

Paulina Jackowiak

**Identyfikacja czynników kształtujących strukturę
populacji wirusowej w przebiegu
przewlekłego zapalenia wątroby typu C**

Rozprawa doktorska wykonana w latach 2004-2009
pod kierunkiem prof. dr hab. Marka Figlerowicza
w Zespole Wirusologii Molekularnej
Pracowni Biologii Molekularnej Roślin
Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN

Poznań 2009

Panu prof. dr hab. Markowi Figlerowiczowi składam bardzo serdeczne podziękowania za wskazanie interesującego tematu badań i umożliwienie ich realizacji, za przekazaną wiedzę, poświęcony czas, a przede wszystkim za ogromną życzliwość, wyrozumiałość i nieocenione wsparcie.

Za współpracę i okazaną pomoc serdecznie dziękuję:

- *dr Magdalenie Alejskiej,*
- *inż. Nelli Malinowskiej,*
- *mgr Lucynie Budżko,*
- *doc. dr hab. Michałowi Sikorskiemu*
z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN;
- *dr hab. n. med. Magdalenie Figlerowicz,*
- *lek. med. Kamili Cudnoch*
z Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego;
- *dr hab. n. med. Dariuszowi Kowalczykowi*
z Zakładu Diagnostyki i Immunologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii;
- *prof. dr hab. Henrykowi Pospiesznemu,*
- *dr Beacie Hasiów-Jaroszewskiej*
z Instytutu Ochrony Roślin – Państwowego Instytutu Badawczego;
- *mgr inż. Pawłowi Kędziorze*
z Instytutu Informatyki Politechniki Poznańskiej.

Koleżankom i Kolegom z Instytutu Chemii Bioorganicznej PAN, zwłaszcza z Zespołu Wirusologii Molekularnej, Pracowni Biologii Molekularnej Roślin, Centrum Doskonałości CENAT oraz Pracowni Chemii RNA, bardzo dziękuję za wszelką pomoc, życzliwość i miłą atmosferę.

Spis treści

I	Wstęp	6
I.1	Wirus zapalenia wątroby typu C	7
I.1.1	Budowa wirionu	7
I.1.2	Struktura genomu	7
I.1.3	Cykl replikacyjny	8
I.1.4	Budowa i funkcje białka E2	18
I.1.5	Przynależność systematyczna i pochodzenie	24
I.2	Populacja wirusa zapalenia wątroby typu C jako quasi-gatunek	26
I.2.1	Koncepcja quasi-gatunku i jej implikacje	26
I.2.2	Polimorfizm genetyczny HCV	30
I.2.3	Metody analizy struktury quasi-gatunku HCV	31
I.3	Zakażenia HCV i ich terapia	35
I.3.1	Przebieg zakażenia	35
I.3.2	Odpowiedź immunologiczna	37
I.3.3	Terapia	39
II	Cel pracy	46
III	Materiały i metody	47
III.1	Materiały	47
III.1.1	Podstawowe odczynniki	47
III.1.2	Bakterie	48
III.1.3	Plazmidy	49
III.1.4	Startery	50
III.1.5	Enzymy	51
III.1.6	Gotowe zestawy do badań biochemicznych	52
III.1.7	Przeciwciała	53
III.1.8	Roztwory	53
III.1.9	Bufory	56
III.1.10	Pożywki	62
III.1.11	Żele	63
III.1.12	Wzorce mas	64
III.2	Metody	65
III.2.1	Powielanie fragmentów genomu HCV metodą RT-PCR	65
III.2.2	Powielanie metodą RT-PCR fragmentów genomu wirusowego wyizolowanego z roślin	66
III.2.3	Powielanie fragmentu AF genomu HCV metodą PCR	68
III.2.4	Powielanie DNA metodą PCR (polimeraza Taq)	69
III.2.5	Powielanie DNA metodą PCR (polimeraza o wysokiej dokładności kopiowania)	70
III.2.6	Analiza kwasów nukleinowych metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym	72
III.2.7	Oczyszczanie DNA	72

III.2.8	Cięcie restrykcyjne.....	72
III.2.9	Izolacja plazmidów w małej skali (do 10 µg).....	73
III.2.10	Izolacja plazmidów w średniej skali (10-100µg)	74
III.2.11	Sekwencjonowanie DNA	75
III.2.12	Ligacja.....	76
III.2.13	Ligacja z wektorem pGEM [®] -T Easy	76
III.2.14	Niezależne od ligacji klonowanie do wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC	77
III.2.15	Usuwanie jednoniciowych wystających końców dsDNA za pomocą polimerazy DNA T4.....	78
III.2.16	Wypełnianie jednoniciowych wystających końców dsDNA za pomocą fragmentu Klenowa polimerazy DNA I	78
III.2.17	Przygotowanie elektrokompetentnych komórek <i>Agrobacterium tumefaciens</i> GV3101	79
III.2.18	Transformacja komórek bakteryjnych.....	79
III.2.19	Agroinfiltracja liści tytoniu <i>Nicotiana benthamiana</i>	81
III.2.20	Ekstrakcja białek roślinnych	81
III.2.21	Deglikozylacja białek roślinnych	82
III.2.22	Ekspresja E2 w komórkach bakteryjnych	82
III.2.23	Analiza rozpuszczalności białek	84
III.2.24	Wymiana buforu i zagęszczanie preparatów białkowych	84
III.2.25	Oczyszczanie białek otrzymanych w komórkach bakteryjnych.....	85
III.2.26	Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (żel PAA).....	88
III.2.27	Identyfikacja białek metodą <i>western blot</i>	88
III.2.28	Test ELISA (ang. <i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>).....	90
III.2.29	Analiza wiązania białka E2 z receptorem CD81 limfocytów B	93
III.2.30	Otrzymywanie genomowych cząsteczek RNA wirusa mozaiki stokłosy metodą transkrypcji <i>in vitro</i>	93
III.2.31	Inokulacja liści komosy <i>Chenopodium quinoa</i>	94
III.2.32	Ekstrakcja RNA z zakażonych roślin.....	94
IV	Wyniki.....	96
IV.1	Analiza struktury populacji wirusa zapalenia wątroby typu C	96
IV.1.1	Wybór reprezentatywnego rejonu genomu HCV	96
IV.1.2	Amplifikacja, klonowanie i sekwencjonowanie rejonu AF.....	98
IV.1.3	Analiza bioinformatyczna na podstawie rejonu AF	101
IV.1.4	Amplifikacja, klonowanie, sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna rejonu IFN-R	118
IV.2	Czynniki kształtujące strukturę quasi-gatunku HCV.....	120
IV.2.1	Wpływ struktury rejonu AF na wierność jego kopiowania przez polimerazę wirusową	121

IV.2.2	Wpływ ciśnienia selekcyjnego na kształt populacji wirusowej.....	130
IV.2.3	Wpływ struktury i funkcji białka E2 na kształt populacji wirusowej.....	131
V	Dyskusja.....	169
V.1	Analiza struktury quasi-gatunku HCV	169
V.2	Czynniki kształtujące strukturę quasi-gatunku HCV.....	174
V.2.1	Wpływ struktury RNA i presji selekcyjnej	174
V.2.2	Wpływ właściwości białka E2	178
VI	Wnioski	187
VII	Literatura	190

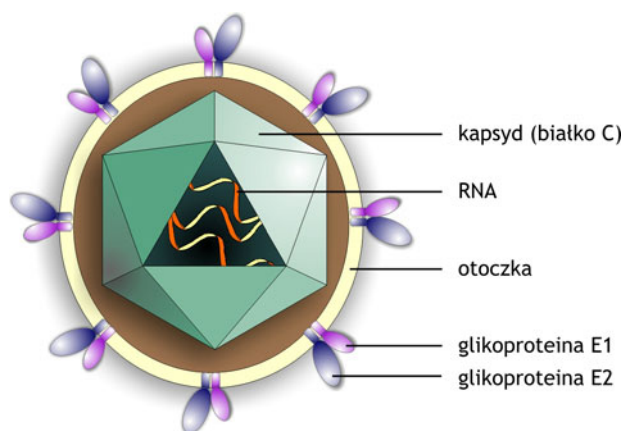
I Wstęp

Jednym z najpoważniejszych wyzwań, przed którymi stoi współczesna medycyna, jest z pewnością znalezienie skutecznych metod profilaktyki i zwalczania infekcji wirusowych. Do najbardziej rozpowszechnionych i groźnych wirusowych patogenów człowieka zaliczyć można wirusa zapalenia wątroby typu C (ang. *hepatitis C virus*, HCV), którym zarażonych jest obecnie ponad 170 milionów osób. Problem ten dotyka ludzi zarówno w krajach słabo, jak i wysoko rozwiniętych (WHO, 1999). HCV cechuje się szczególną zdolnością do wywoływania przewlekłych zakażeń, których skutkiem są groźne powikłania, mogące prowadzić do nieodwracalnych uszkodzeń wątroby. Chociaż mija już 20 lat od zidentyfikowania HCV (Choo *et al.*, 1989), do tej pory nie powstała szczepionka zapobiegająca zakażeniu, a stosowana terapia wykazuje ograniczoną skuteczność. Co więcej, nie stwierdzono, by istniała jakaś jednoznaczna korelacja pomiędzy cechami charakteryzującymi pacjenta a rezultatem terapii przeciwwirusowej – nie wiadomo, dlaczego chorzy charakteryzujący się podobnymi parametrami reagują w różny sposób na prowadzone leczenie. Biorąc pod uwagę wyniki współczesnych badań można stwierdzić, że podstawową przyczyną problemów napotykanych w profilaktyce i zwalczaniu zakażeń HCV jest niezwykle polimorfizm genetyczny wirusa (Figlerowicz *et al.*, 2003). Warunkuje on ogromną plastyczność populacji wirusowej i umożliwia jej przetrwanie w organizmie gospodarza, pomimo odpowiedzi immunologicznej i zastosowanych leków. Analizy izolatów HCV wykazały, że podobnie jak inne wirusy RNA, tworzy on w zainfekowanym organizmie pulę spokrewnionych, lecz zróżnicowanych genetycznie wariantów, nazwanych quasi-gatunkiem (Gomez *et al.*, 1999). W świetle ostatnich danych wydaje się, że to właśnie specyficzne cechy wirusa a nie gospodarza mogą decydować o wynikach leczenia. Celem podjętych badań było ustalenie struktury populacji wirusowej u chorych, którzy różnie odpowiedzieli na terapię, oraz identyfikacja czynników kształtujących tę strukturę. W rezultacie przeprowadzonych doświadczeń uzyskano szereg istotnych informacji dotyczących korelacji pomiędzy strukturą populacji HCV a wynikami leczenia dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Zbadano także, na ile struktura populacji wirusowej jest kształtowana przez ciśnienie selekcyjne, wywierane przez układ immunologiczny gospodarza. Ponadto, zidentyfikowano specyficzne cechy wirusa, charakterystyczne jedynie dla populacji obecnych u osób, u których leczenie było nieskuteczne.

I.1 Wirus zapalenia wątroby typu C

I.1.1 Budowa wirionu

Ze względu na trudności napotymane przy próbach obserwacji mikroskopowej wirionów HCV w tkankach oraz długoletni brak efektywnego systemu namnażania wirusa *in vitro*, dane na temat budowy jego cząstek są niepełne (Lindenbach *et al.*, 2007; Roingeard *et al.*, 2004). Ustalono, że wiriony mają średnicę około 50 nm. W surowicy występują w trzech podstawowych formach: (i) w kompleksie z lipoproteinami o niskiej i bardzo niskiej gęstości; (ii) w kompleksie z immunoglobulinami; (iii) jako wolne wiriony; przy czym postacią infekcyjną jest najprawdopodobniej pierwsza z nich. Hipotetyczny model cząstki wirusowej HCV stworzony został na podstawie danych dotyczących budowy spokrewnionych wirusów [rysunek I.1]. W ostatnich latach uzupełniono go, korzystając z wyników uzyskanych metodą mikroskopii krioelektronowej (Yu *et al.*, 2007). Postuluje się, że materiał genetyczny HCV zamknięty jest wewnątrz ikozaedralnego nukleokapsydu, otoczonego błoną pochodzącą z komórki gospodarza, w którą wbudowane są białka wirusowe (Penin *et al.*, 2004).



Rysunek I.1. Budowa wirionu HCV.

Cząstki wirusowe o średnicy ok. 50 nm są opłaszczane błoną (pochodzącą z komórki gospodarza), w którą wbudowane są glikoproteiny otoczki: E1 i E2. Wewnątrz znajduje się ikozaedryczny kapsyd (zbudowany z białka C), osłaniający materiał genetyczny w postaci pojedynczej nici RNA.

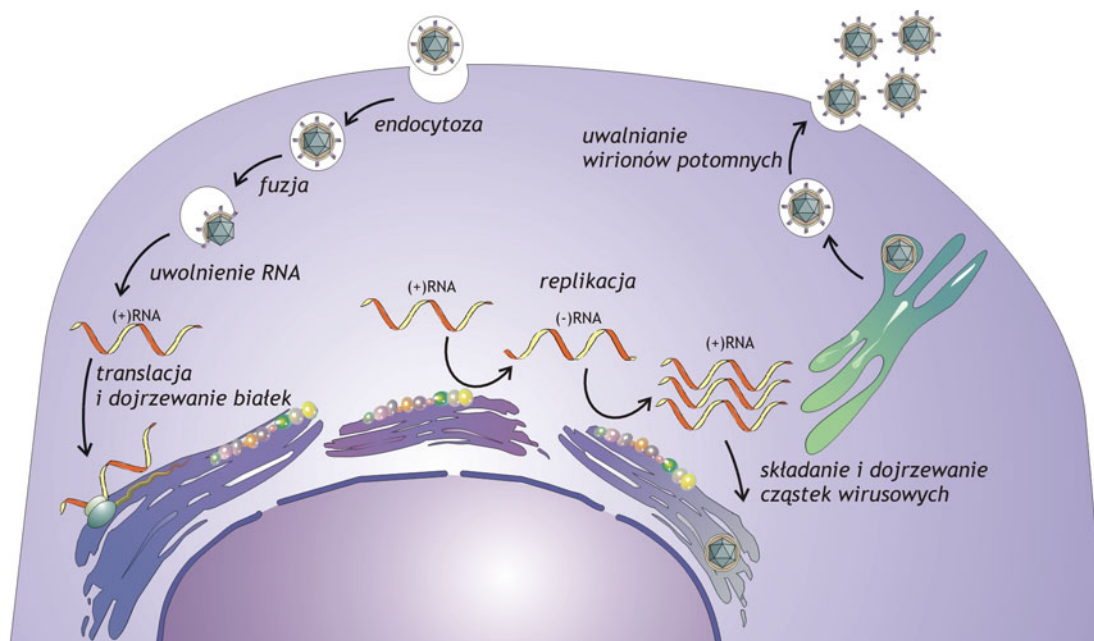
I.1.2 Struktura genomu

Materiał genetyczny HCV stanowi pojedyncza nić RNA o dodatniej polarności i długości ok. 9600 nukleotydów (nt). W obrębie genomu można wyróżnić jedną otwartą ramkę odczytu (ang. *open reading frame*, ORF), kodującą poliproteinę liczącą około 3000 reszt aminokwasowych (Bartenschlager i Lohmann, 2000; Lindenbach *et al.*, 2007; Moradpour *et al.*, 2007). Odcinek kodujący oskrzydłony jest rejonami

nieulegającymi translacji (ang. *untranslated regions*, UTRs), pełniącymi istotne funkcje regulatorowe [rysunek I.4A]. Ponieważ genomowa cząsteczka RNA HCV jest pozbawiona struktury kapu, w rejonie 5'UTR znajduje się miejsce niezależnego od kapu wiązania rybosomu (ang. *internal ribosomal entry site*, IRES). Warunkuje ono inicjację translacji. Ponadto, pierwsze 40 nukleotydów tego rejonu tworzy tzw. domenę I, zaangażowaną w proces replikacji (Lukavsky, 2008; Tan, 2006). W obrębie 3'UTR wyróżnia się trzy zasadnicze elementy, z których jeden, ściśle zachowawczy 98-nukleotydowy rejon X, jest kluczowy dla rozpoczęcia procesu kopiowania wirusowego RNA (Kolykhalov *et al.*, 1996). Co ciekawe, ważne dla replikacji oraz infekcyjności wirusa domeny RNA zidentyfikowano także w rejonie kodującym. Ponadto zaobserwowano, że genom zawiera mniej powtórzeń dinukleotydów UA i UU, aniżeli wynikałoby to z ich losowego rozmieszczenia. Prawdopodobnie w ten sposób wirus unika degradacji genomu przez indukowaną interferonem RNazę L, która preferencyjnie przecina wspomniane sekwencje. Biorąc pod uwagę wyniki modelowania komputerowego można też zauważyć, że RNA HCV zawiera szczególnie dużo rejonów dwuniciowych, co jest charakterystyczną cechą wirusów zdolnych do wywoływania przewlekłych infekcji. Obserwacje te sugerują, że cechy strukturalne genomu HCV mogą stanowić podłoże jednego z mechanizmów unikania odpowiedzi przeciwwirusowej komórki (Lindenbach *et al.*, 2007).

I.1.3 Cykl replikacyjny

Cykl replikacyjny HCV składa się z kilku podstawowych etapów, obejmujących: (i) wnikanie wirionów do komórki; (ii) translację i dojrzewanie białek wirusowych; (iii) replikację RNA; (iv) składanie i uwalnianie wirionów potomnych [rysunek I.2].



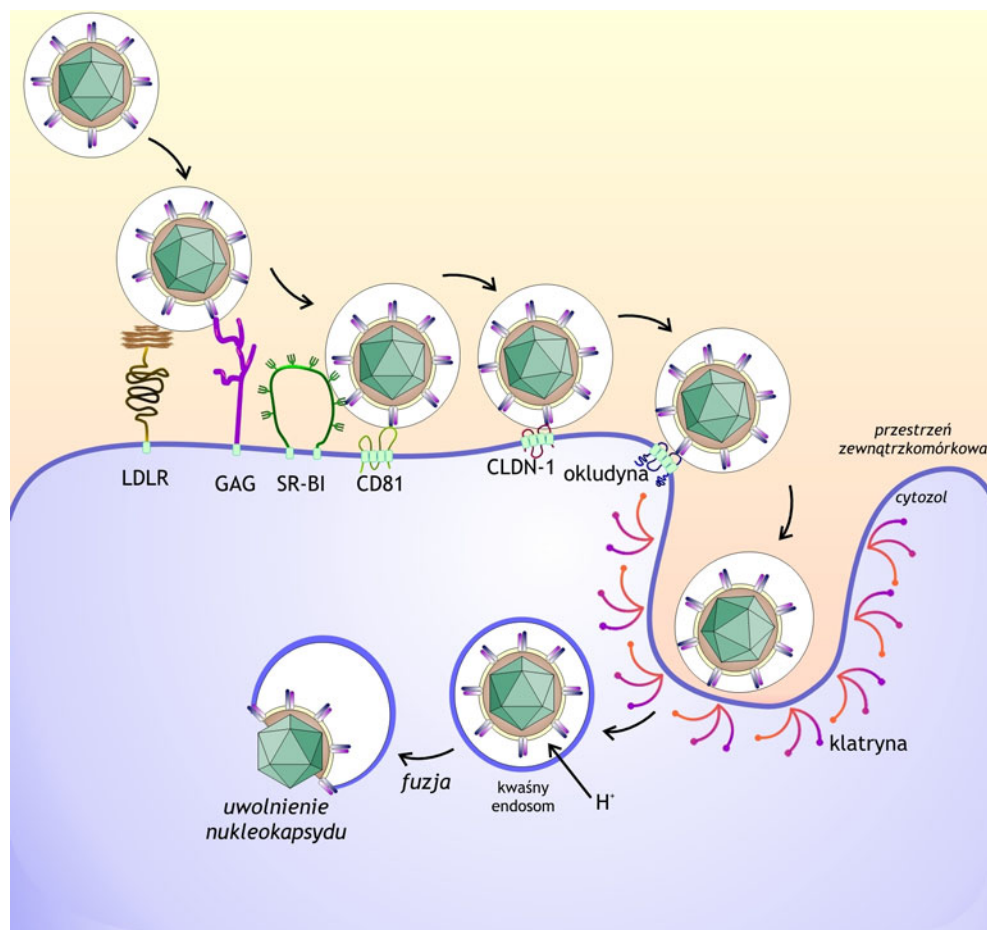
Rysunek I.2. Cykl replikacyjny HCV.

HCV wnika do komórek na drodze endocytozy. Po uwolnieniu materiału genetycznego w postaci (+)RNA, zachodzi synteza i dojrzewanie białek wirusowych. Kompleks replikacyjny powstaje w obrębie sieci błon wewnątrzkomórkowych. Polimeraza wirusowa katalizuje syntezę nici (-), a następnie nici (+)RNA. Składanie wirionów potomnych rozpoczyna się przypuszczalnie od oddziaływania pomiędzy białkiem kapsydu a (+)RNA. Wiriony opuszczają komórkę na drodze egzocytozy.

I.1.3.1 Wnikanie do komórek gospodarza

Chociaż HCV infekuje i namnaża się przede wszystkim w hepatocytach, posiada też zdolność zakażenia innych typów komórek. Wśród nich są komórki układu immunologicznego: limfocyty B krwi obwodowej oraz komórki dendrytyczne (Moradpour *et al.*, 2007; Stamataki *et al.*, 2009). Wyniki najnowszych badań wskazują ponadto, że genomowe cząsteczki RNA HCV są obecne w komórkach mózgowych: astrocytach oraz makrofagach mikrogleju. W tych ostatnich, oprócz RNA o dodatniej polarności, zidentyfikowano również jego komplementarną formę replikacyjną (Wilkinson *et al.*, 2009).

Proces wnikania wirusa do komórek gospodarza nie został całkowicie poznany. Wiadomo jednak, że HCV wykorzystuje różne receptory obecne na powierzchni permissywnych komórek. Wnikanie poprzedzające efektywną infekcję wymaga najprawdopodobniej zaangażowania kilku receptorów jednocześnie (Cocquerel *et al.*, 2006) [rysunek I.3].



Rysunek 1.3. Wnikanie wirionów HCV do komórki gospodarza.

W proces wiązania i wnikania wirusa do komórki mogą być zaangażowane receptory lipoprotein o niskiej gęstości (LDLR), glikozaminoglikany (GAG), receptor zmiatacz (SR-BI) oraz białko CD81. Późny etap wnikania związany jest z kładyną-1 (CLDN-1) i okludyną. Internalizacja wirionu zachodzi na drodze endocytozy zależnej od klatryny. Zakwaszenie endosomu inicjuje etap fuzji jego błony z otoczką wirionu.

Najlepiej poznanym receptorem HCV jest białko CD81 (Pileri *et al.*, 1998). Należy ono do rodziny białek zawierających cztery helisy transbłonowe (ang. *tetraspanin family*) i występuje powszechnie na powierzchni wielu typów komórek. CD81 zawiera dwie pętle zewnątrzkomórkowe, z których jedna, tzw. duża (ang. *large extracellular loop*, LEL), stanowi miejsce oddziaływania z białkiem otoczki HCV, E2 (Kitadokoro *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2004). Obecność tego receptora jest konieczna dla efektywnego wnikania zarówno cząstek pseudowirusowych zawierających białka otoczki HCV (ang. *HCV pseudoparticles*, HCVpp), jak i wirionów powstałych w liniach komórkowych (ang. *cell-culture HCV*, HCVcc) (Lindenbach *et al.*, 2007). Co więcej, produkcja CD81 w liniach komórkowych niektórych rodzajów hepatocytów naturalnie pozbawionych tego receptora, czyni je podatnymi na infekcję HCVpp i HCVcc (Moradpour *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2004). Równocześnie jednak rola CD81

w omawianym procesie nie została w pełni wyjaśniona. Z pewnością nie jest ono pierwszym białkiem, z którym oddziałuje wirus. Wynika to z faktu szerokiego rozpowszechnienia CD81 i jednocześnie stosunkowo wąskiego spektrum komórek zakażanych przez HCV. Ponadto, przeciwciała skierowane przeciwko CD81 są w stanie zapobiec wnikaniu cząstek pseudowirusowych już po ich związaniu z komórką docelową (Cormier *et al.*, 2004). Obecnie wydaje się zatem, że CD81 jest jedynie koreceptorem (Cocquerel *et al.*, 2006).

Drugim białkiem najprawdopodobniej biorącym udział w procesie wiązania/wnikania wirionów do komórek gospodarza jest tzw. receptor zmiatacz klasy B typu I (ang. *scavenger receptor class B type I*, SR-BI). Występuje on zwłaszcza na powierzchni komórek wątroby i gruczołów steroidogennych, gdzie uczestniczy w wiązaniu pochodnych lipoprotein o niskiej gęstości (ang. *low density lipoproteins*, LDL) i lipoprotein o wysokiej gęstości (ang. *high density lipoproteins*, HDL). SR-BI posiada dwie helisy transbłonowe, połączone pętlą zewnątrzkomórkową, zawierającą glikozylowane reszty aminokwasowe (Cocquerel *et al.*, 2006). Stwierdzono, że receptor ten bierze udział w wiązaniu białka E2 otoczki HCV na powierzchni komórek HepG2, nieposiadających receptora CD81 (Scarselli *et al.*, 2002). Funkcja SR-BI w procesie wnikania HCV pozostaje nieznana; nie wiadomo też, w którym etapie oddziaływania wirionu z powierzchnią komórki on uczestniczy. Nadal nie rozstrzygnięto, czy jest właściwym receptorem wirionu, zdolnym nawet do jego internalizacji, czy też warunkuje jedynie selektywne pobieranie lipidów, tym samym modulując skład błony i czyniąc ją bardziej podatną na infekcję (Cocquerel *et al.*, 2006).

Stosunkowo niedawno stwierdzono, że kładyna-1 (ang. *claudin-1*, CLDN-1), białko ścisłych połączeń międzykomórkowych hepatocytów (ang. *tight junctions*), także odgrywa istotną rolę w procesie wnikania HCV. Co więcej, w przeciwieństwie do CD81 i SR-BI, jest jedynym białkiem, które produkowane w liniach komórek niepochodzących z wątroby, czyni je podatnymi na infekcję (Evans *et al.*, 2007). Kładyna-1 tworzy kompleks z CD81 (Harris *et al.*, 2008) i oddziałuje z wirionem w końcowym etapie wnikania, już po przyłączeniu HCV do CD81 (Evans *et al.*, 2007). Ponieważ jednak ekspresja kładyny-1, CD81 i SR-BI w niektórych liniach komórkowych niepochodzących z wątroby nie wystarcza do wniknięcia wirionów HCV, sądzić można, że istnieją dodatkowe czynniki komórkowe zaangażowane w ten proces (Moradpour *et al.*, 2007). Najnowsze doniesienia wskazują, że obok kładyny-1, ważnym koreceptorem jest też okcludyna (ang. *occludine*), występująca w tych samych

rodzajach połączeń międzykomórkowych. Co ciekawe, po infekcji poziom ekspresji genów kodujących te białka spada, co może zapobiegać ponownemu zakażeniu komórek oraz leżeć u podstaw zmian morfologicznych i funkcjonalnych obserwowanych w zainfekowanych hepatocytach (Liu *et al.*, 2009).

Ze względu na występowanie kompleksów wirionów z lipoproteinami o niskiej gęstości, prawdopodobnym wydaje się, że w proces wiązania/wnikania zaangażowany jest odpowiedni receptor lipoprotein (ang. *low density lipoprotein receptor*, LDLR). Ponadto, sugeruje się udział innych cząsteczek występujących na powierzchni komórek, takich jak glikozaminoglikany i lektyny typu C. Obecnie brakuje jednak wystarczających dowodów wyjaśniających ich ewentualną rolę. Można przypuszczać, że wyłapują one wiriony, umożliwiając ich wiązanie z właściwymi receptorami (Cocquerel *et al.*, 2006).

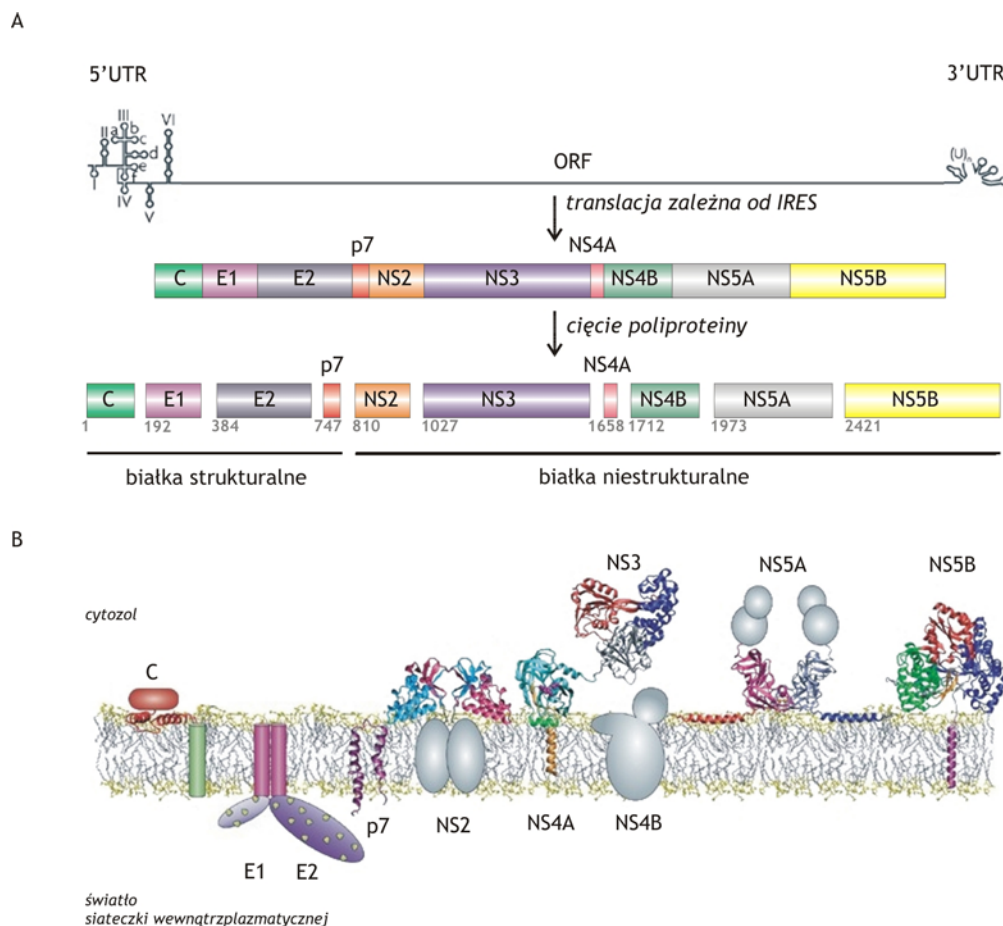
Po związaniu wirionu przez receptor, następuje jego internalizacja. Zachodzi ona na drodze endocytozy zależnej od obecności klatryny. W trakcie wnikania powstaje endosom, który ulega zakwaszeniu, co prowadzi najprawdopodobniej do rearanżacji białek otoczki wirionu i umożliwia jej fuzję z błoną endosomu (Lindenbach *et al.*, 2007; Moradpour *et al.*, 2007).

Alternatywnym sposobem infekowania komórek przez HCV, jest wnikanie zależne od receptora Fc, wiążącego rejon Fc immunoglobulin. Szlak ten wykorzystują również inne wirusy, m.in. wirus Ebola czy ludzki wirus upośledzenia odporności. Mechanizm wnikania nie zależy w tym przypadku od białek wirusowych, ale od obecności przeciwciał skierowanych przeciwko patogenowi. Komórkowe receptory Fc wiążą cząstki wirusowe opłaszczone przeciwciałami (ang. *antibody-dependent enhancement*, ADE). W przypadku HCV zaobserwowano, że w określonych warunkach, w obecności przeciwciał dochodzi do zwiększenia infekcyjności wirusa zarówno w stosunku do hepatocytów, jak i limfocytów B. Wzrost infekcyjności był szczególnie wysoki w przypadku tych drugich komórek, co sugeruje że ADE może odgrywać istotną rolę w ich zakażeniu (Meyer *et al.*, 2008).

1.1.3.2 Translacja i dojrzewanie białek

Po wniknięciu wirusa do komórki, genomowy RNA zostaje uwolniony z nukleokapsydu i rozpoczyna się proces translacji, zachodzący w obrębie szorstkiej siateczki wewnątrzplazmatycznej. Jego produktem jest poliproteina, która podlega ko- i potranslacyjnemu cięciu zarówno przez proteazy wirusowe, jak i komórkowe

peptydazy sygnałowe. W rezultacie powstaje 10 białek, wśród których wyróżnia się strukturalne: C, E1, E2 i p7; oraz niestrukturalne: NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B [tabela I.1, rysunek I.4]. Dodatkowo, w wyniku przesunięcia ramki odczytu -2/+1 w obrębie genu kodującego białko C, powstaje kolejne niewielkie białko F, o niepoznanej dotychczas funkcji.



Rysunek I.4. Struktura genomu i białek HCV.

(A) Genomowa cząsteczka RNA HCV ma długość ok. 9600 nukleotydów. Zawiera pojedynczą ramkę odczytu (ORF), oskrzydloną rejonami nieulegającymi translacji, 5' i 3' UTR. Rejony te przyjmują zachowawcze struktury drugo- i trzeciorzędowe, uczestniczące w regulacji istotnych etapów cyklu replikacyjnego wirusa. Struktura IRES w obrębie 5'UTR umożliwia translację, której produktem jest poliproteina licząca ok. 3000 reszt aminokwasowych. Komórkowe peptydazy sygnałowe i proteazy HCV katalizują jej cięcie, w wyniku którego powstają dojrzałe białka strukturalne i niestrukturalne. W wyniku przesunięcia ramki odczytu w obrębie sekwencji kodującej białko C, powstaje dodatkowo niewielkie białko F, nieprzedstawione na rysunku. Pozycje aminokwasowe odnoszą się do sekwencji HCV-H, zdeponowanej w internetowej bazie danych GenBank pod numerem AF009606. (B) Większość białek HCV jest zakotwiczona w błonie. Z wyjątkiem E1, E2 i niewielkiego fragmentu p7, domeny zewnętrznbłonowe tych białek są skierowane do cytozolu. Fragmenty białek, których struktury nie zostały dotąd poznane, przedstawiono schematycznie za pomocą figur geometrycznych. W obrębie domen białek E1 i E2 zaznaczono potencjalne miejsca glikozylacji - odpowiednio: 4 dla E1 i 11 dla E2. [Z Moradpour *et al.*, 2007, za zgodą wydawcy, zmienione. Adapted by permission from Macmillan Publishers Ltd: D. Moradpour, F. Penin, C.M. Rice; Replication of hepatitis C virus; Nature Reviews Microbiology; 5 (6) 453-463 (2007); copyright 2007.]

Tabela I.1. Białka HCV i ich funkcje w cyklu replikacyjnym [wg Tan, 2006, zmienione]

Białko	Udział w replikacji	Funkcje
C	nie	• składnik nukleokapsydu
E1	nie	• glikoproteina otoczki, • zawiera domenę umożliwiającą fuzję z błoną endosomu (?)*
E2	nie	• glikoproteina otoczki, • zawiera domenę umożliwiającą fuzję z błoną endosomu (?), • oddziaływanie z receptorami komórkowymi
p7	nie	• kanał wapniowy
NS2	nie	• NS2-3 autoproteaza
NS3	tak	• składnik proteinaz NS2-3 i NS3-4A
NS4A	tak	• kofaktor proteiny NS3-NS4A
NS4B	tak	• indukuje patologiczne zmiany błon wewnętrznych w komórce - tworzenie tzw. sieci błon (ang. <i>membranous web</i>)
NS5A	tak	• tworzy kompleks replikacyjny
NS5B	tak	• polimeraza RNA zależna od RNA
F	(?)**	• (??)

* (?) – funkcja przypuszczalna, wymaga potwierdzenia; ** (??) - nieznanne

Białko C występuje najczęściej w formie dimeru lub multimeru i jego podstawową funkcją jest tworzenie nukleokapsydu. Zawiera ono domenę obdarzoną ładunkiem dodatnim, umożliwiającą oddziaływanie z RNA. Ponadto wykazano, że wpływa na liczne procesy komórkowe, do których należą: transkrypcja, apoptoza, metabolizm lipidów i odpowiedź przeciwwirusowa (Lai i Ware, 2000; Tan, 2006). Białka E1 i E2 tworzą kompleks wbudowany w otoczkę wirusową i są niezbędne dla rozpoznawania receptorów powierzchniowych oraz wnikania do komórek gospodarza. Oba zbudowane są z domeny transbłonowej i silnie glikozylowanej domeny skierowanej do światła siateczki wewnątrzplazmatycznej (Bartenschlager i Lohmann, 2000; Moradpour *et al.*, 2007; Tan, 2006). Szczegóły dotyczące budowy i funkcji białka E2 zostały opisane w osobnym podrozdziale [I.1.4]. Niewielkie białko p7 zbudowane jest z dwóch helis transbłonowych, połączonych krótką pętlą cytoplazmatyczną. Stwierdzono, że funkcjonuje ono jako kanał dla jonów wapnia (Griffin *et al.*, 2003), co sugeruje, że najprawdopodobniej bierze udział w dojrzewaniu oraz uwalnianiu wirionów potomnych (Moradpour *et al.*, 2007). Białko niestrukturalne NS2 jest składnikiem proteazy NS2-3, zależnej od obecności jonów cynku (Grakoui *et al.*, 1993a; Grakoui *et al.*, 1993b). Po autokatalicznym przecięciu wiązania pomiędzy

C-końcowym fragmentem NS2 a N-końcowym rejonem NS3, traci swą aktywność proteolityczną i ulega degradacji. Wykazano też, że NS2 powoduje zatrzymanie cyklu komórkowego w fazie S, jednak znaczenie tego zjawiska dla przebiegu infekcji HCV nie zostało ustalone (Yang *et al.*, 2006). Białko NS3 pełni wiele istotnych funkcji w cyklu replikacyjnym HCV. W połączeniu z kofaktorem, białkiem NS4A, wykazuje aktywność proteazy serynowej i odpowiada za prawidłowe dojrzewanie wszystkich białek niestrukturalnych. Ten sam kompleks blokuje także fosforylację kluczowej komórkowej cząsteczki sygnałowej, czynnika transkrypcyjnego IRF-3 (ang. *interferon regulatory factor-3*, IRF-3), indukującego między innymi ekspresję interferonu typu I (Foy *et al.*, 2003). Postuluje się również udział NS3 w supresji apoptozy i indukcji transformacji nowotworowej, choć te mechanizmy nie zostały jeszcze dostatecznie poznane (Tan, 2006). Na końcu karboksylowym NS3 zlokalizowana jest domena helikazowa, (Tai *et al.*, 1996), odgrywająca kluczową rolę w replikacji bogatego w struktury drugorzędowe genomu wirusowego. Integralne białko błonowe, NS4B, nie zostało do tej pory szczegółowo scharakteryzowane. Najprawdopodobniej indukuje tworzenie tzw. sieci błon wewnątrzkomórkowych (ang. *membranous web*) i umożliwia zakotwiczenie w błonie kompleksu replikacyjnego. Przypuszczalnie może także brać udział w modulowaniu aktywności polimerazy RNA zależnej od RNA i wpływać na niektóre procesy komórkowe (Tan, 2006). Podstawową funkcją białka NS5A jest tworzenie kompleksu replikacyjnego i regulacja przejścia od etapu replikacji do składania wirionów potomnych. Białko to występuje w kilku formach różniących się stopniem fosforylacji. Ufosforylowana forma NS5A oddziałuje z białkiem komórkowym, kierując kompleks replikacyjny do tratw lipidowych, gdzie zachodzi kopiowanie genomu HCV. W odróżnieniu od niej, tzw. hiperfosforylowana postać NS5A nie jest zdolna do tego oddziaływania, stąd jej pojawienie się wpływa hamująco na replikację. Badania krystalograficzne wykazały istnienie w obrębie NS5A domen umożliwiających oddziaływanie z błonami, białkami i RNA (Tellinghuisen *et al.*, 2005). Postuluje się zatem, że białko to może wiązać jedno- lub dwuniciowy wirusowy RNA, chroniąc go przed degradacją przez komórkowe nukleazy oraz uniemożliwiając powstanie krótkich regulatorowych RNA skierowanych przeciwko HCV (Moradpour *et al.*, 2007). Ponadto sugeruje się, że NS5A może indukować odporność na odpowiedź interferonową, poprzez inaktywację jednego z białek efektorowych, kinazy białkowej R (Gale *et al.*, 1998). Polimeraza RNA zależna od RNA, NS5B, jest białkiem zakotwiczonym w błonie. Katalizuje syntezę komplementarnej nici RNA na matrycy

cząsteczki genomowej, jak również syntezę właściwych nici genomowych o dodatniej polarności. W strukturze krystalicznej wyróżniono typowe dla polimeraz RNA domeny palców, dłoni i kciuka oraz miejsce katalityczne (Ago *et al.*, 1999; Lesburg *et al.*, 1999). Wyróżniającą cechą tego enzymu jest niemal całkowite odizolowanie miejsca aktywnego przez domeny palców i kciuka (Lesburg *et al.*, 1999). Podobnie jak inne polimerazy wirusowe, NS5B wykazuje zdolność do oligomeryzacji i kooperatywnej syntezy RNA (Wang *et al.*, 2002). Ponieważ nie posiada aktywności 3'→5' egz nukleazowej, należy do enzymów o niskiej dokładności kopiowania. Sugeruje się, że tak samo jak inne polimerazy tego typu, błędnie wprowadza nukleotydy do nici potomnej z częstością 10^{-3} - 10^{-5} (Gomez *et al.*, 1999). Średni współczynnik mutacji wynosi $1,44$ - $1,92 \times 10^{-3}$, w przeliczeniu na miejsce w genomie, na rok (Ogata *et al.*, 1991). Ta cecha białka NS5B jest głównym czynnikiem decydującym o ogromnej zmienności HCV.

1.1.3.3 Replikacja RNA

Ponieważ genomowa cząsteczka RNA stanowi matrycę zarówno podczas translacji, jak i replikacji, procesy te muszą przebiegać w ściśle kontrolowany sposób. Na podstawie podobieństwa HCV do innych przedstawicieli rodziny *Flaviviridae* szacuje się, że utworzenie pojedynczej cząstki wirusowej wymaga powstania jednej cząsteczki RNA oraz około 200 kopii białek strukturalnych. Wynika stąd, że replikacja zachodzi znacznie rzadziej, aniżeli translacja. Sposób regulacji przejścia od translacji do replikacji nie został dokładnie poznany. Przypuszczalnie biorą w nim udział zarówno białka wirusowe, jak i komórkowe. Na przykład białko C będące prawdopodobnie równocześnie produktem oraz inhibitorem procesu translacji (Lindenbach *et al.*, 2007; Zhang *et al.*, 2002b).

Kompleks replikacyjny tworzy się w obrębie okołojądrowej sieci błon wewnątrzkomórkowych – struktury, której powstanie stymuluje białko NS4B. Wspomniana sieć pochodzi najprawdopodobniej z błon siateczki wewnątrzplazmatycznej lub aparatu Golgiego (Lindenbach *et al.*, 2007). Skład lipidowy i stopień płynności tych błon są kluczowe dla prawidłowego przebiegu replikacji. Wykazano, że podczas gdy nasycone i jednonienasycone kwasy tłuszczowe stymulują omawiany proces, wielonienasycone kwasy tłuszczowe hamują go (Kapadia i Chisari, 2005). Umiejscowienie kluczowego etapu cyklu replikacyjnego w obrębie struktur

bloniastych zapewnia ochronę RNA i białek wirusowych przed działaniem komórkowych rybonukleaz oraz enzymów proteolitycznych (Lindenbach *et al.*, 2007).

Istotne elementy strukturalne warunkujące replikację ulokowane są w obrębie 3'UTR (ściśle zachowawczy rejon X i trakt poliU/UC) (Yi i Lemon, 2003a, b), oraz 5'UTR (domeny I i II) (Kim *et al.*, 2002). Miejsce inicjacji syntezy nici (-)RNA jak dotąd nie zostało precyzyjnie ustalone. Wynika to między innymi z faktu, że polimeraza HCV *in vitro* inicjuje syntezę RNA ze startera, *de novo*, oraz z wykorzystaniem krótkiego duplesu, powstałego w wyniku zawinięcia końca 3' matrycy i utworzenia wewnątrzcząsteczkowych wiązań wodorowych (Bartenschlager i Lohmann, 2000). Proponowano, że synteza nici (-) rozpoczyna się w obrębie rejonu X, około 21 nukleotydów powyżej właściwego końca 3' RNA (Oh *et al.*, 2000), lub *de novo*, od 3'-końcowej reszty urydyny (Hong *et al.*, 2001). Pojedyncza antygenomowa nić (-)RNA służy jako matryca do syntezy około 10 kopii nici (+)RNA. Choć proces ten jest zbadany w mniejszym stopniu niż synteza nici (-), stwierdzono, że minimalnym fragmentem RNA niezbędnym do zainicjowania efektywnej syntezy nici (+) jest rejon komplementarny do domen I, II i III 5'UTR. Proces replikacji podlega modulacji zarówno przez białka wirusowe, jak i komórkowe (Lindenbach *et al.*, 2007; Tan, 2006). Niezwykle interesującym mechanizmem regulacji jest ponadto stymulacja replikacji HCV przez miR-122, ludzki mikroRNA, ulegający specyficznej ekspresji w wątrobie (Jopling *et al.*, 2005).

1.1.3.4 Tworzenie i uwalnianie wirionów potomnych

Składanie cząstek wirusowych HCV rozpoczyna się prawdopodobnie od interakcji pomiędzy białkiem C a 5'UTR genomowej cząsteczki RNA, przy czym miejsce tego oddziaływania nie zostało precyzyjnie oznaczone. Przypuszczalnie, proces ten zachodzi podobnie jak u innych przedstawicieli *Flaviviridae* i biorą w nim udział również białka niestrukturalne. Wiriony pączkują do wnętrza siateczki wewnątrzplazmatycznej, przechodzą szlak wydzielniczy przez aparat Golgiego i są uwalniane na powierzchni komórki (Lindenbach *et al.*, 2007; Moradpour *et al.*, 2007; Tan, 2006). Szacuje się, że w trakcie jednego dnia wirerii może być produkowanych około 10^{12} potomnych cząstek wirusowych, natomiast ich okres półtrwania wynosi około 3 godziny (Neumann *et al.*, 1998).

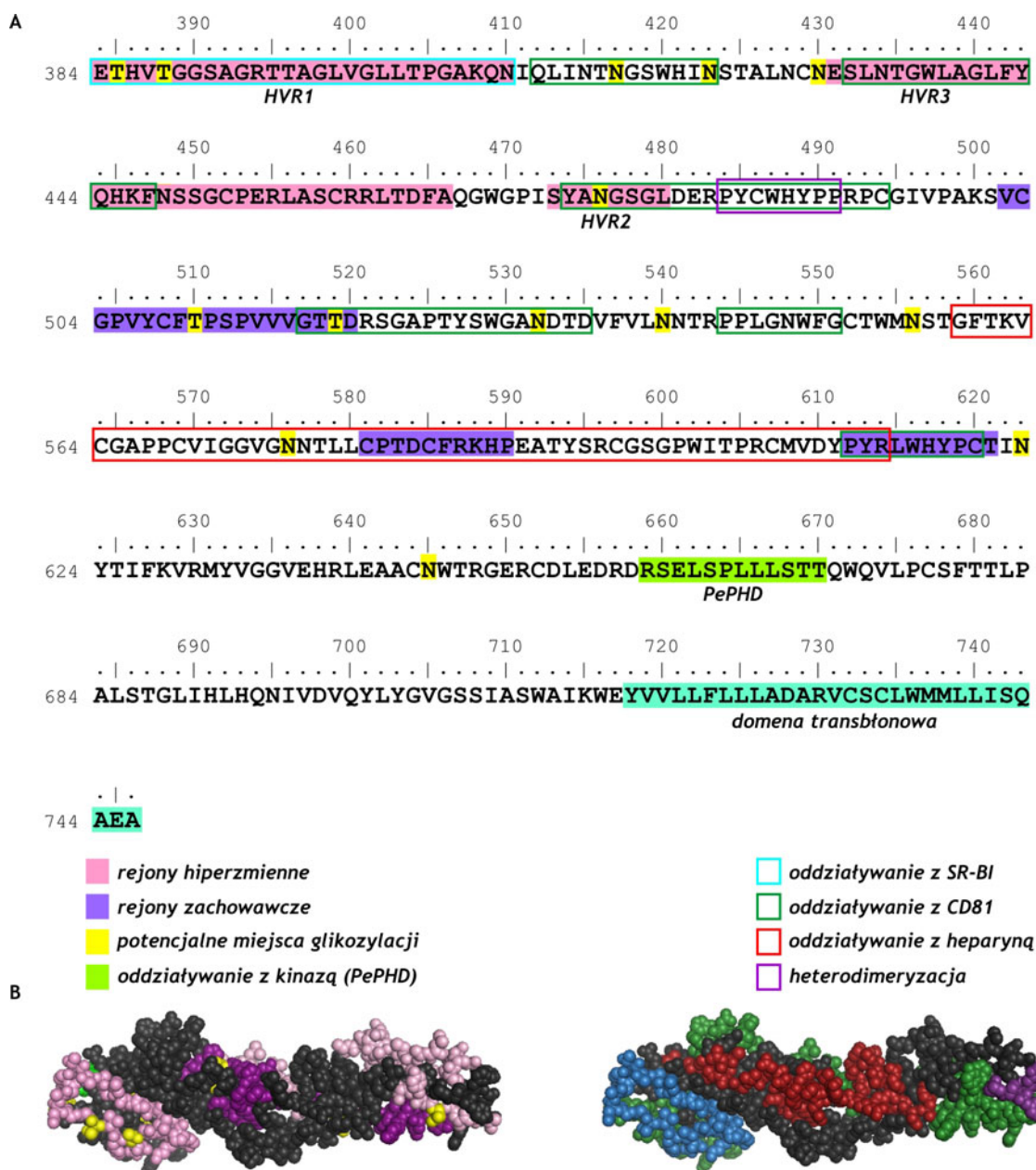
I.1.4 Budowa i funkcje białka E2

Białko E2 HCV liczy 363 reszty aminokwasowe i jest glikoproteiną otoczki wirionu. Najczęściej zawiera 11 łańcuchów N-oligosacharydowych, choć może także ulegać O-glikozylacji. Przyłączenie łańcuchów oligosacharydowych wywiera istotny wpływ na funkcje E2 (Falkowska *et al.*, 2007). Ich obecność wyraźnie zmienia masę cząsteczkową białka z ok. 38 kDa dla formy niemodyfikowanej, do ok. 68 kDa dla w pełni glikozylowanej (Pavio *et al.*, 2002). Fałdowanie poliproteiny w obrębie fragmentu odpowiadającego białku E2 przebiega w siateczce wewnątrzplazmatycznej, w obecności białek opiekuńczych, wykazujących powinowactwo do N-oligosacharydów. Istotne dla prawidłowego ukształtowania E2 jest także tworzenie wewnątrzcząsteczkowych mostków disiarczkowych pomiędzy konserwatywnymi resztami cystein. Białko E2 nie występuje w błonie otoczki samodzielnie, lecz tworzy heterodimery z glikoproteiną E1. Uważa się, że E2 wspomaga proces powstawania funkcjonalnego białka E1, wpływając na jego fałdowanie. Kluczowe elementy umożliwiające heterodimeryzację zlokalizowane są w obrębie domen transbłonowych obu białek (Op De Beeck *et al.*, 2001; Op De Beeck *et al.*, 2000), jak również w domenach zewnętrznych. Przykładem tej drugiej lokalizacji może być zwłaszcza motyw ⁴⁸⁷WHY⁴⁸⁹⁽¹⁾ E2 (Yi *et al.*, 1997).

Ponieważ struktura przestrzenna E2 nie została poznana, informacje na temat jego budowy pochodzą z modelowania komputerowego, analiz składu aminokwasowego oraz eksperymentów biochemicznych [rysunek I.5]. Dodatkowych informacji dostarczają badania rentgenograficzne białek otoczki innych przedstawicieli rodziny *Flaviviridae*. Na podstawie tych przesłanek ustalono, że E2 należy do białek transbłonowych typu I i składa się z części aminowej znajdującej się na zewnątrz wirionu oraz domeny karboksylowej zakotwiczonej w błonie (Tan, 2006). Takie umiejscowienie tego białka umożliwia mu pełnienie funkcji głównego czynnika odpowiedzialnego za rozpoznawanie receptorów docelowych komórek (Cocquerel *et al.*, 2006). Jednocześnie, wyeksponowanie E2 na zewnątrz cząstki wirusowej czyni je celem zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej gospodarza (Kato *et al.*, 1993; Shirai *et al.*, 1999). Jako kluczowe białko w oddziaływaniach

⁽¹⁾ Pozycje aminokwasowe odnoszą się do sekwencji HCV-1a, zdeponowanej w internetowej bazie danych GenBank pod numerem NC_004102.

pomiędzy wirusem a organizmem człowieka, E2 podlega silnej presji selekcyjnej. Stąd też w jego obrębie znajdują się rejony należące do najbardziej polimorficznych w wirusowej poliproteinie, tzw. rejony hiperzmiennie (ang. *hypervariable regions*, HVRs). Rejon HVR1, obejmujący 27 pierwszych reszt aminokwasowych E2 (pozycje 384-410), jest najlepiej zbadanym i pierwszym pod względem poziomu zmienności fragmentem genomu HCV (Simmonds, 2004; Troesch *et al.*, 2006). Wydaje się, iż stanowi on główny cel dla przeciwciał neutralizujących (Kaplan *et al.*, 2003). Krótszy rejon HVR2 (pozycje 473-480), bierze najprawdopodobniej udział w wiązaniu E2 do receptora komórki (Hijikata *et al.*, 1991; Kato *et al.*, 1992). W ostatnich latach zaproponowano również wyodrębnienie trzeciego rejonu hiperzmiennego, HVR3 (Troesch *et al.*, 2006), złożonego z trzech poddomen (pozycje 431-466). Na podstawie właściwości fizykochemicznych HVR3 (przewidywane metodami bioinformatycznymi) można przypuszczać, że również ten obszar bierze udział w oddziaływaniach z receptorami komórkowymi lub jest celem dla przeciwciał. Oprócz wspomnianych rejonów charakteryzujących się dużym polimorfizmem, E2 zawiera również bardziej zachowawcze reszty aminokwasowe, których obecność zapewnia utrzymanie właściwej struktury przestrzennej i funkcjonalności białka. Reszty te układają się w trzy rejony konserwatywne, w obrębie których zachowawczość poszczególnych pozycji przekracza 96% (Sobolev *et al.*, 2000). Pierwszy i zarazem najdłuższy z nich (pozycje 502-520) nie posiada reszt obdarzonych ładunkiem. Ze względu na jego hydrofobowość, przypisuje się mu rolę peptydu inicjującego fuzję otoczki wirionu z błoną endosomu. Dwa pozostałe (pozycje 581-590 i 612-621) zawierają przede wszystkim reszty o charakterze zasadowym, kwaśnym lub aromatycznym, które najczęściej występują w miejscach oddziaływań pomiędzy białkami (Sobolev *et al.*, 2000). Nieco niższy stopień zachowawczości przejawiają rejony, w których zidentyfikowano determinanty antygenowe i miejsca oddziaływania z receptorem CD81 (pozycje 484-491 i 543-559) (Owsianka *et al.*, 2006; Sobolev *et al.*, 2000). W specyficznych pozycjach tych obszarów także przeważają reszty aminokwasowe często zaangażowane w interakcje białko-białko, zwłaszcza tryptofanowe, tyrozynowe i histydynowe (Sobolev *et al.*, 2000).



Rysunek 1.5. Budowa białka E2.

(A) Białko E2 zakotwiczone jest w błonie otoczki za pomocą domeny hydrofobowej (niebieski prostokąt). W obrębie jego części zewnętrznej wyróżniono obszary silnie zróżnicowane (HVR1, HVR2 i HVR3; różowe prostokąty) oraz bardziej zachowawcze (fioletowe prostokąty). Konserwatywne reszty aminokwasowe ulegające glikozylacji przedstawiono na żółtym tle. Zidentyfikowano także rejon umożliwiający oddziaływanie z kinazą komórkową (PePHD; zielony prostokąt). Odcinki, którym przypisuje się udział w oddziaływaniach z cząsteczkami występującymi na powierzchni komórek gospodarza oznaczono ramkami, odpowiednio: zieloną - wiązanie z CD81, niebieską - wiązanie z SR-BI, czerwoną - wiązanie heparyny. Rejon domeny zewnętrznej zaangażowany w heterodimeryzację z białkiem E1 oznaczono fioletową ramką. Pozycje aminokwasowe odnoszą się do sekwencji HCV-1a, zdeponowanej w internetowej bazie danych GenBank pod numerem NC_004102. (B) Model struktury przestrzennej fragmentu części zewnętrznej białka E2, uzyskany metodami bioinformatycznymi (Yagnik *et al.*, 2000). Model zaprezentowano dwukrotnie, oznaczając kolorami rejonny białka E2 pełniące różne funkcje. Z lewej strony kolorami oznaczono: różowym - rejonny hiperzmiennie, fioletowym - rejonny zachowawcze, żółtym - potencjalne miejsca glikozylacji, zielonym - rejon oddziaływania z kinazą PePHD. Kolory odpowiadają prostokątom na rysunku A. Z prawej strony kolorami oznaczono rejonny zaangażowane w oddziaływanie z białkami i heparyną: niebieskim - z receptorem SR-BI, zielonym - z receptorem CD81, czerwoną - z heparyną, fioletowym - z białkiem E1. Kolory odpowiadają ramkom na rysunku A. Wizualizację modelu przeprowadzono w programie PyMOL, wykorzystując dane zdeponowane w internetowej bazie danych Protein Model Database (<http://mi.caspur.it/PMDB/>), pod numerem PM0074602.

Co ciekawe, pomimo znacznej zmienności rejonu HVR1, także w jego obrębie można wyróżnić elementy zachowawcze. Analiza ponad tysiąca sekwencji HVR1 wykazała, że rzeczywisty polimorfizm tego fragmentu ograniczony jest do 13 pozycji, podczas gdy pozostałe są zachowawcze pod względem stopnia hydrofilowości (Penin *et al.*, 2001). Kolejną stałą cechą HVR1 jest wysoki stosunek liczby reszt naładowanych dodatnio do tych naładowanych ujemnie. Znacznie przewyższa on średnią wartość występującą w innych białkach. W rezultacie, HVR1 ma najczęściej charakter zasadowy. Co więcej, również lokalizacja reszt obdarzonych ładunkiem dodatnim wykazuje pewne prawidłowości, co pozwoliło na wyróżnienie kilkunastu wzorów ich rozmieszczenia (Callens *et al.*, 2005). Równoczesna obecność reszt o wysokim poziomie zmienności, jak i rejonów zdefiniowanych pod względem stopnia hydrofilowości, sugeruje, że HVR1 może posiadać organizację podobną do domen zmiennych immunoglobulin i receptorów limfocytów T (Penin *et al.*, 2001). Hipotezę tę wydają się wspierać wyniki badań *in silico*. Stwierdzono, że komputerowy model rejonu HVR1 wykazuje znaczne podobieństwo strukturalne do domeny zmiennej przeciwciała (Hu *et al.*, 2005).

Jak już wspomniano, podstawową funkcją przypisywaną białku E2 jest oddziaływanie z receptorami i innymi cząsteczkami na powierzchni komórek gospodarza [tabela I.2].

Tabela I.2. Rejony białka E2 warunkujące oddziaływanie z cząsteczkami na powierzchni komórek gospodarza

Rejon E2	Cząsteczka na powierzchni komórki	Literatura
412-423	receptor CD81	Owsianka <i>et al.</i> , 2006
432-447		Drummer <i>et al.</i> , 2006; Owsianka <i>et al.</i> , 2006
474-494		Owsianka <i>et al.</i> , 2006; Yagnik <i>et al.</i> , 2000 ⁽¹⁾
517-535		Cocquerel <i>et al.</i> , 2006; Owsianka <i>et al.</i> , 2006
544-551		Owsianka <i>et al.</i> , 2006
612-620		Roccasecca <i>et al.</i> , 2003
384-410 (HVR1)	receptor SR-BI	Scarselli <i>et al.</i> , 2002
559-614	heparyna	Yagnik <i>et al.</i> , 2000 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ Dane uzyskane metodą modelowania *in silico*

Najlepiej scharakteryzowane są rejony E2 zaangażowane w interakcje z receptorem CD81. Ukierunkowana mutageneza białka pozwoliła określić pozycje aminokwasowe kluczowe dla tego oddziaływania, a także wskazać konkretne reszty, których obecność jest niezbędna, by wiązanie zachodziło prawidłowo (Cocquerel *et al.*, 2006; Drummer *et al.*, 2006; Owsianka *et al.*, 2006). Badania te wykazały, że

szczególnie istotne są rejony 412-423 oraz 517-535, ponieważ mutacje wprowadzone w ich obrębie znacznie obniżają powinowactwo cząstek pseudowirusowych do odpowiedniego fragmentu białka CD81. Równocześnie zaproponowano, że rejony 432-447 i 474-494 są odpowiedzialne jedynie za modulowanie oddziaływań E2 z CD81 (Owsianka *et al.*, 2006). Jednakże wnioski te wyciągnięte zostały na podstawie nie do końca jednoznacznych obserwacji. Wykazano bowiem, że motyw ⁴³⁶GWLAGLFY⁴⁴³ jest niezwykle istotny dla prawidłowego wiązania z omawianym receptorem, a cztery z jego reszt bezpośrednio oddziałują z dużą pętlą zewnątrzkomórkową CD81 (Drummer *et al.*, 2006). Interesująca i nie do końca wyjaśniona jest ponadto rola rejonów HVR1 i HVR2 w interakcji E2-CD81. Udowodniono, że białka E2 pochodzące z izolatów reprezentujących różne genotypy HCV różnią się pod względem efektywności przyłączania do receptora CD81. Szczegółowe analizy wykazały, że o skuteczności wiązania decyduje wzajemne oddziaływanie pomiędzy rejonami HVR1 i HVR2. Co ciekawe, całkowite usunięcie HVR1 powoduje wzrost efektywności wiązania białek E2, niezależnie od tego, z jakiego izolatu wirusa pochodzą. Z drugiej strony wiadomo, że obecność przeciwciał skierowanych przeciwko HVR1 bądź HVR2 obniża zdolność białka do przyłączania się do CD81. Postuluje się zatem, że HVR1 nie bierze bezpośredniego udziału w wiązaniu z CD81, lecz wywiera bardziej lub mniej negatywny wpływ na to oddziaływanie, prawdopodobnie stanowiąc zawadę przestrzenną, lub kształtując konformację E2 (Roccasecca *et al.*, 2003). Choć HVR1 wydaje się być negatywnym regulatorem przyłączania do receptora CD81, u pacjentów nigdy nie zidentyfikowano izolatu pozbawionego tego rejonu (Penin *et al.*, 2001), co sugeruje, że pełni on dodatkową istotną funkcję. Przemawia za tym również fakt, że u szympanów zakażonych zmodyfikowanym wirusem nieposiadającym HVR1, kinetyka infekcji znacznie odbiega od przeciętnej, a wirus osiąga nietypowo niskie miano (Forns *et al.*, 2000).

Znacznie mniej wiadomo na temat ewentualnego oddziaływania E2 z receptorem SR-BI. Stwierdzono, że kluczowy jest w tym przypadku rejon HVR1, którego delecja całkowicie zaburza wiązanie (Scarselli *et al.*, 2002). Ponieważ na powierzchni komórek wątroby występują receptory SR-BI, wiriony mogą efektywnie przyłączać się do nich, niezależnie od CD81. W świetle wyników badań dotyczących roli HVR1 można przypuszczać, że izolaty posiadające odmienne sekwencje tego odcinka różnią się zdolnością infekowania komórek, na powierzchni których obecny jest receptor CD81 i nie występuje SR-BI – na przykład limfocytów B (Roccasecca *et*

al., 2003). Dodatkowo zaproponowano, że naładowane dodatnio reszty aminokwasowe HVR1 oddziałują elektrostatycznie z różnego typu proteoglikanami ulokowanymi na powierzchni komórek wielu tkanek, między innymi z siarczanem heparyny (Barth *et al.*, 2003). W polimorfizmie rejonów E2 zaangażowanych w to oddziaływanie można upatrywać różnic w tropizmie poszczególnych izolatów HCV (Penin *et al.*, 2001).

Białku E2 przypisuje się także rolę czynnika hamującego odpowiedź gospodarza na infekcję wirusową. Jednym z mechanizmów obronnych komórki jest indukowana interferonem ekspresja kinazy, aktywowanej obecnością dwuniciowego RNA (ang. *dsRNA-activated protein kinase*, PKR). Kinaza ta, katalizując fosforylację czynnika inicjującego eIF2 α , powoduje inhibicję translacji. Wykazano, że w obrębie E2 występuje rejon o wysokim stopniu podobieństwa zarówno do miejsca autofosforylacji PKR, jak i miejsca fosforylacji eIF2 α . Ten obszar E2 określono skrótem PePHD (ang. *PKR-eIF2 α phosphorylation homology domain*). Dowiedziono, że rejon ten stanowi konkurencyjny wobec eIF2 α substrat dla kinazy PKR, a pojawienie się białka E2 w komórce znosi hamujące translację działanie enzymu (Taylor *et al.*, 1999). Za oddziaływanie z PKR odpowiedzialna jest niemodyfikowana forma E2, o masie ok. 38 kDa. Występuje ona w cytozolu w przeciwieństwie do formy glikozylowanej, która zakotwiczona jest w błonie siateczki wewnątrzplazmatycznej (Pavio *et al.*, 2002).

Obecnie dostępny jest jeden komputerowy model struktury przestrzennej fragmentu zewnętrznej domeny białka E2 (Yagnik *et al.*, 2000). Został on skonstruowany metodami bioinformatycznymi, na podstawie danych rentgenograficznych uzyskanych dla białka otoczki wirusa zapalenia mózgu przenoszonego przez kleszcze (ang. *tick-borne encephalitis virus*, TBEV), należącego do rodziny *Flaviviridae* [rysunek I.5B]. Przynajmniej niektóre elementy modelu wydają się odzwierciedlać rzeczywiste cechy budowy E2, ponieważ pozostają w zgodzie z danymi eksperymentalnymi w odniesieniu do rejonów białka zaangażowanych w wiązanie z receptorami czy oddziaływanie z przeciwciałami. Co ciekawe, na podstawie analizy stopnia hydrofilowości i dostępności jego poszczególnych odcinków, zaproponowano, że E2 tworzy homodimery, ułożone w orientacji głowa do ogona. Wówczas białka otoczki występowałyby w układzie tetramerycznym, E1-E2-E2-E1, ponieważ każda z dwóch cząsteczek E2 tworzyłaby równocześnie heterodimer z E1 (Yagnik *et al.*, 2000). Podobne sugestie wysunięto, analizując metodą mikroskopii krioelektronowej rozmieszczenie białek otoczki w obrębie cząstek pseudowirusowych (ang. *HCV-like particles*, HCV-LP) (Yu *et al.*, 2007).

I.1.5 Przynależność systematyczna i pochodzenie

Wirus zapalenia wątroby typu C jest przedstawicielem rodzaju *Hepacivirus* w rodzinie *Flaviviridae* i pierwszym wirusem w historii, który został zidentyfikowany metodami biologii molekularnej. W latach 80. XX wieku stało się jasne, że znaczna część przypadków zapalenia wątroby związanego z przebyciem wcześniej transfuzją krwi, nie jest wywołana przez znane wówczas wirusy typu A czy B. Pomimo licznych prób, nie udało się oznaczyć czynnika infekcyjnego za pomocą klasycznych technik immunologicznych. Dopiero analiza cDNA, pochodzących z surowicy zakażonego doświadczalnie szympansa, pozwoliła stwierdzić, że za obserwowane infekcje odpowiedzialny jest nowy wirus, nazwany wirusem zapalenia wątroby typu C (Choo *et al.*, 1989). Wkrótce sklonowane zostały różnej długości fragmenty cDNA kilku odrębnych izolatów HCV, pochodzących z różnych rejonów świata (Chan *et al.*, 1992; Mori *et al.*, 1992; Okamoto *et al.*, 1992a; Okamoto *et al.*, 1992b). Porównanie sekwencji tych izolatów wykazało, że istnieją pomiędzy nimi istotne różnice. Przyjęty system klasyfikacyjny wyróżnia sześć głównych genotypów HCV, oznaczonych cyframi arabskimi od 1 do 6, oraz kilkadziesiąt podtypów, oznaczonych literami od a do t (Simmonds *et al.*, 2005). Izolaty należące do odmiennych genotypów różnią się między sobą 31-34% pozycji nukleotydowych, przy porównaniu pełnych sekwencji genomowych. Różnice pomiędzy podtypami należącymi do tego samego genotypu są mniejsze i wynoszą ok. 20-23% pozycji nukleotydowych (Simmonds, 2000). Częstość występowania poszczególnych podtypów w poszczególnych rejonach świata jest różna. W Europie i Ameryce Północnej przeważają podtypy 1a, 1b, 2a, 2b oraz 3a, przy czym podtypy 1a i 3a występują najczęściej u osób zakażonych wskutek używania niesterylnych igieł podczas dożylnego podawania narkotyków. W krajach Środkowego Wschodu oraz północnej i centralnej Afryki dominuje genotyp 4. W Afryce południowej występuje podtyp 5a, natomiast w zachodniej – genotypy 1 i 2, obejmujące więcej niż 20 podtypów. W Japonii, części Chin i na Tajwanie przeważają podtypy 1b, 2a i 2b, natomiast w Tajlandii, Indonezji i Hong-Kongu genotypy 3 i 6 (Simmonds, 2000, 2001).

Pochodzenie HCV jest nieznane. Jak wiadomo, ludzki wirus upośledzenia odporności (ang. *human immunodeficiency virus*, HIV) wywodzi się od małych wirusów, infekujących szympansy i mangaby (Gao *et al.*, 1999; Gao *et al.*, 1992). Wskutek przekroczenia bariery międzygatunkowej doszło do jego przeniesienia na populację ludzką, a następnie rozprzestrzenienia się na wszystkich kontynentach. Biorąc

pod uwagę podobieństwa sposobów zakażenia HIV i HCV, można wysunąć przypuszczenie, iż HCV także przeszedł analogiczną drogę. Takie założenie wydaje się jednak być nieuprawnione, ponieważ nie ma żadnych dowodów na to, że w warunkach naturalnych HCV infekuje małpy Starego Świata. Z drugiej strony wykazano, że spokrewniony z HCV wirus GBV-B (ang. *GB virus B*), zakaża tamaryny (małpy z rodzaju *Saguinus*) i inne naczelne Nowego Świata. Z pewnością wymagane jest przeprowadzenie w przyszłości dalszych, szerzej zakrojonych badań, mających na celu wykrycie wirusów podobnych do HCV u małp (Simmonds, 2004). Obecnie dysponujemy jedynie przesłankami, umożliwiającymi odtworzenie prawdopodobnej historii HCV w populacji ludzkiej. Po pierwsze, analizując wspomniane dane dotyczące rozmieszczenia poszczególnych genotypów wirusa, można przyjąć, że powstały one niezależnie od siebie. Ponadto, izolaty HCV należące do genotypów 3 i 6 i występujące w południowo-wschodniej Azji, oraz te należące do genotypów 1, 2 i 4 i pochodzące z Afryki, cechują się o wiele większym poziomem zróżnicowania, aniżeli izolaty europejskie czy północnoamerykańskie. Silne zróżnicowanie izolatów świadczy najprawdopodobniej o długim czasie obecności wirusa w danej populacji – można zatem sądzić, że HCV występował początkowo w Afryce i/lub Azji, a dopiero później zainfekował mieszkańców Europy i Ameryki Północnej. Na podstawie analizy zróżnicowania izolatów, można ponadto określić moment pojawienia się poszczególnych genotypów. Konieczna jest jednak znajomość liczby mutacji powstających w jednostce czasu, w przeliczeniu na miejsce w genomie. Wartość ta nieco się różni, w zależności od analizowanego fragmentu genomu (Simmonds, 2000; Smith *et al.*, 1997). W badaniach genotypów HCV zdecydowano się przyjąć wartości obliczone dla sekwencji genów E1 i NS5. Aby je wyznaczyć, analizowano próby, pobrane od grupy pacjentów, zakażonych 17 lat wcześniej tym samym zanieczyszczonym preparatem immunoglobulin (Power *et al.*, 1994; Smith *et al.*, 1997). Porównując sekwencje izolatów wirusa pobranych od tych pacjentów z sekwencją wyjściową stwierdzono, że w ciągu roku, w przeliczeniu na jedno miejsce w genomie, powstaje 7×10^{-4} i 4×10^{-4} mutacji, odpowiednio dla E1 i NS5 (Simmonds, 2001; Smith *et al.*, 1997). Przyjmując takie tempo mutacji obliczono, że dywergencja izolatów należących do genotypu 1b i pochodzących od pacjentów z różnych kontynentów, nastąpiła w latach 30. i 40. XX wieku. Ten genotyp rozprzestrzenił się dość szybko, najprawdopodobniej wraz z rozpowszechnieniem szczepionek i transfuzji krwi. W obrębie genotypów 1a i 3a zróżnicowanie jest jeszcze mniejsze, co wskazuje, że

dywergencja zaszła niedawno, prawdopodobnie w latach 60. ubiegłego stulecia. Niestety, podobne szacunki dla bardziej polimorficznych, starszych genotypów oraz próby określenia czasu wyodrębnienia się sześciu genotypów ze wspólnego przodka są obarczone dużym ryzykiem popełnienia błędu. Obliczono, że znane obecnie genotypy powstały około 300-350 lat temu, co wydaje się ogromnym niedoszacowaniem z epidemiologicznego punktu widzenia (Simmonds, 2000, 2004). Błąd wynikać może z faktu, że ewolucja genomów RNA podlega większym ograniczeniom, aniżeli ewolucja organizmów pro- i eukariotycznych, dla których stworzono modele tzw. zegara molekularnego. Dzieje się tak, ponieważ nawet mutacje synonimiczne, niemające wpływu na właściwości białek i selekcję na tym poziomie, mogą w znaczny sposób zaburzać kluczową w cyklu replikacyjnym wirusów strukturę RNA. W rezultacie, liczba neutralnych miejsc, które mogą podlegać zmianom bez wpływu na właściwości fenotypowe, staje się znacznie ograniczona. Na podstawie porównań ze spokrewnionymi wirusami oraz danych epidemiologicznych zaproponowano zatem, że HCV mógł powstać nawet wcześniej niż 150 000 lat temu (Simmonds, 2004).

1.2 Populacja wirusa zapalenia wątroby typu C jako quasi-gatunek

Różnorodność genetyczna wirusa zapalenia wątroby typu C może być rozpatrywana na kilku poziomach. Najbardziej oczywiste i znaczące różnice występują pomiędzy sekwencjami izolatów należących do różnych genotypów i podtypów. Drugim poziomem jest zmienność powstała w ciągu krótszego czasu ewolucji wirusa, obserwowana podczas porównań izolatów należących do tego samego podtypu, lecz pochodzących z niezależnych epidemiologicznie infekcji. Trzecim poziomem jest zmienność poszczególnych wariantów, obecnych w pojedynczym zainfekowanym organizmie. Podobnie jak dzieje się to w przypadku innych wirusów RNA, HCV występuje w organizmie pacjenta jako zbiór spokrewnionych, lecz zróżnicowanych genetycznie wariantów, tworząc tym samym populację nazwaną quasi-gatunkiem (Martell *et al.*, 1992).

1.2.1 Koncepcja quasi-gatunku i jej implikacje

Pojęcie quasi-gatunku zostało użyte po raz pierwszy w teorii Manfreda Eigena, opisującej ewolucję makrocząsteczek przed powstaniem życia na Ziemi. Terminem tym określono grupę zróżnicowanych, lecz podobnych do siebie cząsteczek zdolnych do samopowieliania i ewoluujących pod wpływem zmian środowiska jako pojedyncza

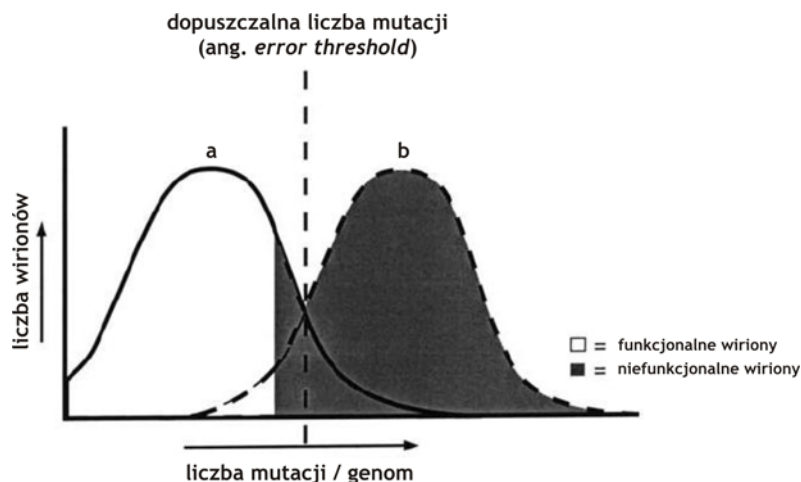
formacja. Zgodnie z założeniem tej teorii, wyłącznie dzięki istnieniu quasi-gatunku, ewolucja mogła przybrać właściwe sobie tempo, które doprowadziło do powstania form ożywionych. W przeciwnym razie, wszelkie zmiany zachodziłyby wielokrotnie wolniej, co znacznie opóźniłoby moment powstania życia (Eigen, 1971). Kilka lat po sformułowaniu tej teorii okazało się, że jej przewidywania doskonale korespondują z danymi uzyskanymi w odniesieniu do populacji faga Q β . Stwierdzono bowiem, że genomu tego wirusa nie można opisać jako pojedynczej sekwencji, lecz raczej jako średnią ważoną wielu zróżnicowanych wariantów (Domingo *et al.*, 1978). Podobne spostrzeżenie poczyniono w stosunku do wirusów RNA i retrowirusów (Domingo *et al.*, 1998; Figlerowicz *et al.*, 2003; Holland *et al.*, 1982). Wraz z tymi obserwacjami, klasyczne rozróżnienie pomiędzy typem dzikim a mutantem stało się nieuprawnione w stosunku do tych patogenów. Podstawową cechą quasi-gatunku jest jego dynamika, wynikająca z nieustannie zachodzącej adaptacji do zmieniających się warunków środowiska. Najczęściej quasi-gatunek tworzy jeden lub kilka wariantów dominujących oraz znaczna liczba wariantów o sekwencji wykazującej mniej lub więcej różnic w stosunku do dominantów (Figlerowicz *et al.*, 2003). Charakteryzują się one także zróżnicowanym potencjałem replikacyjnym i poziomem przystosowania do określonych warunków, mierzonym zdolnością do wytworzenia infekcyjnych wirionów potomnych. Populacja wirusowa obejmuje więc zestaw genomów, mogących teoretycznie zawierać wszystkie mutacje, o ile tylko nie powodują one utraty funkcjonalności wirionu (Vignuzzi *et al.*, 2005). Czynnikiem kształtującym quasi-gatunek jest presja selekcyjna. W przypadku działania selekcji pozytywnej, proces różnicowania populacji wirusowej ulega przyspieszeniu, a nowo powstające mutacje mogą zostać utrwalone. Z kolei selekcja negatywna prowadzi do zmniejszenia różnorodności populacji i eliminacji określonych wariantów wirusowych. Infekcję wirusa RNA można zatem przyrównać do przebiegu eksperymentu selekcji RNA (ang. *systematic evolution of ligands by exponential enrichment*, SELEX), zachodzącego w warunkach *in vivo*. Na początku wirion zakaża komórkę i zaczyna namnażać się w niej, dając początek populacji zróżnicowanych wariantów. Opuszczając komórkę, wiriony potomne są poddawane kolejno czterem etapom presji selekcyjnej. W rezultacie, dochodzi do wyselekcjonowania wariantów infekcyjnych, posiadających zdolność do efektywnej replikacji, unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza oraz wykazujące oporność na stosowane leki (Figlerowicz *et al.*, 2003). O tym, na ile populacja wirusowa się zmienia i jak szerokie spektrum wariantów obejmuje, decyduje natura

czynnika selekcyjnego. Przykładowo, do nabycia oporności na pojedynczy lek przeciwwirusowy wystarczy zwykle jedna lub kilka mutacji. W przypadku często stosowanych leków z grupy analogów nukleozydów substytucja za ledwie pojedynczej reszty aminokwasowej w obrębie polimerazy wirusowej może w istotny sposób ograniczyć działanie terapeutycznego (np. poprzez zmniejszenie powinowactwa enzymu do podanego związku). Bardziej znaczące zmiany w populacji indukowane są przez modyfikacje tropizmu tkankowego wirusa czy odpowiedź immunologiczną gospodarza (Domingo i Gomez, 2007).

Zgodnie z przewidywaniami quasi-gatunek, nie jest zbiorem niezależnych cząstek, lecz tworzące go warianty mają zdolność wzajemnego oddziaływania na siebie. Ta właściwość quasi-gatunku sprawia, że ewoluuje on jako formacja elementów, a celem presji selekcyjnej jest nie tyle pojedynczy wariant, co cała populacja. Analizy prowadzone przy wykorzystaniu teoretycznych modeli pozwoliły ustalić, że potencjalnie najlepiej przystosowany wariant niekoniecznie musi osiągnąć pozycję dominującą w populacji. Jego status jest także uzależniony od innych wariantów, wśród których się znajduje. Innymi słowy, spektrum sprzyjających elementów otaczających może decydować o uzyskaniu dominującej pozycji przez wariant, który w innym przypadku nie miałby na to szans. W ten sposób, oddziaływania pomiędzy cząstkami tworzącymi quasi-gatunek mogą mieć charakter supresji lub komplementacji. Ta teoretyczna prawidłowość znalazła swoje odzwierciedlenie w populacjach wirusowych, czego dowiedziono w szeregu badań przeprowadzonych *in vivo* i w kulturach komórkowych (Domingo i Gomez, 2007; Domingo *et al.*, 2006). Przykładowo zaobserwowano, że spektrum elementów populacji wirusa pęcherzykowego zapalenia jamy ustnej (ang. *vesicular stomatitis virus*, VSV) wywierało negatywny wpływ na lepiej przystosowany wariant, dopóki nie występował on z odpowiednio wysoką częstością (de la Torre i Holland, 1990).

O ile quasi-gatunkowy charakter populacji wirusowej zapewnia jej przetrwanie w skrajnie różnych warunkach, o tyle może też decydować o jej wyginięciu. Dzieje się tak wówczas, gdy do genomów potomnych wprowadzanych jest zbyt wiele mutacji, czego wynikiem jest powstawanie niefunkcyjnych wirionów, niezdolnych do dalszego podtrzymywania infekcji. Okazuje się, że w przypadku wirusów RNA można mówić o dopuszczalnej liczbie zmian w genomie (ang. *error threshold*), której przekroczenie jest letalne dla poszczególnych wirionów. Jeżeli większość cząstek

wirusowych posiada zbyt dużą liczbę zmian, to prowadzi to do wyginięcia zmutowanej populacji (ang. *error catastrophe*) [rysunek I.6].



Rysunek I.6. Model quasi-gatunku wirusowego na progu dopuszczalnej liczby mutacji.

W typowej populacji wirusa RNA (a) przeważają funkcjonalne wiriony, które przejawiają zróżnicowanie nieprzekraczające określonej dopuszczalnej liczby mutacji (kolor biały). Oprócz nich pojawiają się także cząstki wirusowe, w których doszło do nagromadzenia letalnej liczby zmian w genomie (kolor czarny). Wzrost częstości mutacji powyżej krytycznej wartości powoduje przewagę niefunkcjonalnych wirionów i wyginięcie zmutowanej populacji wirusowej (b). [Z Vignuzzi *et al.*, 2005, zmienione. Adapted from, *Virus Research* 107/2, Vignuzzi, M., Stone, J.K., Andino, R., Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications, 173-181, Copyright (2005), with permission from Elsevier. Also from PNAS, 98/12, Crotty, S., Cameron, C.E., Andino, R., RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin, 6895-6900, Copyright (2001).]

Obecny stan wiedzy pozwala sądzić, że wirusy RNA istnieją niejako na progu dopuszczalnej liczby zmian w genomie (Domingo, 2000; Vignuzzi *et al.*, 2005), ponieważ zastosowanie mutagenów RNA i wynikające z tego wymuszone przekroczenia tej granicy, powoduje spadek miana wirusa (Crotty *et al.*, 2001; Severson *et al.*, 2003; Sierra *et al.*, 2000) Chociaż w pobliżu tego progu w populacji powstaje wiele niefunkcjonalnych wirionów, to jednak liczba właściwych wariantów dominuje. Dodatkowo zapewniona jest możliwie duża różnorodność w obrębie populacji (Vignuzzi *et al.*, 2005). Najważniejsze cechy quasi-gatunku wirusowego podsumowano w tabeli [tabela I.3].

Tabela 1.3. Podstawowe cechy quasi-gatunku wirusowego [wg Domingo i Gomez, 2007, zmienione]

Quasi-gatunek
• Populacja wirusowa obecna w pojedynczym zainfekowanym organizmie jest zbiorem spokrewnionych, lecz zróżnicowanych wariantów.
• Warianty tworzące populację wirusową wykazują różne stopnie przystosowania do warunków środowiska.
• Presja selekcyjna kształtuje quasi-gatunek, wymuszając zmienność tworzących go wariantów.
• Szerokie spektrum zróżnicowanych wariantów przyczynia się do zwiększenia stopnia przystosowania populacji wirusowej.
• Pomędzy poszczególnymi wariantami populacji może dochodzić do oddziaływań pozytywnych (komplementacja) lub negatywnych (supresja).
• Liczba mutacji w genomie, przekraczająca dopuszczalną wartość (ang. <i>error threshold</i>), prowadzi do powstawania niefunkcyjnych wirionów.
• Wzrost liczby niefunkcyjnych wirionów powoduje wyginięcie populacji wirusowej (ang. <i>error catastrophe</i>).

1.2.2 Polimorfizm genetyczny HCV

U podłoża powstawania quasi-gatunku wirusowego, leży ogromna zmienność genetyczna wirusów RNA i retrowirusów (Figlerowicz *et al.*, 2003). Jej podstawową przyczyną jest nieprecyzyjna replikacja genomu wirusowego przez polimerazę pozbawioną aktywności 3'→5' egzonukleolitycznej. Jak zaznaczono powyżej, częstość wprowadzania mutacji przez polimerazę HCV to najprawdopodobniej 10^{-3} - 10^{-5} (Gomez *et al.*, 1999). Wiedząc, że podczas jednego dnia wirerii powstaje 10^{12} wirionów potomnych oraz znając długość genomu HCV (w przybliżeniu 10^4 nukleotydów), można łatwo obliczyć, że w tak krótkim czasie, we wszystkich genomach wirusowych obecnych w organizmie pacjenta, zachodzi 10^7 - 10^9 mutacji. Chociaż z pewnością wiele z nich jest letalnych, to jednak liczby te doskonale ilustrują potencjał quasi-gatunku do tworzenia wariantów opornych na działanie układu immunologicznego i stosowane leki (Figlerowicz *et al.*, 2003). Zgodnie z obecnym stanem wiedzy można przyjąć, że polimeraza wirusowa popełnia błędy w sposób losowy. Jednocześnie jednak, obserwowana częstość mutacji jest różna dla poszczególnych miejsc w genomie HCV (Simmonds, 2004). Liczba utrwalanych zmian jest zatem kształtowana przez presję selekcyjną, a istnienie elementów bardziej zachowawczych jest z pewnością uwarunkowane koniecznością utrzymania cech kluczowych dla prawidłowego przebiegu cyklu replikacyjnego wirusa.

Dodatkowym źródłem polimorfizmu wirusów RNA jest rekombinacja genetyczna, wskutek której dochodzi do kompleksowych rearanżacji genomu (Figlerowicz *et al.*, 2003). Rekombinacja RNA zachodzi według mechanizmu

wybiórczego kopiowania (ang. *copy-choice*), gdy w trakcie syntezy nowej cząsteczki replikaza wirusowa dokonuje przeskoku z jednej matrycy, zwanej donorem, na inną, zwaną akceptorem. Skutkiem tego jest utworzenie nici potomnej, powstałej na podstawie dwóch cząsteczek macierzystych (Figlerowicz i Bujarski, 1997). Początkowo uważano, że zjawisko to nie odgrywa istotnej roli w generowaniu zmienności HCV, ponieważ – w przeciwieństwie do wirusa HIV – występowanie rekombinantów wydawało się być bardzo rzadkie (Viazov *et al.*, 2000). Pogląd taki utrzymywał się także dlatego, że próby skonstruowania w warunkach laboratoryjnych funkcjonalnych chimerycznych replikonów 1a/1b wykazały, że połączenie dwóch różnych genomów nie może nastąpić w dowolnym miejscu (Gates *et al.*, 2004). W ostatnich latach scharakteryzowano jednakże szereg naturalnie występujących rekombinantów, zarówno powstałych podczas rekombinacji w obrębie różnych genotypów, jak i tego samego podtypu (Kageyama *et al.*, 2006; Kalinina *et al.*, 2002; Legrand-Abravanel *et al.*, 2007; Sentandreu *et al.*, 2008), co sugeruje, że dalsze badania mogą wkrótce doprowadzić do określenia rzeczywistego wpływu rekombinacji na zmienność HCV.

1.2.3 Metody analizy struktury quasi-gatunku HCV

Ze względu na niski poziom akumulacji HCV w surowicy, niemożliwa jest bezpośrednia analiza wariantów tworzących quasi-gatunek, tak jak zostało to zrobione chociażby w przypadku faga Q β (Domingo *et al.*, 1978). Niezależnie więc od wyboru ostatecznej metody badawczej, pierwszym etapem jest zawsze odwrotna transkrypcja i amplifikacja powstałego cDNA (ang. *reverse transcription – polymerase chain reaction*, RT-PCR). W rezultacie, ogromna większość stosowanych obecnie podejść polega w rzeczywistości na badaniu populacji cząsteczek DNA, odpowiadających wybranym fragmentom genomu HCV. Ponadto, najczęściej analizie poddaje się jedynie warianty obecne w niewielkiej próbce surowicy, pobieranej od pacjenta podczas standardowego badania krwi. Jednocześnie należy pamiętać, iż mogą wystąpić różnice w sekwencjach genomów cząstek wirusowych izolowanych z surowicy, jednojądrzastych komórek krwi obwodowej czy wątroby (Maggi *et al.*, 1997). Biorąc pod uwagę powyższe ograniczenia należałoby przyjąć, że wykrywane są tylko warianty wirusowe występujące w populacji w przeważającej liczbie (Gomez *et al.*, 1999).

Pierwszą zastosowaną metodą analizy populacji HCV było klonowanie i sekwencjonowanie produktów reakcji RT-PCR, w której namnożono DNA, odpowiadające rejonom 5'UTR i NS3. Sekwencjonowaniu poddano od 6 do 20

niezależnych klonów, z których każdy reprezentował pojedynczy genom wirusowy (Martell *et al.*, 1992). Analogiczne podejście było używane wielokrotnie (Booth *et al.*, 1998; Chambers *et al.*, 2005; Farci *et al.*, 2002; Ueda *et al.*, 2004), także w analizie DNA, odpowiadających niemal pełnej długości cząsteczek genomowym HCV (Xu *et al.*, 2008). Metoda wykorzystująca sekwencjonowanie jest czasochłonna, jednakże jest też jedyną, która oprócz danych na temat poziomu zróżnicowania populacji wirusowej, dostarcza także informacji o sekwencji reprezentujących ją wariantów. Kluczowym elementem, który należy wziąć pod uwagę stosując podejście tego typu, jest liczba analizowanych klonów. Naturalnie, z sekwencjonowaniem tylko jednego klonu związane jest znaczne prawdopodobieństwo poznania wariantu występującego najczęściej. Analiza większej liczby klonów, najczęściej 20, zapewnia wykrycie wariantów mających mniejszy udział w populacji. Zazwyczaj quasi-gatunek wirusowy składa się z więcej niż jednego dominanta i szerokiego spektrum wariantów towarzyszących. Na podstawie dotychczasowych doświadczeń można sądzić, że podejście wykorzystujące klonowanie właściwie charakteryzuje populację wirusową (Gomez *et al.*, 1999).

Aby oszacować zróżnicowanie populacji, można zamiast sekwencjonowania zastosować metody bazujące na rozdziale elektroforetycznym. Plazmidy, do których wprowadzono dwuniciowy DNA odpowiadający wirusowemu RNA wykorzystuje się jako matryce w reakcjach PCR. Następnie, poszczególne produkty uwidacznia się rozdzielając je w żelu. Jedną z takich technik jest analiza polimorfizmu konformacji jednoniciowych DNA (ang. *single-strand conformation polymorphism*, SSCP), w której zdenaturowane cząsteczki poddaje się rozdziałowi elektroforetycznemu w warunkach natywnych (Pawlotsky *et al.*, 1998a; Pawlotsky *et al.*, 1998b; Toyoda *et al.*, 1997b). Cząsteczki o odmiennych sekwencjach przyjmują wówczas różne konformacje i w rezultacie wykazują różne prędkości przemieszczania się w żelu, dzięki czemu można określić, ile wariantów występuje w badanym zestawie klonów. Alternatywną metodą jest rozdział produktów PCR, w żelu zawierającym gradient czynnika denaturującego (ang. *denaturing gradient gel electrophoresis*, DGGE) (Harris i Teo, 2001).

Etap klonowania pomijany jest w podejściu wykorzystującym elektroforetyczną analizę migracji heterodupleksów (ang. *heteroduplex mobility assay*, HMA). W metodzie tej, znakowaną sondę poddaje się hybrydyzacji z DNA powstałym w wyniku reakcji RT-PCR na matrycy wirusowej cząsteczki genomowej (Sullivan *et*

al., 1998). Reakcją kontrolną jest próba, zawierająca cząsteczki w pełni komplementarne do sondy i tym samym tworzące z nią tzw. homodupleksy. Następnie prowadzi się elektroforetyczny rozdział prób w warunkach natywnych, podczas którego najszybsze tempo migracji wykazują homodupleksy. Wśród heterodupleksów najszybciej migrują te, które zawierają cząsteczki o największym stopniu komplementarności do sondy. Początkowo postulowano, że odległości w żelu pomiędzy homo- a heterodupleksami są proporcjonalne do liczby różnic w ich sekwencjach nukleotydowych, wykazano jednak, że jest to pewne uproszczenie. Ponadto w przypadku metod wykorzystujących elektroforezę, utrudnione jest rozróżnienie wariantów zawierających mutacje synonimiczne od tych, posiadających zmiany wpływające na sekwencję kodowanego białka.

Bardzo często końcowym etapem analizy quasi-gatunku HCV za pomocą technik elektroforetycznych jest sekwencjonowanie, przy czym zwykle sekwencjonuje się ograniczoną liczbę wybranych klonów, dla których otrzymano różny układ prążków. Podstawową wadą ograniczającą szerokie zastosowanie tego typu metod jest konieczność opracowania i utrzymania ściśle powtarzalnych warunków rozdziału elektroforetycznego. Dotyczy to zwłaszcza temperatury i wartości pH. Wydaje się zatem, że wykorzystanie technik elektroforetycznych będzie stopniowo malało, szczególnie w obliczu szybkiego rozwoju masowych metod sekwencjonowania.

W ostatnich latach zaproponowano nową całkowicie odmienną strategię analizy struktury quasi-gatunku HCV, bazującą na spektrometrii mas (Ayers *et al.*, 2002; Yea *et al.*, 2007). W reakcji RT-PCR tworzone są amplikony, które w kolejnym etapie są wprowadzane do lizatu z retikulocytów królika, gdzie ulegają transkrypcji, a następnie translacji *in vitro*. Powstające peptydy poddawane są izolacji oraz analizie mas w spektrometrze MALDI-TOF (ang. *matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight*). Jak oceniają autorzy, czułość tej procedury jest porównywalna do sekwencjonowania 20 niezależnych klonów i umożliwia wykrycie wariantu stanowiącego 5% populacji wirusowej (Yea *et al.*, 2007).

Poznanie sekwencji nukleotydowej wariantów tworzących quasi-gatunek to jedynie wstępny etap analizy struktury populacji wirusowej (Domingo *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 1999). Podstawowym parametrem stosowanym w jej opisie jest złożoność quasi-gatunku (ang. *quasispecies complexity*). Określenie stopnia złożoności populacji wirusowej obejmuje obliczenie udziału poszczególnych wariantów w populacji oraz wyznaczenie poziomu ich wzajemnego zróżnicowania. Początkowa faza analizy polega

na zestawieniu i porównaniu otrzymanych sekwencji wariantów [rysunek I.7]. W rezultacie określona zostaje liczba różnych wariantów w zbiorze. Następnie, częstość występowania danego wariantu może być wyrażona za pomocą wartości liczbowej, określającej, ile razy cząsteczka o tej samej sekwencji została zidentyfikowana wśród badanych klonów. Alternatywnym sposobem wyrażenia proporcji różnych sekwencji w spektrum wariantów jest zastosowanie miary matematycznej, zwanej entropią Shannona. Uwzględnia ona prawdopodobieństwo pojawienia się różnych wariantów w określonym punkcie czasowym (Cabot *et al.*, 2000). Poziom zróżnicowania wariantów przedstawia się za pomocą odległości Hamminga. Miara ta jest definiowana jako liczba mutacji, różniąca dwie sekwencje. Średnia wartość tego parametru, uzyskana wskutek porównania wszystkich możliwych par wariantów reprezentujących quasi-gatunek, odzwierciedla poziom jego zróżnicowania. Niektóre analizy mają na celu ustalenie tylko jednej sekwencji nukleotydowej lub aminokwasowej, reprezentującej daną populację wirusową. W tym celu tworzy się tzw. sekwencję zgodną (ang. *consensus sequence*), powstałą w następstwie porównania wszystkich wariantów i wyodrębnienia nukleotydów czy reszt aminokwasowych, które przeważają w danej pozycji [rysunek I.7]. Powstała w ten sposób uśredniona sekwencja charakteryzuje daną populację, chociaż w rzeczywistości może w niej nie występować (Domingo *et al.*, 2006; Gomez *et al.*, 1999).

numer klonu	sekwencja	numer wariantu	udział wariantu w populacji
1	RTHVTGGDVAQT TARVASFALGPKQN	1	8/20 (40%)
2		
3		
4		
5		
6		
7		
8		
9S.....	2	4/20 (20%)
10S.....		
11S.....		
12S.....		
13A.....S.....	3	1/20 (5%)
14G.....T.....	4	1/20 (5%)
15G.....L.S.....	5	1/20 (5%)
16G.....G.....L.T.....	6	4/20 (20%)
17G.....G.....L.T.....		
18G.....G.....L.T.....		
19G.....G.....L.T.....		
20	T.....G.....G.....L.T.....		
	rTHVTGGdvAQTTArVASFfaLGPKQN	7	1/20 (5%)

sekwencja zgodna (ang. *consensus sequence*)

Rysunek 1.7. Schemat analizy wybranych parametrów quasi-gatunku HCV.

Na rysunku przedstawiono sekwencje aminokwasowe rejonu HVR1 20 klonów, reprezentujących przykładowy quasi-gatunek HCV. Kropkami oznaczono reszty aminokwasowe niezmienione w stosunku do klonu numer 1. Klony o identycznej sekwencji reprezentują pojedynczy wariant. W przykładowej populacji zidentyfikowano 7 wariantów, stanowiących od 5 do 40% badanej próby. Skonstruowano również sekwencję zgodną, która w analizowanym przypadku jest identyczna z sekwencją najpowszechniej występującego wariantu. W obrębie sekwencji zgodnej, wielkimi literami oznaczono reszty aminokwasowe identyczne dla wszystkich 20 klonów.

I.3 Zakażenia HCV i ich terapia

I.3.1 Przebieg zakażenia

Wirus zapalenia wątroby typu C należy do najbardziej rozpowszechnionych patogenów człowieka. Zakażenie tym wirusem jest istotną przyczyną chorób wątroby, w tym: ostrego zapalenia (20% przypadków zachorowań w Europie oraz Ameryce Północnej), przewlekłego zapalenia (70%), marskości (40%) i pierwotnego raka wątrobowokomórkowego (60%). Ponadto, około 30% wskazań do transplantacji wątroby spowodowane jest jej nieodwracalnym uszkodzeniem, będącym następstwem zakażenia HCV (Castellano, 2000).

Infekcja HCV następuje przez kontakt z zakażoną krwią. Przed wdrożeniem standardowych badań na obecność wirusa, najczęściej do zakażenia dochodziło podczas transfuzji krwi czy podawania preparatów krwiopochodnych, oraz stosowania niesterylnego sprzętu medycznego w trakcie szczepień, operacji chirurgicznych, dializy lub endoskopii. Obecnie w krajach wysokorozwiniętych te przyczyny zostały w dużej

części wyeliminowane, a główną drogą zakażenia HCV stało się dożylnie podawanie narkotyków za pomocą niesterylnych igieł. Rzadziej do infekcji może dojść poprzez kontakty seksualne lub wskutek przeniesienia wirusa z matki na dziecko w ciąży i okresie okołoporodowym (Castellano, 2000; Chen i Morgan, 2006).

Początkowy etap zakażenia HCV, tzw. ostre zapalenie wątroby (ang. *acute hepatitis C*), jest u przeważającej liczby osób bezobjawowe, co praktycznie wyklucza wczesną diagnozę. Zwykle okres inkubacji wirusa wynosi od 3 do 20 tygodni (przeciętnie 7). Zachodzi wówczas replikacja HCV w wątrobie, prowadząca do nekrozy komórek wątrobowych i powstania stanu zapalnego. Wraz z jego nasilaniem się, w ciągu pierwszych 2-8 tygodni, następuje podwyższenie poziomu aktywności aminotransferazy alaninowej (AlAT) w surowicy. Jednocześnie, w pierwszym lub drugim tygodniu, możliwe jest ujawnienie w surowicy obecności wirusowego RNA (Castellano, 2000). Około 1-1,5 dnia później identyfikuje się antygen rdzeniowy HCV (HCVAg), czyli białko C (Czepiel *et al.*, 2008). Po upływie około 1-3 miesięcy wykrywa się przeciwciała anti-HCV przy użyciu testów immunoenzymatycznych. U 15-25% osób dochodzi do wyeliminowania patogenu przed upływem 6 miesięcy od zakażenia. Obserwuje się wtedy obniżenie aktywności aminotransferazy alaninowej w surowicy, a RNA wirusowy staje się niewykrywalny. Do tej pory nie poznano dokładnie mechanizmów odpowiedzialnych za to zjawisko i nie wyjaśniono, dlaczego zachodzi tylko u niektórych zakażonych (Castellano, 2000). W przypadku większości, infekcja HCV nabiera trwałego charakteru i prowadzi do rozwoju przewlekłego zapalenia wątroby (ang. *chronic hepatitis C*, CHC). Na podstawie wieloletnich obserwacji zidentyfikowano kilka czynników, zwiększających prawdopodobieństwo wystąpienia przewlekłej infekcji. Należą do nich: wiek w chwili zakażenia (powyżej 25. roku życia), płeć męska, rasa czarna, brak objawów w przebiegu fazy ostrej, równoczesne zakażenie wirusem HIV, czy poddanie immunosupresji (Chen i Morgan, 2006). Oprócz tych uwarunkowań, postuluje się także, że istotne znaczenie może mieć genotyp wirusa. Samoistna eliminacja patogenu podczas zakażenia HCV-1b jest bowiem rzadsza, aniżeli w przypadku innych genotypów (Amoroso *et al.*, 1998). Stopień zaawansowania przewlekłego zapalenia wątroby ocenia się na podstawie analizy histopatologicznej wycinka narządu, pobranego podczas biopsji. Określana jest wówczas aktywność zapalna i nasilenie włóknienia. W rezultacie, można wyodrębnić pacjentów, dla których prawdopodobieństwo postępującego uszkodzenia wątroby i wystąpienia marskości jest niewielkie. Jest to grupa około 25-30% osób o niewielkich

zmianach zapalnych oraz nieznacznym włóknieniu i jednocześnie z poziomem aktywności AlAT nieprzekraczającym normy. U pacjentów z podwyższonym poziomem aktywności aminotransferazy, najczęściej rozwija się marskość wątroby. Co ciekawe, okres od zakażenia do jej wystąpienia jest bardzo zróżnicowany, stąd obecnie mówi się o trzech grupach pacjentów: z szybkim (5-10 lat), umiarkowanym (11-30 lat) i wolnym (powyżej 30 lat) tempem rozwoju marskości. Szacuje się, że w rzeczywistości dochodzi do niej u 20-30% pacjentów. W przypadku pojawienia się marskości wątroby, zdecydowanie wzrasta ryzyko niewydolności tego narządu i, w konsekwencji, wystąpienia dodatkowych schorzeń. Jej następstwem może być również pierwotny rak wątrobowokomórkowy. Powstałe w ten sposób zniszczenia wątroby są nieodwracalne, a jedynym sposobem leczenia w takich przypadkach pozostaje transplantacja. Przewlekłe zakażenie HCV jest ponadto przyczyną chorób pozawątrobowych, z których najczęściej występuje krioglobulinemia, polegająca na produkcji i akumulacji w różnych organach nieprawidłowych kompleksów immunoglobulin. Skutkiem infekcji HCV mogą też być m.in.: zapalenie kłębuszków nerkowych, choroby skóry, autoimmunologiczne zapalenie tarczycy oraz przypuszczalnie rozwój niektórych chłoniaków (Castellano, 2000; Chen i Morgan, 2006).

1.3.2 Odpowiedź immunologiczna

Podczas zakażenia HCV, dochodzi do indukcji zarówno odpowiedzi humoralnej, jak i komórkowej. Układ immunologiczny wywiera presję selekcyjną na patogen, o czym świadczą znacznie mniejsze zmiany w strukturze quasi-gatunku wirusowego u pacjentów z upośledzonym działaniem systemu odpornościowego (Booth *et al.*, 1998; Toyoda *et al.*, 1997a). Pierwszą linią obrony organizmu przed zakażeniem HCV jest aktywacja niespecyficzej odpowiedzi, związanej z działaniem interferonu [por.: I.3.3] czy komórek NK i NKT (ang. *natural killer* i *natural killer T cells*). Wyniki badań przeprowadzonych na szympanсах wskazują, że ich aktywność umożliwia eliminację wirusa pod nieobecność specyficznej wobec HCV odpowiedzi angażującej limfocyty T. Niestety, jednocześnie ich funkcjonowanie związane jest z produkcją cytokin typu Th1, warunkujących powstanie stanu zapalnego, czego rezultatem jest uszkodzenie wątroby. Bardzo istotnym momentem podczas infekcji HCV jest wytworzenie przeciwciał skierowanych specyficznie przeciwko strukturalnym i niestrukturalnym białkom tego wirusa. Udział immunoglobulin w zwalczaniu zakażenia jest nadal przedmiotem intensywnych badań. Podstawowym celem przeciwciał neutralizujących jest rejon

HVR1, zlokalizowany w obrębie białka E2 (Gremion i Cerny, 2005; Kaplan *et al.*, 2003). Doświadczenia przeprowadzone na szympanсах wykazały, że przeciwciała skierowane przeciwko temu rejonowi są zdolne do zapobiegania zakażeniu homologicznym szczepem wirusa (Farci *et al.*, 1996). O ile jednak początkowo sądzono, że przeciwciała anty-HVR1 są specyficzne wobec konkretnego szczepu, o tyle obecnie uważa się, że wśród nich istnieją również takie, wykazujące zdolność do reakcji krzyżowej z niehomologicznym białkiem E2. Co ciekawe, zarówno pierwsze jak i drugie immunoglobuliny mogą być jednocześnie obecne w surowicy pacjenta (Kaplan *et al.*, 2003; Mondelli *et al.*, 1999). Dokładne analizy epitopów umiejscowionych w obrębie HVR1 dowiodły, że przeciwciała zdolne do reakcji krzyżowej skierowane są na bardziej zachowawczy fragment tego rejonu, obejmujący jego koniec karboksylowy. Równocześnie jednak z obserwacji klinicznych wiadomo, że obecność przeciwciał nie zapobiega ani kolejnemu zakażeniu (Lai *et al.*, 1994), ani przewlekłej infekcji, co rodzi pytanie o efektywność odpowiedzi humoralnej.

Udział odpowiedzi komórkowej jest szczególnie istotny podczas ostrego zapalenia wątroby, a samoistna eliminacja wirusa na tym etapie jest związana z silną reakcją limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺. Komórki pamięci, CD4⁺, umożliwiają również częściową ochronę przed kolejnym zakażeniem. Limfocyty CD8⁺ produkują cytokiny przeciwwirusowe oraz, wykazując aktywność cytotoksyczną, usuwają zakażone komórki. Efektem działania obu typów limfocytów jest ograniczenie rozprzestrzeniania się wirusa. Stosownie do tego, spadek liczby limfocytów T CD4⁺ i CD8⁺ wywołuje wzrost poziomu RNA HCV w surowicy. Jednocześnie jednak, aktywność limfocytów jest związana z powstawaniem stanu zapalnego, powodującego uszkodzenia wątroby.

Do tej pory nie wyjaśniono w pełni, dlaczego wirus jest zdolny przetrwać w organizmie, pomimo odpowiedzi immunologicznej. Istnieje wiele hipotez, próbujących tłumaczyć to zjawisko. Według jednej z nich, istotną rolę odgrywa polimorfizm genetyczny HCV i wynikająca z niego zdolność tworzenia wariantów przystosowanych do unikania zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Inna hipoteza sugeruje, iż reakcja odpornościowa jest ilościowo niewystarczająca do zwalczania wirusa, ponieważ charakteryzuje się on bardzo wysokim potencjałem replikacyjnym. Równocześnie antygeny HCV akumulują się w niższym stężeniu niż np. wirusa zapalenia wątroby typu B. Ponadto, występowanie wirionów w kompleksach z lipoproteinami może maskować antygeny powierzchniowe i utrudniać ich efektywne wykrywanie przez przeciwciała. Prowadzi to także do

osłabienia odpowiedzi komórkowej, ponieważ niewielkie stężenie antygeny negatywnie wpływa na proces jego prezentacji, a także aktywację i proliferację limfocytów T. Dodatkowo zaproponowano, że wirusowe białka strukturalne, C i E2, mają właściwości immunosupresyjne, zaburzając, odpowiednio, aktywację limfocytów T i funkcje komórek NK (Gremion i Cerny, 2005). W ostatnich latach postulowano również, że oddziaływanie E2 z receptorem CD81 limfocytów B wpływa na proces produkcji przeciwciał i prowadzi do zmniejszenia ich powinowactwa do białka E2 (Machida *et al.*, 2008).

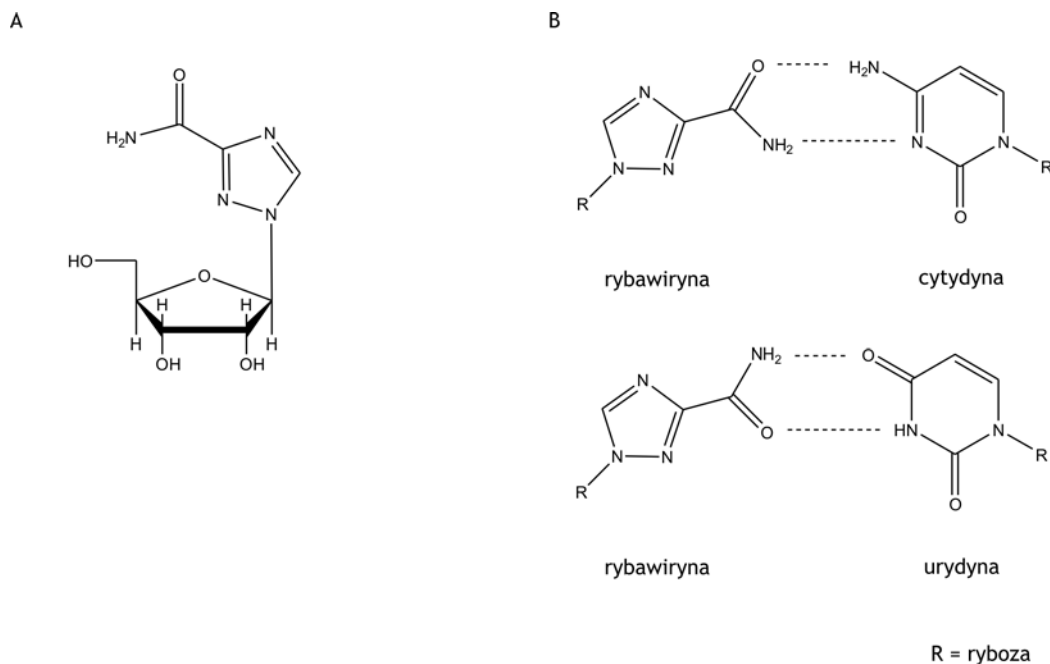
1.3.3 Terapia

Ponieważ zakażenie HCV we wczesnej fazie jest najczęściej niemożliwe do zdiagnozowania, terapię podejmuje się na etapie przewlekłego zapalenia wątroby. Pierwszym preparatem używanym w jego leczeniu był interferon- α (Carithers i Emerson, 1997; Hoofnagle *et al.*, 1986), zatwierdzony do stosowania w Stanach Zjednoczonych i Europie na początku lat 90. ubiegłego wieku (McHutchinson i Hoofnagle, 2000). Skuteczność tego leczenia wynosiła 10-20%, przy czym często po jego zakończeniu odnotowywano ponowny wzrost poziomu RNA HCV w surowicy (Carithers i Emerson, 1997). W kolejnych latach wykazano, że włączenie kolejnego związku, rybawiryny, w znaczący sposób podnosi efektywność leczenia (McHutchinson *et al.*, 1998; Poynard *et al.*, 1998). Mimo to, skuteczność terapii skojarzonej (interferon- α i rybawiryna) u pacjentów zakażonych HCV wynosi 31-64%, zależnie od genotypu wirusa (Poynard *et al.*, 1998). W ostatnich latach interferon- α zastąpiono jego modyfikowaną pochodną, zawierającą grupy glikolu polietylenowego, co pozwoliło wydłużyć okres półtrwania leku w organizmie pacjenta, tym samym zwiększając efektywność leczenia do 42-82%, w zależności od genotypu wirusa (Fried *et al.*, 2002; Manns *et al.*, 2001; Pearlman, 2004).

Interferon (IFN) jest białkiem pełniącym kluczową rolę we wrodzonej odpowiedzi przeciwwirusowej organizmu (Sen, 2001). Spośród kilku rodzajów interferonów, w terapii przeciwko HCV używany jest rekombinowany interferon- α (α 2a, α 2b) i interferon naturalny. Działanie przeciwwirusowe interferonu nie jest skierowane specyficznie przeciwko konkretnemu czynnikowi infekcyjnemu. IFN- α uruchamia szlak transdukcji sygnału, prowadzący do indukcji ekspresji setek genów. Wśród nich największą grupę stanowią geny, których produkty uczestniczą w sygnalizacji komórkowej. Aktywowane są również geny warunkujące mechanizmy

obronne, modulację układu immunologicznego, odczynu zapalne, apoptozę, adhezję komórek, a także translację i metabolizm białek (de Veer *et al.*, 2001). Egzogeny interferon podawany w przewlekłym zapaleniu wątroby pełni identyczne funkcje, a ze względu na wyższe stężenie, przejawia wyższą efektywność niż jego odpowiednik produkowany w organizmie pacjenta. Najprawdopodobniej wpływa hamująco na translację (za pośrednictwem opisanej wcześniej kinazy PKR), a także powoduje degradację wirusowego RNA (aktywacja rybonukleazy L). Interferon stymuluje również proliferację limfocytów T, dojrzewanie komórek dendrytycznych oraz aktywację komórek NK (Feld i Hoofnagle, 2005).

Rybawiryna jest analogiem purynowym [rysunek I.8A], którego właściwości przeciwwirusowe są znane od lat 70. XX wieku, chociaż mechanizm działania w terapii przewlekłego zapalenia wątroby pozostaje do ustalenia.



Rysunek I.8. Struktura rybawiryny.

(A) Rybawiryna jest purynowym analogiem nukleozydowym (1- β -D-rybofuranozyl-1,2,4-triazolo-3-karboksyamid). (B) Dzięki rotacji grupy karboksamidowej, pseudozasada rybawiryny może tworzyć wiązania wodorowe z częścią zasadową zarówno cytydyny, jak i urydyny.

Obecnie postuluje się istnienie czterech możliwych sposobów jej działania. Pierwszy obejmuje wpływ na wzmocnienie komórkowej odpowiedzi immunologicznej, przez indukcję zmiany fenotypu limfocytów $CD4^+$ z Th2 na Th1. Zmiana ta prowadzi do aktywacji mechanizmów prowadzących do lizy zakażonych komórek, jednocześnie osłabia proces różnicowania limfocytów B, a przez to produkcję przeciwciał. Drugi sposób to inhibicja dehydrogenazy monofosforanu inozyny (IMPDH), kluczowego

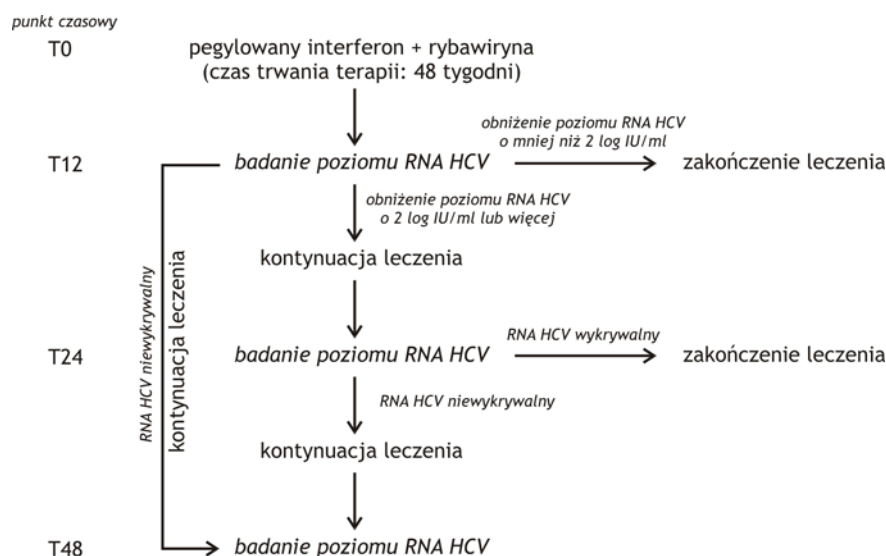
komórkowego enzymu szlaku syntezy trifosforanu guanozyny (GTP). Monofosforan rybawiryny jest silnym inhibitorem kompetycyjnym tego enzymu, współzawodnicząc o miejsce wiązania z jego właściwym substratem – monofosforanem inozyny. Obecność rybawiryny wpływa zatem negatywnie na przebieg syntezy GTP i prowadzi do zmniejszenia jego puli w komórce. Ponieważ w trakcie intensywnej replikacji wirusa zapotrzebowanie na trifosforany nukleozydów jest bardzo duże, sugerowano, że spadek poziomu GTP zaburza ten proces (Parker, 2005). Zaproponowano nawet, że inhibicja IMPDH jest głównym mechanizmem działania rybawiryny wobec wybranych wirusów z rodziny *Flaviviridae* i *Paramyxoviridae* (Leyssen *et al.*, 2005). Do tej pory nie wyjaśniono jednak, na ile spadek poziomu GTP obniża efektywność replikacji HCV. Trzecim postulowanym sposobem działania rybawiryny jest inhibicja polimeraz wirusowych, w tym także białka NS5B HCV. Rybawiryna ulega bowiem w komórce fosforylacji do trifosforanu i jest rozpoznawana przez polimerazę jako substrat. Stwierdzono, że rybawiryna jest włączana do nowo syntetyzowanej nici RNA naprzeciwko cytydyny lub urydyny i może powodować zablokowanie elongacji. Ponieważ jednak posiada ona grupę 3' hydroksylową, możliwe jest utworzenie klasycznego wiązania fosfodiesterowego z kolejnym nukleotydem. Oznacza to, iż zahamowanie syntezy nici potomnej nie ma charakteru terminacji, typowej chociażby dla leku anty-HIV, azydodotymidyny. Badania *in vitro* wykazały, że polimeraza HCV jest zdolna do wydłużania syntetyzowanej nici poniżej miejsca włączenia rybawiryny. Mimo to, w warunkach niskiego stężenia GTP, ilość produktu pełnej długości spadała i jednocześnie pojawiały się produkty krótsze od spodziewanych. Wykazano, że w takich warunkach dochodzi do zatrzymania kompleksu replikacyjnego. Podanie GTP w znacznym stopniu, choć niecałkowicie, znosiło obserwowany efekt. Najistotniejszą dla wyjaśnienia wpływu rybawiryny na obniżenie poziomu replikacji jest jednak inna obserwacja. Stwierdzono, że podczas kopiowania matrycy zawierającej rybawirynę, naprzeciwko niej włączany jest monofosforan nukleozydu pirymidynowego. Efektywność katalityczna tej reakcji jest jednakże 200-3000 razy niższa aniżeli wbudowanie nukleotydu naprzeciwko typowej puryny. W rezultacie, wydajność syntezy RNA na bazie takiej cząsteczki matrycowej znacznie spada (Vo *et al.*, 2003). Mimo że inhibicja polimerazy doskonale koresponduje z przeciwwirusowym działaniem rybawiryny, należy sądzić, iż nie jest to podstawowy mechanizm jej działania *in vivo*. Okazuje się bowiem, że wyraźny efekt inhibicji pojawia się przy względnie wysokich stężeniach analogu nukleozydu, około 5-15 krotnie

przewyższających stężenie osiągane w zastosowaniach klinicznych. W rezultacie, proponowany jest czwarty sposób działania rybawiryny. Jak już wspomniano, może ona tworzyć pary zasad z cytozyną i uracyłem [rysunek I.8B]. Włączenie jej do wirusowego RNA może zatem wywołać efekt mutagenny, przyczyniając się do powstania tranzycji A→G i G→A. W świetle danych na temat quasi-gatunku można przypuszczać, iż działanie rybawiryny prowadzi do nadmiernego nagromadzenia mutacji i zakłócenia równowagi populacji wirusowej oraz jej wyginięcia. Ponieważ udowodniono mutagenny efekt rybawiryny wobec wirusa polio (Crotty *et al.*, 2001), zaproponowano, że działa ona analogicznie w przypadku HCV. Hipotezę tę potwierdzają obserwacje, iż pod wpływem rybawiryny wzrasta częstość mutacji w liniach komórkowych, zawierających pełnej długości replikon HCV (Contreras *et al.*, 2002). Kolejne badania przyniosły jednak sprzeczne wyniki – potwierdzające (Asahina *et al.*, 2005), bądź podające w wątpliwość mutagenną aktywność rybawiryny u pacjentów (Chevaliez *et al.*, 2007) Argumentowano, że zbyt niskie stężenie analogu nukleozydu w surowicy wyklucza taki efekt (Chevaliez *et al.*, 2007). Z drugiej strony, można spekulować, iż inhibicja IMPDH i wynikające z niej obniżenie poziomu GTP może zwiększać prawdopodobieństwo włączania monofosforanu rybawiryny podczas dużego zapotrzebowania na nukleotydy w trakcie intensywnej replikacji HCV. Przypuszczenie to wspiera obserwacja poczyniona wobec wirusa GBV-B. W obecności rybawiryny wirus ten wykazywał obniżoną infekcyjność, lecz efekt ten częściowo znosiło podanie GTP (Lanford *et al.*, 2001). Pomimo licznych badań, kwestia mechanizmu działania rybawiryny pozostaje zatem otwarta.

Terapia przeciwko HCV niesie ze sobą możliwość eliminacji wirusa i remisji choroby, albo przejściowej poprawy stanu zdrowia pacjenta. Z jej stosowaniem związane są jednak pewne ograniczenia. Dotyczą one przede wszystkim poważnych działań niepożądanych, obejmujących, nawet zaburzenia ze strony ośrodkowego układu nerwowego, takie jak: depresja, zmiany zachowania czy zaburzenia psychiczne. Biorąc pod uwagę powyższe dane oraz fakt, że przewlekłe zapalenie wątroby nie musi prowadzić do ciężkich uszkodzeń tego narządu – zatem terapia nie zawsze jest nieodzowna – wprowadzono kryteria, na podstawie których kwalifikuje się pacjentów do leczenia. Należą do nich m.in.: utrzymujący się co najmniej 6 miesięcy podwyższony poziom aktywności aminotransferaz, obecność RNA HCV w surowicy, czy histologiczne cechy przewlekłego zapalenia wątroby (włóknienie lub stan zapalny i zmiany nekrotyczne). Celem stosowania zestawu kryteriów jest maksymalne

zwiększenie prawdopodobieństwa, że leczeniu poddani zostaną jedynie ci pacjenci, u których potencjalne korzyści płynące z terapii przewyższą jej skutki uboczne (McHutchinson i Hoofnagle, 2000).

Przyjęte obecnie schematy terapii są uzależnione od genotypu wirusa, którym zakażony jest pacjent. W przypadku HCV należącego do genotypu 1, leczenie trwa 48 tygodni, natomiast w przypadku genotypu 2 lub 3 – 24 tygodnie (Pearlman, 2004). Przykładowy schemat leczenia przedstawiono na rysunku [rysunek I.9]. Rodzaj odpowiedzi pacjenta na leczenie określa się na poziomie biochemicznym, histologicznym i wirusologicznym. Pozytywna odpowiedź biochemiczna związana jest z powrotem poziomu aktywności AlAT do wartości mieszczących się w granicach normy, odpowiedź histologiczna dotyczy poprawy stanu wątroby, natomiast odpowiedź wirusologiczna oznacza niewykrywalny poziom RNA wirusowego w surowicy. Rodzaj odpowiedzi wirusologicznej oznacza się na podstawie wyników testu na obecność RNA HCV w surowicy w określonych momentach terapii i obserwacji (Karnsakul *et al.*, 2009) [tabela I.4].



Rysunek I.9. Schemat terapii skojarzonej pegylowanym interferonem i rybawiryną w przewlekłym zapaleniu wątroby typu C, wywołanym przez HCV-1.

Leczenie pacjentów zakwalifikowanych do terapii rozpoczyna się w momencie oznaczonym T0. Osoby, u których po 12 tygodniach trwania terapii RNA HCV jest niewykrywalny, leczone są do 48. tygodnia. U pacjentów, u których w tym samym momencie spadek poziomu RNA HCV wynosi mniej niż 2 log IU/ml w stosunku do wartości wyjściowej, leczenie jest przerywane. U pozostałych terapia jest kontynuowana do 24. tygodnia. Wówczas ponownie określa się poziom RNA HCV i przez kolejne 24 tygodnie kontynuuje leczenie osób z niewykrywalnym RNA HCV (Pearlman, 2004).

Tabela 1.4. Rodzaje odpowiedzi wirusologicznej na terapię skojarzoną pegylowanym interferonem i rybawiryną [wg Karnsakul *et al.*, 2009]

Nazwa	Definicja
trwała (ang. <i>sustained</i>)	• Niewykrywalny RNA HCV po 24 tygodniach od zakończenia terapii.
szybka (ang. <i>rapid</i>)	• Niewykrywalny RNA HCV (<50 IU/ml) w 4. tygodniu terapii.
wczesna (ang. <i>early</i>)	• Obniżenie poziomu RNA HCV o 2 log IU/ml lub więcej (bądź RNA HCV niewykrywalny) w 12. tygodniu terapii.
częściowa (ang. <i>partial</i>)	• Obniżenie poziomu RNA HCV o 2 log IU/ml lub więcej w 12. tygodniu terapii, ale RNA HCV wykrywalny w 24. tygodniu terapii.
brak (ang. <i>null response</i>)	• Obniżenie poziomu RNA HCV o mniej niż 2 log IU/ml w 12. tygodniu terapii.
przełom (ang. <i>virological breakthrough</i>)	• Spadek poziomu RNA HCV poniżej progu wykrywalności podczas terapii, po którym następuje jego ponowny wzrost.
nawrót (ang. <i>relapse</i>)	• Wykrywalny RNA HCV po zakończeniu leczenia u pacjenta, u którego był on poniżej progu wykrywalności podczas terapii.

Osiągnięcie trwałej odpowiedzi wirusologicznej jest istotnym czynnikiem, prognostycznym i uważanym za najlepsze kryterium oceny skuteczności leczenia. Trwające 5 lub 10 lat po zakończeniu monoterapii interferonowej badania kontrolne dowiodły, że 95% pacjentów, u których wystąpiła trwała odpowiedź, nadal wykazuje normalny poziom aktywności AlAT i brak RNA HCV w surowicy oraz poprawę obrazu histologicznego wątroby. Tymczasem u osób, charakteryzujących się jedynie pozytywną odpowiedzią biochemiczną, bez obniżenia poziomu RNA HCV, często notowano odnawiające się z upływem czasu uszkodzenie wątroby i jej powrót do stanu sprzed terapii (McHutchinson i Hoofnagle, 2000).

Równocześnie z udoskonalaniem metod leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C, poszukiwane są czynniki pozytywnej prognozy terapii, obowiązujące zarówno przed jej wdrożeniem, jak i w pierwszych tygodniach trwania. Wśród proponowanych parametrów charakteryzujących pacjenta znalazły się: (i) młodszy wiek (poniżej 40. roku życia), (ii) płeć żeńska, (iii) niższa masa ciała (prawidłowa wartość współczynnika BMI), (iv) rasa inna niż czarna, (v) brak stłuszczenia, włóknienia czy marskości wątroby, (vi) aktywność wewnątrzwątrobowych cytotoksycznych limfocytów T specyficznych wobec HCV, (vii) brak jednoczesnego zakażenia innym wirusem hepatotropowym bądź HIV, (viii) brak schorzeń nerek i układu sercowo-naczyniowego. Szansę na korzystny wynik terapii zwiększa też przestrzeganie przez pacjenta zaleceń dotyczących dawkowania leków, rozumiane jako przyjęcie powyżej 80% należnej dawki interferonu i rybawiryny, w wyznaczonym czasie (Feld i Hoofnagle, 2005; Ferenci, 2004; Figlerowicz *et al.*, 2005). Chociaż stwierdzono

zależność pomiędzy wymienionymi wyżej czynnikami a osiągnięciem przez pacjenta trwałej odpowiedzi wirusologicznej, jest oczywiste, że niektóre z nich nie są specyficzne wyłącznie dla zakażeń HCV i mogą jedynie warunkować lub odzwierciedlać lepszy ogólny stan zdrowia organizmu. Wydaje się zatem, że spośród wielu badanych parametrów istotniejsze znaczenie mają te opisujące wirusa, takie jak jego genotyp czy poziom replikacji. Bezspornym jest bowiem fakt, że skuteczność terapii skojarzonej pegylowanym interferonem i rybawiryną jest lepsza u chorych zakażonych HCV o genotypie innym niż 1 (wynosi 50-82%), podczas gdy w przypadku genotypu 1 osiąga najwyżej 42% (Manns *et al.*, 2001). Znalazło to także swój wyraz w stosowanych schematach terapeutycznych – leczenie infekcji HCV-2 lub HCV-3 trwa o połowę krócej niż HCV-1 (Pearlman, 2004). Równie istotny jest poziom akumulacji wirusowego RNA w surowicy. Stwierdzono, iż prawdopodobieństwo trwałej odpowiedzi wzrasta, gdy wiremia nie przekracza 2 milionów kopii (800 000 IU) na mililitr (Feld i Hoofnagle, 2005; Figlerowicz *et al.*, 2005; McHutchinson i Hoofnagle, 2000). Od kilkunastu lat prowadzone są także badania, mające na celu określenie, czy istnieje związek pomiędzy strukturą quasi-gatunku wirusowego przed leczeniem lub w pierwszych tygodniach jego trwania, a odpowiedzią pacjenta na terapię. Początkowo nie znaleziono takiej korelacji (Lopez-Labrador *et al.*, 1999; Nakazawa *et al.*, 1994; Sandres *et al.*, 2000). Stosunkowo niedawno zaproponowano jednak, że drastyczny spadek różnorodności genetycznej HCV wkrótce po wdrożeniu monoterapii interferonowej jest czynnikiem decydującym o wyeliminowaniu wirusa (Farci *et al.*, 2002). Podobne obserwacje poczyniono w odniesieniu do struktury populacji wirusowej tuż przed rozpoczęciem terapii skojarzonej interferonem (bądź jego pegylowaną pochodną) i rybawiryną. Stwierdzono bowiem, iż polimorfizm quasi-gatunku HCV jest niższy u osób, u których w rezultacie leczenia dochodzi do wykształcenia trwałej odpowiedzi wirusologicznej (Moreau *et al.*, 2008; Puig-Basagoiti *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2004). Z drugiej strony sugerowano, iż zależność pomiędzy poziomem zróżnicowania populacji wirusowej a rezultatem leczenia może dotyczyć tylko wczesnej, nie zaś trwałej, odpowiedzi wirusologicznej (Chambers *et al.*, 2005). W świetle tych niejednoznacznych doniesień wydaje się, że na uzyskane wyniki wpływa kilka czynników. Wśród nich można wymienić chociażby dobór rejonu genomu HCV, na podstawie którego badany jest poziom polimorfizmu, czy też genotyp wirusa. Zagadnienie związku pomiędzy strukturą populacji wirusowej a odpowiedzią pacjenta na terapię wymaga zatem dalszych analiz.

II Cel pracy

Pomimo niezwykle intensywnych badań prowadzonych w wielu krajach świata, jak dotąd nie opracowano skutecznych metod profilaktyki oraz terapii zakażeń wywoływanych przez HCV. Co więcej, nie udało się wyznaczyć jednoznacznych korelacji pomiędzy parametrami charakteryzującymi pacjentów a skutecznością stosowanych terapeutyków. W związku z tym zaproponowano, że najistotniejszym czynnikiem decydującym o przebiegu infekcji i wynikach leczenia mogą być specyficzne cechy wirusa, w tym szczególnie jego polimorfizm genetyczny. Weryfikacja powyższej hipotezy stała się podstawowym celem niniejszej pracy. Aby go osiągnąć postanowiono zidentyfikować czynniki kształtujące strukturę populacji wirusowej podczas przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Dodatkowo próbowano ustalić, w jaki sposób zmienność wybranych rejonów genomu HCV wpływa na patogenność wirusa i jego odporność na stosowane leczenie.

Rozwiązanie tak sformułowanego problemu wymagało realizacji następujących zadań szczegółowych:

1. Określenia struktury populacji wirusowych występujących u pacjentów o trzech różnych typach odpowiedzi na terapię przewlekłego zapalenia wątroby typu C.
2. Ustalenia, czy polimorfizm, a tym samym kształt populacji wirusowej, warunkowany jest strukturą RNA, czy raczej presją selekcyjną, wywieraną na białka wirusowe.
3. Poznania mechanizmów indukujących zmienność/zachowawczość populacji HCV.
4. Zbadania, czy istnieje zależność pomiędzy strukturą populacji wirusowej a wynikiem leczenia.

III Materiały i metody

III.1 Materiały

III.1.1 Podstawowe odczynniki

BioShop: agar, BSA, chlorek magnezu ($MgCl_2$), chlorek sodu ($NaCl$), cyjanian ksylenu, dwuwodorofosforan sodu (NaH_2PO_4), glicerol, glicyna, glukoza, izopropylotiogalaktozyd (IPTG), pepton, siarczan magnezu ($MgSO_4$), TBE, TBST, Tris, wodorofosforan sodu (Na_2HPO_4), wyciąg drożdżowy

BioRad: bibuły do transferu białek Protean

Fermentas: inhibitor rybonukleaz RiboLock™ (40 U/ μ l), cztery trifosforany deoksyrybonukleozydów (dATP, dCTP, dGTP, dTTP 100 mM, dNTPs)

GE Healthcare: złożo Superdex75 16/60 HiLoad

Millipore: filtry 10 kDa do zagęszczania białek, filtry 0,22 μ m do sterylizacji roztworów

New England Biolabs: złożo amylozowe

Novagen: pożywka SOC

Pierce: membrana PVDF

Polskie Odczynniki Chemiczne: kwas octowy, etanol, metanol, sacharoza, wodorotlenek sodu ($NaOH$)

Prona: agarozą

Qiagen: złożo niklowe (Ni-NTA agarozą)

Roche: inhibitor proteaz Complete Mini EDTA-free Cocktail

Serva: 40% akrylamid:bisakrylamid 29:1 (akrylamid-bis), dodecylsioarczan sodu (SDS), EDTA, Serva Blue R, TEMED,

Sigma-Aldrich: ampicylina, L-arabinoza, bentonit, błękit bromofenolowy, bromek etydy (10 mg/ml), celit, chlorek potasu (KCl), chloroform, chloramfenikol, DEAE-celuloza, dekstroza, dimetyloformamid (DMF), dimetylosulfotlenek (DMSO),

Ilekróć w pracy jest mowa o substancji o danym stężeniu procentowym, bez uściślenia rodzaju stężenia, należy to rozumieć jako roztwór tej substancji o stężeniu wagowo/objętościowym. W przypadku gdy nie sprecyzowano rodzaju rozpuszczalnika, należy to rozumieć jako roztwór wodny. Przykładowo, stwierdzenie „45% glukoza” oznacza 45% wagowo/objętościowy wodny roztwór glukozy. Podobnie, „0,1 M IPTG” oznacza 0,1 M wodny roztwór IPTG. C_p – stężenie początkowe; C_k – stężenie końcowe; v/v – stężenie objętościowo/objętościowe.

ditiotreitol (DTT), fenol, kanamycyna, karbenicylina, lizozym, maltoza, MES, nadsiarczan amonu (APS), octan amonu, octan sodu, rifampicyna, Tween 20, wodorofosforan potasu (K_2HPO_4), X-Gal, preparat ludzkich immunoglobulin klasy IgG

III. 1.2 Bakterie

Tabela III. 1. Stosowane szczepy bakteryjne

Nazwa	Oporność na antybiotyki	Wybrane cechy
<i>E. coli</i> DH5 α ⁽¹⁾	-	-
<i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS ⁽²⁾	chloramfenikol	<ul style="list-style-type: none"> • szczep ekspresyjny, • gen kodujący polimerazę RNA T7 pod promotorem <i>lac</i>, • gen kodujący lizozym, • brak proteaz <i>lon</i> i <i>ompT</i>
<i>E. coli</i> Rosetta(DE3)pLysS ⁽²⁾	chloramfenikol	<ul style="list-style-type: none"> • szczep ekspresyjny (pochodna BL-21), • gen kodujący polimerazę RNA T7 pod promotorem <i>lac</i>, • gen kodujący lizozym, • geny kodujące tRNA dla sześciu kodonów o niskiej częstotliwości występowania w <i>E. coli</i>
<i>E. coli</i> Origami B(DE3)pLysS ⁽²⁾	kanamycyna, tetracyklina, chloramfenikol	<ul style="list-style-type: none"> • szczep ekspresyjny (pochodna BL-21), • gen kodujący polimerazę RNA T7 pod promotorem <i>lac</i>, • gen kodujący lizozym, • mutacje w genach kodujących reduktazę tioredoksynową i glutationową
<i>E. coli</i> BL21-AI™ One Shot ^{®(3)}	-	<ul style="list-style-type: none"> • szczep ekspresyjny, • gen kodujący polimerazę RNA T7 pod promotorem <i>araBAD</i>
<i>E. coli</i> TB1 ⁽⁴⁾	streptomycyna	• szczep ekspresyjny
<i>A. tumefaciens</i> GV3101 ⁽⁵⁾	rifampicyna	-

⁽¹⁾ Gibco ⁽²⁾ Novagen; ⁽³⁾ Invitrogen; ⁽⁴⁾ Geneti Biotech; ⁽⁵⁾ IconGenetics

III.1.3 Plazmidy

Tabela III.2. Stosowane plazmidy

Nazwa	Oporność na antybiotyk	Wybrane cechy
pGEM [®] -T Easy ⁽¹⁾	ampicylina	<ul style="list-style-type: none"> • bakteryjny plazmid replikacyjny, • selekcja transformowanych komórek na podstawie testu α-komplementacji, • umożliwia bezpośrednie klonowanie produktów PCR, zawierających niesparowane reszty adenozynowe wystające na końcach 3'
pUC18, pUC19 ⁽²⁾	ampicylina	<ul style="list-style-type: none"> • bakteryjne plazmidy replikacyjne, • selekcja transformowanych komórek na podstawie testu α-komplementacji
pET-11a ⁽³⁾	ampicylina	<ul style="list-style-type: none"> • bakteryjny plazmid ekspresyjny, • promotor T7
pET-30 Ek/LIC ⁽³⁾	kanamycyna	<ul style="list-style-type: none"> • bakteryjny plazmid ekspresyjny, • promotor T7, • sekwencja kodująca znacznik histydynowy (HisTag) i S•Tag oraz miejsce rozpoznawane przez enterokinazę • umożliwia klonowanie niezależne od ligacji
pMAL-c4E ⁽⁴⁾	ampicylina	<ul style="list-style-type: none"> • bakteryjny plazmid ekspresyjny, • promotor <i>tac</i>, • gen kodujący białko wiążące maltozę (ang. <i>maltose binding protein</i>, MBP) oraz sekwencja kodująca miejsce rozpoznawane przez enterokinazę, • umożliwia otrzymanie białka fuzyjnego
pICH10990 ⁽⁵⁾	karbenicylina	<ul style="list-style-type: none"> • system plazmidów do przejściowej ekspresji genów w tytoniu <i>Nicotiana benthamiana</i>
pICH7410 ⁽⁵⁾	karbenicylina	
pICH10570 ⁽⁵⁾	karbenicylina	
pICH10881 ⁽⁵⁾	kanamycyna	
pB1TP3 ⁽⁶⁾	ampicylina	<ul style="list-style-type: none"> • system plazmidów umożliwiający otrzymanie genomowych cząsteczek RNA wirusa mozaiki stokłosa (ang. <i>brome mosaic virus</i>, BMV): RNA1, RNA2 i zmodyfikowanego RNA3 na drodze transkrypcji <i>in vitro</i> • promotor T7
pB1TP5 ⁽⁶⁾		
pMat-0 ⁽⁷⁾		

⁽¹⁾ Promega; ⁽²⁾ Invitrogen; ⁽³⁾ Novagen; ⁽⁴⁾ New England Biolabs; ⁽⁵⁾ IconGenetics; ⁽⁶⁾ otrzymane od prof. Józefa Bujarskiego z Plant Molecular Biology Center and the Department of Biological Sciences, Northern Illinois University, USA; ⁽⁷⁾ otrzymany w Zespole Wirusologii Molekularnej IChB PAN

III.1.4 Startery

Startery były syntetyzowane chemicznie w Pracowni Sekwencjonowania DNA i Syntezy Oligonukleotydów Instytutu Biochemii i Biofizyki PAN.

Tabela III.3. Użyte startery

Nazwa	Sekwencja zapisana w orientacji 5'→3'
HVR-Z5	CAG (CT) T (AG) CTCCGGATCCCACAAGC
HVR-Z3	ACGTCCGTCTCATT (CT) (TG) C (AC) CCCCA
HVR-W5	TCTGGATCCTATTCCATGGTGGGGAAGTGG
HVR-W3	AATGAATTCTACAACAGGGCT (TG) GG (AG) GTGAA
E2-Z3	AAGCAGAAGAACACGAGGAAGG
E2-W5	ATGAATTCTCCTGGTAGTGCTGCTGCTA
E2-W3	ATCTGCAGCAGGGATGCTGCATTGAGTA
IFN-Zs	ACCCCTCCACATTACAGCAG
IFN-Za	CCTCCGCAGCGCATGGCGT
IFNs-1a	AAGAATTCTCCTCGGCCAGCCAGCTGT
IFNa-1a	AACTGCAGCATGGAAGAATAGGACTCAGCG
F02	TATGGAAACCCACGTCTCCGGGG
E2-R6-4	ATCTGCAGCTAATGATGATGATGATGATGCGTGTTGGACAGCAGCAGCG
F-05	TATGGAAACCTACGTCTCCGGGGG
R-6-05	AAGGATCCCTAATGATGATGATGATGATGTTGTGGTGGACAGCAGCAACG
F-02Nde	AACATATGGAAACCCACGTCTCCGGGG
R-02Bam6	AAGGATCCTTAATGATGATGATGATGATGCGTGTTGGACAGCAGCAGCG
F-05Nde	AACATATGGAAACCTACGTCTCCGGGGG
F-05pMAL	GAAACCTACGTCTCCGGGGG
R-05pMAL	AAGGATCCTTATGTGGTGGACAGCAGCAACG
F-02pMAL	GAAACCCACGTCTCCGGGG
R-02pMAL	AAGGATCCTTACGTGGTGGACAGCAGCAGCG
F-05LIC	GACGACGACAAGATGGAAACCTACGTCTCCGGGGG
R-05LIC	GAGGAGAAGCCCGTTTATGTGGTGGACAGCAGCAACG
F-02LIC	GACGACGACAAGATGGAAACCCACGTCTCCGGGG
R-02LIC	GAGGAGAAGCCCGTTTACGTGGTGGACAGCAGCAGCG
FpUC19	TGCAAGGCGATTAAGTTGGGTA
RpUC19	CAGGAAACAGCTATGAC
T7	TAATACGACTCACTATAG
R-pGEM	TCAAGCTATGCATCCAACGCG

pET11a5'	TCGATCCC GCGAAATTA AATACG
pET11a3'	CAAAAAACCCCTCAAGACCCG
F-pET30	AAAGAAACCGCTGCTGCTAAATTCG
R-pET30	CCGCAAGCTTGTTCGACGGAGCT
F-pMAL	AAAGACGCGCAGACTAATTCGAGC
R-pMAL	CCCAGTCACGACGTTGTAAA
F-10990	CTCCACCTCACCCATCTTTTAT
R-10990	TACGGATTTACACCGTAAAGTCT
RT-1	CAGTGAATTCCTGGTCTCTTTTAGAGATTTACAG
RT-2	CTGAAGCAGTGCCTGCTAAGGCGGTC
Xba-HVR	ATTCTAGATATTCCATGGTGGGGAAGTGG
Mlu-R	ATACGCGTGCCGGTGTAAAGGCTATCATT

Kolorami oznaczono: (i) zielonym – sekwencje rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, (ii) niebieskim – sekwencje kodujące znacznik histydynowy (HisTag), (iii) czerwonym – sekwencje umożliwiające niezależne od ligacji klonowanie do wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC. Sekwencje odpowiadające kodonom START i STOP podkreślono. W nawiasach podano pozycje zdegenerowane.

III.1.5 Enzymy

III.1.5.1 Enzymy restrykcyjne

Fermentas: FastDigest[®]NdeI, FastDigest[®]SpeI, FastDigest[®]KpnI

Promega: EcoRI (12 U/μl), PstI (12 U/μl), BamHI (12 U/μl), XbaI (8-12 U/μl), MluI (10 U/μl)

III.1.5.2 Pozostałe enzymy

Fermentas: ligaza DNA T4 (5 U/μl), polimeraza DNA Taq (5 U/μl), odwrotna transkryptaza RevertAid[™] M-MuLV (200 U/μl), RNaza A (10 μg/μl), fragment Klenowa polimerazy DNA I (10 U/μl)

Novagen: benzonaza (25 U/ μl)

Roche: N-glikozydaza F (1 U/μl)

Sigma-Aldrich: RNaza B

III.1.6 Gotowe zestawy do badań biochemicznych

Tabela III.4. Gotowe zestawy do badań biochemicznych

Nazwa	Producent	Zastosowanie
Expand High Fidelity PCR System	Roche	amplifikacja DNA metodą PCR z wykorzystaniem polimerazy o wysokiej dokładności kopiowania, posiadającej aktywność naprawczą (ang. <i>proofreading</i>)
OneStep RT-PCR Kit	Qiagen	odwrotna transkrypcja i amplifikacja powstałego cDNA metodą PCR
Plasmid Midi Kit	Qiagen	izolacja plazmidów w średniej skali (do 100µg)
QIAquick PCR Purification Kit	Qiagen	oczyszczanie DNA
mMESSAGE mMACHINE® T7 Kit	Ambion	transkrypcja <i>in vitro</i> w celu otrzymania cząsteczek RNA, zawierających strukturę kapu na końcu 5'
BigDye® Terminator v1.1 Sequencing Kit	Applied Biosystems	sekwencjonowanie DNA
pET-30 Ek/LIC Vector Kit	Novagen	niezależne od ligacji klonowanie do wektora ekspresyjnego
S•Tag™ rEK Purification Kit	Novagen	oczyszczanie białek zawierających znacznik S•Tag i usuwanie znacznika (cięcie białek fuzyjnych zawierających sekwencję rozpoznawaną przez enterokinazę (DDDDK↓X))
AP Detection Reagent Kit	Novagen	kolorymetryczna detekcja obecności fosfatazy alkalicznej (w metodzie <i>western blot</i>)
pGEM®-T Easy Vector System	Promega	bezpośrednie klonowanie produktów PCR do plazmidu
ETI-AB-HCVK-4	DiaSorin	wykrywanie obecności przeciwciał anty-HCV w surowicy

III.1.7 Przeciwciała

Przeciwciała rozpuszczano w buforze blokującym A lub B [III.1.8.4] bądź 1× PBS [III.1.9.12], do uzyskania odpowiedniego rozcieńczenia, wg tabeli:

Tabela III.5. Użyte przeciwciała

Nazwa	Producent	Stężenie początkowe	Stosowane rozcieńczenie
I-rzędowe kozie poliklonalne, przeciwko białku E2 HCV	Abcam	4 mg/ml	1:5000 ^(1,2) 1:50 ⁽³⁾
II-rzędowe królicze poliklonalne, przeciwko kozim immunoglobulinom G, sprzężone z fosfatazą alkaliczną	Abcam	1 mg/ml	1:5000 ⁽¹⁾
II-rzędowe królicze poliklonalne, przeciwko kozim immunoglobulinom G, sprzężone z peroksydazą chrzanową	Abcam	2 mg/ml	1:5000 ⁽²⁾
II-rzędowe ośle poliklonalne, przeciwko kozim immunoglobulinom G, sprzężone z fikoerytryną	Abcam	0,5 mg/ml	1:50 ⁽³⁾
kozim poliklonalne przeciwko ludzkim immunoglobulinom G, sprzężone z fosfatazą alkaliczną	Sigma	1,4 mg/ml	1:30 000 ⁽¹⁾

⁽¹⁾ western blot; ⁽²⁾ ELISA; ⁽³⁾ analiza wiązania białka E2 z receptorem CD81 limfocytów B

III.1.8 Roztwory

III.1.8.1 Roztwory do otrzymywania plazmidów w małej skali

III.1.8.1.1 Roztwór ALM1

- 4,5 g dekstrozy ($C_k = 50$ mM)
- 1,86 g EDTA ($C_k = 10$ mM)
- 1,51 g Tris ($C_k = 25$ mM)
- dopełniano wodą do 500 ml

III.1.8.1.2 Roztwór ALM2

- 1 ml 10% SDS ($C_k = 1\%$)
- 1 ml 2 M NaOH ($C_k = 0,2$ M)
- dopełniano wodą do 10 ml

III.1.8.2 Antybiotyki

Antybiotyki stosowano jako składniki stałych i płynnych pożywek selekcyjnych do hodowli bakterii. Sporządzano roztwory antybiotyków o określonym stężeniu początkowym, dzielono je na porcje i przechowywano w temperaturze -20°C . Do przygotowywanej pożywki dodawano roztwór antybiotyku, do uzyskania odpowiedniego stężenia końcowego, wg tabeli:

Tabela III.6. Stosowane roztwory antybiotyków

Antybiotyk	Rozpuszczalnik	Stężenie początkowe	Stężenie końcowe
ampicylina	woda	100 mg/ml	200 $\mu\text{g/ml}$
chloramfenikol	etanol	34 mg/ml	34 $\mu\text{g/ml}$
kanamycyna	woda	30 mg/ml	30 $\mu\text{g/ml}$
rifampicyna	DMSO	20 mg/ml	50 $\mu\text{g/ml}$
karbenicylina	woda	50 mg/ml	50 $\mu\text{g/ml}$

III.1.8.3 Roztwory do wybarwiania białek rozdzielonych metodą elektroforezy w żelu poliakryloamidowym

III.1.8.3.1 Roztwór utrwalający

- 250 ml etanolu ($C_k = 50\%$, v/v)
- 50 ml kwasu octowego ($C_k = 10\%$, v/v)
- 200 ml H_2O

III.1.8.3.2 Roztwór barwiący

- 250 ml metanolu ($C_k = 50\%$, v/v)
- 50 ml kwasu octowego ($C_k = 10\%$, v/v)
- 200 ml H_2O
- 0,25 g Serva Blue R-250

III.1.8.3.3 Roztwór odbarwiający

- 50 ml metanolu ($C_k = 5\%$, v/v)
- 125 ml kwasu octowego ($C_k = 12,5\%$, v/v)
- 825 ml H_2O

III.1.8.4 Roztwory do blokowania w metodzie *western blot*

III.1.8.4.1 Roztwór blokujący A

- 1,05 g BSA ($C_k = 3\%$)
- dopełniano buforem 1x TBS [III.1.9.11] do 35 ml

III.1.8.4.2 Roztwór blokujący B

- 1 g BSA ($C_k = 1\%$)
- dopełniano buforem TBST [III.1.9.10] do 100 ml

III.1.8.5 Pozostałe roztwory

- 0,5 mg/ml X-gal w DMF
- 50 mg/ml lizozym
- 1 M lub 0,1M IPTG
- 0,1 M octan amonu w metanolu
- 0,1 M DTT
- 0,5 M EDTA pH = 8
- 10% SDS
- 10% APS
- 80% glicerol
- 5 M NaCl
- 1 M $MgSO_4$
- 0,5 M Na_2HPO_4 i 0,5 M NaH_2PO_4 . Mieszając oba roztwory, otrzymywano 0,5 M Na_2HPO_4 o pH = 6; 7; 7,5 i 8.
- 1 M Tris-HCl o pH = 6,8; 7,4; 7,5; 8 i 8,8
- 100 mM MES-NaOH o pH = 5,5

III.1.9 Bufory

III.1.9.1 Bufor TBE do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych

- 0,89 M Tris
- 0,89 M kwas borowy
- 0,02 M EDTA

Gotową mieszaninę składników firmy BioShop rozpuszczano w 1 l H₂O, uzyskując bufor 10× stężony.

III.1.9.2 Bufor do agroinfiltracji

- 100 ml 100 mM MES-NaOH pH = 5,5 ($C_k = 10$ mM)
- 10 ml 1 M MgSO₄ ($C_k = 10$ mM)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.3 Bufor ekstrakcyjny do izolacji białek z tkanki roślinnej

- 50 ml 1 M Tris-HCl pH = 7,5 ($C_k = 0,5$ M)
- 23,96 g sacharozy ($C_k = 0,7$ M)
- 1,86 g EDTA ($C_k = 0,05$ M)
- 0,74 g KCl ($C_k = 0,1$ M)
- dopełniano wodą do 100 ml
- przed izolacją białek do odpowiedniej porcji buforu dodawano β-merkaptoetanol do stężenia końcowego 2%

III.1.9.4 Bufory do deglikozylacji białek roślinnych

III.1.9.4.1 Bufor D1

- 1 ml 0,5 M Na₂HPO₄ pH = 7,5 ($C_k = 50$ mM)
- 0,004 g β-merkaptoetanolu ($C_k = 5$ mM)
- 0,2 ml 0,5 M EDTA ($C_k = 10$ mM)
- 0,2 ml 10% SDS ($C_k = 0,2\%$)
- dopełniano wodą do 10 ml

III.1.9.4.2 Bufor D2

- 1 ml 0,5 M Na₂HPO₄ pH = 7,5 (C_k = 50 mM)
- 0,004 g β-merkaptoetanolu (C_k = 5 mM)
- 0,2 ml 0,5 M EDTA (C_k = 10 mM)
- 0,01 g 0,1% Triton-X (C_k = 0,1%)
- dopełniano wodą do 10 ml

III.1.9.5 Bufory do badania rozpuszczalności białek bakteryjnych

III.1.9.5.1 Bufor PS1

- 10 ml 0,5 M Na₂HPO₄ pH = 8 (C_k = 50 mM)
- 6 ml 5 M NaCl (C_k = 300 mM)
- dopełniano wodą do 100 ml

III.1.9.5.2 Bufor PS2

- 20 ml 0,5 M Na₂HPO₄ pH = 8 (C_k = 100 mM)
- 1 ml 1 M Tris pH = 8 (C_k = 10 mM)
- 48,48 g mocznika (C_k = 8 M)
- dopełniano wodą do 100 ml

III.1.9.6 Bufory do oczyszczania białka E2

Wszystkie bufory sterylizowano wykorzystując filtry 0,22 μm firmy Millipore.

III.1.9.6.1 Bufor I

- 100 ml 0,5 M Na₂HPO₄, pH = 8 (C_k = 50 mM)
- 10 ml 5 M NaCl (C_k = 50 mM)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.6.2 Bufor II

- 100 ml 0,5 M Na₂HPO₄, pH = 7 (C_k = 50 mM)
- 60 ml 5 M NaCl (C_k = 300 mM)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.6.3 Bufor 2× III

- 200 ml 0,5 M Na₂HPO₄, pH = 6 (C_k = 100 mM)
- 120 ml 5M NaCl (C_k = 600 mM)
- 200 g glicerolu (C_k = 20%)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.6.4 Bufor 10× L

- 200 ml 0,5 M Na₂HPO₄, pH = 7,5 (C_k = 100 mM)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.6.5 Bufor 10× S

- 200 mM Tris-HCl pH = 7,5
- 1,5 M NaCl
- 1% Triton X-100

Gotowy bufor wchodzący w skład zestawu S•Tag™ rEK Purification Kit [III.1.6].

III.1.9.6.6 Bufor 2× M

- 40 ml 1 M Tris-HCl pH = 7,4 (C_k = 40 mM)
- 80 ml 5 M NaCl (C_k = 400 mM)
- 4 ml 0,5 M EDTA (C_k = 2 mM)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.6.7 Bufor do sączenia molekularnego

- 100 ml 0,5 M Na₂HPO₄, pH = 6 (C_k = 50 mM)
- 20 ml 5M NaCl (C_k = 100 mM)
- 100 g glicerolu (C_k = 10%)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.7 Bufor do przechowywania białka E2

- 10 ml buforu 2× III [III.1.9.6.3] (C_k = 50 mM Na₂HPO₄, 150 mM NaCl)
- 0,4 ml 100 mM DTT (C_k = 1 mM)
- 18 g glicerolu (C_k = 50%; 2 g glicerolu zawarte są w 10 ml buforu 2× III)
- dopełniano wodą do 40 ml

III.1.9.8 Bufor 10× R do rozdziatu elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących

- 30,2 g Tris ($C_k = 0,25$ M)
- 144,2 g glicyny ($C_k = 1,92$ M)
- 10 g SDS ($C_k = 1\%$)
- dopełniano wodą do 1 l

III.1.9.9 Bufor do transferu białek rozdzielonych w żelach poliakryloamidowych na membranę PVDF

- 20 ml 10× R [III.1.9.8] ($C_k = 1\times$)
- 40 ml metanolu ($C_k = 20\%$, v/v)
- dopełniano wodą do 200 ml

III.1.9.10 Bufor TBST do identyfikacji białek metodą *western blot*

- 25 mM Tris
- 137 mM NaCl
- 2,7 mM KCl
- 0,05% Tween-20

Gotową mieszaninę składników firmy BioShop rozpuszczano w 1 l H₂O, uzyskując bufor jednokrotnie stężony.

III.1.9.11 Bufor 10× TBS do identyfikacji białek metodą *western blot*

- 121,14 g Tris ($C_k = 2$ M)
- rozpuszczano w 300 ml H₂O
- 137 ml 5M NaCl ($C_k = 1,37$ M)
- doprowadzano do pH = 8, dodając HCl
- dopełniano wodą do 500 ml

III.1.9.12 Bufor 5× PBS

- 5,8 g Na₂HPO₄ (C_k = 0,0817 M)
- 0,5 g KCl (C_k = 0,0134 M)
- 0,5 g K₃PO₄ (C_k = 0,0047 M)
- 20 g NaCl (C_k = 0,68 M)
- rozpuszczano w 400 ml H₂O
- doprowadzano do pH = 7,4, dodając HCl
- dopełnianio wodą do 500 ml

III.1.9.13 Bufor PBST

- 1,16 g Na₂HPO₄ (C_k = 0,0163 M)
- 0,1 g KCl (C_k = 0,0026 M)
- 0,1 g K₃PO₄ (C_k = 0,00094 M)
- 4 g NaCl (C_k = 0,136 M)
- 0,25 g Tween 20 (C_k = 0,05%)
- rozpuszczano w 400 ml H₂O
- doprowadzano do pH = 7,4, dodając HCl
- dopełnianio wodą do 500 ml

III.1.9.14 Bufor do inokulacji (5×)

- 1,875 g glicyny (C_k = 250 mM)
- 2,61 g K₂HPO₄ (C_k = 150 mM)
- 0,5 ml bentonitu (C_k = 0,5%)
- 0,5 g celitu (C_k = 0,5%)
- doprowadzano do pH = 9,2 dodając KOH
- dopełnianio wodą do 100 ml

III.1.9.15 Bufor ekstrakcyjny do izolacji kwasów nukleinowych z tkanki roślinnej (10×)

- 37,5 g glicyny (C_k = 1 M)
- 29,22 g NaCl (C_k = 1 M)
- 100 ml 0,5M EDTA (C_k = 0,1 M)
- doprowadzano do pH = 9,0 dodając NaOH
- dopełnianio wodą do 500 ml

III.1.9.16 Bufor reakcyjny dla enterokinazy

- 0,2 ml 1 M Tris-HCl pH = 7,4 ($C_k = 20$ mM)
- 0,5 ml 1 M NaCl ($C_k = 50$ mM)
- 0,2 ml 0,1 M CaCl₂ ($C_k = 2$ mM)
- dopełniano wodą do 10 ml

III.1.9.17 Bufory obciążające

III.1.9.17.1 Bufor obciążający 6× BJ do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w żelach agarozowych w warunkach natywnych

- 0,1 ml 1M Tris-HCl, pH 7,5 ($C_k = 10$ mM)
- 0,186 g EDTA ($C_k = 50$ mM)
- 1 g Ficoll 400 ($C_k = 10\%$)
- 0,025 g błękitu bromofenolowego ($C_k = 0,25\%$)
- 0,025 g cyjanianu ksylenu ($C_k = 0,25\%$)
- dopełniano wodą do 10 ml

III.1.9.17.2 Bufor obciążający 4× SB do rozdzielania elektroforetycznego białek w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących

- 2,5 ml 1 M Tris-HCl pH = 6,8 ($C_k = 250$ mM)
- 2 g β-merkaptioetanolu ($C_k = 20\%$)
- 0,8 g SDS ($C_k = 8\%$)
- 0,015 g błękitu bromofenolowego ($C_k = 0,15\%$)
- 4 g glicerolu ($C_k = 40\%$)
- dopełniano wodą do 10 ml

III.1.10 Pożywki

III.1.10.1 Stała pożywka LB, zawierająca antybiotyki

- 2 g peptonu
- 1,25 g wyciągu drożdżowego
- 1,25 g NaCl
- dopełniano wodą do 250 ml
- dodawano 3,75 g agaru i sterylizowano w autoklawie
- otrzymaną mieszaninę schładzano do temperatury 55°C, dodawano roztwór antybiotyku [III.1.8.2], wylewano na sterylne szalki i pozostawiano do zastygnięcia

III.1.10.2 Płynna pożywka LB

- 10 g peptonu
- 5 g wyciągu drożdżowego
- 10 g NaCl
- dopełniano wodą do 1 l i sterylizowano w autoklawie

III.1.10.3 Płynna pożywka LB zawierająca antybiotyki

- do 1 l sterylnej płynnej pożywki LB dodawano roztwór antybiotyku [III.1.8.2]

III.1.10.4 Płynna pożywka LB, zawierająca ampicylinę i glukozę

- do 1 l sterylnej płynnej pożywki LB dodawano roztwór ampicyliny [III.1.8.2] oraz 4,44 ml 45% glukozy ($C_k = 2 \text{ g/l}$)

III.1.10.5 Płynna pożywka SOC

Gotowa pożywka dostarczona wraz z komórkami kompetentnymi firmy Novagen.

III.1.11 Żele

III.1.11.1 Żel agarozowy do rozdzielania elektroforetycznego kwasów nukleinowych w warunkach natywnych (1%)

- 0,45 g agarozy
- 45 ml 0,5× stężonego buforu TBE [III.1.9.1]
- rozpuszczano przez podgrzanie w kuchence mikrofalowej, schładzano do temperatury 55°C, dodawano 2,25 µl bromku etydyny ($C_p = 10$ mg/ml; $C_k = 0,5$ µg/ml) i wlewano do aparatu do elektroforezy

III.1.11.2 Żele poliakryloamidowe do rozdzielania elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących (żele PAA)

III.1.11.2.1 Żel zagęszczający (5%)

- 0,625 ml 40% akrylamidu-bis
- 0,63 ml 1 M Tris-HCl pH = 6,8
- 0,05 ml 10% SDS
- 3,64 ml H₂O
- 0,05 ml 10% APS
- 0,005 ml TEMED

III.1.11.2.2 Żel rozdzielający (12%)

- 3,6 ml 40% akrylamidu-bis
- 4,4 ml 1 M Tris-HCl pH = 8,8
- 0,12 ml 10% SDS
- 3,76 ml H₂O
- 0,12 ml 10% APS
- 0,006 ml TEMED

III.1.11.2.3 Żel rozdzielający (15%)

- 4,5 ml 40% akrylamidu-bis
- 4,4 ml 1 M Tris-HCl pH = 8,8
- 0,12 ml 10% SDS
- 2,86 ml H₂O
- 0,12 ml 10% APS
- 0,006 ml TEMED

III.1.12 Wzorce mas

III.1.12.1 Wzorzec mas kwasów nukleinowych

Sigma: DirectLoad™ Wide Range DNA Marker

III.1.12.2 Wzorce mas białek

Fermentas: Unstained Protein Molecular Weight Marker

Invitrogen: Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards

III.2 Metody

III.2.1 Powielanie fragmentów genomu HCV metodą RT-PCR

Matrycą w reakcji był całkowity RNA wirusowy wyizolowany z surowicy pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Reakcję prowadzono z wykorzystaniem zestawu OneStep RT-PCR Kit, w objętości 25 μ l, wg ogólnego schematu podanego w tabeli:

Tabela III.7. Skład mieszaniny reakcyjnej RT-PCR

Odczynnik	Ilość
matryca RNA	5 μ l
starter homologiczny do końca 5' namnażanego fragmentu ⁽¹⁾	15 pmol
starter komplementarny do końca 3' namnażanego fragmentu ⁽²⁾	15 pmol
dNTPs ($C_p = 10$ mM, $C_k = 0,4$ mM)	1 μ l
5 \times <i>QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer</i> ⁽³⁾ ($C_p = 5\times$, $C_k = 1\times$)	5 μ l
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i> ⁽³⁾	1 μ l
RiboLock TM	8 U
H ₂ O	do 25 μ l

⁽¹⁾ Starter HVR-Z5 dla fragmentu AF i genu E2 lub starter IFN-Zs dla fragmentu IFN-R [por.: tabela III.3]; ⁽²⁾ Starter HVR-Z3 dla fragmentu AF, starter E2-Z3 dla genu E2 lub starter IFN-Za dla fragmentu IFN [por.: tabela III.3]; ⁽³⁾ Oryginalne nazwy odczynników wchodzących w skład zestawu OneStep RT-PCR Kit.

Reakcje prowadzono w aparacie firmy Biometra. Warunki RT-PCR stosowane podczas powielania poszczególnych fragmentów genomu wirusowego podano w tabelach [tabela III.8, tabela III.9]:

Tabela III.8. Warunki reakcji RT-PCR nr 1 - powielanie fragmentu AF genomu HCV (pozycje nt: 1347-1948⁽¹⁾)

Numer cyklu	Etap cyklu	Czas	Temperatura	Liczba powtórzeń
1.	odwrotna transkrypcja	30 min	45°C	-
2.	inkubacja	15 min	95°C	-
2.	denaturacja	1 min	95°C	20
	hybrydyzacja	1 min	45°C	
	elongacja	1 min	72°C	
3.	denaturacja	1 min	95°C	20
	hybrydyzacja	1 min	60°C	
	elongacja	1 min	72°C	
4.	elongacja	10 min	72°C	-

⁽¹⁾ Pozycje nukleotydowe odnoszą się do sekwencji genomu HCV-1a, zdeponowanej w internetowej bazie danych GenBank pod numerem NC_004102.

Tabela III.9. Warunki reakcji RT-PCR nr 2 - powielanie genu E2 (pozycje nt: 1347-2662⁽¹⁾) i fragmentu IFN-R HCV (pozycje nt: 6871-7653⁽¹⁾)

Numer cyklu	Etap cyklu	Czas	Temperatura	Liczba powtórzeń
1.	odwrotna transkrypcja	30 min	50°C	-
2.	inkubacja	15 min	95°C	-
3.	denaturacja	1 min	95°C	35
	hybrydyzacja	1 min	61°C	
	elongacja	2 min	72°C	
4.	elongacja	10 min	72°C	-

⁽¹⁾ Pozycje nukleotydowe odnoszą się do sekwencji genomu HCV-1a, zdeponowanej w internetowej bazie danych GenBank pod numerem NC_004102.

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelach agarozowych [III.2.6].

III.2.2 Powielanie metodą RT-PCR fragmentów genomu wirusowego wyizolowanego z roślin

Amplifikacja fragmentów genomu wirusowego wyizolowanego z roślin [III.2.32] prowadzona była w dwóch oddzielnych etapach. Pierwszym z nich była odwrotna transkrypcja, w której matrycę stanowił całkowity RNA wyizolowany z roślin. Reakcja przebiegała w objętości 10 µl i zawierała:

- 3,5 µl roztworu całkowitego RNA [III.2.32]
- 6,5 µl Mix-RT [tabela III.10]

Tabela III. 10. Skład mieszaniny Mix-RT (na 10 reakcji)

Odczynnik	Ilość
starter RT-1 (10 pmol/ μ l)	5 μ l
dNTPs ($C_p = 2,5$ mM)	20 μ l
bufor reakcyjny ⁽¹⁾ ($C_p = 10\times$)	10 μ l
MgCl ₂ ($C_p = 25$ mM)	12,5 μ l
0,1M DTT	5 μ l
RiboLock™ (40 U/ μ l)	2 μ l
odwrotna transkryptaza RevertAid™ M-MuLV (200 U/ μ l)	4 μ l
H ₂ O	10 μ l

⁽¹⁾ Dostarczony wraz z polimerazą DNA Taq firmy Fermentas.

Reakcje prowadzono w aparacie firmy Biometra. Mieszaninę reakcyjną inkubowano 40 min w temperaturze 55°C, a następnie denaturowano przez inkubację 5 min w temperaturze 95°C i gwałtowne schłodzenie przez 5 min w temperaturze 0°C.

Następnie amplifikowano DNA, wykorzystując produkt pierwszego etapu jako matrycę. Reakcja ta przebiegała w objętości 50 μ l i zawierała:

- 10 μ l mieszaniny reakcyjnej odwrotnej transkrypcji
- 40 μ l Mix-PCR1 [tabela III.11]

Tabela III. 11. Skład mieszaniny Mix-PCR1

Odczynnik	Ilość
starter RT-1 (10 pmol/ μ l)	2,5 μ l
starter RT-2 (10 pmol/ μ l)	5 μ l
dNTPs ($C_p = 2,5$ mM)	20 μ l
bufor reakcyjny ⁽¹⁾ ($C_p = 10\times$)	40 μ l
MgCl ₂ ($C_p = 25$ mM,)	17,5 μ l
polimeraza DNA Taq	2 μ l
H ₂ O	316,5 μ l

⁽¹⁾ Dostarczony wraz z polimerazą DNA Taq firmy Fermentas.

Reakcje prowadzono w aparacie firmy Biometra. Warunki PCR podano w tabeli:

Tabela III.12. Warunki reakcji PCR nr 1 - powielanie fragmentów genomu wirusowego wyizolowanego z roślin

Numer cyklu	Etap cyklu	Czas	Temperatura	Liczba powtórzeń
1.	denaturacja	1 min	95°C	40
	hybrydyzacja	1 min	58°C	
	elongacja	2 min	72°C	

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelach agarozowych [III.2.6].

III.2.3 Powielanie fragmentu AF genomu HCV metodą PCR

Matrycą w reakcji był 50× rozcieńczony produkt RT-PCR. [III.2.1; tabela III.7]. Reakcję prowadzono z wykorzystaniem zestawu OneStep RT-PCR Kit, w objętości 25 µl, wg ogólnego schematu podanego w tabeli:

Tabela III.13. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR nr 2

Odczynnik	Ilość
matryca	1 µl
starter HVR-W5 ⁽¹⁾	15 pmol
starter HVR-W3 ⁽¹⁾	15 pmol
dNTPs (C _p = 10 mM, C _k = 0,4 mM)	1 µl
5x <i>QIAGEN OneStep RT-PCR Buffer</i> ⁽²⁾ (C _p = 5×, C _k = 1×)	5 µl
<i>QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix</i> ⁽²⁾	1 µl
H ₂ O	do 25 µl

⁽¹⁾ Por.: tabela III.3 ⁽²⁾ Oryginalne nazwy odczynników wchodzących w skład zestawu OneStep RT-PCR Kit.

Reakcje prowadzono w aparacie firmy Biometra. Warunki PCR podano w tabeli:

Tabela III.14. Warunki reakcji PCR nr 2 - powielanie fragmentu AF HCV

Numer cyklu	Etap cyklu	Czas	Temperatura	Liczba powtórzeń
1.	inkubacja	15 min	95°C	-
	denaturacja	1 min	94°C	
2.	hybrydyzacja	45 s	60°C	30
	elongacja	1 min	72°C	
3.	elongacja	10 min	72°C	-

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelach agarozowych [III.2.6].

III.2.4 Powielanie DNA metodą PCR (polimeraza Taq)

Reakcje prowadzono w objętości 50 μl wg ogólnego schematu podanego w tabeli:

Tabela III. 15. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR nr 3

Odczynnik	Ilość
matryca DNA	10 pg-1 μg
starter homologiczny do końca 5' namnażanego fragmentu	15 pmol
starter komplementarny do końca 3' namnażanego fragmentu	15 pmol
dNTPs ($C_p = 2,5 \text{ mM}$, $C_k = 0,2 \text{ mM}$)	4 μl
bufor reakcyjny ⁽¹⁾ ($C_p = 10\times$, $C_k = 1\times$)	5 μl
MgCl_2 ($C_p = 25 \text{ mM}$, $C_k = 3\text{mM}$)	6 μl
polimeraza DNA Taq	2,5 U
H_2O	do 50 μl

⁽¹⁾ Dostarczony wraz z polimerazą DNA Taq firmy Fermentas.

Reakcje prowadzono w aparacie firmy Biometra. Warunki PCR podano w tabeli:

Tabela III. 16. Warunki reakcji PCR nr 3

Numer cyklu	Etap cyklu	Czas	Temperatura	Liczba powtórzeń
1.	denaturacja	2min	94°C	-
2.	denaturacja	1min	94°C	30
	hybrydyzacja	30s	$X^\circ\text{C}^{(1)}$	
	elongacja	1min	72°C	
3.	elongacja	7min	72°C	-

⁽¹⁾ Por.: tabela III.17.

Temperatura hybrydyzacji była ustalana indywidualnie dla każdej pary starterów, na podstawie ich wartości temperatury topnienia (T_m), zgodnie z tabelą:

Tabela III.17. Temperatuty hybrydyzacji dla użytych par starterów

Starter A	Starter B	Temperatura hybrydyzacji
E2-W5	E2-W3	57°C
T7	R-pGEM	53°C
IFNs-1a	IFNa-1a	59°C
XbaHVR	Mlu-R	57°C
F-05Nde	R-6-05	61°C
F-02Nde	R-02-Bam6	61°C
F05	R-6-05	60°C
F02	E2-R6-4	60°C
F-05LIC	R-05LIC	60°C
F-02LIC	R-02LIC	60°C
F-pET30	R-pET30	60°C
F-05pMAL	R-05pMAL	60°C
F-02pMAL	R-02pMAL	60°C
F-pMAL	R-pMAL	60°C

A – starter homologiczny do końca 5' namnażanego fragmentu; B – starter komplementarny do końca 3' namnażanego fragmentu

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelach agarozowych [III.2.6].

III.2.5 Powielanie DNA metodą PCR (polimeraza o wysokiej dokładności kopiowania)

Reakcje powielania DNA przez polimerazę o wysokiej dokładności kopiowania prowadzono z wykorzystaniem gotowego zestawu Expand High Fidelity PCR System [III.1.6], w objętości 50 µl. Zgodnie z zaleceniem producenta, przygotowano dwie oddzielne mieszaniny reakcyjne (Mix1 i Mix2), które łączono tuż przed rozpoczęciem reakcji.

Tabela III. 18. Skład mieszaniny reakcyjnej PCR nr 4

Odczynnik	Ilość
Mix1	
matryca DNA	0,1-250 ng
starter homologiczny do końca 5' namnażanego fragmentu	15 pmol
starter komplementarny do końca 3' namnażanego fragmentu	15 pmol
dNTPs ($C_p = 10 \text{ mM}$, $C_k = 0,2 \text{ mM}$)	1 μl
H ₂ O	do 25 μl
Mix2	
<i>Expand High Fidelity buffer with 15mM MgCl₂</i> ⁽¹⁾ ($C_p = 10\times$, $C_k = 1\times$)	5 μl
<i>Expand High Fidelity enzyme mix</i> ⁽¹⁾	2,6 U
H ₂ O	do 25 μl

⁽¹⁾ Oryginalne nazwy odczynników wchodzących w skład zestawu Expand High Fidelity PCR System.

Reakcje prowadzono w aparacie firmy Biometra. Warunki PCR podano w tabeli:

Tabela III. 19. Warunki reakcji PCR nr 4

Numer cyklu	Etap cyklu	Czas	Temperatura	Liczba powtórzeń
1.	denaturacja	2 min	94°C	-
2.	denaturacja	15 s	94°C	10
	hybrydyzacja elongacja	30 s 1 min	X°C ⁽¹⁾ 72°C	
3.	denaturacja	15 s	94°C	20
	hybrydyzacja	30 s	X°C ⁽¹⁾	
	elongacja	1 min + 5 s na każdy cykl	72°C	
4.	elongacja	7 min	72°C	-

⁽¹⁾ Por.: tabela III.17.

Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelach agarozowych [III.2.6].

III.2.6 Analiza kwasów nukleinowych metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym

- Do badanych preparatów DNA/RNA dodawano buforu obciążającego 6× BJ [III.1.9.17.1], do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego.
- Prowadzono rozdział w 1% żelu agarozowym [III.1.11.1], w buforze 0,5× TBE [III.1.9.1], przy napięciu 125 V i natężeniu 115 mA, w obecności wzorca mas [III.1.12.1].
- Rozdzielone kwasy nukleinowe analizowano przy użyciu transiluminatora światła UV i zestawu do dokumentacji żeli Gel Logic 200 firmy Kodak lub skanera materiałów znakowanych fluorescencyjnie i radioizotopowo Typhoon 8600 firmy Molecular Dynamics.

III.2.7 Oczyszczanie DNA

Oczyszczanie wyizolowanych plazmidów oraz dsDNA po reakcjach enzymatycznych prowadzono wykorzystując gotowy zestaw QIAquick PCR Purification Kit [III.1.6], zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta. Stężenie oczyszczonego DNA określano metodą pomiaru absorpcji światła UV o długości fali $\lambda = 260$ nm, w spektrofotometrze BioPhotometer firmy Eppendorf lub spektrofotometrze Nanodrop firmy Thermo Scientific.

III.2.8 Cięcie restrykcyjne

III.2.8.1 Standardowe cięcie restrykcyjne

Tabela III.20. Składniki mieszaniny reakcyjnej standardowego cięcia dsDNA enzymami restrykcyjnymi

Odczynnik	Ilość	
	Skala preparatywna	Skala analityczna
dsDNA	1-10 μ g	0,1-0,5 μ g
bufor ⁽¹⁾	10 μ l	1 μ l
enzym ⁽²⁾	50-100 U	4-6 U
H ₂ O	do 100 μ l	do 10 μ l

⁽¹⁾ Por.: tabela III.21; ⁽²⁾W przypadku podwójnego cięcia, liczba jednostek odnosi się do dwóch enzymów łącznie.

- Mieszaninę reakcyjną inkubowano 4 h w temperaturze 37°C.

- Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym [III.2.6].
- Produkty cięcia w skali preparatywnej oczyszczano [III.2.7].

Tabela III.21. Bufory stosowane podczas standardowego cięcia restrykcyjnego

Nr	Enzym	Bufor ⁽¹⁾	Producent
1	EcoRI	H	Promega
2	EcoRI/BamHI	Multicore [®]	Promega
3	EcoRI/PstI	H	Promega
4	MluI	D	Promega
5	XbaI/MluI	D	Promega
6	XbaI/EcoRI	Multicore [®]	Promega
7	BamHI	E	Promega
8	PstI	H	Promega

⁽¹⁾ Oznaczenia buforów stosowane przez producentów.

III.2.8.2 Cięcie restrykcyjne z zastosowaniem enzymów FastDigest[®]

Tabela III.22. Składniki mieszaniny reakcyjnej cięcia dsDNA enzymami restrykcyjnymi FastDigest[®]

Odczynnik	Ilość (skala preparatywna)	
dsDNA	1 µg	2 µg
bufor FastDigest	1 µl	2 µl
enzym FastDigest	1 µl	2 µl
H ₂ O	do 10 µl	do 20 µl

- Mieszaninę reakcyjną inkubowano 1 h w temperaturze 37°C.
- Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 1% żelu agarozowym [III.2.6], a następnie oczyszczano [III.2.7].

III.2.9 Izolacja plazmidów w małej skali (do 10 µg)

- Pojedyncze kolonie bakteryjne wyhodowane na stałej pożywce LB, zawierającej antybiotyk [III.1.10.1] przenoszono do 2 ml płynnej pożywki LB, zawierającej antybiotyk [III.1.10.3] i inkubowano 16 h w temperaturze 37°C, wytrząsając z prędkością 300 rpm.
- 1,5 ml hodowli wirowano 1 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze pokojowej.

- Supernatant dekantowano, a zawierający bakterie osad zawieszano w 100 μ l roztworu ALM1 [III.1.8.1.1], wytrząsając 5 min w temperaturze pokojowej.
- Dodawano 200 μ l świeżo przygotowanego roztworu ALM2 [III.1.8.1.2], delikatnie mieszano i inkubowano 5 min na lodzie.
- Dodawano 150 μ l 7,5 M octanu amonu, mieszano i inkubowano 20 min na lodzie.
- Wirowano 20min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze pokojowej.
- Supernatant przenoszono do nowej probówki, dodawano 1 ml 96% etanolu i inkubowano 20 min na lodzie.
- Wirowano 15 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze pokojowej.
- Supernatant dekantowano, a osad przemywano 1 ml 70% etanolu.
- Wirowano 5 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze pokojowej.
- Supernatant dekantowano, a osad suszono.
- Osad rozpuszczano w roztworze zawierającym:
 - 49,5 μ l H₂O
 - 0,5 μ l 4 \times RNazy A (10 μ g/ μ l)
- Otrzymane plazmidy poddawano analizie restrykcyjnej [III.2.8.1, skala analityczna].

III.2.10 Izolacja plazmidów w średniej skali (10-100 μ g)

Izolację plazmidów w średniej skali prowadzono korzystając z gotowego zestawu Plasmid Midi Kit [III.1.6], zgodnie z instrukcją załączoną przez producenta.

III.2.11 Sekwencjonowanie DNA

Sekwencjonowanie DNA prowadzono z wykorzystaniem gotowego zestawu BigDye[®] Terminator v1.1 Sequencing Kit [III.1.6], w objętości 20 µl. Przed sekwencjonowaniem plazmidy poddawano oczyszczeniu [III.2.7].

Tabela III.23. Skład mieszaniny reakcyjnej sekwencjonowania DNA

Odczynnik	Ilość
matryca DNA (plazmid)	150 ng
starter	15 pmol
50% (v/v) DMSO	2 µl
<i>BigDye Sequencing Buffer (5×)</i> ⁽¹⁾	3 µl
<i>Ready Reaction Premix</i> ⁽¹⁾	1 µl
H ₂ O	do 20 µl

⁽¹⁾ Oryginalne nazwy odczynników wchodzących w skład zestawu BigDye[®] Terminator v1.1 Sequencing Kit.

Reakcje prowadzono w aparacie firmy Biometra. Warunki reakcji podano w tabeli:

Tabela III.24. Warunki reakcji sekwencjonowania

Numer cyklu	Etap cyklu	Czas	Temperatura	Liczba powtórzeń
1.	denaturacja	2 min	94°C	-
2.	denaturacja	1 min	94°C	35
	hybrydyzacja	30 s	50°C	
	elongacja	4 min	72°C	

- Do mieszaniny reakcyjnej dodawano 2,5 µl 125 mM EDTA i 30 µl 96% etanolu.
- Dokładnie mieszano i inkubowano 15 min w temperaturze pokojowej.
- Wirowano 30 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Supernatant usuwano pipetą, a osad przemywano 200 µl 70% etanolu.
- Wirowano 10 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Supernatant usuwano pipetą, a osad suszono.
- Osad rozpuszczano w 10 µl formamidu, a następnie denaturowano przez inkubację 5 min w temperaturze 95°C i gwałtowne schłodzenie przez 5 min na lodzie.

- Przeprowadzano odczyt sekwencji z użyciem sekwenatora ABI-PRISM w IChB PAN lub w Wydziałowej Pracowni Techniki Biologii Molekularnej Wydziału Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu.

III.2.12 Ligacja

Reakcje prowadzono w objętości 10 μ l wg ogólnego schematu podanego w tabeli:

Tabela III.25. Skład mieszaniny reakcyjnej ligacji dsDNA

Odczynnik	Ilość
wektor	50-100 ng
insert	X ⁽¹⁾
bufor do ligacji ⁽²⁾ (C _p = 10 \times , C _k = 1 \times)	1 μ l
ligaza DNA T4	1U
H ₂ O	do 10 μ l

⁽¹⁾ Stosunek molowy insert:wektor wynosił 3:1; ⁽²⁾ Dostarczony wraz z ligazą firmy Fermentas.

- Inkubowano 16 h w temperaturze 16°C (w przypadku ligacji dsDNA posiadających lepkie końce) lub w temperaturze 4°C (w przypadku ligacji dsDNA posiadających tępe końce).

III.2.13 Ligacja z wektorem pGEM[®]-T Easy

Reakcje prowadzono korzystając z gotowego zestawu pGEM[®]-T Easy Vector System, w objętości 10 μ l wg ogólnego schematu podanego w tabeli:

Tabela III.26. Skład mieszaniny reakcyjnej ligacji z wektorem pGEM[®]-T Easy

Odczynnik	Ilość
wektor	50 ng
insert	X ⁽¹⁾
<i>Rapid Ligation Buffer</i> ⁽²⁾ (C _p = 2 \times , C _k = 1 \times)	5 μ l
ligaza DNA T4 ⁽²⁾	3U
H ₂ O	do 10 μ l

⁽¹⁾ Stosunek molowy insert:wektor wynosił 3:1; ⁽²⁾ Odczynniki wchodzące w skład zestawu pGEM[®]-T Easy Vector System, podano oryginalną nazwę buforu.

- Inkubowano 16 h w temperaturze 4°C.

III.2.14 Niezależne od ligacji klonowanie do wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC

Procedurę niezależnego od ligacji klonowania do wektora ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC prowadzono wykorzystując gotowy zestaw pET-30 Ek/LIC Vector Kit [III.1.6].

- Insekt (produkt reakcji PCR; [III.2.5]) oczyszczano [III.2.7] i zawieszano w buforze TlowE.
- W celu utworzenia jednoniciowych końców insertu, komplementarnych do jednoniciowych końców wektora, insert poddawano działaniu 3'→5'egzonukleazowej aktywności polimerazy DNA T4, w obecności dATP. Reakcję prowadzono w objętości 20 μ l, wg schematu podanego w tabeli:

Tabela III.27. Skład mieszaniny reakcyjnej tworzenia jednoniciowych końców dsDNA za pomocą polimerazy DNA T4 (kontrolowana hydroliza jednej nici dsDNA)

Odczynnik	Ilość
insekt	0,2 pmol
bufor reakcyjny ($C_p = 10\times$, $C_k = 1\times$)	2 μ l
dATP ($C_p = 25$ mM, $C_k = 2,5$ mM)	2 μ l
DTT ($C_p = 100$ mM, $C_k = 5$ mM)	1 μ l
polimeraza DNA T4 (2,5 U/ μ l)	1U
H ₂ O	do 20 μ l

- Inkubowano 30 min w temperaturze 22°C.
- Inaktywowano enzym przez inkubację 20 min w temperaturze 75°C.
- Przeprowadzano hybrydyzację wektora i insertu, przygotowując mieszaninę zawierającą:
 - 1 μ l wektora pET-30 Ek/LIC
 - 0,02 pmola insertu (2 μ l mieszaniny reakcyjnej tworzenia jednoniciowych końców dsDNA)
- Inkubowano 5 min w temperaturze 22°C.
- Dodawano 1 μ l 25 mM EDTA ($C_k = 6,25$ mM)
- Inkubowano 5 min w temperaturze 22°C.

III.2.15 Usuwanie jednoniciowych wystających końców dsDNA za pomocą polimerazy DNA T4

W celu usunięcia jednoniciowych wystających końców dsDNA, poddawano go działaniu polimerazy DNA T4, posiadającej aktywność 3'→5'egzonukleazową, w obecności czterech trifosforanów deoksyrybonukleozydów. Reakcję prowadzono wykorzystując składniki gotowego zestawu pET-30 Ek/LIC Vector Kit [III.1.6], w objętości 20 µl, wg schematu podanego w tabeli:

Tabela III.28. Skład mieszaniny reakcyjnej usuwania jednoniciowych wystających końców dsDNA za pomocą polimerazy T4

Odczynnik	Ilość
dsDNA rozpuszczony w buforze TlowE	1 µg
bufor reakcyjny ($C_p = 10\times$, $C_k = 1\times$)	2 µl
dNTPs ($C_p = 25$ mM, $C_k = 2,5$ mM)	2 µl
DTT ($C_p = 100$ mM, $C_k = 5$ mM)	1 µl
polimeraza DNA T4 (2,5 U/µl)	1 U
H ₂ O	do 20 µl

- Inkubowano 30 min w temperaturze 22°C.
- Inaktywowano enzym przez inkubację 20 min w temperaturze 75°C, a dsDNA oczyszczano [III.2.7].

III.2.16 Wypełnianie jednoniciowych wystających końców dsDNA za pomocą fragmentu Klenowa polimerazy DNA I

Reakcję prowadzono w objętości 20 µl, wg schematu podanego w tabeli:

Tabela III.29. Skład mieszaniny reakcyjnej wypełniania jednoniciowych wystających końców dsDNA za pomocą fragmentu Klenowa polimerazy DNA I

Odczynnik	Ilość
dsDNA	1 µg
bufor reakcyjny ⁽¹⁾ ($C_p = 10\times$, $C_k = 1\times$)	2 µl
dNTPs ($C_p = 2$ mM, $C_k = 0,05$ mM)	0,5 µl
fragment Klenowa polimerazy DNA I (10 U/µl)	5 U
H ₂ O	do 20 µl

⁽¹⁾ Dostarczony wraz z enzymem – fragmentem Klenowa polimerazy DNA I firmy Fermentas

- Inkubowano 10 min w temperaturze 37°C.

- Inaktywowano enzym przez inkubację 10 min w temperaturze 75°C, a dsDNA oczyszczano [III.2.7].

III.2.17 Przygotowanie elektrokompetentnych komórek *Agrobacterium tumefaciens* GV3101

- Ze stoku glicerolowego *Agrobacterium tumefaciens* GV3101 pobierano zaszczepkę i przenoszono do 5 ml pożywki LB, zawierającej rifampicynę [III.1.10.3]. Inkubowano 24 h w temperaturze 28°C, wytrząsając z prędkością 120 rpm.
- 0,5 ml otrzymanej kultury bakteryjnej przenoszono do 200 ml pożywki LB, zawierającej rifampicynę o stężeniu końcowym 50 µg/ml. Inkubowano 24 h w temperaturze 28°C, wytrząsając z prędkością 120 rpm.
- Otrzymaną kulturę dzielono na 4 porcje o objętości 50 ml każda.
- Wirowano 10 min z prędkością 3000 g w temperaturze 4°C.
- Dwukrotnie przemywano osady 50 ml sterylnego 10% glicerolu.
- Zawieszano osady w 10 ml sterylnego 10% glicerolu, a następnie łączono cztery uzyskane porcje.
- Wirowano 10 min z prędkością 3000 g w temperaturze 4°C.
- Zawieszano osad w 250 µl sterylnego 10% glicerolu, dzielono na porcje o objętości 25 µl, zamrażano w ciekłym azocie i przechowywano w temperaturze -80°C.

III.2.18 Transformacja komórek bakteryjnych

III.2.18.1 Transformacja komórek *Agrobacterium tumefaciens* metodą elektroporacji

- Do zawiesiny komórek kompetentnych *A. tumefaciens* GV3101 [III.2.17] dodawano 10 ng plazmidu i całość przenoszono do kuwety.
- Przeprowadzano elektroporację, stosując następujące parametry pola: napięcie 2,5 kV; pojemność 25 µF; oporność 200 Ω; czas trwania: 3-7 ms.
- Do transformowanych komórek dodawano 1 ml pożywki LB [III.1.10.2] i inkubowano 2 h w temperaturze 28°C, wytrząsając z prędkością 300 rpm.
- 0,05-0,1 ml kultury bakteryjnej rozprowadzano na szalkach ze stałą pożywką LB, zawierającą antybiotyk [III.1.10.1].
- Szalki inkubowano 2-3 doby w temperaturze 28°C.

III.2.18.2 Transformacja komórek *Escherichia coli* metodą szoku cieplnego

- Do zawiesiny komórek kompetentnych *E. coli* [III.1.2] dodawano 5 μ l produktu ligacji [III.2.12], lub 1 μ l produktu hybrydyzacji [III.2.14], bądź 10 ng plazmidu i inkubowano 5 min na lodzie.
- Zawiesinę ogrzewano 45 s (*E. coli* DH5 α) bądź przez 30 s (pozostałe) w temperaturze 42°C.
- Inkubowano 5 min na lodzie.
- Do transformowanych komórek dodawano pożywkę i inkubowano 45 min w temperaturze 37°C, wytrząsając z prędkością 250 rpm.
- W przypadku transformacji komórek *E. coli* DH5 α plazmidem umożliwiającym selekcję kolonii bakteryjnych na podstawie testu α -komplementacji (ang. *blue-white screening*; plazmidy: pGEM[®]-T Easy, pUC18, pUC19,) do 0,1-0,3 ml otrzymanej zawiesiny dodawano:
 - 30 μ l X-Gal [III.1.8.5]
 - 15 μ l 0,1 M IPTG
- Mieszaninę wylewano i rozprowadzano sterylną bagietką na szalkach ze stałą pożywką LB, zawierającą antybiotyki [III.1.10.1]
- Szalki inkubowano 16 h w temperaturze 37°C.

Szczegółowe dane dotyczące objętości zawiesiny transformowanych komórek, rodzaju pożywki dodanej po transformacji oraz ilości rozprowadzonej na szalkach dla poszczególnych szczepów bakteryjnych podano w tabeli:

Tabela III.30. Warunki transformacji różnych szczepów *E. coli*

Szczep <i>E. coli</i> i objętość zawiesiny transformowanych komórek	Dodana pożywka ⁽¹⁾		Ilość rozprowadzona na szalce
DH5 α	50 μ l	1 ml LB	0,1-0,3 ml
BL21(DE3)pLysS	50 μ l	0,25 ml SOC	0,1 ml
BL21-AI [™] One Shot [®]	50 μ l	0,25 ml SOC	0,05 ml
Rosetta(DE3)pLysS	20 μ l	0,08 ml SOC	całość
Origami B(DE3)pLysS	20 μ l	0,08 ml SOC	całość
TB1	50 μ l	1 ml SOC	całość

⁽¹⁾ Por.: III.1.10.2, III.1.10.5.

III.2.19 Agroinfiltracja liści tytoniu *Nicotiana benthamiana*

- Pojedynczą kolonię bakteryjną, transformowaną jednym z trzech plazmidów systemu do ekspresji przejściowej w tytoniu [III.1.3] i wyhodowaną na stałej pożywce LB, zawierającej antybiotyk [III.1.10.1], przenoszono do 5 ml płynnej pożywki LB, zawierającej antybiotyk [III.1.10.3] i inkubowano 24 h w temperaturze 28°C, wytrząsając z prędkością 300 rpm.
- Z niewielkiej porcji hodowli sporządzano stok glicerolowy: pobierano 800 µl kultury bakteryjnej, dodawano 100 µl 80% glicerolu, mieszano i zamrażano na suchym lodzie. Przechowywano w temperaturze -80°C.
- 1,5 ml każdej z trzech hodowli wirowano oddzielnie 10 min z prędkością 8000 rpm w temperaturze pokojowej.
- Supernatanty usuwano a osady delikatnie zawieszano w 500 µl buforu do agroinfiltracji [III.1.9.2]. Trzy uzyskane w ten sposób zawiesiny bakterii łączono i delikatnie mieszano.
- Liście tytoniu nakłuwano, a następnie wprowadzano do nich zawiesinę transformowanych komórek *A. tumefaciens* za pomocą strzykawki bez igły.

III.2.20 Ekstrakcja białek roślinnych

- Liście tytoniu homogenizowano w ciekłym azocie a następnie przechowywano w temperaturze -80°C.
- Do 100 mg homogenizowanych liści dodawano 800 µl mieszaniny zawierającej równą objętość buforu ekstrakcyjnego [III.1.9.3] i fenolu wysyconego 8-hydroksychinoliną. Wytrząsano 10 min.
- Wirowano 6 min z prędkością 6000 rpm w temperaturze 4°C.
- Dodawano 200 µl fenolu wysyconego 8-hydroksychinoliną. Wytrząsano 5 min.
- Wirowano 6 min z prędkością 6000 rpm w temperaturze 4°C.
- Pobierano fazę fenolową i dodawano do niej 1 objętość buforu ekstrakcyjnego. Wytrząsano 5 min w temperaturze 4°C.
- Wirowano 6 min z prędkością 6000 rpm w temperaturze 4°C.
- Pobierano fazę fenolową, a następnie wytrącano zawarte w niej białka, dodając 5 objętości 0,1 M roztworu octanu amonu w metanolu i inkubując 16 h w temperaturze -20°C.
- Wirowano 15 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C.

- Supernatant dekantowano, a osad przemywano 2-3 krotnie 200 µl 0,1 M roztworu octanu amonu w metanolu i jednokrotnie acetonem.
- Rozpuszczano w buforze 1× SB [III.1.9.17.2] lub D1 [III.1.9.4.1].

III.2.21 Deglikozylacja białek roślinnych

- Białka roślinne po izolacji [III.2.20] zawieszano w buforze D1 [III.1.9.4.1].
- Porcję zawierającą ok. 50 µg białka (5-10 µl) denaturowano przez inkubację 5 min w temperaturze 95°C i gwałtowne schłodzenie przez 5 min w temperaturze 0°C.
- Dodawano 1 objętość buforu D2 [III.1.9.4.2] oraz 4-5 U N-glikozydazy F (równocześnie prowadzono reakcję kontrolną, pozbawioną enzymu).
- Inkubowano 24 h w temperaturze 37°C.
- Do produktów reakcji cięcia dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2] do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].

III.2.22 Ekspresja E2 w komórkach bakteryjnych

Ekspresję E2 w komórkach bakteryjnych prowadzono zarówno w skali analitycznej (0,02 l kultury bakteryjnej), jak i w skali preparatywnej (1 l kultury bakteryjnej). Doświadczenia w skali analitycznej prowadzono w celu ustalenia optymalnych warunków hodowli oraz przeprowadzenia analizy rozpuszczalności białek [III.2.23]. Schemat hodowli w skali analitycznej był identyczny, jak w przypadku skali preparatywnej; stosowano jedynie proporcjonalnie mniejszą kulturę początkową i mniejszą objętość związków indukujących ekspresję, zachowując ich stężenie końcowe. Poniżej podano opis ekspresji E2 w komórkach bakteryjnych w skali preparatywnej.

- Z pojedynczej kolonii otrzymanej na szalce ze stałą pożywką selekcyjną lub ze stoku glicerolowego *Escherichia coli*, transformowanych plazmidem ekspresyjnym kodującym gen E2, pobierano zaszczepkę i przenoszono do 0,02 l pożywki LB zawierającej antybiotyki [III.1.10.3] lub antybiotyk (ampicylinę) i glukozę [III.1.10.4]. Inkubowano 16 h w temperaturze 37°C, wytrząsając z prędkością 250-300 rpm. Szczegółowe dane na temat składu pożywek stosowanych dla poszczególnych układów ekspresyjnych podano w tabeli:

Tabela III.31. Skład pożywek dla zastosowanych układów ekspresyjnych

Szczep <i>E. coli</i>	Plazmid	Pożywka
BL21(DE3)pLysS	pET-11a	LB + chloramfenikol + ampicylina
	pET-30 Ek/LIC	LB + chloramfenikol + kanamycyna
BL21-AI™ One Shot®	pET-11a	LB + ampicylina + glukoza
Rosetta(DE3)pLysS	pET-11a	LB + chloramfenikol + ampicylina
Origami B(DE3)pLysS	pET-11a	LB + chloramfenikol + kanamycyna + ampicylina
TB1	pMAL	LB + ampicylina + glukoza

- o Uzyskaną kulturą zaszczepiono 1 l odpowiedniej pożywki i wytrząsano ok. 2,5-3 h z prędkością 250-300 rpm w temperaturze 37°C, do momentu osiągnięcia przez hodowlę gęstości optycznej $OD_{600} = 0,4-0,6$. Z niewielkiej porcji hodowli sporządzano stok glicerolowy: pobierano 800 µl kultury bakteryjnej, dodawano 100 µl 80% glicerolu, mieszano i zamrażano na suchym lodzie. Przechowywano w temperaturze -80°C.
- o W pozostałej części hodowli indukowano ekspresję genu kodującego białko E2. Szczegółowe dane na temat sposobu indukcji ekspresji w poszczególnych szczepach bakteryjnych podano w tabeli:

Tabela III.32. Indukcja ekspresji genu E2 w zastosowanych układach ekspresyjnych

Szczep <i>E. coli</i>	Plazmid	Indukcja ekspresji w 1l hodowli
BL21(DE3)pLysS	pET-11a	0,5 ml 1 M IPTG ($C_k = 0,5$ mM)
	pET-30 Ek/LIC	
BL21-AI™ One Shot®	pET-11a	1 ml 1 M IPTG ($C_k = 1$ mM) + 10 ml 20% L-arabinozy ($C_k = 0,2\%$)
Rosetta(DE3)pLysS	pET-11a	0,5 ml 1 M IPTG ($C_k = 0,5$ mM)
Origami B(DE3)pLysS	pET-11a	0,5 ml 1 M IPTG ($C_k = 0,5$ mM)
TB1	pMAL-c4E	0,3 ml 1 M IPTG ($C_k = 0,3$ mM)

- o Hodowlę bakteryjną inkubowano 3 h w temperaturze 37°C, bądź 16 h w temperaturze 26°C lub 17°C, wytrząsając z prędkością 250-300 rpm.
- o Zawiesinę bakterii wirowano 15 min z prędkością 4000 rpm w temperaturze 4°C.
- o Supernatant dekantowano a osad zamrażano w temperaturze -20°C, a następnie izolowano i oczyszczano zawarte w nim białka [III.2.25].

III.2.23 Analiza rozpuszczalności białek

- Pobierano 1 ml kultury bakteryjnej, w której indukowano ekspresję E2 (po upływie 3 h bądź 16 h od indukcji; [III.2.22]) i wirowano 1 min z prędkością 12 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Osad zamrażano w temperaturze -20°C.
- Po rozmrożeniu osad zawieszano w 0,1 ml buforu PS1 [III.1.9.5.1]. W przypadku analizy białek ze szczepu *E.coli* BL21-AI™ One Shot®, dodawano dodatkowo lizozymu, do uzyskania stężenia końcowego 2 mg/ml.
- Inkubowano 15 min na lodzie.
- Wirowano 15 min z prędkością 12 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Do zawartej w supernatancie frakcji białek rozpuszczalnych dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2], do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].
- Osad zawierający frakcję białek nierozpuszczalnych zawieszano w 0,1 ml buforu PS2 [III.1.9.5.2].
- Inkubowano 15 min w temperaturze 37°C
- Wirowano 15 min z prędkością 12 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Do zawartej w supernatancie frakcji białek nierozpuszczalnych dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2] do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].

III.2.24 Wymiana buforu i zagęszczanie preparatów białkowych

Preparaty białkowe zagęszczano przy użyciu filtrów Amicon Ultra firmy Millipore (o pojemności 15 ml lub 4 ml i punkcie odcięcia 10 000 MWC), zgodnie z instrukcją producenta. Wymieniając bufor preparat białkowy zagęszczano do żądanej objętości, a następnie przemywano 30 objętościami nowego buforu.

III.2.25 Oczyszczanie białek otrzymanych w komórkach bakteryjnych

III.2.25.1 Chromatografia jonowymienna

- Osad komórek bakteryjnych [III.2.22] zawieszano w buforze 1× L [III.1.9.6.4], zawierającym inhibitory proteaz [III.1.1] i 25 U benzonazy [III.1.5.2]. Na 1 g osadu komórek podawano 2 ml buforu.
- Inkubowano 30 min na lodzie.
- Wirowano 15 min z prędkością 12 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Zawarty w supernatancie ekstrakt białkowy наносono na kolumnę wypełnioną 30 ml DEAE-celulozy, zrównoważonej buforem 1× L.
- Kolumnę przemywano 30 ml buforu 1× L.
- Kolumnę przemywano gradientem NaCl w buforze 1× L. Na kolumnę nakładano 30 ml porcje buforu 1× L, zawierającego NaCl w następujących stężeniach: 100, 150, 200, 250, 300, 350 i 500 mM. Zbierano frakcje o objętości 10 ml (po 3 frakcje dla każdego stężenia NaCl).
- Do zebranych frakcji dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2] do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].

III.2.25.2 Chromatografia powinowactwa

III.2.25.2.1 Złoże niklowe

Chromatografię powinowactwa do jonów niklu Ni²⁺ stosowano jako pierwszą lub drugą w kolejności procedurę oczyszczania białek. W tym drugim przypadku pomijano cztery pierwsze etapy.

- Osad komórek bakteryjnych [III.2.22] zawieszano w buforze I [III.1.9.6.1], zawierającym inhibitory proteaz [III.1.1] i 25 U benzonazy [III.1.5.2]. Na 1 g osadu komórek podawano 2 ml buforu.
- Inkubowano 30 min na lodzie.
- Dodawano 0,2 ml 4 M NaCl na 1 g osadu.
- Wirowano 15 min z prędkością 12 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Do zawartego w supernatancie ekstraktu białkowego dodawano 1 objętość buforu II [III.1.9.6.2] i 1 ml złoża niklowego, zrównoważonego buforem II.

- Mieszaninę delikatnie wytrząsano 1 h w temperaturze pokojowej, a następnie nanoszono na kolumnę.
- Kolumnę przemywano 10 ml buforu II.
- Kolumnę przemywano gradientem imidazolu w buforze 1× III [III.1.9.6.3]. Na kolumnę nakładano 10 ml porcje buforu 1× III, zawierającego imidazol w następujących stężeniach: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 100, 200 mM. Zbierano frakcje o objętości 2,5 ml (po 4 frakcje dla każdego stężenia imidazolu). Przemywano kolumnę 10 ml 1 M imidazolu.
- Do zebranych frakcji dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2] do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].

III.2.25.2.2 Złoże zawierające białko S

Oczyszczając białko przy użyciu złoża zawierającego białko S, korzystano z zestawu S•Tag™ rEK Purification Kit [III.1.6].

- Do otrzymanego po wstępnym oczyszczaniu na złożu niklowym preparatu białkowego w buforze 1× S [III.1.9.6.5], dodawano 1 ml złoża zawierającego białko S.
- Mieszaninę delikatnie wytrząsano 30 min w temperaturze pokojowej.
- Wirowano 10 min z prędkością 500 g w temperaturze pokojowej.
- Zbierano supernatant, zawierający białka niezwiązane ze złożem, a złoże przemywano trzykrotnie buforem 1× S (każdorazowo zbierając supernatant, zawierający białka niezwiązane ze złożem).
- Złoże, zawierające związane białka zawieszano w buforze 1× S. Dodawano 10 U enterokinazy.
- Mieszaninę delikatnie wytrząsano 16 h w temperaturze pokojowej.
- Dodawano 0,5 ml złoża wiążącego enterokinazę.
- Mieszaninę delikatnie wytrząsano 10 min w temperaturze pokojowej, a następnie nakładano na kolumnkę.
- Wirowano 5 min z prędkością 500 g w temperaturze pokojowej.
- Przemywano kolumnkę 1,25 ml buforu 1× S.
- Zbierano przesącz, w którym znajdowały się białka wiążące się ze złożem zawierającym białko S.

- Do zebranych frakcji dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2] do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].

III.2.25.2.3 Złoże amylozowe

- Osad komórek bakteryjnych [III.2.22] zawieszano w buforze 1× M [III.1.9.6.6], zawierającym inhibitory proteaz [III.1.1] i 25 U benzonazy [III.1.5.2]. Na 1 g osadu komórek podawano 5 ml buforu.
- Inkubowano 30 min na lodzie.
- Wirowano 30 min z prędkością 9000 g w temperaturze 4°C.
- Zawarty w supernatancie ekstrakt białkowy nakładano na kolumnę wypełnioną 1 ml złoża amylozowego, zrównoważonego buforem 1× M.
- Kolumnę przemywano 12 ml buforu 1× M.
- Związane białka wymywano 12 ml buforu 1× M zawierającego 10 mM maltozę. Zbierano 10 frakcji o objętości 0,5 ml i 2 o objętości 1 ml.
- Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].
- Frakcje, zawierające białko fuzyjne MBP-E2 zagęszczano na filtrach Amicon 10 kDa, w obecności buforu reakcyjnego dla enterokinazy [III.1.9.16].
- Dodawano 10 U enterokinazy i inkubowano 16 h w temperaturze pokojowej.
- Do produktów reakcji cięcia dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2] do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].

III.2.25.3 Sączenie molekularne

- Zagęszczony preparat zawierający białka wstępnie oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa do jonów niklu [III.2.25.2.1], nanoszono na kolumnę wypełnioną 45 ml złoża Superdex75 16/60 HiLoad.
- Kolumnę przemywano buforem do sączenia molekularnego [III.1.9.6.7], z prędkością przepływu 0,375 ml/min, zbierając frakcje o objętości 2,5 ml, do momentu wypłukania wszystkich białek z kolumny.
- Do zebranych frakcji dodawano buforu 4× SB [III.1.9.17.2] do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego i analizowano metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych w warunkach denaturujących [III.2.26].

III.2.26 Rozdział elektroforetyczny białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (żel PAA)

Żele do rozdziału elektroforetycznego białek w warunkach denaturujących składały się z górnego żelu zagęszczającego (5%) i dolnego żelu rozdzielającego (12% lub 15%, w zależności od masy cząsteczkowej analizowanych białek) [III.1.11.2].

- Do badanych preparatów dodawano buforu obciążającego 4× SB [III.1.9.17.2], do uzyskania jednokrotnego stężenia końcowego.
- Próby denaturowano przez inkubację 5 min w temperaturze 95°C i gwałtowne schłodzenie przez 5 min na lodzie;
- Prowadzono rozdział w żelu poliakryloamidowym w buforze 1× R [III.1.9.8], w obecności wzorca mas [III.1.12.2]. Stosowano napięcie 80 V i natężenie 25 mA (żel zagęszczający) oraz 150 V i 50 mA (żel rozdzielający).
- Rozdzielone w żelu białka uwidaczniano przez następujące po sobie płukania w trzech roztworach: (i) utrwalającym, (ii) barwiącym i (iii) odbarwiającym [III.1.8.3], każdorazowo przez 1 h, w temperaturze pokojowej. Obrazy żeli w wersji elektronicznej uzyskano przy pomocy zestawu do dokumentacji żeli Gel Logic 200 firmy Kodak.

III.2.27 Identyfikacja białek metodą *western blot*

Procedura identyfikacji białek metodą *western blot* obejmowała trzy zasadnicze etapy: (i) transfer rozdzielonych w żelu białek na membranę; (ii) przemywanie i inkubację membrany w roztworach zawierających przeciwciała (metoda A lub B); (iii) detekcję sygnału na membranie.

III.2.27.1 Etap 1 - rozdział elektroforetyczny i transfer

- Rozdzielano preparaty białkowe metodą elektroforezy w żelach poliakryloamidowych, w warunkach denaturujących [III.2.26]. Żelu nie poddawano barwieniu.
- Żel i bibuły inkubowano 2 min w buforze do transferu [III.1.9.9] w temperaturze pokojowej. Membranę PVDF zanurzano w metanolu, a następnie w buforze do transferu.
- Bibuły, żel i membranę umieszczano w aparacie firmy BioRad do elektrotransferu metodą półsuchą. Prowadzono transfer przez 1 h, przy napięciu 10 V i natężeniu równemu 1 mA na każdy cm² pola powierzchni żelu.

Dalsze etapy przemywania i inkubacji membrany w roztworach zawierających przeciwciała prowadzono na dwa sposoby: metodą standardową lub z wykorzystaniem aparatu SNAP i.d.[™] firmy Millipore.

III.2.27.2 Etap 2A - metoda standardowa

- Membranę dwukrotnie przemywano 10 min 15 ml 1× TBS [III.1.9.11], w temperaturze pokojowej.
- Inkubowano 16 h w 15 ml roztworu blokującego A [III.1.8.4.1] w temperaturze 4°C.
- Dwukrotnie przemywano 10 min 20 ml TBST [III.1.9.10] w temperaturze pokojowej.
- Przemywano 10 min 15 ml 1× TBS w temperaturze pokojowej.
- Inkubowano 1h w 10ml roztworu blokującego A, zawierającego przeciwciało I-rzędowe [III.1.7] w temperaturze pokojowej.
- Dwukrotnie przemywano 10 min 20 ml TBST w temperaturze pokojowej.
- Przemywano 10 min 15 ml 1× TBS w temperaturze pokojowej.
- Inkubowano 1 h w 10 ml roztworu blokującego A, zawierającego przeciwciało II-rzędowe [III.1.7] w temperaturze pokojowej.
- Pięciokrotnie przemywano 10 min 20 ml TBST w temperaturze pokojowej.

III.2.27.3 Etap 2B - metoda SNAP i.d.[™]

- Membranę umieszczano w podwójnej kasecie aparatu SNAP i.d.[™]. Przemywano 15 ml roztworu blokującego B [III.1.8.4.2].
- Inkubowano 10 min w 2,5 ml roztworu blokującego B, zawierającego przeciwciało I-rzędowe [III.1.7] w temperaturze pokojowej.
- Trzykrotnie przemywano 20 ml TBST [III.1.9.10].
- Inkubowano 10 min w 2,5 ml roztworu blokującego B, zawierającego przeciwciało II-rzędowe [III.1.7] w temperaturze pokojowej.
- Trzykrotnie przemywano 20 ml TBST.

III.2.27.4 Etap 3 - detekcja kolorymetryczna

Detekcję kolorymetryczną prowadzono w przypadku zastosowania przeciwciała II-rzędowego sprzężonego z fosfatą alkaliczną, wykorzystując zestaw AP Detection Reagent Kit [III.1.6].

- Przygotowywano roztwór do detekcji, zawierający substraty dla fosfatazy alkalicznej:
 - 60 µl NBT
 - 60 µl BCIP
 - 15 ml 1× AP
- Membranę umieszczano w roztworze i inkubowano do momentu pojawienia się barwnych prążków – produktów reakcji katalizowanej przez fosfatazę alkaliczną (1-5 min).
- Membranę przemywano wodą destylowaną i pozostawiano do wyschnięcia na bibule. Obrazy membran w wersji elektronicznej uzyskano przy pomocy skanera komputerowego.

III.2.28 Test ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*)

III.2.28.1 Badanie właściwości antygenowych białka E2

- Przygotowywano roztwór preparatów zawierających białko E2 w buforze 1× PBS [III.1.9.12] o stężeniu 2 ng/µl. Do dołków płytki nanoszono po 50 µl roztworu.
- Płytkę inkubowano 2 h w temperaturze pokojowej.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki firmy BioRad. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 µl buforu PBST [III.1.9.13], z czasem nasiąkania 30 s.
- Do dołków płytki nanoszono po 200 µl 5% roztworu odtłuszczonego mleka w buforze 1× PBS.
- Inkubowano 2 h w temperaturze pokojowej.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki firmy BioRad. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 µl buforu PBST, z czasem nasiąkania 30 s. Przed przystąpieniem do kolejnych etapów, przygotowaną płytkę przechowywano 16 h w temperaturze 4°C.
- Do dołków płytki nanoszono po 200 µl buforu PBS zawierającego przeciwciało I-rzędowe, kozie poliklonalne przeciw białku E2 [III.1.7].
- Inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki ETI-System firmy DiaSorin. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 µl buforu przemywającego (pochodzącego z zestawu firmy DiaSorin [III.1.6]), z czasem nasiąkania 30 s.

- Do dołków płytki nanoszono po 200 μ l buforu PBS zawierającego przeciwciało II-rzędowe, królicze przeciwko kozim immunoglobulinom, sprzężone z peroksydazą chrzanową [III.1.7].
- Inkubowano 1 h w temperaturze pokojowej.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki ETI-System firmy DiaSorin. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 μ l buforu przemywającego (pochodzącego z zestawu firmy DiaSorin [III.1.6]), z czasem nasiąkania 30 s.
- Do dołków płytki nanoszono po 100 μ l roztworu zawierającego chromogen i substrat (pochodzącego z zestawu firmy DiaSorin [III.1.6]).
- Inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej, w ciemności.
- Do dołków płytki nanoszono po 100 μ l roztworu hamującego.
- Dokonywano odczytu absorbancji przy długościach fali $\lambda = 630$ nm i $\lambda = 450$ nm za pomocą automatycznego czytnika płytek ELx800 firmy BIO-TEK.

III.2.28.2 Wykrywanie przeciwciał anty-HCV i anty-E2 w surowicach pacjentów

Test ELISA stosowano jako metodę wykrywania przeciwciał specyficznych wobec białek HCV w surowicach pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Badanie przeprowadzono z wykorzystaniem testu IV generacji ETI-AB-HCVK-4 [III.1.6], zgodnie z instrukcją producenta. Następnie procedurę zmodyfikowano w celu wykrycia przeciwciał specyficznych wobec dwóch badanych wariantów białka E2.

- Przygotowywano roztwór preparatów zawierających białko E2 w buforze $1 \times$ PBS [III.1.9.12] o stężeniu 2 ng/ μ l. Do dołków płytki nanoszono po 50 μ l roztworu.
- Inkubowano 2 h w temperaturze pokojowej.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki firmy BioRad. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 μ l buforu PBST [III.1.9.13], z czasem nasiąkania 30 s.
- Do dołków płytki nanoszono po 200 μ l 5% roztworu odtłuszczonego mleka w buforze $1 \times$ PBS.
- Inkubowano 2 h w temperaturze pokojowej.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki firmy BioRad. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 μ l buforu PBST, z czasem nasiąkania 30 s. Przed przystąpieniem do kolejnych etapów, przygotowaną płytkę przechowywano 16 h w temperaturze 4°C. Dalsze postępowanie prowadzono

korzystając z odczynników wchodzących w skład zestawu ETI-AB-HCVK-4 firmy DiaSorin.

- Do dołków płytki nanoszono po 200 μ l rozcieńczalnika próbek oraz 20 μ l surowicy. Do dołka przeznaczonego na ślepa próbę nanoszono tylko rozcieńczalnik, do dołka przeznaczonego na kontrolę negatywną nanoszono 20 μ l surowicy pochodzącej od osoby niezakażonej HCV i nieposiadającej przeciwciał przeciwko temu wirusowi.
- Inkubowano 1 h w temperaturze 37°C.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki ETI-System firmy DiaSorin. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 μ l buforu przemywającego, z czasem nasiąkania 30 s.
- Do dołków płytki nanoszono po 100 μ l roztworu koniugatu, przygotowanego poprzez zmieszanie stężonego koniugatu i odpowiedniego rozcieńczalnika w stosunku 1:100. Koniugat stanowiły mysie przeciwciała monoklonalne, skierowane przeciwko ludzkim immunoglobulinom, sprzężone z peroksydazą chrzanową.
- Inkubowano 1 h w temperaturze 37°C.
- Płytkę przemywano korzystając z automatycznej płuczki ETI-System firmy DiaSorin. Wykonywano pięć cykli przemywania 300 μ l buforu przemywającego, z czasem nasiąkania 30 s.
- Do dołków płytki nanoszono po 100 μ l roztworu zawierającego chromogen i substrat.
- Inkubowano 30 min w temperaturze pokojowej, w ciemności.
- Do dołków płytki nanoszono po 100 μ l roztworu hamującego.
- Dokonywano odczytu absorbancji przy długościach fali $\lambda = 630$ nm i $\lambda = 450$ nm za pomocą automatycznego czytnika płytek ELx800 firmy BIO-TEK.
- Wszystkimi pomiarami normalizowano względem ślepej próby. Próbę przyjmowano jako pozytywną, gdy wartość pomiaru przekraczała trzykrotnie średnią wartość trzech kontroli negatywnych.

III.2.29 Analiza wiązania białka E2 z receptorem CD81 limfocytów B

- Limfocyty B transformowane wirusem Eppsteina-Barr (ok. 100 000 komórek) zawieszano w 50 µl buforu 1× PBS [III.1.9.12].
- Do zawiesiny komórek dodawano 1 µg preparatu zawierającego białko E2. Pozostawiano dwie próby kontrolne (A i B) bez preparatu białkowego.
- Inkubowano 30 min w temperaturze 4°C.
- Przemycano 2 ml buforu 1× PBS i wirowano 5 min z prędkością 1200 rpm. Bufor dekantowano, pozostawiając ok. 50 µl.
- Do zawiesiny zawierającej preparat E2 oraz do próby kontrolnej B dodawano 1 µl I-rzędowego koziego przeciwciała poliklonalnego, przeciwko białku E2 HCV [III.1.7].
- Inkubowano 30 min w temperaturze 4°C.
- Przemycano 2 ml buforu 1× PBS i wirowano 5 min z prędkością 1200 rpm. Bufor dekantowano, pozostawiając ok. 50 µl.
- Do zawiesiny zawierającej preparat E2 oraz do próby kontrolnej B dodawano 1 µl II-rzędowego oślego przeciwciała poliklonalnego przeciwko kozim immunoglobulinom G, sprzężonego z fikoerytryną [III.1.7].
- Inkubowano 30 min w temperaturze 4°C.
- Przemycano 2 ml buforu 1× PBS i wirowano 5 min z prędkością 1200 rpm. Bufor dekantowano.
- Dokonywano pomiaru fluorescencji limfocytów przy użyciu cytometru przepływowego FACSCanto firmy BD Biosciences. Wartości pomiarów dla prób zawierających preparat E2 odnoszono do prób kontrolnych A (limfocyty B) i B (limfocyty B inkubowane z przeciwciałami pod nieobecność białka E2).

III.2.30 Otrzymywanie genomowych cząsteczek RNA wirusa mozaiki stokłosy metodą transkrypcji *in vitro*

Transkrypcję *in vitro* prowadzono korzystając z gotowego zestawu mMACHINE[®] T7 Kit [III.1.6]. Zestaw ten umożliwia otrzymanie RNA zawierającego strukturę kapu na końcu 5'. Matrycami w reakcji były plazmidy kodujące cDNA odpowiadające genomowym cząsteczkom RNA wirusa mozaiki stokłosy (ang. *brome mosaic virus*, BMV) [III.1.3], pod promotorem T7. Na końcu 3' cDNA wprowadzono unikalne miejsce rozpoznawane przez restryktazę EcoRI, umożliwiające

zliniowanie plazmidu przed transkrypcją i otrzymanie prawidłowego końca 3' wirusowego RNA.

Tabela III.33. Skład mieszaniny reakcyjnej transkrypcji

Odczynnik	Ilość
matryca (zliniowany plazmid)	0,6 µg
bufor reakcyjny ($C_p = 10\times$, $C_k = 1\times$)	1 µl
<i>NTP/CAP</i> ⁽¹⁾ ($C_p = 2\times$, $C_k = 1\times$)	5 µl
<i>Enzyme Mix</i> ⁽¹⁾	1 µl
H ₂ O	do 10 µl

(1) Oryginalne nazwy odczynników wchodzących w skład zestawu mMMESSAGE mMACHINE® T7 Kit.

- Mieszaninę reakcyjną inkubowano 2 h w temperaturze 37°C.
- Dodawano 1 µl DNazy TURBO.
- Inkubowano 15 min w temperaturze 37°C.
- Dodawano 39 µl H₂O wolnej od nukleaz.
- Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w żelach agarozowych w warunkach natywnych [III.2.6].

III.2.31 Inokulacja liści komosy *Chenopodium quinoa*

- Sporządzano mieszaninę inokulacyjną, zawierającą:
 - 10 µl roztworu RNA1 BMV [III.2.30]
 - 10 µl roztworu RNA2 BMV
 - 10 µl roztworu RNA3 BMV
 - 10 µl 5× stężonego buforu inokulacyjnego [III.1.9.8]
 - 10 µl H₂O
- Inokulacji poddawano rośliny, które wcześniej przebywały ok. 12 h w ciemności. 15 µl mieszaniny inokulacyjnej наносzono i rozprowadzano na liściu.
- Po inokulacji rośliny spryskiwano delikatnie wodą i pozostawiano w ciemności na kolejne 12 h.
- Inokulowane rośliny przenoszono do szklarni lub pokoju hodowlanego.

III.2.32 Ekstrakcja RNA z zakażonych roślin

- Do wyciętego skalpelem zakażonego fragmentu rośliny dodawano 100 µl buforu ekstrakcyjnego [III.1.9.15] i homogenizowano tkankę roślinną.
- Dodawano 100 µl fenolu, wytrząsano 30 s.

- Wirowano 5 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Pobierano fazę wodną i dodawano do niej 50 µl fenolu i 50 µl chloroformu.
- Wirowano 5 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Pobierano fazę wodną i dodawano do niej 100 µl chloroformu.
- Wirowano 5 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Pobierano fazę wodną i wytrącano zawarte w niej kwasy nukleinowe dodając 3 objętości 96% etanolu i inkubując 16 h w temperaturze -20°C.
- Wirowano 20 min z prędkością 14 000 rpm w temperaturze 4°C.
- Supernatant dekantowano a osad przemywano 70% etanolem.
- Rozpuszczano w wodzie wolnej od nukleaz.

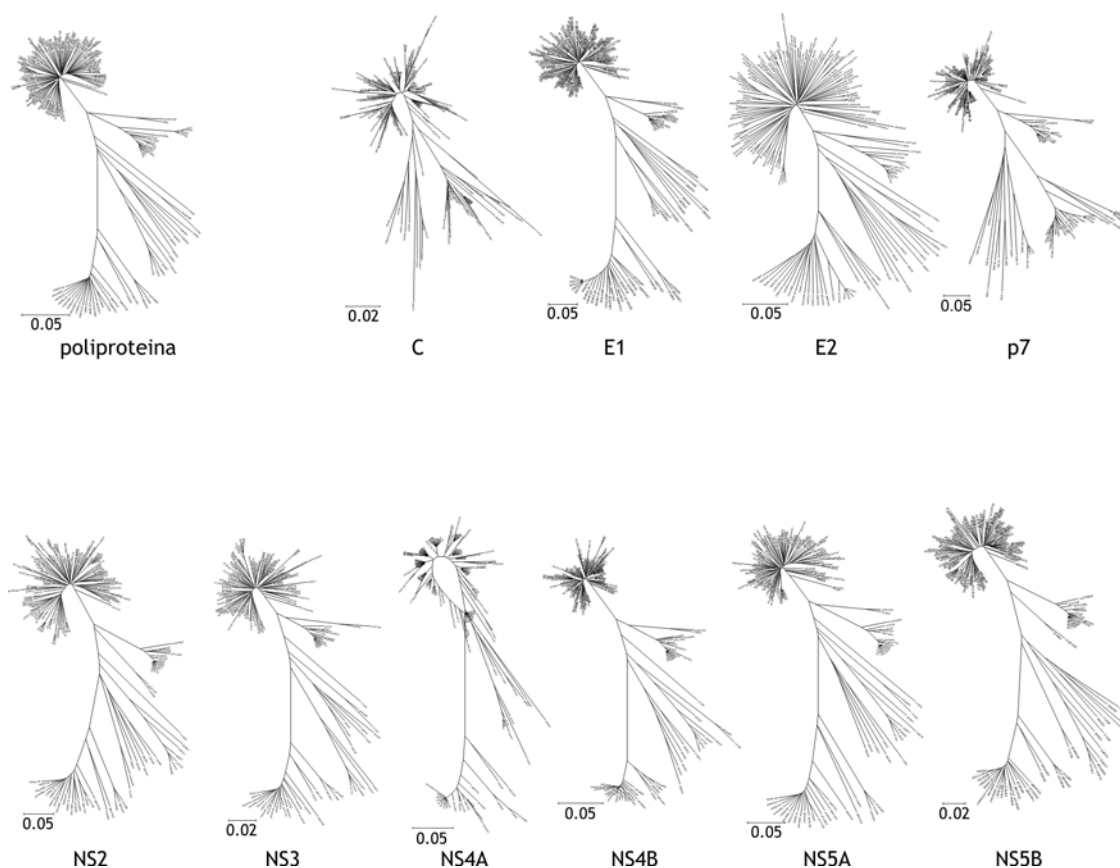
IV Wyniki

IV.1 Analiza struktury populacji wirusa zapalenia wątroby typu C

Analizę populacji wirusowej postanowiono przeprowadzić metodą klonowania i sekwencjonowania poszczególnych wariantów wirusowych. Ponieważ zarówno namnożenie, jak i wielokrotne sekwencjonowanie całego genomu HCV byłoby bardzo czasochłonne oraz kosztowne, dokonano wyboru jego reprezentatywnych fragmentów, które posłużyły do dalszej analizy. Przy wyborze właściwych rejonów przyjęto następujące kryteria: (i) poddany badaniom fragment powinien być możliwy do przesekwencjonowania w pojedynczej reakcji (nie powinien zatem przekraczać 600 nukleotydów); (ii) drzewo filogenetyczne skonstruowane dla wybranego rejonu powinno być podobne do drzewa otrzymanego dla całego genomu; (iii) ze względu na różnice poziomu polimorfizmu w obrębie genomu HCV, poszukiwany fragment powinien obejmować zarówno rejony zmienne, jak i bardziej stabilne (Figlerowicz *et al.*, 2005; Kędziora *et al.*, 2005).

IV.1.1 Wybór reprezentatywnego rejonu genomu HCV

Pierwszy etap badań polegał na analizie filogenetycznej możliwie wielu (najlepiej wszystkich dostępnych) sekwencji aminokwasowych poliproteiny HCV. Szczególnie cennym źródłem informacji na ich temat była internetowa baza danych, Hepatitis Virus Database (<http://s2as02.genes.nig.ac.jp/index.html>). Z bazy pobrano ok. 160 pełnych sekwencji poliproteiny. Pochodziły one z izolatów reprezentujących wszystkie genotypy HCV. Następnie wyodrębniono z nich sekwencje poszczególnych białek. W rezultacie otrzymano 11 zbiorów: jeden zawierający kompletne sekwencje poliproteiny HCV oraz dziesięć zawierających sekwencje poszczególnych białek wirusowych. Każdy zbiór poddano analizie filogenetycznej, wykorzystując algorytm Neighbor-Joining, zaimplementowany w pakiecie programów MEGA 3.1 (Kumar *et al.*, 2008; Tamura *et al.*, 2007). Algorytm ten dokonuje grupowania sekwencji na podstawie podobieństwa między nimi, rozpoczynając od łączenia w pary sekwencji najbardziej zbliżonych (o najniższej wartości współczynnika w macierzy odległości) (Saitou i Nei, 1987). W rezultacie uzyskano 11 drzew filogenetycznych [rysunek IV.1].



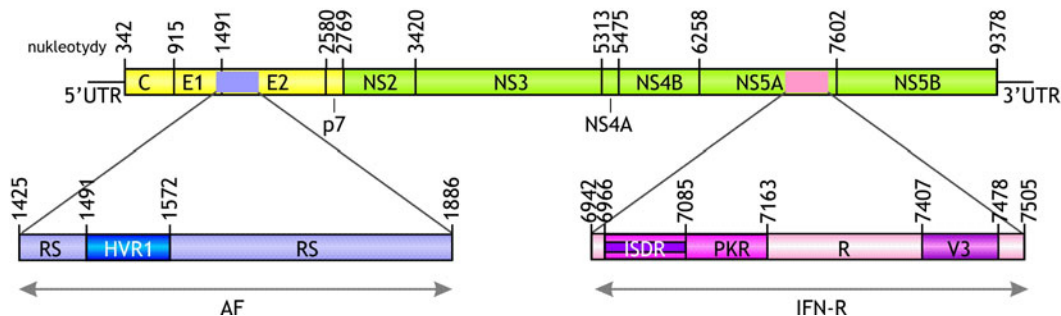
Rysunek IV.1. Drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie sekwencji aminokwasowych HCV, zdeponowanych w internetowej bazie danych Hepatitis Virus Database.

Analizę filogenetyczną przeprowadzono na podstawie ok. 160 sekwencji poliproteiny, jak również wydodrębnionych z niej sekwencji poszczególnych białek wirusowych: C, E1, E2, p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A i NS5B.

Większość drzew otrzymanych dla poszczególnych białek dobrze odzwierciedlała topologię drzewa skonstruowanego dla całej poliproteiny. Niewielkie rozbieżności wystąpiły jedynie w przypadku białek: C, p7 i NS4A. Biorąc pod uwagę wstępne założenia, jak również rolę białek w cyklu replikacyjnym patogenu, do dalszej analizy wybrano dwa fragmenty genomu HCV [rysunek IV.2]. Pierwszy z nich, o długości 462 nukleotydów, nazwany AF, obejmował koniec karboksylowy glikoproteiny E1 i odcinek aminowy E2 (pozycje 1425-1886⁽²⁾). Tym samym, obok reszt względnie stabilnych, zawierał także rejon hiperzmienny 1 (HVR1). Drugi, 546-nukleotydowy fragment, nazwany IFN-R (6942-7505), zlokalizowany był w obrębie białka NS5A i zawierał kilka odcinków, którym przypisuje się bezpośredni udział w przeciwdziałaniu odpowiedzi interferonowej. Były to: rejon warunkujący

⁽²⁾ Pozycje nukleotydowe odnoszą się do sekwencji genomu HCV-1a, zdeponowanej w internetowej bazie danych GenBank pod numerem NC_004102.

wrażliwość na interferon (ang. *interferon sensitivity determining region*, ISDR), miejsce wiązania kinazy PKR i rejon o wysokim poziomie polimorfizmu, V3.



Rysunek IV.2. Reprezentatywne rejony genomu HCV, wybrane do analizy struktury populacji wirusowej.

Niebieskim prostokątem oznaczono pierwszy wybrany rejon, nazwany AF. Obejmuje on pozycje nukleotydowe 1425-1886 i obok obszarów względnie stabilnych (RS), zawiera rejon hiperzmienny 1 (HVR1). Różowym prostokątem oznaczono drugi wybrany rejon, nazwany IFN-R. Obejmuje on pozycje nukleotydowe 6942-7505. Obok obszarów, którym nie przypisuje się specyficznej funkcji (R), zawiera odcinki, którym przypisywana jest istotna rola w przeciwdziałaniu odpowiedzi przeciwwirusowej gospodarza: rejon warunkujący wrażliwość na interferon (ISDR), miejsce wiązania kinazy PKR (PKR) i rejon o wysokim poziomie polimorfizmu (V3).

IV.1.2 Amplifikacja, klonowanie i sekwencjonowanie rejonu AF

Dokonawszy wyboru dwóch reprezentatywnych rejonów genomu HCV, namnożono pierwszy z nich, odcinek AF. Matrycą w reakcji odwrotnej transkrypcji i amplifikacji był całkowity RNA genomowy HCV-1a, izolowany z surowicy krwi 23 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, objętych opieką w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Dzieci poddano terapii skojarzonej interferonem i rybawiryną lub pegylowanym interferonem i rybawiryną, zgodnie z przyjętym schematem (Figlerowicz *et al.*, 2004). Typ odpowiedzi na leczenie określano zgodnie z obowiązującymi wówczas standardami, analizując poziom RNA HCV w 24., 48. i 72. tygodniu po rozpoczęciu terapii. Brak odpowiedzi (ang. *no response*, NR) wykazywali pacjenci, u których wynik testu był za każdym razem dodatni. U osób, u których poziom RNA HCV obniżał się poniżej poziomu wykrywalności we wszystkich trzech punktach czasowych, stwierdzano trwałą odpowiedź (ang. *sustained response*, SR). Spadek poziomu RNA poniżej progu detekcji w czasie T24 lub T24 i T48, po którym następował jego ponowny wzrost, określany był jako odpowiedź przejściowa (ang. *transient response*, TR). Wybrane parametry charakteryzujące pacjentów przedstawiono w tabeli [tabela IV.1].

Tabela IV.1. Wybrane parametry kliniczne i wirusologiczne, charakteryzujące pacjentów, u których przeprowadzono analizę populacji HCV

Pacjent	Wiek (lata)	Płeć	Poziom RNA HCV (kopie/ml)				Wynik leczenia	Uwagi
			T0	T24	T48	T72		
P1-01	8	ż ⁽¹⁾	7 803 000	607 500	5 300 000	6 254 000	NR ⁽³⁾	
P1-02	8	m ⁽²⁾	14 148 000	1 155 600	7 250 000	8 388 000	NR	
P1-03	12	ż	804 600	283 500	725 900	894 000	NR	
P1-04	17	m	9 072 000	-(⁽⁴⁾)	669 330	4 206 000	TR ⁽⁵⁾	
P1-05	14	m	9 018 000	10 503 000	9 504 000	11 205 000	NR	
P1-06	11	ż	337 500	-	-	-	SR ⁽⁶⁾	
P1-07	9	m	631 800	-	791 500	684 300	TR	
P1-08	10	ż	858 600	-	-	-	SR	
P1-09	10	m	804 600	-	-	-	SR	
P1-10	10	ż	46 440	-	-	-	SR	
P2-02	12	ż	768 600	-	-	-	SR	choroba nowotworowa
P2-04	13	m	11 280 000	9 750 000	12 396 000	30 260 000	NR	
P2-05	11	ż	2 170 000	2 880 600	3 070 400	7 240 600	NR	immunosupresja ⁽⁷⁾
P2-08	16	ż	1 870 000	-	-	-	SR	
P2-10	11	m	2 670 000	1 800 400	2 310 000	2 380 900	NR	immunosupresja
P2-17	8	m	56 300 000	-	-	-	SR	
P2-18	15	ż	696 000	-	-	-	SR	
P2-19	10	ż	726 000	199 000	366 000	1 310 000	NR	
P2-20	15	ż	152 000	-	-	-	SR	
P2-22	11	m	713 000	-	-	-	SR	
P2-23	10	m	840 000	4 870	b/o ⁽⁸⁾	b/o	NR	
P2-24	16	ż	286 000	-	-	11 200 000	TR	
P2-28	14	ż	365 000	847 000	9 210 000	117 000	NR	immunosupresja

⁽¹⁾ płeć żeńska; ⁽²⁾ płeć męska; ⁽³⁾ brak odpowiedzi na terapię; ⁽⁴⁾ niewykrywalny poziom RNA HCV; ⁽⁵⁾ odpowiedź przejściowa; ⁽⁶⁾ odpowiedź trwała; ⁽⁷⁾ w przeszłości stosowano immunosupresyjne leczenie przeciwnowotworowe; ⁽⁸⁾ brak oznaczeń.

Do określenia struktury quasi-gatunku HCV wykorzystano materiał genetyczny wirusa, obecny w próbkach krwi pobieranej rutynowo w związku z prowadzonym leczeniem lub obserwacją. Na przeprowadzenie badań uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (pozwolenie nr 712/02 z dnia 05.09.2002). RNA wirusowy wyizolowany z surowicy pacjentów otrzymano dzięki uprzejmości dr hab. n. med. Magdaleny Figlerowicz. Reakcje RT-PCR [III.2.1] prowadzono korzystając z zestawu OneStep RT-PCR Kit [III.1.6]. W zestawie tym

znajduje się mieszanina enzymów, w skład której wchodzi zarówno odwrotne transkryptazy, jak i opłaszczona przeciwciałami polimeraza DNA. Dzięki temu, synteza cDNA i następujący po niej PCR zachodziły w tej samej próbówce, oddzielone jedynie 15 minutowym czasem inkubacji w temperaturze 95°C. Wówczas to dochodziło do dezaktywacji odwrotnych transkryptaz i uaktywnienia polimerazy DNA. W mieszaninie reakcyjnej były obecne dwa startery: HVR-Z5 i HVR-Z3 [III.1.4]. Oligonukleotyd komplementarny do końca 3' namnażanego fragmentu (HVR-Z3) służył zatem jako starter zarówno w reakcji syntezy cDNA, jak i późniejszej amplifikacji. Produkt reakcji rozcieńczano 50-krotnie i wykorzystywano do kolejnej reakcji PCR [III.2.3], z zastosowaniem starterów HVR-W5 i HVR-W3 [III.1.4], specyficznych wobec sekwencji zlokalizowanej wewnątrz produktu RT-PCR. Ta strategia pozwoliła na specyficzne i wydajne namnożenie dsDNA, odpowiadającego rejonowi AF genomu HCV. Dodatkowo, startery HVR-W5 i HVR-W3 wprowadzały miejsca rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne, odpowiednio, BamHI i EcoRI. Otrzymany w wyniku zastosowanej procedury produkt reakcji był poddawany cięciu restrykcyjnemu [III.2.8.1], a następnie ligacji [III.2.12] z plazmidem pUC18 lub pUC19 [III.1.3], uprzednio przeciętym za pomocą tych samych enzymów restrykcyjnych. Plazmidy te posiadają identyczną sekwencję, lecz różnią się orientacją wielokrotnego miejsca klonowania. W kolejnym etapie produkt ligacji został wykorzystany do transformacji komórek kompetentnych *E.coli* DH5 α [III.2.18.2]. Po transformacji komórki hodowano na stałej pożywce LB, zawierającej ampicylinę [III.1.10.1]. Ponieważ plazmidy pUC18 i pUC19 posiadają gen kodujący enzym hydrolizujący ampicylinę, na pożywce selekcyjnej przeżywały jedynie te bakterie, do których wprowadzony został plazmid. Ponadto oba wektory należą do grupy plazmidów, dla których można stosować test α -komplementacji jako metodę selekcji żądanych kolonii bakteryjnych. Posiadają bowiem gen *lacZ*, kodujący β -galaktozydazę, pod kontrolą promotora *lac*, którego induktorem jest IPTG. Dodanie IPTG do pożywki aktywuje ekspresję genu *lacZ* i syntezę enzymu, który rozkładając X-Gal tworzy produkt, nadający kolonom niebieską barwę. Miejsce klonowania w plazmidzie umieszczono w obrębie genu *lacZ*, co powoduje, iż wprowadzanie obcego DNA wywołuje jego insercyjną inaktywację. W rezultacie, X-Gal nie jest metabolizowany, a kolonie transformowane żądanym konstruktem mają barwę białą. Dodanie do pożywki IPTG oraz X-Gal powoduje więc powstanie na szalkach mieszaniny białych i niebieskich kolonii. Białe kolonie wykorzystywano do przygotowania kultur bakteryjnych w płynnej pożywce LB,

zawierającej ampicylinę [III.1.10.3], z których następnie izolowano plazmidy [III.2.9]. Plazmidy posiadające właściwy insert identyfikowano na drodze cięcia restrykcyjnego enzymami EcoRI i BamHI [III.2.8.1]. Do dalszych badań wybierano te, które wyzwały fragment o długości 472 par zasad. Wyselekcjonowane w ten sposób plazmidy oczyszczano [III.2.7] i poddawano sekwencjonowaniu [III.2.11] z użyciem startera F-pUC19 [III.1.4]. Zastosowana procedura, polegająca na sekwencjonowaniu niezależnych klonów, umożliwiła poznanie sekwencji AF pojedynczych wariantów wirusowych, reprezentujących dany quasi-gatunek HCV. Podejście takie zastosowano do identyfikacji wariantów występujących w 46 próbach, izolowanych od 23 pacjentów przed wdrożeniem terapii (T0) oraz po dwóch tygodniach jej trwania (T2). We wszystkich przypadkach przesekwencjonowano co najmniej 20 niezależnych klonów. W ten sposób przeanalizowano 23 populacje w dwóch punktach czasowych, T0 i T2.

IV.1.3 Analiza bioinformatyczna na podstawie rejonu AF

Dla każdej z 23 analizowanych populacji wirusowych uzyskano dwa odrębne zbiory sekwencji wariantów. Pierwszy charakteryzował warianty w T0, drugi w T2. W kolejnym etapie dokonano translacji *in silico* (przepisanie sekwencji nukleotydowej na aminokwasową), a także wyodrębniono z rejonu AF jego komponenty: RS i HVR1. Wstępnie badaniami objęto również sekwencje nukleotydowe, jednakże stwierdzono, że analiza na poziomie białka jest znacznie bardziej informatywna. W rezultacie, dla każdej populacji wirusowej i obu punktów czasowych, uzyskano trzy zestawy sekwencji aminokwasowych: AF, RS i HVR1. Na tym etapie odrzucono sekwencje kodujące niefunkcjonalne białka (zawierające kodon stop bądź przesunięcie ramki odczytu), stąd w przypadku niektórych populacji liczba badanych sekwencji aminokwasowych uległa zmniejszeniu. Następnie wyznaczono liczbę wariantów wirusowych, obecnych w danej populacji, oraz poziom jej zróżnicowania, wyrażony za pomocą średniej odległości Hamminga. W celu wykonania powyższych analiz, posłużono się programem do obliczania stopnia złożoności quasi-gatunku i skryptami w języku Perl, otrzymanymi dzięki uprzejmości mgr inż. Pawła Kędziory z Instytutu Informatyki Politechniki Poznańskiej, oraz pakietem programów EmbossWin. Te same zestawy sekwencji wykorzystano także do dokonania analizy filogenetycznej, przeprowadzonej przy użyciu algorytmu Neighbor-Joining, zaimplementowanego w pakiecie programów MEGA 4.

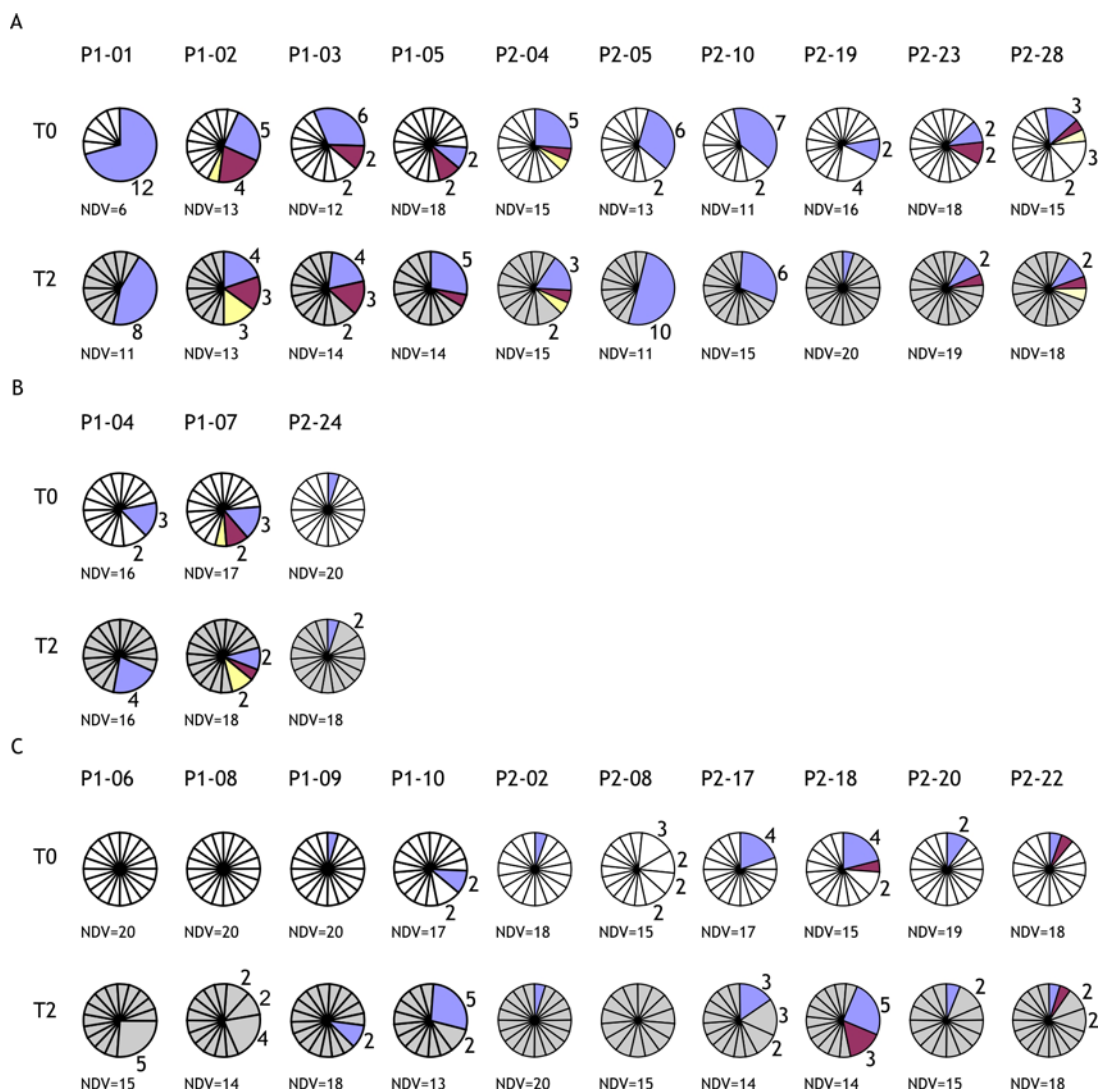
Pierwszy etap analizy bioinformatycznej, obejmujący określenie liczby wariantów wirusowych (ang. *number of different variants*, NDV), polegał na porównaniu sekwencji, reprezentujących pojedynczy quasi-gatunek w danym punkcie czasowym. Na tej podstawie zbadano nie tylko ile różnych wariantów składało się na populację, lecz także z jaką częstością występował każdy z nich. Wyniki uzyskane dla obu punktów czasowych porównano w celu zidentyfikowania wariantów, które były unikalne dla danego punktu czasowego oraz tych, które występowały w obu punktach, tj. T0 i T2. Analizę przeprowadzono dla rejonu AF oraz osobno dla jego komponentów: RS i HVR1.

Liczba wariantów wirusowych, określona na podstawie rejonu AF przed wdrożeniem leczenia (T0), wynosiła od 6 u jednego pacjenta NR, do 20 u jednego pacjenta TR i trzech SR, zwykle przyjmując wartości powyżej 11 [rysunek IV.3]. Wśród niektórych populacji, pochodzących głównie od pacjentów NR, często obserwowano dominację jednego z wariantów – w zbiorze ok. 20 analizowanych sekwencji jedna powtarzała się kilkakrotnie, maksymalnie 12 razy (P1-01). Wyniki uzyskane dla tych samych quasi-gatunków po dwóch tygodniach trwania terapii (T2) wykazały, że interferon i rybawiryne wpływają na populacje wirusowe w różny sposób. W przypadku niektórych, liczba zidentyfikowanych wariantów pozostała bez zmian (P1-02, P2-04, P1-04, P2-08, P2-22), podczas gdy w innych rosła (P1-01, P1-03, P2-10, P2-19, P2-23, P2-28, P1-07, P2-02) bądź malała (P1-05, P2-05, P2-24, P1-06, P1-08, P1-09, P1-10, P2-17, P2-18, P2-20). Co ciekawe, populacje przejawiające wzrost liczby wariantów pochodziły głównie od pacjentów NR, natomiast te, w których ta liczba malała, pochodziły od pacjentów SR. Na przestrzeni dwóch tygodni nastąpiły także zmiany jakościowe w obrębie analizowanych quasi-gatunków. Zaobserwowano: (i) powstanie wariantów dominujących, nieobecnych przed leczeniem (P1-06, P1-08), (ii) powstanie nowych kodominantów (P1-02), (iii) zmniejszenie udziału wariantu dominującego (P1-01), bądź (iv) zwiększenie udziału wariantu dominującego (P2-05). We wszystkich badanych populacjach zidentyfikowano także nowe warianty, których obecności nie wykazano w pierwszym punkcie czasowym. Jedynie w przypadku trzech quasi-gatunków (P1-06, P1-08, P2-08) zbiory sekwencji dla T0 i T2 były całkowicie różne.

Badania przeprowadzone na podstawie samego rejonu RS przyniosły analogiczne wyniki [rysunek IV.4]. Liczba wariantów wirusowych była porównywalna w populacjach pochodzących od pacjentów z wszystkich trzech grup. Ponownie,

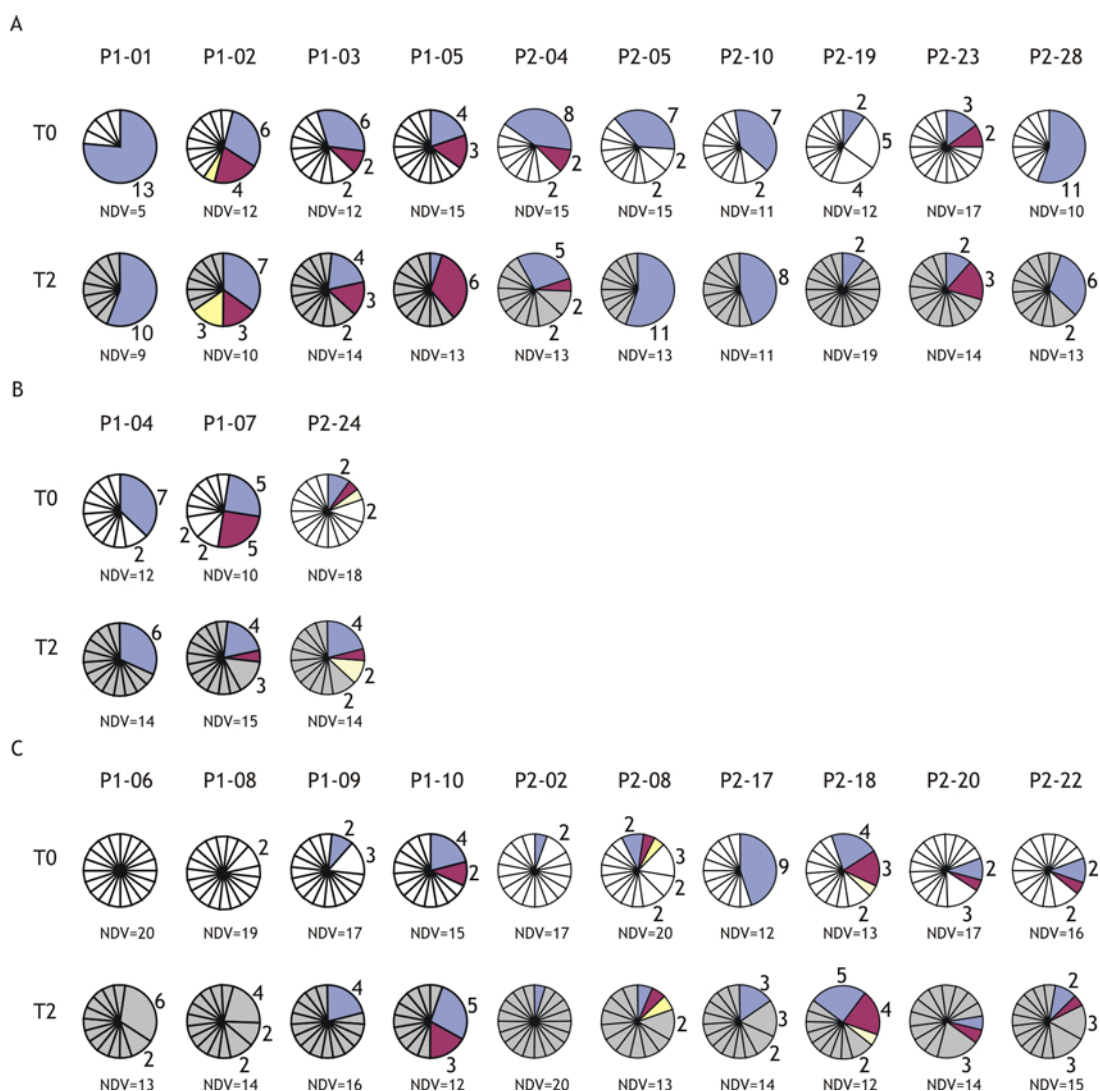
w przypadku większości quasi-gatunków pochodzących od pacjentów SR, zaobserwowano spadek liczby wariantów po dwóch tygodniach terapii.

Analiza rejonu HVR1 istotnie uwypukliła tendencje obserwowane w obrębie pełnej sekwencji AF [rysunek IV.5]. Zaobserwowano wyraźną dominację jednego z wariantów, przede wszystkim w populacjach pochodzących od pacjentów NR, lecz także TR i SR. W pierwszej z wymienionych grup liczba wariantów wirusowych była ponadto niższa i wynosiła 2-9, podczas gdy w trzeciej 4-16, zwykle przekraczając 10. W każdym z badanych quasi-gatunków, wśród wariantów zidentyfikowanych w T2 wystąpiły także takie, które były obecne w próbach izolowanych przed rozpoczęciem leczenia. Ponownie, porównując dane dla T0 i T2 stwierdzono, że w większości populacji pochodzących od pacjentów NR leczenie powodowało wzrost liczby wariantów, podczas gdy jej spadek przeważał w populacjach obecnych u pacjentów SR.



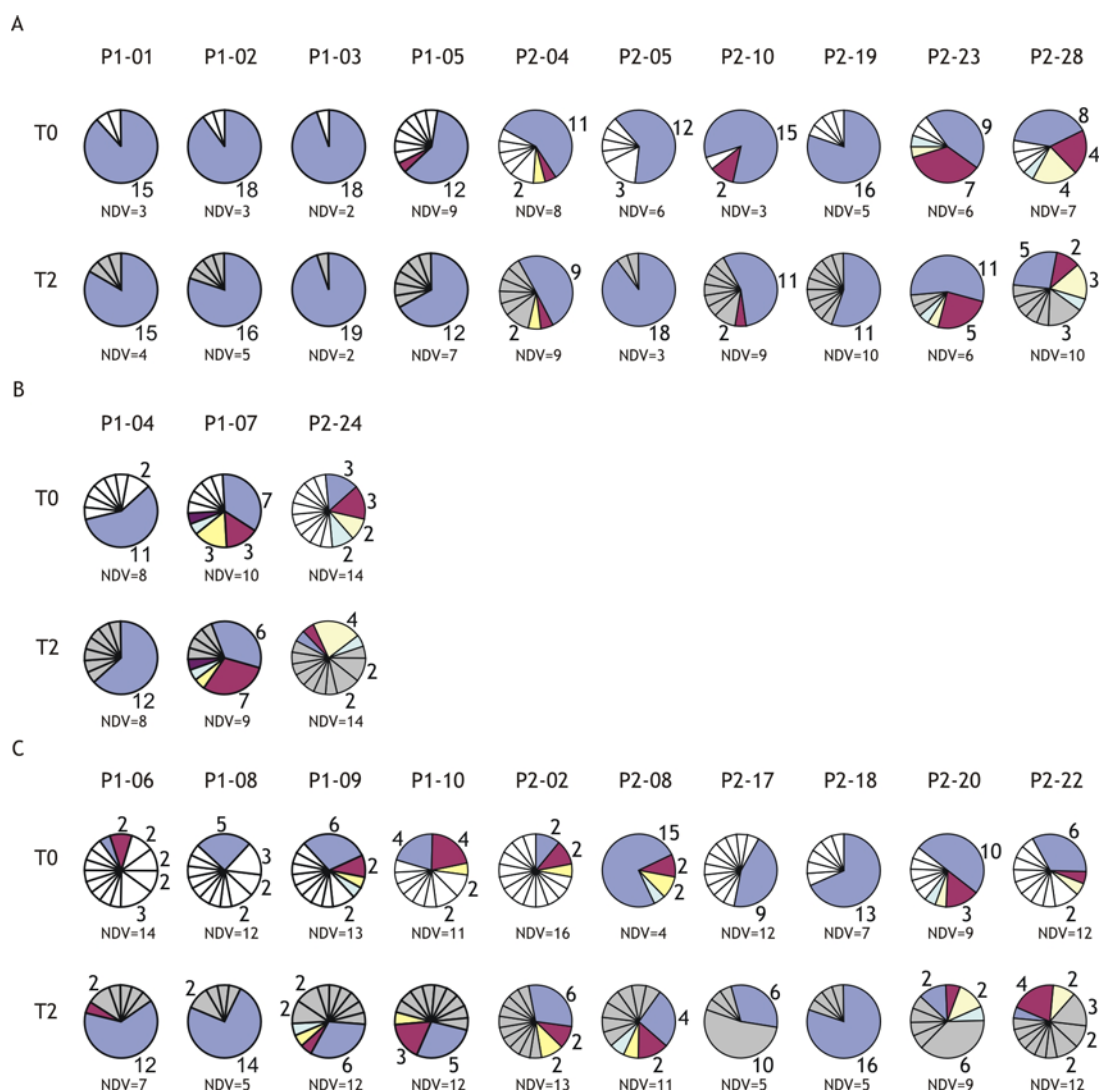
Rysunek IV.3. Wyznaczona na podstawie rejonu AF liczba wariantów wirusowych (NDV), zidentyfikowanych u pacjentów wykazujących różną odpowiedź na terapię (A - brak odpowiedzi, NR; B - odpowiedź przejściowa, TR; C - odpowiedź trwała, SR).

Wykresy kołowe przedstawiają udział każdego wariantu w populacji wirusowej, przed terapią (T0) i po dwóch tygodniach jej trwania (T2). Każdy sektor wykresu reprezentuje pojedynczy wariant, natomiast liczby określają częstość jego występowania w populacji (brak liczby oznacza, że dany wariant zidentyfikowano tylko raz).



Rysunek IV.4. Wyznaczona na podstawie rejonu RS liczba wariantów wirusowych (NDV), zidentyfikowanych u pacjentów wykazujących różną odpowiedź na terapię (A - brak odpowiedzi, NR; B - odpowiedź przejściowa, TR; C - odpowiedź trwała, SR).

Wykresy kołowe przedstawiają udział każdego wariantu w populacji wirusowej, przed terapią (T0) i po dwóch tygodniach jej trwania (T2). Każdy sektor wykresu reprezentuje pojedynczy wariant, natomiast liczby określają częstość jego występowania w populacji (brak liczby oznacza, że dany wariant zidentyfikowano tylko raz).



Rysunek IV.5. Wyznaczona na podstawie rejonu HVR1 liczba wariantów wirusowych (NDV), zidentyfikowanych u pacjentów wykazujących różną odpowiedź na terapię (A - brak odpowiedzi, NR; B - odpowiedź przejściowa, TR; C - odpowiedź trwała, SR).

Wykresy kołowe przedstawiają udział każdego wariantu w populacji wirusowej, przed terapią (T0) i po dwóch tygodniach jej trwania (T2). Każdy sektor wykresu reprezentuje pojedynczy wariant, natomiast liczby określają częstość jego występowania w populacji (brak liczby oznacza, że dany wariant zidentyfikowano tylko raz).

Choć liczba wariantów wirusowych jest istotnym parametrem, opisującym strukturę quasi-gatunku, to nie pozwala jednak określić, w jakim stopniu zidentyfikowane warianty różnią się między sobą. W celu opisanie poziomu zróżnicowania populacji wirusowych posłużono się miarą matematyczną, jaką jest średnia odległość Hamminga. Sekwencje zawarte w jednym zbiorze zostały porównane parami. Dla każdej pary określono liczbę różniących je reszt aminokwasowych, czyli odległość Hamminga. Biorąc pod uwagę wyniki otrzymane dla wszystkich możliwych par sekwencji, wyznaczono średnią odległość Hamminga dla danej populacji. Tak jak

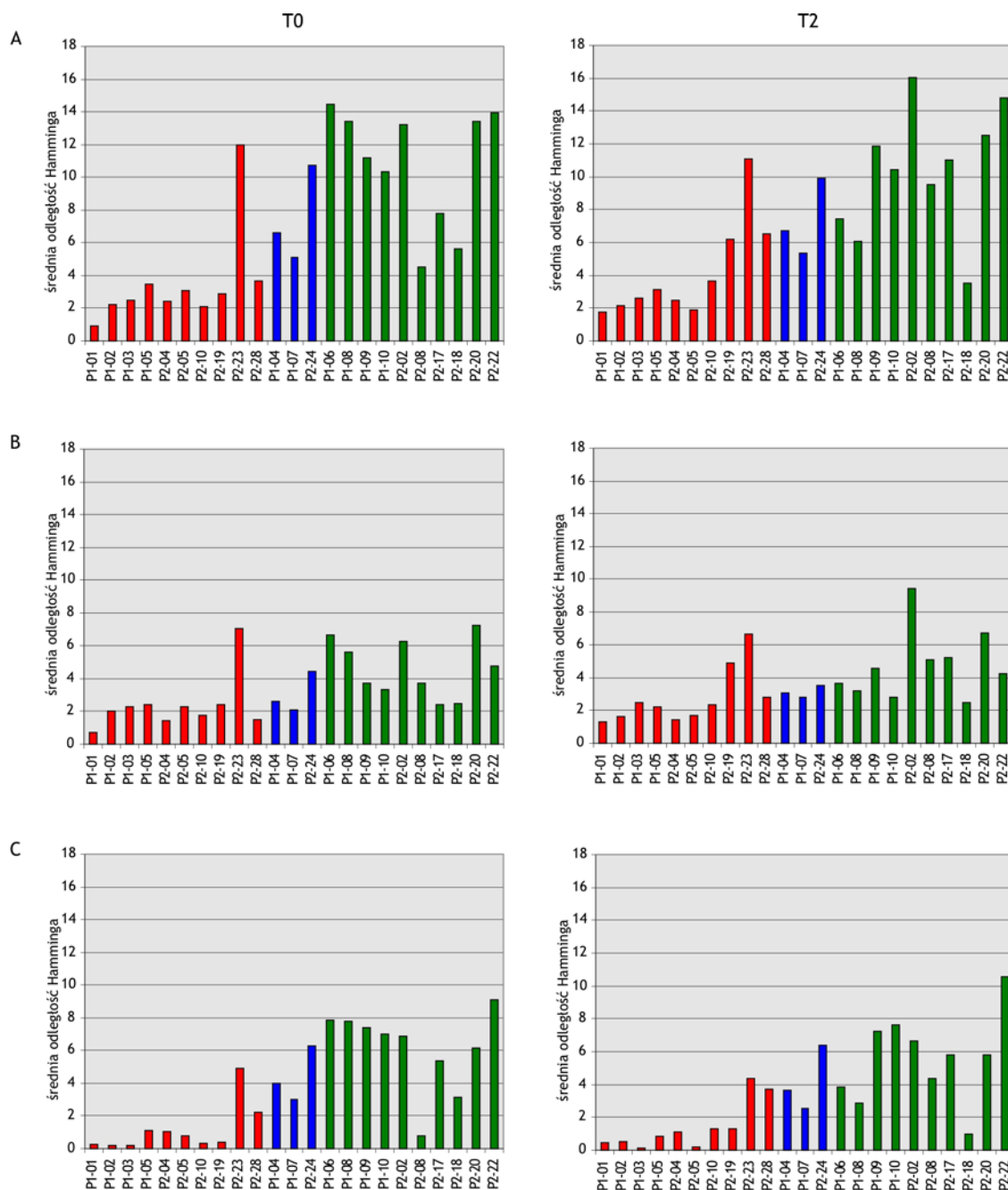
w przypadku liczby wariantów wirusowych, analizę przeprowadzono oddzielnie dla rejonu AF oraz obu jego składowych: RS i HVR1.

Średnia odległość Hamminga dla rejonu AF różniła się znacząco w obrębie trzech analizowanych grup quasi-gatunków [rysunek IV.6A]. Przed rozpoczęciem terapii była najniższa w populacjach obecnych u pacjentów NR i wynosiła 0,94-12, w 9 przypadkach na 10 nie przekraczając jednak 4. Tymczasem, w populacjach pochodzących od dzieci TR i SR, wartość tego parametru wynosiła, odpowiednio, 5,12-10,76 i 4,5-14,47, zwykle przekraczając 6. Innymi słowy, przeciętne wartości poziomu zróżnicowania rejonu AF, jakie można przypisać quasi-gatunkom HCV w obrębie trzech grup pacjentów o różnej odpowiedzi na terapię to: (i) NR – 3,52; (ii) TR – 7,48; (iii) SR – 10,78. Po dwóch tygodniach leczenia nie zaobserwowano istotnych zmian średniej odległości Hamminga wśród populacji obecnych u pacjentów NR i TR, z wyjątkiem P2-19 i P2-28, u których zanotowano znaczny wzrost poziomu zróżnicowania. W przypadku quasi-gatunków pochodzących od pacjentów SR, zauważono zarówno spadek (P1-06, P1-08), jak i wzrost (P2-08) średniej odległości Hamminga.

Analiza ograniczona do rejonu RS, zarówno w T0, jak i T2, wykazała mniejsze różnice pomiędzy populacjami pochodzącymi od osób o trzech typach odpowiedzi na terapię [rysunek IV.6B]. Zachowana była jednak tendencja do niższych wartości średniej odległości Hamminga w quasi-gatunkach obecnych u pacjentów NR (przeciętnie 2,39), natomiast wyższych u pacjentów SR (przeciętnie 4,63).

Badania przeprowadzone dla odcinka HVR1 potwierdziły wnioski wyciągnięte na podstawie analizy rejonu AF [rysunek IV.6C]. Tuż przed wdrożeniem leczenia, średnia odległość Hamminga obliczona dla populacji obecnych u 9 dzieci z grupy NR oscylowała pomiędzy 0,2 i 2,19. Tylko u jednej osoby wynosiła 4,93. Poziom zróżnicowania wzrastał natomiast w przypadku populacji pochodzących od pacjentów TR oraz SR, i wynosił, odpowiednio, 3,03-6,27 i 0,79-9,12. Wartość 0,79 okazała się wyjątkowo niska w tej grupie, gdyż średnia odległość Hamminga 8 z 10 populacji przekroczyła 5,38. Przeciętnie poziom zróżnicowania quasi-gatunków HCV w trzech badanych grupach wynosił: (i) NR – 1,13; (ii) TR – 4,43; (iii) SR – 6,15. Po dwóch tygodniach podawania leków wartość średniej odległości Hamminga w poszczególnych populacjach wzrastała bądź malała, jednakże charakter tych zmian nie miał związku z odpowiedzią pacjenta na terapię. Jednocześnie jednak pierwotne różnice pomiędzy trzema grupami quasi-gatunków wirusowych uległy częściowemu zatarciu. Wydaje się

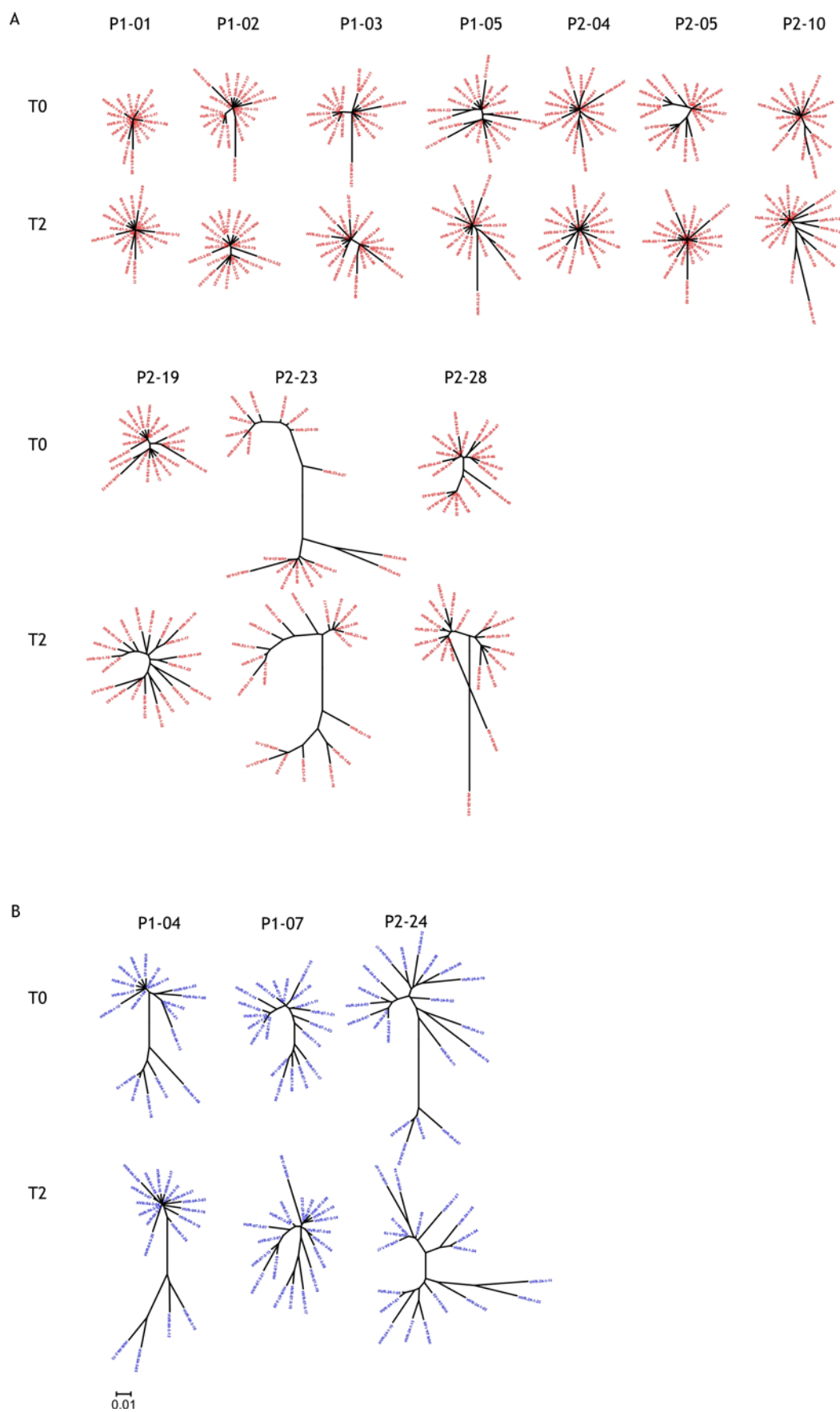
zatem, że dane otrzymane dla populacji wirusowych przed rozpoczęciem leczenia najlepiej korespondują z jego rezultatem.



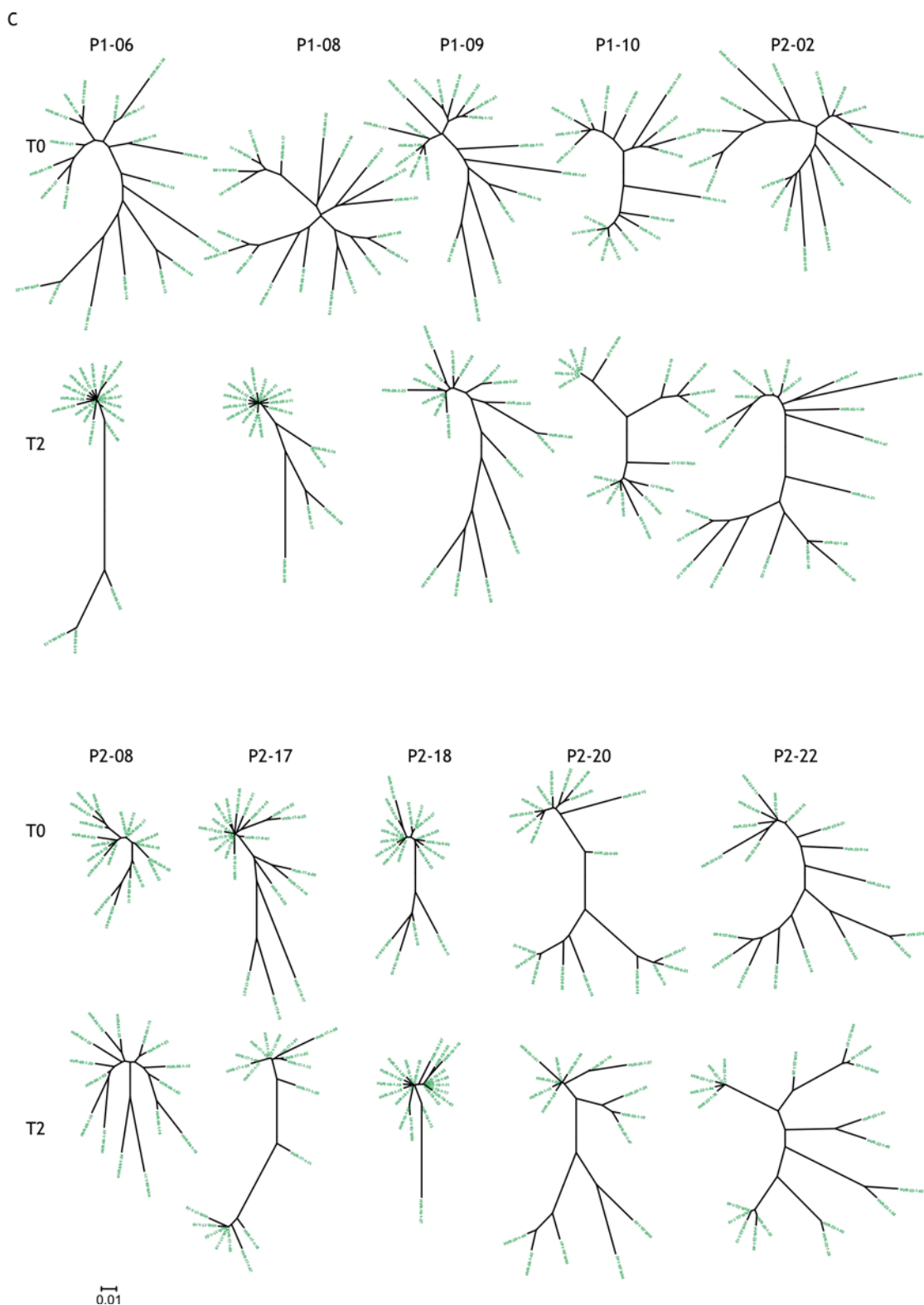
Rysunek IV.6. Zróżnicowanie populacji wirusowych. Średnie odległości Hamminga, wyznaczone na podstawie rejonu AF (A), RS (B) i HVR1 (C) dla populacji uzyskanych od pacjentów przed rozpoczęciem terapii (T0) i po dwóch tygodniach jej trwania (T2).

Śtupki wykresów oznaczono kolorami w zależności od odpowiedzi pacjenta na leczenie: czerwony - brak odpowiedzi, niebieski - odpowiedź przejściowa, zielony - odpowiedź trwała.

W celu uwidocznienia relacji pomiędzy wariantami, reprezentującymi daną populację, przeprowadzono analizę filogenetyczną, korzystając z algorytmu Neighbor-Joining. Badanie ponownie przeprowadzono na podstawie całego rejonu AF, jak również RS i HVR1 osobno.

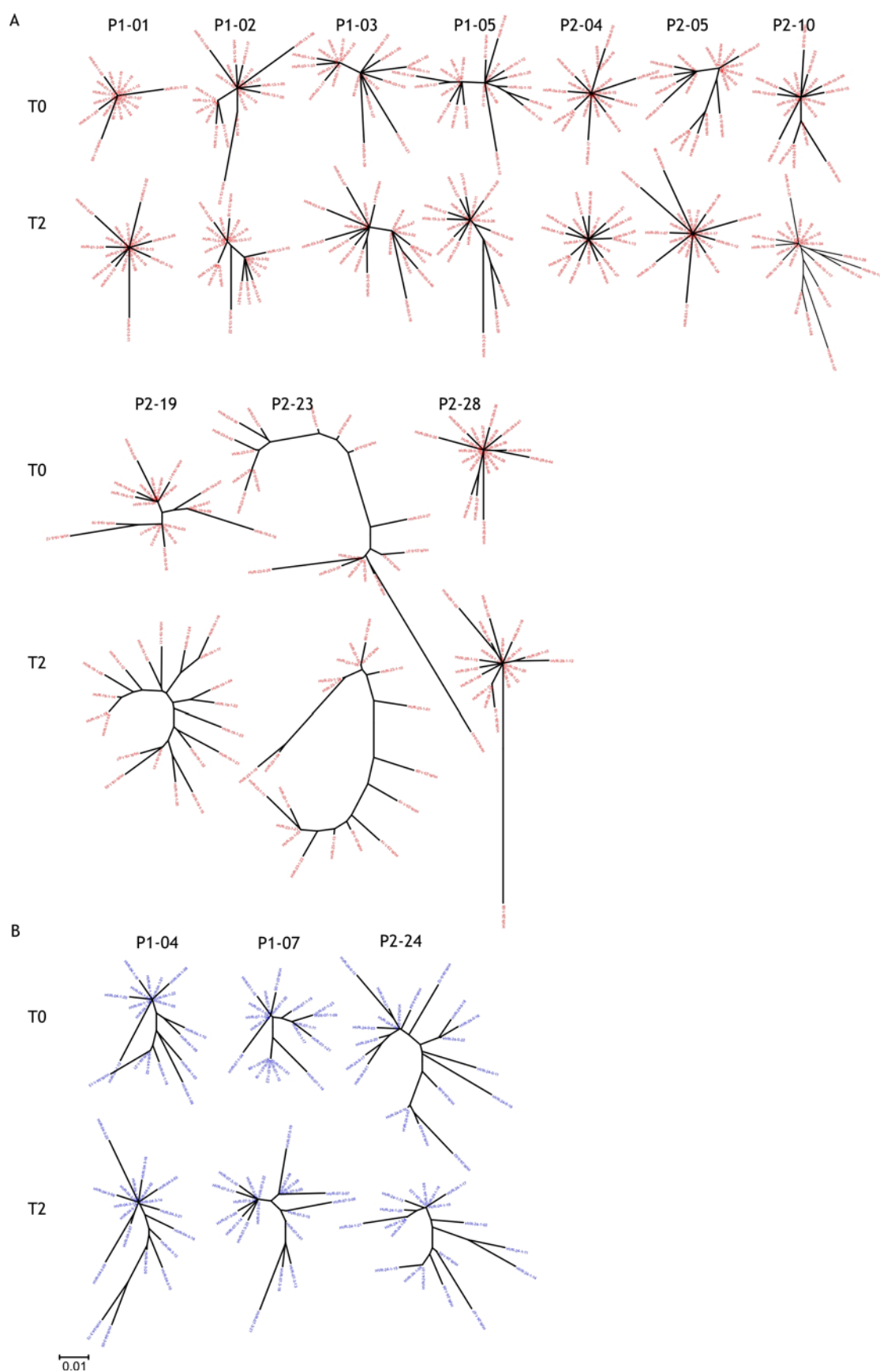


Rysunek IV.7A, B.
Opis - rysunek IV.7C.

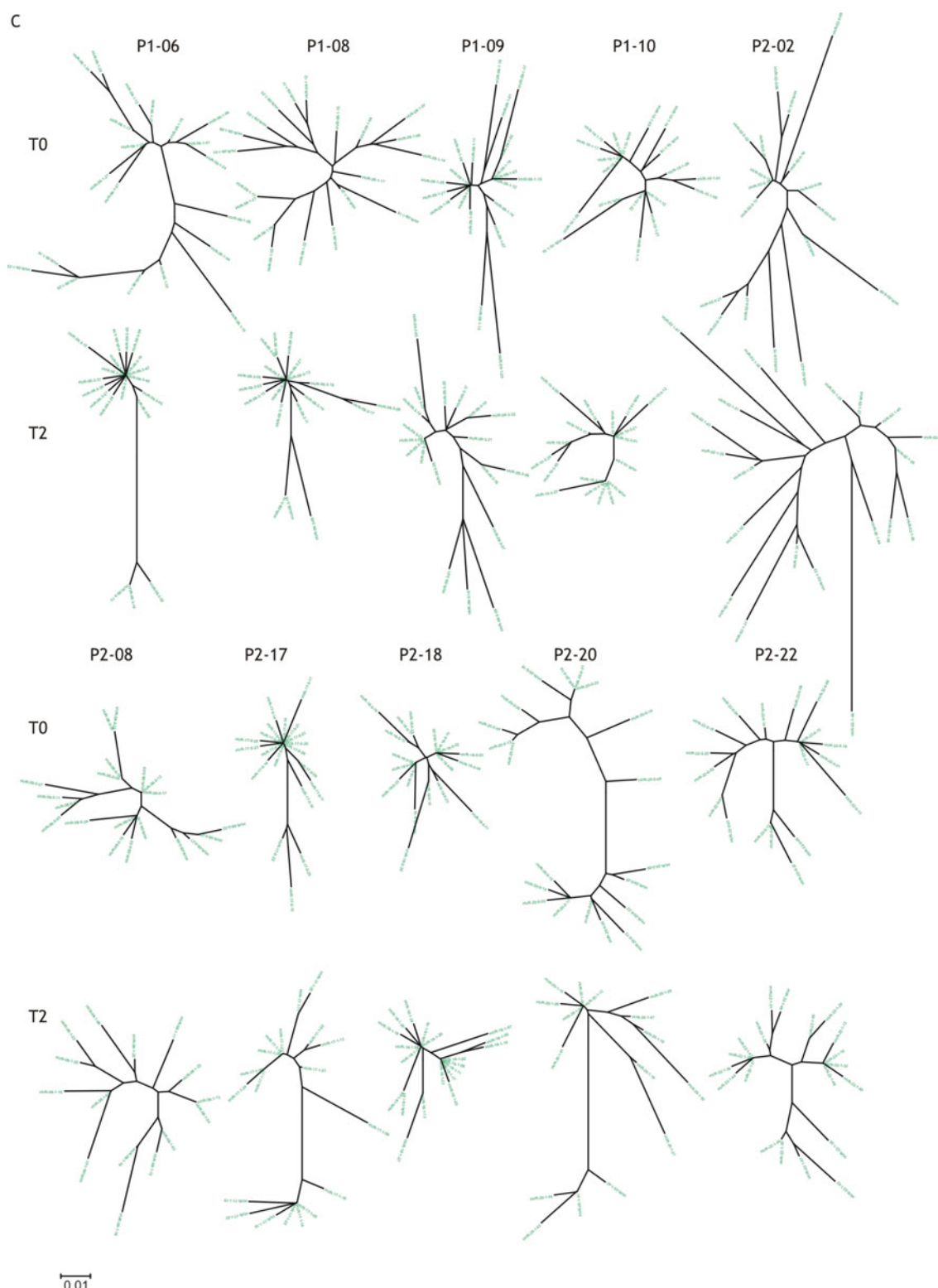


Rysunek IV.7C. Drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie regionu AF dla populacji HCV występujących u pacjentów o różnej odpowiedzi na terapię (A - brak odpowiedzi, NR; B - odpowiedź przejściowa, TR; C - odpowiedź trwała, SR), przed rozpoczęciem leczenia (T0) i po dwóch tygodniach jego trwania (T2).

Gałęzie drzew przedstawiono za pomocą czarnych linii, natomiast nazwy wariantów wirusowych oznaczono kolorami zgodnie z odpowiedzią pacjentów na terapię: czerwony - brak odpowiedzi, niebieski - odpowiedź przejściowa, zielony - odpowiedź trwała.

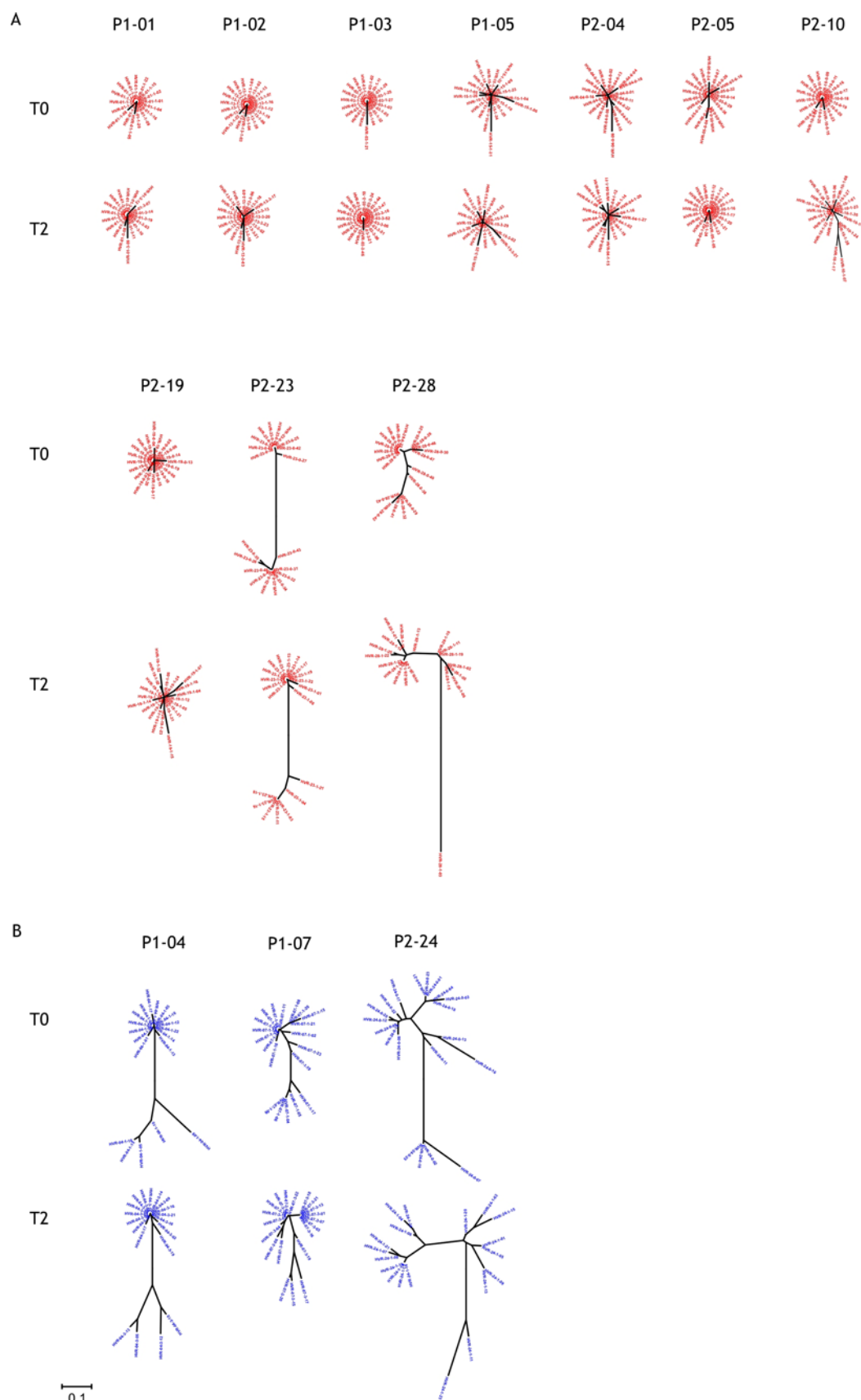


Rysunek IV.8A, B.
Opis - rysunek IV.8C.

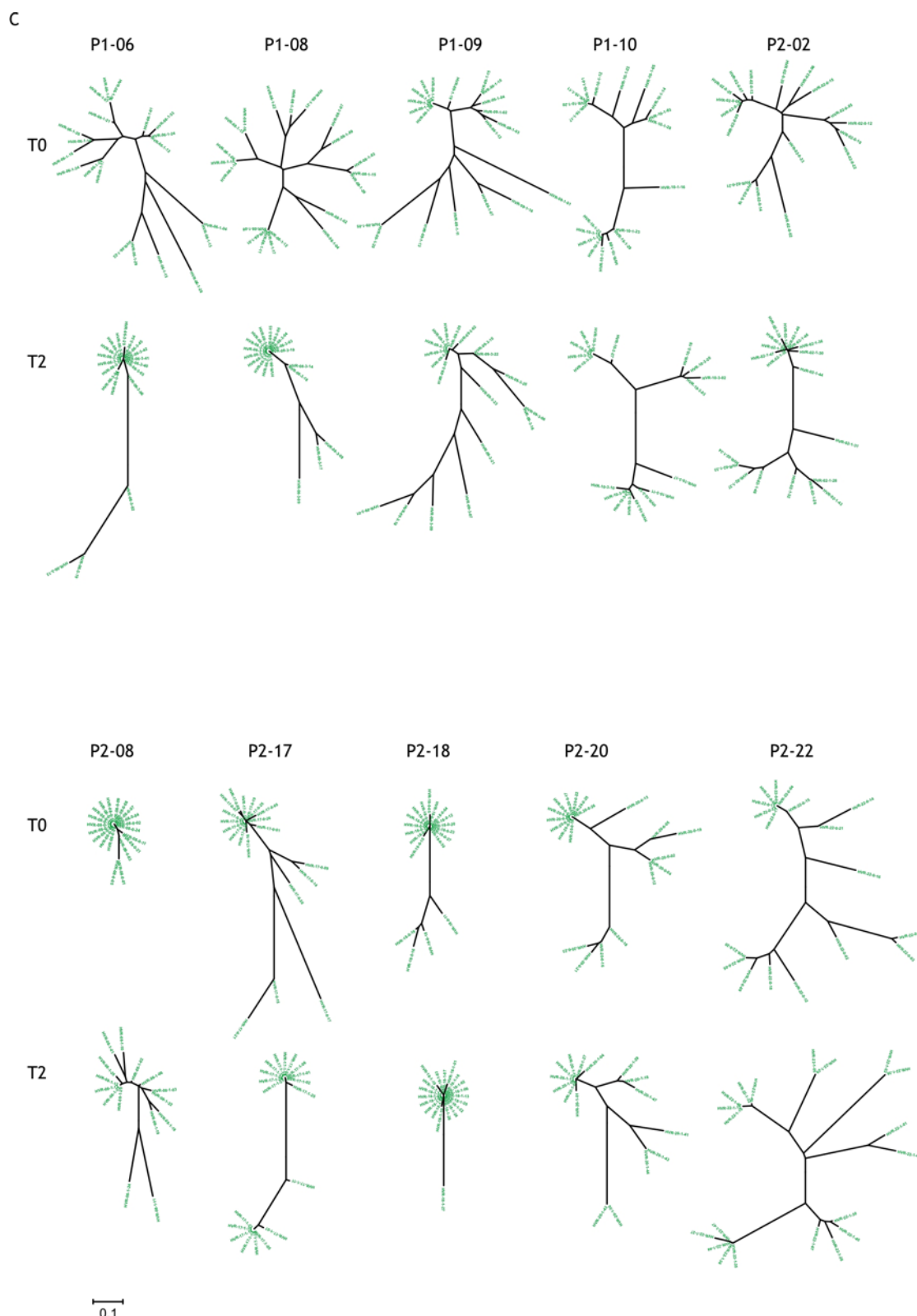


Rysunek IV.8C. Drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie rejonu RS dla populacji HCV występujących u pacjentów o różnej odpowiedzi na terapię (A - brak odpowiedzi, NR; B - odpowiedź przejściowa, TR; C - odpowiedź trwała, SR), przed rozpoczęciem leczenia (T0) i po dwóch tygodniach jego trwania (T2).

Gałęzie drzew przedstawiono za pomocą czarnych linii, natomiast nazwy wariantów wirusowych oznaczono kolorami zgodnie z odpowiedzią pacjentów na terapię: czerwony - brak odpowiedzi, niebieski - odpowiedź przejściowa, zielony - odpowiedź trwała.



Rysunek IV.9A, B.
Opis - rysunek IV.9C.



Rysunek IV.9C. Drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie rejonu HVR1 dla populacji HCV występujących u pacjentów o różnej odpowiedzi na terapię (A - brak odpowiedzi, NR; B - odpowiedź przejściowa, TR; C - odpowiedź trwała, SR), przed rozpoczęciem leczenia (T0) i po dwóch tygodniach jego trwania (T2).

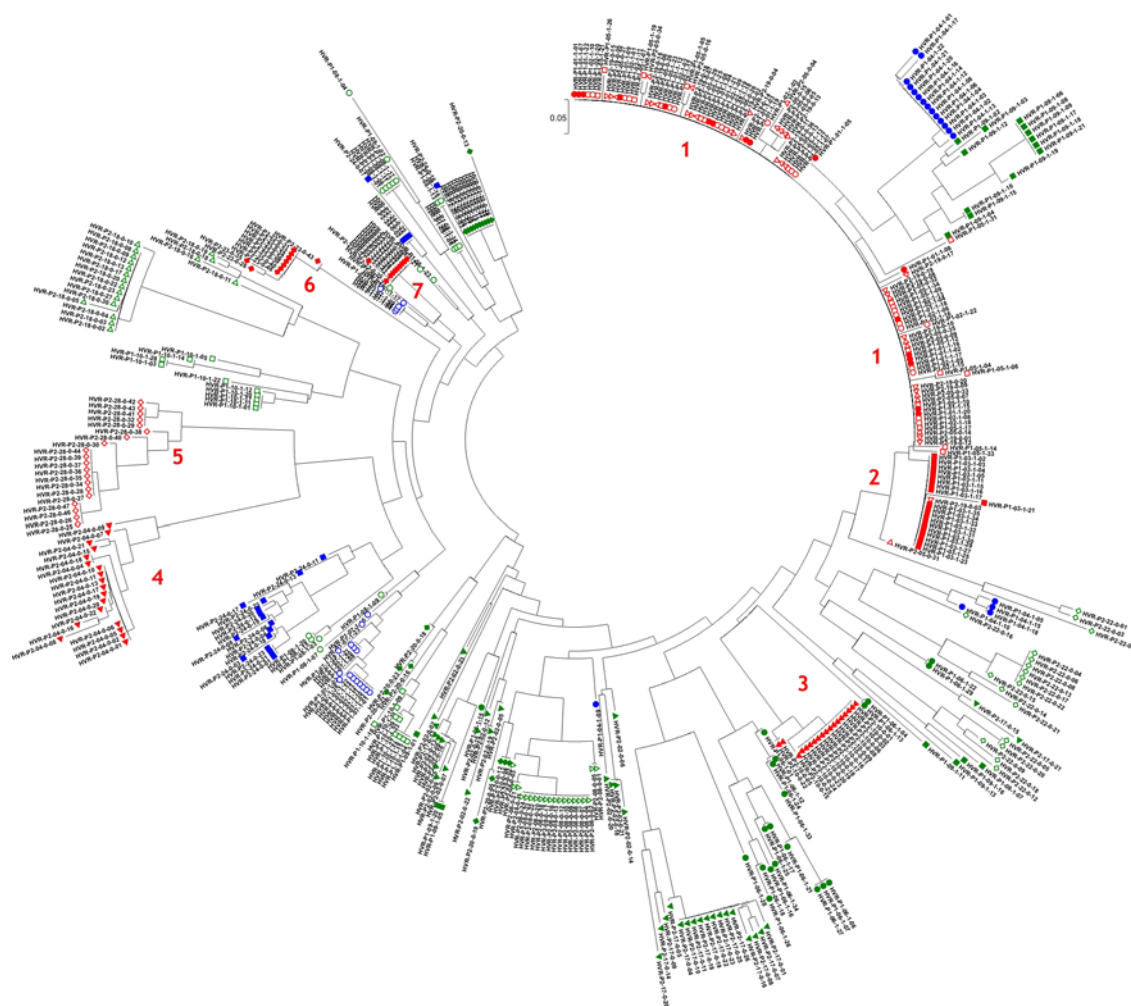
Gałęzie drzew przedstawiono za pomocą czarnych linii, natomiast nazwy wariantów wirusowych oznaczono kolorami zgodnie z odpowiedzią pacjentów na terapię: czerwony - brak odpowiedzi, niebieski - odpowiedź przejściowa, zielony - odpowiedź trwała.

Drzewa filogenetyczne uzyskane dla poszczególnych quasi-gatunków na podstawie rejonu AF różniły się zarówno długością gałęzi, jak i ogólną topologią [rysunek IV.7]. Różnice pomiędzy trzema grupami populacji były najlepiej widoczne przed rozpoczęciem terapii. Drzewa charakteryzujące się dużą zwartością oraz niewielką długością gałęzi otrzymano przede wszystkim dla populacji pochodzących od pacjentów NR oraz jednego pacjenta TR – P1-07, i dwóch SR – P2-08 i P2-18. Z kolei drzewa o silnie rozgałęzionej topologii reprezentowały głównie quasi-gatunki obecne u pacjentów SR oraz jednego pacjenta NR – P2-23 i jednego TR – P2-24.

Analiza filogenetyczna odcinka RS nie przyniosła rozstrzygających wyników [rysunek IV.8]. Choć w niektórych wypadkach zaobserwowano podobne zależności, jak w przypadku rejonu AF, to jednak znacznie częściej niż poprzednio otrzymano drzewa o podobnej topologii dla populacji pochodzących od pacjentów NR, TR i SR.

Tendencje zanotowane dla rejonu AF stały się dalece bardziej widoczne podczas analizy odcinka HVR1 [rysunek IV.9], zwłaszcza przed rozpoczęciem leczenia. Drzewa skonstruowane dla quasi-gatunków obecnych u pacjentów NR były bardzo zwarte, a nierzadko ograniczone do jednego punktu, któremu towarzyszyły nieliczne krótkie odgałęzienia (P1-01, P1-02, P1-03, P2-05, P2-10, P2-19). Podobne drzewo otrzymano tylko dla jednej populacji pochodzącej od pacjenta SR, P2-08. Co ciekawe, w obrębie quasi-gatunku obecnego u pacjenta P2-23, który wykazywał najwyższą wartość średniej odległości Hamminga w grupie NR, zidentyfikowano obecność dwóch oddalonych filogenetycznie subpopulacji. Każda z nich była jednak reprezentowana przez klony o niemal identycznych sekwencjach. Drzewa filogenetyczne charakteryzujące quasi-gatunki pochodzące od pacjentów SR wyróżniały się natomiast silnie rozgałęzioną topologią, świadczącą o odleglejszych związkach pomiędzy poszczególnymi klonami. Od tego schematu odbiegały jedynie drzewa uzyskane dla populacji P2-08 i P2-18.

Końcowy etap tej części badań polegał na przeprowadzeniu analizy filogenetycznej dla wszystkich 445 sekwencji rejonu HVR1, zidentyfikowanych u 23 pacjentów przed wdrożeniem terapii (T0) [rysunek IV.10]. Pozwoliła ona stwierdzić, że warianty pochodzące od osób, które pozytywnie odpowiedziały na leczenie były rozproszone, natomiast te zidentyfikowane u dzieci niewyleczonych przejawiały wyraźną tendencję do grupowania się w określonych miejscach drzewa. W rezultacie wyróżniono 7 grup, obejmujących warianty wirusowe, reprezentujące populacje obecne u pacjentów NR. Co ciekawe, blisko spokrewnione grupy nr 1 i 2 zawierały warianty wyizolowane od pacjentów P1-01, P1-02, P1-03, P1-05, P2-05 i P2-19.



Rysunek IV.10. Drzewo filogenetyczne skonstruowane dla wszystkich wariantów HVR1, zidentyfikowanych u 23 pacjentów o różnej odpowiedzi na terapię.

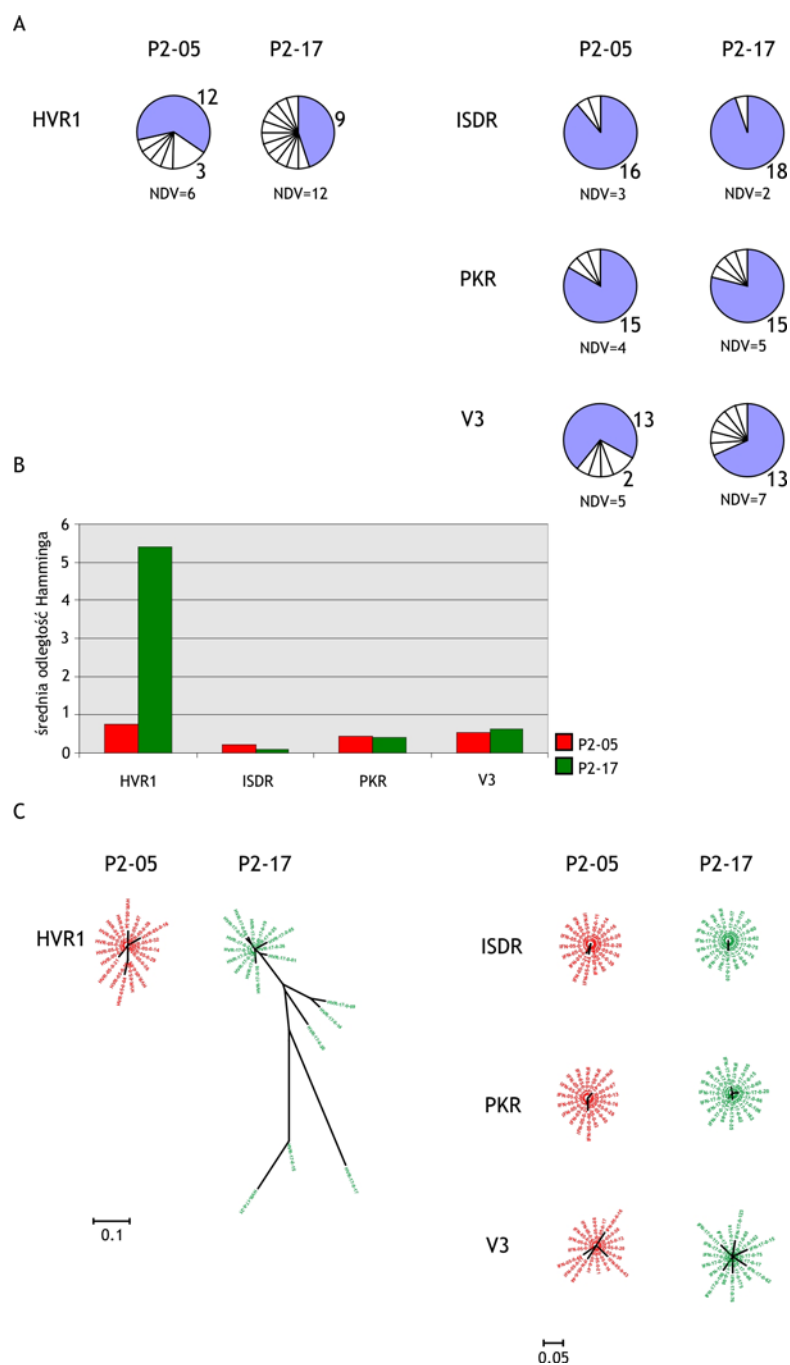
Gałęzie drzewa zaznaczono za pomocą czarnych linii. Nazwy sekwencji opatrzone symbolami geometrycznymi. Wszystkie sekwencje o tym samym symbolu reprezentują pojedynczą populację wirusową. Symbole oznaczono kolorami zgodnie z odpowiedzią pacjentów na terapię: czerwony - brak odpowiedzi, niebieski - odpowiedź przejściowa, zielony - odpowiedź trwała. Cyframi oznaczono 7 grup skupiających warianty zidentyfikowane u osób, które nie odpowiedziały na leczenie.

Oznacza to, że w sześciu niezależnych epidemiologicznie populacjach wirusowych, obecne były warianty rejonu HVR1 o wysokim stopniu podobieństwa lub nawet identyczne. Chociaż podczas całego postępowania – od momentu pobrania próbki krwi, poprzez namnażanie i klonowanie, do sekwencjonowania – ściśle przestrzegano procedur zapobiegających zanieczyszczeniu prób, przeprowadzono dodatkowy test potwierdzający, że dokonana obserwacja nie jest przypadkowa. Porównano wszystkie sekwencje nukleotydowe klonów należących do grup nr 1 i 2, a także wyznaczono sekwencję zgodną dla każdego ze zbiorów klonów, pochodzących od 6 pacjentów [rysunek IV.11].

IV.1.4 Amplifikacja, klonowanie, sekwencjonowanie i analiza bioinformatyczna rejonu IFN-R

Amplifikację rejonu IFN-R [III.2.1] przeprowadzono na podstawie genomowych RNA HCV, użytych wcześniej do powielenia odcinka AF [IV.1.2]. Ponownie zastosowano zestaw OneStep RT-PCR Kit [III.1.6], a całą procedurę prowadzono analogicznie, jak w przypadku AF. Tym razem w mieszaninie reakcyjnej obecne były startery IFN-Zs i IFN-Za [III.1.4]. Produkt RT-PCR rozcieńczano 50-krotnie i wykorzystywano do kolejnej reakcji PCR [III.2.4], z zastosowaniem starterów IFNs-1a i IFNa-1a [III.1.4], specyficznych wobec sekwencji zlokalizowanej wewnątrz produktu RT-PCR. O ile amplifikacja rejonu AF była bardzo wydajna, o tyle namnożenie odcinka IFN-R okazało się być trudniejsze i mniej efektywne, co spowodowało, że nie dla wszystkich populacji wirusowych uzyskano odpowiedni produkt PCR. Najprawdopodobniej było to związane z częściową degradacją genomowego RNA. Podobne problemy napotymano bowiem także przy próbach powielenia innych fragmentów, zlokalizowanych bliżej końca 3' genomowej czasteczki RNA HCV. Startery użyte w reakcji PCR wprowadzały miejsca rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne, odpowiednio: EcoRI i PstI. Dalsze postępowanie było analogiczne, jak w przypadku rejonu AF [IV.1.2 i IV.1.3]. Otrzymane dsDNA poddano zatem cięciu restrykcyjnemu, a następnie ligacji z wektorem pUC19. Produktem ligacji transformowano komórki kompetentne *E.coli* DH5 α , które następnie wykorzystano do przygotowania płynnych kultur bakterii, z których izolowano plazmidy. Ponownie, otrzymano po 20 niezależnych klonów dla danej populacji wirusowej przed leczeniem i po dwóch tygodniach trwania terapii. Dysponując wynikami wcześniejszych doświadczeń, postanowiono przeprowadzić analizę odcinka IFN-R dla kilku wybranych quasi-gatunków, których parametry wyznaczone na podstawie rejonu AF wyraźnie się różniły. Badaniom bioinformatycznym, wykonanym zgodnie z przyjętym wcześniej schematem, poddano zarówno cały rejon IFN-R, jak i jego poszczególne fragmenty: ISDR, PKR i V3.

W przeciwieństwie do parametrów uzyskanych na podstawie uprzednio analizowanego rejonu genomu wirusowego, w przypadku IFN-R nie zaobserwowano istotnych różnic pomiędzy populacjami obecnymi u osób o różnej odpowiedzi na terapię [rysunek IV.12].



Rysunek IV.12. Porównanie parametrów dwóch wybranych quasi-gatunków HCV, wyznaczonych na podstawie HVR1 oraz fragmentów IFN-R w T0.

(A) Liczba różnych wariantów (NDV) w populacjach wirusowych, obecnych u pacjentów o zróżnicowanej odpowiedzi na terapię: P2-05 - brak odpowiedzi, P2-17 - odpowiedź trwała. Liczba wariantów została określona na podstawie: HVR1, ISDR, PKR oraz V3. Wykresy kołowe przedstawiają udział każdego wariantu w populacji wirusowej. Jeden sektor wykresu reprezentuje pojedynczy wariant, natomiast liczby określają częstość jego występowania w danej populacji. Brak liczby oznacza, że dany wariant został zidentyfikowany tylko raz. (B) Średnie odległości Hamminga populacji HCV u pacjentów o zróżnicowanej odpowiedzi na terapię, obliczone na podstawie: HVR1, ISDR, PKR oraz V3. Słupki wykresu oznaczono kolorami w zależności od odpowiedzi pacjentów na leczenie: czerwony - brak odpowiedzi (P2-05), zielony - odpowiedź trwała (P2-17). (C) Drzewa filogenetyczne skonstruowane dla populacji HCV obecnych u pacjentów o zróżnicowanej odpowiedzi na terapię, na podstawie: HVR1, ISDR, PKR oraz V3. Gałęzie drzew przedstawiono za pomocą czarnych linii, natomiast nazwy wariantów wirusowych oznaczono kolorami w zależności od odpowiedzi pacjentów na leczenie: czerwony - brak odpowiedzi (P2-05), zielony - odpowiedź trwała (P2-17).

Populacje charakteryzowały się podobną, ograniczoną liczbą wariantów wirusowych, i przejawiały niski poziom zróżnicowania, wyrażony za pomocą średniej odległości Hamminga. Niewielka złożoność populacji znalazła swoje odzwierciedlenie w topologii skonstruowanych drzew filogenetycznych, które charakteryzowały się dużą zwartością. Uzyskane wyniki wskazują, że poziomy polimorfizmu w obrębie rejonów AF i IFN-R nie korelują ze sobą. Tym samym wydaje się, że parametry uzyskane na podstawie IFN-R nie pozwalają na rozróżnienie populacji wirusowych, pochodzących od pacjentów odmiennie reagujących na prowadzone leczenie.

Podsumowanie. Wybrano dwa reprezentatywne rejony genomu HCV, które wykorzystano do analizy struktury quasi-gatunku w przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C. W wyniku analizy bioinformatycznej wyznaczono parametry, opisujące strukturę populacji wirusowych obecnych u 23 pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C przed wdrożeniem terapii skojarzonej (T0) i po dwóch tygodniach jej trwania (T2). Poczynione obserwacje, zwłaszcza dotyczące rejonu HVR1 przed terapią, wskazały na istnienie dwóch odmiennych typów quasi-gatunku HCV. Pierwszy z nich charakteryzował się występowaniem wyraźnego dominanta, otoczonego ograniczoną liczbą wariantów towarzyszących. Poziom zróżnicowania takiej populacji był niewielki, a warianty łączyły ściśle relacje filogenetyczne. Ten typ quasi-gatunku zdecydowanie przeważał u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na leczenie (z wyjątkiem pacjenta P2-08). Drugi typ populacji HCV charakteryzował się obecnością większej liczby zróżnicowanych wariantów o odleglejszych związkach filogenetycznych. Występował on głównie u dzieci, przejawiających pozytywną odpowiedź na terapię (z wyjątkiem pacjenta P2-23). Analiza filogenetyczna wszystkich 445 uzyskanych sekwencji rejonu HVR1 z 23 populacji HCV ujawniła, że bardzo podobne lub jednakowe warianty były obecne w 6 niezależnych epidemiologicznie quasi-gatunkach, wyłącznie u osób niewyleczonych. Jednocześnie okazało się, iż analiza drugiego z wybranych fragmentów genomu wirusowego, IFN-R, nie dała zbieżnych rezultatów. Parametry wyznaczone dla kilku przykładowych quasi-gatunków były podobne i nie związane z odpowiedzią danego pacjenta na zastosowane leczenie.

IV.2 Czynniki kształtujące strukturę quasi-gatunku HCV

Przedstawione powyżej wyniki wskazywały na istotne zróżnicowanie poziomu polimorfizmu genetycznego w obrębie analizowanych populacji wirusa zapalenia wątroby typu C. Na ich podstawie można było wyróżnić dwa podstawowe typy

quasi-gatunku HCV. Tendencje te były szczególnie wyraźne w przypadku rejonu HVR1. Wydaje się, że u podłoża obserwowanych różnic mogą leżeć dwa odmienne mechanizmy. Po pierwsze, zjawisko to może być uwarunkowane specyficzną strukturą genomowej cząsteczki RNA wirusa. Z licznych doniesień literaturowych wynika bowiem, iż struktura matrycy wywiera bardzo istotny wpływ na wierność jej kopiowania przez polimerazę RNA zależną od RNA. Jeżeli założenie to byłoby słuszne także w tym wypadku, wówczas należałoby spodziewać się, że odcinki HVR1 o różnych sekwencjach będą powielane przez ten sam enzym z różną dokładnością. Z drugiej strony wiadomo, że badany rejon jest fragmentem wirusowego genu kodującego glikoproteinę otoczki, E2. Białko to odgrywa istotną rolę w rozpoznawaniu komórek gospodarza, będąc jednocześnie celem odpowiedzi immunologicznej, przez co znajduje się w warunkach silnej presji selekcyjnej. Polimorfizm lub stabilność genetyczna HVR1 mogą być zatem uwarunkowane funkcjonalnością fragmentu kodowanego przezeń białka.

IV.2.1 Wpływ struktury rejonu AF na wierność jego kopiowania przez polimerazę wirusową

Aby sprawdzić, w jakim stopniu obserwowana zachowawczość lub zmienność HVR1 zależy od struktury RNA tego rejonu, przeprowadzono badania w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego. W tym celu posłużono się stosowanym wcześniej w Zespole Wirusologii Molekularnej IChB PAN układem: wirus mozaiki stokłosy (ang. *brome mosaic virus*, BMV) – komosa chińska (*Chenopodium quinoa*). Genom BMV stanowią trzy cząsteczki RNA, oznaczone RNA1, RNA2 i RNA3. Proces replikacji tego patogenu uzależniony jest od białek kodowanych przez RNA1 i RNA2. Upřednio wykazano, że wprowadzenie około 500-nukleotydowego fragmentu w obrębie 3'-końcowej niekodującej sekwencji (3'UTR) genomowego RNA3 BMV nie wpływa w istotny sposób na przebieg replikacji tego wirusa *in vivo*. Mając do dyspozycji plazmidy kodujące genomowe cząsteczki BMV, postanowiono otrzymać szereg mutantów zawierających w obrębie 3'UTR RNA3 odcinki AF reprezentujące quasi-gatunki HCV o różnym poziomie polimorfizmu genetycznego. W dalszym etapie, plazmidy te posłużyły jako matryce w reakcji transkrypcji *in vitro*. Uzyskane w ten sposób cząsteczki RNA1 i RNA2 typu dzikiego oraz zmodyfikowane cząsteczki RNA3 zostały wykorzystane do inokulacji liści komosy chińskiej. Podczas infekcji, wirusowa polimeraza RNA zależna od RNA (analogiczna do kodowanej przez HCV) kopiowała

genom BMV, a wraz z nim i sekwencję AF. Izolacja wirusowego RNA, powielenie badanego rejonu metodą RT-PCR, a następnie klonowanie i sekwencjonowanie produktów reakcji umożliwiło określenie poziomu zmienności różnych sekwencji AF pod nieobecność presji selekcyjnej, charakterystycznej dla organizmu pacjenta.

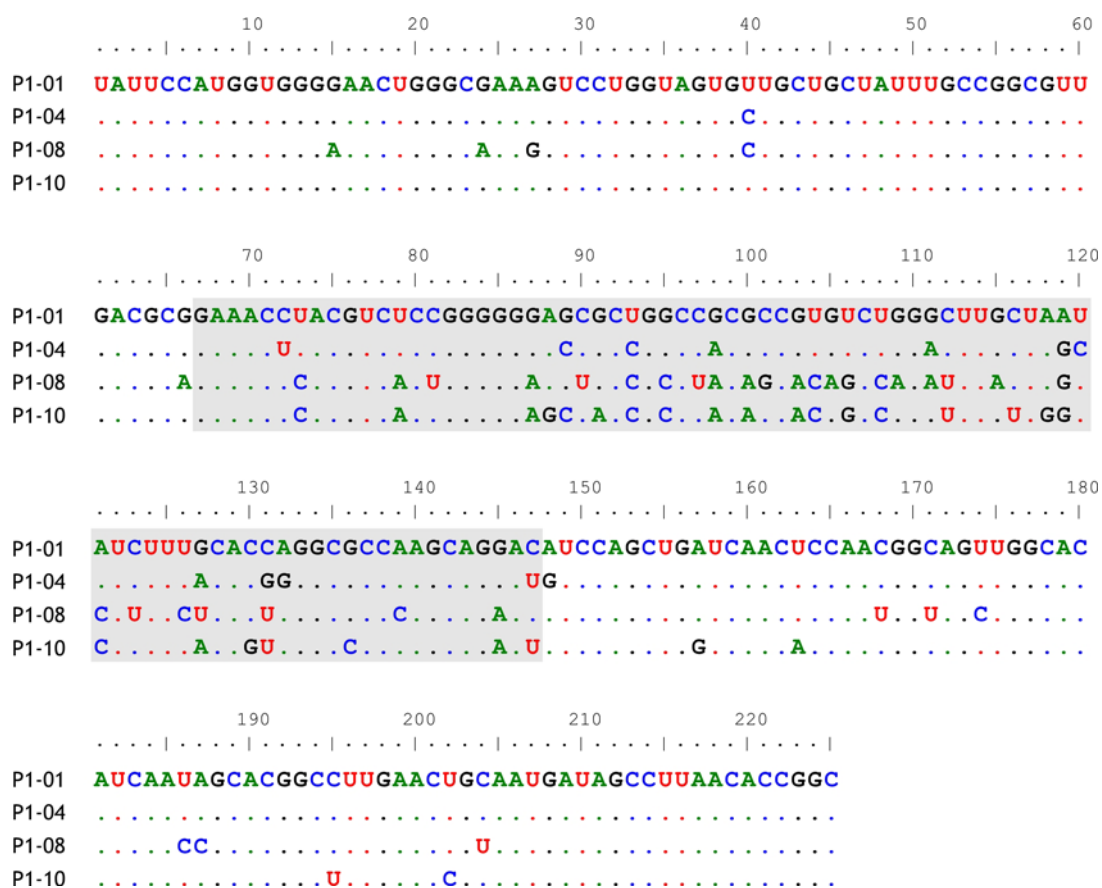
IV.2.1.1 Otrzymywanie plazmidów kodujących cząsteczkę AF_A HCV

Spośród wszystkich 445 klonów rejonu AF, uzyskanych w T0 z 23 populacji wirusowych obecnych u osób poddanych terapii interferonem i rybawiryną, wybrano cztery. Każdy z nich reprezentował inny quasi-gatunek: P1-01, P1-04, P1-08 lub P1-10. Pierwszy pochodził od pacjenta, który nie zareagował na leczenie, drugi od pacjenta wykazującego odpowiedź przejściową, natomiast trzeci i czwarty od osób przejawiających trwałą odpowiedź. Populacje, z których pochodziły klony, znacznie różniły się poziomem polimorfizmu [tabela IV.2], również sekwencje czterech klonów były wyraźnie odmienne [rysunek IV.13], a łączące je relacje filogenetyczne odległe.

Tabela IV.2. Poziom polimorfizmu rejonu AF w czterech wybranych quasi-gatunkach HCV, pochodzących od pacjentów o zróżnicowanej odpowiedzi na leczenie

Quasi-gatunek HCV	Średnia odległość Hamminga (T0)	
	Sekwencje nukleotydowe	Sekwencje aminokwasowe
P1-01	3,66	0,94
P1-04	13,24	2,44
P1-08	23,68	13,43
P1-10	16,46	10,32

Początkowo planowano otrzymanie plazmidów kodujących pełną sekwencję AF. Niestety, uzyskane cząsteczki Mat-AF-RNA3 były nieinfekcyjne. Ponieważ było to najprawdopodobniej spowodowane długością włączonego fragmentu, zdecydowano się na zastosowanie skróconych odcinków, nazwanych AF_A, obejmujących pierwsze 225 par zasad AF, a zatem także rejon HVR1.

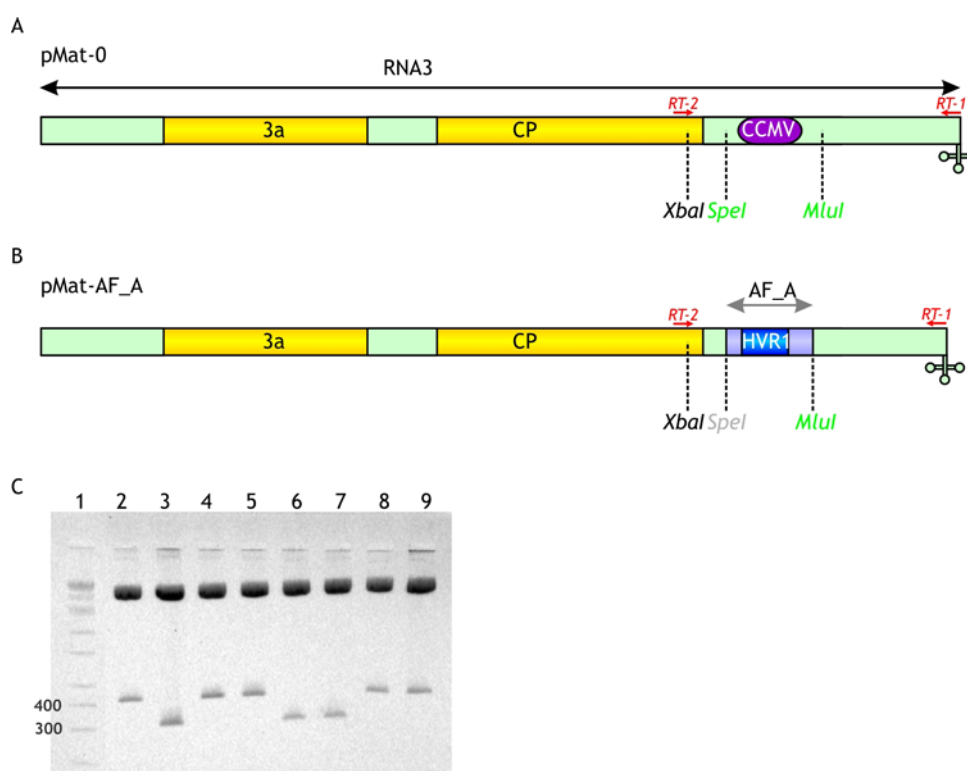


Rysunek IV.13. Porównanie sekwencji czterech wybranych wariantów AF_A, reprezentujących populacje wirusowe obecne u pacjentów o różnej odpowiedzi na leczenie.

P1-01 - brak odpowiedzi, P1-04 - odpowiedź przejściowa, P1-08 i P1-10 - odpowiedź trwała. Odpowiadające im cząsteczki dsDNA wykorzystano do przygotowania konstruktów, umożliwiających zbadanie wpływu struktury AF_A na dokładność jego kopiowania przez polimerazę wirusową w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego. Kropkami oznaczono nukleotydy identyczne w stosunku do sekwencji P1-01. Rejon HVR1 wyróżniono szarym prostokątem.

Cztery wektory pUC19, z których każdy zawierał jeden z wybranych wariantów sekwencji AF, wykorzystano jako matryce w reakcjach PCR [III.2.4], z użyciem starterów XbaHVR i Mlu-R [III.1.4]. W ten sposób otrzymano cztery dsDNA, o długości 241 par zasad, odpowiadające rejonowi AF_A i zawierające dodatkowo miejsca rozpoznawane przez enzymy restrykcyjne, XbaI na końcu 5' i MluI na końcu 3'. Po oczyszczeniu, produkty PCR poddano cięciu restrykcyjnemu [III.2.8.1]. Równocześnie przygotowano plazmid pMat-0, otrzymany w Zespole Wirusologii Molekularnej IChB PAN [III.1.3]. Plazmid ten zawiera sekwencję kodującą zmodyfikowaną cząsteczkę RNA3 BMV pod kontrolą promotora polimerazy RNA T7. W obrębie jego 3'UTR umieszczono sekwencję kodującą fragment genomu wirusa żółtej chlorowatości wspięgi chińskiej (ang. *cowpea chlorotic mosaic virus*, CCMV), oskrzydłą miejscami klonowania [rysunek IV.14A]. Plazmid ten poddano cięciu

restrykcyjnego, najpierw za pomocą enzymu SpeI [III.2.8.2], a następnie, po uprzednim oczyszczeniu, MluI [III.2.8.1]. Prawidłowość przebiegu obu reakcji, w wyniku których uwolniony został fragment długości ok. 400 par zasad, oceniono, analizując ich produkty metodą elektroforezy w żelu agarozowym [III.2.6]. W kolejnym etapie, przeprowadzono cztery równoległe reakcje ligacji plazmidu pMat-0 z insertami, odpowiadającymi czterem wybranym wariantom rejonu AF_A HCV [III.2.12]. Ponieważ enzymy XbaI i SpeI generują kompatybilne końce, możliwe było włączenie insertu do plazmidu z wykorzystaniem tzw. lepkich końców. Jednocześnie, wskutek wprowadzenia insertu, miejsce rozpoznawane przez SpeI w plazmidzie zostało usunięte [rysunek IV.14B].



Rysunek IV.14. Otrzymywanie plazmidów umożliwiające zbadanie wpływu struktury HVR1 na dokładność jego kopiowania przez polimerazę wirusową w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego.

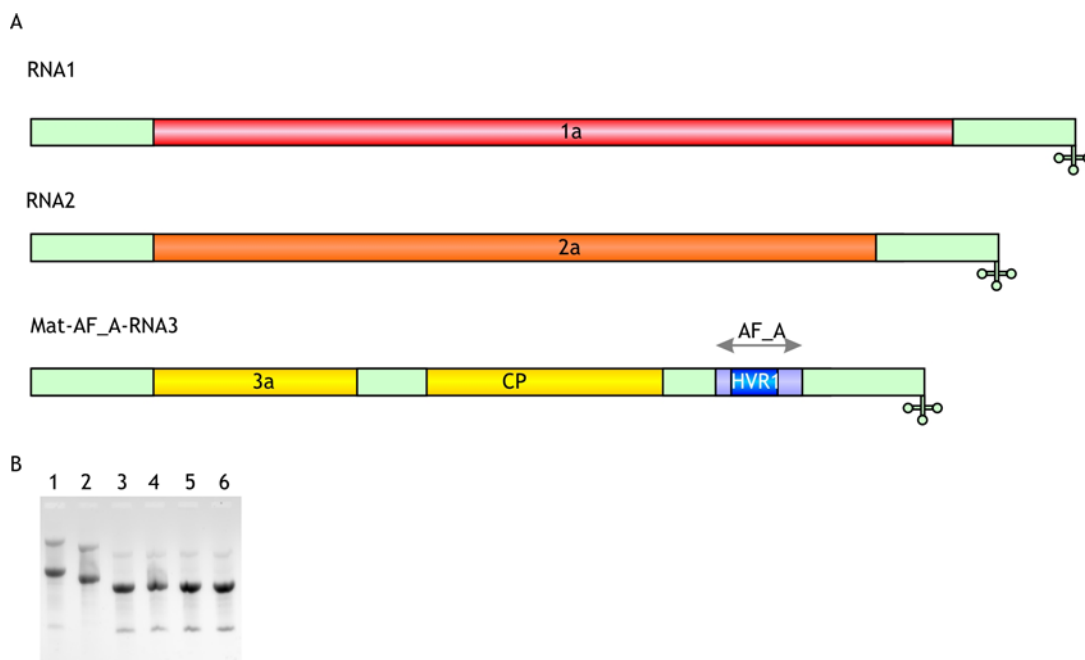
(A) Plazmid pMat-0 zawiera sekwencję kodującą zmodyfikowaną cząsteczkę RNA3 BMV pod kontrolą promotora polimerazy RNA T7. W obrębie jego 3'UTR umieszczono sekwencję kodującą fragment genomu wirusa żółtej chlorowatości wspięgi chińskiej (CCMV), oskrzydloną miejscami klonowania. Kolorem jasnozielonym oznaczono odcinki niekodujące, natomiast żółtym - odcinki kodujące białka 3a i CP BMV. Liniami przerywanymi zaznaczono miejsca rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne, XbaI, SpeI i MluI. Czerwone strzałki odpowiadają miejscom przyłączenia się starterów RT-1 i RT2. (B) Na bazie plazmidu pMat-0 otrzymano cztery konstrukty, w których rejon pomiędzy miejscami rozpoznawanymi przez SpeI i MluI zastąpiono cząsteczką DNA, odpowiadającą jednemu z czterech AF_A HCV. W wyniku przyjętej procedury klonowania, miejsce SpeI zostało usunięte. (C) Przykładowy obraz rozdziału produktów analizy restrykcyjnej w 1% żelu agarozowym w warunkach natywnych, podczas której identyfikowano plazmidy posiadające wprowadzony insert AF_A. Wskutek cięcia enzymami XbaI i MluI, z plazmidów zawierających żądany insert wyzwalał fragment o długości ok. 300 pz (ścieżki 3, 6, 7), podczas gdy z plazmidów niezawierających insertu, fragment o długości ok. 400 pz (ścieżki 2, 4, 5, 8, 9). Ścieżka 1 - wzorzec mas [III.1.12.1].

Produkt ligacji wykorzystano do transformacji komórek *E. coli* DH5 α [III.2.18.2]. Po transformacji bakterie hodowano na stałej pożywce, zawierającej ampicylinę [III.1.10.1]. W rezultacie, przeżywały tylko te komórki, które posiadały plazmid. Uzyskane kolonie wykorzystano do przygotowania kultur bakteryjnych w płynnej pożywce LB, zawierającej ampicylinę [III.1.10.3], z których następnie izolowano plazmidy [III.2.9]. Plazmidy posiadające wprowadzony insert identyfikowano na drodze cięcia restrykcyjnego z użyciem enzymów XbaI i MluI [III.2.8.1] i analizy jego produktów metodą elektroforezy w żelach agarozowych [III.2.6]. Miejsce rozpoznawane przez endonukleazę XbaI znajdowało się w plazmidzie, ok. 60 par zasad powyżej właściwego miejsca klonowania. W rezultacie, wskutek cięcia plazmidów zawierających żądany insert, wyzwalał się fragment o długości ok. 300 par zasad. Pozwoliło to na odróżnienie właściwych klonów od plazmidów pMat-0, do których podczas ligacji został ponownie włączony wycięty wcześniej odcinek [rysunek IV.14C]. Otrzymane w ten sposób cztery plazmidy: pMat-AF_A1, pMat-AF_A4, pMat-AF_A8 i pMat-AF_A10 namnożono w średniej skali [III.2.10] i poddano sekwencjonowaniu [III.2.11] z użyciem startera RT-2 [III.1.4].

IV.2.1.2 Otrzymywanie zmodyfikowanych cząsteczek RNA3 BMV

Aby wywołać infekcję BMV, konieczne jest wprowadzenie do rośliny wszystkich trzech genomowych RNA wirusa. Każdy z nich musi posiadać na końcu 5' tzw. strukturę kapu. W celu zbadania wpływu struktury rejonu AF_A HCV na dokładność jego powielania przez polimerazę wirusową, niezbędne było uzyskanie cząsteczek RNA1 i RNA2 typu dzikiego, jak również czterech rodzajów RNA3, z których każdy zawierał jeden z wariantów AF_A [rysunek IV.15A]. Cząsteczki te otrzymano na drodze transkrypcji *in vitro*, z wykorzystaniem zestawu mMACHINE[®] T7 Kit [III.2.30]. W jego skład wchodzi analog struktury kapu, który włączany jest jako pierwszy nukleotyd do nowo syntetyzowanej nici RNA. Matrycami w niezależnych reakcjach były plazmidy: (i) pB1TP3, kodujący RNA1; (ii) pB1TP5, kodujący RNA2 oraz (iii) pMat-AF_A1, pMat-AF_A4, pMat-AF_A8 lub pMat-AF_A10, kodujące cztery rodzaje zmodyfikowanych RNA3. We wszystkich tych plazmidach sekwencje kodujące genomowe RNA BMV zostały wprowadzone pod kontrolę promotora polimerazy RNA T7. Sześć reakcji transkrypcji prowadzono równolegle, a następnie ich produkty analizowano metodą elektroforezy w żelu

agarozowym [III.2.6]. Przykładowy rezultat rozdziału produktów transkrypcji przedstawiono na rysunku [rysunek IV.15B].



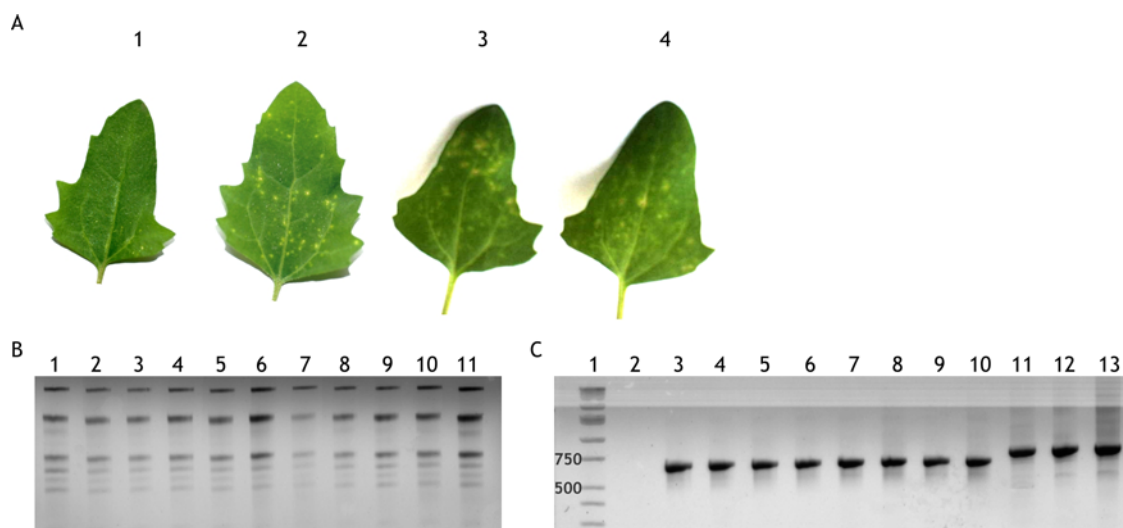
Rysunek IV.15. Mutanty BMV wykorzystane do inokulacji komosy chińskiej.

(A) Schematyczne przedstawienie dwóch genomowych cząsteczek RNA BMV typu dziękiego (RNA1 i RNA2) oraz zmodyfikowanej cząsteczki RNA3, otrzymanej na bazie plazmidu pMat-AF_A. Kolorem jasnozielonym oznaczono odcinki niekodujące, natomiast czerwonym, pomarańczowym i żółtym odcinki kodujące białka BMV: 1a, 2a, 3a i CP. Końce 3' wszystkich trzech cząsteczek przyjmują strukturę przypominającą tRNA. (B) Przykładowy rezultat rozdziału produktów transkrypcji *in vitro* w 1% żelu agarozowym, w warunkach natywnych. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - RNA1; 2 - RNA2; 3 - Mat-AF_A1-RNA3; 4 - Mat-AF_A4-RNA3; 5 - Mat-AF_A8-RNA3; 6 - Mat-AF_A10-RNA3.

IV.2.1.3 Badanie zmienności rejonu AF_A w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego

Uzyskanymi na drodze transkrypcji *in vitro* genomowymi cząsteczkami RNA BMV inokulowano liście komosy chińskiej [III.2.31]. W tym celu przygotowane zostały mieszaniny, z których każda zawierała RNA1, RNA2 i jeden z czterech rodzajów Mat-AF_A-RNA3. Dodatkowo, sporządzono dwie kontrole: (i) mieszaninę, w której zamiast Mat-AF_A-RNA3 obecny był RNA otrzymany na bazie plazmidu pMat-0 oraz (ii) jednokrotnie stężony bufor do inokulacji [III.1.9.14], niezawierający RNA. Następnie przeprowadzono mechaniczną inokulację liści komosy chińskiej, przy czym każdą z sześciu mieszanin wprowadzono do oddzielnej rośliny. W roślinie genomowe cząsteczki RNA, posiadające na końcach 5' strukturę kapu, wykorzystywane są bezpośrednio jako matryce do translacji, w wyniku której powstają białka wirusowe. W ten sposób rozwija się infekcja, której objawem są charakterystyczne plamki nekrotyczne, pojawiające się na inokulowanych liściach. W każdej z plamek infekcja

przebiega niezależnie, ponieważ nekroza jest reakcją obronną, zapobiegającą rozprzestrzenianiu się wirusa w roślinie. Zgodnie z oczekiwaniami, powstanie plamek zaobserwowano tylko na tych liściach, do których wprowadzono wirusowe RNA [rysunek IV.16A]. Po upływie ok. tygodnia od inokulacji, poszczególne plamki zostały wycięte, a zawarty w nich RNA wyizolowany [III.2.32] i poddany analizie metodą rozdzielania elektroforetycznego w żelach agarozowych, w warunkach natywnych [III.2.6; rysunek IV.16B].



Rysunek IV.16. Badanie zmienności AF_A w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego.

(A) Przykładowe liście komosy chińskiej zebrane po upływie ok. tygodnia od inokulacji. Na drodze mechanicznej inokulacji do liści wprowadzono: 1 - jednokrotnie stężony bufor inokulacyjny (liść kontrolny); 2 - mieszaninę zawierającą RNA1, RNA2 i Mat-0-RNA3 (liść kontrolny); 3 i 4 - mieszaninę zawierającą RNA1, RNA2 i Mat-AF_A-RNA3. Na liściach, do których wprowadzono cząsteczki RNA BMV zaobserwowano powstawanie plamek nekrotycznych, będących symptomem infekcji. (B) Przykładowy rezultat rozdzielania kwasów nukleinowych, wyizolowanych z liści komosy chińskiej, w 1% żelu agarozowym, w warunkach natywnych. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono kwasy nukleinowe wyizolowane z: 1 - fragmentu liścia nieinokulowanego; 2-9 - poszczególnych plamek nekrotycznych, wyciętych z liści inokulowanych mieszaniną RNA1, RNA2 i Mat-AF_A-RNA3; 10-11 - poszczególnych plamek nekrotycznych, wyciętych z liści inokulowanych mieszaniną RNA1, RNA2 i Mat-0-RNA3. (C) Przykładowy rezultat rozdzielania produktów reakcji RT-PCR, przeprowadzonej w celu stwierdzenia obecności wirusowego RNA w plamkach nekrotycznych. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas [III.1.12.1]; 2 - produkty otrzymane na bazie RNA izolowanego z fragmentu nieinokulowanego liścia (kontrola negatywna); 3-10 - produkty otrzymane na bazie RNA izolowanego z plamek nekrotycznych, wyciętych z liści inokulowanych mieszaniną RNA1, RNA2 i Mat-AF_A-RNA3; 11-12 - produkty otrzymane na bazie RNA izolowanego z plamek nekrotycznych, wyciętych z liści inokulowanych mieszaniną RNA1, RNA2 i Mat-0-RNA3; 13 - produkty otrzymane na bazie cząsteczki Mat-0-RNA3 (kontrola pozytywna).

Następnie uzyskane kwasy nukleinowe wykorzystano do przeprowadzenia reakcji RT-PCR [III.2.2] w celu stwierdzenia obecności RNA BMV w plamkach nekrotycznych. Dodatkowo, wykonano reakcje kontrolne. W jednej z nich matrycą był całkowity RNA wyizolowany z fragmentu nieinokulowanego liścia (kontrola negatywna), natomiast w drugiej, cząsteczka Mat-0-RNA3, otrzymana uprzednio metodą transkrypcji *in vitro* (kontrola pozytywna) [rysunek IV.16C]. Dzięki obecności

w mieszaninie reakcyjnej startera RT-1 [III.1.4], komplementarnego do końca 3' cząsteczek genomowych BMV, uzyskano odpowiednie nici cDNA. W kolejnym etapie posłużyła ona jako matryca w reakcji PCR, z wykorzystaniem starterów: RT-1, który wprowadzał miejsce rozpoznawane przez endonukleazę EcoRI, i RT-2 [III.1.4]. Drugi starter był specyficzny wobec RNA3 BMV. W wyniku reakcji otrzymano zatem cząsteczki o długości ponad 600 par zasad, odpowiadające zarówno odcinkowi AF_A HCV, jak i fragmentowi RNA3 BMV [rysunek IV.14B]. W obrębie namnożonego rejonu było także zawarte miejsce rozpoznawane przez enzym XbaI. Amplifikowane cząsteczki (pochodzące z jednej losowo wybranej plamki nekrotycznej dla każdego z czterech wariantów) poddano cięciu enzymami XbaI i EcoRI [III.2.8.1], a następnie ligacji [III.2.12] z analogicznie przygotowanym plazmidem pUC18 [III.1.3]. Produktem ligacji transformowano *E. coli* DH5 α [III.2.18.2]. Powtórnie, z uzyskanych na stałej pożywce, zawierającej ampicylinę [III.1.10.1] kolonii przygotowano płynne kultury, z których następnie izolowano plazmidy [III.2.9]. Właściwe klony identyfikowano na drodze cięcia restrykcyjnego (XbaI i EcoRI) i analizy jego produktów metodą elektroforezy w żelach agarozowych [III.2.6]. W rezultacie otrzymano i przesekwencjonowano za pomocą startera F-pUC19 po 20 niezależnych klonów dla AF_A1, AF_A4, AF_A8 oraz AF_A10.

Porównanie uzyskanych sekwencji wykazało, że poziom zmienności wszystkich czterech rodzajów rejonu AF_A HCV w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego był podobny i zarazem bardzo niski [tabela IV.3].

Tabela IV.3. Poziom polimorfizmu rejonu AF_A czterech wybranych quasi-gatunków HCV w organizmie pacjenta i w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego

Quasi-gatunek HCV (wariant AF_A)	Średnia odległość Hamminga (sekwencje nukleotydowe)	
	W organizmie pacjenta (T0)	W układzie BMV-komosa chińska
P1-01 (1)	1,98	0,11
P1-04 (4)	6,96	0,42
P1-08 (8)	15,95	0,31
P1-10 (10)	11,77	0,11

Sekwencjonowane cząsteczki zawierały nie tylko odcinek AF_A lecz także fragment RNA3 BMV. Istniała więc możliwość porównania liczby i typu mutacji występujących w genomie BMV i sekwencji AF_A, pochodzącej z HCV [tabela IV.4]. Zdecydowanie najczęstszą formą substytucji były tranzycje U→C. Na dalszych miejscach, w kolejności zgodnej z częstością występowania, znalazły się: A→G, G→A,

C→U oraz C→G i G→U. Łącznie, dla wszystkich czterech mutantów, najwięcej zmian wprowadzonych zostało w ramach fragmentu RNA3 BMV, znajdującego się powyżej miejsca wprowadzenia AF_A (RNA3-F5'; 0,084 substytucji/nukleotydy). Następne w kolejności były: HVR1 (0,061), RNA3 poniżej miejsca wprowadzenia insertu (RNA3-F3'; 0,06) i AF_A poza HVR1 (0,026). Analizując liczbę mutacji w obrębie czterech wariantów AF_A, nie zaobserwowano istotnych różnic. W odniesieniu do ogólnej liczby zmian w całym sekwencjonowanym odcinku, najmniej substytucji wystąpiło w przypadku AF_A1, najwięcej zaś w przypadku AF_A4. Ten ostatni był jednocześnie jedynym, dla którego liczba mutacji w ramach AF_A była wyższa, aniżeli w obrębie fragmentów RNA3.

Tabela IV.4. Substytucje nukleotydowe zidentyfikowane w obrębie rejonu AF_A i oskrzydających go fragmentów genomu BMV podczas infekcji w roślinie

Wariant AF_A	Liczba* i rodzaj substytucji	Umiejscowienie mutacji i długość analizowanego fragmentu	
1	1; U→C	RNA3-F5' BMV	83 nt
	1; U→C	AF_A HCV (w obrębie HVR1)	81nt
	5; U→C 1; A→G	RNA3-F3' BMV	216 nt
4	1; U→C	RNA3-F5' BMV	83 nt
	1; U→C 1; C→U	AF_A HCV (w obrębie HVR1)	81nt
	1; U→C 1; C→U	AF_A HCV (poza HVR1)	150 nt
	1; A→G	RNA3-F3' BMV	216 nt
	3; G→A 1; A→G	RNA3-F5' BMV	83 nt
8	1; C→G 1; U→C	AF_A HCV (w obrębie HVR1)	81nt
	1; U→C	AF_A HCV (poza HVR1)	150 nt
	2; U→C 2; A→G	RNA3-F3' BMV	216 nt
	1; G→A 1; U→C	RNA3-F5' BMV AF_A HCV (poza HVR1)	83 nt 150 nt
10	1; G→A 1; U→C	RNA3-F5' BMV AF_A HCV (poza HVR1)	83 nt 150 nt
	1; G→U 1; A→G	RNA3-F3' BMV	216 nt

* Sumarycznie w obrębie 20 niezależnych klonów.

Podsumowanie. Otrzymano serię mutantów BMV, umożliwiających badanie wpływu struktury RNA na zmienność wybranego rejonu genomu HCV w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego. W tym celu wybrano cztery warianty AF_A HCV, reprezentujące populacje wirusowe, znacznie różniące się poziomem polimorfizmu podczas infekcji *in vivo*. Cząsteczki dsDNA, odpowiadające fragmentom AF_A

wprowadzono do plazmidu, kodującego cząsteczkę RNA3 genomu BMV. Otrzymano wszystkie trzy RNA genomowe tego patogenu (RNA1, RNA2 oraz zmodyfikowany RNA3) i inokulowano nimi liście komosy chińskiej. Podczas infekcji wprowadzone do RNA3 warianty AF_A był kopiowane przez polimerazę wirusową w roślinie. Analiza sekwencji potomnych cząsteczek RNA3 BMV (w obrębie czterech wariantów AF_A) wykazała, że liczba mutacji nie była w znaczący sposób uzależniona od sekwencji AF_A i nie korelowała z poziomem polimorfizmu odpowiedniej populacji HCV w organizmie pacjenta. Dodatkowo stwierdzono, że z wyjątkiem jednego wariantu, liczba substytucji wprowadzanych w obrębie AF_A była niższa niż w przypadku oskrzydlających go fragmentów RNA3 BMV. Uzyskane dane sugerują, że struktura RNA nie jest znaczącym czynnikiem wpływającym na poziom polimorfizmu wybranego rejonu genomu HCV.

IV.2.2 Wpływ ciśnienia selekcyjnego na kształt populacji wirusowej

Aby określić wpływ ciśnienia selekcyjnego na zmienność wybranego rejonu genomu HCV, przeprowadzono analizę mutacji synonimicznych i niesynonimicznych, występujących w poszczególnych kodonach HVR1. W tym celu sekwencje nukleotydowe wszystkich uzyskanych klonów HVR1 (w sumie 904 klony pochodzące z T0 i T2) podzielono na 6 grup: NR-T0, NR-T2, TR-T0, TR-T2, SR-T0, SR-T2. Analizę przeprowadzono korzystając z metody IFEL (ang. *internal fixed effects likelihood*), dostępnej pod adresem www.datamonkey.org (Pond i Frost, 2005; Pond *et al.*, 2006). Podejście to jest przeznaczone między innymi do analizy genomów wirusowych izolowanych z próbek pochodzących od różnych gospodarzy. Metoda ta pozwala ustalić, jakiego typu presja selekcyjna działa na poszczególne kodony.

	10	20	
	dN/dS (HVR1)
NR-T0	etyvsGgsagravsglanifapGakQd		0,672
NR-T2	etyvsgGsagravsglanifapgakQd		0,707
TR-T0	ethvtGgsaahataglaglfspGakQn		0,993
TR-T2	ethVtGgsaahataglaglfspgakQn		0,935
SR-T0	eThvtggsagratsglaslftpgakQn		1,792
SR-T2	ethvsGgsagrtvsglaslftspgakqn		1,614

Rysunek IV.17. Presja selekcyjna działająca na rejon HVR1.

Na rysunku przedstawiono sekwencje zgodne dla każdej z trzech analizowanych grup sekwencji rejonu HVR1. Kolorami oznaczono reszty aminokwasowe których kodony znajdują się pod wpływem selekcji pozytywnej (czerwony) bądź negatywnej (niebieski). Miejsca te zidentyfikowano korzystając z metody IFEL, dostępnej pod adresem www.datamonkey.org, używając modelu substytucji nukleotydowych HKY85, dla poziomu istotności $p = 0,1$. Po prawej stronie podano wartość dN/dS dla badanych grup sekwencji, określającą charakter presji selekcyjnej w obrębie całego rejonu HVR1. Wyznaczono ją korzystając z metody SLAC, używając modelu substytucji nukleotydowych HKY85, dla poziomu istotności $p = 0,1$. Presja pozytywna (czerwony) występuje gdy $dN/dS > 1$, natomiast negatywna (niebieski), gdy $dN/dS < 1$.

Zaobserwowano istotną różnicę w charakterze presji selekcyjnej działającej na populację HCV u pacjentów o różnej odpowiedzi na terapię. W przypadku sekwencji NR-T0 stwierdzono, że 2 kodony podlegają selekcji pozytywnej, natomiast 4 – selekcji negatywnej [rysunek IV.17]. Podczas gdy selekcja pozytywna faworyzuje powstawanie mutacji niesynonimicznych, negatywna prowadzi do zachowania pierwotnej sekwencji, ponieważ zachodzące zmiany są niekorzystne w kontekście osiągniętego poziomu przystosowania. Podobna sytuacja miała miejsce w przypadku sekwencji TR-T0. W przeciwieństwie do nich, w sekwencjach SR-T0 zidentyfikowano 2 kodony podlegające selekcji negatywnej i aż 10 znajdujących się pod wpływem selekcji pozytywnej. Wyznaczono również globalny charakter presji selekcyjnej, w obrębie całego rejonu HVR1 [rysunek IV.17]. Ponieważ metoda IFEL nie oferuje takiej możliwości, posłużono się metodą SLAC (ang. *single likelihood ancestor counting*). Stwierdzono, że w przypadku NR-T0 i TR-T0 występuje selekcja negatywna, natomiast w SR-T0 – pozytywna. Po dwóch tygodniach leczenia zanotowano wzrost liczby miejsc podlegających selekcji we wszystkich analizowanych grupach. W grupie NR-T2 utrzymała się przewaga kodonów znajdujących się pod wpływem selekcji negatywnej, w TR-T2 stwierdzono po 5 miejsc ulegających obu rodzajom selekcji. W przypadku SR-T2 liczba miejsc pod wpływem selekcji pozytywnej nieznacznie zmalała, przy jednoczesnym wzroście liczby kodonów ulegających selekcji negatywnej. Nadal jednak kodony, na które działała selekcja pozytywna, znajdowały się w znacznej przewadze. Globalny charakter presji selekcyjnej pozostał bez zmian. Poczynione obserwacje sugerują, że ciśnienie selekcyjne, choć może mieć różny charakter (presja pozytywna w grupie SR, negatywna w dwóch pozostałych) jest istotnym czynnikiem, kształtującym poziom zmienności badanego fragmentu genomu HCV.

IV.2.3 Wpływ struktury i funkcji białka E2 na kształt populacji wirusowej

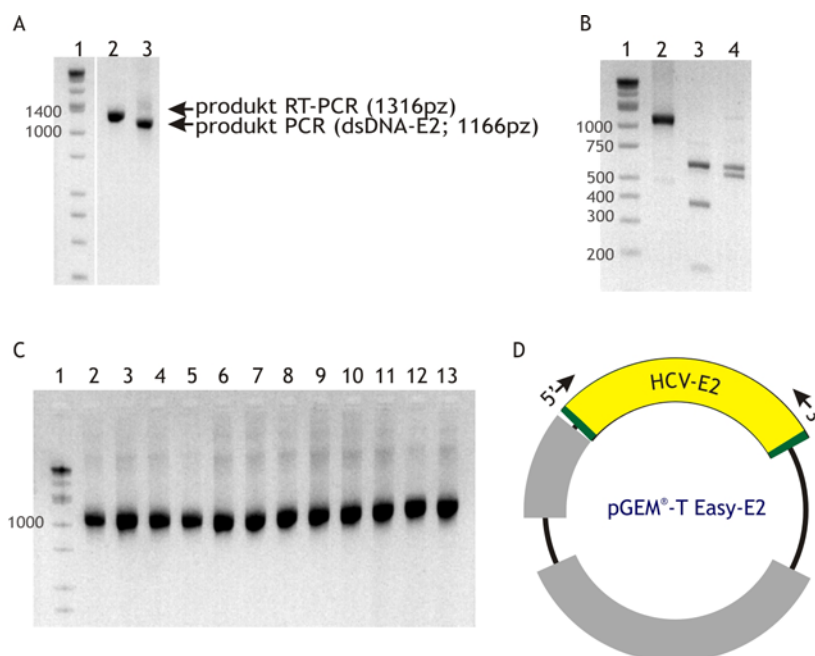
W celu ustalenia, w jakim stopniu obserwowana zmienność bądź zachowawczość rejonu HVR1 uwarunkowana jest funkcjonalnością fragmentu kodowanego przezeń białka, zaplanowano otrzymanie różnych wariantów E2 i zbadanie ich wybranych właściwości. Aby tego dokonać, opracowano metodę klonowania genu E2. Następnie przeprowadzono jego ekspresję w układzie bakteryjnym i roślinnym. Biorąc pod uwagę dane dotyczące tych systemów, spodziewano się otrzymać zarówno białka niemodyfikowane potranslacyjnie (komórki bakteryjne), jak i glikozylowane (układ roślinny). W kolejnym etapie badań scharakteryzowano uzyskane warianty E2.

Porównano między innymi ich zdolność do wiązania przeciwciał obecnych w surowicy pacjentów oraz receptorów CD81 występujących na powierzchni ludzkich limfocytów B.

IV.2.3.1 Amplifikacja i klonowanie genu E2 HCV

Pierwszy etap badań polegał na opracowaniu strategii namnażania i klonowania genu E2. W tym celu posłużono się genomowymi cząsteczkami wyizolowanymi uprzednio na potrzeby wykonania analizy quasi-gatunków HCV [IV.1.2]. Reakcje RT-PCR [III.2.1] prowadzono korzystając z zestawu OneStep RT-PCR Kit, analogicznie jak podczas wcześniejszego namnażania wybranych rejonów genomu HCV. Tym razem jednak w mieszaninie reakcyjnej obecne były startery HVR-Z5 i E2-Z3 [III.1.4], umożliwiające przepisanie na cDNA oraz amplifikację całego genu E2, wraz z oskrzydłającymi go sekwencjami. W rezultacie otrzymano dsDNA o długości 1316 par zasad [rysunek IV.18A]. Produkt RT-PCR rozcieńczano 50-krotnie i wykorzystywano do kolejnej reakcji PCR [III.2.4]. Stosowano w niej startery E2-W5 i E2-W3 [III.1.4], specyficzne wobec sekwencji zlokalizowanej wewnątrz produktu RT-PCR. Przyjęte postępowanie umożliwiło bardzo wydajną i specyficzną amplifikację 1166 nukleotydowego fragmentu genomu wirusowego, obejmującego gen E2 wraz z krótkimi rejonami oskrzydłającymi [rysunek IV.18A]. Miejsca przyłączenia starterów zlokalizowane zostały poza genem E2, dzięki czemu zachowana była sekwencja różnych wariantów E2, obecnych w organizmie pacjenta. Kolejnym zaplanowanym etapem było wprowadzenie uzyskanych cząsteczek dsDNA do plazmidu pUC19, w celu uzyskania pojedynczych klonów, które następnie były sekwencjonowane. Stosownie do tego, użyte w reakcji PCR startery E2-W5 i E2-W3 wprowadzały miejsca rozpoznawane przez endonukleazy restrykcyjne, odpowiednio, EcoRI i PstI. Miejsca te wybrano, jako rzadko występujące w sekwencjach genu E2, zdeponowanych w internetowej bazie danych Los Alamos HCV Sequence Database (<http://hcv.lanl.gov/content/hcv-index>). Niestety okazało się, że w wyniku cięcia uzyskanych dsDNA za pomocą EcoRI i PstI [III.2.8.1], otrzymano produkty o różnych długościach [III.2.6, rysunek IV.18B]. Uzyskane rezultaty świadczyły, że dsDNA odpowiadające genowi E2 (dsDNA-E2), obecnemu w różnych populacjach HCV, charakteryzują się znaczną zmiennością i zawierają jedno bądź kilka miejsc rozpoznawanych przez wybrane enzymy restrykcyjne, co utrudniłoby ich sklonowanie. Postanowiono zatem zastosować alternatywną strategię, umożliwiającą bezpośrednie

klonowanie produktów PCR, niezależnie od obecności konkretnych miejsc rozpoznawanych przez enzymy restrykcyjne. W tym celu posłużono się plazmidem pGEM[®]-T Easy [III.1.3]. Plazmid ten dostarczany jest w formie liniowej, posiadającej na obu końcach pojedyncze wystające (niesparowane) reszty tymidynowe. Dwuniciowy DNA-E2 uzyskany został przy użyciu polimerazy DNA Taq, wykazującej zdolność do dodawania na końcach 3' dodatkowych (niekodowanych przez cząsteczkę matrycową) wystających reszt adenozynowych. Dzięki tej właściwości enzymu, możliwe było łatwe wprowadzenie dsDNA-E2 do plazmidu pGEM[®]-T Easy [III.2.13]. Podobnie jak pUC18 i pUC19, posiada on gen kodujący enzym hydrolizujący ampicylinę oraz miejsce klonowania zlokalizowane wewnątrz genu *lacZ*, co pozwala na identyfikację właściwych kolonii bakteryjnych metodą α -komplementacji.



Rysunek IV. 18. Amplifikacja i klonowanie genu E2 HCV.

(A) Przykładowy wynik rozdziatu w 1% żelu agarozowym produktów reakcji RT-PCR (ścieżka 2) oraz PCR (ścieżka 3), w których amplifikowano gen E2 wraz z otaczającymi go krótkimi fragmentami genów E1 i p7. Ścieżka 1 - wzorzec mas [III.1.12.1]. (B) Przykładowy wynik rozdziatu w 1% żelu agarozowym produktów analizy restrykcyjnej dsDNA-E2, pochodzącego z różnych populacji wirusowych. Produkty dsDNA-E2 poddano cięciu restrykcyjnemu EcoRI i PstI. Zidentyfikowano trzy profile restrykcyjne badanych wariantów, uwidocznione w ścieżkach 2-4. Ścieżka 1 - wzorzec mas [III.1.12.1]. (C) Przykładowy obraz rozdziatu w 1% żelu agarozowym produktów reakcji PCR, przeprowadzonej w celu identyfikacji plazmidów, zawierających żądany insert. W przedstawionym przypadku, insert obecny był we wszystkich wyizolowanych plazmidach, co stwierdzono na podstawie obecności dsDNA o długości 1166 par zasad w ścieżkach 2-13. Ścieżka 1 - wzorzec mas [III.1.12.1]. (D) Schematyczne przedstawienie plazmidu pGEM[®]-T Easy z wklonowanym genem E2 (kolor żółty) i krótkimi fragmentami genów go otaczających (kolor zielony). Tak przygotowany konstrukt służył jako matryca wyjściowa w reakcjach PCR (strzałkami oznaczono miejsca przyłączania stosowanych starterów), mających na celu przygotowanie genu E2 do klonowania do wektorów ekspresyjnych.

Produktem ligacji transformowano komórki kompetentne *E. coli* DH5 α [III.2.18.2]. Pojedyncze kolonie, otrzymane na szalkach ze stałą pożywką selekcyjną

[III.1.10.1], wykorzystano do przygotowania płynnych kultur bakteryjnych, z których następnie izolowano plazmidy [III.2.9]. Ze względu na polimorfizm genu E2 i wynikające z niego problemy w interpretacji wyników analizy restrykcyjnej, plazmidy posiadające włączony insert identyfikowano metodą PCR [III.2.4]. Również w tym przypadku do mieszaniny reakcyjnej dodano startery E2-W5 i E2-W3. Matrycami w przeprowadzonych reakcjach były wyizolowane plazmidy. Ponieważ startery były specyficzne wobec insertu, spodziewano się uzyskać produkt – dsDNA o długości 1166 par zasad – wyłącznie wówczas, gdy użyty jako matryca plazmid zawierał właściwy insert [rysunek IV.18C]. Plazmidy, dla których uzyskano pozytywny wynik PCR, oczyszczono [III.2.7] i poddano sekwencjonowaniu za pomocą starterów T7 i R-pGEM [III.2.11, III.1.4]. Spośród otrzymanych klonów wybrano te, które zawierały gen E2, pozbawiony mutacji wprowadzających przedwcześnie kodon stop.

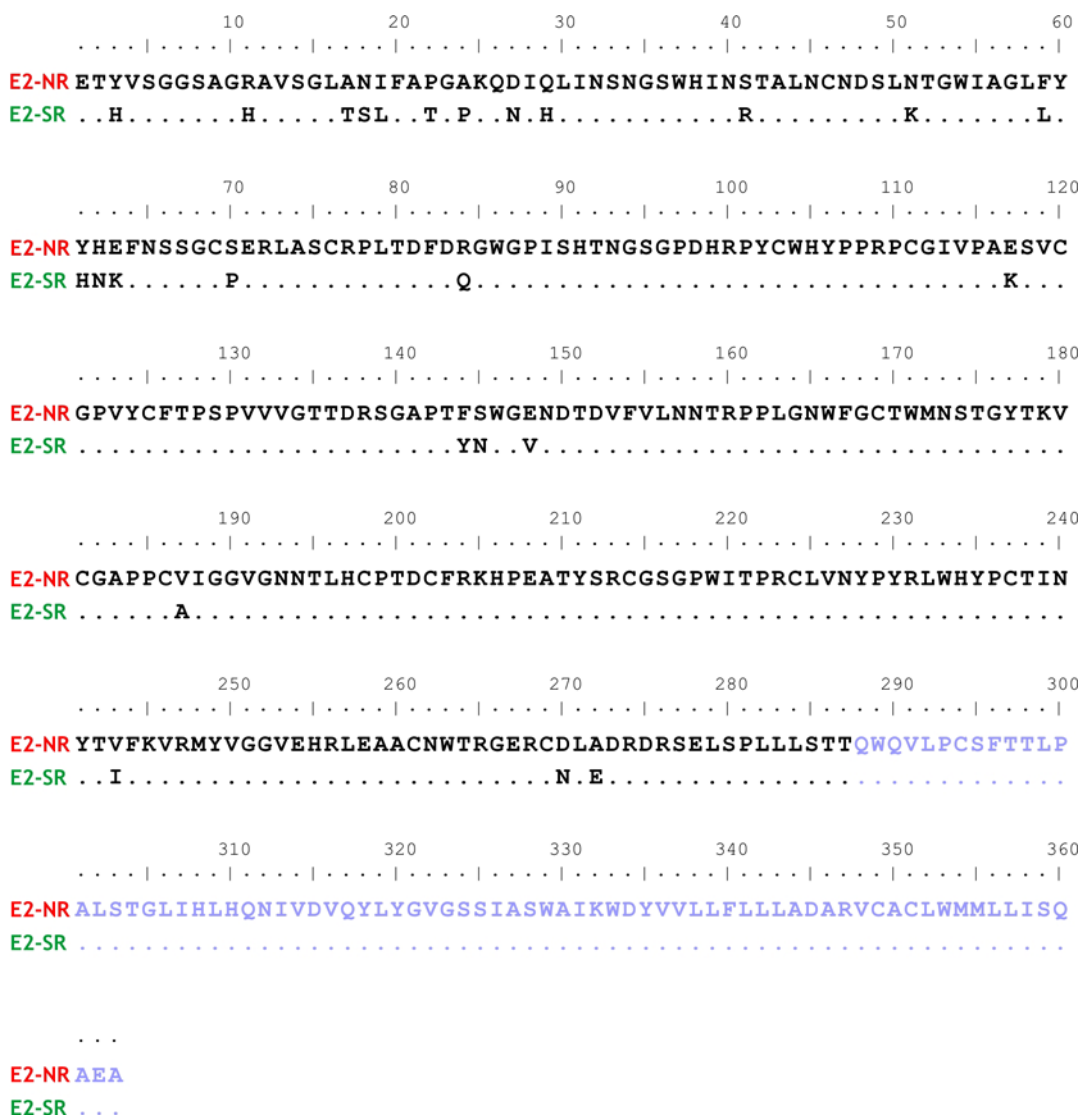
Podsumowanie. Opracowano strategię amplifikacji i klonowania genu E2 HCV, w której wykorzystano materiał genetyczny wirusa, izolowany z próbek krwi pobranej od pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Zaprojektowano startery, umożliwiające efektywne i specyficzne powielenie genu E2 wraz z otaczającymi go fragmentami genów E1 i p7. W wyniku przeprowadzonego postępowania sklonowano kilka wariantów genu E2, reprezentujących populacje wirusowe, pochodzące zarówno od osób, które nie zareagowały na leczenie, jak i pacjentów przejawiających trwałą odpowiedź. Uzyskane klony E2 w plazmidzie pGEM[®]-T Easy służyły jako matryce w późniejszych próbach wprowadzenia genu E2 do wektorów ekspresyjnych.

IV.2.3.2. Ekspresja genu E2 w komórkach bakterii *Escherichia coli*

Mając do dyspozycji serię klonów E2, dokonano wyboru wariantów, które miały być poddane ekspresji. Z wcześniejszych analiz filogenetycznych dokonanych na podstawie rejonu HVR1 wynikało, że warianty pochodzące od osób z trwałą odpowiedzią na terapię znacznie różniły się, zarówno w obrębie jednego quasi-gatunku, jak i pomiędzy różnymi populacjami [IV.1.3, rysunek IV.10]. W przeciwieństwie do nich, populacje obecne u pacjentów z brakiem odpowiedzi, składały się z bardzo podobnych lub identycznych wariantów. Postanowiono zatem otrzymać dwa warianty białka E2 – jeden reprezentowałby populację HCV obecną u pacjenta niewyleczonego (NR), drugi – populację obecną u osoby z trwałą odpowiedzią na leczenie (SR). Zdecydowano zatem, by wariant E2-SR pochodził od pacjenta P2-02. Wariant E2-NR pochodził natomiast od pacjenta P2-05, i jednocześnie reprezentował grupę

filogenetyczną numer 1, skupiającą warianty HVR1 obecne u kilkorga dzieci [rysunek IV.10]. Na podkreślenie zasługuje fakt, iż w momencie wyboru wariantów genu E2 do ekspresji, dysponowano jedynie ich sekwencjami oraz wynikami przeprowadzonej analizy bioinformatycznej. W tym czasie terapia pacjentów była bowiem w toku i nie posiadano żadnych danych na temat jej przebiegu, ani tym bardziej końcowego rezultatu. Na podstawie posiadanych przesłanek trafnie przewidziano zatem prawdopodobny wynik leczenia.

Uzyskane wcześniej sekwencje nukleotydowe wybranych klonów E2 poddano translacji *in silico*, otrzymując sekwencje aminokwasowe. Jak wykazało ich porównanie, warianty białka różniły się 25 resztami aminokwasowymi, z czego 8 przypadło na rejon HVR1. Aby zwiększyć prawdopodobieństwo obecności E2 we frakcji białek rozpuszczalnych, postanowiono otrzymać jego skróconą formę, (liczącą 287 reszt aminokwasowych), pozbawioną domeny transbłonowej i poprzedzającego ją rejonu hydrofobowego [rysunek IV.19].

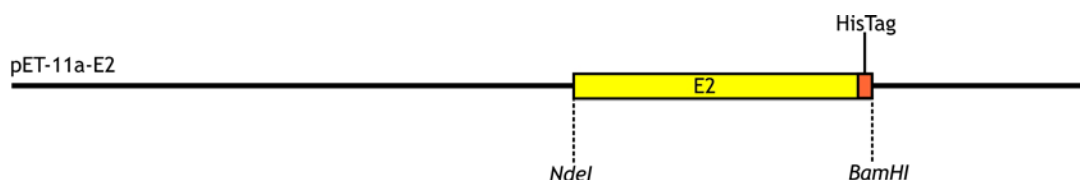


Rysunek IV.19. Porównanie sekwencji aminokwasowych dwóch wybranych wariantów E2. Sekwencje nukleotydowe dwóch wariantów E2 poddano translacji *in silico*, otrzymując sekwencje aminokwasowe. Wariant E2-NR reprezentował populacje obecne u osób niewyleczonych, natomiast E2-SR - obecne u pacjentów z trwałą odpowiedzią na terapię. Kropkami w sekwencji SR oznaczono reszty aminokwasowe identyczne w stosunku do sekwencji NR. Kolorem jasnoniebieskim oznaczono usuniętą domenę transbłonową, wraz z poprzedzającym ją rejonem hydrofobowym.

IV.2.3.2.1 Konstrukcja wektorów ekspresyjnych pET-11a kodujących gen E2

W celu uzyskania ekspresji genu E2 w komórkach bakteryjnych, posłużono się plazmidem pET-11a [III.1.3]. W plazmidzie tym miejsce klonowania zlokalizowane jest poniżej promotora T7, a zarazem w odpowiedniej odległości poniżej miejsca wiązania rybosomu. Ulokowanie genu E2 we właściwej ramce odczytu, zapewniającej prawidłowy przebieg translacji, osiągnięto wykorzystując do klonowania miejsce rozpoznawane przez endonukleazę NdeI i zawierającego kodon start. Plazmid pET-11a posiada ponadto gen kodujący enzym rozkładający ampicylinę (β -laktamazę), co umożliwia selekcję transformowanych nim komórek bakteryjnych.

Aby uzyskać sekwencję dsDNA, odpowiadającą skróconemu genowi E2, przeprowadzono reakcje PCR [III.2.5], w których jako matryce wykorzystano otrzymane uprzednio plazmidy pGEM[®]-T Easy-NR i pGEM[®]-T Easy-SR, kodujące dwa warianty genu E2. W reakcjach tych zastosowano następujące startery: F-05Nde i R-6-05 dla E2-NR, oraz F-02Nde i R-02-Bam6 dla E2-SR [III.1.4]. W obu przypadkach, startery wprowadzały sekwencję rozpoznawaną przez enzym NdeI na końcu 5' oraz sekwencję kodującą znacznik histydynowy (sześć reszt histydynowych) wraz z następującym po nim kodonem stop i sekwencją rozpoznawaną przez enzym BamHI na końcu 3'. Jak wspomniano uprzednio, w wyniku reakcji powielono odcinek genu, kodujący wybrany fragment E2 (reszty aminokwasowe 1-287). Produkty PCR, jak również plazmid pET-11a, poddano cięciu restykcijnemu enzymem NdeI [III.2.8.2], a następnie, po oczyszczeniu, enzymem BamHI [III.2.8.1]. Uzyskane substraty reakcji ligacji analizowano metodą elektroforezy w żelu agarozowym w warunkach natywnych [III.2.6]. W kolejnym etapie przygotowane plazmidy i inserty poddano ligacji [III.2.12], której produktami transformowano komórki kompetentne *E. coli* DH5 α [III.2.18.2]. Transformowane bakterie hodowano na szalkach ze stałą pożywką LB zawierającą ampicylinę [III.1.10.1] Uzyskane pojedyncze kolonie użyto do przygotowania płynnych kultur, z których izolowano plazmidy [III.2.9]. Prawidłowość procesu klonowania potwierdzono, tnąc wyizolowane plazmidy endorestryktazą EcoRI [III.2.8.1] i analizując uzyskane produkty metodą elektroforezy w żelu agarozowym w warunkach natywnych [III.2.6]. Plazmid pET-11a, podobnie jak wariant E2-SR, zawiera jedno miejsce rozpoznawane przez EcoRI. Wariant E2-NR natomiast posiada dwa miejsca rozpoznawane przez tę endonukleazę. Stosownie do tego, w wyniku cięcia plazmidów pET-11a-SR, z wektora wyzwalał się dsDNA o długości ok. 660 par zasad. W przypadku plazmidów pET-11a-NR, pojawiał się dodatkowy produkt cięcia, o długości ok. 470 par zasad. Plazmidy wyzwalające oczekiwane fragmenty sekwencjonowano przy użyciu starterów pET11a5' i pET11a3' [III.2.11]. Na tej podstawie dokonano wyboru odpowiednich wektorów, pET-11a-SR i pET-11a-NR, które posłużyły do dalszych badań [rysunek IV.20].



Rysunek IV.20. Wektor ekspresyjny pET-11a kodujący gen E2 HCV.

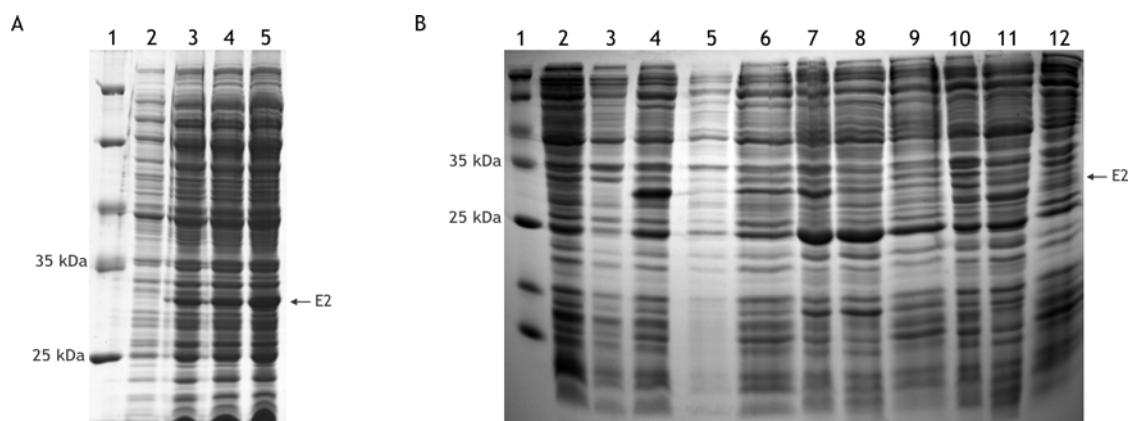
Skrócony gen E2 wprowadzono do plazmidu ekspresyjnego pET-11a pomiędzy miejsca restrykcyjne NdeI i BamHI. Kodon start, zawarty w miejscu rozpoznawanym przez endonukleazę NdeI znajdował się bezpośrednio przed pierwszym kodonem białka E2. Na końcu 3' genu wprowadzono sekwencję kodującą znacznik histydynowy, tzw. His-Tag oraz kodon stop. Postępowanie to przeprowadzono równolegle dla dwóch wariantów genu E2, otrzymując wektory pET-11a-SR i pET-11a-NR.

IV.2.3.2.2 Ekspresja genu E2 w komórkach *E.coli* BL21(DE3)pLysS

Otrzymane wektory ekspresyjne, kodujące oba warianty genu E2, wprowadzono do komórek kompetentnych *E.coli* BL21(DE3)pLysS [III.1.2] na drodze transformacji metodą szoku cieplnego [III.2.18.2]. Wybrany szczep posiada zintegrowany z genomem gen *I* bakteriofaga T7, umieszczony pod kontrolą promotora *lac*. Gen ten koduje polimerazę RNA T7. Aktywacja promotora następuje wskutek dodania do pożywki izopropylotiogalaktozydu (IPTG). Ponadto, szczep ten posiada plazmid pLysS, w którym obecny jest gen lizozymu bakteriofaga T7 oraz enzymu hydrolizującego chloramfenikol. Lizozym powstający w bakteriach pełni dwie funkcje. Po pierwsze, inhibuje bakteriofagową polimerazę i zapobiega transkrypcji z promotora T7 w nieindukowanych komórkach bakteryjnych. Po drugie, odpowiada za indukowaną niską temperaturą lizę ścian komórkowych bakterii, przez co ułatwia proces izolacji białek.

Spośród otrzymanych na szalce kolonii bakteryjnych, transformowanych plazmidem pET-11a-SR lub pET-11a-NR, wybrano jedną i sporządzono płynną kulturę w celu przeprowadzenia ekspresji E2 w skali analitycznej [III.2.22]. Hodowlę bakterii prowadzono do chwili osiągnięcia przez nią gęstości optycznej $OD_{600} = 0,4-0,6$. Wówczas zachodzą najbardziej intensywne podziały komórek (faza wzrostu logarytmicznego), jest to zatem najkorzystniejszy moment by indukować ekspresję heterologicznego genu. Ekspresję E2 indukowano, dodając do pożywki IPTG, co umożliwiło rozpoczęcie w bakteriach biosyntezy polimerazy T7, a następnie transkrypcję i translację genu, znajdującego się pod kontrolą promotora T7. Przed dodaniem IPTG, z niewielkiej ilości hodowli sporządzono stok glicerolowy, który przechowywano w temperaturze -80°C i wykorzystywano w późniejszym czasie, do przygotowywania kultur bakteryjnych z pominięciem etapu transformacji. Przebieg ekspresji monitorowano, pobierając niewielkie porcje hodowli tuż przed indukcją, jak

i po upływie 1, 2 i 3 godzin. Białka rozpuszczano, dodając do komórek bakteryjnych buforu $1 \times$ SB [III.1.9.17.2], a następnie analizowano metodą elektroforezy w 12% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących [III.2.26]. Dodatkowo, pobrano oddzielną porcję komórek i przeprowadzono analizę rozpuszczalności zawartych w nich białek [III.2.23]. Po uwidocznieniu ekstrahowanych białek w żelu, w próbach pobranych po indukcji ekspresji, zaobserwowano obecność wyraźnego prążka, odpowiadającego najprawdopodobniej skróconemu białku E2 (ok. 32 kDa) [rysunek IV.21A]. Przypuszczenie to potwierdzono, wycinając odpowiedni fragment żelu i poddając zawarte w nim białka analizie metodą spektrometrii mas w aparacie MALDI-TOF. Niestety, okazało się, że zdecydowana większość powstałego E2 występowała we frakcji białek nierozpuszczalnych, najprawdopodobniej wskutek gromadzenia się w tzw. ciałkach inkluzyjnych. Ich tworzenie jest często reakcją obronną komórek bakteryjnych na obecność obcego białka. Ponieważ wstępne próby oczyszczenia białka nie powiodły się, postanowiono zoptymalizować warunki prowadzenia hodowli, mając na uwadze zwiększenie zawartości E2 we frakcji białek rozpuszczalnych. W tym celu, po indukcji hodowlę inkubowano w temperaturze 27°C, a nie jak wcześniej 37°C. W takich warunkach dochodzi do zwolnienia metabolizmu bakterii, obejmującego także biosyntezę białek. Wówczas potencjalnie szkodliwe obce białka powstają w mniejszej ilości, dzięki czemu tworzenie ciałek inkluzyjnych jest ograniczone. Z tego samego względu wydłużono czas prowadzenia hodowli do 16 godzin po dodaniu IPTG i ponownie przeprowadzono analizę rozpuszczalności białek [III.2.23]. Prowadzono też równoległe hodowlę przez 16 godzin, w temperaturze 37°C. Otrzymane preparaty białkowe poddano rozdzielaniu w 15% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących [III.2.26; rysunek IV.21B]. Zgodnie z oczekiwaniami, skład frakcji białek rozpuszczalnych uzyskanych w różnych warunkach był odmienny. Na podstawie otrzymanych wyników, zdecydowano prowadzić dalsze doświadczenia, obniżając temperaturę inkubacji indukowanej hodowli do 27°C, przy jednoczesnym wydłużeniu czasu jej trwania do 16 godzin. W takich warunkach przeprowadzono ekspresję genu E2 w skali preparatywnej [III.2.22].

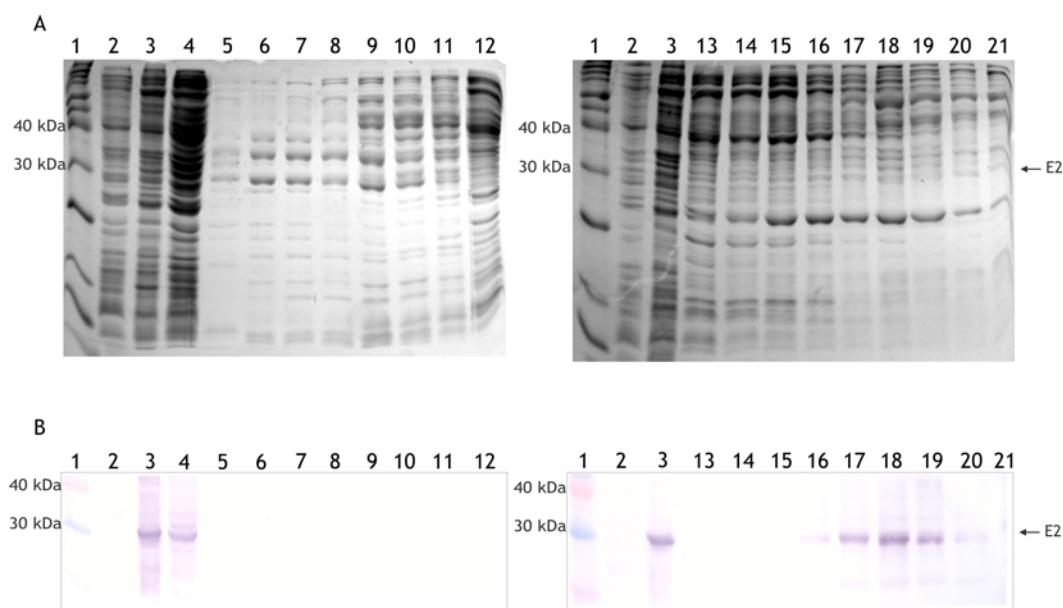


Rysunek IV.21. Analiza ekspresji genu E2 w komórkach *E. coli* BL21(DE3)pLysS.

(A) Przebieg ekspresji genu E2 w komórkach *E. coli* BL21(DE3)pLysS - wynik rozdzielania preparatów w 12% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidocznił: 1 - wzorzec długości Unstained Protein Molecular Weight Marker; 2 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych przed indukcją ekspresji; 3 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 1 h po indukcji; 4 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 2 h po indukcji; 5 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 3 h po indukcji. (B) Wpływ warunków hodowli na rozpuszczalność białek bakteryjnych - preparaty rozdzielano w 15% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidocznił: 1 - wzorzec długości Unstained Protein Molecular Weight Marker; 2-3 - całkowity ekstrakt białek z komórek bakteryjnych przed indukcją ekspresji; 4 - całkowity ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 3 h po indukcji ekspresji prowadzonej w temperaturze 37°C; 5 - frakcja białek rozpuszczalnych po 3 h ekspresji prowadzonej w temperaturze 37°C; 6 - frakcja białek nierozpuszczalnych po 3 h ekspresji prowadzonej w temperaturze 37°C; 7 - całkowity ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 16 h po indukcji ekspresji prowadzonej w temperaturze 37°C; 8 - frakcja białek rozpuszczalnych po 16 h ekspresji prowadzonej w temperaturze 37°C; 9 - frakcja białek nierozpuszczalnych po 16 h ekspresji prowadzonej w temperaturze 37°C; 10 całkowity ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 16 h po indukcji ekspresji prowadzonej w temperaturze 27°C; 11 - frakcja białek rozpuszczalnych po 16 h ekspresji prowadzonej w temperaturze 27°C; 12 - frakcja białek nierozpuszczalnych po 16 h ekspresji prowadzonej w temperaturze 27°C.

IV.2.3.2.3 Oczyszczanie białka E2, otrzymanego w komórkach *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Białko E2 zawarte w preparatach wyizolowanych z komórek *E. coli* BL21(DE3)pLysS oczyszczono wstępnie metodą chromatografii jonowymiennej [III.2.25.1]. Polega ona na odwracalnym wiązaniu cząsteczek obdarzonych ładunkiem (w tym przypadku białek) do unieruchomionych na stałym podłożu cząsteczek o ładunku przeciwnym. Ekstrakt białkowy z komórek *E. coli* BL21(DE3)pLysS nałożono na kolumnę wypełnioną złożem DEAE-celulozowym. Ze względu na obecność trzeciorzędowych grup aminowych, DEAE-celuloza posiada dodatni ładunek, dzięki czemu wiązała ujemnie naładowane białka. Następnie złożo przemywano gradientem NaCl w buforze fosforanowym. W ten sposób, zwiększając siłę jonową poszczególnych porcji buforu, doprowadzono do stopniowego wypierania białek ze złoża. Skład poszczególnych frakcji analizowano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących [III.2.26; rysunek IV.22A].



Rysunek IV.22. Analiza preparatów białkowych otrzymanych po oczyszczaniu na złożu DEAE-celulozowym.

(A) Wynik rozdziatu uzyskanych frakcji w 15% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - ekstrakt białek *E.coli* BL21(DE3)pLysS przed indukcją ekspresji E2 (kontrola negatywna); 3 - ekstrakt białek *E.coli* BL21(DE3)pLysS 3 h po indukcji ekspresji E2 (kontrola pozytywna); 4 - ekstrakt białek *E.coli* BL21(DE3)pLysS 3 h po indukcji ekspresji E2 przed natożeniem na złożo DEAE-celulozowe; 5-6 - frakcje białek niezwiązanych ze złożem; 7-9 - frakcje białek po przemyciu buforem z 50 mM NaCl; 10-12 - frakcje białek po przemyciu buforem z 100 mM NaCl; 13-15 - frakcje białek po przemyciu buforem z 150 mM NaCl; 16-18 - frakcje białek po przemyciu buforem z 200 mM NaCl; 19-21 - frakcje białek po przemyciu buforem z 250 mM NaCl. (B) Analiza białek metodą *western blot*, przy zastosowaniu przeciwciał specyficznych wobec E2. Opis ścieżek jak na rysunku A.

Ponieważ wybarwienie żeli komasyną nie pozwoliło zidentyfikować prążka odpowiadającego białku E2, starano się potwierdzić jego obecność metodą *western blot* [III.2.27]. W metodzie tej do detekcji białek rozdzielonych w żelu, a następnie unieruchomionych na membranie, używa się specyficznych przeciwciał. W prezentowanych badaniach posłużono się dostępnymi komercyjnie kozimi przeciwciałami pierwszorzędowymi anty-E2 HCV (I-rz). Jako przeciwciała drugorzędowe wykorzystano skierowane przeciwko kozim przeciwciałom immunoglobuliny królicze, sprzężone z fosfatazą alkaliczną (II-rz-AP) [III.1.7]. Enzym ten katalizuje hydrolizę BCIP (sól toluidynowa 5-bromo-4-chloro-3-indolofosforanu) do związku przejściowego, który w obecności NBT dimeryzuje, tworząc barwny produkt. Umieszczenie membrany w roztworze zawierającym BCIP i NBT umożliwia wykrycie kompleksu E2:I-rz:II-rz-AP. Prążki odpowiadające białku E2 zidentyfikowano we frakcjach zebranych po przemyciu złoża buforem zawierającym 200 i 250 mM NaCl.

Drugim etapem oczyszczania była chromatografia powinowactwa do jonów niklu [III.2.25.2.1]. W metodzie tej wykorzystuje się zdolność pierścieni

imidazolowych reszt histydynowych do wiązania z jonami niklu Ni^{2+} , unieruchomionymi na złożu agarozowym. Ponieważ białko E2 posiadało na końcu C sześć reszt histydynowych (znacznik histydynowy, tzw. His-Tag), powinno wydajnie wiązać się ze złożem. Połączone frakcje zawierające E2 wymyte z kolumny DEAE-celulozowej zagęszczono na filtrze 10 kDa, w buforze przeznaczonym do kolumny niklowej [III.2.24] i inkubowano ze złożem Ni^{2+} . Następnie wypełnioną nim kolumnę przemywano gradientem imidazolu, który konkurował z resztami histydyny o wiązanie jonów Ni^{2+} , stopniowo wypierając białka ze złoża. Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących [III.2.26].

Wbrew oczekiwaniom, białko E2 nie wiązało się efektywnie z jonami niklu, unieruchomionymi na złożu i było całkowicie wymywane przy 20 i 50 mM stężeniu imidazolu, podobnie jak większość białek zawartych w preparacie. Wcześniejsza analiza metodą MALDI-TOF wykazała obecność sześciu reszt histydynowych, na końcu karboksylowym białka E2. Brak powinowactwa E2 do złoża był najprawdopodobniej uwarunkowany strukturą białka, uniemożliwiającą prawidłowe oddziaływanie pomiędzy znacznikiem histydynowym a jonami Ni^{2+} .

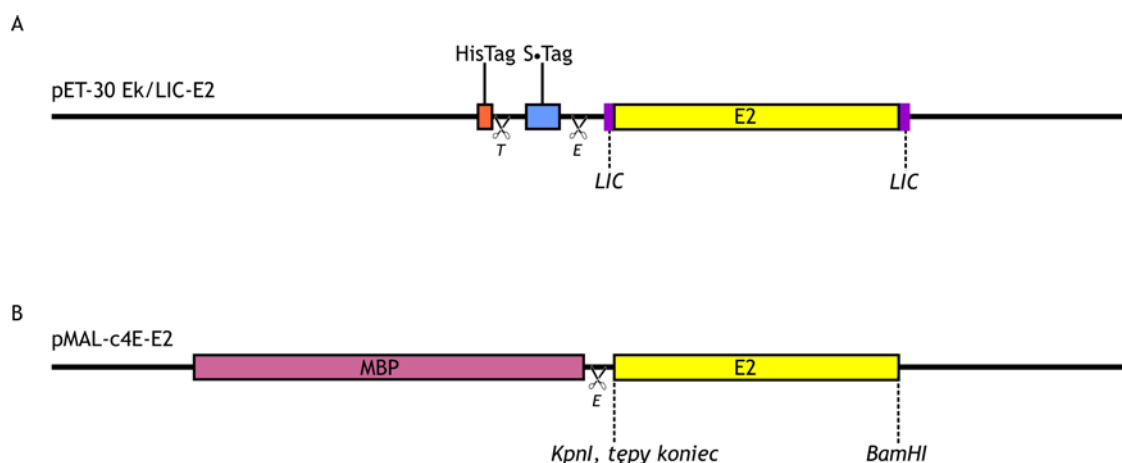
IV.2.3.2.4 Konstrukcja wektorów ekspresyjnych pET-30 Ek/LIC i pMAL-c4E kodujących gen E2

Biorąc pod uwagę powyższe wyniki, postanowiono otrzymać nowe konstrukty kodujące białko E2, umożliwiające zastosowanie innych metod oczyszczania. W tym celu posłużono się dwoma plazmidami, pET-30 Ek/LIC oraz pMAL-c4E [III.1.3]. Pierwszy umożliwia produkcję białka zaopatrzonego w dodatkowy peptyd na końcu aminowym. Peptyd ten zawiera sekwencję rozpoznawaną przez enterokinazę, poprzedzoną znacznikiem histydynowym oraz znacznikiem S•Tag. Są one wykorzystywane do dwuetapowego oczyszczania białka metodą chromatografii powinowactwa na złożu niklowym i złożu zawierającym białko S. Plazmid ten dostarczany jest w formie liniowej, posiadającej kilkunastonukleotydowe odcinki jednoniciowe na obu końcach. Ich obecność umożliwia wprowadzenie odpowiednio przygotowanego insertu na drodze hybrydyzacji jednoniciowych fragmentów (bez udziału ligazy DNA). Aby uzyskać właściwe inserty kodujące oba warianty genu E2, przeprowadzono reakcję PCR [III.2.5], w obecności starterów F-02LIC i R-02LIC dla wariantu E2-SR oraz F-05LIC i R-05LIC dla wariantu E2-NR [III.1.4]. Jako matryce

wykorzystano wektory pET-11a-SR i pET-11a-NR. Zastosowane startery wprowadzały sekwencje umożliwiające klonowanie do plazmidu pET-30 Ek/LIC oraz kodon stop na końcu 3' skróconych wariantów genu E2. Następnie, produkty PCR poddano działaniu polimerazy DNA T4, wykazującej aktywność 3'→5' egzonukleazową [III.2.14]. Pod nieobecność trifosforanów deoksyrybonukleozydów, polimeraza DNA T4 usuwa nukleotydy w kierunku 3'→5', natomiast w ich obecności równowaga reakcji przesuwana się w kierunku polimeryzacji. W opisywanym przypadku, w mieszaninie reakcyjnej zawarty był jedynie trifosforan deoksyryboadenozyny (dATP). Polimeraza degradowała zatem nie 3'→5' do momentu, gdy w nici matrycowej znalazła się deoksyrybotymidyna (dT). Wówczas następowało włączenie dATP, jednak dalsze wydłużanie nie było możliwe. W rezultacie, na obu końcach insertów pozostały kilkunastonukleotydowe fragmenty jednoniciowe, komplementarne do odpowiednich rejonów plazmidu pET-30 Ek/LIC. Tak przygotowane inserty poddano hybrydyzacji z plazmidem [III.2.14], a następnie wprowadzono do komórek *E. coli* DH5α metodą szoku cieplnego [III.2.18.2]. Z pojedynczych kolonii otrzymanych na szalkach z pożywką LB zawierającą kanamycynę [III.1.10.1] przygotowano płynne kultury, z których izolowano plazmidy [III.2.9]. Prawidłowość procesu klonowania potwierdzono metodą PCR [III.2.4], wykorzystując startery F-pET30 i R-pET30 [III.1.4]. Ponieważ miejsca hybrydyzacji starterów oskrzydlały miejsce klonowania, na podstawie analizy produktów PCR metodą elektroforezy w żelu agarozowym [III.2.6] dokonano wyboru plazmidów zawierających insert [rysunek IV.23A]. Wybrane klony poddano sekwencjonowaniu [III.2.11] przy użyciu starterów F-pET30 i R-pET30.

Równolegle przygotowano wektory ekspresyjne na podstawie plazmidu pMAL-c4E, kodującego białko wiążące maltozę, (ang. *maltose binding protein*, MBP). Połączenie E2 z MBP powinno wyraźnie zwiększyć rozpuszczalność produktu. Miejsce klonowania w tym plazmidzie znajduje się poniżej genu MBP i krótkiego łącznika, kodującego sekwencję aminokwasową rozpoznawaną przez enterokinazę. Wprowadzenie insertu w tej samej ramce odczytu umożliwia produkcję białka fuzyjnego, a następnie oczyszczenie go metodą chromatografii powinowactwa na złożu amylozowym. W celu uzyskania właściwych insertów kodujących oba warianty genu E2, przeprowadzono reakcję PCR [III.2.5], z wykorzystaniem starterów F-02pMAL i R-02pMAL dla wariantu E2-SR oraz F-05pMAL i R-05pMAL dla wariantu E2-NR [III.1.4], jako matrycę użyto wektor pET-11a-SR lub pET-11a-NR. Startery

komplementarne do końca 3' namnażanego fragmentu genu wprowadzały kodon stop oraz miejsce rozpoznawane przez endonukleazę BamHI. Produkty reakcji PCR poddano dalszej obróbce, polegającej na trawieniu jednoniciowych wystających końców [III.2.15], oraz cięciu restrykcyjnym BamHI [III.2.8.1]. Plazmid trawiono KpnI [III.2.8.2], następnie usunięto jednoniciowe wystające końce oraz cięto BamHI. W rezultacie, ligacja insertu z plazmidem zachodziła przy wykorzystaniu „tępego” i „lepkiego” końca. Produktami ligacji transformowano bakterie i wyselekcjonowano niezależne klonów [III.2.18.2, III.2.9]. Obecność insertów w wyizolowanych plazmidach wstępnie potwierdzono, metodą PCR [III.2.4], przy użyciu starterów F-pMAL i R-pMAL [III.1.4], oskrzydłających rejon klonowania, a następnie metodą sekwencjonowania z użyciem tych samych starterów.



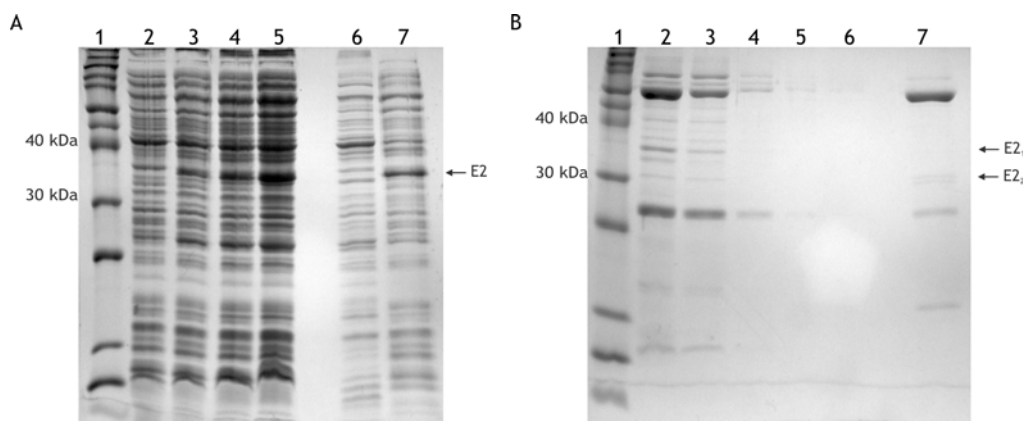
Rysunek IV.23. Wektory ekspresyjne kodujące gen E2 HCV.

(A) Skrócony gen E2 z kodonem stop wprowadzono do plazmidu ekspresyjnego pET-30 Ek/LIC metodą niezależną od ligacji, wykorzystującą hybrydację pomiędzy jednoniciowymi odcinkami insertu i plazmidu - LIC. Takie włączenie docelowego genu zapewnia ulokowanie go w jednej ramce odczytu z sekwencjami kodującymi peptydy umożliwiające oczyszczanie białka na drodze chromatografii powinowactwa: HisTag i S•Tag. Peptydy te mogą być odcięte dzięki obecności sekwencji rozpoznawanych przez proteazy: trombinę - T i enterokinazę - E. Otrzymano wektory kodujące oba warianty genu E2: pET-30 Ek/LIC-SR i pET-30 EK/LIC-NR. (B) Skrócony gen E2 z kodonem stop wprowadzono do plazmidu ekspresyjnego pMAL-c4E pomiędzy miejsca restrykcyjne KpnI i BamHI, umieszczając go w jednej ramce odczytu z sekwencją kodującą białko wiążące maltozę - MBP. Sekwencje kodujące oba białka oddzielone są krótkim łącznikiem, kodującym miejsce rozpoznawane przez enterokinazę - E. Do plazmidu pMAL-c4E wprowadzono oba warianty E2, otrzymując wektory pMAL-c4E-SR i pMAL-c4E-NR.

IV.2.3.2.5 Ekspresja genu E2 wprowadzonego do plazmidów pET-30 Ek/LIC i pMAL-c4E oraz oczyszczanie otrzymanych białek

Otrzymane wektory pET-30 Ek/LIC-SR i pET-30 EK/LIC-NR użyto do transformacji komórek kompetentnych *E. coli* BL21(DE3)pLysS [III.1.2] metodą szoku cieplnego [III.2.18.2]. Spośród uzyskanych na pożywce z kanamycyną kolonii bakteryjnych wybrano jedną i sporządzono płynną kulturę w celu przeprowadzenia

ekspresji w skali analitycznej [III.2.22]. Hodowlę prowadzono w temperaturze 37°C, do momentu osiągnięcia przez kulturę gęstości optycznej $OD_{600} = 0,4-0,5$. Następnie indukowano ekspresję E2, dodając IPTG. Z niewielkich porcji hodowli pobranych przed indukcją, jak i po upływie trzech godzin, ekstrahowano białka i poddano je analizie metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących [III.2.26]. Przeprowadzono także analizę rozpuszczalności białek [III.2.23]. Po uwidocznieniu rozdzielonych białek, w próbach pobranych po indukcji zaobserwowano obecność wyraźnego prążka, odpowiadającego skróconemu białku E2, zaopatrzonemu w dodatkowy peptyd (białko o masie ok. 36 kDa). Jednocześnie stwierdzono, że znaczna większość powstającego E2 znajdowała się we frakcji białek nierozpuszczalnych [rysunek IV.24A]. Mimo to, podjęto próbę oczyszczenia E2, obecnego we frakcji białek rozpuszczalnych.



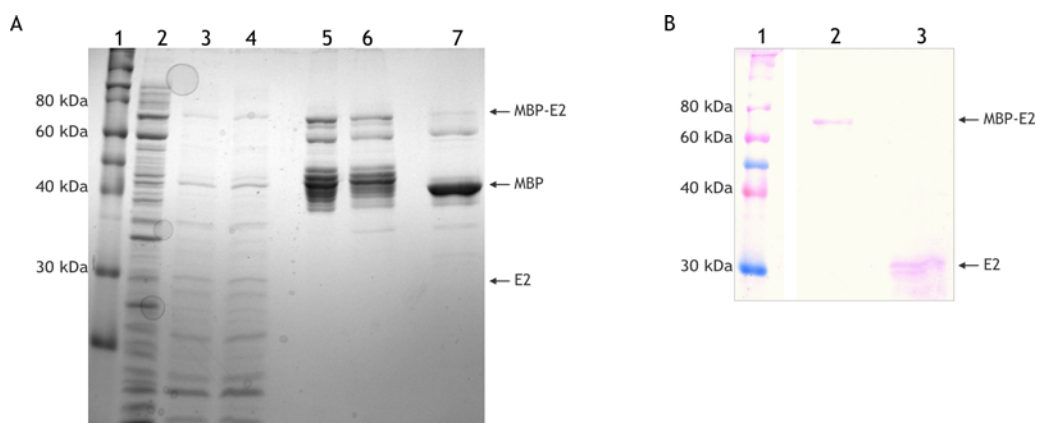
Rysunek IV.24. Analiza ekspresji genu E2 wprowadzonego do plazmidu pET-30 Ek/LIC oraz preparatów otrzymanych po dwóch etapach oczyszczania białka.

(A) Ekspresja genu E2 w komórkach *E. coli* BL21(DE3)pLysS - wynik rozdzielenia preparatów w 15% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex[®] Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych przed indukcją ekspresji; 3 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 1 h po indukcji; 4 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 2 h po indukcji; 5 - ekstrakt białek z komórek bakteryjnych 3 h po indukcji; 6 - frakcja białek rozpuszczalnych; 7 - frakcja białek nierozpuszczalnych. (B) Analiza preparatów otrzymanych po dwóch etapach oczyszczania białka E2. Izolaty poddano elektroforezie w 15% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex[®] Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - połączone frakcje białek wymyte ze złoża niklowego buforem o 100 mM, 200 mM i 1 M stężeniu imidazolu (preparat ten nałożono następnie na złożo zawierające białko S); 3 - frakcja białek niezwiązanych ze złożem zawierającym białko S; 4-6 - frakcje białek wymyte ze złoża buforem S; 7 - frakcja białek związanych ze złożem zawierającym białko S. Wskutek odcięcia peptydu obejmującego znaczniki His-Tag i S•Tag za pomocą enterokinazy, masa cząsteczkowa białka E2 zmniejszyła się z 36 kDa (E2₁) do 32 kDa (E2₂).

Jako pierwszą metodę oczyszczania zastosowano chromatografię powinowactwa do jonów niklu [III.2.25.2.1]. Zaobserwowano znaczny wzrost efektywności wiązania białka E2 ze złożem w porównaniu do wcześniej stosowanego układu ekspresyjnego [IV.2.3.2.3] – E2 było bowiem wymywane w zakresie od 0,03 do 1 M stężenia imidazolu. Ponieważ w każdej frakcji oprócz E2 znajdowały się również liczne białka

bakteryjne, przeprowadzono drugi etap oczyszczania. W tym celu frakcje o stężeniu imidazolu 100 mM, 200 mM oraz 1M połączono i zagęszczono na filtrze w obecności buforu $1 \times S$ [III.2.24; III.1.9.6.5]. Tak przygotowany preparat połączono ze złożem zawierającym białko S [III.2.25.2.2]. Białko to jest fragmentem rybonukleazy A. Subtylizyna przecina jedno wiązanie peptydowe w RNazie A, w wyniku czego powstaje tzw. rybonukleaza S, zbudowana z dwóch ściśle związanych fragmentów: białka S i peptydu S. Zmodyfikowany peptyd S, tzw. S•Tag, jest kodowany przez plazmid pET-30 Ek/LIC. Obecność znacznika S•Tag w uzyskanym białku umożliwia wykorzystanie jego zdolności do wiązania białka S jako metody oczyszczania. E2 usuwano ze złoża (zawierającego białko S), odcinając za pomocą enterokinazy peptyd obejmujący His-Tag i S•Tag. W ten sposób masa białka E2 zmniejszała się do 32 kDa. Niestety, zastosowane procedury nie pozwoliły otrzymać homogennego preparatu [rysunek IV.24B]. Jedynie niewielka część białka zaopatrzonego w znacznik S•Tag związała się ze złożem. Jednocześnie, w tej samej frakcji obecne były białka bakteryjne. Ponieważ zastosowana metoda okazała się być bardzo mało wydajna, przetestowano kolejny system ekspresyjny.

Wektorami pMAL-c4E-SR i pMAL-c4E-NR transformowano komórki kompetentne *E. coli* TB1 [III.2.18.2]. W przeciwieństwie do wcześniej stosowanych bakterii, szczep ten nie posiada genu kodującego polimerazę RNA T7. W zastosowanym systemie ekspresyjnym obecność tego enzymu nie jest potrzebna, ponieważ w plazmidzie pMAL-c4E gen kodujący białko fuzyjne umieszczony jest pod kontrolą promotora bakteryjnego, *tac*. Analogicznie jak w poprzednich doświadczeniach, przeprowadzono ekspresję i analizę rozpuszczalności otrzymanych białek [III.2.22; III.2.23], która wykazała, że większość białka fuzyjnego (o masie ok. 70 kDa) obecna jest we frakcji białek nierozpuszczalnych. Preparat zawierający białka rozpuszczalne poddano oczyszczaniu metodą chromatografii powinowactwa, nakładając go na kolumnę wypełnioną złożem amylozowym [III.2.25.2.3]. W metodzie tej wykorzystuje się specyficzne oddziaływanie MBP z amylozą unieruchomioną na złożu. Po odpłukaniu białek niezwiązanych, kolumnę przemyto buforem zawierającym 10 mM maltozę, wypierając białka związane ze złożem. Wśród tych ostatnich zidentyfikowano białko MBP-E2, MBP oraz niewielką ilość dodatkowych białek bakteryjnych [rysunek IV.25A, ścieżka 5].



Rysunek IV.25. Analiza preparatów otrzymanych w wyniku oczyszczania białka E2 po ekspresji z wektora pMAL-c4E-E2.

(A) Wynik rozdzielenia preparatów uzyskanych wskutek oczyszczania na złożu amylozowym. Próbkę rozdzielono metodą elektroforezy w 12% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidoczono: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - frakcja białek rozpuszczalnych przed nałożeniem na kolumnę wypełnioną złożem amylozowym; 3-4 - frakcje białek niezwiązanych ze złożem, 5 - frakcja białek związanych ze złożem; 6 - frakcja białek związanych ze złożem po wymianie buforu; 7 - frakcja białek związanych ze złożem po 16 h inkubacji z enterokinazą. (B) Analiza preparatów białkowych metodą *western blot*. Do detekcji zastosowano przeciwciała specyficzne wobec E2 HCV. W poszczególnych ścieżkach uwidoczono: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - frakcja białek związanych ze złożem amylozowym; 3 - frakcja białek związanych ze złożem po 16 h inkubacji z enterokinazą.

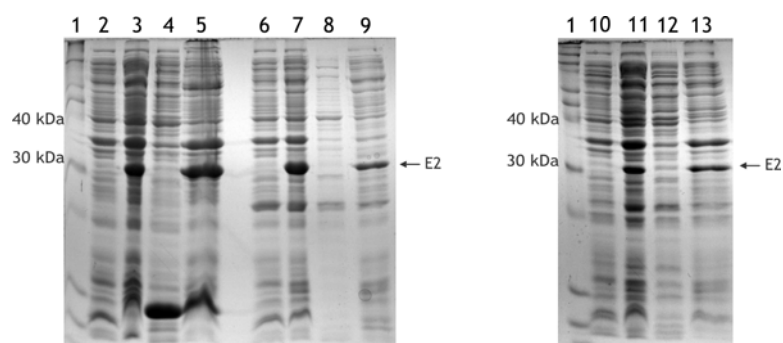
Frakcje zawierające MBP-E2 połączono i zagęszczono w buforze reakcyjnym dla enterokinazy [III.2.24]. Ponieważ miejsce rozpoznawane przez enzym zlokalizowane jest pomiędzy białkiem MBP a E2, spodziewano się że białko fuzyjne ulegnie przecięciu na te dwa komponenty. Analiza produktów cięcia metodą elektroforezy w 12% żelu poliakryloamidowym wykazała, że większość białka MBP-E2 rzeczywiście ulegała przecięciu [rysunek IV.25A, ścieżka 7]. Jednocześnie okazało się, że znaczna ilość tego białka degradowała w komórkach *E. coli* i/lub podczas oczyszczania. Wniosek taki można wysnuć, analizując układ prążków odpowiadających białkom o masie nieco przekraczającej 40 kDa [rysunek IV.25A, ścieżka 6]. W wyniku trawienia preparatu enterokinazą, białka te przyjmowały masę 40 kDa, tworząc jeden wyraźny prążek, odpowiadający MBP [rysunek IV.25A, ścieżka 7]. Oznacza to, że były one produktami degradacji MBP-E2. Z tego powodu wydajność ekspresji E2 z wektora pMAL-c4E-SR i pMAL-c4E-NR okazała się znikoma, a białko można było uwidocznić jedynie za pomocą techniki *western blot* [rysunek IV.25B].

IV.2.3.2.6 Wybór optymalnego szczepu *E. coli*

Ponieważ wcześniej wykonane doświadczenia nie doprowadziły do uzyskania oczyszczonego preparatu E2, przeprowadzono próbę jego produkcji w kilku zmodyfikowanych szczepach bakteryjnych. W tym celu wektorami pET11a-SR

i pET11a-NR transformowano trzy szczepy *E. coli*: BL21-AITM One Shot[®], Rosetta(DE3)pLysS i Origami B(DE3)pLysS [III.1.2]. Pierwszy z nich zawiera gen kodujący polimerazę RNA T7 pod kontrolą promotora *araBAD*, aktywowanego dodaniem L-arabinozy. Jednocześnie, promotor ten ulega represji w obecności glukozy, która jest składnikiem pożywki. Ze względu na ściśle kontrolowaną ekspresję obcego genu, szczep ten szczególnie dobrze nadaje się do produkcji toksycznych białek. Bakterie szczepu Rosetta(DE3)pLysS posiadają plazmid pRARE, zawierający geny tRNA, rozpoznających sześć kodonów, rzadko występujących u *E. coli*. W ten sposób, szczep ten umożliwia wydajną ekspresję obcego genu, zwłaszcza pochodzącego z organizmu znacznie różniącego się od *E. coli* pod względem częstości wykorzystania poszczególnych kodonów. Bakterie *E. coli* Origami B(DE3)pLysS posiadają specyficzne mutacje w genach kodujących reduktazę tioredoksynową i glutationową. Enzymy te są odpowiedzialne za redukcję wiązań disiarczkowych, zatem ich inaktywacja umożliwia produkcję białek, w których mostki S-S są konieczne dla osiągnięcia właściwej im konformacji. Analogicznie jak uprzednio, sporządzono kultury bakteryjne poszczególnych szczepów, transformowanych plazmidem pET11a kodującym skrócony gen E2 i inkubowano je w temperaturze 37°C. W chwili osiągnięcia przez hodowlę fazy wzrostu logarytmicznego pobrano niewielką jej porcję, po czym indukowano ekspresję [III.2.22]. Indukcja przebiegała podobnie jak w przypadku stosowanego wcześniej szczepu *E. coli* BL21(DE3)pLysS, przez dodanie IPTG. Wyjątkiem był szczep BL21-AITM One Shot[®], który do zaindukowania ekspresji polimerazy RNA T7 wymaga podania L-arabinozy. Przebieg ekspresji monitorowano, pobierając niewielkie porcje kultur po upływie 1, 2 i 3 godzin od indukcji. Następnie przeprowadzono analizę rozpuszczalności białek [III.2.23]. Ekstrakty białkowe analizowano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących. [III.2.26; rysunek IV.26]. Gen E2 ulegał bardzo wydajnej ekspresji we wszystkich trzech szczepach bakteryjnych. Zdecydowana większość powstałego białka ponownie jednak znajdowała się we frakcji białek nierozpuszczalnych, a w przypadku komórek Rosetta(DE3)pLysS była w niej zawarta całość produkowanego E2. W przeciwieństwie do nich, zarówno w ekstraktach ze szczepu BL21-AITM One Shot[®], jak i Origami B(DE3)pLysS, stwierdzono obecność E2 także we frakcji białek rozpuszczalnych. Ekspresję tych szczepów przeprowadzono także w temperaturze 27°C przez 16 h, a dla komórek Origami B(DE3)pLysS dodatkowo w temperaturze 18°C. W tych warunkach (27 i 18°C) nie zanotowano jednak istotnego wzrostu wydajności

produkcji E2. W następstwie dokonanych analiz, do dalszych doświadczeń wybrano szczep Origami B(DE3)pLysS, kierując się dwiema zasadniczymi przesłankami. Po pierwsze, zawartość E2 we frakcji białek rozpuszczalnych była w tych bakterjach względnie największa. Po drugie, komórki te posiadają mutacje w genach kodujących reduktazy – powstające białka mogą więc tworzyć mostki disiarczkowe. Wcześniejsze badania wskazywały, że ich powstanie umożliwia białku E2 przyjęcie natywnej konformacji. Dodatkowo zakładano, iż właściwe fałdowanie wpłynie korzystnie na dostępność znacznika histydynowego, a zarazem na proces oczyszczania białka.



Rysunek IV.26. Analiza ekspresji genu E2 w trzech szczepach *E. coli*.

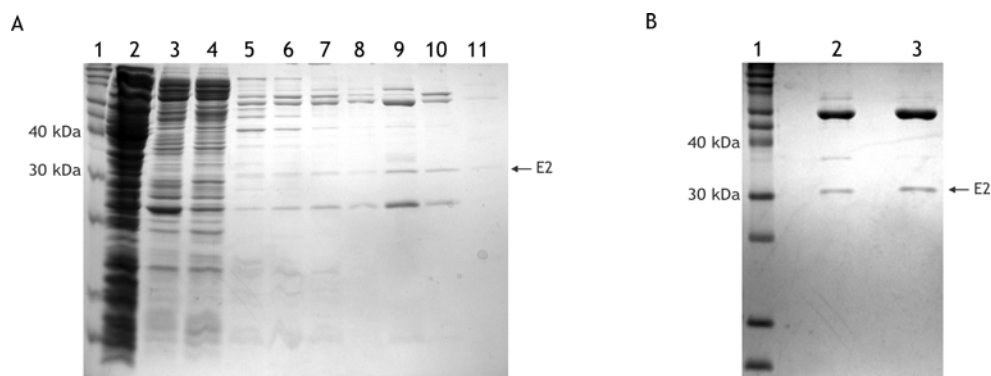
Wynik rozdziatu preparatów w 15% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - całkowity ekstrakt białek z komórek BL21-AI™ One Shot® przed indukcją ekspresji; 3 - całkowity ekstrakt białek z komórek BL21-AI™ One Shot® 3 h po indukcji ekspresji; 4 - frakcja białek rozpuszczalnych; 5 - frakcja białek nierozpuszczalnych; 6 - całkowity ekstrakt białek z komórek Rosetta(DE3)pLysS przed indukcją ekspresji; 7 - całkowity ekstrakt białek z komórek Rosetta(DE3)pLysS 3 h po indukcji ekspresji; 8 - frakcja białek rozpuszczalnych; 9 - frakcja białek nierozpuszczalnych; 10 - całkowity ekstrakt białek z komórek Origami B(DE3)pLysS przed indukcją ekspresji; 11 - całkowity ekstrakt białek z komórek Origami B(DE3)pLysS 3 h po indukcji ekspresji; 12 - frakcja białek rozpuszczalnych; 13 - frakcja białek nierozpuszczalnych.

IV.2.3.2.7 Oczyszczanie białka E2 otrzymanego w komórkach *E. coli* Origami B(DE3)pLysS

Białko E2 obecne w preparatach wyizolowanych z komórek *E. coli* Origami B(DE3)pLysS poddano oczyszczaniu metodą chromatografii powinowactwa do jonów niklu [III.2.25.2.1]. Ekstrakt zawierający E2 inkubowano ze złożem niklowym, a następnie nałożono na kolumnę. W kolejnym etapie, złożo przemywano gradientem imidazolu, w ten sposób doprowadzając do stopniowego wypierania białek ze złoża. Zawartość zebranych frakcji analizowano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących [III.2.26; rysunek IV.27A].

Zaobserwowano istotną zmianę powinowactwa białka E2 do unieruchomionych na złożu jonów Ni^{2+} . Białko to było obecne we frakcjach, w których stężenie imidazolu wynosiło od 0,04 do 1 M. Choć ilość białka była stosunkowo mała, to jednak można było jednoznacznie przypisać odpowiadający mu prążek. Stosowny fragment żelu

wycięto, a zawarte w nim białka poddano analizie w spektrometrze MALDI-TOF. Uzyskane wyniki potwierdziły obecność E2 we wstępnie oczyszczonych preparatach.



Rysunek IV.27. Analiza preparatów białkowych otrzymanych w komórkach *E. coli* Origami B(DE3)pLysS, po dwóch etapach oczyszczania.

(A) Analiza elektroforetyczna (15% żel PAA) frakcji białek otrzymanych w wyniku oczyszczania na złożu niklowym. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex[®] Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - frakcja białek niezwiązanych ze złożem; 3 - frakcja wymyta buforem o 10 mM stężeniu imidazolu; 4 - frakcja wymyta buforem o 20 mM stężeniu imidazolu; 5 - frakcja wymyta buforem o 40 mM stężeniu imidazolu; 6 - frakcja wymyta buforem o 50 mM stężeniu imidazolu; 7-8 - frakcje wymyte buforem o 60 mM stężeniu imidazolu; 9 - frakcja wymyta buforem o 100 mM stężeniu imidazolu; 10 - frakcja wymyta buforem o 200 mM stężeniu imidazolu; 11 - frakcja wymyta buforem o 1 M stężeniu imidazolu. (B) Analiza elektroforetyczna (15% żel PAA) preparatów zawierających E2-SR i E2-NR, otrzymanych po oczyszczeniu na kolumnie niklowej i metodą sączenia molekularnego. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex[®] Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - preparat zawierający E2-SR; 3 - preparat zawierający E2-NR.

Frakcje o stężeniu imidazolu 0,1-1 M, pochodzące z trzech litrów wyjściowej hodowli bakteryjnej połączone, a następnie zagęszczono w buforze przeznaczonym do oczyszczania metodą sączenia molekularnego [III.2.24]. Następnie preparat białkowy nałożono na kolumnę wypełnioną złożem Superdex75 16/60 HiLoad i przemywano buforem, stopniowo doprowadzając do całkowitego wypłukania białek z kolumny [III.2.25.3]. Istotą zastosowanej metody jest rozdział białek na frakcje ze względu na ich masę cząsteczkową. Białka o dużej masie nie dostają się do wnętrza ziaren złoża i wypływają jako pierwsze, zaś białka o mniejszych masach, które przedostają się do wnętrza ziaren, wymywane są w dalszej kolejności. Spodziewano się zatem, iż technika ta umożliwi odseparowanie E2 od obecnych w mieszaninie białek bakteryjnych, znacznie różniących się od niego masą cząsteczkową. Zebrane frakcje analizowano metodą elektroforezy w 15% żelach poliakryloamidowych [III.2.26]. Niestety, zastosowane podejście nie doprowadziło do otrzymania homogennego preparatu. [rysunek IV.27B]. Na podstawie uzyskanych wyników można stwierdzić, że białka E2 tworzą kompleksy o dużej masie cząsteczkowej, bądź oddziałują z białkami bakteryjnymi, stąd znalazły się we frakcji, zawierającej inne białka o podobnej masie. W wyniku przeprowadzonego procesu oczyszczania otrzymano preparaty w pełni

nadające się do zastosowania w dalszych doświadczeniach prowadzonych z wykorzystaniem metod *western blot* i ELISA (ang. *enzyme-linked immunosorbent assay*). Frakcje zawierające E2 połączono i zagęszczono w buforze do przechowywania białka [III.1.9.7].

Podsumowanie. Spośród sklonowanych wariantów genu E2 HCV wybrano dwa i poddano je ekspresji w komórkach *Escherichia coli*. Skonstruowano sześć wektorów (po trzy dla każdego wariantu), umożliwiających produkcję i oczyszczenie białka E2. Uzyskano wydajną ekspresję obu wariantów genu E2 w pięciu szczepach bakteryjnych, przy czym we wszystkich większość powstałego białka znajdowała się we frakcji białek nierozpuszczalnych. Przetestowano także szereg metod oczyszczania otrzymanego E2. W wyniku przeprowadzonych doświadczeń, wyłoniono optymalny układ ekspresyjny i sposób oczyszczania, którego zastosowanie doprowadziło do uzyskania preparatów zawierających po jednym z dwóch wariantów E2 i trzy białka bakteryjne. Tak przygotowane preparaty wykorzystano do dalszych badań.

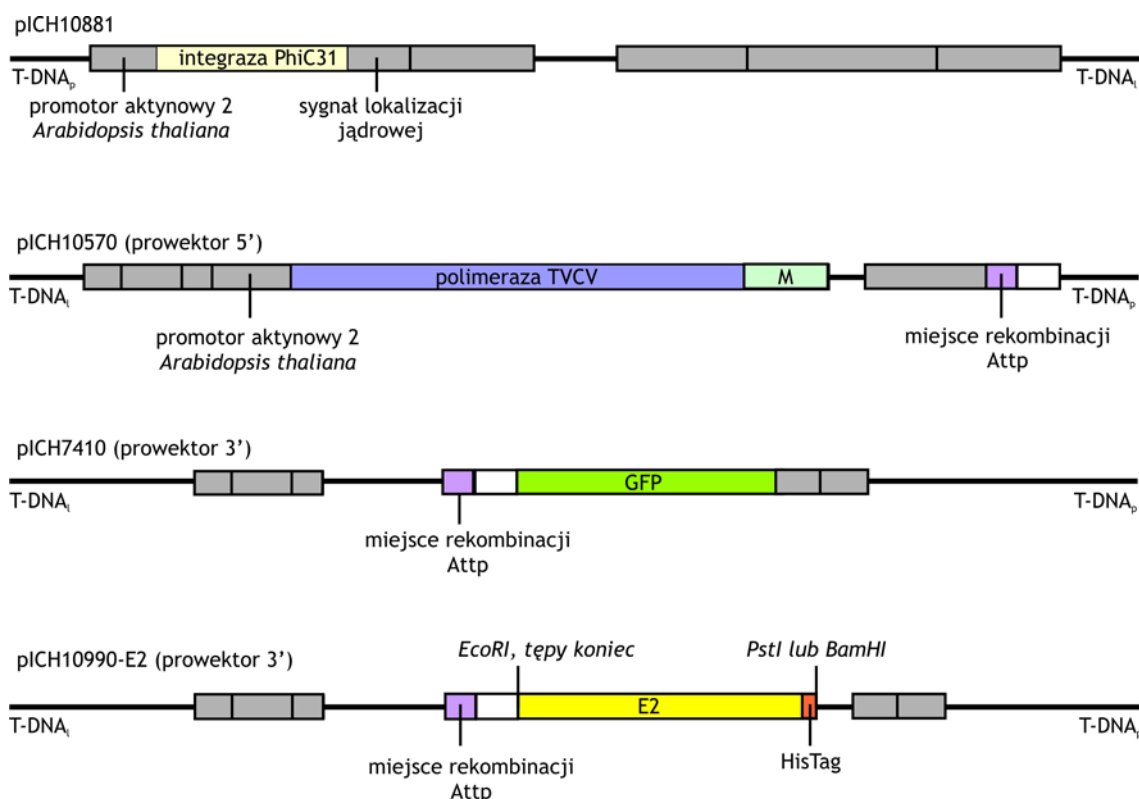
IV.2.3.3 Ekspresja genu E2 w tytoniu *Nicotiana benthamiana*

Aby otrzymać modyfikowane potranslacyjnie białko E2, postanowiono przeprowadzić ekspresję kodującego je genu w układzie roślinnym. Podstawowym celem podjętych badań było ustalenie, czy otrzymane w ten sposób białka są glikozylowane oraz porównanie ich wzoru glikozylacji z obserwowanym w organizmie człowieka. Ekspresji poddano te same warianty, które otrzymano w komórkach bakteryjnych [IV.2.3.2; rysunek IV.19]. Ponownie zdecydowano się na produkcję białek pozbawionych domeny transbłonowej i poprzedzającego ją odcinka hydrofobowego.

IV.2.3.3.1 Konstrukcja wektorów ekspresyjnych kodujących gen E2

W celu uzyskania białka E2 w roślinie posłużono się systemem do ekspresji przejściowej w tytoniu *Nicotiana benthamiana* (Marillonnet *et al.*, 2004). Układ ten wymaga jednoczesnego wprowadzenia do liści trzech plazmidów [rysunek IV.28]. Odpowiednie ich elementy, oskrzydłone są fragmentami sekwencji T-DNA i dzięki temu ulegają integracji z genomem tytoniu. Dwa z nich, tak zwane prowektory, łączą się *in planta* w jeden konstrukt. Proces ten jest katalizowany przez integrasę, którą koduje trzeci plazmid. W rezultacie powstaje w pełni funkcjonalny, infekcyjny replikon

wirusowy. Strategia ta zapewnia bardzo wysoką wydajność produkcji docelowego białka.



Rysunek IV.28. System plazmidów IconGenetics do ekspresji przejściowej w tytoniu *Nicotiana benthamiana*.

System plazmidów obejmuje wektor kodujący integrację (pICH10881), prowektor 5', kodujący polimerazę TVCV (pICH10570) oraz prowektor 3', kodujący żądane białko. W prezentowanych badaniach jako prowektory 3' wykorzystano pICH10990-SR i pICH10990-NR oraz pICH7410, kodujący białko zielonej fluorescencji (GFP) jako kontrolę.

Dwa z plazmidów, pICH10881 i pICH10570, są elementami niezbędnymi podczas każdej agroinfiltracji. Pierwszy z nich koduje integrację, umożliwiającą składanie prowektorów. Drugi, tzw. prowektor 5', niesie gen polimerazy wirusa przejaśnienia nerwów rzepy (ang. *turnip vein-clearing virus*, TVCV). Enzym ten warunkuje wydajne namnażanie replikonu w komórkach tytoniu. Trzecim, zmiennym elementem systemu jest tzw. prowektor 3' – pICH10990, do którego wprowadzany jest żądany gen, lub wektor kontrolny (pICH7410). Opisany zestaw pozwala na produkcję białka w obrębie infiltrowanej części liścia – nie powstaje w nim bowiem białko, umożliwiające rozprzestrzenianie się wirusa w roślinie.

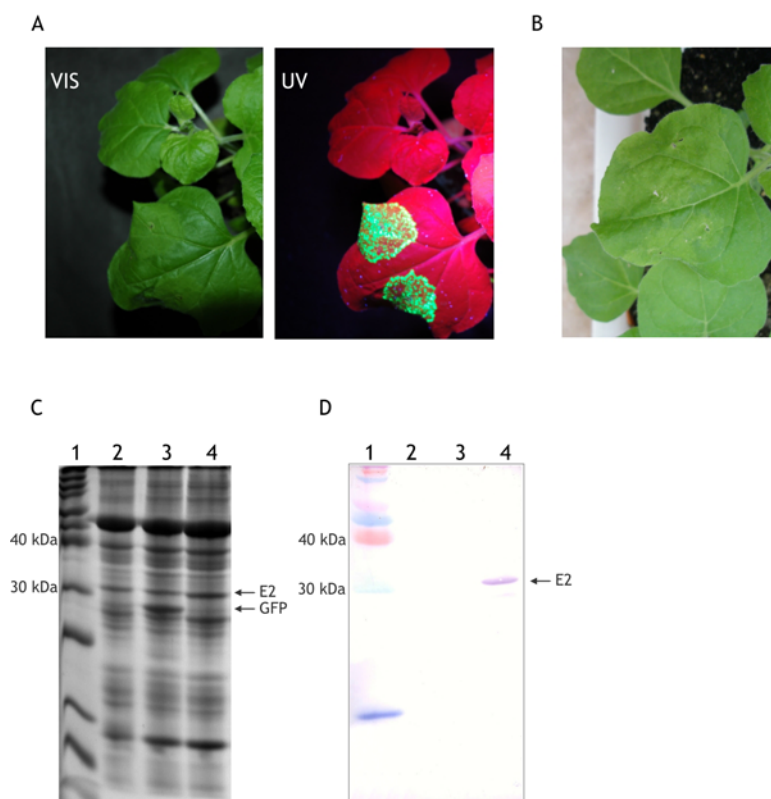
W celu uzyskania dsDNA, kodującego skróconą formę E2, przeprowadzono reakcje PCR [III.2.5], wykorzystując jako matryce uprzednio otrzymane plazmidy pGEM[®]-T Easy-NR i pGEM[®]-T Easy-SR, kodujące dwa warianty genu E2 [IV.2.3.1].

W mieszaninach reakcyjnych obecne były następujące startery: F05 i R-6-05 dla wariantu E2-NR oraz F02 i E2-R6-4 dla wariantu E2-SR [III.1.4]. Startery homologiczne do końców 5' obu wariantów wprowadzały kodon start bezpośrednio przed pierwszym kodonem E2. Startery komplementarne do końców 3' obu wariantów wprowadzały sekwencję kodującą znacznik histydynowy, kodon stop oraz miejsce rozpoznawane przez enzym restrykcyjny; BamHI dla E2-NR i PstI dla E2-SR. Otrzymane produkty PCR poddano reakcji wypełniania wystających końców za pomocą fragmentu Klenowa polimerazy DNA I [III.2.16], a następnie cięciu enzymami restrykcyjnymi: E2-NR – BamHI, natomiast E2-SR – PstI [III.2.8.1]. Przeprowadzono cięcie restrykcyjne plazmidu pICH10990 za pomocą enzymu EcoRI [III.2.8.1], a następnie poddano go reakcji wypełniania wystających końców za pomocą fragmentu Klenowa polimerazy DNA I. W kolejnym etapie, plazmid do klonowania wariantu E2-NR przecięto endonukleazą BamHI, natomiast plazmid do klonowania wariantu E2-SR – PstI. Następnie przeprowadzono reakcje ligacji, w których inserty kodujące skrócony gen E2 zostały wprowadzone do pICH10990 [III.2.12]. W obu przypadkach, ligacja końca 5' insertu przebiegała „na tępo”, zaś ligacja końca 3' – z wykorzystaniem lepkich końców. Produktem ligacji transformowano komórki kompetentne *E. coli* DH5 α [III.2.18.2]. Otrzymane na stałej pożywce z ampicyliną [III.1.10.1] kolonie posłużyły do przygotowania płynnych kultur, z których izolowano plazmidy [III.2.9]. Obecność insertów w plazmidach potwierdzono wstępnie metodą PCR [III.2.4], stosując startery F-10990 i R-10990, specyficzne wobec wektora [III.1.4]. W przypadku plazmidu zawierającego insert, spodziewano się uzyskać produkt o długości ok. 1100 par zasad, gdyby zaś plazmid nie zawierał insertu, namnożeniu uległby jedynie fragment o długości ok. 210 par zasad. Uzyskane produkty poddano analizie metodą elektroforezy w żelach agarozowych [III.2.6]. Na tej podstawie wybrano właściwe klony, które następnie sekwencjonowano [III.2.11] przy użyciu starterów F-10990 i R-10990 [III.1.4].

IV.2.3.3.2 Agroinfiltracja i ekspresja genu E2

Każdy z wektorów: pICH10990-NR, pICH10990-SR, pICH10881, pICH10570 oraz pICH7410 wprowadzono oddzielnie do komórek kompetentnych *A. tumefaciens* szczepu GV3101 [III.2.17] metodą elektroporacji [III.2.18.1]. Bakterie hodowano na stałej pożywce LB, zawierającej rifampicynę oraz (i) kanamycynę (komórki transformowane plazmidem pICH10881) lub (ii) karbenicylinę (pozostałe) [III.1.10.1].

Następnie pojedynczą kolonię przeniesiono do odpowiedniej płynnej pożywki selekcyjnej [III.1.10.3; III.2.19]. W ten sposób przygotowano pięć niezależnych kultur *A. tumefaciens*, przy czym każdą tworzyły bakterie transformowane innym plazmidem. W kolejnym etapie sporządzono trzy mieszaniny bakterii. W skład każdej z nich wchodziły komórki transformowane plazmidami pICH10881 i pICH10570 oraz jednym z wektorów: (i) pICH7410, (ii) pICH10990-NR lub (iii) pICH10990-SR. Tak przygotowanymi mieszaninami bakterii agroidyfilowano liście 3-tygodniowych roślin *Nicotiana benthamiana*. Każdą z mieszanin wprowadzono do oddzielnej rośliny. Mieszanina zawierająca bakterie transformowane plazmidem pICH7410, kodującym białko zielonej fluorescencji (ang. *green fluorescent protein*, GFP), służyła jako kontrola procesu transformacji i agroidyfilacji. Powstawanie GFP w liściach rośliny kontrolnej monitorowano, obserwując ją w świetle UV. Czwartego dnia po infiltacji (dpi) stwierdzono obecność znacznej ilości białka GFP w infiltrowanych fragmentach liścia [rysunek IV.29A]. Infekcja roślin zawierających konstrukty kodujące białko E2 przebiegała bezobjawowo, bądź z powstaniem śladowych zmian nekrotycznych [rysunek IV.29B]. Zarówno liście agroidyfilowane, jak i nieinfiltrowane (kontrola negatywna) zebrano 7 dpi. Następnie wyizolowano zawarte w nich białka [III.2.20] i poddano je analizie metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym, w warunkach denaturujących [III.2.26; rysunek IV.29C]. Po uwidocznieniu rozdzielonych białek, w próbie kontrolnej zaobserwowano wyraźny prążek, odpowiadający białku GFP. Równocześnie identyfikacja prążka odpowiadającego białku E2 okazała się niemożliwa. Stąd też, jako metodę detekcji ponownie wykorzystano technikę *western blot*. Dzięki niej wykazano obecność E2 w preparatach białkowych, pochodzących z liści, do których uprzednio wprowadzono wektor pICH10990-SR lub pICH10990-NR [rysunek IV.29D].



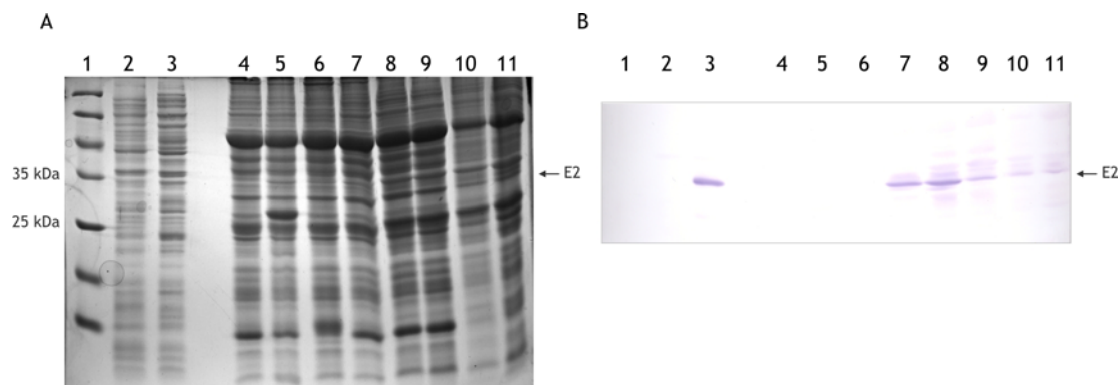
Rysunek IV.29. Ekspresja genów GFP i E2 w liściach tytoniu *Nicotiana benthamiana*.

(A) Powstawanie białka GFP w roślinach kontrolnych monitorowano obserwując je w świetle UV - zdjęcie w świetle widzialnym (VIS) i w ultrafiolecie (UV) infiltrowanego liścia 4 dpi. (B) Roślina infiltrowana wektorem kodującym białko E2. Infekcja przebiegała bezobjawowo. (C) Wynik rozdzielania elektroforetycznego białek wyekstrahowanych z roślin (15% żel PAA). W poszczególnych ścieżkach uwidoczniło: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - preparat z liścia nieinfiltrowanego (kontrola negatywna); 3 - preparat z liścia infiltrowanego konstruktem kodującym GFP; 4 - preparat z liścia infiltrowanego konstruktem kodującym białko E2. (D) Analiza preparatów białkowych metodą *western blot*. Do detekcji zastosowano przeciwciała specyficzne wobec E2 HCV. Opis ścieżek jak na rysunku C.

Na podstawie wyników analizy *western blot*, zidentyfikowano na żelu poliakryloamidowym prążek, który przypuszczalnie odpowiadał białku E2. Odpowiedni fragment żelu wycięto i obecne w nim białka poddano analizie metodą spektrometrii mas na aparacie MALDI-TOF. W rezultacie ostatecznie potwierdzono występowanie obu wariantów E2 w preparatach uzyskanych z liści tytoniu.

Aby zoptymalizować produkcję białka E2 w roślinach, sprawdzono jak jego akumulacja zmienia się w czasie. W tym celu, agroinfiltrowano serię roślin wektorami: (i) pICH10881, (ii) pICH10570 i (iii) pICH10990-NR lub pICH10990-SR. Następnie agroinfiltrowane liście zebrane po 3, 5, 7, 10, 12 i 14 dniach zamrożono w temperaturze -80°C . Stwierdzono, że zmiany nekrotyczne w liściach nasilają się w miarę rozwoju infekcji i osiągają maksymalne nastężenie po ok. 12-14 dniach od agroinfiltracji. W kolejnym etapie z wszystkich zgromadzonych liści wyizolowano białka i poddano je

analizie metodą elektroforezy w 15% żelu poliakrylamidowym, w warunkach denaturujących, oraz techniką *western blot* [rysunek IV.30].



Rysunek IV.30. Analiza akumulacji białka E2 w liściach tytoniu.

(A) Wynik rozdziatu preparatów białkowych w 15% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniiono: 1 - wzorzec mas Unstained Protein Molecular Weight Marker; 2 - preparat z komórek *E. coli* przed indukcją ekspresji E2; 3 - preparat z komórek *E. coli* 3 h po indukcji ekspresji E2; 4 - preparat z liścia nieinfiltrowanego (kontrola negatywna); 5 - preparat z liścia infiltrowanego wektorem kodującym GFP; 6-11 - preparaty z liści infiltrowanych wektorem kodującym białko E2, izolowane, odpowiednio, 3, 5, 7, 10, 12 i 14 dni po infiltracji. (B) Analiza preparatów białkowych metodą *western blot*. Do detekcji zastosowano przeciwciała specyficzne wobec E2 HCV. Opis ścieżek jak na rysunku A.

Znaczna ilość białka E2 powstawała już 5 dpi. W ciągu następnych dwóch dni jego ilość nieznacznie wzrastała, by osiągnąć najwyższy poziom 7 dpi. Dłuższa hodowla roślin nie prowadziła do zwiększenia udziału E2 w całkowitym ekstrakcie białkowym. Przeciwnie, począwszy od 10. dnia odnotowywano spadek zawartości tego białka. Z pewnością istotny wpływ na uzyskany rezultat miał wzrost intensywności zmian nekrotycznych, będących skutkiem trwającej infekcji wirusowej.

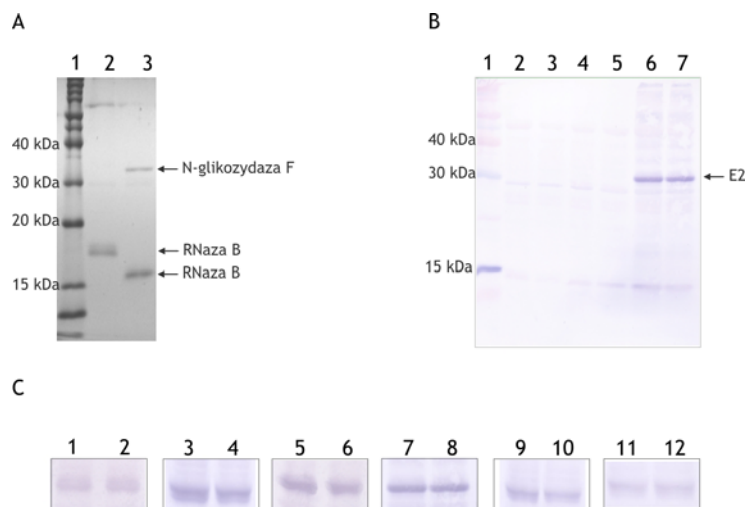
IV.2.3.3.3 Analiza glikozylacji białka E2

Ekspresja genu E2 w układzie roślinnym miała na celu uzyskanie białka modyfikowanego potranslacyjnie. Jak wiadomo, podczas infekcji HCV w organizmie człowieka, E2 ulega wielokrotnej glikozylacji [I.1.4]. Reszty cukrowcowe są zazwyczaj przyłączane do bocznej grupy aminowej reszt asparaginy, za pośrednictwem wiązań N-glikozydowych. Przeprowadzona wcześniej analiza elektroforetyczna preparatów białkowych wyizolowanych z liści tytoniu oraz z komórek *E. coli* wykazała, że białka E2 otrzymane w obu tych układach wykazują takie samo tempo migracji w żelu, odpowiadające białku o masie ok. 32 kDa [rysunek IV.30]. Tymczasem, w następstwie procesu glikozylacji, masa E2 wzrasta niemal dwukrotnie, osiągając 68 kDa zamiast 38 kDa, w przypadku białka o pełnej długości. Do detekcji E2 w preparatach z liści tytoniu metodą *western blot*, stosowano dostępne komercyjnie kozie przeciwciała poliklonalne. Są one uzyskiwane poprzez immunizację zwierząt białkiem E2

otrzymanym w linii komórek CHO (ang. *chinese hamster ovary*) [III.1.7]. Można zatem przypuszczać, iż antygen użyty do immunizacji był modyfikowany potranslacyjnie. Zastosowane przeciwciała powinny więc być zdolne do wiązania się także z glikozylowaną formą E2. Analiza *western blot* nie wykazała jednak obecności białek o masie wyższej niż 32 kDa [rysunek IV.29D, rysunek IV.30B], co sugerowało, iż w wybranym układzie ekspresyjnym E2 nie ulega modyfikacji. Na podstawie dostępnej charakterystyki zastosowanych przeciwciał nie można było jednoznacznie stwierdzić, czy oddziałują one z glikozylowaną formą E2, postanowiono zatem część uzyskanych preparatów poddać deglikozylacji. W przypadku powstawania glikozylowanych białek E2, deglikozylacja powinna powodować wzrost intensywności prążka odpowiadającego niemodyfikowanemu białku E2.

W celu przeprowadzenia reakcji deglikozylacji, wyizolowano białka obecne w liściach tytoniu, transformowanych wektorem kodującym E2 [III.2.20]. Ponieważ białko E2 było nierozpuszczalne, otrzymany po izolacji osad rozpuszczono w buforze D1, zawierającym SDS [III.1.9.4.1]. Następnie do roztworu dodano N-glikozydazę F [III.2.21, III.1.5, rysunek IV.31B]. Enzym ten katalizuje odcięcie wszystkich typów N-glikanów, przyłączonych do reszty asparaginy, pod warunkiem, że grupa oligosacharydowa jest złożona co najmniej z dwóch cząsteczek N-acetyloglukozaminy. Równocześnie jako reakcję kontrolną przeprowadzono w identycznych warunkach deglikozylację rybonukleazy B. Białko to posiada jedno miejsce N-glikozylacji i jest typowym substratem dla N-glikozydazy F [rysunek IV.31A]. Produkty reakcji analizowano metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących i techniką *western blot*. Uzyskane wyniki świadczą, że N-glikozydaza F zachowuje swoją aktywność w warunkach, w jakich prowadzone były reakcje [rysunek IV.31A]. Pojedynczy łańcuch oligosacharydowy rybonukleazy był efektywnie usuwany, co powodowało zmianę masy białka z ok. 17 kDa na ok. 15 kDa. W przypadku preparatów izolowanych z liści tytoniu, zaobserwowano taką samą intensywność prążka, odpowiadającego białku E2, bez względu na to, czy odpowiedni ekstrakt był poddany działaniu N-glikozydazy F, czy też nie [rysunek IV.31B]. Biorąc pod uwagę fakt, iż wydajność glikozylacji może zmieniać się w czasie, przeprowadzono analogiczne reakcje dla preparatów wyizolowanych 5, 7 i 10 dni po infiltracji [rysunek IV.31C]. Również tym razem, porównanie prób poddanych działaniu enzymu z próbami kontrolnymi, nie wykazało istotnych różnic. Poczynione obserwacje sugerują, iż w zastosowanym systemie ekspresyjnym białko E2 nie ulega glikozylacji, bądź że

modyfikowana jest zaledwie niewielka pula powstałych cząsteczek E2, znajdująca się poniżej poziomu detekcji zastosowanej metody.



Rysunek IV.31 Deglikozylacja preparatów białkowych zawierających białko E2.

(A) Badanie aktywności N-glikozydazy F wobec rybonukleazy B - wynik rozdziatu produktów reakcji w 15% żelu PAA. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - rybonukleazę B inkubowaną w buforze bez N-glikozydazy F (kontrola negatywna); 3 - rybonukleazę B inkubowaną w buforze zawierającym N-glikozydazę F. (B) Deglikozylacja białka E2 - analiza metodą *western blot*. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - preparat z liścia nieinfiltrowanego, inkubowany w buforze bez N-glikozydazy F; 3 - preparat z liścia nieinfiltrowanego, inkubowany w buforze zawierającym N-glikozydazę F; 4 - preparat z liścia infiltrowanego konstruktem kodującym GFP, inkubowany w buforze bez N-glikozydazy F; 5 - preparat z liścia infiltrowanego konstruktem kodującym GFP, inkubowany w buforze zawierającym N-glikozydazę F; 6 - preparat z liścia infiltrowanego konstruktem kodującym E2, inkubowany w buforze bez N-glikozydazy F; 7 - preparat z liścia infiltrowanego konstruktem kodującym E2, inkubowany w buforze zawierającym N-glikozydazę F. (C) Analiza metodą *western blot* deglikozylacji E2 w preparatach białkowych izolowanych z liści tytoniu. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono prążki odpowiadające białku E2, zawartemu w preparacie inkubowanym w buforze bez N-glikozydazy F (ścieżki 1, 3, 5, 7, 9, 11), bądź zawierającym N-glikozydazę F (ścieżki 2, 4, 6, 8, 10, 12). Ekstrakty z liści sporządzono po upływie 5 (ścieżki 1-4), 7 (ścieżki 5-10) lub 10 dni od infiltracji (ścieżki 11-12).

Podsumowanie. Przygotowano konstrukty umożliwiające przejściową ekspresję dwóch wariantów genu E2 w liściach tytoniu *Nicotiana benthamiana*. Wykazano, że białko E2 powstaje w roślinie i jest wykrywalne 5 dni po agroinfiltracji, natomiast poziom jego akumulacji jest najwyższy w 7. dniu po wprowadzeniu wektora ekspresyjnego. Na podstawie przeprowadzonych doświadczeń można ponadto sądzić, że w wybranym układzie białko E2 nie ulega charakterystycznej N-glikozylacji.

IV.2.3.4 Charakterystyka wybranych właściwości białka E2

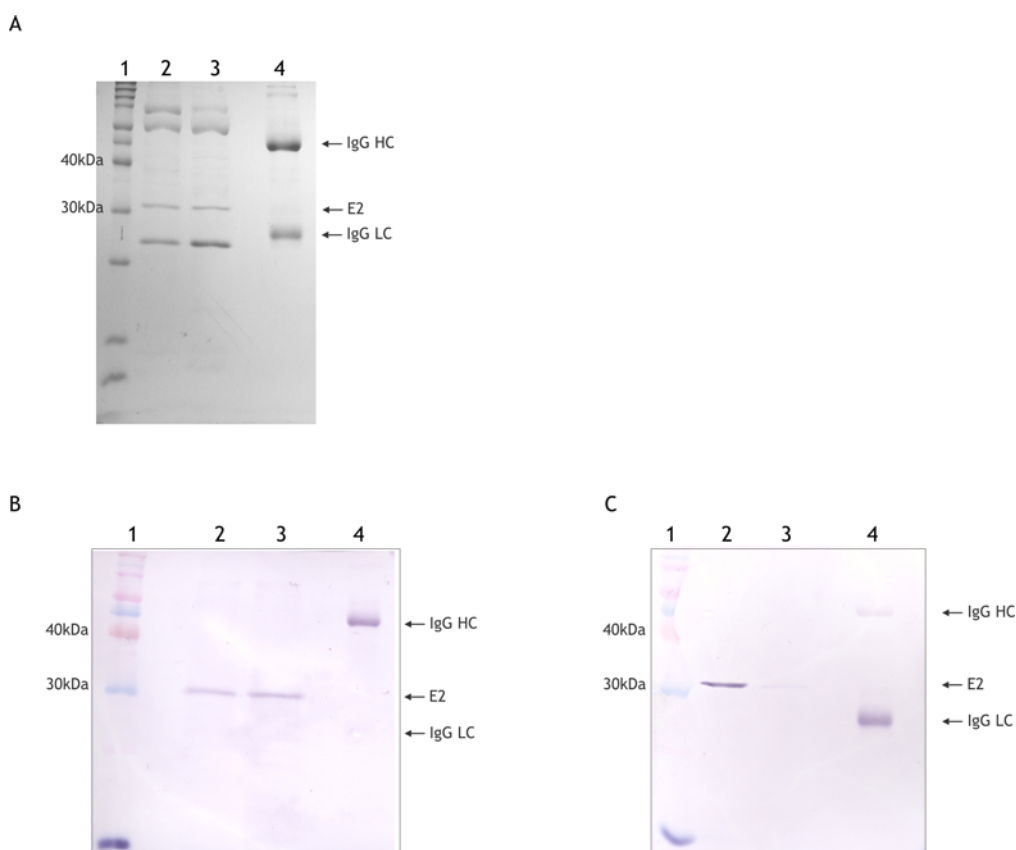
Analiza populacji wirusowych wykazała, że istnieje wariant białka E2 (sklonowany wariant E2-NR) charakterystyczny dla kilku quasi-gatunków obecnych u pacjentów, którzy nie zareagowali na terapię interferonem i rybawiryną. Co więcej, wariantu tego nie zidentyfikowano u żadnej z osób o przejściowej bądź trwałej

odpowiedzi na leczenie [IV.1.4]. Obserwacja ta sugeruje, że wariant E2-NR posiada cechy, które sprawiają, że jest on utrzymywany w niezależnych epidemiologicznie populacjach i znajduje się pod wpływem selekcji negatywnej [IV.2.2]. Celem dalszych badań było porównanie wybranych właściwości dwóch wariantów białka E2, otrzymanych metodą ekspresji w komórkach *E. coli* Origami B(DE3)pLysS. Bazując na danych literaturowych postanowiono poddać analizie: (i) podobieństwo strukturalne E2-SR i E2-NR do ludzkich immunoglobulin klasy IgG; (ii) zdolność przeciwciał obecnych w surowicach pacjentów do rozpoznawania obu wariantów E2 oraz (iii) oddziaływanie tych wariantów z receptorem CD81 limfocytów B.

IV.2.3.4.1 Podobieństwo strukturalne białka E2 do ludzkich immunoglobulin klasy IgG

Zakotwiczone w otocze wirionu białko E2 HCV jest głównym celem dla przeciwciał gospodarza. Jedną z niezwykłych cech HCV jest obserwowane podczas przewlekłej infekcji współistnienie we krwi chorego cząstek wirusa oraz skierowanych przeciw nim przeciwciał (zwykle pojawienie się specyficznych przeciwciał prowadzi do eliminacji krążących we krwi wirusów). Oznacza to, iż z jakichś przyczyn, wirus (lub niektóre z jego wariantów) są nierozpoznawane przez układ immunologiczny. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia literaturowe, w których postulowano, iż część zewnętrzna E2 może przyjmować strukturę przestrzenną, przypominającą domenę zmienną przeciwciał i receptorów limfocytów T (Hu *et al.*, 2005; Penin *et al.*, 2001). Co więcej, zaproponowano, że wirus może wykorzystywać mechanizm mimikry molekularnej do unikania odpowiedzi immunologicznej. Wiadomo bowiem, że organizm usuwa przeciwciała skierowane przeciwko własnym białkom. Opublikowane dane sugerują, iż wraz ze wzrostem stopnia podobieństwa białka E2 do immunoglobulin, maleje zdolność układu odpornościowego gospodarza do wytworzenia skutecznych przeciwciał anti-E2. Jednocześnie wydaje się prawdopodobne, że opisywane zjawisko ma związek z zaburzeniami autoimmunologicznymi, które często towarzyszą przewlekłej infekcji HCV (Hu *et al.*, 2005). W świetle tych doniesień zaplanowano zbadanie, czy wysoki stopień podobieństwa do immunoglobulin jest przyczyną utrzymywania charakterystycznego wariantu białka E2-NR w kilku quasi-gatunkach izolowanych od osób, które nie odpowiedziały na leczenie.

W celu określenia podobieństwa E2 do ludzkich immunoglobulin przeprowadzono analizę zdolności E2-SR i E2-NR do wiązania przeciwciał skierowanych przeciwko ludzkim IgG (anty-hIgG). Na podstawie danych literaturowych przyjęto, że rozpoznanie białka E2 przez przeciwciała anty-hIgG będzie świadczyło o strukturalnym podobieństwie pomiędzy E2 a hIgG (Hu *et al.*, 2005). Do badań wykorzystano preparaty E2 oczyszczone metodą chromatografii powinowactwa do jonów niklu [IV.2.3.2.7]. W preparatach tych oprócz E2 obecnych było kilka dodatkowych białek bakteryjnych, stanowiących wewnętrzną kontrolę specyficzności badanych oddziaływań. Próbki zawierające dwa warianty E2 oraz ludzkie immunoglobuliny klasy IgG rozdzielono metodą elektroforezy w 15% żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących [III.2.26], nakładając próby na żel dwukrotnie, w identycznym układzie. Następnie dokonano transferu białek na membranę PVDF. Przed przystąpieniem do kolejnego etapu analizy *western blot* [III.2.27], membranę przecięto na dwie części. W ten sposób, na każdej części membrany znajdowały się wszystkie trzy badane preparaty, tj. próbka zawierająca: E2-SR, E2-NR i hIgG. Jedną część membrany inkubowano w roztworze zawierającym stosowane wcześniej kozie przeciwciała poliklonalne przeciwko białku E2 HCV, a później w roztworze zawierającym odpowiednie przeciwciała drugorzędowe, sprzężone z fosfatazą alkaliczną [III.1.7]. Drugą część membrany inkubowano w roztworze kozich przeciwciał poliklonalnych przeciwko ludzkim immunoglobulinom IgG, również sprzężonych z fosfatazą alkaliczną [III.1.7]. Detekcję fosfatazy alkalicznej przeprowadzono dla obu części membrany jednocześnie. Eksperyment wykonany został w trzech niezależnych powtórzeniach.



Rysunek IV.32. Analiza podobieństwa dwóch wariantów białka E2 do ludzkich immunoglobulin.

(A) Wynik rozdziłu preparatów białkowych w 15% żelu poliakrylamidowym. W poszczególnych ścieżkach uwidoczniono: 1 - wzorzec mas Novex® Sharp Pre-Stained Protein Standards; 2 - preparat zawierający E2-SR; 3 - preparat zawierający E2-NR; 4 - preparat ludzkich immunoglobulin klasy IgG. HC - łańcuch ciężki, LC - łańcuch lekki. (B) Analiza badanych preparatów metodą *western blot*. Jako przeciwciała I-rzędowe zastosowano kozie immunoglobuliny poliklonalne przeciwko białku E2, a jako II-rzędowe - królicze przeciwciała poliklonalne przeciwko kozim immunoglobulinom, sprzężone z fosfatazą alkaliczną. Opis ścieżek jak na rysunku A. (C) Analiza badanych preparatów metodą *western blot*. Zastosowano kozie przeciwciała poliklonalne przeciwko ludzkim immunoglobulinom, sprzężone z fosfatazą alkaliczną. Opis ścieżek jak na rysunku A.

Zgodnie z oczekiwaniami, oba warianty białka E2 były rozpoznawane przez kozie przeciwciała anti-E2 [rysunek IV.32B]. Co ciekawe, te same przeciwciała wiązały się z łańcuchem ciężkim ludzkich immunoglobulin IgG. Zaskakujące, bo niezgodne z oczekiwaniami były natomiast rezultaty analizy wiązania przeciwciał anti-hIgG z dwoma wariantami białka E2. Stwierdzono, że wariant E2-SR jest przez nie znacznie lepiej rozpoznawany niż wariant E2-NR. W przypadku E2-NR reakcja z przeciwciałem była o wiele słabsza lub niemal niewykrywalna [rysunek IV.32C]. Dodatkowo zanotowano, że podstawowym celem tych przeciwciał w obrębie naturalnej cząsteczki docelowej, hIgG, jest jej łańcuch lekki.

Podsumowanie. Wyniki przeprowadzonych eksperymentów były zgodne z wcześniejszymi obserwacjami, iż E2 HCV może wykazywać podobieństwo do

ludzkich immunoglobulin. Wniosek ten nie dotyczy jednak wszystkich wariantów E2. W rezultacie wykonanych doświadczeń stwierdzono, że pomiędzy poszczególnymi wariantami E2 występują istotne różnice, kształtujące ich oddziaływanie z przeciwciałami anty-hIgG. Niespodziewanie, wariant E2-SR okazał się wykazywać znacznie wyższe podobieństwo do ludzkich IgG aniżeli wariant E2-NR. Tym samym można sądzić, iż upodabnianie się do immunoglobulin i wynikające stąd unikanie odpowiedzi humoralnej gospodarza najprawdopodobniej nie jest zasadniczym mechanizmem odpowiedzialnym za utrzymywanie wariantu E2-NR, charakterystycznego wyłącznie dla populacji izolowanych od osób, które nie odpowiedziały na leczenie. Dodatkowo, zaobserwowano interesującą zależność, wskazującą na możliwość reakcji krzyżowej pomiędzy przeciwciałami anty-E2 a łańcuchem ciężkim ludzkich immunoglobulin. Uzyskane wyniki wspierają pogląd, że pewne właściwości białka E2 mogą leżeć u podstaw zaburzeń autoimmunologicznych towarzyszących przewlekłemu zapaleniu wątroby typu C.

IV.2.3.4.2 Analiza powinowactwa przeciwciał anty-E2 występujących w surowicach pacjentów do E2-SR i E2-NR

Biorąc pod uwagę uzyskane wyniki, dotyczące stopnia podobieństwa obu wariantów białka E2 do ludzkich immunoglobulin klasy IgG, postanowiono sprawdzić, jak efektywnie E2-SR i E2-NR rozpoznawane są przez przeciwciała obecne we krwi pacjentów. Przed przystąpieniem do właściwych badań, przeprowadzono wstępne analizy, mające na celu wykazanie, że białko otrzymane w systemie bakteryjnym zachowuje charakterystyczne właściwości antygenowe. W tym celu, płytkę 96-dołkową do testu ELISA opłaszczono preparatem białkowym [III.2.28.1] zawierającym wariant E2-NR (preparat poddany dwóm etapom oczyszczania [IV.2.3.2.7, rysunek IV.27B]). Zastosowana procedura umożliwiała badanie oddziaływań pomiędzy antygenem unieruchomionym na płytce a przeciwciałami. W tym przypadku posłużono się kozimi przeciwciałami anty-E2, otrzymanymi wskutek immunizacji zwierząt białkiem uzyskanym w linii komórek CHO (przeciwciała używane wcześniej do identyfikacji E2 metodą *western blot*). W drugim etapie zastosowano królicze przeciwciała przeciwko kozim immunoglobulinom IgG, sprzężone z peroksydazą chrzanową [III.1.7]. Następnie podano mieszaninę chromogenu/substratu. Jeżeli w próbce obecny był kompleks zawierający antygen, przeciwciało I-rzędowe oraz przeciwciało II-rzędowe, to następowała reakcja enzymatyczna. Peroksydaza redukowała substrat (nadtlenek

wodoru w buforze cytrynianowym), który utleniał chromogen (tetrametylobenzydynę), czego skutkiem było powstanie niebieskiego zabarwienia próby. Barwa niebieska przechodziła w żółtą po dodaniu roztworu hamującego. Intensywność zabarwienia mierzono spektrofotometrycznie. Jednocześnie przeprowadzono szereg reakcji kontrolnych, w których: (i) przeciwciała nałożono do dołka niezawierającego białka, (ii) inkubowano białko bez przeciwciał, (iii) inkubowano białko z samym tylko przeciwciałem I-rzędowym, (iv) inkubowano białko z samym przeciwciałem II-rzędowym. Na podstawie przeprowadzonego testu stwierdzono, że E2 było specyficznym wykrywane przez zastosowane przeciwciała I-rzędowe. Otrzymany wynik sugerował więc, że białka uzyskane na drodze ekspresji w komórkach bakteryjnych zachowują przynajmniej część właściwości antygenowych białek otrzymanych w komórkach ssaczy.

W kolejnym etapie, za pomocą standardowego testu dignostycznego firmy DiaSorin [III.2.28.2], potwierdzono obecność przeciwciał anti-HCV we krwi badanych osób. Analizy te przeprowadzono w Pracowni Diagnostyki Chorób Wirusowych przy Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego, we współpracy z dr hab. n. med. Magdaleną Figlerowicz. Dysponowano surowicami pacjentów: P2-02, P2-04, P2-05, P2-10, P2-17, P2-18, P2-19, P2-20, P2-22, P2-23, P2-24 oraz P2-28. Próbkę te zostały pobrane tuż przed rozpoczęciem terapii (T0), z wyjątkiem surowic pochodzących od dzieci P2-10 i P2-28, które pobrano po dwóch tygodniach trwania leczenia (T2). Zastosowany test zawiera płytkę opłaszczoną antygenami fuzyjnymi, reprezentującymi wirusowe białka strukturalne i niestukturalne: C, E1, E2, NS3, NS4A, NS4B i NS5A. Na płytkę nanoszona jest dziesięciokrotnie rozcieńczona surowica pobrana od pacjenta. Jeżeli są w niej obecne przeciwciała anti-HCV, to przyłączają się one do antygenów unieruchomionych na płytce. Obecność przeciwciał anti-HCV wykrywana jest w kolejnych etapach, za pomocą sprzężonych z peroksydazą chrzanową mysich przeciwciał monoklonalnych skierowanych przeciwko ludzkim immunoglobulinom. Podanie chromogenu/substratu wywołuje reakcję barwną, której intensywność mierzona jest spektrofotometrycznie. Otrzymany wynik pomiaru porównuje się z wartościami uzyskanymi dla zawartej w zestawie kontroli pozytywnej i negatywnej. Na podstawie dwóch wykonanych powtórzeń stwierdzono, iż przeciwciała anti-HCV były obecne u większości, jednak nie u wszystkich badanych osób – w przypadku pacjentów P2-05, P2-10 i P2-28 wynik testu był negatywny [tabela IV.5]. Najprawdopodobniej przyczyną

takiego stanu rzeczy było leczenie immunosupresyjne, któremu wcześniej poddano dzieci, w związku z wykrytą u nich chorobą nowotworową [tabela IV.1].

Po wykonaniu wstępnych analiz, przystąpiono do właściwego testu, mającego na celu stwierdzenie, czy w surowicach pacjentów obecne są przeciwciała skierowane przeciwko dwóm uzyskanym wcześniej wariantom białka E2 [III.2.28.2]. W tym celu do dołków płytki naniesiono preparat białkowy zawierający wariant E2-SR lub wariant E2-NR. Po opłaszczeniu płytki antygenami, w poszczególnych dołkach umieszczono rozcieńczone surowice pacjentów. Dla każdej serii testów (dla każdego z dwóch wariantów antygeny E2) przygotowano także próbę ślepą (bez surowicy) oraz trzy kontrole negatywne, zawierające surowicę pobraną od osoby niezakażonej HCV i nieposiadającej przeciwciał przeciwko temu wirusowi. W dalszych etapach doświadczenia posłużono się odczynnikami z zestawu firmy DiaSorin. Uzyskane wyniki pomiaru spektrofotometrycznego normalizowano w każdej serii testów względem odpowiedniej ślepej próby. Próbę badaną traktowano jako pozytywną wówczas, gdy wartość pomiaru przekraczała trzykrotnie średnią wartość trzech kontroli negatywnych. Całe doświadczenie wykonano w dwóch powtórzeniach.

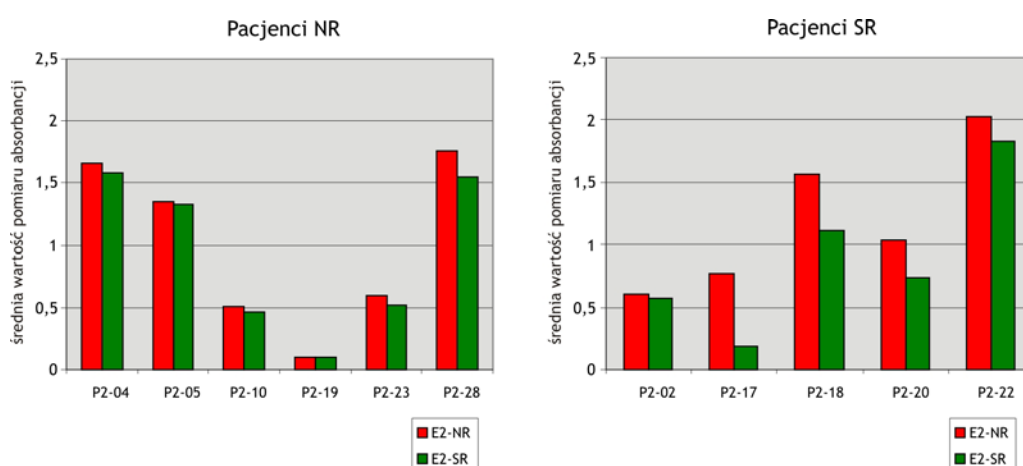
Tabela IV.5. Wyniki testów ELISA

Pacjent	Wynik leczenia	Wynik testu anty-HCV	Wynik testu anty-E2-SR	Wynik testu anty-E2-NR
P2-02	SR ⁽¹⁾	POZ ⁽²⁾	POZ	POZ
P2-04	NR ⁽³⁾	POZ	POZ	POZ
P2-05	NR	NEG ⁽⁴⁾	POZ	POZ
P2-10	NR	NEG	POZ	POZ
P2-17	SR	POZ	NEG	POZ
P2-18	SR	POZ	POZ	POZ
P2-19	NR	POZ	NEG	NEG
P2-20	SR	POZ	POZ	POZ
P2-22	SR	POZ	POZ	POZ
P2-23	NR	POZ	POZ	POZ
P2-24	TR ⁽⁵⁾	POZ	NEG	NEG
P2-28	NR	NEG	POZ	POZ

⁽¹⁾ trwała odpowiedź na terapię; ⁽²⁾ wynik pozytywny; ⁽³⁾ brak odpowiedzi; ⁽⁴⁾ wynik negatywny; ⁽⁵⁾ odpowiedź przejściowa

U większości pacjentów zidentyfikowano obecność przeciwciał przeciwko obu badanym wariantom E2 [tabela IV.5]. Niespodziewanie, wynik był pozytywny również

u osób, u których wcześniej nie wykryto przeciwciał anti-HCV za pomocą dostępnego komercyjnie testu. Szczegółowa analiza danych z pomiarów spektrofotometrycznych wykazała, iż powinowactwo przeciwciał pacjentów względem białka E2 jest podobne niezależnie od rezultatu terapii (brak odpowiedzi bądź trwała odpowiedź³). Choć występowaly wahania wartości absorbancji pomiędzy poszczególnymi surowicami [rysunek IV.33], to jednak średnie dla obu grup pacjentów były bardzo zbliżone [tabela IV.6, średnia dla dwóch wariantów E2 łącznie]. Także wynik negatywny testu, czyli brak przeciwciał przeciwko przynajmniej jednemu z dwóch wariantów E2, zanotowano zarówno dla pacjenta NR, jak i SR.



Rysunek IV.33. Oddziaływanie przeciwciał obecnych w surowicach pacjentów z dwoma wariantami białka E2 (E2-NR i E2-SR)

Na wykresach przedstawiono średnie wartości pomiarów absorbancji uzyskane w testach ELISA, w których badano oddziaływanie przeciwciał obecnych w surowicach pacjentów z dwoma wariantami białka E2, otrzymanymi na drodze ekspresji w komórkach *E. coli* Origami B(DE3)pLysS. Z lewej strony zaprezentowano dane uzyskane dla surowic pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na leczenie (NR), z prawej - dla surowic pacjentów wykazujących trwałą odpowiedź (SR). Słupki wykresu oznaczono kolorami: czerwonym - wartości pomiaru dla antygeny E2-NR, zielonym - dla antygeny E2-SR.

Tabela IV.6. Średnie wyniki pomiarów absorbancji w próbach pochodzących od pacjentów z dwóch grup, dla obu wariantów antygeny E2

	Pacjenci NR ⁽¹⁾	Pacjenci SR ⁽²⁾
średnia dla obu wariantów E2 łącznie	0,9603	1,0447
średnia dla E2-NR	0,9963	1,2028
średnia dla E2-SR	0,9244	0,8866
średnia różnica [E2-NR] - [E2-SR]	0,0718	0,3162

⁽¹⁾ brak odpowiedzi na terapię; ⁽²⁾ trwała odpowiedź

³ Z analizy tej wyłączono osoby o przejściowej odpowiedzi na leczenie, ponieważ dysponowano surowicą tylko od jednego takiego pacjenta.

W przypadku dzieci P2-02 i P2-05 podczas testu badano układ, w którym zarówno antygen E2, jak i przeciwciała pochodziły od tej samej osoby. Warianty E2-SR i E2-NR otrzymano bowiem w wyniku ekspresji genu wyizolowanego z surowicy, odpowiednio, pacjenta P2-02 i P2-05. W pozostałych próbach testowano układy heterologiczne, w których antygeny na płycie różniły się od wariantów E2 zidentyfikowanych wcześniej podczas analizy poszczególnych populacji wirusowych. Na podstawie uzyskanych rezultatów stwierdzono, że w surowicach pacjentów występują przeciwciała zdolne rozpoznać oba warianty białka E2. Oznacza to, iż u badanych osób powstały przeciwciała posiadające zdolność rozpoznawania także takich wariantów E2, których u nich nie zidentyfikowano. Może to świadczyć o tym, iż wykrywane w teście przeciwciała skierowane są na zachowawcze epitopy antygeny.

Interesującą obserwację poczyniono, analizując zdolność przeciwciał pacjentów do oddziaływania z każdym z dwóch badanych wariantów białka E2. Stwierdzono, iż reakcja przeciwciał była słabsza względem wariantu E2-SR, zarówno u pacjentów wykazujących trwałą odpowiedź na leczenie, jak i u osób, u których terapia nie przyniosła rezultatu. Co ciekawe, efekt ten był widoczny przede wszystkim u dzieci wyleczonych [tabela IV.6, średnia różnica [E2-NR] – [E2-SR]]. W przypadku pacjenta P2-17 zanotowano nawet brak przeciwciał przeciwko temu wariantowi, przy jednoczesnej obecności immunoglobulin skierowanych przeciwko E2-NR. W świetle otrzymanych wcześniej wyników można sądzić, iż prawdopodobną przyczyną niższego powinowactwa przeciwciał do E2-SR jest wyższy stopień podobieństwa tego białka do ludzkich immunoglobulin klasy IgG.

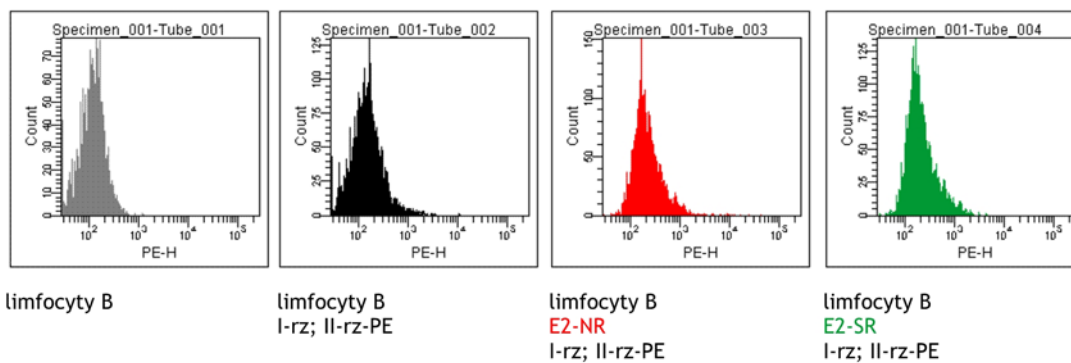
Podsumowanie. Na podstawie przeprowadzonej analizy białka E2 metodą ELISA, stwierdzono specyficzną reakcję kozich przeciwciał anti-E2 (otrzymanych wskutek immunizacji zwierząt białkiem produkowanym w linii komórek CHO) wobec białek E2-NR i E2-SR uzyskanych w komórkach *E. coli* Origami B(DE3)pLysS. Sugeruje to, że zachowują one przynajmniej część właściwości antygenowych białek uzyskanych w komórkach ssaczy. W dalszym etapie zbadano oddziaływanie E2-SR i E2-NR z przeciwciałami obecnymi we krwi pacjentów. Wykazano, że w surowicach występują przeciwciała rozpoznające oba warianty E2. Są one najprawdopodobniej skierowane przeciwko zachowawczym epitopom białka. Przeciwciała obecne we krwi pacjentów wykazywały niższą specyficzność wobec wariantu E2-SR, aniżeli wobec E2-NR. Zjawisko to tłumaczyć można wyższym podobieństwem E2-SR do ludzkich

immunoglobulin. Efekt ten był widoczny głównie w przypadku surowic pochodzących od pacjentów wykazujących trwałą odpowiedź na leczenie.

IV.2.3.4.3 Wstępna analiza wiązania białka E2 z receptorem CD81 limfocytów B

Podstawową funkcją białka E2 jest przyłączanie się do receptorów komórkowych, w tym do CD81 [I.1.4]. W ostatnich latach pojawiły się doniesienia literaturowe sugerujące, że oddziaływanie pomiędzy E2 a CD81 na powierzchni limfocytów B uruchamia szlak prowadzący do zwiększenia polimorfizmu immunoglobulin i w rezultacie do powstawania przeciwciał o obniżonym powinowactwie do białka E2 (Machida *et al.*, 2008). Postanowiono zatem określić, czy uzyskane warianty E2 wykazują różną zdolność wiązania receptorów CD81.

Badania te przeprowadzono w Zakładzie Immunologii Nowotworów Wielkopolskiego Centrum Onkologii, we współpracy z dr hab. n. med. Dariuszem Kowalczykiem. Ponownie posłużono się preparatami zawierającymi białka E2-NR i E2-SR, uzyskane w komórkach *E. coli* Origami B(DE3)pLysS (preparaty poddane dwóm etapom oczyszczania [rysunek IV.27B]). Preparaty te inkubowano z limfocytami B, transformowanymi wirusem Eppsteina-Barr [III.2.29]. Następnie dodano do nich stosowanych uprzednio przeciwciał anty-E2 (I-rz), a w dalszym etapie przeciwciał drugorzędowych, sprzężonych z fikoerytryną (II-rz-PE). Jednocześnie przygotowano dwie próby kontrolne: jedna zawierała same tylko limfocyty B, druga – komórki inkubowane z przeciwciałami pod nieobecność preparatu E2. Jeżeli białko E2 wiązało się z receptorem CD81, wówczas w kolejnych etapach dochodziłoby do powstania na powierzchni komórek kompleksu CD81:E2:I-rz:II-rz-PE. Ze względu na obecność fikoerytryny przyłączonej do przeciwciała drugorzędowego, limfocyty takie powinny wykazywać podwyższony poziom fluorescencji w stosunku do komórek, do których nie przyłączyło się białko E2 (Rosa *et al.*, 1996). Pomiaru fluorescencji limfocytów dokonano przy użyciu cytometru przepływowego FACSCanto firmy BD Biosciences. Wartości otrzymane dla obu preparatów E2 porównano z wartościami odnoszącymi się do prób kontrolnych. Doświadczenie wykonano w dwóch niezależnych powtórzeniach.



średnia fluorescencja: 131 średnia fluorescencja: 197 średnia fluorescencja: 329 średnia fluorescencja: 265

Rysunek IV.34. Oddziaływanie dwóch wariantów białka E2 z receptorem CD81 limfocytów B - wyniki pomiaru poziomu fluorescencji.

Limfocyty B inkubowano z białkiem E2-NR lub E2-SR oraz odpowiednimi przeciwciałami: kozimi poliklonalnymi przeciwko białku E2 (I-rz) oraz króliczymi przeciwko kozim immunoglobulinom IgG, sprzężonymi z fikoerytryną (II-rz-PE). Dodatkowo, przygotowano dwie próby kontrolne (i) zawierającą same limfocyty B oraz (ii) zawierającą limfocyty inkubowane z przeciwciałami pod nieobecność białka E2. Na wykresach przedstawiono wyniki pomiaru fluorescencji, dokonanego za pomocą cytometru przepływowego FACSCanto. Na osi rzędnych zaznaczono liczbę komórek, na osi odciętych - intensywność fluorescencji. Dodatkowo pod wykresami umieszczono wartość parametru średniej fluorescencji dla każdej z czterech prób.

W próbach, w których obecne było białko E2, stwierdzono nieznaczny wzrost fluorescencji w stosunku do limfocytów inkubowanych z samymi tylko przeciwciałami [rysunek IV.34]. Oznacza to, iż badane białka w niewielkim stopniu wiązały się z receptorem na powierzchni limfocytów. Na uzyskany wynik nie wpłynęło również dziesięciokrotne zwiększenie ilości stosowanego preparatu białkowego (do 10 µg). Porównanie średniej wartości fluorescencji pozwoliło stwierdzić, że była ona wyższa dla komórek inkubowanych z E2-NR aniżeli z E2-SR [rysunek IV.34].

Podsumowanie. Przeprowadzono analizę wiązania otrzymanych wariantów białka E2 z receptorem CD81 limfocytów B. Jak wykazał pomiar fluorescencji, oba warianty w niewielkim stopniu wiązały się z receptorem. Chociaż wykonane badania mają zaledwie wstępny charakter, uzyskane wyniki stanowią jednak przesłankę wskazującą, że warianty E2 mogą różnić się pod względem powinowactwa do receptora na powierzchni limfocytów. Wariant E2-NR wykazywałby wówczas większą zdolność do wiązania z receptorem niż wariant E2-SR. Aby rozstrzygnąć tę kwestię niezbędne są jednak dalsze badania. Na podstawie danych literaturowych można sądzić, iż analiza oddziaływania E2 z CD81 na powierzchni limfocytów B wymaga zastosowania w pełni modyfikowanych białek.

V Dyskusja

Podstawowym celem niniejszej pracy było określenie najistotniejszych czynników kształtujących strukturę populacji wirusowej podczas przewlekłego zapalenia wątroby typu C. W ramach tak zarysowanego zagadnienia, zamierzano zarówno zidentyfikować mechanizmy warunkujące zmienność wybranych rejonów genomu HCV, jak i określić wpływ obserwowanych zmian na patogenność wirusa i jego odporność na stosowane leczenie.

V.1 Analiza struktury quasi-gatunku HCV

Pierwszy etap badań obejmował szczegółową analizę struktury quasi-gatunków HCV. Pochodziły one od dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Wszyscy pacjenci zostali poddani terapii skojarzonej interferonem i rybawiryną, bądź pegylowanym interferonem i rybawiryną [IV.1]. W światowej literaturze znajduje się coraz więcej doniesień poświęconych analizie populacji HCV a szczególnie jej związków z wynikami leczenia przeciwwirusowego (Chambers *et al.*, 2005; Farci *et al.*, 2002; Moreau *et al.*, 2008; Puig-Basagoiti *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2004). Jednakże tylko nieliczne odnoszą się do charakterystyki quasi-gatunku tego wirusa u dzieci. Dodatkowo, niektóre z nich dotyczą zmian zachodzących w strukturze populacji wirusowej u pacjentów niepoddanych leczeniu (Farci *et al.*, 2006; Gerotto *et al.*, 2006). Co więcej, w części tych prac opisano wyniki badań u osób zakażonych jednocześnie HCV i HIV (Canobio *et al.*, 2004; Quesnel-Vallieres *et al.*, 2008). Prezentowana w niniejszej rozprawie analiza jest zatem najprawdopodobniej pierwszym opisem struktury quasi-gatunków HCV u ponad 20 dzieci z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C, poddanych terapii skojarzonej. Także liczba pacjentów, a tym samym liczba badanych quasi-gatunków, należy do największych w analogicznych badaniach.

Spośród wielu metod analizy quasi-gatunku HCV [I.2.3] zastosowano klonowanie i sekwencjonowanie wybranych fragmentów genomu uzyskanych metodą RT-PCR. Podejście to nie tylko dobrze charakteryzuje populację wirusową (Gomez *et al.*, 1999), lecz także jako jedyne dostarcza pełnej informacji o sekwencji reprezentujących ją wariantów – umożliwia zatem przeprowadzenie szerszej zakrojonych badań. Na początku wyselekcjonowano reprezentatywne rejony genomu HCV. Podstawę do dokonania tego wyboru stanowiła analiza filogenetyczna pełnych sekwencji genomowych wirusa, zdeponowanych w internetowej bazie danych.

Dodatkowo wzięto pod uwagę rolę, jaką poszczególne białka HCV pełnią w jego cyklu replikacyjnym i oddziaływaniach z białkami gospodarza. W rezultacie wybrano dwa rejony: AF, obejmujący fragmenty genów E1/E2, i IFN-R, zlokalizowany w obrębie genu NS5A. Analogiczne odcinki genomu HCV były także podstawą podobnych analiz dokonanych przez innych badaczy dla populacji HCV u dorosłych (Farci *et al.*, 2002; Pawlotsky *et al.*, 1998a) i u dzieci (Farci *et al.*, 2006; Quesnel-Vallieres *et al.*, 2008).

Wszystkie badane populacje wirusowe zostały dobrane w taki sposób, by reprezentowały ten sam podtyp HCV, 1a. Obecnie wiadomo, że przynależność wirusa do określonego genotypu w istotny sposób wpływa na przebieg zakażenia oraz skuteczność terapii (Amoroso *et al.*, 1998; Fried *et al.*, 2002; Manns *et al.*, 2001; Pearlman, 2004). Obserwacja ta znajduje swoje odzwierciedlenie w stosowanych rutynowo schematach terapeutycznych, zgodnie z którymi leczenie infekcji HCV-1 trwa 48 tygodni, podczas gdy HCV-2 lub HCV-3 – 24 tygodnie. Tymczasem w niektórych przeprowadzonych do tej pory analizach quasi-gatunku HCV, populacje wirusowe reprezentowały różne podtypy (Chambers *et al.*, 2005), a nawet genotypy (Farci *et al.*, 2006; Farci *et al.*, 2002). W przeciwieństwie do nich, inne badania dotyczyły populacji należących do jednego podtypu (Pawlotsky *et al.*, 1998a; Puig-Basagoiti *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2004). W świetle powyższych danych wydaje się jednak jasne, iż poszczególne genotypy istotnie różnią się właściwościami determinującymi infekcyjność i/lub oddziaływania wirus-gospodarz. W związku z tym, wszelkie porównania cech populacji wirusowych o różnej przynależności systematycznej mogą przynosić niejednoznaczne wyniki. W takich przypadkach nie wiadomo bowiem, czy u podłoża obserwowanych zjawisk lub zależności leżą cechy quasi-gatunku, czy raczej cechy właściwe dla genotypu. W rezultacie słusznym wydaje się prowadzenie analiz populacji HCV dla każdego genotypu, bądź nawet podtypu, oddzielnie.

Analiza bioinformatyczna uzyskanych sekwencji aminokwasowych odcinka AF wykazała istnienie różnic pomiędzy populacjami HCV, pochodzącymi od osób o różnej odpowiedzi na terapię. Co więcej, okazało się, iż różnice te – widoczne zwłaszcza przed rozpoczęciem leczenia – warunkowane są w głównej mierze przez rejon HVR1. Zidentyfikowano dwa typy quasi-gatunków wirusowych o odmiennym poziomie polimorfizmu: homogenne populacje obecne u pacjentów niewykazujących odpowiedzi na leczenie i zróżnicowane u osób z trwałą odpowiedzią. Obserwacje te różnią się od opublikowanych danych, dotyczących zależności pomiędzy stopniem zróżnicowania populacji HCV a odpowiedzią na leczenie u dorosłych pacjentów. Z szeregu doniesień

wynika bowiem, iż poziom zmienności quasi-gatunku HCV wyznaczony na podstawie analogicznego rejonu genomu jest niższy u osób, z trwałą odpowiedzią wirusologiczną (Moreau *et al.*, 2008; Pawlotsky *et al.*, 1998b; Ueda *et al.*, 2004). Sugerowano, że większe zróżnicowanie umożliwia wirusowi przetrwanie w organizmie gospodarza mimo stosowanych leków. W ostatnim czasie pojawiło się jednak jedno doniesienie mówiące, iż poziom zróżnicowania quasi-gatunku osób SR może być wyższy, niż u pacjentów NR. Badania te dotyczyły jednak polimorfizmu genu NS5B (Cannon *et al.*, 2009).

Jak już wcześniej wspomniano ilość danych opisujących strukturę populacji HCV u dzieci jest bardzo ograniczona. Stwierdzono między innymi, iż populacje te są początkowo homogenne, a ich zróżnicowanie wzrasta stopniowo wraz z wiekiem dziecka i następującym równoległym rozwojem jego układu immunologicznego (Gerotto *et al.*, 2006). Podobnej zależności nie zaobserwowano jednak w przypadku badanej grupy pacjentów, w której znalazły się dzieci w wieku od 8. do 17. roku życia. Występowanie homogennej populacji HCV stwierdzono także u dorosłych i dzieci z zaburzeniami humoralnej odpowiedzi immunologicznej (Gaud *et al.*, 2003). U tych osób, mimo upływu czasu, odcinek HVR1 był stabilny bądź ulegał tylko niewielkim zmianom, co sugeruje, iż istotną rolę w kształtowaniu jego polimorfizmu pełni presja selekcyjna, wywierana przez przeciwciała. Spośród 23 pacjentów od których pochodziły badane quasi-gatunki HCV, trzy osoby były w przeszłości poddane leczeniu immunosupresyjnemu [tabela IV.1]. Wszystkie należały do grupy NR, w której populacje HCV były homogenne. Poziom zróżnicowania quasi-gatunków wirusowych pochodzących od osób poddanych immunosupresji nie odbiegał jednakże od zróżnicowania innych populacji, obecnych u pozostałych pacjentów NR. Można zatem przyjąć, że niski poziom zmienności rejonu HVR1 u dzieci niewykazujących odpowiedzi na leczenie najprawdopodobniej nie jest związany z ich wiekiem ani dysfunkcjami układu odpornościowego.

W ostatnich latach zaproponowano, że poziom polimorfizmu rejonu HVR1 może zależeć od tego, który z rodzajów odpowiedzi immunologicznej – komórkowa czy humoralna – przeważa. Sugestię tę wysunięto po dokonaniu analizy populacji HCV u noworodków zakażonych w okresie okołoporodowym. Stwierdzono, iż wysoce homogenne populacje są obecne u dzieci, u których występuje znacznie podniesiony poziom aktywności AlAT. Zróżnicowane quasi-gatunki zidentyfikowano natomiast u pacjentów o niskim poziomie aktywności tej aminotransferazy. Ponieważ poziom

aktywności ALAT koreluje ze stopniem uszkodzenia wątroby wysunięto przypuszczenie, że homogenne populacje są charakterystyczne dla pacjentów, u których przeważa odpowiedź cytotoksyczna. Jednocześnie zaproponowano, iż zróżnicowane populacje HCV powstają wskutek przewagi odpowiedzi humoralnej, która wymusza tworzenie nowych wariantów HVR1 (Farci *et al.*, 2006). W badaniach tych analizowano jednak dane uzyskane dla różnych genotypów HCV, stąd przedstawione wyniki pozostają niejednoznaczne. Choć nie zostało to zaprezentowane w niniejszej rozprawie, w naszym zespole przeprowadzono jednak analizę zależności pomiędzy średnią odległością Hamminga populacji HCV a poziomem aktywności ALAT u wybranych pacjentów z badanej grupy. Stwierdzono brak istotnej korelacji tych dwóch parametrów (Wąsik *et al.*, 2009). Niedawno opublikowane zostały dane na temat struktury populacji HCV u dwojga dzieci zakażonych okołoporodowo. U obojga zanotowano wysoką zachowawczość odcinka HVR1 w pięcioletnim okresie obserwacji, mimo braku jakichkolwiek zaburzeń funkcjonowania układu odpornościowego (Gismondi *et al.*, 2009). Z innych doniesień wiadomo, że pięć lat jest z pewnością wystarczającym czasem, w którym polimorfizm populacji HCV u dzieci może wzrosnąć (Ni *et al.*, 1997). Autorzy sugerują zatem, iż u podłoża zaobserwowanego zjawiska może leżeć tolerancja immunologiczna lub optymalne przystosowanie wirusa do panujących warunków (Gismondi *et al.*, 2009). Wyniki zaprezentowane w niniejszej rozprawie wspierają tę drugą hipotezę. Wydaje się bowiem, że homogenne populacje wirusowe zawierają warianty o szczególnych właściwościach, umożliwiającym im przetrwanie w organizmie pacjenta. Zidentyfikowano kilka wariantów rejonu HVR1, charakterystycznych dla populacji występujących u osób, które nie zareagowały na leczenie. Jeden z nich obecny był w aż w pięciu niezależnych epidemiologicznie quasi-gatunkach, co jest szczególnie zaskakujące w kontekście znanej zmienności wirusów RNA. Wyraźnie wskazuje to więc, iż posiadał on cechy, które okazały się optymalne do przetrwania u kilku różnych osób. Można zatem przypuszczać, że populacje wirusowe gwałtownie ewoluują tylko do momentu wytworzenia wariantu najlepiej przystosowanego do danych warunków. Jeżeli wariant taki zostanie wyselekcjonowany wówczas zdominuje on całą populację (staje się ona jednorodna), jeżeli jednak nie powstanie, wówczas w organizmie chorego występuje wiele różnych suboptymalnych wariantów. Ta ostatnia sytuacja najprawdopodobniej miała miejsce w przypadku silnie polimorficznych quasi-gatunków, obecnych u osób wykazujących trwałą odpowiedź na terapię. W żadnej z tych populacji nie zidentyfikowano jednak

wariantów charakterystycznych dla pacjentów NR, które można uznać za „optymalne”. Tworzone warianty były najprawdopodobniej gorzej przystosowane do warunków panujących w organizmie gospodarza, co spowodowało, iż zostały wyeliminowane w następstwie leczenia. Analogicznie można sądzić, że w populacjach HCV obecnych u osób, które nie zareagowały na terapię, powstały najlepiej przystosowane warianty, które okazały się zdolne do przetrwania mimo zastosowanych leków. Ponieważ posiadały one korzystne cechy, presja selekcyjna zaczęła działać w kierunku ich utrzymania, jednocześnie eliminując inne warianty, co doprowadziło do spadku poziomu zróżnicowania quasi-gatunków. Ta obserwacja sugeruje ponadto, że warianty odporne na leczenie mogą być obecne w organizmie pacjenta jeszcze przed rozpoczęciem terapii.

Częstym celem badań nad strukturą quasi-gatunków HCV jest znalezienie cech różnicujących populacje obecne u osób, które w odmienny sposób reagują na leczenie. Można by wówczas uzupełnić listę czynników pozytywnej prognozy terapii, co prawdopodobnie przyczyniłoby się do korzystnych zmian w procesie kwalifikacji pacjentów do leczenia. Otrzymane w ramach niniejszej rozprawy wyniki sugerują, że istnieje związek pomiędzy strukturą populacji HCV u dzieci, wyznaczoną na podstawie rejonu HVR1 przed rozpoczęciem terapii, a wynikiem leczenia. Z pewnością pożądane byłoby rozszerzenie tych badań w przyszłości o kolejne grupy pacjentów. W przypadku potwierdzenia uzyskanych wyników można by rozważyć wprowadzenie takiej analizy jako dodatkowego czynnika pomocniczego w procesie kwalifikacji dzieci do terapii skojarzonej.

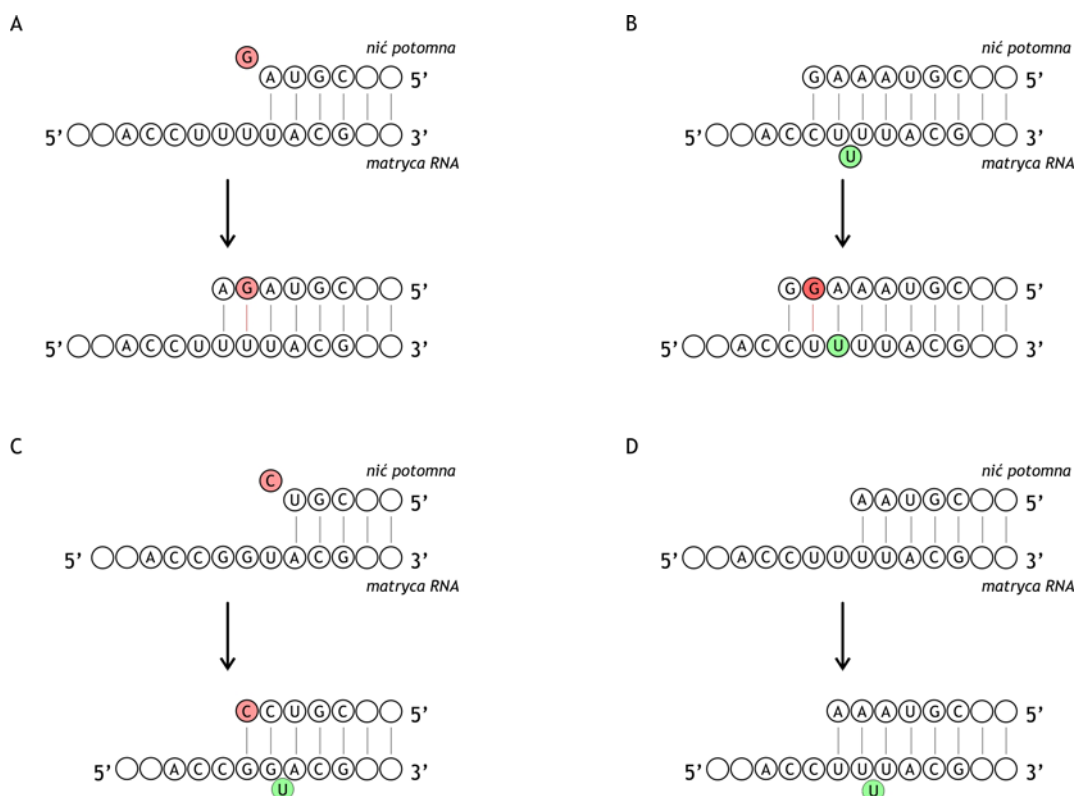
Białko NS5A, oprócz współtworzenia kompleksu replikacyjnego HCV, pełni istotną rolę w oddziaływaniach wirus-gospodarz. Zidentyfikowano w nim rejon przypuszczalnie zaangażowany w inaktywację jednego z białek odpowiedzi interferonowej, kinazy białkowej R (Gale *et al.*, 1998). W związku z tym przeprowadzono szereg badań, mających na celu określenie zależności pomiędzy występowaniem określonych reszt aminokwasowych lub polimorfizmem NS5A a rezultatem terapii (Enomoto *et al.*, 1995; Enomoto *et al.*, 1996; Pawlitsky *et al.*, 1998a; Puig-Basagoiti *et al.*, 2005; Ueda *et al.*, 2004). W niniejszej rozprawie opisano wyniki analizy populacji wirusowych, przeprowadzonych na podstawie kluczowych fragmentów NS5A (ISDR, PKR, V3) i zestawiono je z wynikami uzyskanymi na bazie rejonu HVR1. Co ciekawe, nie zanotowano różnic pomiędzy poziomem zmienności odcinków NS5A w wybranych populacjach wirusowych. Struktura quasi-gatunków

scharakteryzowana na podstawie tych rejonów odzwierciedlała ich niski poziom zmienności. Tym samym, nie zaobserwowano żadnej zależności pomiędzy strukturą populacji wirusowej a odpowiedzią pacjenta na terapię. Wynik ten potwierdza wcześniejsze obserwacje, iż poziom zmienności HCV nie jest jednakowy w obrębie całego genomu, lecz ulega znacznym wahaniom (Simmonds, 2004). Biorąc pod uwagę doniesienia literaturowe można ponadto sądzić, że w przypadku białka NS5A istotne znaczenie dla odporności na terapię interferonową może mieć, obok liczby mutacji, także występowanie konkretnych reszt aminokwasowych.

V.2 Czynniki kształtujące strukturę quasi-gatunku HCV

V.2.1 Wpływ struktury RNA i presji selekcyjnej

Na podstawie licznych doniesień literaturowych można było sądzić, że jednym z czynników determinujących polimorfizm HCV jest lokalna struktura RNA. Wiadomo bowiem, że struktura matrycy, obok właściwości polimerazy, odgrywa istotną rolę w procesie replikacji. Podczas syntezy RNA na matrycy RNA mutacje mogą powstawać na kilka różnych sposobów [rysunek V.1]. Kontekst sekwencji, a co za tym idzie – struktury cząsteczki matrycowej, jest często kluczowy w przypadku mutacji wprowadzanych przez polimerazę (substytucje, delecje, insercje) (Figlerowicz *et al.*, 2003). Oczywistym jest, że w przypadku analizy sekwencji HCV izolowanych z surowicy pacjentów nie można określić, w jakim stopniu struktura RNA danego wariantu determinowała wierność jego replikacji. Aby stwierdzić, na ile struktura RNA badanego rejonu genomu HCV wpływa na jego zmienność bądź zachowawczość, posłużono się zatem systemem, w którym rejon AF_A był kopiowany przez polimerazę wirusową w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego [IV.2.1]. Układ ten stosowano wcześniej w Zespole Wirusologii Molekularnej. Kluczowym elementem skonstruowanego wówczas uniwersalnego systemu do badań procesu rekombinacji RNA był wektor wirusowy Mat-0. Wykazano, że wprowadzenie do niego cząsteczki odpowiadającej rejonowi HVR1 nie obniża infekcyjności powstałego mutantu BMV (Alejska *et al.*, 2005).



Rysunek V.1. Mechanizmy wprowadzania mutacji podczas kopiowania cząsteczki RNA.

Kółkami oznaczono poszczególne nukleotydy nici matrycowej (dolna nić) i potomnej (górną). (A) Substytucja powstająca w wyniku włączenia niekomplementarnego nukleotydu i utworzenia niekanonicznej pary zasad. (B) Substytucja wynikająca z powstania wybrzuszenia w nici matrycowej. Polimeraza włącza do nici potomnej o jeden nukleotyd A za mało. Po odtworzeniu struktury w pełni dwuniciowej, ostatni U nici matrycowej tworzy niekanoniczną parę zasad z G nici potomnej. (C) Zmiana ramki odczytu wskutek włączenia niekomplementarnego nukleotydu. Polimeraza wprowadza C naprzeciwko U nici matrycowej. Może to spowodować zahamowanie elongacji i oddysocjowanie enzymu lub powstanie wybrzuszenia nici matrycowej i utworzenie kanonicznej pary C-G z kolejnym nukleotydem matrycy. (D) Zmiana ramki odczytu wskutek powstania wybrzuszenia. Podczas kopiowania odcinków zawierających kilkunukleotydowe powtórzenia (np. cztery U), w wyniku utworzenia wybrzuszenia RNA, polimeraza włącza w nici potomnej o jeden nukleotyd za mało (tzw. „poślizg” polimerazy). Niekomplementarne nukleotydy oznaczono kolorem czerwonym, ulegające wybrzuszeniu - zielonym. Wiązania wodorowe w niekanonicznych parach zasad oznaczono za pomocą czerwonych linii. [Na podstawie Figlerowicz *et al.*, 2003.]

Tym razem wybrano 4 cząsteczki AF_A, reprezentujące populacje HCV znacznie różniące się pod względem poziomu polimorfizmu. Następnie otrzymano 4 mutanty BMV, z których każdy zawierał jeden z odcinków AF_A w obrębie niekodującego rejonu 3' genomowej cząsteczki RNA3. Mutanty te zachowały zdolność do wywołania infekcji, podczas której wirusowa polimeraza RNA zależna od RNA (analogiczna do kodowanej przez HCV) powielała genom wirusowy a wraz z nim i fragment AF_A. We wszystkich czterech przypadkach liczba wprowadzonych mutacji była bardzo podobna. Obserwacja ta wskazuje, że w zastosowanym układzie badawczym struktura RNA AF_A nie wpływa w istotny sposób na wierność replikacji przez polimerazę wirusową. Pod nieobecność presji selekcyjnej charakterystycznej dla

organizmu człowieka, liczba zmian powstałych zarówno w sekwencji HVR1, jak i pozostałej części odcinka AF_A była porównywalna z liczbą mutacji wprowadzanych do cząsteczki RNA3 BMV. Tym samym można przypuszczać, iż w obrębie badanego rejonu nie występują miejsca wyjątkowo podatne na powstawanie substytucji (ang. „hotspots”). Potwierdza to szczegółowa analiza porównawcza sekwencji wszystkich 80 klonów dsDNA, odpowiadających potomnym cząsteczkom RNA BMV. Na jej podstawie można stwierdzić, iż zidentyfikowane mutacje nie koncentrowały się w określonych miejscach, lecz były rozmieszczone przypadkowo. Z pewnością interesującym dopełnieniem tych badań byłoby porównanie wyników uzyskanych *in vivo* z analogicznymi rezultatami otrzymanymi *in vitro*. Obecnie zasadniczą trudność uniemożliwiającą przeprowadzenie takich doświadczeń stanowi brak odpowiedniej wirusowej polimerazy RNA zależnej od RNA. Ponieważ takie białko nie jest dostępne komercyjnie, w Zespole Wirusologii Molekularnej podjęto wstępne próby otrzymania polimerazy NS5B HCV, jednak do tej pory nie udało się uzyskać aktywnego enzymu.

Zarówno wyniki analizy struktury quasi-gatunków HCV, jak i badania dokładności powielania wybranego rejonu genomu przez polimerazę wirusową w roślinie wskazywały, iż istotnym czynnikiem kształtującym poziom zróżnicowania populacji HCV jest ciśnienie selekcyjne, wywierane przez organizm gospodarza. Do tego samego wniosku prowadziła analiza bioinformatyczna presji selekcyjnej, jakiej poddany jest rejon HVR1 [IV.2.2]. Selekcja naturalna jest pierwszoplanowym procesem działającym na wszystkie ewoluujące populacje. Selekcja pozytywna prowadzi do zwiększenia częstości występowania alleli (w tym przypadku wariantów wirusowych), które wyróżniają się na tle pozostałych osobników populacji cechą korzystną w kontekście poziomu przystosowania do danych warunków. Jest zatem zorientowana w kierunku akumulowania mutacji i zwiększania poziomu zróżnicowania populacji. Selekcja negatywna natomiast działa w kierunku usuwania niekorzystnych zmian, prowadząc tym samym do utrwalenia już istniejących cech i obniżenia polimorfizmu populacji. Opisano kilka mechanizmów wpływających na proces ewolucji wirusów RNA w organizmie gospodarza. Wśród nich można wyróżnić zarówno ewolucję adaptacyjną (Wolinsky *et al.*, 1996), jak i neutralną (Gojobori *et al.*, 1990), która ma miejsce wówczas, gdy powstające zmiany nie wpływają na poziom przystosowania do warunków zewnętrznych (tzw. dryf genetyczny). Istnieje szereg doniesień literaturowych, wskazujących, że w przypadku HCV ma miejsce ewolucja adaptacyjna, warunkowana przez presję selekcyjną (Manzin *et al.*, 2000). Pogląd ten wspierają dane

z unikalnego studium ewolucji wirusa u 17 pacjentek zakażonych z jednego źródła. Stwierdzono, iż mimo oczywistego pokrewieństwa, odzwierciedlonego w wynikach analizy filogenetycznej, nowopowstałe populacje HCV różniły się od siebie. Ich ewolucja przebiegała niezależnie od pierwotnej sekwencji genomu wirusa, kształtowana przez ciśnienie selekcyjne wywierane przez różnych gospodarzy (McAllister *et al.*, 1998). W ostatnich latach nastąpił wyraźny rozwój badań nad udziałem presji selekcyjnej w determinowaniu poziomu zmienności niektórych rejonów genomu HCV. Z pewnością istotny wpływ na uzyskiwane wyniki miał dobór zarówno zbiorów sekwencji, jak również zastosowanych metod bioinformatycznych. Stosownie do tego, liczba kodonów ulegających selekcji pozytywnej opisanych w obrębie HVR1 oscyluje od 1 (Suzuki i Gojobori, 2001) do 18 (Cuevas *et al.*, 2009). Stosunkowo niedawno dokonano szczegółowej analizy ewolucji genów kodujących obie glikoproteiny otoczki sześciu genotypów HCV (Brown *et al.*, 2007). Stwierdzono, iż zasadniczą siłą kształtującą ewolucję E1 i E2 jest selekcja negatywna, związana z koniecznością zachowania ich właściwości strukturalno-funkcjonalnych. Kodony znajdujące się pod wpływem selekcji pozytywnej zidentyfikowano tylko w genie E2. Co ciekawe, o ile rozmieszczenie tych miejsc poza HVR1 było specyficzne dla poszczególnych genotypów, o tyle ich układ w ramach HVR1 okazał się być podobny bez względu na genotyp wirusa. W tym ostatnim rejonie określono 9 pozycji podlegających działaniu selekcji pozytywnej (Brown *et al.*, 2007). Sześć z nich zostało zidentyfikowanych także w testach opisanych w niniejszej rozprawie, w przypadku przynajmniej jednego z 6 analizowanych zbiorów danych (NR-T0, NR-T2, TR-T0, TR-T2, SR-T0, SR-T2). Istotne rozbieżności zanotowano dla 1. i 8. kodonu HVR1, które według danych literaturowych znajdują się pod wpływem selekcji pozytywnej (Brown *et al.*, 2007), natomiast w przeprowadzonych analizach okazały się ulegać selekcji negatywnej (odpowiednio w pięciu i dwóch zbiorach danych). W badanych sekwencjach kodony podlegające selekcji pozytywnej były zlokalizowane głównie w centralnej części odcinka HVR1, obejmującego pozycje 10-18. Na podstawie analiz sekwencji zdeponowanych w bazach danych stwierdzono, iż w rejonie tym znajdują się zarówno reszty o wysokim stopniu antygenowości (10-13), jak i niemające takiego charakteru (14-18), mimo iż przynajmniej niektóre z tych ostatnich (14, 15 i 18) są najprawdopodobniej dostępne na powierzchni E2. Reszty te są zatem przypuszczalnie zaangażowane w oddziaływania z białkami gospodarza (Penin *et al.*, 2001). Silna selekcja pozytywna, kształtująca te kodony w populacjach HCV obecnych u pacjentów

wykazujących trwałą odpowiedź na terapię, może odzwierciedlać toczący się proces „dopasowania” E2 wirusa do białek gospodarza. Co ciekawe, w sekwencjach zgodnych NR, TR i SR na niektórych z omawianych pozycji HVR1 występują te same reszty aminokwasowe. Presja w kierunku akumulowania zmian w tych kodonach w populacjach SR może zatem świadczyć o tym, iż właściwości tego rejonu nie są uzależnione od konkretnych reszt aminokwasowych, lecz raczej od szerszego kontekstu sekwencji białka E2.

Jak wspomniano powyżej, w obrębie HVR1 opisano dwa rejony o wysokim stopniu antygenowości – obejmują one pozycje 3-13 i 19-25 (Penin *et al.*, 2001). W konsekwencji sumarycznie stanowią one większość HVR1. Nieco zaskakująca jest zatem obserwacja, że w ich obrębie występuje stosunkowo niewiele reszt ulegających selekcji pozytywnej. Można by bowiem przypuszczać, iż u podłoża powstawania mutacji w tym rejonie leży przede wszystkim presja wywołwana przez przeciwciała. Rezultaty analiz sześciu badanych zbiorów sekwencji sugerują jednak, że przynajmniej tak samo istotnym – jeśli nie ważniejszym – mechanizmem jest proces przystosowania do oddziaływania z innymi białkami gospodarza. Analiza charakteru presji selekcyjnej działającej wobec HCV w trzech grupach pacjentów różniących się rodzajem odpowiedzi na leczenie zdaje się potwierdzać obserwacje dokonane na podstawie wcześniejszego badania struktury populacji wirusowych. Warianty charakterystyczne dla populacji obecnych u pacjentów NR wykazują najprawdopodobniej wysoki poziom przystosowania do organizmu gospodarza. W rezultacie pojawia się presja ukierunkowana na zachowanie istniejącej sekwencji. Tymczasem w quasi-gatunkach obecnych u pacjentów SR poziom przystosowania wariantów jest niższy, co wymusza akumulowanie zmian w celu wytworzenia optymalnego wariantu.

V.2.2 Wpływ właściwości białka E2

Poziom polimorfizmu quasi-gatunków HCV, wyznaczony na podstawie rejonu HVR1, jest najprawdopodobniej ściśle związany z funkcją, jaką pełni ten fragment białka E2. Aby stwierdzić, które z funkcji E2 są szczególnie uzależnione od modyfikacji potranslacyjnych, postanowiono otrzymać to białko na drodze ekspresji w komórkach bakteryjnych, jak również w systemie roślinnym. W przypadku pierwszego z systemów ekspresyjnych powinno powstać białko niemodyfikowane, a drugiego – białko modyfikowane [IV.2.3].

V.2.2.1 Otrzymywanie białka E2

Przetestowano szereg układów ekspresyjnych, obejmujących różne plazmidy oraz szczepy bakteryjne. We wszystkich uzyskano wydajną ekspresję białka E2, skróconego o potencjalną domenę transbłonową i poprzedzający ją rejon wysoce hydrofobowy. Analogiczne podejście, zmierzające ku zwiększeniu rozpuszczalności E2 produkowanego w komórkach bakteryjnych opisano już wcześniej (Yurkova *et al.*, 2004). Stwierdzono, że bez względu na zastosowany układ ekspresyjny, E2 bądź białko fuzyjne MBP-E2 zawsze znajdowało się w przeważającej części we frakcji białek nierozpuszczalnych. Ten sam problem napotkali także inni badacze i w konsekwencji zdecydowali się oni na oczyszczanie białka w warunkach denaturujących (Yurkova *et al.*, 2004). W przypadku niniejszej pracy, postanowiono jednakże oczyścić jedynie białko występujące we frakcji białek rozpuszczalnych, stosując warunki natywne. Co prawda wydajność tego procesu była niewielka, lecz uniknięto etapów związanych z ponownym fałdowaniem białka po izolacji z komórek bakteryjnych. Wiadomo bowiem, że ten proces często nie przebiega efektywnie, dodatkowo pociągając za sobą wysokie prawdopodobieństwo powstania mieszaniny konformerów E2 lub wielocząsteczkowych agregatów. W przyjętej strategii, kluczowym okazał się być nie tyle wektor ekspresyjny (a co za tym idzie - zastosowany znacznik czy białko fuzyjne MBP), ale szczep bakteryjny, użyty do produkcji E2. Optymalne rezultaty oczyszczania metodą chromatografii powinowactwa i sączenia molekularnego osiągnięto posługując się szczepem *E. coli* Origami B(DE3)pLysS. Szczep ten, dzięki obecności mutacji w genach kodujących reduktazy, umożliwia produkcję białek zawierających istotne dla tworzenia E2 wiązania disiarczkowe. Zaobserwowano, że białko uzyskane w bakteriach tego szczepu przyjmowało inną konformację aniżeli w analogicznych komórkach, pozbawionych wspomnianych mutacji. Ponadto, posługując się testem ELISA stwierdzono, że otrzymane E2 były efektywnie rozpoznawane przez przeciwciała uzyskane przy zastosowaniu glikozylowanych białek produkowanych w linii komórek CHO.

Produkcja białek w roślinach jest interesującą i z wielu przyczyn korzystną alternatywą wobec ich otrzymywania w systemach bakteryjnych czy innych eukariotycznych, zwłaszcza ssaczy (Jasiński *et al.*, 2006). Często białka produkowane są w roślinach w celu uzyskania w pełni modyfikowanych potranslacyjnie antygenów szczepionkowych. Obecnie obok tworzenia roślin transgenicznych wykorzystuje się często ekspresję przejściową. Spośród wielu białek wyprodukowanych w roślinach

wymienić można choćby białko p24 wirusa HIV (Zhang *et al.*, 2002a), glikoproteinę gD bydłęcego herpeswirusa (Perez Filgueira *et al.*, 2003), czy antygen powierzchniowy wirusa zapalenia wątroby typu B (Zhong *et al.*, 2008). Dwa ostatnie powstały na drodze ekspresji przejściowej, z wykorzystaniem wektorów wirusowych. Podjęto także udane próby otrzymania w roślinach białek chimerycznych, zawierających rejon HVR1 HCV (El Attar *et al.*, 2004; Nemchinov *et al.*, 2000). Do tej pory najprawdopodobniej nie przeprowadzono jednakże ekspresji dłuższego fragmentu genu E2 w systemie roślinnym – opisane w niniejszej pracy doświadczenie byłoby zatem przypuszczalnie pierwszym doniesieniem na ten temat. Posługując się systemem do ekspresji przejściowej (Marillonnet *et al.*, 2004) uzyskano dwa warianty E2 w liściach tytoniu, stwierdzono jednak, iż powstałe białka nie ulegały N-glikozylacji. Ten sam system wykorzystano niedawno do ekspresji antygeny HBsAg wirusa HBV (Zhong *et al.*, 2008). Również w tym przypadku tworzone białko nie było glikozylowane. Obecność reszt glikozydowych jest istotna w kontekście przyjmowania prawidłowej konformacji, jak również funkcjonowania białka E2 (Op De Beeck *et al.*, 2001). Jednocześnie z doniesień literaturowych wiadomo, iż w organizmie człowieka E2 jest obecne także w formie niemodyfikowanej. W takiej postaci oddziałuje ono z kinazą PKR, zaburzając odpowiedź komórki gospodarza na infekcję wirusową (Pavio *et al.*, 2002). W zależności od celu dalszych analiz, pożądanym jest zatem otrzymanie E2 w jednej z dwóch form: modyfikowanej i niemodyfikowanej. Również w przypadku badań nad właściwościami antygenowymi czy immunogennością białek uzyskiwanych w roślinach występowanie glikanów nie zawsze jest korzystne, gdyż mogą one maskować epitopy na powierzchni białka. Ponieważ powstałe w tytoniu białka E2-NR i E2-SR nie posiadały modyfikacji, odstąpiono od ich oczyszczania i w dalszych badaniach posłużono się białkami otrzymanymi na drodze ekspresji w komórkach bakteryjnych.

V.2.2.2 Analiza wybranych właściwości dwóch wariantów białka E2

Jak wspomniano wcześniej, istnieje szereg przesłanek świadczących, iż właściwości poszczególnych wariantów białka E2 wywierają istotny wpływ na ich utrzymywanie w populacjach wirusowych, a także na kształtowanie się struktury quasi-gatunku. Białko E2 pełni szereg funkcji w cyklu replikacyjnym HCV i jest bezpośrednio zaangażowane w oddziaływanie wirus-gospodarz [I.1.4]. Poszukując odpowiedzi na pytanie, jakimi właściwościami różnią się warianty E2 reprezentujące populacje wirusowe obecne u pacjentów o odmiennej odpowiedzi na terapię, wzięto

pod uwagę dwie zasadnicze hipotezy. Pierwsza z nich zakładała, iż HCV może unikać odpowiedzi immunologicznej gospodarza, wykorzystując zjawisko mimikry molekularnej. Tego typu mechanizm został zaproponowany w ostatnich latach. Na podstawie modelowania *in silico* oraz badań immunologicznych wykazano bowiem, że zbudowany z ok. 100 reszt aminokwasowych N-terminalny odcinek białka E2 przejawia podobieństwo strukturalne do domeny zmiennej ludzkich immunoglobulin klasy IgG. Stwierdzono także obniżenie reakcji przeciwciał anti-E2 w miarę wzrostu stopnia podobieństwa glikoproteiny otoczki do immunoglobulin (Hu *et al.*, 2005). W świetle tych spostrzeżeń można było zatem przypuszczać, iż zachowawczy wariant E2-NR, charakterystyczny dla pacjentów NR wykazuje znaczne podobieństwo do immunoglobulin, przez co pozostaje nierozpoznany przez układ odpornościowy gospodarza. Wzorując się na opublikowanych doniesieniach (Hu *et al.*, 2005), posłużono się metodą *western blot* w celu sprawdzenia zdolności obu wariantów białka E2 do oddziaływania z przeciwciałami skierowanymi przeciwko ludzkim IgG [IV.2.3.4.1]. Przyjęto założenie, że rozpoznanie białka E2 przez przeciwciała anti-hIgG będzie świadczyło o strukturalnym podobieństwie pomiędzy E2 a hIgG. Wbrew oczekiwaniom okazało się, iż wariant E2-SR, a nie E2-NR, był efektywnie rozpoznawany przez przeciwciała anti-hIgG. Na podstawie tej obserwacji można z całą pewnością stwierdzić, że białko E2 rzeczywiście przejawia podobieństwo do ludzkich immunoglobulin, jednak nie jest to jego stała, właściwa mu cecha. Uzyskane wyniki wyraźnie wskazują bowiem na to, że poziom tego podobieństwa jest różny dla różnych wariantów E2. Zjawisko to po części tłumaczy fakt trwałego współwystępowania we krwi pacjentów cząstek wirusowych i przeciwciał anti-HCV. Można sądzić, że tworzone są przeciwciała skierowane tylko przeciwko części wariantów E2, takie, które nie reagują jednocześnie z białkami ludzkimi. W ten sposób, niektóre z wariantów E2 byłyby tolerowane przez system immunologiczny. Jednocześnie można przypuszczać, że zjawisko mimikry molekularnej leży u podłoża zaburzeń autoimmunologicznych, towarzyszących niekiedy zakażeniom HCV (Eisen-Vandervelde *et al.*, 2004; Hu *et al.*, 2005). Prawdopodobne jest bowiem, że oprócz wariantów całowicie tolerowanych, istnieją takie, które funkcjonują jako antygeny, indukujące powstanie przeciwciał zdolnych do reakcji krzyżowej z innymi białkami organizmu pacjenta. Pogląd ten wspiera poczyniona w trakcie tych badań obserwacja, że kozie przeciwciała anti-E2 bardzo wydajnie i specyficznie rozpoznają łańcuch ciężki ludzkich immunoglobulin. Z pewnością odpowiednie mechanizmy w organizmie człowieka zapobiegają powstaniu

przeciwciał tak silnie skierowanym przeciwko własnym immunoglobulinom. Nie można jednak wykluczyć mniej specyficznych reakcji krzyżowych pomiędzy przeciwciałami anti-E2 a hIgG. Niestety w przypadku badanych pacjentów nie dysponowano danymi dotyczącymi występowania zaburzeń autoimmunologicznych. Należy jednak stwierdzić, że opisany mechanizm mimikry molekularnej nie jest decydujący w kontekście terapii i przebiegu przewlekłego zapalenia wątroby typu C. Jak się bowiem okazało, to populacja zawierająca wariant E2-SR (wykazujący wyższy stopień podobieństwa do immunoglobulin niż E2-NR), została wyeliminowana w rezultacie leczenia. Na tej podstawie można było sądzić, że inne właściwości E2, wykraczające poza mimikrę molekularną, są odpowiedzialne za utrzymywanie wariantu E2-NR w kilku populacjach obecnych u osób niewyleczonych.

Aby ostatecznie odrzucić pierwszą hipotezę, należało jednak przekonać się, czy w surowicach pacjentów obecne były przeciwciała przeciwko obu wariantom E2 [IV.2.3.4.2]. Zdolność do unikania odpowiedzi immunologicznej nie musiałaby przecież być związana wyłącznie ze stopniem podobieństwa do immunoglobulin. Wiadomo na przykład, że inny rejon E2, PePHD, wykazuje podobieństwo do miejsca autofosforylacji kinazy PKR oraz miejsca fosforylacji jednego z czynników inicjacji translacji (Taylor *et al.*, 1999). Białka E2 uzyskiwane w systemach bakteryjnych były wcześniej z powodzeniem wykorzystywane do badania oddziaływań z przeciwciałami obecnymi w surowicy pacjentów i bardzo dobrze nadają się do tego celu (Liu *et al.*, 2004; Mita *et al.*, 1992; Yurkova *et al.*, 2004). W tego typu testach nie jest wymagane, by białko posiadało modyfikacje w postaci N-glikanów. Ich obecność w powstałych naturalnie białkach najczęściej maskuje niektóre epitopy, przez co stają się one niedostępne dla przeciwciał. Jednocześnie nie istnieje niebezpieczeństwo zaobserwowania nietypowych reakcji przeciwciał wobec białek niemodyfikowanych. W surowicach pacjentów obecne są bowiem tylko przeciwciała, wytworzone wcześniej w wyniku kontaktu układu odpornościowego z cząstkami wirusowymi, zaopatrzonymi w natywne, glikozylowane E2. Posługując się białkiem niemodyfikowanym można zatem wykryć reakcję przeciwciał wobec epitopów dostępnych w naturalnym białku. Przeprowadzone badania wykazały, że w surowicach pacjentów obecne były przeciwciała przeciwko obu wariantom E2, niezależnie od tego, czy warianty te zidentyfikowano u danej osoby, czy też nie. Oznacza to, iż dochodziło przede wszystkim do oddziaływań przeciwciał z zachowawczymi rejonami E2. Wynik ten pozostaje w zgodzie z danymi literaturowymi, w których opisano współwystępowanie w surowicy zarówno

przeciwciał specyficznych wobec konkretnego szczepu wirusa, jak i zdolnych do reakcji krzyżowej z niehomologicznym białkiem E2 (Kaplan *et al.*, 2003; Mondelli *et al.*, 1999). Co ciekawe, uzyskane wyniki sugerują, że wariant E2-SR był gorzej rozpoznawany przez przeciwciała obecne w surowicach pacjentów aniżeli wariant E2-NR. Różnica ta występowała praktycznie zawsze, jednak była wyraźniej widoczna w przypadku surowic pacjentów, którzy osiągnęli trwałą odpowiedź na leczenie. Biorąc pod uwagę wcześniej uzyskane wyniki wydaje się prawdopodobne, że przyczyną niższego powinowactwa przeciwciał do E2-SR jest wyższy stopień podobieństwa tego białka do ludzkich immunoglobulin klasy IgG. Można jednak spekulować, że ta obserwacja odzwierciedla nie tylko same właściwości E2-SR, lecz także sposób funkcjonowania układu immunologicznego pacjentów. Gdyby bowiem słabsza reakcja przeciwciał była uwarunkowana jedynie strukturą i/lub właściwościami tego wariantu, wówczas nie obserwowano by różnic w jego rozpoznawaniu, charakterystycznych dla dwóch grup pacjentów. Można więc zaproponować hipotezę, że u osób niewyleczonych do pewnego stopnia zaburzony jest mechanizm zabezpieczający przed tworzeniem przeciwciał, skierowanych przeciwko własnym białkom. Ta interesująca kwestia wymaga jednak podjęcia dalszych badań. Jednocześnie otrzymany wynik wskazuje, że u pacjentów NR występuje odpowiedź humoralna. Nie można zatem upatrywać przyczyny niskiego polimorfizmu obecnych u nich quasi-gatunków HCV w braku presji związanej z prawidłowym funkcjonowaniem przeciwciał (Farci *et al.*, 2006; Gaud *et al.*, 2003). Co ciekawe zaobserwowano, że w całkowitej puli przeciwciał w surowicach pacjentów, procentowy udział immunoglobulin specyficznych wobec poszczególnych białek wirusa jest zróżnicowany. Wśród badanych dzieci znalazło się troje poddanych we wcześniejszym okresie terapii immunosupresyjnej. Nie stwierdzono u nich obecności przeciwciał anti-HCV w teście dostępnym komercyjnie. Test ten zawiera antygen fuzyjny, powstały w wyniku połączenia epitopów 7 białek wirusowych, w tym także E2. Aby wynik był pozytywny, najprawdopodobniej konieczne jest wystąpienie silnej reakcji przeciwciał przeciwko co najmniej kilku z nich. Ponieważ u tych samych dzieci wykazano obecność przeciwciał przeciwko obu wariantom E2 można sądzić, że odpowiedź anti-E2 występuje nawet wtedy, gdy zaburzone jest tworzenie przeciwciał specyficznych wobec innych białek wirusa. Obserwacja ta zgodna jest z poglądem, że główny cel przeciwciał neutralizujących zlokalizowany jest w obrębie białka E2 (Kaplan *et al.*, 2003). Jednocześnie jednak należy stwierdzić, że mimo obecności innych przeciwciał, immunoglobuliny anti-E2 mogą w niektórych przypadkach nie

występować w surowicy. Taka sytuacja wystąpiła u trzech innych pacjentów, z których każdy wykazywał inny rodzaj odpowiedzi na terapię. Co ciekawe, u jednej z tych osób były obecne przeciwciała przeciwko jednemu z dwóch wariantów E2. Można zatem wysunąć przypuszczenie, iż zjawisko to uwarunkowane jest do pewnego stopnia właściwościami E2, choć z pewnością bardzo istotna jest tu również sprawność układu odpornościowego pacjenta.

Na podstawie analizy opisanych powyżej wyników należało odrzucić hipotezę, w myśl której pewne warianty E2 utrzymują się w kilku populacjach wirusowych, ponieważ pozostają nierozpoznane przez przeciwciała pacjentów.

Porównanie sekwencji aminokwasowych obu otrzymanych wariantów E2 każe zwrócić uwagę na umiejscowienie różniących je reszt aminokwasowych [rysunek IV.19; rysunek I.5]. Spośród 25 pozycji, na których występują odmienne reszty, 8 znajduje się w obrębie rejonu HVR1, zwłaszcza w jego połowie karboksylowej. Dwie z nich ulokowane są w odcinku centralnym, odpowiedzialnym za oddziaływanie z białkami gospodarza, natomiast pozostałe w części o właściwościach antygenowych. Osiem reszt rozmieszczonych jest przypadkowo i w większości nie znajduje się w żadnym z rejonów, którym przypisywane są określone funkcje. Dziewięć pozostałych występuje natomiast w trzech z sześciu odcinków prawdopodobnie zaangażowanych w oddziaływanie z receptorem CD81. Wiadomo również, że rejony HVR1 o różnych sekwencjach w różny sposób modulują wiązanie E2 do CD81 (Roccasecca *et al.*, 2003). Na podstawie tych obserwacji postawiono drugą hipotezę, zgodnie z którą warianty E2, reprezentujące populacje wirusowe obecne u pacjentów o odmiennej odpowiedzi na terapię, różnią się pod względem zdolności oddziaływania z receptorem CD81. Odmienne powinowactwo do tego receptora mogłoby wywierać wpływ na stopień infekcyjności obu wariantów. W kontekście danych opublikowanych na temat przyłączania cząstek wirusowych do różnych receptorów można by przypuszczać, że różnice te dotyczą nie tylko wnikania do hepatocytów, lecz także, a może przede wszystkim, oddziaływań z CD81 na powierzchni limfocytów B (Roccasecca *et al.*, 2003; Scarselli *et al.*, 2002). W ostatnich latach pojawiły się interesujące doniesienia, dotyczące skutków przyłączania się E2 do receptora CD81 limfocytów B. Stwierdzono, że to oddziaływanie prowadzi do tzw. hiperzmienności produkowanych przeciwciał (Machida *et al.*, 2005). Ponadto opublikowano wyniki, świadczące o tym, że nadmierny polimorfizm przeciwciał obniża ich powinowactwo i działanie neutralizujące wobec białka E2 HCV (Machida *et al.*, 2008). W świetle tych danych można przyjąć, że różne

warianty E2 wykazują różną zdolność do oddziaływania z CD81, a być może też w różnym stopniu zaburzają proces tworzenia przeciwciał.

Doświadczenia, zmierzające do porównania zdolności obu wariantów E2 do wiązania receptora CD81, miały jedynie wstępny charakter [IV.2.3.4.3]. Posłużono się w nich ponownie białkami otrzymanymi w systemie bakteryjnym, bazując na doniesieniach literaturowych, w których stwierdzono, że E2 pozbawione N-glikanów zachowuje zdolność do oddziaływania z CD81 (Yurkova *et al.*, 2004). Zanotowano jednakże, iż uzyskane białka tylko w niewielkim stopniu wiązały się z receptorem na powierzchni limfocytów B. Przyczyn takiej obserwacji można upatrywać po pierwsze w zastosowanej metodyce. W odróżnieniu od innych badaczy, którzy posłużyli się rozpuszczalnym, rekombinowanym białkiem fuzyjnym GST-CD81 (Yurkova *et al.*, 2004), w tej pracy wykorzystano limfocyty B. Oddziaływanie monitorowano stosując sprawdzoną wcześniej metodę, bazującą na cytometrii przepływowej (Rosa *et al.*, 1996). Można zatem przypuszczać, że białko E2 uzyskane w systemie prokariotycznym, chociaż wiąże rozpuszczalną postać CD81, to jednak nie oddziałuje wydajnie z białkiem ulokowanym w błonie. Ponadto istotną rolę w procesie wiązania CD81 oraz wnikania do komórek gospodarza pełnią reszty oligosacharydowe (Falkowska *et al.*, 2007). Stwierdzono, że usunięcie N- i O-glikanów z określonych pozycji E2 obniża jego powinowactwo do CD81. Z drugiej strony jednak wskazano także szereg miejsc, w których brak glikanów pozostaje bez wpływu na to oddziaływanie lub nawet zwiększa powinowactwo E2 do receptora (Falkowska *et al.*, 2007). Biorąc pod uwagę dane literaturowe można także sądzić, że prawdopodobnie jedynie pewna pula cząsteczek białka uzyskanego w systemie prokariotycznym przyjmuje konformację właściwą dla wiązania z CD81. Stwierdzono bowiem, że białka E2 uzyskane w różnych układach eukariotycznych (drożdże, komórki owadzie, linie CHO i HeLa) wykazują zróżnicowane powinowactwo do CD81 (Rosa *et al.*, 1996), co można tłumaczyć odmiennym fałdowaniem białka w tych systemach.

Analizując wstępne dane, dotyczące oddziaływania dwóch badanych wariantów E2 z receptorem na powierzchni limfocytów B stwierdzono, że wariant E2-NR wiązał się nieco efektywniej aniżeli E2-SR. Obserwacja ta stanowi przesłankę świadczącą, że zidentyfikowane różnice w składzie aminokwasowym mogą przekładać się na właściwości wariantów, determinujące ich oddziaływanie z receptorem CD81. Wyniki te zachęcają do kontynuowania badań w tym właśnie kierunku. Z pewnością warto byłoby w najbliższej przyszłości powtórzyć przeprowadzone doświadczenie, tym razem

jednak stosując białko otrzymane w komórkach ssaczych. Podjęto już pierwsze kroki w tym kierunku, konstruując odpowiednie wektory ekspresyjne niosące oba warianty genu E2.

VI Wnioski

1. W wyniku przeprowadzonych badań scharakteryzowano strukturę populacji wirusowych, obecnych u pacjentów z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C. Prezentowana analiza jest najprawdopodobniej pierwszym opisem struktury quasi-gatunków HCV-1a u ponad 20 dzieci poddanych terapii skojarzonej interferonem i rybawiryną, bądź pegylowanym interferonem i rybawiryną.
2. Analizując strukturę populacji przed leczeniem, stwierdzono istnienie dwóch odmiennych typów quasi-gatunku HCV. Pierwszy z nich charakteryzował się występowaniem wyraźnego dominanta, otoczonego ograniczoną liczbą wariantów towarzyszących. Poziom zróżnicowania takiej populacji był niewielki, a warianty łączyły ściśle relacje filogenetyczne. Ten typ quasi-gatunku zdecydowanie przeważał u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na leczenie (NR). Drugi typ populacji HCV charakteryzował się obecnością większej liczby zróżnicowanych wariantów o odleglejszych związkach filogenetycznych. Występował on głównie u dzieci z pozytywną odpowiedzią na terapię (SR). Otrzymane wyniki wskazują, że istnieje związek pomiędzy strukturą quasi-gatunku HCV u dzieci a rezultatem terapii.
3. Stwierdzono, że bardzo podobne lub identyczne (na poziomie sekwencji aminokwasowych, lecz nie nukleotydowych) warianty rejonu HVR1 mogą występować w kilku niezależnych epidemiologicznie quasi-gatunkach HCV, obecnych u pacjentów NR.
4. Wykazano, że dobór rejonu genomu ma kluczowy wpływ na wyniki analizy struktury populacji HCV. W przeciwieństwie do odcinka HVR1, w przypadku rejonu IFN-R nie zaobserwowano różnic pomiędzy strukturą quasi-gatunków, pochodzących od pacjentów o odmiennej odpowiedzi na terapię.
5. Wyniki badań przeprowadzonych w warunkach słabego ciśnienia selekcyjnego *in vivo* sugerują, że struktura RNA nie wpływa w znaczący sposób na polimorfizm HVR1.
6. Podstawowym czynnikiem kształtującym strukturę populacji HCV jest presja selekcyjna, ukierunkowana na optymalizację oddziaływań białek wirusa z białkami gospodarza. Jednocześnie presja ta działa w kierunku zachowania istotnych właściwości strukturalno-funkcjonalnych białek wirusowych.

7. Charakter presji selekcyjnej w populacjach HCV obecnych u pacjentów o odmiennej odpowiedzi na terapię jest różny. U osób NR przeważa selekcja negatywna, ukierunkowana na zachowanie istniejących właściwości wariantów wirusowych. Można zatem sądzić, że warianty te osiągnęły optymalny w danych warunkach poziom przystosowania. U osób SR dominuje selekcja pozytywna, faworyzująca wprowadzanie mutacji niesynonimicznych i tworzenie nowych wariantów. Prawdopodobnie odzwierciedla to sytuację gwałtownej ewolucji wirusa w kierunku wytworzenia lepiej przystosowanych wariantów. Kluczowym czynnikiem determinującym poziom zmienności populacji HCV w obrębie badanego rejonu są zatem specyficzne właściwości białka E2.
8. Opracowano metodę klonowania i ekspresji genu E2 w komórkach bakteryjnych oraz w tytoniu. Najprawdopodobniej po raz pierwszy uzyskano ekspresję E2 w roślinie. Stwierdzono, że powstające białko nie ulega w tytoniu N-glikozylacji.
9. Białko E2 HCV wykazuje podobieństwo do domeny zmiennej ludzkich immunoglobulin. Stopień tego podobieństwa jest jednak wyraźnie uzależniony od sekwencji aminokwasowej wariantu E2. Wyższe podobieństwo do immunoglobulin zaobserwowano dla wariantu E2, reprezentującego populacje obecne u pacjentów SR. Podobieństwo do ludzkich immunoglobulin nie jest zatem mechanizmem umożliwiającym utrzymywanie zachowawczego wariantu E2-NR w quasi-gatunkach występujących u pacjentów NR.
10. W surowicach pacjentów, bez względu na rodzaj ich odpowiedzi na terapię, zidentyfikowano przeciwciała skierowane przeciwko obu badanym wariantom E2. Wysoki stopień zachowawczości wariantów w populacjach NR nie wynika zatem z zaburzeń w humoralnej odpowiedzi immunologicznej. Przeciwciała powstające w organizmach pacjentów posiadają zdolność do rozpoznania heterologicznych wariantów E2, niezidentyfikowanych u danego pacjenta. Sugeruje to, że są one specyficzne wobec konserwatywnych epitopów E2. Unikanie odpowiedzi immunologicznej najprawdopodobniej nie jest też główną przyczyną utrzymywania zachowawczego wariantu E2-NR w populacjach, występujących u pacjentów NR.
11. Białko E2 otrzymane metodą ekspresji w komórkach bakteryjnych w niewielkim stopniu wiąże się z receptorem CD81 ulokowanym na powierzchni limfocytów B. Wstępne analizy wskazują, że badane warianty E2 mogą

przejawiać różne powinowactwo do tego receptora. Niezbędne są dalsze badania aby ustalić, czy zachowawczy wariant E2-NR jest utrzymywany w quasi-gatunkach obecnych u osób NR, ponieważ charakteryzuje się wyższym powinowactwem do CD81 i przez to jest bardziej infekcyjny lub indukuje hiperzmiennność przeciwciał.

VII Literatura

1. Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., Miyano, M. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *Structure* 7, 1417-1426.
2. Alejska, M., Figlerowicz, M., Malinowska, N., Urbanowicz, A., Figlerowicz, M. (2005). A universal BMV-based RNA recombination system--how to search for general rules in RNA recombination. *Nucleic Acids Res* 33, e105.
3. Amoroso, P., Rapicetta, M., Tosti, M.E., Mele, A., Spada, E., Buonocore, S., Lettieri, G., Pierri, P., Chionne, P., Ciccaglione, A.R., et al. (1998). Correlation between virus genotype and chronicity rate in acute hepatitis C. *J Hepatol* 28, 939-944.
4. Asahina, Y., Izumi, N., Enomoto, N., Uchihara, M., Kurosaki, M., Onuki, Y., Nishimura, Y., Ueda, K., Tsuchiya, K., Nakanishi, H., et al. (2005). Mutagenic effects of ribavirin and response to interferon/ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. *J Hepatol* 43, 623-629.
5. Ayers, M., Siu, K., Roberts, E., Garvin, A.M., Tellier, R. (2002). Characterization of hepatitis C virus quasispecies by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight (mass spectrometry) mutation detection. *J Clin Microbiol* 40, 3455-3462.
6. Bartenschlager, R., Lohmann, V. (2000). Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 81, 1631-1648.
7. Barth, H., Schafer, C., Adah, M.I., Zhang, F., Linhardt, R.J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T.H., Depla, E., et al. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *J Biol Chem* 278, 41003-41012.
8. Booth, J.C., Kumar, U., Webster, D., Monjardino, J., Thomas, H.C. (1998). Comparison of the rate of sequence variation in the hypervariable region of E2/NS1 region of hepatitis C virus in normal and hypogammaglobulinemic patients. *Hepatology* 27, 223-227.
9. Brown, R.J., Tarr, A.W., McClure, C.P., Juttla, V.S., Tagiuri, N., Irving, W.L., Ball, J.K. (2007). Cross-genotype characterization of genetic diversity and molecular adaptation in hepatitis C virus envelope glycoprotein genes. *J Gen Virol* 88, 458-469.
10. Cabot, B., Martell, M., Esteban, J.I., Sauleda, S., Otero, T., Esteban, R., Guardia, J., Gomez, J. (2000). Nucleotide and amino acid complexity of hepatitis C virus quasispecies in serum and liver. *J Virol* 74, 805-811.
11. Callens, N., Ciczora, Y., Bartosch, B., Vu-Dac, N., Cosset, F.L., Pawlotsky, J.M., Penin, F., Dubuisson, J. (2005). Basic residues in hypervariable region 1 of hepatitis C virus envelope glycoprotein e2 contribute to virus entry. *J Virol* 79, 15331-15341.
12. Cannon, N.A., Donlin, M.J., Mayes, L.M., Lyra, A.C., Di Bisceglie, A.M., Tavis, J.E. (2009). Evidence for action of ribavirin through the hepatitis C virus RNA polymerase. *J Viral Hepat* 16, 595-604.
13. Canobio, S., Guilbert, C.M., Troesch, M., Samson, J., Lemay, M., Pelletier, V.A., Bernard-Bonnin, A.C., Kozielski, R., Lapointe, N., Martin, S.R., et al. (2004). Differing patterns of liver disease progression and hepatitis C virus (HCV) quasispecies evolution in children vertically coinfecting with HCV and human immunodeficiency virus type 1. *J Clin Microbiol* 42, 4365-4369.
14. Carithers, R.L., Jr., Emerson, S.S. (1997). Therapy of hepatitis C: meta-analysis of interferon alfa-2b trials. *Hepatology* 26, 83S-88S.
15. Castellano, G. (2000). The natural history of hepatitis C virus infection. *Nephrol Dial Transplant* 15 Suppl 8, 19-23.

16. Chambers, T.J., Fan, X., Droll, D.A., Hembrador, E., Slater, T., Nickells, M.W., Dustin, L.B., Dibisceglie, A.M. (2005). Quasispecies heterogeneity within the E1/E2 region as a pretreatment variable during pegylated interferon therapy of chronic hepatitis C virus infection. *J Virol* 79, 3071-3083.
17. Chan, S.W., McOmish, F., Holmes, E.C., Dow, B., Peutherer, J.F., Follett, E., Yap, P.L., Simmonds, P. (1992). Analysis of a new hepatitis C virus type and its phylogenetic relationship to existing variants. *J Gen Virol* 73 (Pt 5), 1131-1141.
18. Chen, S.L., Morgan, T.R. (2006). The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci* 3, 47-52.
19. Chevaliez, S., Brillet, R., Lazaro, E., Hezode, C., Pawlotsky, J.M. (2007). Analysis of ribavirin mutagenicity in human hepatitis C virus infection. *J Virol* 81, 7732-7741.
20. Choo, Q.L., Kuo, G., Weiner, A.J., Overby, L.R., Bradley, D.W., Houghton, M. (1989). Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 244, 359-362.
21. Cocquerel, L., Voisset, C., Dubuisson, J. (2006). Hepatitis C virus entry: potential receptors and their biological functions. *J Gen Virol* 87, 1075-1084.
22. Contreras, A.M., Hiasa, Y., He, W., Terella, A., Schmidt, E.V., Chung, R.T. (2002). Viral RNA mutations are region specific and increased by ribavirin in a full-length hepatitis C virus replication system. *J Virol* 76, 8505-8517.
23. Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J., Gardner, J.P., Dragic, T. (2004). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 7270-7274.
24. Crotty, S., Cameron, C.E., Andino, R. (2001). RNA virus error catastrophe: direct molecular test by using ribavirin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6895-6900.
25. Cuevas, J.M., Gonzalez, M., Torres-Puente, M., Jimenez-Hernandez, N., Bracho, M.A., Garcia-Robles, I., Gonzalez-Candelas, F., Moya, A. (2009). The role of positive selection in hepatitis C virus. *Infect Genet Evol* 9, 860-866.
26. Czepiel, J., Biesiada, G., Mach, T. (2008). Viral hepatitis C. *Pol Arch Med Wewn* 118, 734-740.
27. de la Torre, J.C., Holland, J.J. (1990). RNA virus quasispecies populations can suppress vastly superior mutant progeny. *J Virol* 64, 6278-6281.
28. de Veer, M.J., Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, S., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., Williams, B.R. (2001). Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J Leukoc Biol* 69, 912-920.
29. Domingo, E. (2000). Viruses at the edge of adaptation. *Virology* 270, 251-253.
30. Domingo, E., Escarmis, C., Sevilla, N., Baranowski, E. (1998). Population dynamics in the evolution of RNA viruses. *Adv Exp Med Biol* 440, 721-727.
31. Domingo, E., Gomez, J. (2007). Quasispecies and its impact on viral hepatitis. *Virus Res* 127, 131-150.
32. Domingo, E., Martin, V., Perales, C., Grande-Perez, A., Garcia-Arriaza, J., Arias, A. (2006). Viruses as Quasispecies: Biological Implications. w Quasispecies: Concepts and Implications for Virology, E. Domingo, ed. (Springer), pp. 51-782.
33. Domingo, E., Sabo, D., Taniguchi, T., Weissmann, C. (1978). Nucleotide sequence heterogeneity of an RNA phage population. *Cell* 13, 735-744.
34. Drummer, H.E., Boo, I., Maerz, A.L., Pountourios, P. (2006). A conserved Gly436-Trp-Leu-Ala-Gly-Leu-Phe-Tyr motif in hepatitis C virus glycoprotein E2 is a determinant of CD81 binding and viral entry. *J Virol* 80, 7844-7853.
35. Eigen, M. (1971). Selforganization of matter and the evolution of biological macromolecules. *Naturwissenschaften* 58, 465-523.

36. Eisen-Vandervelde, A.L., Yao, Z.Q., Hahn, Y.S. (2004). The molecular basis of HCV-mediated immune dysregulation. *Clin Immunol* 111, 16-21.
37. El Attar, E.K., Shamloul, A.M., Shalaby, A.A., Riad, B.Y., Saad, A., Mazyad, H.M., Keith, J.M. (2004). Expression of chimeric HCV peptide in transgenic tobacco plants infected with recombinant alfalfa mosaic virus for development of a plant-derived vaccine against HCV. *African Journal of Biotechnology* 3, 588-594.
38. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (1995). Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 96, 224-230.
39. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (1996). Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 334, 77-81.
40. Evans, M.J., von Hahn, T., Tscherne, D.M., Syder, A.J., Panis, M., Wolk, B., Hatzioannou, T., McKeating, J.A., Bieniasz, P.D., Rice, C.M. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446, 801-805.
41. Falkowska, E., Kajumo, F., Garcia, E., Reinus, J., Dragic, T. (2007). Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol* 81, 8072-8079.
42. Farci, P., Quinti, I., Farci, S., Alter, H.J., Strazzer, R., Palomba, E., Coiana, A., Cao, D., Casadei, A.M., Ledda, R., et al. (2006). Evolution of hepatitis C viral quasispecies and hepatic injury in perinatally infected children followed prospectively. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 8475-8480.
43. Farci, P., Shimoda, A., Wong, D., Cabezon, T., De Gioannis, D., Strazzer, A., Shimizu, Y., Shapiro, M., Alter, H.J., Purcell, R.H. (1996). Prevention of hepatitis C virus infection in chimpanzees by hyperimmune serum against the hypervariable region 1 of the envelope 2 protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 15394-15399.
44. Farci, P., Strazzer, R., Alter, H.J., Farci, S., Degioannis, D., Coiana, A., Peddis, G., Usai, F., Serra, G., Chessa, L., et al. (2002). Early changes in hepatitis C viral quasispecies during interferon therapy predict the therapeutic outcome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 3081-3086.
45. Feld, J.J., Hoofnagle, J.H. (2005). Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *Nature* 436, 967-972.
46. Ferenci, P. (2004). Predictors of response to therapy for chronic hepatitis C. *Semin Liver Dis* 24 Suppl 2, 25-31.
47. Figlerowicz, M., Alejska, M., Kurzyńska-Kokorniak, A., Figlerowicz, M. (2003). Genetic variability: the key problem in the prevention and therapy of RNA-based virus infections. *Med Res Rev* 23, 488-518.
48. Figlerowicz, M., Bujarski, J. (1997). Rekombinacja genetyczna (+)RNA wirusów. *Postępy biochemii* 43, 257-266.
49. Figlerowicz, M., Formanowicz, P., Kędziora, P., Alejska, M., Jackowiak, P., Błazewicz, J., Służewski, W., Figlerowicz, M. (2005). Kliniczne znaczenie zmian w populacji HCV w pierwszych tygodniach leczenia przewlekłego zapalenia wątroby typu C interferonem i rybawiryną. *Przegl Epidemiol* 59, 581-590.
50. Figlerowicz, M., Służewski, W., Kowala-Piaskowska, A., Mozer-Lisewska, I. (2004). Interferon alpha and ribavirin in the treatment of children with chronic hepatitis C. *Eur J Pediatr* 163, 265-267.
51. Forns, X., Thimme, R., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Chisari, F.V., Bukh, J. (2000). Hepatitis C virus lacking the hypervariable region 1 of the second

envelope protein is infectious and causes acute resolving or persistent infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 13318-13323.

52. Foy, E., Li, K., Wang, C., Sumpter, R., Jr., Ikeda, M., Lemon, S.M., Gale, M., Jr. (2003). Regulation of interferon regulatory factor-3 by the hepatitis C virus serine protease. *Science* 300, 1145-1148.

53. Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncalves, F.L., Jr., Haussinger, D., Diago, M., Carosi, G., Dhumeaux, D., et al. (2002). Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N Engl J Med* 347, 975-982.

54. Gale, M.J., Jr., Korth, M.J., Katze, M.G. (1998). Repression of the PKR protein kinase by the hepatitis C virus NS5A protein: a potential mechanism of interferon resistance. *Clin Diagn Virol* 10, 157-162.

55. Gao, F., Bailes, E., Robertson, D.L., Chen, Y., Rodenburg, C.M., Michael, S.F., Cummins, L.B., Arthur, L.O., Peeters, M., Shaw, G.M., et al. (1999). Origin of HIV-1 in the chimpanzee *Pan troglodytes troglodytes*. *Nature* 397, 436-441.

56. Gao, F., Yue, L., White, A.T., Pappas, P.G., Barchue, J., Hanson, A.P., Greene, B.M., Sharp, P.M., Shaw, G.M., Hahn, B.H. (1992). Human infection by genetically diverse SIVSM-related HIV-2 in west Africa. *Nature* 358, 495-499.

57. Gates, A.T., Sarisky, R.T., Gu, B. (2004). Sequence requirements for the development of a chimeric HCV replicon system. *Virus Res* 100, 213-222.

58. Gaud, U., Langer, B., Petropoulou, T., Thomas, H.C., Karayiannis, P. (2003). Changes in hypervariable region 1 of the envelope 2 glycoprotein of hepatitis C virus in children and adults with humoral immune defects. *J Med Virol* 69, 350-356.

59. Gerotto, M., Resti, M., Dal Pero, F., Migliorato, I., Alberti, A., Bortolotti, F. (2006). Evolution of hepatitis C virus quasispecies in children with chronic hepatitis C. *Infection* 34, 62-65.

60. Gismondi, M.I., Becker, P.D., Diaz Carrasco, J.M., Guzman, C.A., Campos, R.H., Preciado, M.V. (2009). Evolution of hepatitis C virus hypervariable region 1 in immunocompetent children born to HCV-infected mothers. *J Viral Hepat* 16, 332-339.

61. Gojobori, T., Moriyama, E.N., Kimura, M. (1990). Molecular clock of viral evolution, and the neutral theory. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 10015-10018.

62. Gomez, J., Martell, M., Quer, J., Cabot, B., Esteban, J.I. (1999). Hepatitis C viral quasispecies. *J Viral Hepat* 6, 3-16.

63. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1993a). A second hepatitis C virus-encoded proteinase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90, 10583-10587.

64. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1993b). Expression and identification of hepatitis C virus polyprotein cleavage products. *J Virol* 67, 1385-1395.

65. Gremion, C., Cerny, A. (2005). Hepatitis C virus and the immune system: a concise review. *Rev Med Virol* 15, 235-268.

66. Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J. (2003). The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett* 535, 34-38.

67. Harris, H.J., Farquhar, M.J., Mee, C.J., Davis, C., Reynolds, G.M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S.G., et al. (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *J Virol* 82, 5007-5020.

68. Harris, K.A., Teo, C.G. (2001). Diversity of hepatitis C virus quasispecies evaluated by denaturing gradient gel electrophoresis. *Clin Diagn Lab Immunol* 8, 62-73.

69. Hijikata, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Shimotohno, K. (1991). Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 175, 220-228.
70. Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., VandePol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215, 1577-1585.
71. Hong, Z., Cameron, C.E., Walker, M.P., Castro, C., Yao, N., Lau, J.Y., Zhong, W. (2001). A novel mechanism to ensure terminal initiation by hepatitis C virus NS5B polymerase. *Virology* 285, 6-11.
72. Hoofnagle, J.H., Mullen, K.D., Jones, D.B., Rustgi, V., Di Bisceglie, A., Peters, M., Waggoner, J.G., Park, Y., Jones, E.A. (1986). Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med* 315, 1575-1578.
73. Hu, Y.W., Rocheleau, L., Larke, B., Chui, L., Lee, B., Ma, M., Liu, S., Omlin, T., Pelchat, M., Brown, E.G. (2005). Immunoglobulin mimicry by Hepatitis C Virus envelope protein E2. *Virology* 332, 538-549.
74. Jasiński, M., Banasiak, J., Frankowska, M., Figlerowicz, M. (2006). Rośliny jako reaktory do produkcji biofarmaceutyków. *Biotechnologia* 3, 53-66.
75. Jopling, C.L., Yi, M., Lancaster, A.M., Lemon, S.M., Sarnow, P. (2005). Modulation of hepatitis C virus RNA abundance by a liver-specific MicroRNA. *Science* 309, 1577-1581.
76. Kageyama, S., Agdamag, D.M., Alesna, E.T., Leano, P.S., Heredia, A.M., Abellanos-Tac-An, I.P., Jereza, L.D., Tanimoto, T., Yamamura, J., Ichimura, H. (2006). A natural inter-genotypic (2b/1b) recombinant of hepatitis C virus in the Philippines. *J Med Virol* 78, 1423-1428.
77. Kalinina, O., Norder, H., Mukomolov, S., Magnius, L.O. (2002). A natural intergenotypic recombinant of hepatitis C virus identified in St. Petersburg. *J Virol* 76, 4034-4043.
78. Kapadia, S.B., Chisari, F.V. (2005). Hepatitis C virus RNA replication is regulated by host geranylgeranylation and fatty acids. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 2561-2566.
79. Kaplan, M., Gawrieh, S., Cotler, S.J., Jensen, D.M. (2003). Neutralizing antibodies in hepatitis C virus infection: a review of immunological and clinical characteristics. *Gastroenterology* 125, 597-604.
80. Karnsakul, W., Alford, M.K., Schwarz, K.B. (2009). Managing pediatric hepatitis C: current and emerging treatment options. *Ther Clin Risk Manag* 5, 651-660.
81. Kato, N., Ootsuyama, Y., Ohkoshi, S., Nakazawa, T., Sekiya, H., Hijikata, M., Shimotohno, K. (1992). Characterization of hypervariable regions in the putative envelope protein of hepatitis C virus. *Biochem Biophys Res Commun* 189, 119-127.
82. Kato, N., Sekiya, H., Ootsuyama, Y., Nakazawa, T., Hijikata, M., Ohkoshi, S., Shimotohno, K. (1993). Humoral immune response to hypervariable region 1 of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 67, 3923-3930.
83. Kędziora, P., Figlerowicz, M., Formanowicz, P., Alejska, M., Jackowiak, P., Malinowska, N., Frątczak, A., Błażewicz, J., Figlerowicz, M. (2005). Computational methods in diagnostics of chronic hepatitis C. *Bulletin of the Polish Academy of Sciences: Technical Sciences* 53, 273-281.
84. Kim, Y.K., Kim, C.S., Lee, S.H., Jang, S.K. (2002). Domains I and II in the 5' nontranslated region of the HCV genome are required for RNA replication. *Biochem Biophys Res Commun* 290, 105-112.
85. Kitadokoro, K., Bordo, D., Galli, G., Petracca, R., Falugi, F., Abrignani, S., Grandi, G., Bolognesi, M. (2001). CD81 extracellular domain 3D structure: insight into the tetraspanin superfamily structural motifs. *EMBO J* 20, 12-18.

86. Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1996). Identification of a highly conserved sequence element at the 3' terminus of hepatitis C virus genome RNA. *J Virol* 70, 3363-3371.
87. Kumar, S., Nei, M., Dudley, J., Tamura, K. (2008). MEGA: a biologist-centric software for evolutionary analysis of DNA and protein sequences. *Brief Bioinform* 9, 299-306.
88. Lai, M.E., Mazzoleni, A.P., Argioli, F., De Virgilis, S., Balestrieri, A., Purcell, R.H., Cao, A., Farci, P. (1994). Hepatitis C virus in multiple episodes of acute hepatitis in polytransfused thalassaemic children. *Lancet* 343, 388-390.
89. Lai, M.M., Ware, C.F. (2000). Hepatitis C virus core protein: possible roles in viral pathogenesis. *Curr Top Microbiol Immunol* 242, 117-134.
90. Lanford, R.E., Chavez, D., Guerra, B., Lau, J.Y., Hong, Z., Brasky, K.M., Beames, B. (2001). Ribavirin induces error-prone replication of GB virus B in primary tamarin hepatocytes. *J Virol* 75, 8074-8081.
91. Legrand-Abrevanel, F., Claudinon, J., Nicot, F., Dubois, M., Chapuy-Regaud, S., Sandres-Saune, K., Pasquier, C., Izopet, J. (2007). New natural intergenotypic (2/5) recombinant of hepatitis C virus. *J Virol* 81, 4357-4362.
92. Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., Weber, P.C. (1999). Crystal structure of the RNA-dependent RNA polymerase from hepatitis C virus reveals a fully encircled active site. *Nat Struct Biol* 6, 937-943.
93. Leysen, P., Balzarini, J., De Clercq, E., Neyts, J. (2005). The predominant mechanism by which ribavirin exerts its antiviral activity in vitro against flaviviruses and paramyxoviruses is mediated by inhibition of IMP dehydrogenase. *J Virol* 79, 1943-1947.
94. Lindenbach, B.D., Thiel, H.-J., Rice, C.M. (2007). *Flaviviridae: The Viruses and Their Replication*. w Fields Virology, D.M. Knipe, P.M. Howley, eds. (Philadelphia, Lippincott-Raven Publishers), pp. 1101-1151.
95. Liu, J., Zhang, X.X., Zhang, S.Y., Lu, M., Kong, Y.Y., Wang, Y., Li, G.D. (2004). Expression of hepatitis C virus E2 ectodomain in *E. coli* and its application in the detection of anti-E2 antibodies in human sera. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)* 36, 57-63.
96. Liu, S., Yang, W., Shen, L., Turner, J.R., Coyne, C.B., Wang, T. (2009). Tight junction proteins claudin-1 and occludin control hepatitis C virus entry and are downregulated during infection to prevent superinfection. *J Virol* 83, 2011-2014.
97. Lopez-Labrador, F.X., Ampurdanes, S., Gimenez-Barcons, M., Guilera, M., Costa, J., Jimenez de Anta, M.T., Sanchez-Tapias, J.M., Rodes, J., Saiz, J.C. (1999). Relationship of the genomic complexity of hepatitis C virus with liver disease severity and response to interferon in patients with chronic HCV genotype 1b infection. *Hepatology* 29, 897-903.
98. Lukavsky, P.J. (2008). Structure and function of HCV IRES domains. *Virus Res.*
99. Machida, K., Cheng, K.T., Pavio, N., Sung, V.M., Lai, M.M. (2005). Hepatitis C virus E2-CD81 interaction induces hypermutation of the immunoglobulin gene in B cells. *J Virol* 79, 8079-8089.
100. Machida, K., Kondo, Y., Huang, J.Y., Chen, Y.C., Cheng, K.T., Keck, Z., Fong, S., Dubuisson, J., Sung, V.M., Lai, M.M. (2008). Hepatitis C virus (HCV)-induced immunoglobulin hypermutation reduces the affinity and neutralizing activities of antibodies against HCV envelope protein. *J Virol* 82, 6711-6720.
101. Maggi, F., Fornai, C., Vatteroni, M.L., Giorgi, M., Morrica, A., Pistello, M., Cammarota, G., Marchi, S., Ciccorossi, P., Bionda, A., et al. (1997). Differences in

hepatitis C virus quasispecies composition between liver, peripheral blood mononuclear cells and plasma. *J Gen Virol* 78 (*Pt 7*), 1521-1525.

102. Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet* 358, 958-965.

103. Manzin, A., Solforosi, L., Debiaggi, M., Zara, F., Tanzi, E., Romano, L., Zanetti, A.R., Clementi, M. (2000). Dominant role of host selective pressure in driving hepatitis C virus evolution in perinatal infection. *J Virol* 74, 4327-4334.

104. Marillonnet, S., Giritch, A., Gils, M., Kandzia, R., Klimyuk, V., Gleba, Y. (2004). In planta engineering of viral RNA replicons: efficient assembly by recombination of DNA modules delivered by *Agrobacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 6852-6857.

105. Martell, M., Esteban, J.I., Quer, J., Genesca, J., Weiner, A., Esteban, R., Guardia, J., Gomez, J. (1992). Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 66, 3225-3229.

106. McAllister, J., Casino, C., Davidson, F., Power, J., Lawlor, E., Yap, P.L., Simmonds, P., Smith, D.B. (1998). Long-term evolution of the hypervariable region of hepatitis C virus in a common-source-infected cohort. *J Virol* 72, 4893-4905.

107. McHutchinson, J.G., Hoofnagle, J.H. (2000). Therapy of chronic hepatitis C. w Hepatitis C, T.J. Liang, J.H. Hoofnagle, eds. (San Diego, California, USA, Academic Press), pp. 203-239.

108. McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Schiff, E.R., Shiffman, M.L., Lee, W.M., Rustgi, V.K., Goodman, Z.D., Ling, M.H., Cort, S., Albrecht, J.K. (1998). Interferon alfa-2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. Hepatitis Interventional Therapy Group. *N Engl J Med* 339, 1485-1492.

109. Meyer, K., Ait-Goughoulte, M., Keck, Z.Y., Fong, S., Ray, R. (2008). Antibody-dependent enhancement of hepatitis C virus infection. *J Virol* 82, 2140-2149.

110. Mita, E., Hayashi, N., Ueda, K., Kasahara, A., Fusamoto, H., Takamizawa, A., Matsubara, K., Okayama, H., Kamada, T. (1992). Expression of MBP-HCV NS1/E2 fusion protein in *E. coli* and detection of anti-NS1/E2 antibody in type C chronic liver disease. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 925-930.

111. Mondelli, M.U., Cerino, A., Lisa, A., Brambilla, S., Segagni, L., Cividini, A., Bissolati, M., Missale, G., Bellati, G., Meola, A., et al. (1999). Antibody responses to hepatitis C virus hypervariable region 1: evidence for cross-reactivity and immune-mediated sequence variation. *Hepatology* 30, 537-545.

112. Moradpour, D., Penin, F., Rice, C.M. (2007). Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol* 5, 453-463.

113. Moreau, I., Levis, J., Crosbie, O., Kenny-Walsh, E., Fanning, L.J. (2008). Correlation between pre-treatment quasispecies complexity and treatment outcome in chronic HCV genotype 3a. *Virol J* 5, 78.

114. Mori, S., Kato, N., Yagyu, A., Tanaka, T., Ikeda, Y., Petchelai, B., Chiewsilp, P., Kurimura, T., Shimotohno, K. (1992). A new type of hepatitis C virus in patients in Thailand. *Biochem Biophys Res Commun* 183, 334-342.

115. Nakazawa, T., Kato, N., Ohkoshi, S., Shibuya, A., Shimotohno, K. (1994). Characterization of the 5' noncoding and structural region of the hepatitis C virus genome from patients with non-A, non-B hepatitis responding differently to interferon treatment. *J Hepatol* 20, 623-629.

116. Nemchinov, L.G., Liang, T.J., Rifaat, M.M., Mazyad, H.M., Hadidi, A., Keith, J.M. (2000). Development of a plant-derived subunit vaccine candidate against hepatitis C virus. *Arch Virol* 145, 2557-2573.
117. Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J., Perelson, A.S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282, 103-107.
118. Ni, Y.H., Chang, M.H., Chen, P.J., Lin, H.H., Hsu, H.Y. (1997). Evolution of hepatitis C virus quasispecies in mothers and infants infected through mother-to-infant transmission. *J Hepatol* 26, 967-974.
119. Ogata, N., Alter, H.J., Miller, R.H., Purcell, R.H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 88, 3392-3396.
120. Oh, J.W., Sheu, G.T., Lai, M.M. (2000). Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *J Biol Chem* 275, 17710-17717.
121. Okamoto, H., Kanai, N., Mishiro, S. (1992a). Full-length nucleotide sequence of a Japanese hepatitis C virus isolate (HC-J1) with high homology to USA isolates. *Nucleic Acids Res* 20, 6410.
122. Okamoto, H., Kurai, K., Okada, S., Yamamoto, K., Lizuka, H., Tanaka, T., Fukuda, S., Tsuda, F., Mishiro, S. (1992b). Full-length sequence of a hepatitis C virus genome having poor homology to reported isolates: comparative study of four distinct genotypes. *Virology* 188, 331-341.
123. Op De Beeck, A., Cocquerel, L., Dubuisson, J. (2001). Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Gen Virol* 82, 2589-2595.
124. Op De Beeck, A., Montserret, R., Duvet, S., Cocquerel, L., Cacan, R., Barberot, B., Le Maire, M., Penin, F., Dubuisson, J. (2000). The transmembrane domains of hepatitis C virus envelope glycoproteins E1 and E2 play a major role in heterodimerization. *J Biol Chem* 275, 31428-31437.
125. Owsianka, A.M., Timms, J.M., Tarr, A.W., Brown, R.J., Hickling, T.P., Szwejk, A., Bieńkowska-Szewczyk, K., Thomson, B.J., Patel, A.H., Ball, J.K. (2006). Identification of conserved residues in the E2 envelope glycoprotein of the hepatitis C virus that are critical for CD81 binding. *J Virol* 80, 8695-8704.
126. Parker, W.B. (2005). Metabolism and antiviral activity of ribavirin. *Virus Res* 107, 165-171.
127. Pavio, N., Taylor, D.R., Lai, M.M. (2002). Detection of a novel unglycosylated form of hepatitis C virus E2 envelope protein that is located in the cytosol and interacts with PKR. *J Virol* 76, 1265-1272.
128. Pawlotsky, J.M., Germanidis, G., Neumann, A.U., Pellerin, M., Frainais, P.O., Dhumeaux, D. (1998a). Interferon resistance of hepatitis C virus genotype 1b: relationship to nonstructural 5A gene quasispecies mutations. *J Virol* 72, 2795-2805.
129. Pawlotsky, J.M., Pellerin, M., Bouvier, M., Roudot-Thoraval, F., Germanidis, G., Bastie, A., Darthuy, F., Remire, J., Soussy, C.J., Dhumeaux, D. (1998b). Genetic complexity of the hypervariable region 1 (HVR1) of hepatitis C virus (HCV): influence on the characteristics of the infection and responses to interferon alfa therapy in patients with chronic hepatitis C. *J Med Virol* 54, 256-264.
130. Pearlman, B.L. (2004). Hepatitis C treatment update. *Am J Med* 117, 344-352.
131. Penin, F., Combet, C., Germanidis, G., Frainais, P.O., Deleage, G., Pawlotsky, J.M. (2001). Conservation of the conformation and positive charges of hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein hypervariable region 1 points to a role in cell attachment. *J Virol* 75, 5703-5710.

132. Penin, F., Dubuisson, J., Rey, F.A., Moradpour, D., Pawlotsky, J.M. (2004). Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 39, 5-19.
133. Perez Filgueira, D.M., Zamorano, P.I., Dominguez, M.G., Taboga, O., Del Medico Zajac, M.P., Puntel, M., Romera, S.A., Morris, T.J., Borca, M.V., Sadir, A.M. (2003). Bovine herpes virus gD protein produced in plants using a recombinant tobacco mosaic virus (TMV) vector possesses authentic antigenicity. *Vaccine* 21, 4201-4209.
134. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282, 938-941.
135. Pond, S.L., Frost, S.D. (2005). Datamonkey: rapid detection of selective pressure on individual sites of codon alignments. *Bioinformatics* 21, 2531-2533.
136. Pond, S.L., Frost, S.D., Grossman, Z., Gravenor, M.B., Richman, D.D., Brown, A.J. (2006). Adaptation to different human populations by HIV-1 revealed by codon-based analyses. *PLoS Comput Biol* 2, e62.
137. Power, J.P., Lawlor, E., Davidson, F., Yap, P.L., Kenny-Walsh, E., Whelton, M.J., Walsh, T.J. (1994). Hepatitis C viraemia in recipients of Irish intravenous anti-D immunoglobulin. *Lancet* 344, 1166-1167.
138. Poynard, T., Marcellin, P., Lee, S.S., Niederau, C., Minuk, G.S., Ideo, G., Bain, V., Heathcote, J., Zeuzem, S., Trepo, C., et al. (1998). Randomised trial of interferon alpha2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon alpha2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. International Hepatitis Interventional Therapy Group (IHIT). *Lancet* 352, 1426-1432.
139. Puig-Basagoiti, F., Forns, X., Furcic, I., Ampurdanes, S., Gimenez-Barcons, M., Franco, S., Sanchez-Tapias, J.M., Saiz, J.C. (2005). Dynamics of hepatitis C virus NS5A quasispecies during interferon and ribavirin therapy in responder and non-responder patients with genotype 1b chronic hepatitis C. *J Gen Virol* 86, 1067-1075.
140. Quesnel-Vallieres, M., Lemay, M., Lapointe, N., Martin, S.R., Soudeyns, H. (2008). HCV quasispecies evolution during treatment with interferon alfa-2b and ribavirin in two children coinfecting with HCV and HIV-1. *J Clin Virol* 43, 236-240.
141. Roccacaccia, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B.B., McKeating, J., Yagnik, A., et al. (2003). Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J Virol* 77, 1856-1867.
142. Roingeard, P., Hourieux, C., Blanchard, E., Brand, D., Ait-Goughoulte, M. (2004). Hepatitis C virus ultrastructure and morphogenesis. *Biol Cell* 96, 103-108.
143. Rosa, D., Campagnoli, S., Moretto, C., Guenzi, E., Cousens, L., Chin, M., Dong, C., Weiner, A.J., Lau, J.Y., Choo, Q.L., et al. (1996). 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 U S A* 93, 1759-1763.
144. Saitou, N., Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol Biol Evol* 4, 406-425.
145. Sandres, K., Dubois, M., Pasquier, C., Payen, J.L., Alric, L., Duffaut, M., Vinel, J.P., Pascal, J.P., Puel, J., Izopet, J. (2000). Genetic heterogeneity of hypervariable region 1 of the hepatitis C virus (HCV) genome and sensitivity of HCV to alpha interferon therapy. *J Virol* 74, 661-668.
146. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccacaccia, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J* 21, 5017-5025.
147. Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annu Rev Microbiol* 55, 255-281.

148. Sentandreu, V., Jimenez-Hernandez, N., Torres-Puente, M., Bracho, M.A., Valero, A., Gosalbes, M.J., Ortega, E., Moya, A., Gonzalez-Candelas, F. (2008). Evidence of recombination in inpatient populations of hepatitis C virus. *PLoS ONE* 3, e3239.
149. Severson, W.E., Schmaljohn, C.S., Javadian, A., Jonsson, C.B. (2003). Ribavirin causes error catastrophe during Hantaan virus replication. *J Virol* 77, 481-488.
150. Shirai, M., Arichi, T., Chen, M., Masaki, T., Nishioka, M., Ikeda, K., Takahashi, H., Enomoto, N., Saito, T., Major, M.E., et al. (1999). T cell recognition of hypervariable region-1 from hepatitis C virus envelope protein with multiple class II MHC molecules in mice and humans: preferential help for induction of antibodies to the hypervariable region. *J Immunol* 162, 568-576.
151. Sierra, S., Davila, M., Lowenstein, P.R., Domingo, E. (2000). Response of foot-and-mouth disease virus to increased mutagenesis: influence of viral load and fitness in loss of infectivity. *J Virol* 74, 8316-8323.
152. Simmonds, P. (2000). Hepatitis C virus genotypes. w Hepatitis C, T.J. Liang, J.H. Hoofnagle, eds. (San Diego, California, USA, Academic Press), pp. 53-70.
153. Simmonds, P. (2001). The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *J Gen Virol* 82, 693-712.
154. Simmonds, P. (2004). Genetic diversity and evolution of hepatitis C virus--15 years on. *J Gen Virol* 85, 3173-3188.
155. Simmonds, P., Bukh, J., Combet, C., Deleage, G., Enomoto, N., Feinstone, S., Halfon, P., Inchauspe, G., Kuiken, C., Maertens, G., et al. (2005). Consensus proposals for a unified system of nomenclature of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* 42, 962-973.
156. Smith, D.B., Pathirana, S., Davidson, F., Lawlor, E., Power, J., Yap, P.L., Simmonds, P. (1997). The origin of hepatitis C virus genotypes. *J Gen Virol* 78 (Pt 2), 321-328.
157. Sobolev, B.N., Poroikov, V.V., Olenina, L.V., Kolesanova, E.F., Archakov, A.I. (2000). Comparative analysis of amino acid sequences from envelope proteins isolated from different hepatitis C virus variants: possible role of conservative and variable regions. *J Viral Hepat* 7, 368-374.
158. Stamataki, Z., Shannon-Lowe, C., Shaw, J., Mutimer, D., Rickinson, A.B., Gordon, J., Adams, D.H., Balfe, P., McKeating, J.A. (2009). Hepatitis C virus association with peripheral blood B lymphocytes potentiates viral infection of liver-derived hepatoma cells. *Blood* 113, 585-593.
159. Sullivan, D.G., Wilson, J.J., Carithers, R.L., Jr., Perkins, J.D., Gretch, D.R. (1998). Multigene tracking of hepatitis C virus quasispecies after liver transplantation: correlation of genetic diversification in the envelope region with asymptomatic or mild disease patterns. *J Virol* 72, 10036-10043.
160. Suzuki, Y., Gojobori, T. (2001). Positively selected amino acid sites in the entire coding region of hepatitis C virus subtype 1b. *Gene* 276, 83-87.
161. Tai, C.L., Chi, W.K., Chen, D.S., Hwang, L.H. (1996). The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J Virol* 70, 8477-8484.
162. Tamura, K., Dudley, J., Nei, M., Kumar, S. (2007). MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. *Mol Biol Evol* 24, 1596-1599.
163. Tan, S.-L. (2006). *Hepatitis C Viruses: Genomes and Molecular Biology* (Norfolk, UK, Horizon Bioscience).
164. Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., Lai, M.M. (1999). Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 285, 107-110.

165. Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Rice, C.M. (2005). Structure of the zinc-binding domain of an essential component of the hepatitis C virus replicase. *Nature* 435, 374-379.
166. Toyoda, H., Fukuda, Y., Koyama, Y., Takamatsu, J., Saito, H., Hayakawa, T. (1997a). Effect of immunosuppression on composition of quasispecies population of hepatitis C virus in patients with chronic hepatitis C coinfecting with human immunodeficiency virus. *J Hepatol* 26, 975-982.
167. Toyoda, H., Kumada, T., Nakano, S., Takeda, I., Sugiyama, K., Osada, T., Kiriyama, S., Sone, Y., Kinoshita, M., Hadama, T. (1997b). Quasispecies nature of hepatitis C virus and response to alpha interferon: significance as a predictor of direct response to interferon. *J Hepatol* 26, 6-13.
168. Troesch, M., Meunier, I., Lapierre, P., Lapointe, N., Alvarez, F., Boucher, M., Soudeyns, H. (2006). Study of a novel hypervariable region in hepatitis C virus (HCV) E2 envelope glycoprotein. *Virology* 352, 357-367.
169. Ueda, E., Enomoto, N., Sakamoto, N., Hamano, K., Sato, C., Izumi, N., Watanabe, M. (2004). Changes of HCV quasispecies during combination therapy with interferon and ribavirin. *Hepatol Res* 29, 89-96.
170. Viazov, S., Widell, A., Nordenfelt, E. (2000). Mixed infection with two types of hepatitis C virus is probably a rare event. *Infection* 28, 21-25.
171. Vignuzzi, M., Stone, J.K., Andino, R. (2005). Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res* 107, 173-181.
172. Vo, N.V., Young, K.C., Lai, M.M. (2003). Mutagenic and inhibitory effects of ribavirin on hepatitis C virus RNA polymerase. *Biochemistry* 42, 10462-10471.
173. Wang, Q.M., Hockman, M.A., Staschke, K., Johnson, R.B., Case, K.A., Lu, J., Parsons, S., Zhang, F., Rathnachalam, R., Kirkegaard, K., et al. (2002). Oligomerization and cooperative RNA synthesis activity of hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *J Virol* 76, 3865-3872.
174. Wąsik, S., Jackowiak, P., Krawczyk, J., Kędziora, P., Formanowicz, P., Figlerowicz, M., Błażewicz, J. (2009). Towards prediction of HCV therapy efficiency. *Comput Math Methods Med przyjęte do druku*.
175. WHO (1999). Hepatitis C - global prevalence (update). *Weekly Epidemiological Record*, pp. 425-427.
176. Wilkinson, J., Radkowski, M., Laskus, T. (2009). Hepatitis C virus neuroinvasion: identification of infected cells. *J Virol* 83, 1312-1319.
177. Wolinsky, S.M., Korber, B.T., Neumann, A.U., Daniels, M., Kunstman, K.J., Whetsell, A.J., Furtado, M.R., Cao, Y., Ho, D.D., Safrit, J.T. (1996). Adaptive evolution of human immunodeficiency virus-type 1 during the natural course of infection. *Science* 272, 537-542.
178. Xu, Z., Fan, X., Xu, Y., Di Bisceglie, A.M. (2008). Comparative analysis of nearly full-length hepatitis C virus quasispecies from patients experiencing viral breakthrough during antiviral therapy: clustered mutations in three functional genes, E2, NS2, and NS5a. *J Virol* 82, 9417-9424.
179. Yagnik, A.T., Lahm, A., Meola, A., Roccasecca, R.M., Ercole, B.B., Nicosia, A., Tramontano, A. (2000). A model for the hepatitis C virus envelope glycoprotein E2. *Proteins* 40, 355-366.
180. Yang, X.J., Liu, J., Ye, L., Liao, Q.J., Wu, J.G., Gao, J.R., She, Y.L., Wu, Z.H., Ye, L.B. (2006). HCV NS2 protein inhibits cell proliferation and induces cell cycle arrest in the S-phase in mammalian cells through down-regulation of cyclin A expression. *Virus Res* 121, 134-143.

- 181.** Yea, C., Bukh, J., Ayers, M., Roberts, E., Kraiden, M., Tellier, R. (2007). Monitoring of hepatitis C virus quasispecies in chronic infection by matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry mutation detection. *J Clin Microbiol* *45*, 1053-1057.
- 182.** Yi, M., Lemon, S.M. (2003a). 3' nontranslated RNA signals required for replication of hepatitis C virus RNA. *J Virol* *77*, 3557-3568.
- 183.** Yi, M., Lemon, S.M. (2003b). Structure-function analysis of the 3' stem-loop of hepatitis C virus genomic RNA and its role in viral RNA replication. *RNA* *9*, 331-345.
- 184.** Yi, M., Nakamoto, Y., Kaneko, S., Yamashita, T., Murakami, S. (1997). Delineation of regions important for heteromeric association of hepatitis C virus E1 and E2. *Virology* *231*, 119-129.
- 185.** Yu, X., Qiao, M., Atanasov, I., Hu, Z., Kato, T., Liang, T.J., Zhou, Z.H. (2007). Cryo-electron microscopy and three-dimensional reconstructions of hepatitis C virus particles. *Virology* *367*, 126-134.
- 186.** Yurkova, M.S., Patel, A.H., Fedorov, A.N. (2004). Characterisation of bacterially expressed structural protein E2 of hepatitis C virus. *Protein Expr Purif* *37*, 119-125.
- 187.** Zhang, G.G., Rodrigues, L., Rovinski, B., White, K.A. (2002a). Production of HIV-1 p24 protein in transgenic tobacco plants. *Mol Biotechnol* *20*, 131-136.
- 188.** Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M., McKeating, J.A. (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol* *78*, 1448-1455.
- 189.** Zhang, J., Yamada, O., Yoshida, H., Iwai, T., Araki, H. (2002b). Autogenous translational inhibition of core protein: implication for switch from translation to RNA replication in hepatitis C virus. *Virology* *293*, 141-150.
- 190.** Zhong, H., Kate, L., Galina, E., Yasmin, T., Hugh, S.M. (2008). High-yield rapid production of hepatitis B surface antigen in plant leaf by a viral expression system. *Plant Biotechnology Journal* *6*, 202-209.