG-I receptorem a tím spuštění interferonové odpovědi typu III. Obrázek také znázorňuje antivirovou aktivitu RIG-I receptoru, která při vazbě s  $\epsilon$ RNA brání nasednutí HBV polymerázy a tím zablokuje reverzní transkripci pgRNA.

HBV DNA polymeráza vykonává mnoho funkcí, které jsou vyžadovány při balení RNA, replikaci HBV, vazby virové RNA, výměny templátu, degradaci RNA a syntézy DNA. Ve výsledku musí virová polymeráza k dosažení funkce interagovat s hostitelskými proteiny (Clark and Hu, 2015). Nejdůležitější funkcí polymerázy je však schopnost rozeznat virový RNA signál nacházející se na pgRNA a označovaný jako  $\epsilon$  ( $H\epsilon$ ), který je vyžadován pro specifické balení pgRNA do virové nukleokapsidy a k iniciaci virové reversní transkripce (Jones, Boregowda, Spratt and Hu, 2012).

### 5.3 HBcAg

Kapsidový antigen (HBcAg) viru hepatitidy B je hlavním virovým faktorem pro vstup do buňky (Lin, Huang, Yang et al., 2010). Blokování HBcAg překáží ve vývoji antivirové imunitní odpovědi a tím posiluje odolnost HBV. Tento kapsidový protein HBV se sestavuje do ikosahedrální kapsidy a během procesu balení je HBV pgRNA společně s virovou polymerázou začleněná do virové částice, kde utvoří nukleokapsidu. Enkapsidovaná pgRNA je reversně transkribována do DNA virovou polymerázou a až poté dokončí syntézu virové DNA. Kapsidový protein slouží nejen jako hlavní strukturální protein HBV, ale také se účastní virové replikace (Lin, Wu, Chen and Chen, 2012).

HBcAg interaguje s restričním faktorem APOBEC (apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide), který vykazuje schopnost modifikovat nukleovou kyselinu a tím dávat za vznik novým nenáhodným mutacím (Burns et al., 2013). Rodina APOBEC patří mezi ISG. Při infekci HBV se nevytváří, ale je indukována při interferonové terapii chronicky infikovaných jedinců. Enzym APOBEC je v lidském genomu kódován 11 geny (AID, APOBEC1 (A1), APOBEC2 (A2), APOBEC3A (A3A), APOBEC3B (A3B), APOBEC3C (A3C), APOBEC3D (A3D), APOBEC3F (A3F), APOBEC3G (A3G), APOBEC3H (A3H), APOBEC4 (A4)) (shrnuto v Holmes, Malim and Bishop, 2007). Sheehy et al. (2002) objevili, že APOBEC3G je zodpovědný za deaminaci cytidinu v DNA viru HIV-1, který vzniká při reverzní transkripci viru, což je významný objev pro studium antivirových účinků APOBEC. Omezený vliv A3G na editaci genomu viru hepatitidy a na inhibici reverzní transkripce popsali poprvé Jost et al. (2012). Inhibiční účinek A3G na replikaci HBV se projevuje zvýšením citlivosti pgRNA k nukleázám. Citlivost pgRNA k A3G je pravděpodobně způsobena špatnou enkapsidací pgRNA do nukleokapsidy. Toto se děje při interakci A3G s kapsidovým proteinem (Rösler et al., 2005). IFN $\alpha$  a IFN $\gamma$  mají vliv na zvýšení produkce APOBEC3 při infekci HBV, protože při léčbě infekce interferony dochází k nárůstu mRNA pro A3B, A3C, A3G a A3F (Bonvin et al., 2006). Hypotéza, podle které na inhibici replikace HBV nemá deaminázová aktivita velký vliv nebyla zcela vyvrácena. Toto podporují výsledky studie Noguchi et al. (2007), které dokazují, že A3G je schopný inhibovat replikaci HBV i když byl zbavený své deaminázové aktivity. Ve studii, kterou provedli Nguyen et al., (2007) byly získány podobné výsledky, které se týkaly inhibice replikace HBV a vlivu A3G na ni. V této studii autoři poukázali na to, že nezávisle na deaminázové aktivitě A3G dokáže inhibovat replikaci HBV už v brzkých fázích reverzní transkripce.



Obrázek 8: Schéma interakce A3A, HBc a cccDNA. Na obrázku je znázorněna signalizace LTβR a IFN-α, která vede k degradaci HBV cccDNA. A3A a A3B přímo interagují s HBc v infikovaných hepatocytech a poté jsou translokovány do jádra, kde interagují s cccDNA. A3A a A3B poté vyvolají cytidinovou deaminaci, což má za následek degradaci DNA. Převzato z (Lucifora et al., 2014).

Jiní zástupci skupiny A3G mají naopak velmi velký význam pro inhibici replikace HBV, a to konkrétně A3A, A3B a A3H (Henry et al., 2009) (Obrázek 8). A3A a A3B se mohou nacházet uvnitř jader buněk a díky tomu přímo interagovat s virovou cccDNA. A3A interaguje se střední částí kapsidového proteinu HBV a má schopnost se vázat k cccDNA minichromosomu. Stejně jako A3A, tak i A3B po vysokých dávkách IFNα vykazují nárůst exprese. Oba tyto enzymy interagují s kapsidovým proteinem HBV, poté interagují s virovým minichromosomem, který se nachází v jádře, a pak v cccDNA dochází k deaminaci cytosinu na uracil a mutovaná místa jsou následně vyštěpena DNA glykosilázami. To zapříčiní vznik apyrimidinových a apurinových (AP) míst. Specifická a necytopatická likvidace cccDNA v infikovaných buňkách je poté zajištěna tak, že chyby nejsou opraveny ale místo toho tam jsou AP-endonukleázy, které rozpoznají vyštěpená místa a cccDNA úplně rozštěpí (Lucifora et al., 2014) (Obrázek 8). Degradace cccDNA HBV je přitom považována za jedinou cestu, jak hepatitidu B nejen úspěšně léčit, ale též vyléčit.



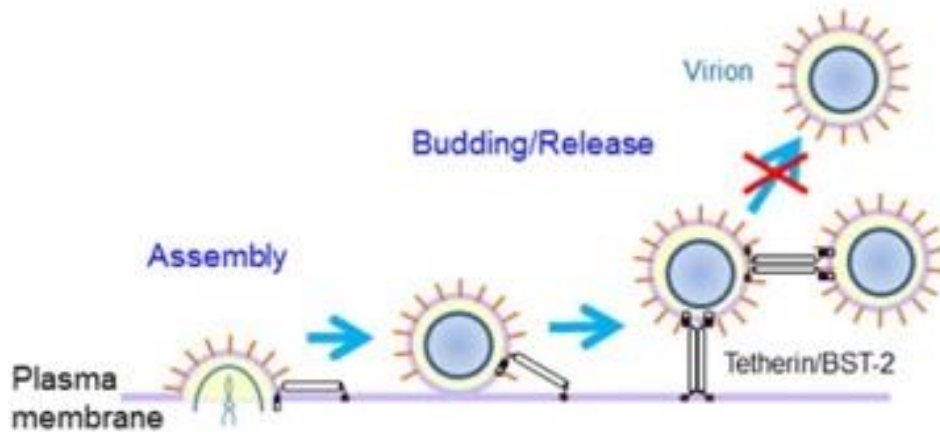
Byla provedena studie na interakci HBcAg s PRMT5 (protein arginine methyltransferase 5) Zhang et al. (2017), kde zjistili, že PRMT5 efektivně zabraňuje transkripci a replikaci HBV. PRMT5 zasahuje do symetrické dimethylace argininu 3 na histonu 4 na cccDNA minichromosomu, která vyžaduje interakci s HBcAg. A také inhibuje HBcAg DNA částice, které se produkují nezávisle na methyltransferázové aktivitě PRMT5.

## 5.4 HBsAg

Povrchový antigen viru hepatitidy B (HBsAg) byl první objevený protein u tohoto viru (Blumberg, Alter and Visnich, 1965; cit. dle Jaroszewicz et al. 2010). Detekování tohoto proteinu je zásadní pro diagnostikování infekce HBV (Nguyen et al., 2008). HBsAg je subvirovou formou obalového proteinu viru hepatitidy B a obsahuje mnoho modifikací z o-glykosylací a hostitelských hepatocytů (Patient et al., 2007, Vanlandschoot et al., 2002). Skládá se z malého (S), středního (M) a velkého (L) proteinu. Všechny tyto proteiny jsou kódovány stejným ORF, ale translace je iniciována ze tří různých start kodonů (shrnutí v Seeger and Mason, 2000).

HBs interaguje s tetherinem, který se řadí mezi ISG a který je také znám pod názvy CD317, BST2 a HM1.24. Tetherin je malý transmembránový protein, který fyzicky uváže obaly virů na jejich pučící straně a tím zabraňuje uvolnění virionu z infikované buňky (shrnutí v Neil, 2013) (Obrázek 9). Tento protein byl známý poměrně dlouhou dobu, avšak jeho antivirová aktivita byla objevena až v roce 2008 (Neil et al., 2008). Antivirové spektrum tetherinu je velmi široké. Zahrnuje například retroviry a množství obalených virů jako je Ebola, SIV, Marburg (Jouvenet et al., 2009), virus hepatitidy C (HCV) (Amet et al., 2014.) a virus chřipky (Yondola et al., 2011).

Tetherin se skládá ze čtyř strukturních domén a to z N-koncové transmembránové  $\alpha$ -helikální kotvy, transmembránové domény (TM), coiled-coil domény (struktura se dvěma  $\alpha$ -helixy), C-koncové části s GPI (glykosilfosfatidilinositolovou) kotvou. Tetherin existuje ve formě dimerů na buněčném povrchu, kde se pomocí uspořádání intermolekulárních disulfidických vazeb váže mezi buněčné ektodomény a TM doména s GPI kotvou jsou zodpovědné za vazbu viru k buněčné membráně (shrnutí v Swiecki, Omattage and Brett, 2013). Zkoumání buněk infikovaných virem HIV-1 ukázalo, že kromě schopnosti přímo blokovat uvolňování viru z buňky má tetherin rovněž schopnost působit jako senzor virové infekce (Galão et al., 2012).



Obrázek 9: Schéma antivirového mechanismu tetherinu. Tetherin zabraňuje uvolnění viru z buňky tak, že naváže jeden konec molekuly na membránu buňky a druhý konec k virovému obalu. Nové vypučené viry mohou být také pomocí tetherinu připevněny jeden k druhému. Převzato a upraveno z (Yasuda, 2012).

Nedávné studie ukázaly, že tetherin může také zabraňovat uvolnění pučící HBV částice z buňky. Navíc mechanismus, který je využit při restrikci uvolnění HBV z buňky tetherinem je podobný jako u zabránění uvolnění HIV až na ten rozdíl, že HBV získává svůj obal již v MVB (multivesikulární tělíska) a ne na buněčné membráně. Při výzkumu, inhibice pučení nových virionů tetherinem již v MVB váčcích byla použita linie buněk HepAD38 permissivních pro replikaci HBV. Ve shodě s poznatkem, že tetherin je jedním z ISG vedla transdukce kteréhokoliv z  $IFN\alpha$ ,  $IFN\gamma$ ,  $IFN\lambda$  ke zvýšení produkce tetherinu. V těchto buňkách, ve kterých probíhala replikace HBV zároveň s produkcí tetherinu nedošlo ke změně úrovně replikace DNA, ani produkce subgenomových partikulí nebo formování nukleokapsid. Rozdíl od kontrol spočíval ve výrazném snížení množství vyprodukovaných virionů (Yan et al., 2015). HBV vyvinul dvě různé strategie, jak odporovat antivirové akci tetherinu. Jednou je již zmíněná inaktivace tetherinu pomocí HBx vyžadující specifické hepatocytické prostředí (shrnutí v Han, Yu and Zhang, 2016). Dalším mechanismem objeveným Miyakawa et al., (2015) je inhibiční účinek vazby SHBs a LHBs (malý a velký HBs protein) na aktivitu tetherinu.

## 6 Závěr

Ve své bakalářské práci jsem shrnula, jak interagují proteiny viru hepatitidy B s různými mechanismy přirozené imunity. Vybrala jsem čtyři proteiny viru, u kterých jsem tyto mechanismy popsala: HBx, který interaguje s Smc5/6 komplexem, s adaptorovou molekulou IPS-1 a s tetherinem; virová DNA polymeráza, která interaguje s RIG-I receptorem, HBc který interaguje s APOBEC3A/B a s transmetylázou PRMT5 a HBs, který interaguje s tetherinem. Každá z těchto interakcí má jiné antivirové účinky a probíhá v různých fázích replikačního cyklu. Tyto výsledky mění původní náhled na HBV jako na pro imunitní systém „neviditelný“ virus. Ukazují, že mechanismy přirozené imunity jsou schopné HBV detekovat, ale HBV vyvinul své vlastní často sofistikované mechanismy jak imunitní odpověď překonat. Studium těchto interakcí umožňuje získávat cenné poznatky, které identifikují nové farmakologické terče pro výzkum a vývoj léčby hepatitidy B.

V interakci s restričními faktory hraje mimořádnou roli pleiotropně působící protein HBx inhibující tři molekulárně velmi odlišné restriční mechanismy: 1) Smc5/6 komplex inhibující expresi extrachromozomální DNA, 2) signalizaci RIG-I vedoucí k tvorbě IFN-I/III interakcí s jeho adaptorovou molekulou IPS-1, a 3) aktivitu tetherinu zabraňující uvolňování virových partikulí z buňky.

Virová DNA polymeráza je vázána na 5'konec oblasti pgRNA a pomáhá zahajovat reverzní transkripci genomu viru do konečné DNA podoby. Samotná pgRNA která nese na 5'konci enkapsidační signál  $\epsilon$  se při replikaci podílí na signalizaci a následné indukci IFN  $\lambda$ . Při interakci RIG-I receptoru s  $\epsilon$ RNA je však zabráněno virové polymeráze interagovat s 5'koncovou částí pgRNA a tím je zabráněno proběhnutí reverzní transkripce. Tato akce však není závislá na zprostředkované IFN  $\lambda$  odpovědi.

Protein HBc interagující podobně jako HBx s několika restričními mechanismy je dalším významným terčem farmakologického výzkumu. HBc interaguje se skupinou APOBEC, který je zodpovědný za deaminaci cytidinu ve virové DNA, který vzniká při reversní transkripci. Při stimulaci buněk interferony  $\alpha$  a  $\gamma$  dochází k zvýšené expresi A3B, A3C, A3G a A3F. Konceptně nejvýznamnější je interakce HBc s APOBEC3-A/B, které se oproti APOBEC-3G exprimují v buněčném jádře. Interakce APOBEC-3A/B s HBc je jediným známým restričním mechanismem vedoucím k destrukci HBV cccDNA. Právě degradace cccDNA HBV je považována za ústřední cíl vyléčení se z infekce HBV. Dalším buněčným partnerem

HBc je transmetyláza PRMT5 inhibující replikaci HBV na úrovni epigenetických mechanismů.

Interakce HBs s tetherinem sice nijak neovlivňuje replikaci viru, ale dokáže zabránit rozšiřování nově vzniklých virionů do ještě neinfikovaných buněk. A dokáže vázat jak nově vzniklé viriony na povrch buňky, tak viriony k sobě.

## 7 Použitá literatura

**Amet T, Byrd D, Hu N, Sun Q, Li F, Zhao Y, Hu S, Grantham A, Yu Q. (2014).** BST-2 expression in human hepatocytes is inducible by all three types of interferons and restricts production of hepatitis C virus. *Curr Mol Med*, 14: 349–360.

**Ballana E. and Esté J. A. (2015).** SAMHD1: At the Crossroads of Cell Proliferation, Immune Responses, and Virus Restriction. *Trends Microbiol.*, 23: 680–692.

**Benhenda S., Cougot D., Buendia M. Annick and Neuveut CH. (2009).** Hepatitis B virus X protein molecular functions and its role in virus life cycle and pathogenesis. *Advances in cancer research*, 103: 75-109.

**Bertoletti A. and A. J. Gehring (2006).** The immune response during hepatitis B virus infection. *J. Gen. Virol.*, 87: 1439–1449.

**Blumberg B. S., Alter H. J., Visnich S. (1965).** A “New” antigen in leukemia sera. *JAMA*, 191:541–546.

**Bonvin M., Achermann F., Greeve I., Stroka D., Keogh A., Inderbitzin D., Candinas D., Sommer P., Wain-Hobson S., Vartanian J.-P., et al. (2006).** Interferon-inducible expression of APOBEC3 editing enzymes in human hepatocytes and inhibition of hepatitis B virus replication. *Hepatology*, 43, 1364–1374.

**Bouchard M. J., Puro R. J., Wang, L. and Schneider R. J. (2003).** Activation and Inhibition of Cellular Calcium and Tyrosine Kinase Signaling Pathways Identify Targets of the HBx Protein Involved in Hepatitis B Virus Replication. *Journal of Virology*, 77(14): 7713–7719.

**Bouchard M., L.-H. Wang and R. Schneider. (2001).** Calcium signaling by HBx protein in hepatitis B virus DNA replication. *Science*, 294:2376-2378.

**Burns M. B., Lackey L., Carpenter, M. A., Rathore A., Land, A.M., Leonard, B., Refsland E. W., Kotandeniya D., Tretyakova N., Nikas J. B., et al. (2013).** APOBEC3B is an enzymatic source of mutation in breast cancer. *Nature*, 494, 366–370.

**Clark D. N. and Hu J. (2015).** Unveiling the roles of HBV polymerase for new antiviral strategies. *Future virology*, 10(3): 283-295.

**Decorsière A., Mueller H., van Breugel P. C., Abdul F., Gerossier L., Beran R. K., Livingston C. M., Niu C., Fletcher S. P., Hantz O., Strubin M. (2016).** Hepatitis B virus X protein identifies the Smc5/6 complex as a host restriction factor, *Nature*, 531(7594):386-359.

**Du W., Zhen J., Zheng Z., Ma S., Chen S. (2013).** Expression of AIM2 is high and correlated with inflammation in hepatitis B virus associated glomerulonephritis. *Journal of Inflammation*, 10: 37.

**Durbin R. K., Kotenko S. V. and Durbin J. E. (2013).** Interferon induction and function at the mucosal surface. *Immunology*, 255: 25–39.

**Galão R. P., Le Tortorec A., Pickering S., Kueck T. and Neil S. J. D. (2012).** Innate sensing of HIV-1 assembly by Tetherin induces NFκB-dependent proinflammatory responses. *Cell Host Microbe* 12, 633–644.

**Girardin S. E. et al. (2003).** Nod1 detects a unique muropeptide from Gram-negative bacterial peptidoglycan. *Science*, 300:1584.

**Goodbour S., Didcock L., Randall R. E. (2000).** Interferons: Cell Signalling, Immuno Modulation, Antiviral Responses and Virus Countermeasures. *Journal of general virology*, 81:2341-2364.

**Gun S. Y., Claser C., Tan K. S. W., Rénia L. (2014).** Interferons and Interferon Regulatory Factors in Malaria. *Mediators of Inflammation*, 2014:243713.

**Han Q., Zhang C., Zhang J., Tian Z. (2011).** Reversal of hepatitis B virus-induced immune tolerance by an immunostimulatory 3p-HBx-siRNAs in a retinoic acid inducible gene I-dependent manner. *Hepatology*, 54(4):1179-89.

**Han Z., Yu X., Zhang W. (2016).** Inhibition of HBV Release by BST-2, *Bing Du Xue Bao*. 32(2): 215-21.

**Henry M., Guétard D., Suspène R., Rusniok C., Wain-Hobson S. and Vartanian J.-P. (2009).** Genetic Editing of HBV DNA by Monodomain Human APOBEC3 Cytidine Deaminases and the Recombinant Nature of APOBEC3G. *PLOS ONE*, 4, e4277.

**Holmes R. K., Malim M. H., Bishop K. N. (2007).** APOBEC-mediated viral restriction: not simply editing?, *Trends in Biochemical Sciences*, 32(3): 118-28.

**Hornung V., Ablasser A., Charrel-Dennis M. et al., (2009)** AIM2 recognizes cytosolic dsDNA and forms a caspase-1-activating inflammasome with ASC., *Nature*. 458(7237): 514–518.

**Hu J. and Anselmo D. (2000).** In vitro reconstitution of a functional duck hepatitis B virus reverse transcriptase: posttranslational activation by Hsp90. *J. Virol.* 74(24):11447–11455.

**Chen J. X., Shen H. H., Niu M., Guo Y. M., Liu X. Q., Han Y. Z., Zhang Y. M., Zhao Y. L., Bai B. K., Zhou W. J., Xiao X. H. (2016).** Anti-hepatitis B virus effect of matrine-type alkaloid and involvement of p38 mitogen-activated protein kinase and tumor necrosis factor receptor-associated factor 6. *Virus Res*, 215:104-113.

**Choo, Q. L., Kuo, G., Weiner, A. J., Overby, L. R., Bradley, D. W., and Houghton, M. (1989).** Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, 244, 359–362.

**Isogawa M., Robek M. D., Furuichi Y., Chisari F. V. (2005).** Toll-like receptor signaling inhibits hepatitis B virus replication in vivo. *J Virol*, 79: 7269-7272.

**Iwasaki A. and Medzhitov R. (2015).** Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat. Immunol*, 16: 343–353.

**Jacome A., Gutierrez-Martinez P., Schiavoni F., Tenaglia E., Martinez P., Rodriguez-Acebes S. et al. (2015).** NSMCE2 suppresses cancer and aging in mice independently of its SUMO ligase activity, *EMBO J*, 34: 2604–2619.

**Jaroszewicz J. et al. (2010).** Hepatitis B surface antigen (HBsAg) levels in the natural history of hepatitis B virus (HBV)-infection: A European perspective, *Journal of Hepatology*, 52: 514–52.

**Jones S. A., Boregowda R., Spratt T. E., Hu J. (2012).** In Vitro Epsilon RNA-Dependent Protein Priming Activity of Human Hepatitis B Virus Polymerase. *Journal of Virology*, 86(9):5134-5150.

**Jost S., Turelli P., Mangeat B., Protzer U., Trono D. (2007).** Induction of antiviral cytidine deaminases does not explain the inhibition of hepatitis B virus replication by interferons. *J Virol*. 81(19):10588-96.

**Jouvenet N., Neil S. J., Zhadina M., Zang T., Kratovac Z., Lee Y., McNatt M., Hatzioannou T., Bieniasz P. D. (2009).** Broad-spectrum inhibition of retroviral and filoviral particle release by tetherin. *J Virol*, 83:1837–1844.

**Ju L., Wing J., Taylor E., Brandt R., Slijepcevic P., Horsch M. et al. (2013).** SMC6 is an essential gene in mice, but a hypomorphic mutant in the ATPase domain has a mild phenotype with a range of subtle abnormalities. *DNA Repair (Amst)*, 12: 356–366.

**Kao J.-H. and Chen D.-S. (2006).** HBV genotypes: Epidemiology and implications regarding natural history. *Curr. Hepat. Rep*, 5: 5–13.

**Kawai T. and Akira S. (2006).** Innate immune recognition of viral infection. *Nat. Immunol*, 7: 131–137.

**Kew M. C. (2011).** Hepatitis B virus x protein in the pathogenesis of hepatitis B virus-induced hepatocellular carcinoma., *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 26: 144–152.

**Kumar M., Jung S. Y., Hodgson A. J., Madden C. R., Qin J., Slagle B. L. (2011).** Hepatitis B virus regulatory HBx protein binds to adaptor protein IPS-1 and inhibits the activation of beta interferon. *J Virol*. 85(2):987-95.

**Lau J. Y. and Wright T. L. (1993).** Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet Lond. Engl.*, 342:1335–1340.

**Lehmann A. R. (2005).** The role of SMC proteins in the responses to DNA damage. *DNA Repair (Amst.)* 4:309–314.



**Lepore M., Harr F. Njai, Deborah A. Garside, Yusuke Shimakawa, Mary M. E. Crossey, Ramou Njie and Maud Lemoine (2015).** Hepatitis B: The view from West Africa, *South Sudan Medical Journal*, 8: 33-35.

**Li T., Robert E. I., van Breugel P. C., Strubin M., Zheng N. (2010).** A promiscuous alpha-helical motif anchors viral hijackers and substrate receptors to the CUL4-DDB1 ubiquitin ligase machinery. *Nat Struct Mol Biol.* 17:105–111.

**Lin F. and Young H. A. (2014).** Interferons: Success in anti-viral immunotherapy. *Cytokine Growth Factor*, 25, 369–376.

**Lin Y-J, Huang L-R, Yang H-C et al. (2010).** Hepatitis B virus core antigen determines viral persistence in a C57BL/6 mouse model, *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(20): 9340-9345.

**Lin Y-J, Wu H-L, Chen D-S, Chen P-J. (2012).** Hepatitis B Virus Nucleocapsid but Not Free Core Antigen Controls Viral Clearance in Mice. *Journal of Virology*, 86(17): 9266-9273.

**Loo Y.-M. and Gale M. (2011).** Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity*, 34(5), 680–692.

**Lucifora J., Xia Y., Reisinger F., Zhang K., Stadler D., Cheng X., Sprinzl M. F., Koppensteiner H., Makowska Z., Volz T. et al. (2014).** Specific and Nonhepatotoxic Degradation of Nuclear Hepatitis B Virus cccDNA. *Science*, 343, 1221–1228.

**Lv M., Zhang B., Shi Y. et al. (2015).** Identification of BST-2/tetherin-induced hepatitis B virus restriction and hepatocyte-specific BST-2 inactivation. *Scientific Reports*. 5:11736.

**MacMicking J. D. (2012).** Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat. Rev. Immunol.*, 12: 367–382.

**Man S. M., Karki R., Kanneganti T-D. (2016).** AIM2 inflammasome in infection, cancer and autoimmunity: role in DNA sensing, inflammation and innate immunity, *European journal of immunology*. 46(2): 269-280.

- McClain S. L., Clippinger A. J., Lizzano R. and Bouchard M. J. (2007).** Hepatitis B Virus Replication Is Associated with an HBx-Dependent Mitochondrion-Regulated Increase in Cytosolic Calcium Levels . *Journal of Virology*, 81(21): 12061–12065.
- Minor M. and Slagle B. (2014).** Hepatitis B Virus HBx Protein Interactions with the Ubiquitin Proteasome System. *Viruses*, 6: 4683-4702.
- Miyakawa K., Matsunaga S., Watashi K., Sugiyama M., Kimura H., Yamamoto N., Mizokami M., Wakita T. and Ryo A. (2015).** Molecular dissection of HBV evasion from restriction factor tetherin: A new perspective for antiviral cell therapy. *Oncotarget*, 6, 21840–21852.
- Moretta L., Bottino C., Pende D., Vitale M., Mingari M. C. and Moretta A. (2005).** Human natural killer cells: molecular mechanisms controlling NK cell activation and tumor cell lysis. *Immunol Lett*, 100: 7–13.
- Neil S. J. (2013).** The antiviral activities of tetherin. *Curr Top Microbiol Immunol*, 371:67–104.
- Neil S. J., Zang T., Bieniasz P. D. (2008).** Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1,Vpu. *Nature*, 451:425–430.
- Nguyen D. H., Gummuluru S. and Hu J. (2007).** Deamination-Independent Inhibition of Hepatitis B Virus Reverse Transcription by APOBEC3G. *J. Virol.* 81, 4465–4472.
- Nguyen D. H., Ludgate L., Hu J. (2008).** Hepatitis B virus–cell interactions and pathogenesis. *J Cell Physiol*, 216:289–294.
- Noguchi C., Hiraga N., Mori N., Tsuge M., Imamura M., Takahashi S., Fujimoto Y., Ochi H., Abe H., Maekawa T. et al. (2007).** Dual effect of APOBEC3G on Hepatitis B virus. *J. Gen. Virol.* 88, 432–440.
- Nowak M. A., Bonhoeffer S., Hill A. M., Boehme R., Thomas H. C., McDade H. (1996).** Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 93(9): 4398-4402

- Patient R., Hourieux C., Sizaret P. Y., Trassard S., Sureau C., et al. (2007).** Hepatitis B virus subviral envelope particle morphogenesis and intracellular trafficking. *J Virol* 81: 3842–51.
- Patlak M., Blumberg B., Hilleman M., Rutter W. (2000).** The hepatitis B story, *National academy of sciences*, 1-8.
- Pei R., Chen Y., Lu M. (2014).** Control of hepatitis B virus replication by interferons and Toll-like receptor signaling pathways, *World journal of gastroenterology*, 20: 11618-11629.
- Randow F., MacMicking J. D. and James L. C. (2013)** Cellular Self-Defense: How Cell-Autonomous Immunity Protects Against Pathogens. *Science*, 340.
- Rösler C., Köck J., Kann M., Malim M. H., Blum H. E., Baumert T. F. and von Weizsäcker F. (2005).** APOBEC-mediated interference with hepadnavirus production. *Hepatology. Baltim. Md* 42, 301–309.
- Sato S. et al. (2015).** The RNA sensor RIG-I dually functions as an innate sensor and direct antiviral factor for hepatitis B virus. *Immunity*, 42(1):123-32.
- Satoh T., Kato H., Kumagai Y., Yoneyama M., Sato S., Matsushita K., Tsujimura T., Fujita T., Akira S., Takeuchi O. (2010).** LGP2 is a positive regulator of RIG-I- and MDA5-mediated antiviral responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 107: 1512–1517.
- Scragg I. G. (1999).** Early cytokine induction by *Plasmodium falciparum* is not a classical endotoxin-like process. *European Journal of Immunology*. 29(8):2636–2644.
- Seeger C. and Mason W. S. (2000).** Hepatitis B Virus Biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, 64:51–68.
- Sheehy A. M., Gaddis N. C., Choi J. D. and Malim M. H. (2002).** Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418, 646–650.

**Sureau C. and Salisse, J. (2013).** A conformational heparan sulfate binding site essential to infectivity overlaps with the conserved hepatitis B virus A-determinant. *Hepatology*, 57: 985–994.

**Swiecki M., Omattage N. S., Brett T. J. (2013).** BST-2/tetherin: structural biology, viral antagonism, and immunobiology of a potent host antiviral factor. *Mol Immunol*, 54:132–139.

**Takeda K. and Akira S. (2005).** Toll-like receptors in innate immunity, *International Immunology*, 17: 1-14.

**Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. (2006).** Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci*, 97:977–983.

**Thimme R., Wieland S., Steiger C., Ghayeb J., Reimann K. A., Purcell R. H., and Chisari F. V. (2003).** CD8+ T Cells Mediate Viral Clearance and Disease Pathogenesis during Acute Hepatitis B Virus infection. *J. Virol*, 77: 68–76.

**Tomasello E., Pollet E., Vu Manh T.-P., Uzé G. and Dalod M. (2014).** Harnessing mechanistic knowledge on beneficial versus deleterious IFN-I effects to design innovative immunotherapies targeting cytokine activity to specific cell types. *Microb. Immunol*, 5: 526.

**Turvey S. and Broide D. (2010).** Innate immunity. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 125: 24-32.

**Vanlandschoot P., Van Houtte F., Roobrouck A., Farhoudi A., Stelter F. et al. (2002).** LPS-binding protein and CD14-dependent attachment of hepatitis B surface antigen to monocytes is determined by the phospholipid moiety of the particles. *J Gen Virol*, 83: 2279–89.

**Waris G., Huh K. W. and Siddiqui A. (2001).** Mitochondrially associated hepatitis B virus X protein constitutively activates transcription factors STAT-3 and NF- $\kappa$ B via oxidative stress., *Mol. Cell. Biol.* 21:7721-7730.

**Wei Y. and Tiollais P, (1999).** Molecular biology of hepatitis B virus. *Clin. Liver Dis.* 3, 189-219.

**Wen Y., Golubkov V. S., Strongin A. Y., Jiang W., Reed J. C. (2008).** Interaction of hepatitis B viral oncoprotein with cellular target HBXIP dysregulates centrosome dynamics and mitotic spindle formation. *J Biol Chem*, 283:2793–2803.

**Wieland S., Thimme R., Purcell R. H. and Chisari F. V. (2004).** Genomic analysis of the host response to hepatitis B virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101: 6669–6674.

**Yan H., Zhong G., Xu G., He W., Jing Z., Gao Z., Huang Y., Qi Y., Peng B., Wang H. et al. (2012).** Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife*, 1, e00049.

**Yan N. and Chen Z. J. (2012).** Intrinsic Antiviral Immunity. *Nat. Immunol.*, 13: 214–222.

**Yan R., Zhao X., Cai D., Liu Y., Block T. M., Guo J.-T. and Guo H. (2015).** The Interferon-Inducible Protein Tetherin Inhibits Hepatitis B Virus Virion Secretion. *J. Virol.* 89, 9200–9212.

**Yasuda J. (2012).** Ebolavirus Replication and Tetherin/BST-2. *Frontiers in Microbiology*. 3:111.

**Yondola M. A., Fernandes F., Belicha-Villanueva A., Uccellini M., Gao Q., Carter C., Palese P. (2011).** Budding capability of the influenza virus neuraminidase can be modulated by tetherin. *J Virol*, 85:2480–2491.

**Yu S., Chen J., Wu M., Chen H., Kato N., and Yuan Z. (2010).** Hepatitis B virus polymerase inhibits RIG-I- and Toll-like receptor 3-mediated beta interferon induction in human hepatocytes through interference with interferon regulatory factor 3 activation and dampening of the interaction between TBK1/IKK $\epsilon$  and DDX3. *J. Gen. Virol.* 91, 2080–2090.

**Zhang W. et al. (2017).** PRMT5 Restricts Hepatitis B Virus Replication Through Epigenetic Repression of Covalently Closed Circular DNA Transcription and Interference With Pregenomic RNA Encapsidation. *Hepatology*, 1-18

**Zhang Y., Hu K. (2015).** Rethinking the Pathogenesis of Hepatitis B Virus (HBV) infection. *Journal of Medical Virology*, 87:1989–1999.