



**Międzyuczelniany Wydział
Biotechnologii**

Uniwersytetu Gdańskiego
i Gdańskiego Uniwersytetu Medycznego

ROZPRAWA DOKTORSKA

Mgr Karolina Zimmer

Analiza zmienności genetycznej glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) u pacjentów poddanych terapii interferonem alfa i rybawiryną

**Hepatitis C Virus E2 glycoprotein genetic variability in patients
subjected to interferon-ribavirin therapy**

Praca przedstawiona

Radzie Dyscypliny Biotechnologia Uniwersytetu Gdańskiego

celem uzyskania stopnia doktora

w dziedzinie nauk ścisłych i przyrodniczych

w dyscyplinie naukowej biotechnologia

Promotor: Prof. dr hab. Krystyna Bieńkowska-Szewczyk

Zakład Biologii Molekularnej Wirusów

Międzyuczelniany Wydział Biotechnologii UG i GUMed

GDAŃSK 2024

Podziękowania

Prof. dr hab. Krystynie Bieńkowskiej-Szewczyk dziękuję za poświęcony czas, opiekę oraz cenne rady.

*Koleżankom i Kolegom z Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów oraz Zakładu Szczepionek
Rekombinowanych dziękuję za miłą atmosferę w pracy i wsparcie w realizacji badań.*

*Prof. Dr hab. Markowi Figlerowiczowi i dr hab. Paulinie Jackowiak dziękuję za udaną
współpracę naukową.*

*Prof. Dr hab. Rafałowi Bobińskiemu i dr. Mieczysławowi Dutce dziękuję za wsparcie
i motywację do działania.*

*Mojemu Mężowi Mateuszowi dziękuję za nieograniczone wsparcie, motywację, słowa otuchy
i nieskończone pokłady cierpliwości.*

Mojej Rodzinie dziękuję za wiarę we mnie.

Z całego serca dziękuję!

Spis treści

1. Wykaz skrótów	7
2. Streszczenie w języku polskim	10
3. Abstract (streszczenie w języku angielskim)	12
4. Wstęp	14
4.1. Charakterystyka Wirusa Zapalenia Wątroby typu C (HCV).....	14
4.2. Struktura wirionu i organizacja genomu wirusa HCV	15
4.3. Cykl życiowy wirusa HCV	18
4.4. Białka wirusa HCV	20
4.5. Białka wirusowe biorące udział w wejściu wirusa do komórki gospodarza – glikoproteiny E1 i E2	23
4.6. Epidemiologia i patogeneza zakażeń HCV	27
4.7. Odpowiedź immunologiczna organizmu skierowana przeciwko HCV i jej unikanie	30
4.8. Diagnostyka zakażeń HCV	34
4.9. Terapie anty-HCV u dorosłych i dzieci.....	35
4.9.1. Preparaty o bezpośredniej aktywności przeciwwirusowej – Direct Acting Antivirals.....	35
4.9.2. Aktualne wytyczne dotyczące terapii wirusowego zapalenia wątroby typu C ...	37
4.10. Szczepionka profilaktyczna skierowana przeciwko wirusowi HCV	38
5. Cel pracy	42
6. Metody	43
6.1. Metody pracy z komórkami bakteryjnymi	43
6.1.1. Przygotowanie komórek kompetentnych: TOP10 E. coli	43
6.1.2. Transformacja komórek kompetentnych TOP10 E. coli.....	43
6.1.3. Nadprodukcja CD81-LEL w komórkach bakteryjnych	44
6.2. Metody pracy z DNA	44
6.2.1. Amplifikacja wirusowego materiału genetycznego pochodzącego od pacjentów	44
6.2.2. Klonowanie do plazmidu pJet1.2 blunt.....	44
6.2.3. Amplifikacja sekwencji DNA kodujących glikoproteinę E1 oraz warianty glikoproteiny E2 przy użyciu metody PCR.....	44

6.2.4.	Konstrukcja chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1E2 – „Assembly” PCR	45
6.2.5.	Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych	45
6.2.6.	Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi	45
6.2.7.	Ligacja	46
6.2.8.	Elektroforeza DNA w żelu agarozowym	46
6.2.9.	Izolacja DNA z żelu agarozowego	47
6.3.	Metody analizy bioinformatycznej obejmującej poziom N-glikozylacji uzyskanych konstruktów	47
6.4.	Metody pracy z białkami	47
6.4.1.	Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)	47
6.4.2.	Elektrotransfer mokry białek rozdzielonych przy pomocy elektroforezy SDS- PAGE na błonę PVDF	47
6.4.3.	Western Blotting	48
6.4.4.	Barwienie żeli poliakryloamidowych	48
6.4.5.	Immunoprecypitacja glikoprotein E1 i E2	48
6.4.6.	Oczyszczanie fragmentu dużej zewnątrzkomórkowej pętli receptora CD81 (CD81-LEL-GST) metodą chromatografii powinowactwa	49
6.4.7.	ELISA z wykorzystaniem oczyszczonego fragmentu receptora CD81 (CD81- LEL-GST)	49
6.4.8.	GNA-capture ELISA	50
6.4.9.	ELISA z wykorzystaniem panelu przeciwciał konformacyjnych	51
6.4.10.	Badanie wpływu syntezy glikoprotein E1E2 na poziom ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek	51
6.4.11.	Pomiar infekcyjności pseudocząsteczek HCV	52
6.4.12.	Detekcja glikoprotein E1 i E2 w pseudocząsteczkach HCV	52
6.5.	Metody pracy z hodowlami komórek ssaczych	52
6.5.1.	Hodowle komórek ssaczych	52
6.5.2.	Transfekcja komórek ssaczych plazmidowym DNA	53
6.5.3.	Przygotowanie lizatów komórkowych	53
6.5.4.	Immunodetekcja białek w jednowarstwowych hodowlach komórek (Test IPMA) 53	
6.5.5.	Barwienie immunofluorescencyjne klasyczne	54
6.5.6.	Produkcja pseudocząsteczek HCV (HCV pseudoparticles, HCVpp)	54
7.	Materiały	55
7.1.	Fragmety DNA pochodzące od pacjentów uzyskane na podstawie RNA wirusowego uprzednio wyizolowanego od pacjentów, otrzymane od prof. M. Figlerowicza – materiał wyjściowy do badań	55
7.2.	Szczepy bakteryjne	55

7.3. Linie komórkowe	55
7.4. Plazmidy.....	56
7.5. Pożywki.....	57
7.6. Pozostałe odczynniki do hodowli komórkowych.....	57
7.7. Antybiotyki.....	57
7.8. Przeciwciała	58
7.8.1. Przeciwciała pierwszorzędowe	58
7.8.2. Przeciwciała drugorzędowe.....	58
7.9. Wzorce masowe	58
7.10. Enzymy.....	59
7.11. Bufory i roztwory	59
7.12. Pozostałe odczynniki.....	61
8. Wyniki	63
8.1. Uzyskanie materiału wyjściowego do badań	63
8.1.1. Amplifikacja wirusowego materiału genetycznego pochodzącego od pacjentów oraz konstrukcja chimerycznego heterodimeru glikoprotein E1E2 dla każdej z próbek .	63
8.1.2. Produkcja chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1E2 wirusa HCV w komórkach ssaczy.....	74
8.2. Analiza strukturalna glikoprotein E1E2 wirusa HCV, zawierających warianty genetyczne glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów	76
8.2.1. Analiza masy cząsteczkowej uzyskanych glikoprotein wirusa HCV	76
8.2.2. Analiza formowania heterodimeru glikoprotein E1E2	77
8.2.3. Analiza stanu N-glikozylacji wariantów glikoproteiny E2	78
8.3. Analiza funkcjonalna zrekonstruowanych heterodimerów glikoprotein, niosących zmienione genetycznie warianty glikoproteiny E2.....	82
8.3.1. Badanie stopnia wiązania się różnych wariantów glikoproteiny E2 do lektyn pochodzących z <i>Galanthus nivalis</i>	82
8.3.2. Badanie stopnia powinowactwa wariantów genetycznych glikoproteinę E2 do receptora komórkowego CD81	83
8.3.3. Analiza poprawności fałdowania białek – Western Blotting i ELISA z wykorzystaniem panelu przeciwciał konformacyjnych	86
8.3.4. Ocena regulacji ekspresji cząsteczek MHC klasy I przez warianty genetyczne glikoproteiny E2 metodą cytometrii przepływowej	88
8.3.5. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji wariantów glikoproteiny E2	90
8.3.6. Analiza sekwencji glikoproteiny E2 pochodzących od pacjentów i zdeponowanych w europejskiej bazie danych (euHCVdb) pod kątem częstotliwości występowania mutacji powodujących utratę miejsc N-glikozylacji	92

8.3.7. Badanie wpływu zmienności genetycznej oraz różnic w profilu N-glikozylacji wariantów białka E2 na infekcyjność cząsteczek wirusowych za pomocą pseudocząsteczek HCV	93
9. Podsumowanie wyników	96
10. Dyskusja.....	98
11. Bibliografia	107
12. Dorobek naukowy	129

1. Wykaz skrótów

Ang. – angielski

Apo – apolipoproteiny (ang. Apolipoproteins)

AR – rejon antygenowy (ang. Antigenic region)

AS – miejsce antygenowe (ang. Antigenic site)

Asn – asparagina

BSA – surowicza albumina wołowa (ang. Bovine serum albumin)

C – białko rdzenia (ang. Core protein)

CD – antygen różnicowania komórkowego (ang. Cluster of differentiation)

CD81 – receptor CD81 (ang. Cluster of differentiation 81)

CDC – Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention)

CLDN1 – kładyna 1 (ang. Claudin1)

CR – rejon konserwowany (ang. Conserved region)

CRE – element replikacyjny (ang. Cis-acting replication element)

DAAs – leki o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (ang. Direct Acting Antivirals)

DNA – kwas deoksyrybonukleinowy (ang. Deoxyribonucleic acid)

E1 – glikoproteina osłonkowa 1 (ang. Envelope glycoprotein 1)

E2 – glikoproteina osłonkowa 2 (ang. Envelope glycoprotein 2)

eIF-2a – eukariotyczny czynnik inicjacji translacji 2a (ang. eukaryotic translation initiation factor 2a)

EMA – Europejska Agencja Leków (ang. European Medicines Agency)

ER – retikulum endoplazmatyczne (ang. Endoplasmic reticulum)

FBS – płodowa surowica bydlęca (ang. Fetal bovine serum)

FDA – Amerykańska Agencja Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration)

GNA – lektyny pochodzące ze śnieżyczki przebiśniega (ang. Galanthus nivalis agglutinin)

GST – transferaza-S-glutationowa (ang. Glutathione-S-Transferase)

Gt – genotyp

HAV – wirus zapalenia wątroby typu A (ang. Hepatitis A Virus)

HBV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis B Virus)

HCC – rak wątrobowokomórkowy (ang. Hepatocellular carcinoma)

HCV – wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis C Virus)

HCVcc – infekcyjny HCV pochodzący z hodowli komórkowych (ang. cell culture HCV)

HCVpp – pseudocząsteczki wirusa HCV (ang. HCV pseudoparticles)

HIV – ludzki wirus niedoboru odporności (ang. Human Immunodeficiency Virus)

HVR – rejon hiperzmienny (ang. Hypervariable region)

IFN – interferon

IL – interleukina (ang. Interleukin)

IRES – wewnętrzne miejsce wiązania rybosomu (ang. Internal Ribosome Entry Site)

J.w – jak wyżej

LDL – lipoproteiny o małej gęstości (ang. Low density lipoproteins)

LEL – duża pętla zewnątrzkomórkowa (ang. Large Extracellular Loop)

LVP – cząsteczki lipowirusowe (ang. Lipo-viro-particles)

MHC – główny układ zgodności tkankowej (ang. Major Histopatibility Complex)

nAb – przeciwciała neutralizujące (ang. neutralizing antibodies)

NANBH – wirus zapalenia wątroby typu nie-A i nie-B (ang. Non-A-Non-B-Hepatitis Virus)

NK – naturalni zabójcy, komórki układu immunologicznego (ang. Natural Killers)

NR – pacjenci nieodpowiadający na terapię anty-HCV (ang. Non-responders)

NS – białko niestrukturalne (ang. Non-structural protein)

NTD – domena N-końcowa (ang. N-terminal domain)

OCLN – okludyna (ang. Occludin)

ORF – otwarta ramka odczytu (ang. Open Reading Frame)

PBMC – jednojądrzaste komórki krwi obwodowej (ang. Peripheral blood mononuclear cells)

PCR – łańcuchowa reakcja polimerazy (ang. Polymerase Chain Reaction)

Peg – pegylowany

pFP – prawdopodobny peptyd fuzyjny (ang. Putative fusion peptide)

PI – inhibitory proteazy wirusowej (ang. Protease inhibitors)

PKR – białkowa kinaza R (ang. Protein kinase R)

PVDF – polifluorek winylidenu (ang. Polyvinylidene fluoride)

RBD – domena wiążąca receptor białka S wirusa SARS-CoV-2 (ang. Receptor binding domain)

RBV – rybawiryna (ang. Ribavirin)

RNA – kwas rybonukleinowy

RT-PCR – reakcja łańcuchowa polimerazy z odwrotną transkrypcją (ang. Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction)

S – białko kolca wirusa SARS-CoV-2 (ang. Spike)

SARS-CoV-2 – drugi koronawirus ciężkiego ostrego zespołu oddechowego (ang. Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2)

SEL – mała pętla zewnątrzkomórkowa (ang. Small Extracellular Loop)

Ser – seryna (ang. Serine)

sHBaAg – małe białko powierzchniowe wirusa zapalenia wątroby typu B (ang. Small hepatitis B surface antigen)

SPP – peptydaza peptydu sygnałowego (ang. Signal Peptide Peptidase)

SR – pacjenci trwale odpowiadający na terapię anty-HCV (ang. Sustained-responders)

SR-BI – receptor zmiatacz klasy B typu I (ang. Scavenger receptor class B type I)

SVR – trwała odpowiedź wirusologiczna (ang. sustained virological response)

Thr – treonina (ang. Threonine)

TLR – receptor toll-podobny (ang. Toll-like receptor)

TMD – domena przez błonową (ang. Transmembrane domain)

TR – przejściowa odpowiedź wirusologiczna (ang. Transient-response)

UTR – rejon niepodlegający translacji (ang. Untranslated region)

VLDL – lipoproteiny o bardzo małej gęstości (ang. Very-low density lipoproteins)

VLPs – cząsteczki wirusopodobne (ang. virus-like particles)

WHO – Światowa Organizacja Zrowia (ang. World Health Organisation)

WZW – wirusowe zapalenie wątroby

2. Streszczenie w języku polskim

Wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis C Virus, HCV) stanowi jedno z najbardziej poważnych zagrożeń dla zdrowia publicznego. Szacuje się, że ok 1-2% światowej populacji jest zakażonych tym wirusem, co przekłada się na około 242 000 zgonów rocznie, corocznie też dochodzi do 1,5 miliona nowych zakażeń. Do roku 2011 roku standardem leczenia zakażeń HCV pozostawała terapia skojarzona pegylowanym interferonem oraz rybawiryną. Jednakże wieloletnia praca naukowców doprowadziła do opracowania leków celujących bezpośrednio w białka wirusowe, tzw direct acting anti-viral drugs (DAAs). Terapeutyki te cechują się bardzo wysokim wskaźnikiem skuteczności (powyżej 90%). Jednak wysokie koszty prowadzenia terapii przy pomocy DAAs, ograniczona jej dostępność, a także pojawianie się wariantów opornych na leczenie stanowią główne przeszkody w skutecznej kontroli rozprzestrzeniania się zakażeń wirusem HCV. Istnieje więc wciąż wielka potrzeba opracowania szczepionki profilaktycznej. Zadanie to jest jednak utrudnione przez wysoką zmienność genetyczną wirusa, a także brak dogłębnego zrozumienia mechanizmów wzbudzania odpowiedzi immunologicznej przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C.

Glikoproteiny osłonkowe E1 i E2, tworzące na powierzchni wirionu HCV heterodimer i odpowiedzialne za wejście wirusa do komórki gospodarza, są głównym celem dla przeciwciał neutralizujących (ang. Neutralizing antibodies, nAb). Ektodomeny obu tych białek są silnie glikozylowane – glikany stanowią 1/3 masy heterodimeru E1E2. Pomimo dużej zmienności genetycznej, miejsca N-glikozylacji są silnie konserwowane, co może sugerować ich ważną rolę w funkcjonowaniu glikoprotein HCV. Co więcej, dane literaturowe wskazują na udział N-glikanów w ucieczce wariantów wirusowych przed działaniem układu immunologicznego gospodarza, zarówno w warunkach *in vitro*, jak i *in vivo*. Można więc wnioskować, że wzór N-glikozylacji glikoprotein E1E2 może pełnić kluczową rolę w indukowaniu odpowiedzi ze strony przeciwciał neutralizujących przez potencjalne preparaty szczepionkowe.

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie zależności pomiędzy zmiennością genetyczną glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), a odpowiedzią na terapię pegylowanym interferonem alfa i rybawiryną u dzieci. W trakcie prowadzenia badań został

udokumentowany związek pomiędzy mutacjami we wzorze N-glikozylacji białka E2, a zmniejszonym rozpoznawaniem epitopów przez przeciwciała neutralizujące.

Modelami użytymi w wykonanych badaniach były chimeryczne heterodimery glikoprotein E1E2 wirusa HCV składające się z białek uzyskanych ze szczepu referencyjnego H77c wirusa HCV (glikoproteina E1) oraz białek otrzymanych z materiału pochodzącego od pacjentów Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu (glikoproteina E2). Istotnym celem pracy była analiza roli obecności/braku reszt cukrowych na powierzchni glikoproteiny E2 w procesie rozpoznawania przez przeciwciała neutralizujące. Co ważne, warianty glikoproteiny E2 niosące zmiany we wzorze N-glikozylacji obecne przed rozpoczęciem leczenia, w wyniku działania presji selekcyjnej, stawały się wariantami dominującymi w organizmie pacjenta.

Przeprowadzone badania pozwoliły na uzyskanie istotnych informacji na temat potencjalnego mechanizmu ucieczki wirusa HCV przed działaniem układu immunologicznego gospodarza, co może przyczynić się do opracowania skutecznej szczepionki przeciwko wirusowi zapalenia wątroby typu C.

3. Abstract (streszczenie w języku angielskim)

Hepatitis C Virus (HCV) is one of the most serious public health threats. It is estimated that approximately 1-2 % of the world's population is infected with the virus, resulting in approximately 242 000 deaths per year and 1.5 million new infections each year. Until 2011, combination therapy with pegylated interferon and ribavirin remained the standard of care for HCV infection. However, many years of research work have led to the development of drugs that target viral proteins directly, so-called direct acting anti-viral drugs (DAAs). These therapies have a very high success rate (above 90%). However, the high cost of providing therapy with DAAs, its limited availability, and the emergence of treatment-resistant variants are major obstacles to effectively controlling the spread of HCV infection. There is therefore still a great need to develop a prophylactic vaccine. However, this task is hampered by the high genetic variability of the virus, as well as the lack of a thorough understanding of the mechanisms of induction of the immune response against hepatitis C virus.

The envelope glycoproteins E1 and E2, which form a heterodimer on the surface of the HCV virus and are responsible for the entry of the virus into the host cell, are the main target for neutralizing antibodies. The ectodomains of both these proteins are highly glycosylated - glycans account for one-third of the mass of the E1E2 heterodimer. Despite high genetic variability, the N-glycosylation sites are highly conserved, which may suggest their important role in HCV glycoprotein function. Moreover, literature data indicate the involvement of N-glycans in the escape of viral variants from the host immune system, both in vitro and in vivo. Thus, it can be inferred that the N-glycosylation pattern of E1E2 glycoproteins may play a key role in the induction of neutralizing antibodies response by potential vaccine candidates.

The aim of the present study was to search for a relationship between genetic variation of the E2 glycoprotein of hepatitis C virus (HCV) and the response to pegylated interferon alpha and ribavirin therapy in children. During the course of the study, an association between mutations in the N-glycosylation pattern of the E2 protein and reduced recognition of epitopes by neutralizing antibodies was documented.

The models used in the study were chimeric heterodimers of HCV glycoproteins E1E2 consisting of proteins obtained from the reference strain H77c of HCV (glycoprotein E1) and proteins obtained from material from patients of the Department of Infectious Diseases and

Child Neurology of the Karol Marcinkowski Medical University in Poznań (glycoprotein E2). An important aim of the study was to analyze the role of the presence/absence of sugar residues on the surface of glycoprotein E2 in the recognition process by neutralizing antibodies. Importantly, variants of E2 glycoprotein carrying changes in the N-glycosylation pattern present prior to treatment became the predominant variants in the patient's organism as a result of selection pressure.

The research conducted has provided important insights into the potential mechanism by which HCV escapes from the host immune system, which may contribute to the development of an effective vaccine against hepatitis C virus.

4. Wstęp

4.1. Charakterystyka Wirusa Zapalenia Wątroby typu C (HCV)

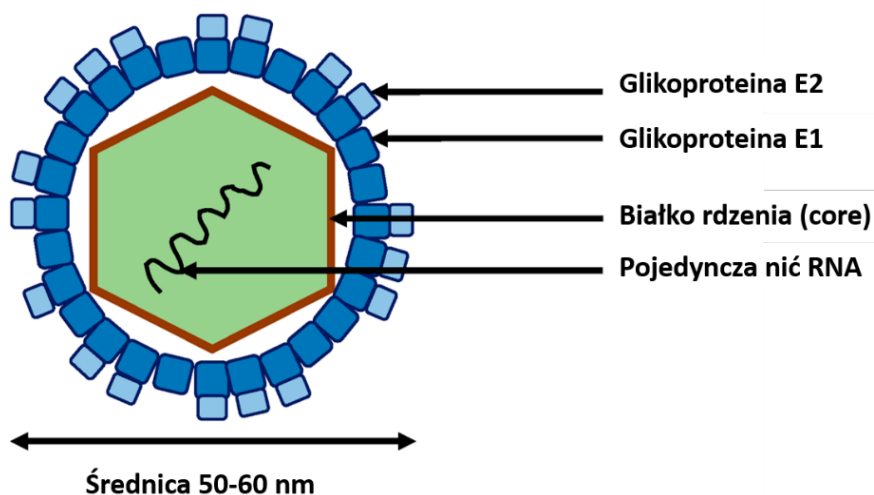
Wirus zapalenia wątroby typu C (ang. Hepatitis C Virus, HCV) stanowi jedno z najbardziej poważnych zagrożeń dla zdrowia publicznego. Szacuje się, że ok 1-2% światowej populacji jest zakażonych tym wirusem, co przekłada się na około 242 000 zgonów rocznie, a dodatkowo każdego roku dochodzi do 1,5 milionów nowych zakażeń (Kenfack-Momo i wsp., 2024; WHO 2024).

Wirus HCV został zidentyfikowany w 1989 roku przez zespół naukowców pod kierownictwem Michaela Houghtona dzięki wykorzystaniu technik klonowania molekularnego i analizy cDNA. Jednakże jeszcze we wczesnych latach siedemdziesiątych XX wieku lekarze klinicyści obserwowali częste przypadki występowania zapalenia wątroby związanego z transfuzją (około 1/3 wszystkich pacjentów poddawanych transfuzjom), często o charakterze przewlekłym, którego nie można było przypisać ani wirusowi zapalenia wątroby typu A (ang. Hepatitis A Virus, HAV), ani wirusowi zapalenia wątroby typu B (ang. Hepatitis B Virus, HBV), ani żadnej innej znanej przyczynie. Naukowcy, świadomi istnienia nowego czynnika wywołującego chroniczne zapalenie wątroby, zaczęli stosować określenie Wirus Zapalenia Wątroby Typu Nie-A i Nie-B (ang. Non-A-Non-B-Hepatitis Virus, NANBH). Za twórców tego terminu uznaje się Harveya J. Altera i jego współpracowników (Alter i wsp., 1975; Manns i Maasoumy, 2022). Warto wspomnieć, że w 2020 roku Harvey J. Alter, Michael Houghton i Charles M. Rice otrzymali Nagrodę Nobla w dziedzinie fizjologii lub medycyny właśnie za odkrycie wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV).

Obecnie wiadomo, że wirus HCV należy do rodziny Flaviviridae i do rodzaju Hepacivirus. Jest małym, osłonkowym wirusem, którego materiał genetyczny, stanowi pojedynczą nić RNA o dodatniej polarności (Morozov i wsp., 2018). Chociaż HCV wykazuje tropizm w kierunku hepatocytów, może namnażać się także w tkankach pozawątrobowych, w tym w komórkach jednojądrzastych krwi obwodowej (ang. peripheral blood mononuclear cell, PBMC) (Hajarizadeh i wsp., 2013).

4.2. Struktura wirionu i organizacja genomu wirusa HCV

Cząsteczki wirusa zapalenia wątroby typu C zbudowane są z dwudziestościennej nukleokapsydu utworzonego przez białka rdzenia (ang. Core protein, C protein) i otaczającego genom wirusa w postaci pojedynczej nici RNA. Całość otoczona jest bogatą w lipidy osłonką wirusową, pochodzącą z retikulum endoplazmatycznego, w której zakotwiczone są glikoproteiny E1 i E2 (ang. Envelope glycoprotein, E) (Modrapuor i wsp., 2007; Kim i Chang, 2013). Analiza wirionów wyizolowanych z osocza zakażonych osób oraz uzyskanych z hodowli komórkowych wykazała, że cząsteczki wirusa HCV mają średnicę 56-65 nm, podczas gdy średnica rdzenia wirusowego to około 45 nm (Gastaminza i wsp., 2010, Catanese i wsp., 2013) (Rysunek 1).

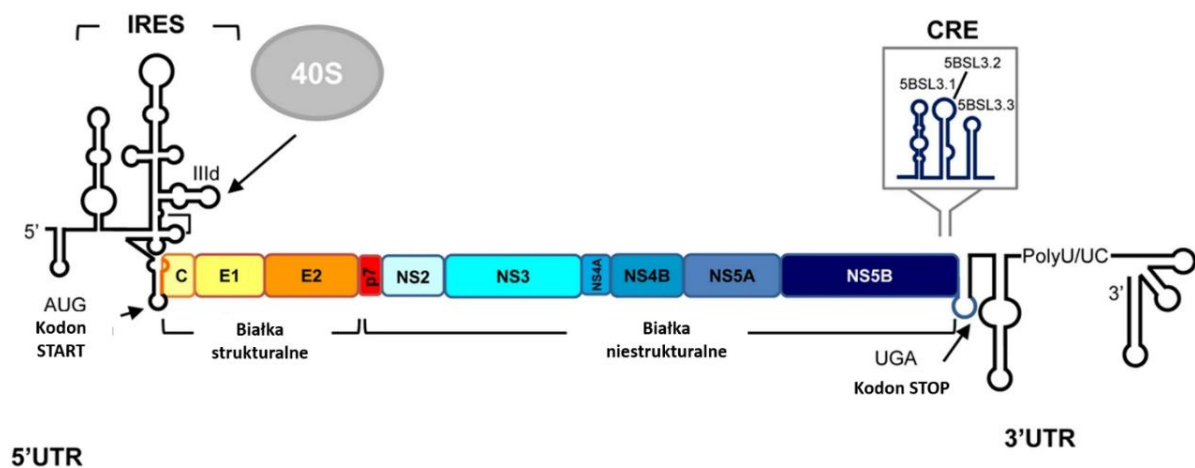


Rys. 1 Schemat cząsteczki wirusa HCV (na podstawie Loureiro i wsp., 2020).

Co ciekawe, populacja wirionów HCV nie jest jednorodna – ich rozmiar, a nawet stopień zakaźności wykazują znaczne różnice. Bardzo często cząsteczki wirusa połączone są z lipoproteinami komórkowymi takimi jak: apolipoproteiny (ang. Apolipoproteins, Apo) A1, B, C i E, lipoproteiny o małej gęstości (ang. Low density lipoproteins, LDL) oraz lipoproteiny o bardzo małej gęstości (ang. Very-low density lipoproteins, VLDL) – noszą one wówczas miano cząsteczek lipowirusowych (ang. Lipo-Viro-Particles, LVP) (Moriishi i Matsuura, 2012; Vercauteren i wsp. 2014).

Genom wirusa HCV stanowi pojedynczą nić RNA o długość około 9600 nukleotydów zawierająca dwa wysoce konserwowane regiony nieulegające translacji (ang. Untranslated region, UTR): 5'-UTR i 3'-UTR, które otaczają pojedynczą otwartą ramkę odczytu (ang. Open reading frame, ORF) (Rysunek 2). Wysoce konserwowany rejon 5'-UTR składa się z 341

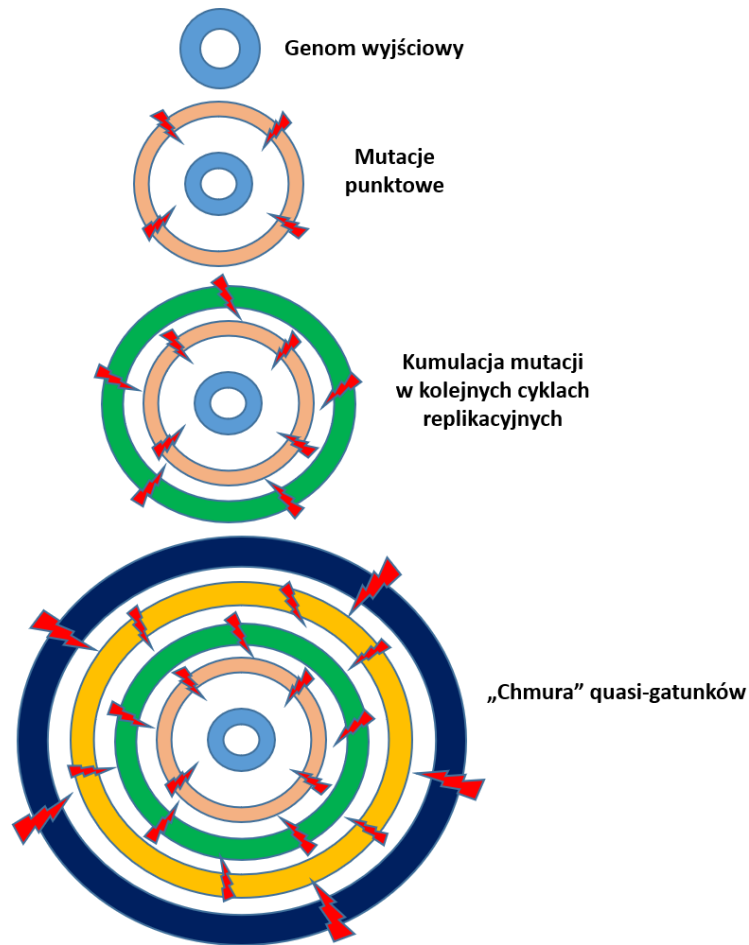
nukleotydów tworzących 4 ustrukturyzowane domeny. Morozov i wsp. wskazują, że pierwsze 125 nukleotydów 5'UTR (domeny I i II) jest niezbędnych do replikacji wirusowego RNA. Pozostałe dwie domeny (III i IV) zaangażowane są w wiązanie rybosomu (sekwencja IRES – ang. Internal Ribosome Entry Site) i umożliwiają inicjację translacji wirusowej poliproteiny w sposób niezależny od czapeczki (Morozov i wsp., 2018). Z kolei rejon 3'-UTR ma długość ok. 400 nukleotydów i odgrywa kluczową rolę w replikacji HCV. Podobnie jak 5'-UTR, region ten jest wysoce konserwowany i składa się z trzech odrębnych funkcjonalnie części. Wśród nich obecny jest element replikacyjny CRE (ang. Cis-acting replication element) pełniący rolę inhibitora translacji i wzmacniacza replikacji. Mechanizm, za pomocą którego CRE zakłóca syntezę poliproteiny HCV, nie jest do końca poznany (Shi i wsp., 2016; Romero-Lopez i wsp., 2018)



Rys. 2 Schemat organizacji genomu wirusa HCV (na podstawie Romero-López i wsp., 2018).

W przeciwieństwie do enzymów obecnych u wirusów DNA, RNA-zależna polimeraza RNA wirusa HCV nie wykazuje aktywności korekcyjnej, co przekłada się na wysoki poziom mutacji (rzędu 10^3 - 10^5 mutacji/ nukleotyd/ cykl replikacji). To wysokie tempo mutacji wraz z działaniem zjawisk ewolucyjnych (np. presja selekcyjna) doprowadziły do powstania dwóch poziomów zmienności: osobniczej (tzw. pseudotypy wirusowe, quasi-gatunki wirusowe) oraz zmienności między gospodarzami (genotypy, subtypy) (Domingo i Perales, 2019). Wirus zapalenia wątroby typu C (HCV) jest wirusem o znacznym stopniu zróżnicowania genetycznego. Do tej pory zidentyfikowano 8 genotypów (nazywanych 1-8 w kolejności odkrycia) i ponad 100 podtypów (określanych literami alfabetu łacińskiego). Na poziomie nukleotydowym istnieje 30-35% różnica sekwencji między genotypami i 15% różnica między podtypami tego samego genotypu. Ponadto w organizmie osoby zakażonej wirus występuje

w postaci quasi-gatunków, różniących się od siebie od 1% do 10 % sekwencji nukleotydowej (Kouroumalis i Voumvouraki, 2022) (Rysunek 3).



Rys. 3 Schemat powstawania quasi-gatunków wirusowych.

Genotyp 1 jest najbardziej rozpowszechniony na świecie (szczególnie w krajach rozwiniętych), przy czym podtyp 1a wykazuje większą częstość występowania w Stanach Zjednoczonych i Kanadzie, a podtyp 1b – w Europie. Genotyp 2 dominuje w Afryce Zachodniej, genotyp 3 występuje endemicznie w Azji Południowo-Wschodniej, a obecność genotypu 4 ogranicza się do Bliskiego Wschodu, Egiptu oraz Afryki Środkowej. Genotyp 5 występuje prawie wyłącznie w Afryce Południowej, podczas gdy genotyp 6 występuje głównie w całej Azji. Niedawno odkryty genotyp 7 został zidentyfikowany u siedmiu zakażonych osób w Demokratycznej Republice Konga, a genotyp 8 u czterech zakażonych osób z Pendżabu (Indie) (Antaki i wsp., 2010). Na całym świecie najbardziej rozpowszechnionymi genotypami są genotypy 1 i 3, które odpowiadają odpowiednio za 44%

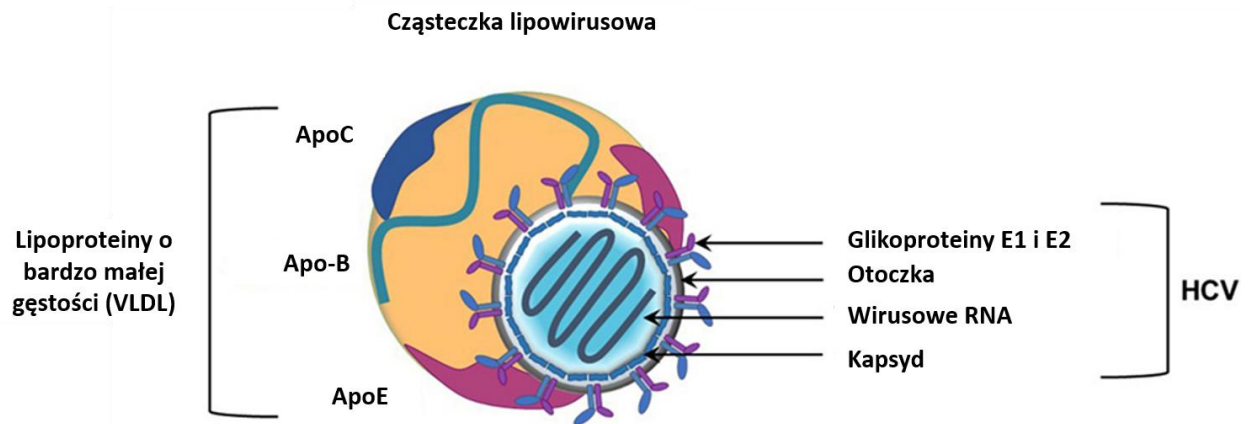
i 25% zakażeń HCV (Petruzzello i wsp., 2016). Warto zwrócić uwagę na fakt, że wysoka zmienność genetyczna wirusa HCV jest cechą typową dla Afryki Subsaharyjskiej, co może sugerować występowanie endemiczne HCV na tym obrzarze na długo przed jego globalnym rozprzestrzenieniem się w ciągu ostatnich 100 lat (Polaris Observatory HCV Collaborators, 2017). Badania przeprowadzone w ramach projektu EpiTer-2, wykazały, że w Polsce dominującym jest genotyp 1b (82%) zaś pozostałe genotypy to: 3 (11,3%), 4 (3,5%) i 1a (3,2%). Pacjenci, u których stwierdzono zakażenie genotypem 2, 5, czy 6 stanowili wyłącznie pojedyncze przypadki (Flisiak i wsp., 2018)

4.3. Cykl życiowy wirusa HCV

Pierwszym etapem cyklu życiowego wirusa HCV jest proces jego wejścia do komórki gospodarza. To złożony i wieloetapowy mechanizm, obejmujący interakcje cząsteczek wirusa z szeregiem receptorów obecnych na powierzchni komórki, między innymi: receptorem zmiataczem klasy B typu I (ang. Scavenger receptor class B type I, SRB1), receptorem CD81 (ang. Cluster of differentiation 81), czy białkami połączeń ścisłych – kładyną 1 (ang. claudin-1, CLDN1) i okładyną (ang. Occludin, OCLN) (Alazard-Dany i wsp., 2019). Wśród wymienionych czynników CD81 odgrywa niewątpliwie główną rolę. Receptor CD81 to tetraspanina o wysoce dynamicznej strukturze, wzbogaconej dodatkowo w obszary błony tworzące stabilne platformy, pozostające w ciągłej wymianie z resztą błony lipidowej. Równowaga tych zmian jest niezbędna do przeprowadzenia procesu wnikania HCV do komórki gospodarza. W szczególności uważa się, że cząsteczki CD81, które swobodnie dyfundują, a zatem nie są zaangażowane w statyczne mikrodomeny, są wykorzystywane przez HCV na etapie jego wejścia (Harris i wsp., 2013; Potel i wsp., 2013). Wykazano również, że CD81 oddziałuje z CLDN1, tworząc kompleks zaangażowany w dalsze etapy omawianego procesu i regulowany przez wiele szlaków sygnałowych (Farquhar i wsp., 2012).

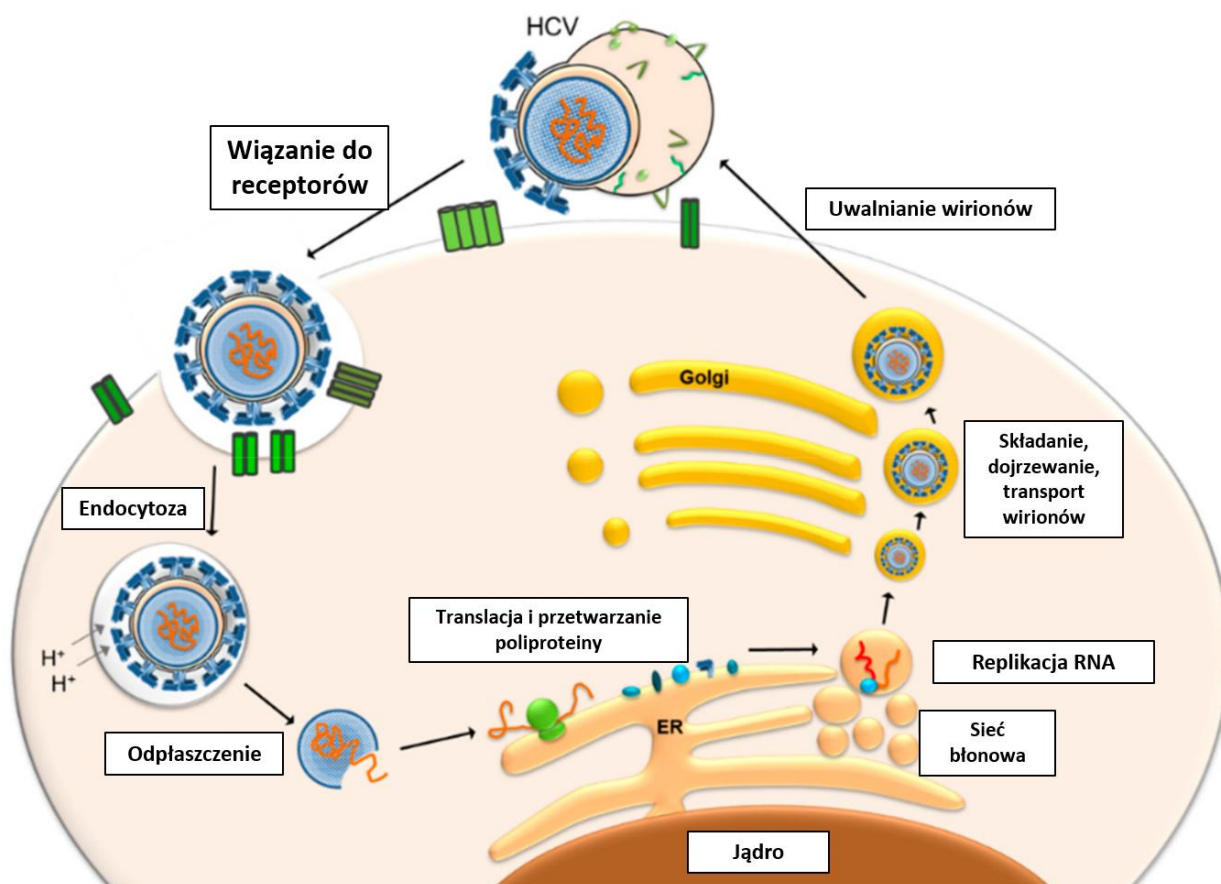
Jak już zostało wspomniane, wiriony HCV wykazują ścisły związek z lipidami obojętnymi (estrami cholesterolu i triglicerydami) oraz apolipoproteinami (Rysunek 4). Połączenie to nie tylko przyczynia się do maskowania glikoprotein osłonkowych, ale także odgrywa rolę w procesie wejściu wirusa do komórki gospodarza. Udowodniono udział apolipoproteiny E w wiązaniu do proteoglikanów siarczanu heparanu, receptora LDL oraz SR-BI (Jiang i wsp., 2012; Denolly i wsp., 2019). Poza ApoE na wczesnych etapach przyłączenia cząsteczki lipowirusowej do receptora SR-BI pośredniczą także ApoB-100 oraz ApoE (Maillard i wsp., 2006; Dao i wsp., 2012). Uważa się, że opisana powyżej interakcja

indukuje dysocjację wirionu HCV od cząsteczki lipidowej i przyczynia się do ekspozycji glikoproteiny E2 na bezpośrednie oddziaływanie z receptorami SR-BI oraz CD81 (Maillard i wsp., 2006).



Rys. 4 Model lipowiro-cząstki (LVP) wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) na podstawie Wrensch i wsp., 2018).

Główną rolę we wnikanii wirusa do komórki gospodarza, a tym samym w tropizmie wirusa do hepatocytów, odgrywają glikoproteiny osłonkowe E1 i E2. Białka te funkcjonują w postaci kompleksów heterodimerów związanych mostkami dwusiarczkowymi. E2 jest głównym białkiem odpowiedzialnym za wiązanie receptorów. Udowodniono bezpośrednie oddziaływanie między E2, a CD81 oraz SR-BI – co ciekawe, nawet przy braku E1. Powszechnie sądzi się, że E1 odgrywa jedynie rolę pomocniczą poprzez utrzymywanie prawidłowej konformacji białka E2, wymaganej do wiązania receptorów (Tong i wsp., 2018). Po uprzednim przyłączeniu się do kaskady receptorów, cząsteczki wirusa wnikają do komórek za pomocą szlaku endocytarnego zależnego od klatryny. Wiriony transportowane są do wczesnych endosomów, gdzie następuje ich odpłaszczenie oraz uwolnienie wirusowego RNA do cytoplazmy. RNA jest następnie rekrutowany do kompleksu replikacyjnego w błoniastej sieci (ang. membranous web) i wykorzystywany w procesach replikacji oraz translacji (Rysunek 5). Powstająca poliproteina ulega cięciu przez proteazy (gospodarza i wirusowe), co prowadzi do powstania funkcjonalnych białek strukturalnych i niestruturalnych (Blanchard i wsp., 2006.; Morozov i Lagaye, 2018). Białka wirusa HCV opisano w oddzielnym podrozdziale.



Rys. 5 Cykl życiowy wirusa HCV (na podstawie Gerresheim i wsp., 2019).

Składanie wirionów potomnych jest również procesem wieloetapowym, a niektóre jego elementy do tej pory nie zostały wyjaśnione. Powstające nukleokapsydy (zawierające RNA) pączkują do światła ER nabywając osłonkę, a następnie wiążą się z glikoproteinami, tworząc niedojrzałą cząsteczkę. W kolejnym etapie wiriony są transportowane przez cysterny aparatu Golgiego, gdzie kończą dojrzewanie. Gotowe cząsteczki są uwalniane z komórki przez błonę cytoplazmatyczną (Rysunek 5). Wciąż pozostaje niejasne, w jaki sposób regulowane jest sprzężenie wirionów z lipoproteinami i apolipoproteinami (Hansen i wsp., 2017; Wrensch i wsp., 2018). Dane literaturowe wskazują, że wydzielanie cząsteczek HCV zależy zarówno od obecności VLDL, jak i apolipoproteiny B (Morozov i Lagaye, 2018).

4.4. Białka wirusa HCV

Pojedyncza otwarta ramka odczytu wirusa zapalenia wątroby typu C HCV zawiera (w zależności od genotypu) od 9024 do 9111 nukleotydów. Koduje ona pojedynczą poliproteinę, która jest cięta przez proteazy gospodarza i proteazy wirusowe na 10

pojedynczych białek strukturalnych i niestrukturalnych (Alvisi i wsp., 2011; Li i wsp, 2015) (Tabela 1).

Białko	Masa cząsteczkowa [kDa]	Funkcja
C	21	Wiązanie RNA, tworzenie nukleokapsydu
E1	35	Glikoproteina osłonkowa, tworzy heterodimer z E2
E2	70	Glikoproteina osłonkowa, tworzy heterodimer z E1
p7	7	Wiroporyna
NS2	23	Proteaza cysteinowa
NS3	70	Proteaza serynowa, helikaza
NS4A	8	Kofaktor proteiny NS3-4A
NS4B	27	Indukcja zmian w błonie lipidowej
NS5A	56-58	Fosfoproteina serynowa
NS5B	68	RNA-zależna polimeraza RNA

Tab. 1 Charakterystyka białek wirusa HCV.

Białko rdzenia (ang. Core protein, C), złożone ze 91 aminokwasów, uwalniane jest z poliproteiny przez komórkową peptydazę sygnałową (Ait-Goughoulte i wsp., 2006). Uważa się, że w warunkach natywnych cząsteczki białka C tworzą homomultimery gromadzące się głównie w ER. Co więcej, mają one zdolność do samoczynnej organizacji w cząsteczki wirusopodobne (Roingard i wsp., 2011). Podczas składania kapsydu białko rdzenia oddziałuje z RNA wirusowym tworząc nukleokapsyd. Poza tym białko rdzeniowe pełni funkcje regulacyjne podczas translacji RNA, a dodatkowo może ono także uczestniczyć w takich procesach jak apoptoza, metabolizm lipidów oraz rozwój raka wątrobowokomórkowego (Dubuisson i Cosset, 2014; Mani i wsp., 2021).

Glikoproteiny osłonkowe E1 oraz E2 odgrywają kluczową rolę w różnych etapach cyklu życiowego HCV (np. składanie cząstek zakaźnych, wnikanie wirusa do komórki gospodarza, fuzja z błoną endosomalną) (Falkowska i wsp., 2007) i zostaną omówione w osobnym podrozdziale.

Białko p7 pełni funkcję kanału jonowego. Składa się ono z 63 aminokwasów i tworzy heksamery lub heptamery o aktywności kanałów kationowych, co wskazuje na przynależność do rodziny wiroporyn (Chandler i wsp., 2012). Udowodniono, że p7 jest niezbędne do składania i uwalniania zakaźnych cząsteczek wirusa zarówno *in vitro*, jak i *in vivo*. Jednakże jego dokładna funkcja pozostaje nieznana (Steinmann i Pietschmann, 2010).

Proteaza cysteinowa NS2 (ang. Non-structural 2, NS2) jest dimerem i posiada dwa miejsca aktywne. Odpowiada ona za cięcie prekursora poliproteiny na połączeniu białek NS2/NS3, a jej działanie jest dodatkowo wzmacniane przez N-kończącą część białka NS3 (Schregel i wsp., 2009). Sama proteaza NS2 nie jest niezbędna do przeprowadzania replikacji RNA, ale jej działanie jest konieczne do uwolnienia w pełni funkcjonalnego białka NS3, a tym samym do promowania replikacji wirusowego RNA (Jirasko i wsp., 2010).

Białka NS3 oraz NS4A tworzą funkcjonalny kompleks i z tego powodu zostaną omówione wspólnie. NS3 jest białkiem o masie cząsteczkowej 70 kDa pełniącym funkcje proteazy serynowej oraz helikazy. Z kolei białko NS4A działa jako kofaktor dla proteazy serynowej NS3. Proteaza NS3 odgrywa kluczową rolę w przetwarzaniu poliproteiny HCV przez jej w 4 miejscach (pomiędzy białkami: NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/NS5A, NS5A/NS5B). Rozszczepia również TRIF – białko adaptorowe receptora TLR3 (ang. Toll-like receptor 3) i mitochondrialne przeciwwirusowe białko sygnalizacyjne MAVS, blokując w ten sposób komórkowy szlak indukcji interferonu typu I (García-Sastre i Biron, 2006; Morikawa i wsp., 2011). NS3 jest jednym z kluczowych celów działania leków przeciwwirusowych.

NS4B jest stosunkowo słabo scharakteryzowanym, hydrofobowym białkiem. Jego masa cząsteczkowa wynosi 27 kDa i składa się z 261 aminokwasów. NS4B indukuje tworzenie tzw. sieci błoniastej, polegające na powstawaniu pęcherzyków służących jako rusztowanie dla kompleksu replikacyjnego HCV. Poza tym wiadomo, że białko to oddziałuje z innymi wirusowymi białkami niestrukturalnymi, a także ma zdolność wiązania wirusowego RNA (Einav i wsp., 2008). Wyniki badań biochemicznych, strukturalnych i genetycznych wskazują, że NS4B jest głównym organizatorem tworzenia kompleksu replikacyjnego HCV (Rai i Deval, 2011).

NS5A jest fosfoproteiną odgrywającą kluczową rolę w modulowaniu replikacji RNA i tworzeniu wirionów potomnych (Tellinghuisen i wsp., 2004). Białko to występuje w dwóch formach: fosforylowanej (56 kDa) i hiperfosforylowanej (58 kDa) (Evans i wsp., 2004; Appel i wsp., 2005). Oprócz swojej niezaprzeczalnej roli w replikacji, NS5A początkowo wzbudziło

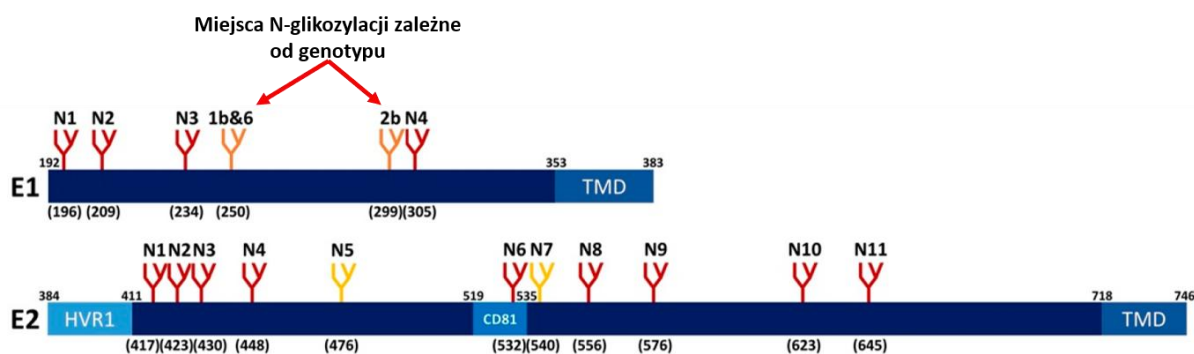
znaczące zainteresowanie ze względu na jego potencjalną rolę w modulowaniu odpowiedzi interferonowej, jednakże w dalszym ciągu pozostaje to kwestią kontrowersyjną (Kumthip i wsp., 2012).

Kluczowym białkiem odpowiedzialnym za replikację wirusowego RNA jest NS5B, będące RNA-zależną polimerazą RNA. Jest to enzym o masie cząsteczkowej 68 kDa składający się z 591 aminokwasów. Aktywność enzymatyczna NS5B jest modulowana przez interakcję z niektórymi innymi białkami wirusowymi, takimi jak NS3 oraz NS5A (Bartenschlager i wsp., 2004). Badania z wykorzystaniem krystalografii strukturalnej ujawniły, że NS5B posiada typowy kształt polimerazy „praworęcznej” z subdomeną palca, dłoni i kciuka. Kluczową informacją jest to, że polimeraza ta nie posiada właściwości korektorskich, co prowadzi do powstawania licznych mutantów (Boyce i wsp., 2014). Ze względu na swoją kluczową rolę w replikacji wirusa, białko NS5B jest uważane za najważniejszy cel działania leków przeciwwirusowych.

4.5. Białka wirusowe biorące udział w wejściu wirusa do komórki gospodarza – glikoproteiny E1 i E2

Glikoproteiny osłonkowe E1 i E2 są białkami transbłonowymi typu I z C-końcową domeną przezbłonową (ang. Transmembrane domain, TMD) i tworzącymi heterodimer. E1 i E2 w czasie dojrzewania nie podlegają cięciu proteolitycznemu, lecz są bezpośrednio eksymowane jako funkcjonalne białka wymagające później heterodimeryzacji i glikozylacji. Uważa się, że E1 jest pierwszym białkiem, które uzyskuje funkcjonalną konformację konieczną do prawidłowego fałdowania E2 i heterodimeryzacji. Może to sugerować, że E1 działa jako białko opiekuńcze dla E2 (Brazzoli i wsp., 2005; Douam i wsp., 2015). W czasie heterodimeryzacji powstają wewnątrzcząsteczkowe mostki dwusiarczkowe. E1 i E2 posiadają odpowiednio 8 i 18 cystein, tworzących 4 i 9 mostków dwusiarczkowych. Struktury te w obrębie glikoproteiny E2 są niezbędne do wiązania CD81 i rozpoznawania przez przeciwciała (Fenouillet i wsp., 2008).

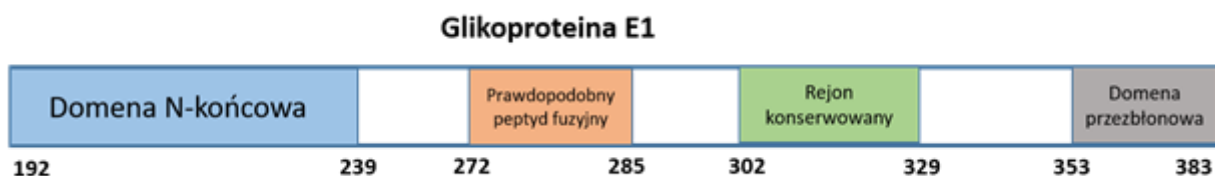
Obie glikoproteiny są silnie modyfikowane potranslacyjnie – każda z nich posiada liczne miejsca N-glikozylacji. E1 i E2 posiadają odpowiednio 5 i 11 miejsc N-glikozylacji, a masa glikanów stanowi prawie połowę całkowitej masy białek (Rysunek 6). Oligosacharydy są dodawane do asparaginy (Asn) według wzoru Asn-X-Ser/Thr (Beljelarskaya i wsp., 2016).



Rys. 6 Schemat miejsc N-glikozylacji glikoprotein E1 i E2. Każde z miejsc N-glikozylacji oznaczono literą „N”, wraz z liczbą wskazującą pozycję miejsca glikozylacji w sekwencji (na podstawie sekwencji genotypu 1a HCV (GenBank: AF009606.1) (na podstawie LeBlanc i wsp., 2021).

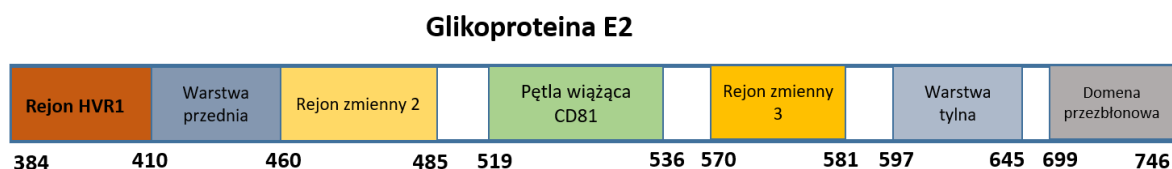
Większość tych miejsc jest wysoce konserwowana wśród genotypów. Glikany te pełnią liczne funkcje, m. in. zależne od nich są: fałdowanie i składaniu glikoprotein osłonki (miejsca E1N1, E2N8 i E2N10), zakaźność cząstek wirusowych (miejsca E2N3 i E2N7), czy unikanie przeciwciał neutralizujących (E2N1, E2N2, E2N4, E2N6 i E2N11) (Yechezkel i in., 2021).

Glikoproteina E1 jest znacznie mniejsza od E2 (odpowiednio 192 aminokwasy i 365 aminokwasów) i jak już wspomniano, posiada cztery konserwowane potencjalne miejsca N-glikozylacji (w pozycjach 196, 209, 234 i 305), podczas gdy piąte miejsce glikozylacji (N250) jest specyficzne dla genotypów 1b i 6 (Zhang i wsp., 2004). Analiza bioinformatyczna sekwencji E1 we wszystkich genotypach wykazała, że białko to zawiera 4 konserwowane domeny białkowe (Rysunek 7): domenę N-końcową (ang. N-terminal domain, NTD) zlokalizowaną pomiędzy aminokwasami 192 i 239, prawdopodobny peptyd fuzyjny (ang. Putative fusion peptide, pFP) – aminokwasy 272–285, region konserwowany (ang. Conserved region, CR) – aminokwasy 302–329 oraz C-końcową domenę przezbłonową – aminokwasy 353–383 (Tong i wsp., 2018). NTD zawiera cztery konserwowane cysteiny tworzące wiązania dwusiarczkowe. Co ważne, większość miejsc glikozylacji E1 oraz zidentyfikowanych epitetów dla przeciwciał znajduje się właśnie w tej domenie. Fakt ten może sugerować powierzchnię ekspozycję domeny N-końcowej (Maurin i wsp., 2011.). Domena pFP jest silnie konserwowana, a jej rolą jest prawdopodobnie udział w fuzji osłonki wirusowej i błony komórkowej gospodarza podczas wnikania HCV. Natomiast ostatnia z domen, TMD, nie tylko pełni rolę peptydu sygnałowego dla E2, ale także jest niezbędna do tworzenia heterodimeru z E2 (Douam i wsp., 2015).



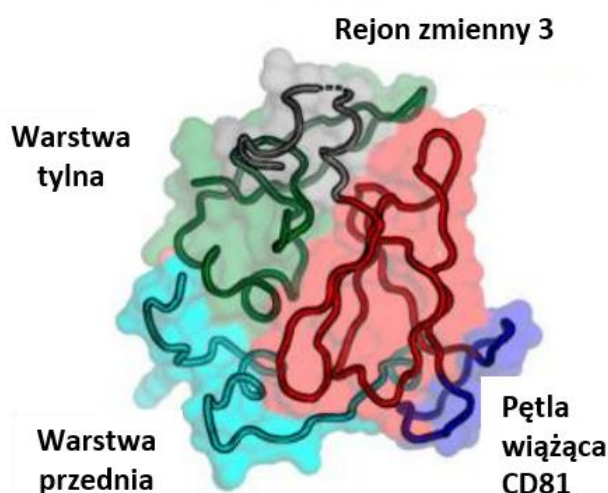
Rys. 7 Schemat organizacji domen glikoproteiny E1 (Numery oznaczające kolejność aminokwasów na podstawie sekwencji genotypu 1a HCV (GenBank: AF009606.1).

Jak już zostało wspomniane, glikoproteina E2 odgrywa kluczową rolę w procesie wejścia wirusa do komórek gospodarza. Jest białkiem wiążącym receptory na powierzchni hepatocytów i tym samym głównym celem działania przeciwciał neutralizujących. Ektodomena E2 jest silnie zmodyfikowana przez dziewięć wiązań dwusiarczkowych, które przyczyniają się do jej wysokiej stabilności termicznej – temperatura topnienia E2 wynosi aż 85°C (Kong i wsp., 2016). Glikoproteina ta posiada 11 wysoce konserwatywnych miejsc N-glikozylacji (Rysunek 6). Dziewięć z nich jest konserwowanych pomiędzy genotypami i znajdują się w pozycjach: 417 (E2N1), 423 (E2N2), 430 (E2N3), 448 (E2N4), 532 (E2N6), 556 (E2N8), 576 (E2N9), 623 (E2N10) i 645 (E2N11) – numery aminokwasów zgodne z sekwencją genotypu 1a HCV (GenBank: AF009606.1). Dwa pozostałe miejsca N-glikozylacji są również obecne w większości genotypów, z wyjątkiem genotypu 1b (E2N5) oraz genotypów 3 i 6 (E2N7). Co ważne, pomimo dużej zmienności genetycznej wirusa HCV, większość miejsc N-glikozylacji pozostaje niezmienna, co sugeruje istotną ich rolę w cyklu życiowym HCV (Goffard i wsp., 2005). Dane literaturowe wspominają także o możliwości pojawienia się dodatkowych miejsc glikozylacji. Przykładem może być miejsce glikozylacji zlokalizowane wewnątrz rejonu hiperzmiennego (HVR495) genotypu 3a, zidentyfikowane u pacjentów pakistańskich. Istnienie dodatkowych glikanów może stanowić formę przystosowania się do zmian środowiskowych (Anjum i wsp., 2013).



Rys. 8 Schemat organizacji domen glikoproteiny E2 (Numery oznaczające kolejność aminokwasów na podstawie sekwencji genotypu 1a HCV (GenBank: AF009606.1).

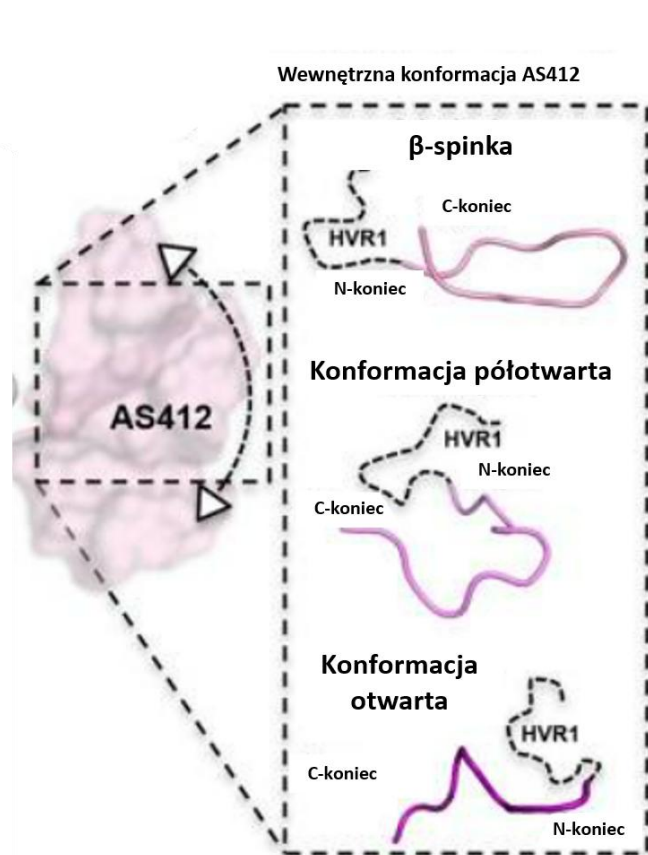
Podobnie jak w przypadku E1, w ektodomenie E2 wyróżnić można szereg domen: N-końcowy rejon hiperzmienny 1 (ang. Hypervariable region 1, HVR1), centralną domenę rdzeniową oraz C-końcowy region łączący ektodomenę E2 z regionem TM (Rysunek 8 i Rysunek 9). Domena rdzeniowa składa się z centralnej struktury β -spinki do włosów otoczonej przez N-końcową przednią warstwę i C-końcową tylną warstwę oraz pętli wiążącej receptor CD81. E2 posiada również trzy regiony zmienne: HVR1 oraz regiony zmienne 2 i 3 (ang. Variable region, VR2 i VR3), przyczyniające się do ucieczki wirusa przed działaniem układu immunologicznego gospodarza (Kong i wsp., 2013).



Rys. 9 Model trzeciorzędowej struktury glikoproteiny E2 genotypu 1a H77 E2c (PDB: 4MWF) (Na podstawie Yechezkel i in., 2021).

Glikoproteina E2 należy również do białek cechujących się wysoką wewnętrzną elastycznością – regiony zmienne E2, miejsce antygenowe AS412 (ang. Antigenic site 412), czy rejon wiązania receptora CD81 wykazują wysoką zmienność konformacyjną. Udowodniono, że konformacja struktury β -spinki do włosów AS412 jest związana z opornością na działanie przeciwciał neutralizujących (Augestad i wsp., 2021). Na powierzchni infekcyjnych wirionów heterodimery E1E2 istnieją prawdopodobnie w dynamicznej równowadze między stanami konformacyjnymi „otwartymi” (wrażliwymi na działanie przeciwciał neutralizujących) i „zamkniętymi” (opornymi na działanie przeciwciał) (Rysunek 10). Zmienność glikoprotein może wpływać na tę równowagę i niejako regulować ekspozycję epitopów. Wspomniana uprzednio konformacja spinki do włosów (AS412) jest związana ze stanem „zamkniętym”. Ta opisana dynamika struktury glikoprotein HCV

prawdopodobnie odgrywa kluczową rolę w „ukrywaniu się” przed działaniem układu immunologicznego. Nadal jednak wiele kwestii w tym temacie pozostaje niejasnych (Augestad i wsp., 2020).



Rys. 10 Model elastyczności konformacyjnej rejonu AS412 w oparciu o strukturę krystaliczną AP33 bNAbs-AS412 (Na podstawie Tzarum i wsp., 2018).

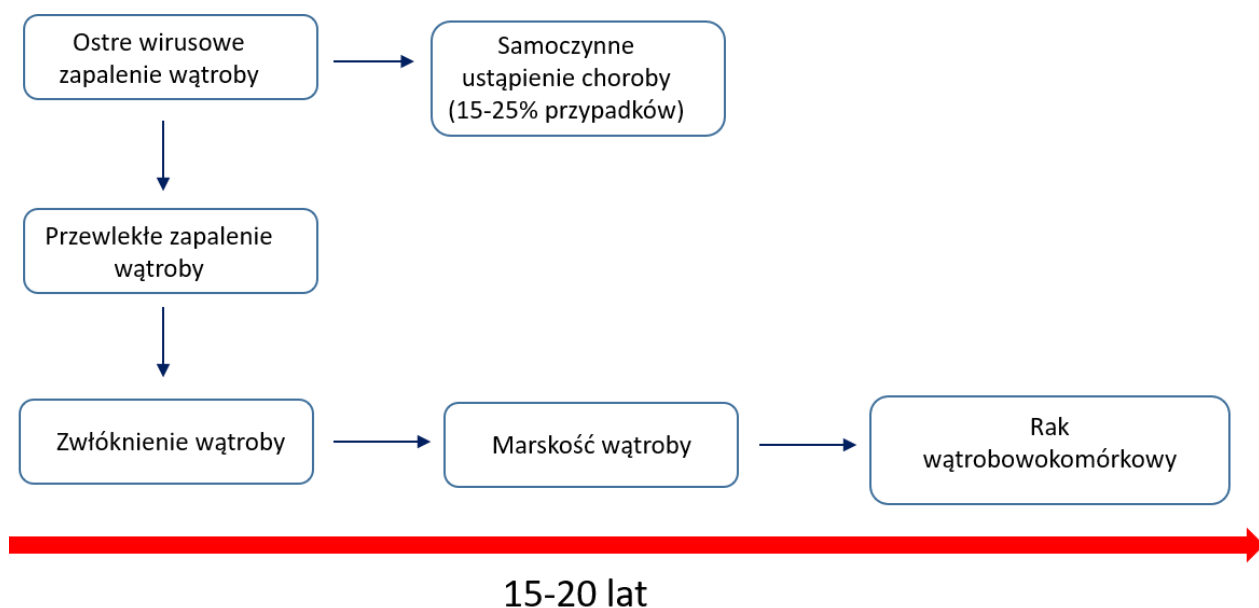
4.6. Epidemiologia i patogeneza zakażeń HCV

Wirus zapalenia wątroby typu C wciąż stanowi poważne zagrożenie dla zdrowia publicznego. Szacuje się, że 46–76 milionów ludzi na świecie jest przewlekle zakażonych HCV, co roku dochodzi do około 1,5 miliona nowych przypadków zakażeń, a 242 000 osób rocznie umiera w następstwie powikłań związanych z zakażeniem HCV (Robinson i wsp., 2023). Powszechnie wiadomo, że wirus zapalenia wątroby typu C może powodować przewlekle wirusowe zapalenie wątroby – ciche, ale postępujące schorzenie, które przez 10-15 lat może prowadzić do marskości wątroby i raka wątrobowokomórkowego (ang. Hepatocellular carcinoma, HCC). Przewlekle wirusowe zapalenie wątroby typu C jest również najczęstszym wskazaniem do przeszczepienia wątroby w Stanach Zjednoczonych, Australii i większości krajów Europy (Dultz i wsp., 2017; Martini S., 2018). HCV replikuje

się w cytoplazmie hepatocytów. Trwała infekcja prawdopodobnie polega na szybkiej produkcji wirusa i ciągłym rozprzestrzenianiu do nowych komórek przy jednoczesnym braku właściwej odpowiedzi immunologicznej ze strony limfocytów T (Larrubia i wsp., 2014).

Wirusowe zapalenie wątroby typu C przenoszone jest drogą pozajelitową – głównie poprzez kontakt z zakażoną krwią. Ponieważ produkty krwiopochodne do transfuzji stają się coraz bardziej bezpieczne dzięki skutecznym testom wirusologicznym, głównymi drogami przenoszenia HCV w większości krajów pozostają: dożylne zażywanie narkotyków, ryzykowne czynności seksualne, przeszczep narządów od zakażonego dawcy, narażenie zawodowe, hemodializa, narażenie w gospodarstwie domowym, narodziny dziecka zakażonej matki i donosowe używanie kokainy. Według amerykańskiego Centrum Kontroli i Prewencji Chorób (ang. Centers for Disease Control and Prevention, CDC) za 60% przypadków zakażeń HCV w USA w latach 1991-1995 odpowiedzialne było dożylne zażywanie narkotyków. Dlatego też skuteczne zwalczanie wirusowego zapalenia wątroby typu C wymaga skutecznych strategii redukcji szkód związanych z dożylnym przyjmowaniem narkotyków (Schreiber i wsp., 1996; Dodd i wsp., 2002; Ghany i wsp., 2020).

Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C samoogranicza się tylko w przypadku 15-25% pacjentów. U większości osób zakażonych wirusem HCV nie dochodzi do samoczynnej eliminacji zakażenia, a sama infekcja przechodzi w postać przewlekłą (Rysunek 11). Przewlekłe wirusowe zapalenie wątroby typu C charakteryzuje się utrzymywaniem się RNA HCV we krwi przez co najmniej 6 miesięcy po wystąpieniu fazy ostrej zakażenia. Na częstość przewlekłego zakażenia HCV wpływa wiele czynników, w tym wiek w chwili zakażenia, płeć, pochodzenie etniczne oraz rozwój żółtaczk podczas ostrej fazy infekcji (Hajarizadeh i wsp., 2013).



Rys. 11 Przebieg i progresja chorób wątroby spowodowanych zakażeniem wirusem HCV.

Ostra faza zakażenia HCV trwa około 6 miesięcy od momentu infekcji i u większości pacjentów przebiega z występowaniem objawów takich jak: żółtaczka (40%), zmęczenie (80%), ból brzucha (50%) i niestrawność (40%). Rozpoznanie zakażenia HCV opiera się na detekcji wirusowego RNA i/lub przeciwciał anty-HCV w surowicy dotychczas seronegatywnego pacjenta – wynik dodatni w badaniu RNA możliwy jest do uzyskania już po dwóch tygodniach od zakażenia, natomiast przeciwciała anty-HCV mogą zostać wykryte po 8 tygodniach (Moosavy i wsp., 2017). Przewlekła faza zakażenia HCV rozpoczyna się, kiedy wirusowe RNA jest wciąż wykrywalne w surowicy pacjenta po 6 miesiącach od zakażenia. Niektóre czynniki, takie jak: płeć męska, koinfekcja HBV/HIV, spożywanie alkoholu, insulinooporność, niealkoholowe stłuszczenie wątroby, otyłość oraz immunosupresja zostały określone jako przyczyny przejścia w fazę przewlekłą u pacjentów z zakażeniem HCV. Przewlekłe zakażenie wirusem zapalenia wątroby przyczynia się do postępującego uszkodzenia hepatocytów i prowadzi do rozwoju marskości wątroby (15-25%) i raka wątrobowokomórkowego (1-3%) u zakażonych pacjentów, którzy nie otrzymali odpowiedniego leczenia (Rysunek 11) (Chen i Morgan, 2006; Ward J.W., 2014). Liczne badania wykazały, że przewlekłe spożywanie alkoholu jest głównym zewnętrznym czynnikiem ryzyka progresji przewlekłego wirusowego zapalenia wątroby typu C do marskości wątroby i ostatecznie HCC. Czynniki ryzyka ze strony gospodarza obejmują ponadto: wiek w momencie zakażenia (prognozy gorsze wraz z wiekiem), płeć męską, stopień zapalenia i zwłóknienia w biopsji wątroby, koinfekcja HIV/HBV oraz choroby

współistniejące (np. immunosupresja, insulinooporność, niealkoholowe stłuszczeniowe zapalenie wątroby). Szczególnie insulinooporność wydaje się być związana z nasileniem włóknienia wątroby i zmniejszoną odpowiedzią na leczenie anty-HCV (Ryder i wsp., 2004; D'Souza i wsp., 2005; Chen i Morgan, 2006).

Przewlekła infekcja wirusem HCV wiąże się z licznymi manifestacjami pozawątrobowymi. Dochodzi do nich u 1-2% zakażonych i mogą obejmować one liczne układy i narządy. Najczęściej wymienia się schorzenia układu moczowego, problemy dermatologiczne, hematologiczne i reumatologiczne. Wśród nich najbardziej powszechna jest mieszana krioglobulinemia. Według danych literaturowych krioglobuliny obecne są nawet u 50% pacjentów z przewlekłym zakażeniem HCV, a występujące u tych pacjentów objawy kliniczne są spowodowane odkładaniem się kompleksów immunologicznych w różnych narządach (Bunchorntavakul i wsp., 2018). Inne często wymieniane objawy pozawątrobowe obejmują m.in. zapalenie kłębuszków nerkowych, porfirię skórą późną, czy bielactwo nabyte. Istnieją również dane sugerujące związek między przewlekłym zakażeniem wirusem zapalenia wątroby typu C, a chłoniakami nieziarniczymi i Hodgkina oraz autoimmunologicznym zapaleniem tarczycy, jednakże pozostaje niejasne, czy choroby te spowodowane są bezpośrednio infekcją HCV, czy stymulacją immunologiczną wynikającą z przewlekłej fazy zakażenia (Chen i Morgan, 2006).

4.7. Odpowiedź immunologiczna organizmu skierowana przeciwko HCV i jej unikanie

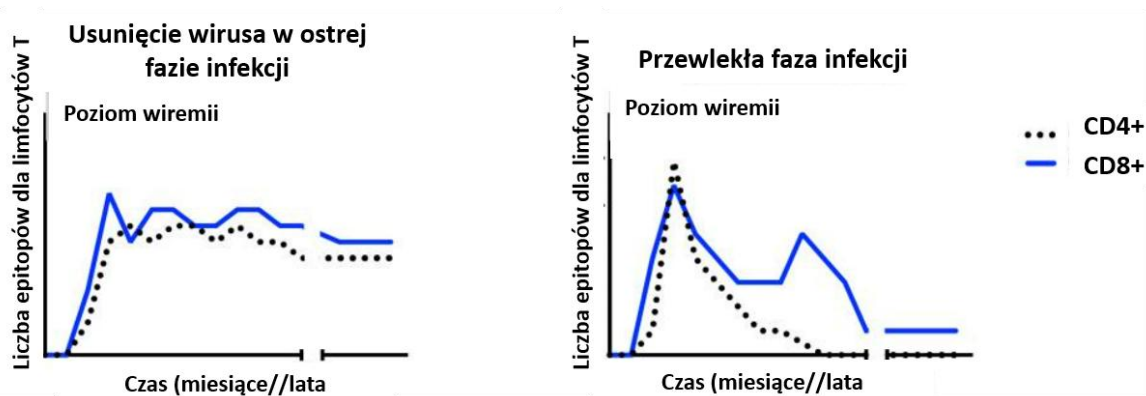
Wrodzona odpowiedź immunologiczna, stanowiąca pierwszą, niezbędną barierę w kontrolowaniu wirusów cytopatycznych, jest niewystarczająca w infekcjach niecytopatycznych, takich jak zakażenie wirusem HCV. Odpowiedź ta nie tylko ogranicza rozprzestrzenianie się wirusa, ale także aktywuje adaptacyjną odpowiedź immunologiczną. To właśnie odpowiedź adaptacyjna, pełniąca rolę drugiej linii obrony, odgrywa główną rolę w przeciwdziałaniu zakażeniu wirusem HCV, ze względu na zdolność tego wirusa do unikania odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Odpowiedź adaptacyjną można podzielić na dwa rodzaje reakcji: humoralną (udział przeciwciał neutralizujących oraz nieneutralizujących) i komórkową (udział limfocytów oraz komórek układu immunologicznego). Co ważne, limfocyty T nie tylko biorą udział w bezpośrednim usuwaniu zakażonych komórek, ale także zaangażowane są w wytwarzanie rozpuszczalnych czynników, usuwających wirusa w sposób niecytolityczny, co może sprzyjać bezpośredniemu

uszkodzeniu wątroby i przyciąganiu niespecyficycznych komórek zapalnych (Guidotti i Chisari, 2006, Wang i wsp., 2011).

Po skutecznym zakażeniu wirusem HCV u prawie wszystkich pacjentów indukowana jest odpowiedź ze strony limfocytów T CD8+, które pojawiają się we krwi po 6–8 tygodniach od momentu infekcji. Przyczyny tego opóźnienia nie są znane. W tym czasie poziom wirerii, choć utrzymuje się na stosunkowo wysokim poziomie, podlega kontroli wrodzonej odpowiedzi immunologicznej (np. komórki NK i interferony typu I (IFN α) i III (IFN λ)). Warto zauważyć, że limfocyty T CD8+ specyficzne dla HCV nie wytwarzają cytokin przeciwwirusowych, takich jak interferon-gamma, we wczesnej fazie ostrej infekcji. Tak późne pojawienie się odpowiedzi limfocytów T CD8+ zbiega się w czasie z początkiem przewlekłej fazy zakażenia, trwałym zajęciem wątroby oraz spadkiem miana wirusa (Sung i wsp., 2014). Jednakże w ostrej fazie zakażenia wczesna ekspresja receptora IL-7 alfa (CD127) i czynnika transkrypcyjnego T-bet (ang. T-box expressed in T cell) na limfocytach T CD8+ wiąże się ze skuteczną odpowiedzią immunologiczną oraz neutralizacją wirusa. Niejasne jest, dlaczego po wstępnym pobudzeniu odpowiedzi limfocytów T CD8+ o podobnej sile i podobnych cechach (funkcjonalnych/fenotypowych), u jednej osoby dojdzie do ustąpienia infekcji, zaś u innej zakażenie przejdzie w postać przewlekłą (Kurktschiev i wsp., 2014). Warto zauważyć, że limfocyty T CD8+ do pełnienia swojej funkcji efektorowej wymagają działania limfocytów T CD4+, zatem brak tego współdziałania wydaje się być możliwym mechanizmem przyczyniającym się do trwałości wirusa. Same zaś limfocyty T CD4+ swoiste dla HCV w ostrej fazie infekcji są aktywowane, namnażane i biorą udział w wieloswoistej i wielofunkcyjnej odpowiedzi immunologicznej. W opozycji do tego stanu, kiedy infekcja przechodzi w fazę przewlekłą, komórki CD4+ są szybko usuwane (Schulze Zur Wiesch i wsp., 2012, Smith i wsp., 2021).

Jak już zostało powiedziane, u zdecydowanej większości pacjentów (70%) organizm nie jest w stanie usunąć ostrego zakażenia HCV i infekcja przechodzi w fazę przewlekłą. Istnieją dwa główne mechanizmy odpowiedzialne za to zjawisko: wyczerpanie limfocytów T oraz ucieczka samego wirusa przed układem immunologicznym gospodarza. Dodatkowo, wytwarzanie cytokin immunomodulujących przez limfocyty T regulatorowe (Treg) także ma wpływ na niewydolność limfocytów T specyficznych dla HCV (Jung i Shin, 2016). Pierwszy z mechanizmów polega na zachodzeniu zmian w fenotypie, funkcjonalności oraz profilach: epigenetycznym oraz transkrypcyjnym limfocytów poprzez ciągłą stymulację antygenami wirusowymi. Wyczerpanie limfocytów T prowadzi do stopniowej utraty ich funkcji

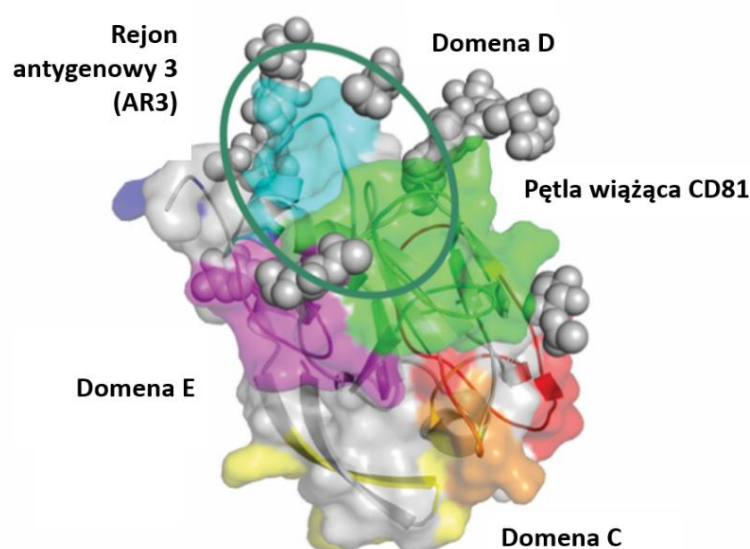
efektorowych: zdolności proliferacyjnej, wydzielania cytokin oraz utraty cytotoxyczności (Nakamoto i wsp., 2008). Z kolei ucieczka wirusa przed działaniem limfocytów T CD8+ zwykle występuje we wczesnej fazie infekcji i polega na kumulowaniu się mutacji zlokalizowanych wewnątrz epitopów związanych z trwałością wirusa, a tym samym na zmniejszeniu się liczby dostępnych funkcjonalnych epitopów (Rysunek 12). Przykładem takich mutacji mogą być zmiany w rejonach wiążących cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej (ang. Major histopatibility complex, MHC) klasy I (Walker i wsp., 2015). W niektórych przypadkach możliwe jest zastąpienie oryginalnej sekwencji wirusa przez te tzw. „warianty uciezkowe”, co może przyczynić się do utraty epitopów dla limfocytów T CD8+ specyficznych dla HCV (Neumann-Haefelin i wsp., 2008; Ball i wsp., 2018).



Rys. 12 Przykład ucieczki wirusa HCV przed działaniem limfocytów T (na podstawie Dustin L.B., 2017).

Istnieją kontrowersje dotyczące roli limfocytów B w zwalczaniu ostrej fazy zakażenia HCV. Początkowo sądzono, że komórki te jedynie w niewielkim stopniu przyczyniają się do eliminacji wirusa. Jednakże wiele doniesień naukowych wykazało możliwość istnienia korelacji między wczesnym pojawieniem się przeciwciał neutralizujących w czasie ostrej infekcji, a eliminacją zakażenia. Niestety jedynie niewielka część przeciwciał specyficznych dla HCV ma zdolność neutralizowania cząstek wirusowych *in vitro*, a zdecydowana większość z nich celuje w region hiperzmienny 1 (HVR1) glikoproteiny E2 (Raghuraman i wsp., 2012; Osburn i wsp., 2014). Badania te wykazały również, że przeciwciała neutralizujące indukowane w czasie ostrego zakażenia mają szerokie możliwości krzyżowego rozpoznawania wirusowych quasi-gatunków i szczepów, nawet z różnych genotypów HCV. Co więcej, przeciwciała te wykazały działanie ochronne w czasie doświadczeń ze zwierzętami oraz umożliwiły usunięcie infekcji HCV u chimericznych myszy

z humanizowaną wątrobą (Law i wsp., 2008; De Jong i wsp., 2014; Keck i wsp., 2016) i szympanów (Morin i wsp., 2012). Tak jak wspomniano wcześniej, przeciwciała o właściwościach neutralizujących rozpoznają konformacyjne, nieciągłe epitopy w obrębie glikoproteiny E2. Najczęściej wymieniane epitopy to tzw. regiony antygenowe (ang. Antigenic regions, AR) 1-5, domeny A-E i epitopy I-III (Rysunek 13). Warto zauważyć, że niektóre z nich w dużym stopniu pokrywają się ze sobą lub nawet reprezentują identyczne reszty wiążące. Co więcej, obecność/brak licznych reszt cukrowych na powierzchni białka E2 przyczynia się do zmniejszenia lub zwiększenia dostępności tych epitopów.



Rys. 13 Organizacja domen antygenowych zlokalizowanych w przedniej części glikoproteiny E2 (PDB: 6MEJT) (na podstawie Dustin L.B., 2017).

Zdolność neutralizująca przeciwciał skierowanych przeciwko powyższym epitopom jest bardzo zróżnicowana. Wielokrotnie wykazano, że epitopy AR3/domena B i AR4 indukują przeciwciała o największym potencjale neutralizacyjnym, podczas gdy immunoglobuliny skierowane przeciwko domenie A oraz rejonowi AR1 mają ograniczoną zdolność neutralizacji lub nie mają jej wcale. Domena C i rejon AR2 także indukują powstanie przeciwciał neutralizujących, jednakże są one często specyficzne dla konkretnych genotypów wirusowych (Brasher i wsp., 2021).

Pomimo opisanych postępów w zrozumieniu roli specyficznych przeciwciał anty-HCV, niejasne pozostają powody, dla których limfocyty B nie wytwarzają znacznych ilości przeciwciał neutralizujących u większości pacjentów. Podsumowując, immunologiczna

odpowieź humoralna, przejawiająca się poprzez produkcję przeciwciał neutralizujących, jest prawdopodobnie ważnym składnikiem naturalnego procesu eliminacji wirusa HCV i może stanowić atrakcyjny cel dla rozwoju szczepionek. Konieczne jest prowadzenie dalszych prac badawczych, aby w pełni zrozumieć działanie ochronne przeciwciał, a także mechanizmy stojące za niepowodzeniem w zwalczaniu przez nie zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C.

4.8. Diagnostyka zakażeń HCV

W maju 2016 r. Światowe Zgromadzenie Zdrowia przyjęło pierwszą globalną strategię dotyczącą wirusowego zapalenia wątroby na lata 2016–2020. Jej głównym założeniem była eliminacja wirusowego zapalenia wątroby jako zagrożenia zdrowia publicznego do 2030 r. Strategia ta zakładała zmniejszenie o 90% liczby przypadków nowych przewlekłych zakażeń i zmniejszenie śmiertelności o 65% w porównaniu z wartością wyjściową z 2015 r. Podobnie w maju 2022 r. 75. Światowe Zgromadzenie Zdrowia ustanowiło szereg nowych strategii obejmujących HIV, WZW i zakażenia przenoszone drogą płciową na lata 2022–2030. Kluczową wytyczną zawartą w obu strategiach było dążenie do maksymalnego rozpowszechnienia badań przesiewowych umożliwiających wykrywanie przeciwciał anty-HCV oraz detekcję wirusowego RNA jako kwalifikację do leczenia (World Health Organization. Global Hepatitis Report 2017). W celu oceny stopnia zaawansowania zaleca się metody nieinwazyjne – za najbardziej efektywną uznaje się elastografię dynamiczną, umożliwiającą pomiar sztywności tkanki wątrobowej (Knop i wsp., 2021). W przypadku komplikacji w rozpoznaniu, takich jak: podejrzenie współistnienia chorób wątroby o różnej etiologii, brak powiązania wyniku badania nieinwazyjnego ze stanem klinicznym pacjenta lub uzyskanie odmiennych wyników badań z zastosowaniem różnych metod nieinwazyjnych wskazane jest wykonanie biopsji wątroby, której wynik uznaje się za rozstrzygający.

Szacuje się, że około 2,1 miliona dzieci poniżej 15 roku życia cierpi z powodu przewlekłego WZW typu C. W Pakistanie i Egipcie odnotowuje się najwyższy odsetek dzieci poniżej 5 roku życia zakażonych HCV (odpowiednio 25% i 50%). Biorąc pod uwagę fakt, że najczęstszą drogą zakażeń HCV u dzieci jest droga wertykalna, zaleca się, aby wszystkie dzieci zakażonych matek rutynowo badać pod kątem obecności HCV. Przeciwciała anty-HCV przenikają przez łożysko i możliwe jest ich utrzymywanie się we krwi dziecka przez 18 miesięcy, stąd też konieczne jest przeprowadzenie diagnostyki metodą PCR między drugim, a trzecim miesiącem życia dziecka (Nwaohiri i wsp., 2018; Kushner i Reau, 2021).

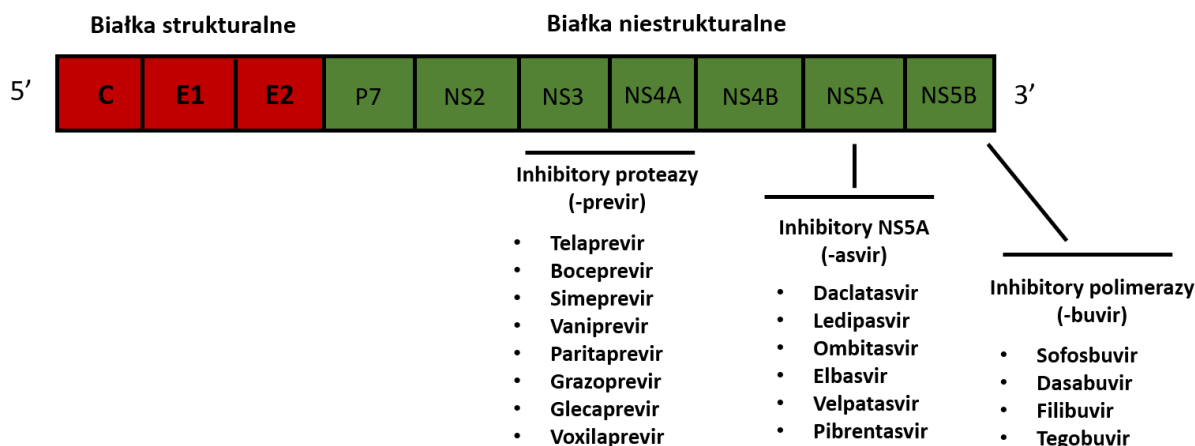
4.9. Terapie anty-HCV u dorosłych i dzieci

Pierwsze próby leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu nie-A i nie-B zostały podjęte w latach 80-tych XX wieku. Hoofnagle i współpracownicy, podejrzewając wirusową etiologię choroby, podawali 10 pacjentom rekombinowany interferon alfa (ang. Interferon alpha, IFN) przez okres 12 miesięcy, co przyczyniło się do znacznego spadku poziomu transaminaz w surowicy oraz poprawy stanu wątroby (Hoofnagle i wsp., 1986). Dalsze prowadzone szerokokrojone badania potwierdziły działanie IFN α w leczeniu WZW typu C i stały się podstawą do wprowadzenia monoterapii rekombinowanym interferonem alfa jako standardu leczenia (Di Bisceglie i wsp., 1989). Następnym etapem w leczeniu zakażeń wirusem HCV było wprowadzenie do schematu terapeutycznego analogu nukleozydowego – rybawiryny (ang. Ribavirin, RBV). Początkowo próbowano stosować ją w monoterapii (analogicznie do IFN), jednakże jedynie dodanie jej do terapii interferonowej doprowadziło osiągnięcia trwałej odpowiedzi wirusologicznej (ang. sustained virological response, SVR) u znacznego odsetka pacjentów (Brillanti i wsp., 1994, Hoofnagle i Seeff, 2006). Kolejnym ważnym osiągnięciem w walce z przewlekłym WZW typu C było zastosowanie pegylowanych interferonów IFN. Modyfikacja ta wpłynęła korzystnie na farmakokinetykę leku oraz wykazała wyższą skuteczność przeciwwirusową. Tym sposobem schemat leczenia obejmujący stosowanie rekombinowanych pegylowanych interferonów w połączeniu z rybawiryną stał się „złotym standardem” leczenia zakażeń HCV aż do roku 2011 (Rockstroh JK., 2015).

4.9.1. Preparaty o bezpośredniej aktywności przeciwwirusowej – Direct Acting Antivirals

Dzięki wynikom intensywnie prowadzonych prac badawczych nad biologią wirusa HCV rozpoczęła się nowa era w walce z zakażeniami tym wirusem. W 2011 roku dopuszczono do stosowania dwie substancje zaliczane do całkowicie nowej generacji związków przeciwwirusowych, tak zwanych „direct acting antivirals” (DAAs): Telaprevir i Boceprevir. Krok ten z pewnością stanowi jeden z najważniejszych kamieni milowych w historii zmagania z wirusem zapalenia wątroby typu C. W przeciwieństwie do niespecyficznie działających interferonów i rybawiryny, leki te celowały bezpośrednio w białka wirusowe zaangażowane w kluczowe etapy cyklu życiowego HCV. Wspomniane pierwsze opracowane DAAs zaliczane były do inhibitorów proteazy (ang. Protease inhibitors, PI), a mechanizm ich działania opierał się na hamowaniu cięcia poliproteiny między białkami

NS3 i NS4A. Choć monoterapia Telaprewirem lub Boceprewirem prowadziła do gwałtownego spadku tempa replikacji wirusa HCV, indukowała ona również rozwój wariantów wirusa opornych na leczenie praktycznie u wszystkich pacjentów (Romano i wsp., 2010). W związku z tym konieczne było wprowadzenie terapii skojarzonej z pegylowanym interferonem oraz rybawiryną. Ta tzw. terapia potrójna zwiększyła częstość występowania SVR o około 30% u pacjentów niepoddawanych uprzednio żadnej terapii w porównaniu z poprzednim standardowym schematem Peg-IFN–RBV (Foster i wsp., 2011; Silva i wsp., 2013). Drugą generację DAAs stanowiły preparaty Sofosbuvir oraz Simeprevir – oba uzyskały aprobatę Amerykańskiej Agencji Żywności i Leków (ang. Food and Drug Administration, FDA) w 2013 roku. Simeprevir również należał do grupy inhibitorów wirusowej proteazy, jednakże w przeciwieństwie do Telapreviru i Bocepreviru, możliwe było jego stosowanie wyłącznie w pojedynczej dawce na dzień. Drugi z leków, Sofosbuvir, to inhibitor wirusowej polimerazy NS5B – głównego enzymu odpowiadającego za replikację HCV. Co ciekawe Sofosbuvir posiada formę proleku i dopiero w organizmie pacjenta jest przekształcany w aktywną postać leku. Stosowanie Sofosbuviru stało się przełomowym momentem w leczeniu zakażeń HCV z dwóch powodów: jako pierwszy dopuszczony był do stosowania u pacjentów zakażonych genotypami 1-6 wirusa (pozostałe DAAs ograniczały się wyłącznie do genotypu 1) oraz możliwe było podawanie sofosbuviru w skojarzeniu z rybawiryną i z pominięciem interferonu (terapia bezinterferonowa). (Chmielewska i wsp., 2015). Od tego momentu rozwój prac nad nowymi preparatami terapeutycznymi do stosowania w leczeniu przewlekłego WZWC gwałtownie przyspieszył. Opracowane i dopuszczone do stosowania rodzaje leków z grupy DAAs przedstawiono na Rysunku 14.



Rys. 14 Rodzaje dopuszczonych do stosowania leków o bezpośrednim działaniu przeciwwirusowym (DAAs).

4.9.2. Aktualne wytyczne dotyczące terapii wirusowego zapalenia wątroby typu C

Leczenie dorosłych pacjentów ze stwierdzoną infekcją wirusem HCV ma na celu eliminację zakażenia oraz zatrzymanie/cofnięcie zmian histologicznych w wątrobie, co przekłada się na zmniejszenie ryzyka rozwoju marskości i raka wątrobowokomórkowego (HCC). Kluczową kwestią jest, aby terapię rozpocząć jak najszybciej, także u osób z fazą ostrą zakażenia (bez czekania na samoczynną eliminację wirusa). Chorzy powinni być jak najszybciej kwalifikowani do leczenia. Decyzja o wyborze schematu leczenia zależy od następujących czynników: aktualnej dostępności, skuteczności i profilu bezpieczeństwa leków przeciwwirusowych. Najnowsze zalecenia Polskiej Grupy Ekspertów ds. HCV obejmują podawanie pacjentom leków przeciwwirusowych o bezpośrednim działaniu (DAA) zarejestrowanych przez Europejską Agencję Leków (ang. European Medicines Agency, EMA). Dokładny wykaz zalecanych preparatów zestawiono w Tabeli 2.

Klasa	Nazwa leku
Inhibitory proteazy NS3	Glekaprewir
	Woksylaprewir
	Grazoprewir
Inhibitory Białka NS5A	Pibrentaswir
	Welpataswir
	Elbaswir (EBR)
	Ledipaswir (LDV)
Inhibitor polimerazy NS5B	Sofosbuwir

Tab. 2 Zalecane preparaty z grupy DAAs do stosowania w terapii wirusowego zapalenia wątroby typu C.

Co istotne, schematy lekowe glekaprewir/pibrentaswir, sofosbuwir/welpataswir i sofosbuwir/welpataswir/woksylaprewir można stosować niezależnie od genotypu wirusa stwierdzonego u pacjenta. Natomiast połączenia sofosbuwir/ledipaswir i elbaswir/grazoprewir ograniczają się do wybranych genotypów (odpowiednio: wszystkie genotypy z wyłączeniem gt 3 oraz genotypy 1 i 4), zatem ich stosowanie jest zasadne wyłącznie w sytuacji, gdy podanie leków pangenotypowych jest niemożliwe (Tomasiewicz i wsp., 2023).

W przypadku dzieci zakażonych wirusem HCV zalecenia ekspertów mówią o konieczności zastosowania terapii u wszystkich małoletnich pacjentów, zarówno tych wcześniej nieleczonych, jak i leczonych bez powodzenia. Podobnie jak u pacjentów dorosłych, rekomendowaną metodą leczenia są schematy bezinterferonowe – są one dopuszczone do użycia u dzieci powyżej 3. roku życia, niezależnie od stopnia zaawansowania choroby wątroby. Preferowane są terapie pangenotypowe (sofosbuwir/welpataswir lub glekaprewir/pibrentaswir) w dawkach zależnych od masy ciała pacjenta. Należy podkreślić, że w przypadku dzieci terapia powinna odbywać się pod kontrolą w ośrodkach wyspecjalizowanych w leczeniu dzieci z przewlekłym WZWC (Rana i wsp., 2021; Tomasiewicz i wsp., 2023).

4.10. Szczepionka profilaktyczna skierowana przeciwko wirusowi HCV

Powszechnie wiadomo, że szczepienia są najbezpieczniejszym, i najbardziej skutecznym narzędziem obrony przed zagrożeniami ze strony chorób zakaźnych. Pierwsze próby opracowania szczepionki przeciwko wirusowi HCV rozpoczęto na początku lat

dziewięćdziesiątych. Preparaty te oparte były na wektorach wirusowych niosących sekwencje glikoprotein HCV (Ralston i wsp., 1993). Niestety pomimo uzyskania bardzo optymistycznych wstępnych wyników badań na modelu szympansim, nie zostały one dopuszczone do użytku klinicznego (Choo i wsp., 1994). W kolejnych latach immunogenność licznych kolejnych potencjalnych preparatów szczepionkowych została poddana ocenie z wykorzystaniem modeli zwierzęcych. Szczepionki te bazowały na całych białkach wirusowych, cząsteczkach wirusopodobnych, rekombinowanych wektorach oraz na DNA (Bailey i wsp., 2019). Zastosowano różne strategie mające na celu wywołania odpowiedzi limfocytów T swoistych dla HCV – obejmowały one wykorzystanie konserwowanych niestrukturalnych białek wirusowych (NS3, NS4 i NS5) wraz z glikoproteinami osłonki (E1, E2) i bez nich. Większość kandydatów na szczepionki przetestowano na gryzoniach, a niewielki ich podzbiór także na makakach. Otrzymane wyniki wskazywały na silną indukcję komórek T (Cox A.L., 2020). Ze względu na koszty i ograniczoną dostępność szympanсів, zdecydowanie mniej potencjalnych preparatów szczepionkowych oceniono pod ich kątem skuteczności w modelu szympansim. Szczepionki te obejmowały cząsteczki wirusopodobne (ang. Virus-like particles, VLPs) złożone z glikoprotein E1, E2, białka C oraz rekombinowanych białek NS oraz szczepionek genetycznych kodujących białka NS. Otrzymano bardzo zróżnicowane wyniki, prawdopodobnie w związku z ograniczoną liczbą zwierząt (mniej niż 6 zwierząt w jednym badaniu). Szczepionki genetyczne (zawierające DNA kodujące glikoproteiny osłonki) choć wzbudziły odpowiedź zarówno ze strony limfocytów T, jak i limfocytów B, nie zapewniły odporności przed zakażeniem HCV (Rollier C i wsp., 2004; Elmowalid i wsp., 2007; Youn i wsp., 2008; Zubkova i wsp., 2014).

Spośród wszystkich preparatów wykazujących skuteczność w zapobieganiu przewlekłej infekcji w modelu szympansim, zaledwie dwa skierowano do testów klinicznych na ludziach. Pierwszym z nich była szczepionka pierwotnie opracowana przez Chiron Corporation (obecnie Novartis), składająca się z rekombinowanych glikoprotein E1 i E2 (genotyp 1a) podanych z adiuwantem MF59. U zdrowych ochotników immunizacja wywołała silną odpowiedź ze strony limfocytów T CD4+, a u niektórych biorców dodatkowo wzbudziła produkcję przeciwciał neutralizujących zdolnych do krzyżowego rozpoznawania różnych genotypów wirusa. Pomimo tych zachęcających wyników, badania uzupełniające w celu oceny skuteczności jeszcze się nie rozpoczęły (Frey i wsp., 2010; Law i wsp., 2013). Drugim kandydatem była dwudawkowa szczepionka wektorowa opracowana przez Okairos Corporation (obecnie GlaxoSmithKline). W pierwszej dawce podawano wektor bazujący na

rekombinowanym adenowirusie szympansim niosącym sekwencje kodujące białka niestrukturalne. Druga dawka obejmowała podanie wektora pochodzącego z wirusa krowianki i także niosącego geny kodujące białka NS. Zakażenie szympansov wirusem HCV poprzedzone podaniem dwóch dawek wyżej opisanego preparatu przyczyniło się do wywołania odpowiedzi ze strony limfocytów T oraz znacznego zmniejszenia poziomu wirerii (Folgori i wsp., 2006). Z kolei u zdrowych ochotników zastosowanie takiego schematu indukowało silną odpowiedź ze strony specyficznych limfocytów T CD4+ oraz CD8+. Odpowiedź ta była zbliżona do reakcji organizmu podczas spontaniczej neutralizacji wirusa w czasie infekcji pierwotnej (Swadling i wsp., 2014). Do badania klinicznego II fazy zakwalifikowano osoby należące do grupy wysokiego ryzyka i zażywające narkotyki drogą iniekcji. I chociaż zastosowany preparat indukował odpowiedź ze strony limfocytów T, nie udało się uzyskać ani działania profilaktycznego, ani zmniejszenia częstości występowania przewlekłego zakażenia wirusem. Powody tego niepowodzenia pozostają nieznanne (Page i wsp., 2021).

Strategie zmierzające do uzyskania szczepionki indukującej powstanie przeciwciał przeciwko HCV obejmowały preparaty oparte na białkach, DNA, VLPs, oraz wektorach wirusowych. Szczepionka zawierająca rekombinowaną glikoproteiny E1E2 pełnej długości (genotyp 1a) podane z adiuwantem typu olej w wodzie została przetestowana na gryzoniach, naczelnych i ludziach. Chociaż preparat ten wzbudził przeciwciała neutralizujące krzyżowo u świnek morskich oraz wykazywał działanie ochronne u szympansov, uzyskane przeciwciała neutralizujących po szczepieniu w badaniu 1 fazy na ludziach były wykrywalne tylko u 3 z 16 zaszczepionych osób (Choo i wsp., 1994; Stamataki i wsp., 2007; Frey i wsp., 2010). Inne szczepionki mające na celu wzbudzenie przeciwciał neutralizujących także nie cechowały się wysoką skutecznością. Ostatnim podejściem było wykorzystanie całego inaktywowanego wirusa pochodzącego z systemu HCVcc jako materiału szczepionkowego. Akazawa i wsp. opublikowali wyniki badań obejmujących szczepienie myszy inaktywowanym wirusem HCVcc (szczep J6/JFH-1). Postępowanie to doprowadziło do produkcji przeciwciał neutralizujących skierowanych przeciwko homologicznemu i dwóm heterologicznym szczepom HCV, a podanie oczyszczonych przeciwciał pozyskanych od zaszczepionych myszy zapobiegło homologicznej infekcji wirusowej w mysim modelu humanizowanym (Akazawa i wsp., 2013). Badania wykazujące, że region HVR1 może blokować konserwowane epitopy dla przeciwciał szeroko neutralizujących, przyczyniły się do stworzenia szczepionki niosącej białko E2 z usuniętymi trzema regionami zmiennymi.

Jednakże ten preparat zdolny był do indukcji jedynie umiarkowanie wysokich mian przeciwciał (Vietheer i wsp., 2017).

Biorąc pod uwagę powyższe dane opracowanie idealnej szczepionki wykazującej działanie ochronne przed wirusem HCV powinno skupiać się nie tylko na indukowaniu odpowiedzi ze strony limfocytów T, ale także na wzbudzaniu przeciwciał szeroko neutralizujących, niezbędnych w zapobieganiu przewlekłej infekcji wirusowej (Schlotthauer i wsp., 2021).

5. Cel pracy

Celem niniejszej pracy było poszukiwanie zależności pomiędzy zmiennością genetyczną glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV), a odpowiedzią na terapię pegylowanym interferonem alfa i rybawiryną u dzieci. W pracy użyto białek otrzymanych z materiału pochodzącego od pacjentów Kliniki Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Szczegółowym celem pracy była analiza zmian we wzorze glikozylacji białka E2.

6. Metody

6.1. Metody pracy z komórkami bakteryjnymi

6.1.1. Przygotowanie komórek kompetentnych: TOP10 *E. coli*

Hodowlę komórek *E. coli* szczepu TOP10 odmładzano poprzez dodanie 1ml hodowli nocnej do 50ml pożywki LB. Hodowlę kontynuowano z wytrząsaniem do uzyskania OD=0,4-0,6 przy długości fali 575nm. Następnie całość hodowli przenoszono do jałowej probówki 50ml i wirowano przy prędkości 1500 rpm przez 10 minut w 4°C, w celu uzyskania osadu komórek. Po usunięciu pożywki nad osadu, bakterie zawieszano w 10 ml zimnego 0,1M CaCl₂ i inkubowano 30 minut w lodzie. Po zakończonej inkubacji bakterie wirowano przy prędkości 1500rpm przez 10 minut w 4°C. Do oddzielonego od CaCl₂ osadu dodawano 2,5 ml (na każdą probówkę) zimnego roztworu 0,1M CaCl₂ z 5% glicerolem. Osad zawieszano w 4ml zimnego 0,1M CaCl₂ z dodatkiem 5% glicerolu. Bakterie rozdzielano do probówek typu Eppendorf po 200 µl i zamrażano w -70°C.

6.1.2. Transformacja komórek kompetentnych TOP10 *E. coli*

W celu namnożenia plazmidowego DNA przeprowadzano transformację komórek kompetentnych *E. coli* TOP10. Porcję komórek kompetentnych rozmrażano w lodzie, następnie do bakterii dodawano 0,5-1 µg DNA plazmidowego lub całość mieszaniny ligacyjnej (20µl). Po wymieszaniu komórek i DNA całość inkubowano w lodzie 30 minut. Następnie przeprowadzano szok temperaturowy przez 1 minutę w 42°C i schładzano na lodzie przez 5 min. W kolejnym etapie do bakterii dodawano 900µl pożywki LB bez dodatku antybiotyków i hodowano z wytrząsaniem przez 1h w 37°C. Po tym czasie bakterie transformowane DNA plazmidowym wysiewano po 100µl na płytki ze stałym podłożem LA z dodatkiem odpowiedniego antybiotyku. W przypadku transformacji komórek mieszaniną ligacyjną, przed wysianiem na płytkę, bakterie zagęszczano przez wirowanie z prędkością 1500 rpm przez 5 minut, zbierano 800µl supernatantu, a pozostałe 200µl delikatnie rozpipetowywano i wysiewano na na płytki. Całość pracy wykonywana była w warunkach jałowych (przy palniku). Płytki z wysianymi bakteriami inkubowano przez 16 godzin w 37°C.

6.1.3. Nadprodukcja CD81-LEL w komórkach bakteryjnych

Z konserwy komórek bakteryjnych BL21 *E. coli*, zawierających plazmid niosący sekwencję kodującą dużą pętlę zewnątrzkomórkową (LEL) białka CD81 połączonym znacznikiem GST, przygotowywano hodowlę nocną w 100 ml pożywki LB. Następnego dnia hodowlę odmładzano poprzez dodanie 40 ml hodowli nocnej do 1000 ml pożywki Terrific Broth z dodatkiem ampicyliny (50 μ l na 100 ml pożywki). Hodowlę kontynuowano w 37°C z wytrząsaniem do uzyskania OD = 1 przy długości fali 575nm. Po uzyskaniu odpowiedniego OD hodowlę indukowano 1ml IPTG oraz ponownie hodowano z wytrząsaniem przez 3 godziny. Całość hodowli wirowano z prędkością 5000 rpm w 4°C przez 10 minut. Supernatant zlewano, a osad zamrażano w -20°C. Osad wykorzystywano do oczyszczenia nadprodukowanego białka CD81-LEL-GST.

6.2. Metody pracy z DNA

6.2.1. Amplifikacja wirusowego materiału genetycznego pochodzącego od pacjentów

Materiał wyjściowy do badań stanowił panel produktów reakcji RT-PCR, w których jako matrycę wykorzystano RNA wirusa obecnego w osoczu pacjentów (próbki otrzymane w ramach współpracy naukowej od Prof. Figlerowicza). W celu amplifikacji fragmentów DNA przeprowadzano reakcję PCR (ang. polymerase chain reaction) z użyciem specyficznych starterów. Reakcje prowadzono z użyciem polimerazy WALK (PWO) zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

6.2.2. Klonowanie do plazmidu pJet1.2 blunt

W celu uzyskania grupy sekwencji wirusowych pseudotypów (ang. Quasispecies) typowych dla każdego z pacjentów, powielone wcześniej fragmenty DNA wklonowano do wektora pJET1.2-blunt zgodnie z protokołem producenta.

6.2.3. Amplifikacja sekwencji DNA kodujących glikoproteinę E1 oraz warianty glikoproteiny E2 przy użyciu metody PCR

W celu powielenia sekwencji kodującej glikoproteinę E1 oraz sekwencji kodujących warianty glikoproteiny E2 przeprowadzano reakcję PCR z użyciem specyficznych starterów. Jako matryce służyły odpowiednio: plazmid pcDNA3.1 H77c (dla glikoproteiny E1) oraz poszczególne plazmidy pJet1.2 (pJet 1.2 NR1-3, pJet1.2 TR, pJet1.2 SR1-3 dla glikoproteiny

E2). Wszystkie reakcje przeprowadzano z użyciem polimerazy KOD zgodnie z wytycznymi producenta. Po przeprowadzeniu reakcji PCR próbki w całości nanoszono na 1% żel agarozowy w celu potwierdzenia obecności produktów właściwej wielkości. Odpowiednie prążki wycinano z żelu agarozowego, a zawarte w nich DNA izolowano przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników „Gel-out Concentrator” zgodnie z instrukcjami dostarczonymi przez producenta.

6.2.4. Konstrukcja chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1E2 – „Assembly” PCR

Homogenność wyizolowanych uprzednio z żelu agarozowego fragmentów DNA zawierających sekwencje kodujące glikoproteinę E1 i warianty glikoproteiny E2 potwierdzano poprzez ponowny rozdział w 1% żelu agarozowym. Tak przygotowane DNA stanowiło matrycę do reakcji łączącego PCR (ang. „Assembly” PCR). Reakcję prowadzono dwuetapowo. Pierwszy etap obejmował hybrydyzację wspólnych części sekwencji obu glikoprotein oraz ich wydłużenie przez polimerazę KOD bez wykorzystania starterów. W drugim etapie do mieszaniny reakcyjnej dodawano specyficzne startery i ponownie przeprowadzano reakcję PCR w odpowiednio dobranych warunkach. Całość produktu reakcji rozdzielało w 1% żelu agarozowym, prążki o wielkości ok. 1500 par zasad wycinano z żelu, a DNA oczyszczano przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Gel-Out Concentrator. W celu wklonowania uzyskanych konstruktów (wstawek) do plazmidu ekspresyjnego pcDNA3.1 H77c przeprowadzano trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi NotI oraz Bsp68I (jak opisano w punkcie 6.2.6), a następnie ligację (jak w punkcie 6.2.7). Poprawność otrzymanych chimerycznych heterodimerów zweryfikowano poprzez sekwencjonowanie.

6.2.5. Izolacja plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych

Do izolacji plazmidowego DNA z komórek bakteryjnych stosowano zestawy „Plazmid Mini” oraz „Plazmid Midi AX” firmy A&A Biotechnology. Procedurę przeprowadzano zgodnie z instrukcją producenta.

6.2.6. Trawienie DNA enzymami restrykcyjnymi

W celu uzyskania odpowiednich końców do klonowania bądź przeprowadzania analizy restrykcyjnej produktów ligacji, wykonywano trawienie enzymami restrykcyjnymi. Reakcja prowadzona była w temperaturze 37°C przez 30min.

Skład mieszaniny reakcyjnej:

Odczynnik	Ilość (μl)
DNA (1 μg)	X
Bufor 10x stężony	2
Enzym restrykcyjny (zwykle 1-2 U/μg DNA)	X
H ₂ O	Do objętości 20μl

Po zakończeniu trawienia próbki DNA oczyszczano przy pomocy zestawu odczynników “Clean-up Concentrator” firmy A&A Biotechnology zgodnie z protokołem producenta.

6.2.7. Ligacja

Ligację przeprowadzano przy użyciu ligazy DNA faga T4. Reakcję przeprowadzano w całkowitej objętości 20μl. Ilość DNA użytego do ligacji była ustalana indywidualnie dla każdej reakcji, tak aby stosunek ilości wstawki do wektora wynosił 3:5. Reakcja ligacji prowadzona była przez noc w temperaturze 16°C.

Skład mieszaniny reakcyjnej przedstawiono w tabeli poniżej.

Odczynnik	Ilość (μl)
Wektor (plazmid)	X
Wstawka	X
Bufor 10x stężony	2
Ligaza faga T4	1
H ₂ O	Do objętości 20μl

6.2.8. Elektroforeza DNA w żelu agarozowym

Elektroforetyczny rozdział fragmentów DNA wykonywano z użyciem 1% żelu agarozowego. Agarozę rozpuszczano w buforze 1x TAE przez podgrzanie w kuchenke mikrofalowej. Po schłodzeniu do roztworu agarozy dodawano barwnik Simply Safe (5μl/100ml żelu) i wylewano do specjalnej formy z grzebieniem. Próbkę zawieszano w końcowo 1x stężonym buforze obciążającym i następnie наносono na żel. W celu określenia wielkości rozdzielanych fragmentów DNA stosowano marker GeneRuler. Elektroforezę prowadzono

w buforze 1x TAE przy napięciu od 60 – 100 V. Po rozdzieleniu DNA, żel oglądano w świetle UV.

6.2.9. Izolacja DNA z żelu agarozowego

W celu wyizolowania i oczyszczania fragmentów DNA po rozdziale elektroforetycznym w żelu agarozowym zastosowano zestaw „Gel Out Concentrator” firmy A&A Biotechnology. Procedurę przeprowadzano zgodnie z instrukcją dostarczoną przez producenta.

6.3. Metody analizy bioinformatycznej obejmującej poziom N-glikozylacji uzyskanych konstruktów

Wszystkich analiz *in silico* dotyczących stopnia N-glikozylacji poszczególnych wariantów glikoproteiny E2 wirusa HCV dokonano przy pomocy serwera Net-N-Glyc 1.0 (bezpłatne oprogramowanie dostępne pod adresem <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>).

6.4. Metody pracy z białkami

6.4.1. Elektroforeza białek w żelu poliakryloamidowym w warunkach denaturujących (SDS-PAGE)

Elektroforezę białek przeprowadzano w żelu rozdzielającym o procentowości 12% lub 10%, w zależności od wielkości analizowanych białek. Próbkę zawieszano w buforze obciążająco-lizującym i inkubowano przez 10 minut w temperaturze 80°C. W celu określenia wielkości rozdzielanych białek stosowano marker białkowy PageRuler. Rozdział białek prowadzono w buforze SDS-PAGE 1x stężonym przy napięciu 80V do momentu wejścia w żel rozdzielający, a następnie przy napięciu 160V.

6.4.2. Elektrotransfer mokry białek rozdzielonych przy pomocy elektroforezy SDS-PAGE na błonę PVDF

Po zakończeniu rozdziału białek przy pomocy elektroforezy w żelu poliakryloamidowym, przeprowadzano elektrotransfer białek na błonę PVDF. Trzy bibuły typu Whatman, przycięte na wymiar żelu rozdzielającego, namaczano w buforze do elektrotransferu, następnie umieszczano na nich aktywowaną w metanolu błonę PVDF oraz żel poliakryloamidowy zawierający rozdzielone białka. Całość przykrywano trzema nasączonymi buforem do elektrotransferu bibułami typu Whatman. Tak przygotowaną kanapkę umieszczano w aparacie do elektrotransferu mokrego i usuwano pęcherzyki powietrza. Transfer

prowadzono przy napięciu 15V przez noc. Po zakończeniu transferu błonę PVDF wykorzystywano do detekcji białek metodą western blotting.

6.4.3. Western Blotting

Błonę PVDF z przeniesionymi na nią białkami rozdzielonymi przy użyciu elektroforezy poliakrylamidowej, blokowano przez 1godzinę w 5% roztworze mleka odtłuszczonego w TBST w celu uniemożliwienia niespecyficznego łączenia się przeciwciał z membraną. Po zakończeniu inkubacji i dokładnym wypłukaniu błony w buforze TBST, przenoszono ją do roztworu przeciwciał 1-rzędowych w 5% mleku odtłuszczonym w TBST (rodzaj i rozcieńczenie przeciwciał zależne od wykrywanego epitopu), a następnie inkubowano przez 1h w temperaturze pokojowej. Po inkubacji błonę płukano 3 razy po 5 min w buforze TBST i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę w roztworze odpowiednich przeciwciał 2-rzędowych skoniungowanych z peroksydazą chrzanową zawieszonych w 5% mleku w TBST. Po inkubacji błonę płukano jak wyżej. Detekcję wyznakowanych przeciwciałami białek przeprowadzano, za pomocą komercyjnych zestawów odczynników do detekcji sygnałów chemiluminescencyjnych i ekspozycji błony na klisze światłoczułe.

6.4.4. Barwienie żeli poliakryloamidowych

W celu wybarwienia białek rozdzielanych w żelach poliakryloamidowych w elektroforezie SDS-PAGE stosowano roztwór barwnika Coomassie Brilliant Blue R250. Żel po zakończeniu rozdziału elektroforetycznego umieszczano w roztworze barwnika i inkubowano przez 45 minut w temperaturze pokojowej. Po upływie tego czasu zlewano roztwór barwnika i zastępowano go roztworem odbarwiacza, w którym pozostawiano żel do momentu uwidocznienia się pojedynczych prążków.

6.4.5. Immunoprecypitacja glikoprotein E1 i E2

Materiał wyjściowy, z którego wyodrębniano kompleksy glikoprotein E1E2 stanowiły lizaty komórek ssaczy HEK293, przygotowywane zgodnie z opisem w punkcie 6.5.3. Do gotowych lizatów komórkowych dodawano kozie poliklonalne przeciwciało skierowane przeciwko glikoproteinie E2 wirusa HCV i inkubowano przez noc w 4°C. Kolejnego dnia złoże agarozowe sprzężone z białkiem G płukano trzykrotnie buforem LB2 przez 5 minut, po czym wirowano z prędkością 2000 rpm. Następnie złoże porcjowano do probówek typu Eppendorf, dodawano do niego kompleksy lizat-przeciwciało i ponownie inkubowano przez noc w 4°C. Po zakończeniu inkubacji całość płukano sześciokrotnie j.w., wirowano,

a przyłączone heterodimery glikoprotein eluowano przy pomocy buforu elucyjnego w składzie Tris-HCl pH 3.0 + 0,1M glicyna. Uzyskane kompleksy poddawano następnie elektroforezie SDS-PAGE w warunkach redukujących (6.4.1) oraz analizie typu Western Blotting (6.4.3).

6.4.6. Oczyszczanie fragmentu dużej zewnątrzkomórkowej pętli receptora CD81 (CD81-LEL-GST) metodą chromatografii powinowactwa

Osad otrzymany poprzez zwirowanie hodowli komórek BL21 *E. coli* (6.1.3) zamrażano w -20°C, a następnie zawieszano w 40 ml buforu lizującego i inkubowano w lodzie przez 30 minut. Po upływie tego czasu dodawano kolejno: 3 ml 10% roztworu Tritonu X-100, 0,45 ml 1M MgCl₂ i 0,45 ml roztworu DNAzy I w stężeniu 10 mg/ml, całość mieszano i ponownie inkubowano w lodzie przez 30 minut. Następnie całość wirowano przez 20 minut z prędkością 15000g w 4°C. W czasie wirowania przygotowywano złożę sefarożowe z immobilizowanym glutationem przemywając je trzykrotnie buforem płuczącym GST-A. Po zakończeniu wirowania supernatant dodawano do 1 ml gotowego złoża sefarożowego i inkubowano przez noc w 4°C, zachowując uprzednio niewielką ilość do dalszych analiz. Następnego dnia lizat ze złożem wirowano z prędkością 2000 rpm w 4°C, a supernatant zbierano (niewielką jego ilość pozostawiono do dalszych analiz). Po czterokrotnym płukaniu złoża, przenoszono je do mniejszej próbówki, dodawano bufor elucyjny i sześciokrotnie zbierano frakcje, każdorazowo inkubując złożę z buforem przez 5 minut w lodzie. Każda z frakcji była oceniana pod kątem ogólnej zawartości białek przy pomocy rozdzielania w żelu poliakryloamidowym (elektroforeza SDS-PAGE) oraz barwienia roztworem barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250. Po wstępnym oszacowaniu stężenia białek w poszczególnych frakcjach, trzy z nich połączono, a następnie dializowano w buforach (kolejno): Tris-HCl pH 8 przez 1 godzinę oraz Tris-HCl pH 7,4 przez noc. Po zakończeniu dializy do gotowego preparatu dodawano glicerol, osiągając jego końcowe stężenie w próbce na poziomie 10% i zamrażano w -70°C.

6.4.7. ELISA z wykorzystaniem oczyszczonego fragmentu receptora CD81 (CD81-LEL-GST)

Dołki 96-dołkowej płytki opłaszczano oczyszczonym białkiem CD81-LEL-GST w ilości 100 µl/dołek i inkubowano w 4°C przez noc. Następnego dnia płytkę płukano czterokrotnie buforem TBSTw w celu usunięcia niezwiązanych białek, po czym dodawano lizaty

komórkowe (100 μ l/studzienkę) zawierające chimeryczne heterodimery glikoprotein E1E2 i inkubowano przez 2 godziny w 37°C. Po zakończeniu inkubacji i płukaniu płytki j.w. wolne miejsca blokowano 3% roztworem surowiczej albuminy wołowej (Bovine Serum Albumin, BSA) przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po ponownym wypłukaniu płytki studzienki opłaszczano roztworem przeciwciał pierwszorzędowych ALP98 rozcieńczonych w 3% roztworze surowiczej albuminy wołowej w TBSTw i inkubowano przez noc w 4°C. Następnego dnia płytkę ponownie płukano i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę w roztworze kozich anti-mysich przeciwciał 2-rzędowych skoniungowanych z peroksydazą chrzanową zawieszonych w 3% BSA w TBSTw. Po sześciokrotnym wypłukaniu płytki do każdej ze studzienek dodawano roztwór substratu dla peroksydazy chrzanowej TMB i inkubowano maksymalnie przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po upływie tego czasu (lub wcześniej, w zależności od otrzymanego wyniku) zatrzymywano reakcję poprzez dodawanie 0,5M roztworu kwasu siarkowego (VI). Poziom absorbancji odczytywano przy długości fali $n=450$ nm z wykorzystaniem czytnika płytek TECAN Infinite 2000.

6.4.8. GNA-capture ELISA

Dołki 96-dołkowej płytki opłaszczano roztworem lektyny pochodzącej ze śnieżyczki przebiśniega (*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA) w rozcieńczeniu 50 μ l GNA/10 ml PBS i inkubowano w 4°C przez noc. Następnego dnia płytkę płukano czterokrotnie buforem TBSTw w celu usunięcia niezwiązanych lektyn, po czym wolne miejsca blokowano 3% roztworem surowiczej albuminy wołowej przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po ponownym wypłukaniu płytki, nakładano do każdego dołka po 100 μ l lizatu komórek HEK293 uprzednio transfekowanych przy pomocy plazmidów kodujących poszczególne heterodimery glikoprotein E1E2 i inkubowano przez noc w 4°C. Rano płytkę płukano, opłaszczano roztworem przeciwciał pierwszorzędowych rozcieńczonych w 3% roztworze BSA w TBSTw (rodzaj i rozcieńczenie przeciwciał zależne od wykrywanego epitopu) i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po inkubacji płytkę płukano jak wcześniej i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę w roztworze odpowiednich przeciwciał 2-rzędowych skoniungowanych z peroksydazą chrzanową zawieszonych w 3% BSA w TBSTw. Po sześciokrotnym wypłukaniu płytki do każdej ze studzienek dodawano roztwór substratu dla peroksydazy chrzanowej TMB i inkubowano maksymalnie przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po upływie tego czasu (lub wcześniej, w zależności od otrzymanego wyniku) zatrzymywano reakcję poprzez

dodawanie 0,5M roztworu kwasu siarkowego (VI). Poziom absorbancji odczytywano przy długości fali $n=450$ nm z wykorzystaniem czytnika płytek TECAN Infinite 2000.

6.4.9. ELISA z wykorzystaniem panelu przeciwciał konformacyjnych

Dołki 96-dołkowej płytki opłaszczano lizatami komórek HEK293 zawierającymi takie same ilości wariantów chimerycznych heterodimerów E1E2 i inkubowano w 4°C przez noc. Następnego dnia płytkę płukano czterokrotnie buforem TBSTw w celu usunięcia niezwiązanych białek, po czym wolne miejsca blokowano 3% roztworem surowiczej albuminy wołowej przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Następnie płytkę płukano, opłaszczano roztworem przeciwciał pierwszorzędowych (HC-1, HC-11, HC-84.1, CBH-4B) rozcieńczonych w 3% roztworze BSA w końcowym stężeniu 10 mg/mL i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Przeciwciało ALP98 antibody służyło jako kontrola. Po inkubacji płytkę płukano jak wcześniej i inkubowano w temperaturze pokojowej przez 1 godzinę w roztworze odpowiednich przeciwciał 2-rzędowych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową zawieszonych w 3% BSA w TBSTw. Po sześciokrotnym wypłukaniu płytki do każdej ze studzienek dodawano roztwór substratu dla peroksydazy chrzanowej TMB i inkubowano maksymalnie przez 30 minut w temperaturze pokojowej w ciemności. Po upływie tego czasu (lub wcześniej, w zależności od otrzymanego wyniku) zatrzymywano reakcję poprzez dodawanie 0,5M roztworu kwasu siarkowego (VI). Poziom absorbancji odczytywano przy długości fali $n=450$ nm z wykorzystaniem czytnika płytek TECAN Infinite 2000.

6.4.10. Badanie wpływu syntezy glikoprotein E1E2 na poziom ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek

Komórki Huh7 wysiewano na płytki sześciodołkowe i transfekowano plazmidowym DNA niosącym heterodimery glikoprotein E1E2. 48 godzin po transfekcji komórki płukano 1x PBS, trypsynizowano, wirowano z prędkością 1000xg przez 3 minuty, a następnie zawieszano w zimnym buforze PBA (1xPBS + 1% BSA + 0,02% azydek sodu). Komórki rozdzielano na 3 równe części i przenoszono na płytki 96-dołkowe o stożkowym dnie. Po zwirowaniu przez 2 minuty z prędkością 1500 rpm i usunięciu buforu PBA, komórki zawieszano w roztworze przeciwciał pierwszorzędowych W6/32 (Dako Denmark) i inkubowano przez 1 godzinę w lodzie. Następnie płytki wirowano jak wcześniej, komórki płukano trzykrotnie buforem PBA, a następnie zawieszano w roztworze przeciwciał drugorzędowych sprzężonych

z fikoerytryną i inkubowano przez 1 godzinę w lodzie w ciemności. Po zakończeniu inkubacji komórki ponownie płukano trzykrotnie j.w. i zawieszano w 100 µl buforu PBA. Poziom ekspresji cząsteczek MHC klasy I analizowano przy pomocy cytometru przepływowego BD FACSCalibur™.

6.4.11. Pomiar infekcyjności pseudocząsteczek HCV

Poziom infekcyjności pseudocząsteczek wirusowych oznaczano poprzez pomiar poziomu ekspresji białka reporterowego lucyferazy produkowanego w komórkach z plazmidu pTG126 Luc I znajdującego się we wnętrzu każdej funkcjonalnej pseudocząsteczki. W tym celu wykorzystywano zestaw odczynników „Bright-Glo Luciferase Assay System” (Promega) postępując zgodnie z instrukcjami producenta. Pomiaru luminescencji dokonywano za pomocą czytnika TECAN Infinite 2000.

6.4.12. Detekcja glikoprotein E1 i E2 w pseudocząsteczkach HCV

Pseudocząsteczki HCV produkowano zgodnie z procedurą opisaną w punkcie 6.5.6. 48 godzin po kotransfekcji zbierano pożywkę zawierającą HCVpp z naczyń ssaczyc HEK293 do probówek 15ml i odwirowywano z prędkością 3000 rpm przez 5 minut w celu usunięcia resztek komórkowych. Supernatant następnie wirowano na poduszce sacharozowej (1,5 ml, 20% sacharoza) w ultrawirówce z rotorem Beckman SW41 przez 2.5 godziny w +4°C z prędkością 25000 rpm. Osad (pseudocząsteczki HCV) zawieszano w 50 µl 1xPBS, a następnie, po odpowiednim przygotowaniu, rozdzielano w żelu poliakryloamidowym w warunkach redukujących (6.4.2). Detekcję białek metodą western blotting przeprowadzano zgodnie z punktem 6.4.3.

6.5. Metody pracy z hodowlami komórek ssaczyc

6.5.1. Hodowle komórek ssaczyc

Do hodowli komórek ssaczyc używano butelek polistyrenowych T-25, T75 i T175 oraz płytek wielodołkowych. Komórki pasażowano w momencie, gdy tworzyły jednorodną warstwę na dnie naczynia hodowlanego. Hodowle prowadzono w inkubatorze w atmosferze 5% CO₂ w temperaturze 37°C.

Pożywki i suplementy stosowane do konkretnych linii komórkowych zostały wymienione w tabeli poniżej.

Linia komórkowa	Skład pożywki
HEK293	DMEM 4500 + 10% FBS + 1% Pen/Strep
Huh7,5	DMEM 4500 + 10% FBS + 1% Pen/Strep

6.5.2. Transfekcja komórek ssaczych plazmidowym DNA

Transfekcję komórek ssaczych DNA plazmidowym przeprowadzano z użyciem odczynnika JetPrime (PolyplusTransfection), postępując zgodnie z protokołem dostarczonym przez producenta.

6.5.3. Przygotowanie lizatów komórkowych

W celu przygotowania lizatów komórkowych służących do późniejszych analiz (np. Western blotting, ELISA), zbierano pożywkę z nacieków komórek transfekowanych plazmidowym DNA, płukano 1x PBS, a następnie dodawano 1 ml zimnego buforu lizującego LB2 z dodatkiem inhibitorów proteaz oraz jodoacetamidu i inkubowano w 4°C z bujaniem przez 30 minut. Następnie całość zbierano do probówek Eppendorfa i wirowano przez 30 minut z prędkością 13000 rpm w temperaturze 4°C. Supernatant zbierano i przenoszono do nowych probówek Eppendorfa. Tak powstałe lizaty komórkowe przechowywano w -70°C.

6.5.4. Immunodetekcja białek w jednowarstwowych hodowlach komórek (Test IPMA)

Detekcję białek w hodowlach jednowarstwowych komórek ssaczych umożliwia test IPMA (ang. immunoperoxidase monolayer assay). Komórki ssacze transfekowane plazmidowym DNA płukano 3 razy buforem PBS, suszono w warunkach jałowych i zamrażano w temperaturze -20°C. Następnie komórki utrwalano zimnym 4% paraformaldehydem przez 10 minut, płukano 3 razy buforem PBST (PBS + 0,5% Tween80) i dodawano przeciwciała 1-rzędowe zawieszone w buforze PBS z dodatkiem 1% Tween80 i 5% FBS. Inkubację z przeciwciałami prowadzono przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Niezwiązane przeciwciała odpłukiwano 3 razy buforem 1xPBS + 0,5% Tween80, a następnie komórki pokrywano buforem PBS z dodatkiem 1% Tween80, 5% surowicy bydlęcej i przeciwciał 2-rzędowych skoniugowanych z peroksydazą chrzanową i inkubowano przez 1 godzinę w temperaturze pokojowej. Po zakończonej inkubacji komórki płukano 3x buforem PBS i dodawano roztwór substratu dla peroksydazy chrzanowej: AEC, wskutek czego powstawała

reakcja barwna – kolor czerwony w miejscu reakcji pozytywnej. Komórki oglądano w mikroskopie w świetle przechodzącym.

6.5.5. Barwienie immunofluorescencyjne klasyczne

Barwienie immunofluorescencyjne klasyczne wykonywano z użyciem płytek 12-dółkowych. W każdym z dołków umieszczano jałowe szkiełka nakrywkowe pokryte żelatyną, na które wysiewano komórki. 24 godziny po wysianiu komórki były transfekowane plazmidowym DNA niosącym heterodimery glikoprotein wirusa HCV. Po 48 godzinach komórki utrwalano poprzez dodanie 16% paraformaldehydu (PFA) bezpośrednio do pożywki tak, aby uzyskać końcowe stężenie 4% PFA. Komórki inkubowano przez 2 godziny w 8° C i suszono na powietrzu. Następnie komórki permeabilizowano przy pomocy 0,2% Triton X-100 w PBS przez 5 minut i przemywano trzykrotnie 1xPBS. Po 1-godzinnej inkubacji z roztworem przeciwciał pierwszorzędowych, komórki płukano 3 razy 1xPBS, a następnie inkubowano z roztworem odpowiednich przeciwciał drugorzędowych przez 1 godzinę. Roztwory przeciwciał przygotowywano w 1xPBS z dodatkiem 5% FBS. Preparaty zaklejało się przy użyciu preparatu ProLong Gold antifade mountant z DAPI (Invitrogen) i analizowano przy pomocy mikroskopu konfokalnego Leica TSC SP8X.

6.5.6. Produkcja pseudocząsteczek HCV (HCV pseudoparticles, HCVpp)

Na płytce o średnicy 10 cm wysiewano komórki linii komórkowej HEK293 w ilości $1,8 \times 10^5$ komórek/ml. Kolejnego dnia przeprowadzano kotransfekcję plazmidami: pMLV Gag-Pol, pTG126 Luc oraz plazmidami niosącymi sekwencje kodujące badane glikoproteiny. Po całonocnej inkubacji zastępowano pożywkę DMEM świeżą, z dodatkiem 1M buforu HEPES w stosunku 1:100. Tego samego dnia zakładano hodowlę komórek linii Huh7 na płytce M12 ($4,5 \times 10^5$ komórek/dółek). 48 godzin po transfekcji zbierano pożywkę z nad transfekowanych komórek, wirowano i przeprowadzano infekcję komórek Huh7. Po 4 godzinach inkubacji, usuwano pożywkę zawierającą pseudocząsteczki i zastępowano ją pożywką DMEM. Komórki inkubowano przez kolejne 2 dni w warunkach jak wyżej.

7. Materiały

7.1. Fragmenty DNA pochodzące od pacjentów uzyskane na podstawie RNA wirusowego uprzednio wyizolowanego od pacjentów, otrzymane od prof. M. Figlerowicza – materiał wyjściowy do badań

- **P2-04** – oznaczenie własne NR6, płeć męska, 13 lat, brak odpowiedzi na terapię
- **P2-05** – oznaczenie własne NR4, płeć żeńska, 11 lat, brak odpowiedzi na terapię
- **P2-10** – oznaczenie własne NR1, płeć męska, 11 lat, brak odpowiedzi na terapię
- **P2-17** – oznaczenie własne SR1, płeć męska, 8 lat, trwała odpowiedź wirusologiczna
- **P2-18** – oznaczenie własne SR2, płeć żeńska, 15 lat, trwała odpowiedź wirusologiczna
- **P2-19** – oznaczenie własne NR5, płeć żeńska, 10 lat, brak odpowiedzi na terapię
- **P2-20** – oznaczenie własne SR3, płeć żeńska, 15 lat, trwała odpowiedź wirusologiczna
- **P2-23** – oznaczenie własne NR2, płeć męska, 10 lat, brak odpowiedzi na terapię
- **P2-24** – oznaczenie własne TR, płeć żeńska, 16 lat, przejściowa odpowiedź na terapię
- **P2-28** – oznaczenie własne NR3, płeć żeńska, 14 lat, brak odpowiedzi na terapię

7.2. Szczepy bakteryjne

- **Escherichia coli TOP10**

McrA, Δ (mrr-hsdRMS-mcrBC), F80 Δ lacZDM15, Δ lacX74, deoR, recA1, araD139, Δ (ara,leu)7697, galU, galK, I-, rpsL, endA1, nupG (Invitrogen, Life Technologies)

- **Escherichia coli BL21 (DE3)**

E. coli str. B F⁻ ompT gal dcm lon hsdSB(rB-mB-) λ (DE3 [lacI lacUV5-T7p07 ind1 sam7 nin5]) [malB+]K-12(λ S)

7.3. Linie komórkowe

- **HEK293**

Human embryonic kidney cells – linia komórkowa ciągła wyprowadzona z embrionalnych komórek nerki ludzkiej, ze zbiorów własnych Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów

- **Huh7,5**

Human hepatocellular carcinoma – linia komórkowa ciągła wyprowadzona z komórek ludzkiego raka wątrobowokomórkowego, ze zbiorów własnych Zakładu Biologii Molekularnej Wirusów

7.4. Plazmidy

- pJet 1.2 NR1-3 – plazmidy niosące fragmenty genów kodujących glikoproteinę wirusową E2 wirusa HCV pochodzących od pacjentów nieodpowiadających na terapię (NR)
- pJet 1.2 TR – plazmid niosący fragment genu kodującego glikoproteinę wirusową E2 wirusa HCV pochodzący od pacjenta o przejściowej odpowiedzi na terapię (TR)
- pJet 1.2 SR1-3 – plazmidy niosące fragmenty genów kodujących glikoproteinę wirusową E2 wirusa HCV pochodzących od pacjentów o trwałej odpowiedzi na terapię (SR)
- pcDNA3.1 H77c – plazmid zawierający sekwencję kodującą poliproteiny wirusa HCV genotypu 1a
- pcDNA3.1 H77c/NR1-3 – plazmidy niosące sekwencję kodującą chimeryczną poliproteinę wirusa HCV genotypu 1a zawierające białka pochodzące od pacjentów nieodpowiadających na terapię (NR)
- pcDNA3.1 H77c/TR – plazmid niosący sekwencję kodującą chimeryczną poliproteinę wirusa HCV genotypu 1a zawierający białko pochodzące od pacjenta o przejściowej odpowiedzi na terapię (TR)
- pcDNA3.1 H77c/SR1-3 – plazmidy niosące sekwencję kodującą chimeryczną poliproteinę wirusa HCV genotypu 1a zawierające białka pochodzące od pacjentów o trwałej odpowiedzi na terapię (SR)
- pMLV Gag-Pol – pakujący wektor retrowirusowy niosący sekwencję kodującą białka Gag-Pol mysiego wirus białaczki (murine leukemia virus, MLV)
- pTG126 Luc – plazmid niosący sekwencję genu dla reporterowego białka lucyferazy

7.5. Pożywki

- **Do hodowli bakteryjnych**

- **Pożywka LB**

- Bacto-Trypton 10g, ekstrakt drożdżowy 5g, NaCl 10g rozpuszczono w 1 litrze wody destylowanej i jałowiono w autoklawie

- **Pożywka Terrific Broth**

- Bacto-Trypton 12g, ekstrakt drożdżowy 5g, glicerol 4 ml, K₂HPO₄ 12,54g, KH₂PO₄ 2,31g rozpuszczono w 1 litrze wody destylowanej i jałowiono w autoklawie

- **Pożywka LA**

- Bacto-Trypton 10g, ekstrakt drożdżowy 24g, NaCl 10g, Bacto-agar 15g, rozpuszczono w 1 litrze wody destylowanej i jałowiono w autoklawie

- **Do hodowli komórek ssaczych**

- **Pożywka DMEM 4500**

- (ang. Dulbecco's Modified Eagle's Medium) uzupełniona L-glutaminą (Gibco), roztwórek penicyliny/streptomycyny (Sigma Aldrich) i płodową surowicą bydlęcą w stężeniu 10% (Gibco)

7.6. Pozostałe odczynniki do hodowli komórkowych

- Trypsyna (Gibco)
- L-glutamina (Sigma Aldrich)
- Roztwór antybiotyków penicyliny i streptomycyny (ang. Pen/Strep) (Sigma Aldrich)
- Bydlęca surowica płodowa (ang. fetal bovine serum - FBS) (Invitrogen)
- JetPrime (PolyplusTransfection)

7.7. Antybiotyki

- **Ampicylina**

Roztwór 100 mg/ml w wodzie, stężenie w pożywce 100µg/ml (Sigma)

7.8. Przeciwciała

7.8.1. Przeciwciała pierwszorzędowe

- Przeciwciała monoklonalne anti-E1 (Santa Cruz Biotechnology)
- Przeciwciało poliklonalne anti-E2 (Bio-Rad)
- Przeciwciała monoklonalne anti-E2 AP33, otrzymane z MRC, Glasgow, Wielka Brytania
- Przeciwciała monoklonalne anti-E2 ALP98, otrzymane z MRC, Glasgow, Wielka Brytania
- Przeciwciała monoklonalne anti-E2 HC-1, otrzymane z MRC, Glasgow, Wielka Brytania
- Przeciwciała monoklonalne anti-E2 HC-11, otrzymane z MRC, Glasgow, Wielka Brytania
- Przeciwciała monoklonalne anti-E2 CBH-4B, otrzymane z MRC, Glasgow, Wielka Brytania
- Przeciwciała monoklonalne anti-E2 HC-84.1, otrzymane z MRC, Glasgow, Wielka Brytania
- Przeciwciała monoklonalne anti-MHC klasy I W6/32 (Dako Denmark)
- Przeciwciała monoklonalne anti- β -aktyna (Santa Cruz Biotechnology)
- Przeciwciało poliklonalne anti-CD81 (Santa Cruz Biotechnology)

7.8.2. Przeciwciała drugorzędowe

- Przeciwciała poliklonalne kozie anti-mysie IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (Jackson Immunoresearch)
- Przeciwciała poliklonalne ośle anti-kozio IgG sprzężone z peroksydazą chrzanową (Jackson Immunoresearch)
- Przeciwciała poliklonalne kozie anti-ludzkie sprzężone z peroksydazą chrzanową (Jackson Immunoresearch)
- Koniugaty przeciwciał anti-króliczych i anti-mysich sprzężonych z Alexa fluor 488 i alexa fluor 546 (Molecular Probes)

7.9. Wzorce masowe

- Gene Ruler DNA Ladder Mix (Life Technologies)

- PageRuler Prestained Protein Ladder (Life Technologies)

7.10. Enzymy

- Polimeraza DNA WALK (A&A Biotechnology)
- Polimeraza DNA KOD (Novagen)
- Ligaza DNA faga T4 (Fermentas)
- FastDigest *BglIII* (Fermentas)
- FastDigest *NotI* (Fermentas)
- FastDigest *Bsp86I/NruI* (Fermentas)

7.11. Bufory i roztwory

- **PBS**

137 mM NaCl

2.7 mM KCl

4.3 mM Na₂HPO₄

1.47 mM KH₂PO₄, pH 7.4

- **PBST**

PBS 1X stężony + 0.5% Tween 80

- **PBSTw**

PBS 1x stężony + 0,05% Tween 20

- **PBA**

PBS 1x stężony + 1% BSA + 0,02% Azydek sodu

- **TBS**

50 mM Tris-HCl

150 mM NaCl, pH 7.4

- **TBST**

TBS + 0.05% Tween 20

- **TAE (bufor elektrodowy do elektroforezy agarozowej)**

40mM Tris-octan

1 mM EDTA, pH 8.5

- **Bufor obciążający do DNA**

15% fikorol

0.25% ksylencjanol

0.25% błękit bromofenolowy

- **10X stężony bufor elektrodowy do elektroforezy SDS-PAGE**
0.25 M Tris
1.92 M glicyna
1% SDS, pH 8.3 73
- **4X stężony bufor lizująco-obciążający do elektroforezy SDS-PAGE w warunkach redukujących**
0.25 M Tris, pH 6.8
6% SDS
40% glicerol
0.04% błękitbromofenolowy
20% β-merkaptoetanol
 - **Bufor do lizy komórek ssaczyc LB2**
20 mM Tris-HCl (pH 7,4)
1 mM EDTA
150 mM NaCl
1% Triton X100
 - **0.2% Triton X 100**
0.1ml Triton X-100 + 49ml PBS 1X stężony
 - **Bufor do lizy komórek bakteryjnych BL21 E.coli**
1mM DTT
20% Lizozym
1mM PMSF
1x PBS
 - **Bufor płuczący sosowany w chromatografii powinowactwa**
0,0008 mM Triton X-100
1mM DTT
1xPBS
 - **Bufor do elucji białek ze złoża sefarozowego z immobilizowanym glutationem**
1M Tris-HCl pH 8,0
0,3% Glutation
 - **Bufor do elucji białek ze złoża agarozowego z przyłączonym białkiem G**
1M Tris-HCl pH 3.0
0,1M glicyna

- **Bufor płuczący GST-A**

50 mM Tris-HCl pH 8,0

80 mM NaCl

1 mM EDTA

- **Roztwór barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250**

1% Coomassie Brilliant Blue R-250

20% Metanol

10% Kwas octowy

- **Roztwór odbarwiający barwnik Coomassie Brilliant Blue R-250**

20% Metanol

10% Kwas octowy

- **CaCl₂**

0,1M CaCl₂

- **CaCl₂ z 5% glicerolem**

0,1M CaCl₂

5% glycerol

- **Roztwór akryloamidów 30%**

29% akrylamid

1% N,N'-metyleno-bisakrylamid

- 4 % paraformaldehyd (Alfa Aesar)

7.12. Pozostałe odczynniki

- Zestaw „Plasmid mini” (A&A Biotechnology)
- Zestaw “Plasmid midi AX” (A&A Biotechnology)
- Zestaw “Clean up concentrator” (A&A Biotechnology)
- Zestaw „Gel-out concentrator” (A&A Biotechnology)
- Zestaw “NovaRED” (Vector Laboratories)
- Zestaw do klonowania “CloneJet” (Thermo Scientific)
- Simpy Safe (EURX)
- Odczynniki do ECL (Thermo Scientific)
- Jednokrotnie stężony roztwór TMB (Thermo Scientific)
- Roztwór lektyn z *Galanthus nivalis* (Sigma Aldrich)
- Surowicza albumina wołowa (BSA) (Sigma Aldrich)

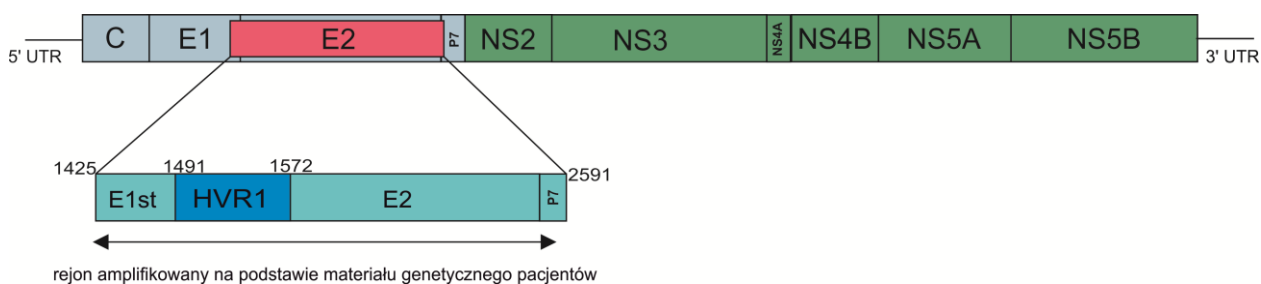
- Roztwory wywoływacza i utrwalacza RTG (Kodak)
- Klisze RTG (Kodak, Fujifilm)
- ImmobilonP (Millipore)
- Bibuła Whatmana 3MM (Whatman)
- Roztwór inhibitorów proteaz (Sigma Aldrich)
- Jodoacetamid (Fluka)
- IPTG (Fermentas)
- Barwnik Coomassie Brilliant Blue R250 (Sigma Aldrich)
- Złoże sefarozowe z immobilizowanym glutationem (Sigma Aldrich)
- Złoże agarozowe sprzężone z białkiem G (Thermo Scientific)
- DTT (Sigma Aldrich)
- DNAza 1 (Thermo Scientific)
- Lizozym (Sigma Aldrich)
- ProLong Gold antifade mountant (Invitrogen)
- Jednorazowe polistyrenowe naczynia do hodowli tkankowych (BD)
- Tris-HCl, agaroz, etanol 99,8%, metanol, kwas octowy, kwas siarkowy (VI), TEMED, Triton X-100, Tween 20, Tween 80, błękit bromofenolowy, ksylenocjanol, glicyna, β -merkaptioetanol, bromek etydyny, akryloamid, N,N'-metylenobisakryloamid, SDS, EDTA, sacharoza (POCh)

8. Wyniki

8.1. Uzyskanie materiału wyjściowego do badań

8.1.1. Amplifikacja wirusowego materiału genetycznego pochodzącego od pacjentów oraz konstrukcja chimerycznego heterodimeru glikoprotein E1E2 dla każdej z próbek

Materiał wyjściowy do badań przedstawionych w tej pracy stanowiło 10 fragmentów DNA (produktów PCR) o długości 1166 nukleotydów kodujących całą sekwencję glikoproteiny E2, niewielki C-terminalny fragment sekwencji glikoproteiny E1 oraz N-terminalny fragment białka P7 wirusa zapalenia wątroby typu C (Rysunek 15). Matrycą wykorzystaną do uzyskania tych próbek w reakcji odwrotnej transkrypcji było całkowite genomowe RNA wyizolowane z surowicy krwi 10 dziecięcych pacjentów cierpiących na chroniczną postać zapalenia wątroby typu C (wszyscy zainfekowani wirusem genotypu 1a).



Rys. 15 Schemat genomu wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) z zaznaczonym rejonem podlegającym amplifikacji z wykorzystaniem jako matrycy materiału genetycznego wirusa HCV pozyskanego z krwi pacjentów. Namnażany rejon obejmuje pozycje 1425-2591 (nr GenBank NC_004102) i zawiera obszary względnie stabilne (E1) oraz hiperzmiennie (HVR1).

Dzieci zostały poddane terapii skojarzonej pegylowanym interferonem alfa 2b i rybawiryną zgodnie ze schematem opisanym przez Figlerowicz i współautorów (Figlerowicz i wsp., 2004) w Klinice Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu. Wybrane parametry kliniczne, biochemiczne i wirusologiczne charakteryzujące pacjentów oraz końcowy wynik odpowiedzi na terapię zostały przedstawione w Tabeli 3. Wyżej wymienione próbki otrzymałam w ramach współpracy naukowej od prof. Marka Figlerowicza z Instytutu Chemii Bioorganicznej Polskiej Akademii Nauk w Poznaniu. Na pozyskanie materiału od pacjentów i wykorzystanie

go do dalszych badań naukowych uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu (nr 712/02 z dnia 05.09.2002).

Numer pacjenta	Numer próbki	Wynik terapii	Wiek (lata)	Płeć	Początkowy poziom RNA (kopie/mL)	Początkowy poziom ALT (IU/L)	Początkowa obecność przeciwciał anti-HCV
P2-04	NR6	NR	13	M	11280000	315	+
P2-05	NR4	NR	11	Ż	2170000	53	-
P2-10	NR1	NR	11	M	2670000	45	-
P2-17	SR1	SR	8	M	56300000	19	+
P2-18	SR2	SR	15	Ż	696000	54	+
P2-19	NR5	NR	10	Ż	726000	35	+
P2-20	SR3	SR	15	Ż	152000	37	+
P2-23	NR2	NR	10	M	840000	63	+
P2-24	TR	TR	16	Ż	286000	28	+
P2-28	NR3	NR	14	Ż	365000	51	-

Tab. 3 Podstawowa charakterystyka pacjentów, od których pozyskano próbki – wybrane parametry kliniczne, biochemiczne i wirusologiczne. NR – brak odpowiedzi na terapię, SR – trwała odpowiedź na terapię, TR – przejściowa odpowiedź na terapię, M – płeć męska, Ż – płeć żeńska.

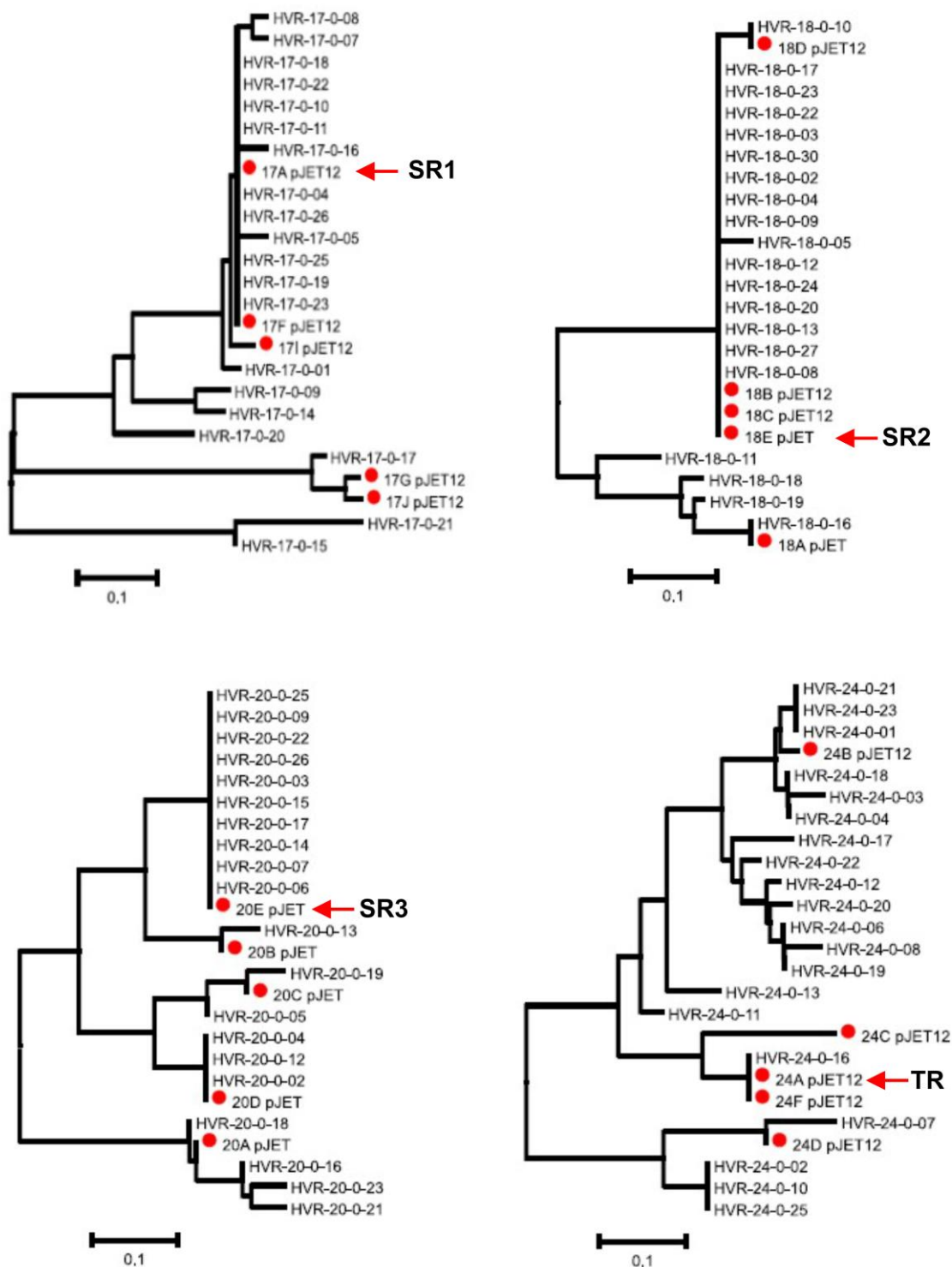
Pierwszym etapem pracy była amplifikacja 10 produktów PCR pochodzących od pacjentów, ich klonowanie oraz sekwencjonowanie w celu uzyskania sekwencji reprezentujących pseudotypy wirusowe, czyli tzw. quasispecies. DNA zostało powielone przy pomocy polimerazy DNA PWO (polimeraza WALK, A&A Biotechnology) z użyciem pary starterów analogicznych do oryginalnie używanych przez zespół Prof. Figlerowicza. Wykorzystane startery zostały zamieszczone w tabeli poniżej.

Nazwa startera	Sekwencja startera 5'-3'
E2W5_FOR	ATGAATTCTCCTGGTAGTGCTGCTGCTA
E2W3_REW	ATCTGCAGCAGGGATGCTGCATTGAGTA

Tab. 4 Lista starterów użytych w reakcji PCR służącej powieleniu wyjściowego materiału do badań.

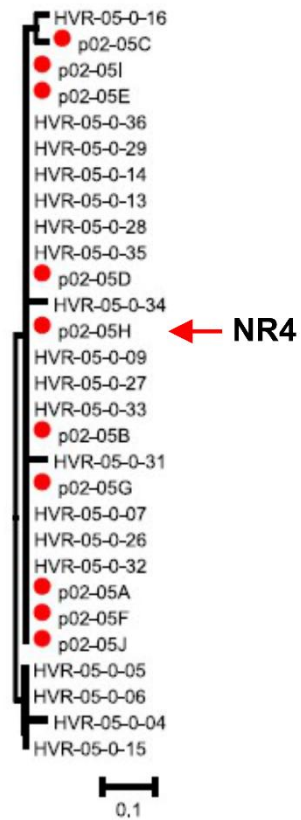
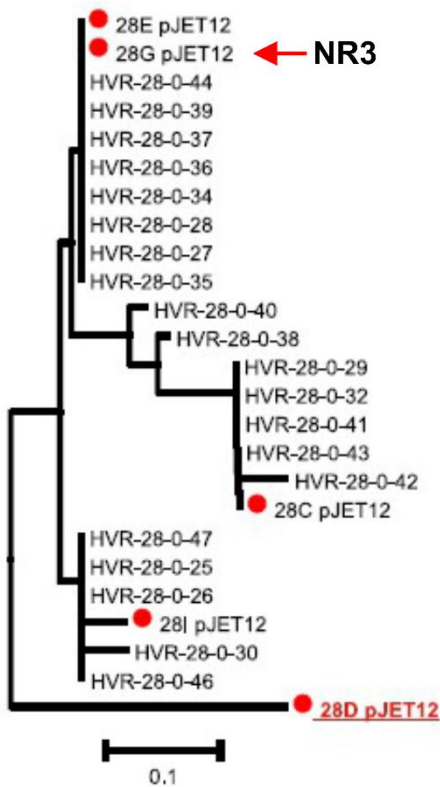
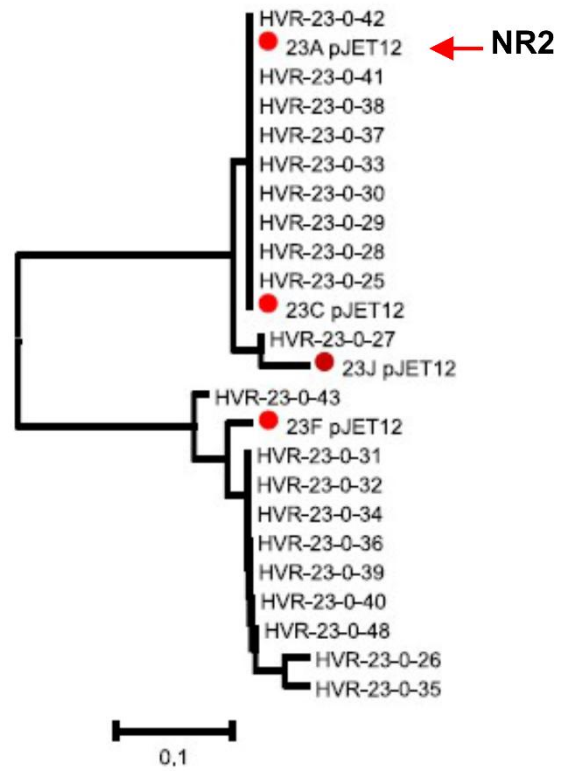
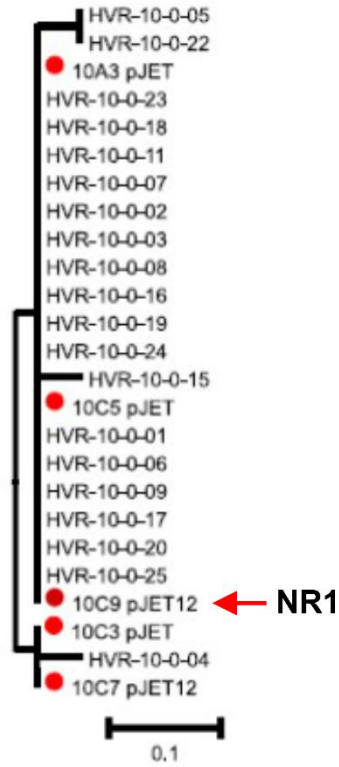
Produkty reakcji PCR zostały rozdzielone w 1% żelu agarozowym, prążki odpowiedniej wielkości zostały wycięte i oczyszczone przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Gel-Out Concentrator. Uzyskane próbki DNA zostały następnie wklonowane do wektora pJET1.2-blunt zgodnie z protokołem producenta. Transformacja komórek kompetentnych TOP10 E. coli każdym z 10 produktów ligacji umożliwiła otrzymanie serii klonów, z których każdy reprezentował jedną z sekwencji wirusowych quasispecies charakterystycznych dla danego pacjenta. Poprawność wszystkich konstruktów została zweryfikowana poprzez trawienie analityczne z wykorzystaniem enzymu restrykcyjnego BglII oraz sekwencjonowanie. Ostatecznie wybrano losowo 5 sekwencji pseudotypów wirusowych dla każdego z pacjentów, a uzyskane sekwencje DNA w formacie FASTA przesłano do dr hab. Pauliny Jackowiak pracującej w zespole prof. Marka Figlerowicza. Dr Jackowiak w swojej pracy doktorskiej wykonała analizę bioinformatyczną puli próbek DNA pochodzących od pacjentów cierpiących na przewlekłą postać zapalenia wątroby typu C (obejmującą również tych pacjentów, od których uzyskano próbki przekazane później do prowadzonych przeze mnie badań) określając częstotliwość występowania różnych sekwencji pierwszego rejonu hiperzmiennego (ang. hypervariable 1, HVR1) glikoproteiny E2 w badanej populacji quasispecies (Figlerowicz i wsp., 2010). Porównując otrzymane przeze mnie sekwencje pseudotypów wirusowych z bazą danych sekwencji rejonu HVR-1, którą dysponuje dr Jackowiak, wybrano po jednej sekwencji dla każdego z pacjentów tak, aby były one identyczne lub jak najbardziej zbliżone do tych, które w bazie danych pojawiają się najczęściej. Innymi słowy, zostały wytypowane sekwencje najbardziej charakterystyczne dla wszystkich pacjentów. Wyniki wyżej wymienionych analiz zostały przedstawione w formie drzew filogenetycznych (drzewa zostały przygotowane przez dr hab. Paulinę Jackowiak). Próbki pochodzące z bazy danych rejonu HVR-1 dr Jackowiak oznaczone są na drzewach jako „HVR-numer pacjenta”, natomiast nazwy sekwencji pseudo-typów wirusowych uzyskanych przeze mnie obejmują nr pacjenta (liczba oraz litera) i dodatkowo oznaczone są czerwoną kropką. W przypadku pacjentów, którzy trwale odpowiedzieli na terapię (sustained responders, SR) populacja quasispecies w każdym przypadku była zróżnicowana. Zgodnie z wnioskami opublikowanymi grupę prof. Figlerowicza (Figlerowicz i wsp., 2010) jest to związane z adaptacją pseudotypów wirusowych do nieustannie działającej presji selekcyjnej. W związku ze wspomnianą różnorodnością sekwencji w tej grupie, wybór próbki do dalszych badań nie był oczywisty. W porozumieniu z dr Jackowiak wybór padł na próby: 17A (SR1), 18E (SR2) oraz 20E (SR3), jako że zlokalizowane one były wzdłuż jednej linii pionowej na

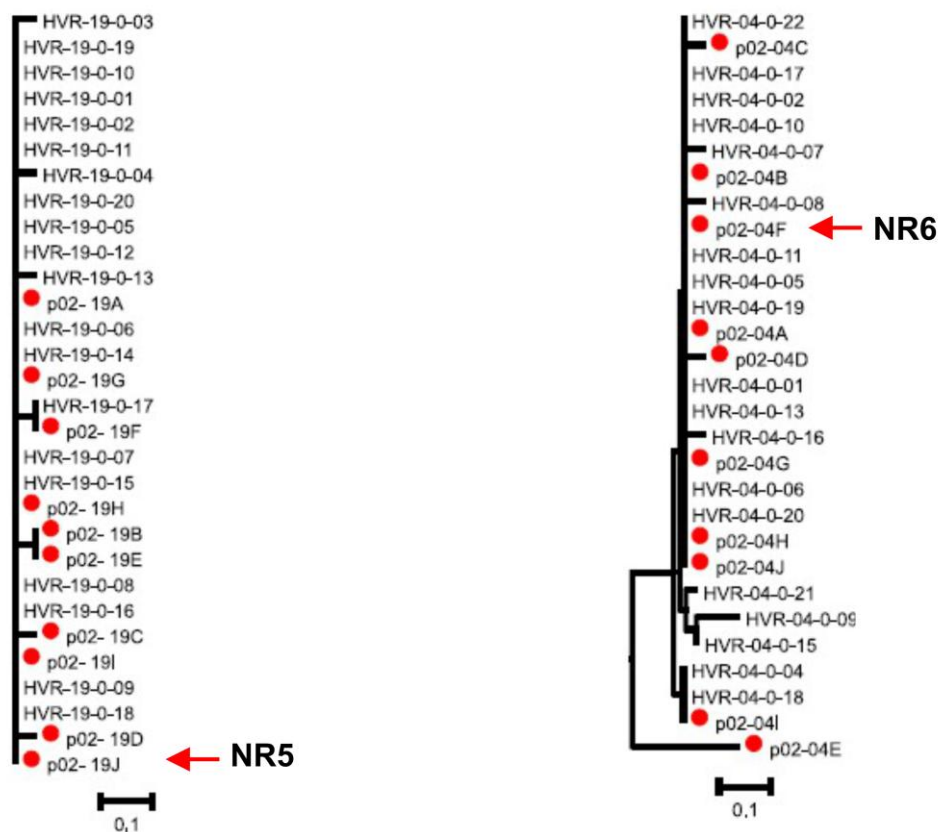
każdym z drzew filogenetycznych, a zatem były one identyczne w stosunku do większej grupy sekwencji dostępnych w bazie danych (Rysunek 16). Populacja wirusowych quasispecies pacjenta charakteryzującego się przejściową odpowiedzią na terapię skojarzoną (transient responder, TR) okazała się być jeszcze bardziej zróżnicowana niż u opisywanych wyżej pacjentów SR. Jedynie dwa klony (24A oraz 24F) posiadały sekwencję HVR1 występującą w analizowanej bazie danych i z tych dwóch losowo wybrano próbkę 24A (sekwencja klonu 24F była tożsama). Omawiane drzewo filogenetyczne przedstawiono na Rysunku 16.



Rys. 16 Analiza filogenetyczna – drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie regionu HVR1 glikoproteiny E2 dla populacji HCV występującej u pacjentów, którzy trwale/przejsiowo odpowiedzieli na terapię skojarzoną interferonem i rybawiryną. Czerwonymi kropkami zaznaczono sekwencje pseudo-typów wirusowych uzyskane poprzez amplifikację materiału wyjściowego

Co ciekawe, sytuacja w grupie pacjentów, którzy nie zareagowali na zastosowaną terapię (nonresponders, NR) wyglądała odmiennie. Wspomniane już wyniki uzyskane przez grupę prof. Marka Figlerowicza wskazywały, że ewolucja populacji quasispecies w grupie nonresponders jest silnie ograniczona, prawdopodobnie ze względu na konieczność zachowania określonych właściwości rejonu HVR1. W związku z tym faktem populacje pseudotypów wirusowych pochodzących od pacjentów NR są bardzo jednorodne, a zatem stworzone na ich podstawie drzewa filogenetyczne jedynie w niewielkim stopniu rozgałęzione (Rysunek 17). Wybór sekwencji charakterystycznej dla każdego z pacjentów nie stwarzał zatem trudności i zdecydowano się na następujące klony: 10C9 (NR1), 23A (NR2), 28G (NR3), 5H (NR4), 19J (NR5), 4F (NR6). Jedynie w przypadku pacjenta NR3 populacja quasispecies odbiegała nieco od pozostałych i wykazywała większą różnorodność. Tutaj podobnie, jak przy analizie próbek z grupy SR, zdecydowano się na wybór tej sekwencji, która była identyczna z jak największą liczbą sekwencji dostępnych w bazie danych. Warto także zwrócić uwagę, że wśród analizowanych sekwencji otrzymanych dla pacjenta NR3 znalazła się jedna posiadająca delecję (klon 28D) i została ona od razu odrzucona.

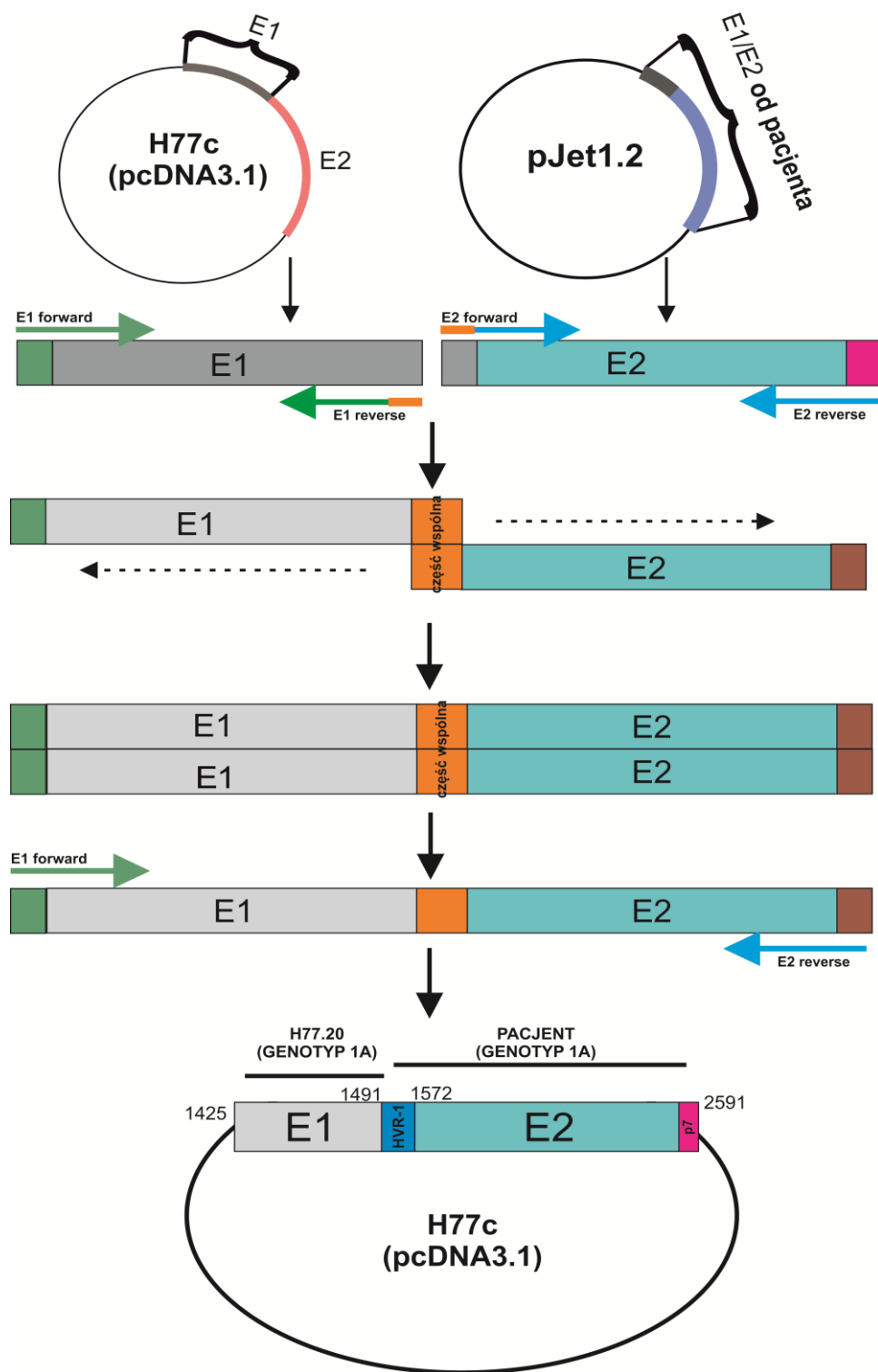




Rys. 17 Analiza filogenetyczna – drzewa filogenetyczne skonstruowane na podstawie rejonu HVR1 glikoproteiny E2 dla populacji HCV występującej u pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na terapię skojarzoną interferonem i rybawiryną. Czerwonymi kropkami zaznaczono sekwencje pseudo-typów wirusowych uzyskane poprzez amplifikację materiału wyjściowego

Utworzenie niekowalencyjnego heterodimeru przez glikoproteiny E1 i E2 jest jedynym sposobem na to, by białka osłonkowe wirusa HCV zachowały funkcjonalność. Z tego względu zdecydowano się na odtworzenie heterodimeru dla wszystkich badanych próbek pochodzących od pacjentów. Jednakże biorąc pod uwagę fakt, że pozyskane od pacjentów fragmenty DNA zaliczane były do próbek archiwalnych w momencie ich przekazania w nasze ręce i tym samym niemożliwym było uzyskanie oryginalnych sekwencji pełnej glikoproteiny E1, zdecydowano się na wykorzystanie referencyjnego szczepu laboratoryjnego H77c. Sekwencja glikoproteiny E1 charakteryzuje się stosunkowo niewielką zmiennością genetyczną, a sam szczep H77c należy do tego samego genotypu i subtypu co badane próbki (1a), dlatego też konstrukcja chimerycznego heterodimeru glikoprotein złożonego z części pochodzącej ze szczepu referencyjnego (część E1) oraz z części pozyskanej od pacjenta (fragment E1 oraz cała sekwencja E2) była uzasadniona. Proces rekonstrukcji heterodimeru dla każdej z próbek odbywał się trzyetapowo. Pierwszym krokiem

była amplifikacja sekwencji kodującej glikoproteinę E1 z wykorzystaniem referencyjnego szczepu laboratoryjnego H77c jako matrycy oraz amplifikacja sekwencji kodującej glikoproteinę E2 wraz z niewielkim fragmentem białka E1 na podstawie wklonowanego do wektora pJet1.2 fragmentu DNA pochodzącego od pacjenta. Produkty reakcji PCR zostały rozdzielone w 1% żelu agarozowym, a prążki odpowiedniej wielkości (ok 400 par zasad dla E1 i 1100 par zasad dla E1/E2) wycięte i oczyszczone przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Gel-Out Concentrator. Drugim krokiem było połączenie ze sobą otrzymanych fragmentów DNA za pomocą techniki „assembly” PCR. Proces ten podzielony był na dwa etapy. W pierwszym z nich produkty wcześniejszych reakcji PCR, posiadające wspólną część sekwencji (N-końcowy fragment sekwencji kodującej glikoproteinę E1), uległy hybrydyzacji, a następnie zostały wydłużone przez polimerazę bez wykorzystania starterów. Efektem tego działania było stworzenie chimerycznej sekwencji, która następnie została wykorzystana jako matryca. W drugim etapie do mieszaniny reakcyjnej dodano specyficzne startery i ponownie przeprowadzono reakcję PCR w odpowiednio dobranych warunkach. Całość produktu reakcji „assembly” PCR została rozdzielona w 1% żelu agarozowym, prążki o wielkości ok. 1500 par zasad zostały wycięte z żelu, a DNA oczyszczone przy pomocy komercyjnego zestawu odczynników Gel-Out Concentrator. We wszystkich opisanych powyżej reakcjach PCR wykorzystana została polimeraza DNA KOD, a także specyficzne startery zamieszczone w Tabeli 3. Ostatnim krokiem niezbędnym do uzyskania chimerycznego heterodimeru było wklonowanie ostatecznego produktu do plazmidu ekspresyjnego H77c (w pcDNA3.1). Zarówno produkty reakcji PCR, jak i wektor H77c poddano trawieniu enzymami restrykcyjnymi NotI oraz Bsp86I (NruI), a następnie poddano ligacji przy użyciu ligazy T4. Poprawność otrzymanych konstruktów została zweryfikowana przy pomocy trawienia analitycznego z wykorzystaniem tej samej pary enzymów restrykcyjnych, która została wspomniana powyżej oraz poprzez sekwencjonowanie. Schemat całego procesu przedstawiono na Rysunku 18, zaś listę starterów użytych w reakcji „assembly” PCR zestawiono w Tabeli 5.



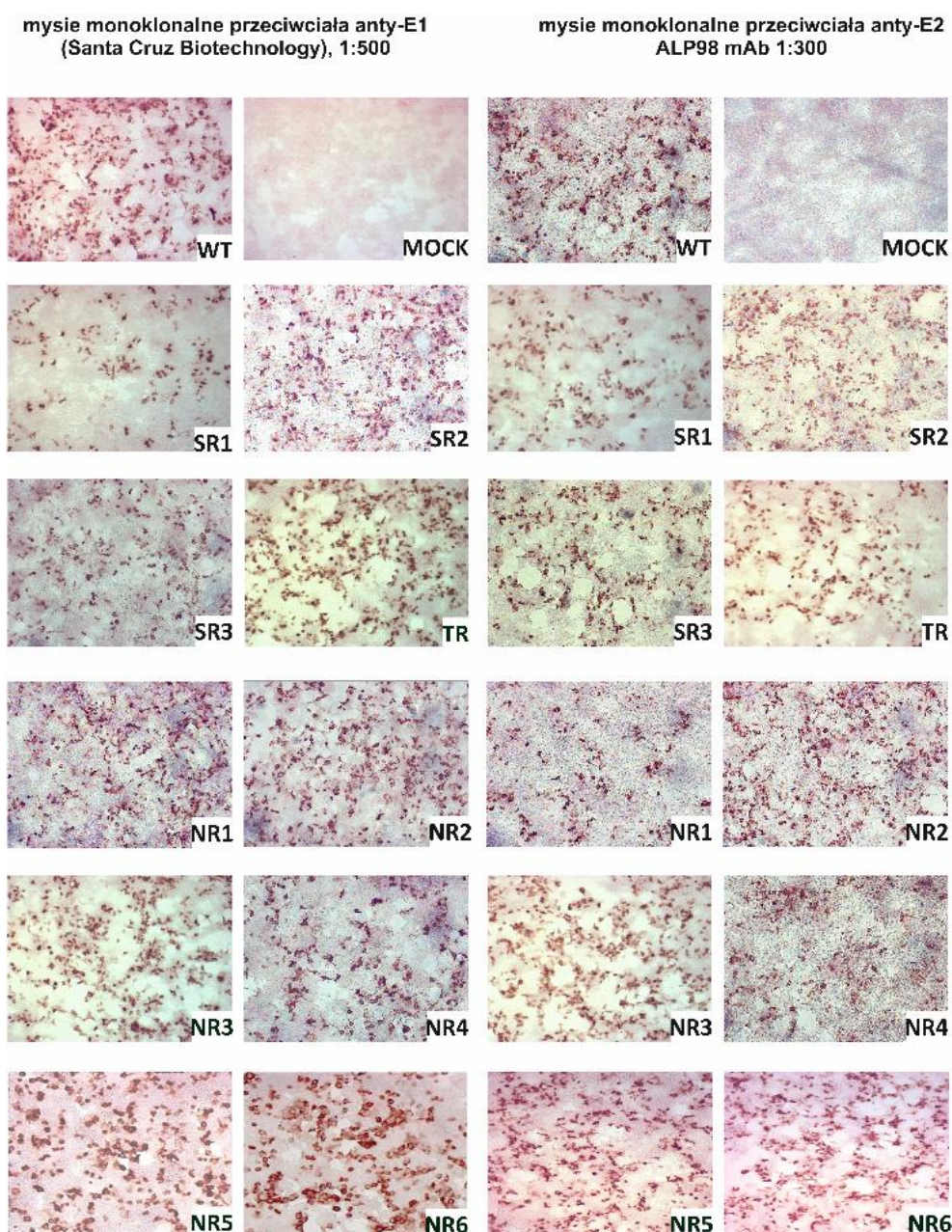
Rys. 18 Schemat uzyskania chimerycznego heterodimeru glikoprotein E1E2 przy pomocy reakcji łączącego PCR (ang. „Assembly” PCR).

Numer pacjenta	Numer próbki	E1 Starter Forward 5' -> 3'	E1 Starter Reverse 5' -> 3'	E2 Starter Forward 5' -> 3'	E2 Starter Reverse 5' -> 3'
P2-04	NR6	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	CTCGAGCGGCCGCCTTTTATGCCTCTGCTTGAGATAT GAG
P2-05	NR4	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	AAAAGCGGCCGCCTTTTACGCCTCCGCTTGGGATAT GAG
P2-10	NR1	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	AAAAGCGGCCGCCTTTTACGCCTCCGCTTGGGATAT GAG
P2-17	SR1	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	CTCGAGCGGCCGCCTTTTATGCCTCTGCTTGAGATAT GAG
P2-18	SR2	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	AAAAGCGGCCGCCTTTTATGCCTCTGCTCGAGATAT GAG
P2-19	NR5	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	AAAAGCGGCCGCCTTTTACGCCTCCGCTTGGGATAT GAG
P2-20	SR3	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	AAAAGCGGCCGCCTTTTACGCCTCCGCTTGGGATAT GAG
P2-23	NR2	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	CTCGAGCGGCCGCCTTTTATGCCTCTGCTTGAGATAT GAG
P2-24	TR	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	CTCGAGCGGCCGCCTTTTATGCCTCTGCTTGAGATAT GAG
P2-28	NR3	GTCCCTTGC GTTCGCGAGGGTAACG C	CCTTCGCCCAGT TCCCCACCATG GAG	TGGTGGGGAAC TGGGCGAAGGTCTGGTAGTGCTGC TGC	CTCGAGCGGCCGCCTTTTATGCCTCTGCTTGAGATAT GAG

Tab. 5 Lista starterów użytych w reakcji „assembly” PCR służącej uzyskaniu chimerycznego heterodimeru glikoprotein E1E2 dla każdej z próbek pochodzących od pacjentów.

8.1.2. Produkcja chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1E2 wirusa HCV w komórkach ssaczych.

Ostatnim krokiem mającym na celu weryfikację zrekonstruowanych sekwencji kodujących heterodimery glikoprotein była ich ekspresja w komórkach ssaczych linii HEK293 oraz immunocytochemiczne barwienie uzyskanych białek in situ. Komórki HEK293 zostały transfekowane przygotowanymi konstruktami z wykorzystaniem komercyjnego odczynnika do transfekcji Polyplus jetPRIME. Wszystkie użyte plazmidy ekspresyjne niosące sekwencje heterodimerów umożliwiły syntezę obu białek (widoczną w postaci czerwono-zabarwionych komórek), a zatem poprawność ich wykonania została potwierdzona (Rysunek 19).

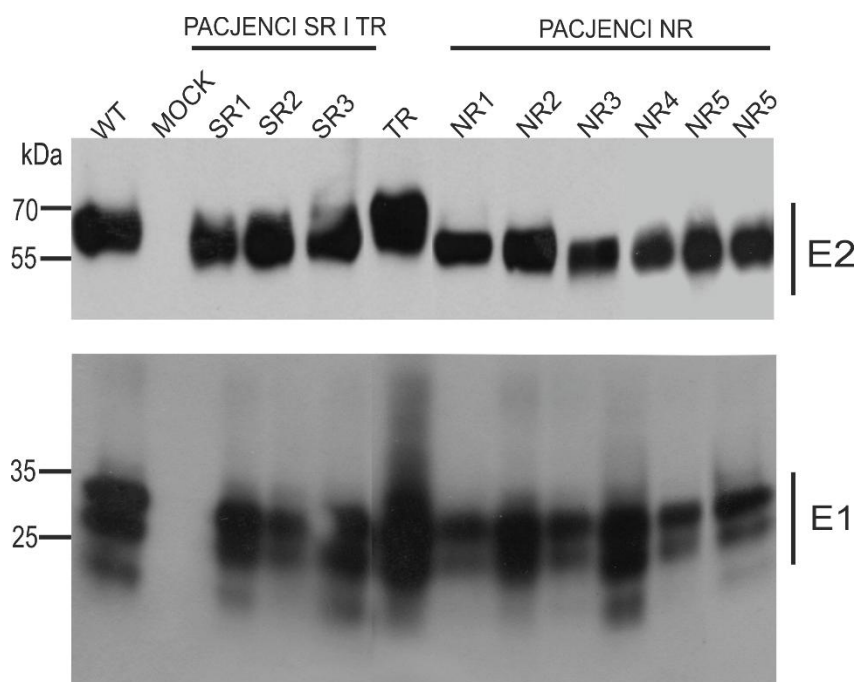


Rys. 19 Detekcja glikoprotein E1 oraz E2 w transfekowanych komórkach HEK293. Komórki 48 godzin po transfekcji utrwalono na płycie przy użyciu 4% roztworu paraformaldehydu, a następnie glikoproteiny wykrywano z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych anti-E1 (1:500) i anti-E2 (1:300). Kolor czerwony oznacza detekcję odpowiedniego białka. WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – komórki HEK293 transfekowane mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna.

8.2. Analiza strukturalna glikoprotein E1E2 wirusa HCV, zawierających warianty genetyczne glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów

8.2.1. Analiza masy cząsteczkowej uzyskanych glikoprotein wirusa HCV

W celu weryfikacji podstawowych właściwości biochemicznych glikoprotein tworzących chimeryczne heterodimery przeprowadzono elektroforezę poliakryloamidową w warunkach redukujących oraz analizę typu Western Blotting. W żelu poliakryloamidowym o właściwej procentowości (odpowiednio 12% i 10% dla białek E1 oraz E2) rozdzielono lizaty komórek transfekowanych konstruktami kodującymi badane heterodimery glikoprotein wirusa HCV. Za każdym razem stosowano 5% poliakryloamidowy żel zagęszczający. Po zakończonym rozdziale białka zostały przeniesione na błonę PVDF (transfer mokry białek), a następnie przeprowadzono Western Blotting z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał pierwszorzędowych. We wszystkich konstruktach obie glikoproteiny wirusowe zostały prawidłowo rozpoznane przez użyte przeciwciała. W przypadku glikoproteiny E1 analiza Western Blotting nie tylko potwierdziła prawidłową masę cząsteczkową (30-35 kDa), ale także uwidoczniała obecność trzech glikoform badanego białka (Rysunek 20). Występowanie białka E1 o różnym stopniu N-glikozylacji jest zgodne z dostępnymi danymi literaturowymi (Dubuisson i wsp., 2000, Haddad i wsp., 2017). W przeciwieństwie do wyników otrzymanych dla glikoproteiny E1, dane uzyskane po analizie białka E2 nie były identyczne dla każdego z badanych konstruktów. Warianty glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na terapię anty-HCV migrowały szybciej w żelu poliakryloamidowym, co wskazywało na niższą masę cząsteczkową niż oczekiwane 62 kDa (Rysunek 20). Możliwym wyjaśnieniem tego stanu rzeczy mogły być zmiany we wzorze N-glikozylacji tych białek.

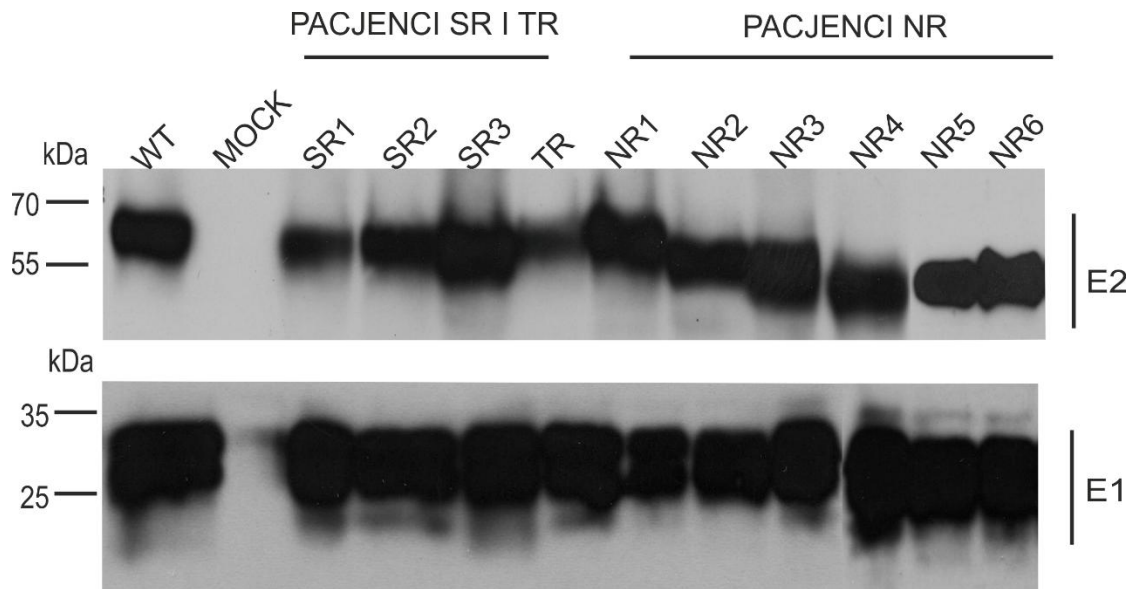


Rys. 20 Analiza masy cząsteczkowej uzyskanych glikoprotein wirusa zapalenia wątroby typu C – elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach redukujących oraz detekcja glikoprotein E1 oraz E2 w lizatach komórkowych. Lizaty komórkowe wykonane 48 godzin po transfekcji rozdzielono w 10% (E2) lub 12% (E1) żelu poliakrylamidowym, a następnie glikoproteiny wykrywano z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych anti-E1 (1:2000) oraz anti-E2 (1:500). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna

8.2.2. Analiza formowania heterodimeru glikoprotein E1E2

Jak zostało już wcześniej wspomniane, glikoproteiny osłonkowe wirusa zapalenia wątroby typu C zachowują swoje funkcje tylko wtedy, gdy tworzą tzw. niekowalencyjny heterodimer. W celu sprawdzenia, czy w analizowanych konstrukcjach proces heterodimeryzacji nie został zaburzony wykonano immunoprecypitację. Komercyjne poliklonalne przeciwciała skierowane przeciwko glikoproteinie E2 zostało użyte do wyodrębnienia kompleksów glikoprotein E1E2 z lizatów transfekowanych komórek HEK293. Kompleksy te zostały następnie poddane elektroforezie SDS-PAGE w warunkach redukujących oraz analizie typu Western Blotting. Uzyskane wyniki były zgodne z oczekiwaniami – „wychwycone” kompleksy białek pod wpływem działania β -merkaptoetanolu zostały rozdzielone na 2 niezależne glikoproteiny, które dało się wykryć przy pomocy specyficznych przeciwciał monoklonalnych anti-E1 oraz anti-E2 (Rysunek 21).

Kontrola negatywna nie dała żadnego sygnału, co potwierdza, że eksperyment został przeprowadzony prawidłowo. Podsumowując, połączenie w formę chimerycznych kompleksów glikoprotein E1 (z laboratoryjnego szczepu referencyjnego H77c) oraz E2 (pochodzące od pacjentów) nie zaburzyło procesu heterodimeryzacji tych białek.



Rys. 21 Badanie zdolności glikoprotein E1E2 do tworzenia heterodimerów za pomocą immunoprecypitacji – elektroforeza poliakrylamidowa w warunkach redukujących oraz detekcja glikoprotein E1 oraz E2 w lizatach komórkowych. Lizaty komórkowe wykonane 48 godzin po transfekcji rozdzielono w 10% (E2) lub 12% (E1) żelu poliakrylamidowym, a następnie glikoproteiny wykrywano z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych anty-E1 (1:2000) oraz anty-E2 (1:500). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna.

8.2.3. Analiza stanu N-glikozylacji wariantów glikoproteiny E2

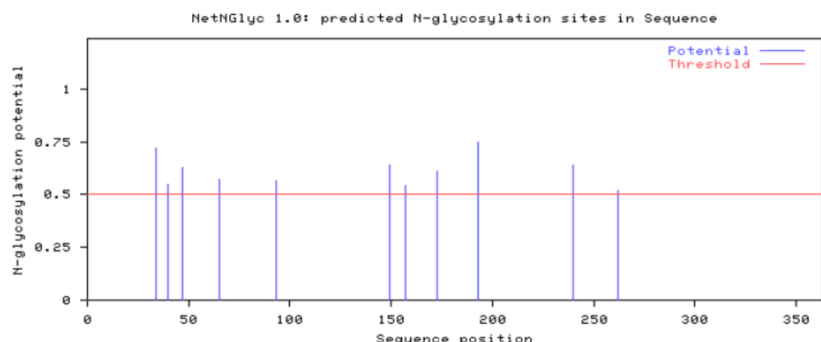
Wyniki zaprezentowane w podrozdziale 8.2.1 wskazują, że warianty glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów z grupy „non responders” charakteryzowały się niższą masą cząsteczkową w porównaniu do próbek z pozostałych grup pacjentów („sustained responders” oraz „transient responder”). Wyjaśnienia tej sytuacji można doszukiwać się w zmienionym wzorze N-glikozylacji tych białek. Aby zweryfikować tę możliwość wykorzystano oprogramowanie Geneious do wykonania translacji *in silico* posiadanych sekwencji wszystkich wariantów glikoproteiny E2 pochodzących od pacjentów, a następnie za pomocą programu Net-N-Glyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) sprawdzono ich stan

glikozylacji. Serwer Net-N-Glyc umożliwia przewidywanie występowania reszt cukrowych w miejscach N-glikozylacji wykorzystując sztuczne sieci neuronowe (ang. Neural networks) do rozpoznawania w analizowanej sekwencji charakterystycznego dla procesu N-glikozylacji wzoru aminokwasowego Asn-X-Ser/Thr (gdzie X może być dowolnym aminokwasem z wyjątkiem proliny). Dzięki Net-N-Glyc można także łatwo odnaleźć mutacje w tej konsensusowej sekwencji blokujące przyłączanie się glikanów. Otrzymane wyniki potwierdziły występowanie zmian we wzorze N-glikozylacji w sekwencjach wyłącznie tych wariantów glikoproteiny E2, które pochodziły od pacjentów nieodpowiadających na terapię. Na załączonym poniżej Rysunku 22 przedstawiono przykładowe wyniki analizy sekwencji wariantów glikoproteiny E2 pochodzących ze wszystkich trzech grup pacjentów (po jednym wyniku dla każdej z grup). W każdym przypadku kolorem czerwonym zaznaczono aminokwas asparaginę (N), zaś kolorem niebieskim pozostałe dwa aminokwasy tworzące wzór N-glikozylacji.

SR2

```

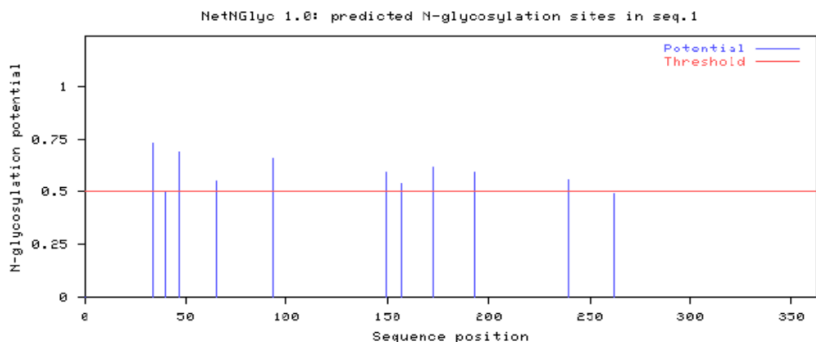
ETTISGGVTARGETASLVNFFSPGSPQNIQLINTNGSWHINRTASNCSNDSLNTGWVAGLLYNNRFNSSGCPERLASCRSLT      80
YFDQGWGPISYANESGSDQRPYCWHPFRPCGIVRAKDVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYNWGANETDVFVLLNNTNR      160
PPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGAGNKTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCMVHYFYRLWHYPCTIN      240
YTFKVRMYVGGVEHRLDAACNWTGERCDLEDRDRSELSPLLSTQWQVLPSCFTTLPALSTGLIHLHQNTVDVQYLY      320
GVGSSIASWAIKWYVLLFLLLADARVCSCLWMMFLISRAEA
    
```



TR

```

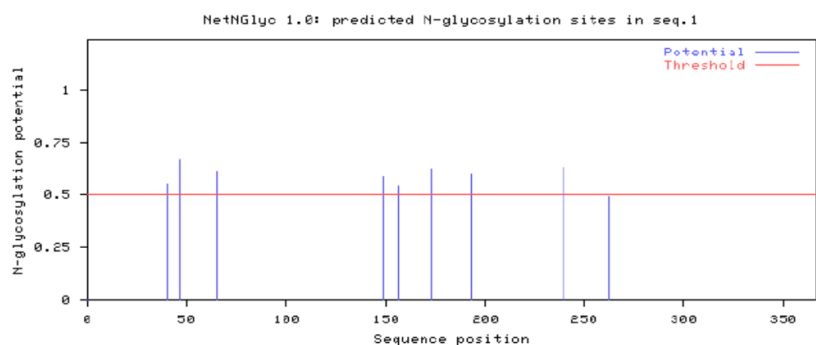
ETHVTGGASAGHATAGFTSLFSSGPKQNIQLINTNGSWHINRTALNCNDSLQGTGWVAGLFYHNRFNSSGCPERLASCRSLT      80
DFDQGWGPISYANGSGDQRPYCWHPFRPCGIVPAKNVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGAPTYSWGENDTDVFVLLNNTNR      160
PPLGNWFGCTWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGAGNKTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCLVDYPYRLWHYPCTIN      240
YTFKVRMYVGGVEHRLDAACNWTGERCDLEDRDRSELSPLLSTQWQVLPSCFTTLPALSTGLIHLHQNTVDVQYLY      320
GVGSSIASWAIKWYVLLFLLLADARVCSCLWMMFLISRAEA
    
```



NR3

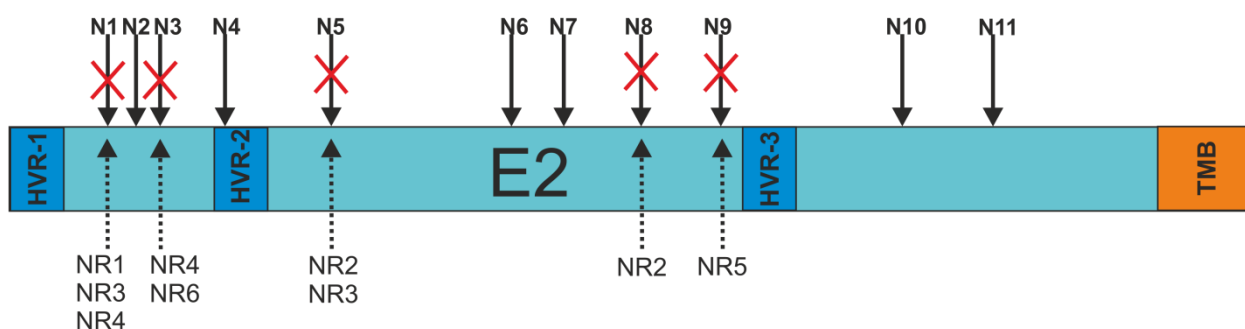
```

RTHVTGGDVAQTTARVASFFALGPKQNIQLVNTNGRWHINRTALNCNDSLNTGWVGLFHYSKFNSSGCPERLASCRSLT      80
DFDQGWGPISYADGSGDQRPYCWHPFRPCGIVPAKDVCGPVYCFTPSPVVVGTDRSGTPTYSWGENDTDVFVLLNNTNR      160
PPLGNWFGCAWMNSTGFTKVCGAPPCVIGGAGNKTLLCPTDCFRKHPEATYSRCGSGPWITPRCLVDYPYRLWHYPCTIN      240
YTRFKVRMYVGGVEHRLDAACNWTGERCDLEDRDRSELSPLLSTQWQVLPSCFTTLPALSTGLIHLHQNTVDVQYLY      320
GVGSSIASWAIKWYVLLFLLLADARVCSCLWMMFLISRQAEAAA
    
```



Rys. 22 Analiza stanu N-glikozylacji wariantów glikoproteiny E2 pochodzących od pacjentów przy użyciu serwera Net-N-Glyc 1.0 – wyniki uzyskane dla wybranych, przykładowych sekwencji pochodzących ze wszystkich trzech badanych grup pacjentów. Kolor czerwony – asparagina (N), kolor niebieski – pozostałe aminokwasy tworzące wzór N-glikozylacji.

Każda z sekwencji E2 pochodząca z grupy NR charakteryzowała się mutacjami powodującymi stratę przynajmniej jednego miejsca N-glikozylacji. Należy także zwrócić uwagę na fakt, że niektóre z miejsc N-glikozylacji ulegały delecji u więcej niż jednego pacjenta. Podsumowanie otrzymanych wyników znajduje się na Rysunku 23 oraz w Tabeli 6.



Rys. 23 Schemat glikoproteiny E2 zapalenia wątroby typu C (HCV) z zaznaczonymi miejscami N-glikozylacji. Czerwone krzyżyki wskazują zmiany w sekwencji białka prowadzące do utraty danego miejsca N-glikozylacji u pacjentów z grupy nieodpowiadającej na terapię anty-HCV (NR). N1-N11 - kolejne miejsca N-glikozylacji, HVR1,2,3 - rejony hipermienne, TMB - domena przezbłonowa

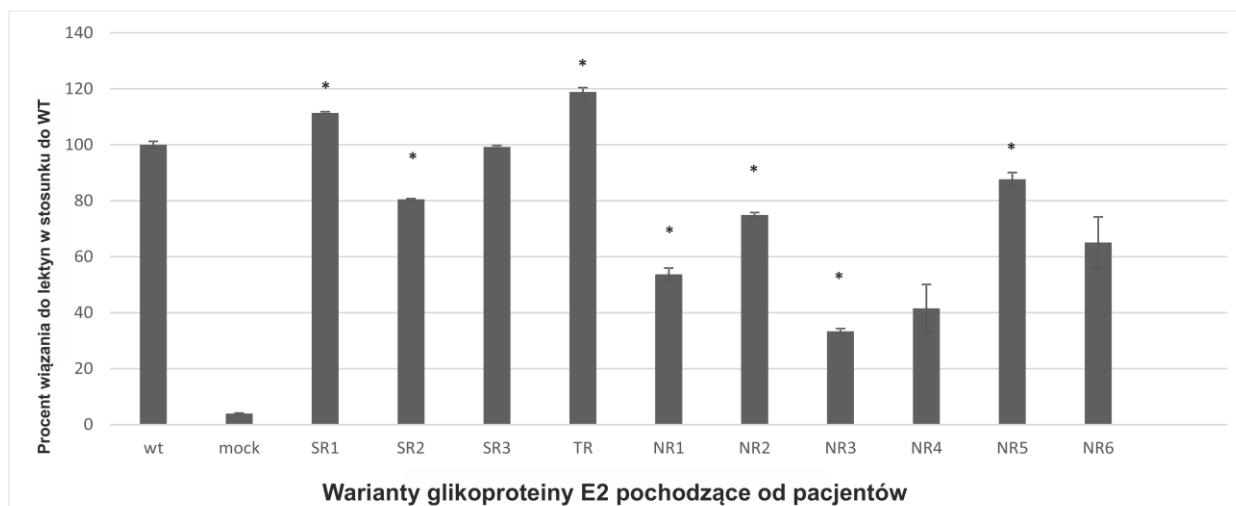
Numer próbki	Brakujące miejsce N-glikozylacji (numer aminokwasu)	Sekwencja konsensusowa miejsca N-glikozylacji typu dzikiego	Sekwencja mutacji w miejscu N-glikozylacji
NR1	N1 (AA417)	Asn-Gly-Ser	Asn-Gly-Asn
NR2	N5 (AA476)	Asn-Gly-Ser	Asn-Gly-Arg
	N8 (AA556)	Asn-Ser-Thr	SST
NR3	N1 (AA417)	Asn-Gly-Ser	NGN
	N5 (AA476)	Asn-Gly-Ser	DGS
NR4	N1 (AA417)	Asn-Gly-Ser	NGR
	N3 (AA430)	Asn-Asp-Ser	DDS
NR5	N9 (AA576)	Asn-Asn-Thr	NNA
NR6	N3 (AA430)	Asn-Asp-Ser	DDS

Tab. 6 Lista zmian sekwencji w obrębie wzoru charakterystycznego dla występowania miejsc N-glikozylacji Asn-X-Ser/Thr – mutacje skutkujące utratą glikanów. NR – brak odpowiedzi na terapię, SR – trwała odpowiedź na terapię, TR – przejściowa odpowiedź na terapię, AA - aminokwas, N1-N9 miejsca N-glikozylacji 1-9.

8.3. Analiza funkcjonalna zrekonstruowanych heterodimerów glikoprotein, niosących zmienione genetycznie warianty glikoproteiny E2

8.3.1. Badanie stopnia wiązania się różnych wariantów glikoproteiny E2 do lektyn pochodzących z *Galanthus nivalis*

Aby potwierdzić zmiany w poziomie glikozylacji poszczególnych wariantów glikoproteiny E2, postanowiono określić siłę wiązania tych białek do lektyn w teście GNA-capture ELISA. Aglutynina GNA (*Galanthus nivalis*), otrzymywana z przebiśniegu, jest członkiem rodziny białek wiążących glikany, które specyficznie rozpoznają i wiążą różne glikoproteiny wirusowe (Kaku i Goldstein, 1989). Na płytce 96-dółkowej opłaszczoną uprzednio roztworem lektyny GNA, nałożono lizaty komórek transfekowanych plazmidami kodującymi zarówno dziki, jak i chimeryczne heterodimery glikoprotein E1E2. Detekcja powstałych kompleksów możliwa była przy zastosowaniu specyficznych monoklonalnych przeciwciał anti-E2 (ALP98) oraz wywołaniu reakcji barwnej. Doświadczenie wykonywano trzykrotnie, za każdym razem wykorzystując seryjne rozcieńczenia wykorzystywanych lizatów komórkowych (dane nie zostały pokazane w niniejszej pracy). Otrzymane wyniki, będące uśrednieniem trzech niezależnych eksperymentów, jasno pokazują, że te warianty glikoproteiny E2, które pochodziły od pacjentów charakteryzujących się brakiem odpowiedzi na terapię anti-HCV i u których w analizach Net-N-Glyc wykazano zmiany we wzorze N-glikozylacji, zdecydowanie gorzej wiązane są przez lektynę GNA. Zależność tę najłatwiej można zauważyć w przypadku próbek NR1, NR3 oraz NR4 – sygnał pochodzący od tych wariantów glikoproteiny E2 osiągnął mniej niż 50% wartości reprezentowanej przez glikoproteinę E2 typu dzikiego. Podsumowując, powyższe obserwacje potwierdzają, że we wszystkich próbkach wywodzących się od pacjentów z grupy NR proces N-glikozylacji był niekompletny (Rysunek 24).

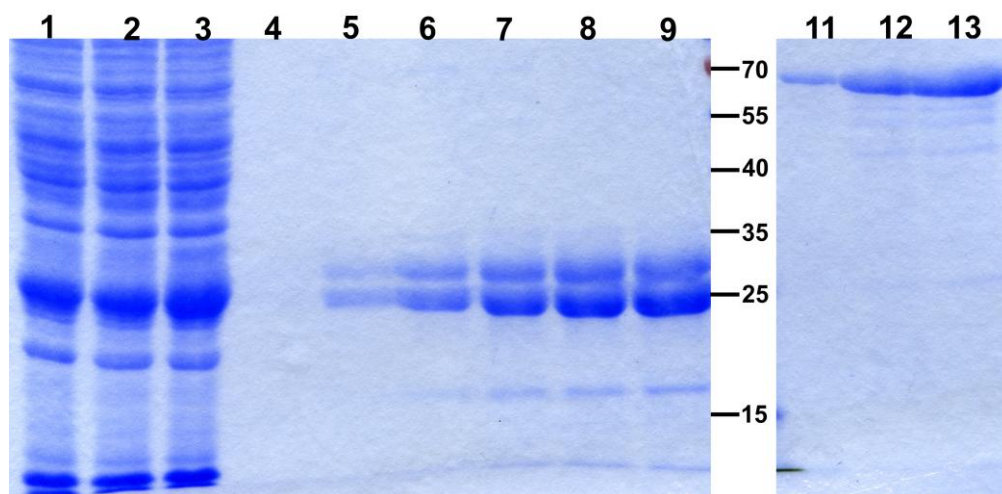


Rys. 24 Analiza stopnia wiązania wariantów glikoproteiny E2 do lektyn GNA. Lizaty komórkowe wykonane 48 godzin po transfekcji, dodano do dołków płytki 96-dółkowej uprzednio opłaszczonych roztworem lektyn GNA. Związane glikoproteiny wykrywano z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych anti-E2 ALP98 (1:500). Wynik, będący średnią trzech niezależnych eksperymentów, przedstawiono jako procent przyłączenia glikoprotein do lektyn w odniesieniu do szczepu kontrolnego H77C = 100% (* $P < 0,01$). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna

8.3.2. Badanie stopnia powinowactwa wariantów genetycznych glikoproteinę E2 do receptora komórkowego CD81

Receptor CD81 to białko należące do rodziny tetraspanin – posiada ono łącznie cztery domeny transbłonowe: dwa krótkie końce cytoplazmatyczne, jedną krótką pętlę cytoplazmatyczną oraz dwie domeny zewnątrzkomórkowe, zwane małą pętlą zewnątrzkomórkową (ang. Small Extracellular Loop, SEL) i dużą pętlą zewnątrzkomórkową (ang. Large Extracellular Loop, LEL) (Banse i wsp., 2018). Aby móc dokonać oceny stopnia wiązania się wariantów genetycznych glikoproteiny E2 do receptora komórkowego CD81, konieczne było uprzednie przygotowanie preparatu zawierającego dużą zewnątrzkomórkową pętlę wspomnianego receptora. CD81-LEL została nadprodukowana w postaci białka rekombinowanego, połączonego z transferazą S-glutationową (CD81-LEL-GST), w komórkach bakteryjnych *E. coli* szczepu BL21. Przyłączenie fragmentu receptora do białka fuzyjnego GST znacząco upraszcza procedury oczyszczania za pomocą chromatografii powinowactwa. Na potrzeby analiz opisywanych w niniejszej pracy, oczyszczanie dużej pętli

zewnątrzkomórkowej białka CD81 przeprowadzono na złożu sefarozowym z immobilizowanym glutationem. Poszczególne frakcje zebrane w czasie całej procedury poddano elektroforezie w żelu poliakryloamidowym w warunkach redukujących, a następnie żel zabarwiono z wykorzystaniem roztworu barwnika Coomassie Brilliant Blue R-250 (Rysunek 25). Na podstawie uzyskanego wyniku zdecydowano o połączeniu frakcji 6-9 jako posiadających zbliżone ilości białka fuzyjnego. Całość materiału poddano dializie w buforze Tris-HCl o zmiennym pH. Gotowy preparat poddano rozdzałowi w żelu poliakryloamidowym, a następnie detekcji metodą Western Blotting z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał anty-CD81 w celu potwierdzenia obecności oczekiwanego fragmentu receptora CD81 w badanej próbce (wyniki niezaprezentowane w niniejszej pracy). Stężenie oczyszczonego białka fuzyjnego CD81-LEL-GST oceniono na 0,5 mg/ml.



Rys. 25 Analiza preparatów białkowych otrzymanych po oczyszczaniu na złożu sefarozowym z immobilizowanym glutationem – elektroforeza poliakryloamidowa w warunkach redukujących (10% żel rozdzielający) próbek pochodzących z kolejnych etapów oczyszczania białka fuzyjnego GST-CD81-LEL. Barwienie żelu przy pomocy roztworu Coomassie Brilliant Blue R-250, wszystkie próbki w końcowej objętości 30 µl.

1 – lizat komórkowy (10 µl)

2,3 – frakcje białek niezwiązanych (10 µl)

4 – frakcja po płukaniu białek niespecyficznie związanych (10 µl)

5 – 9 – próbki z kolejnych frakcji elucyjnych (po 25µl)

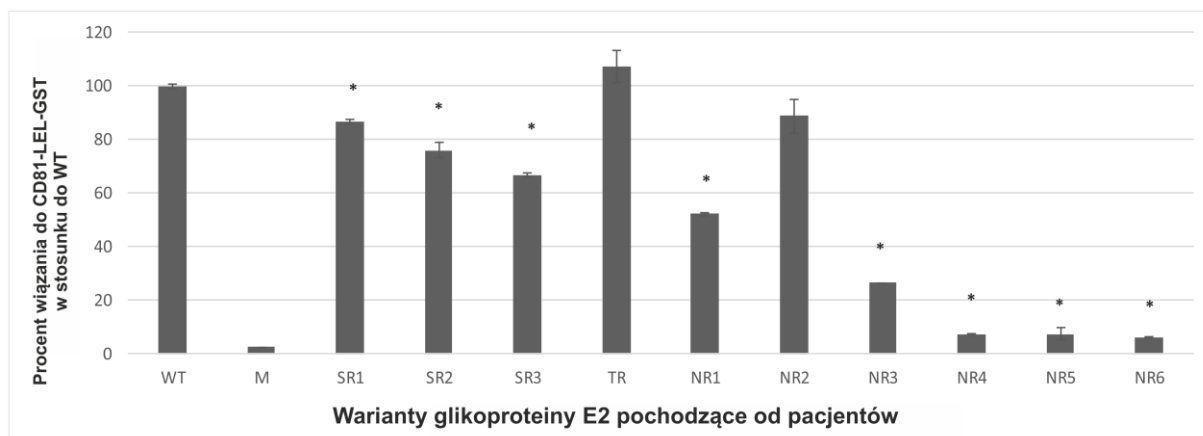
11 – BSA (100 µg/ml)

12 – BSA (500 µg/ml)

13 – BSA (1000 µg/ml)

GST - transferazą S-glutationowa, BSA – surowicza albumina wołowa,

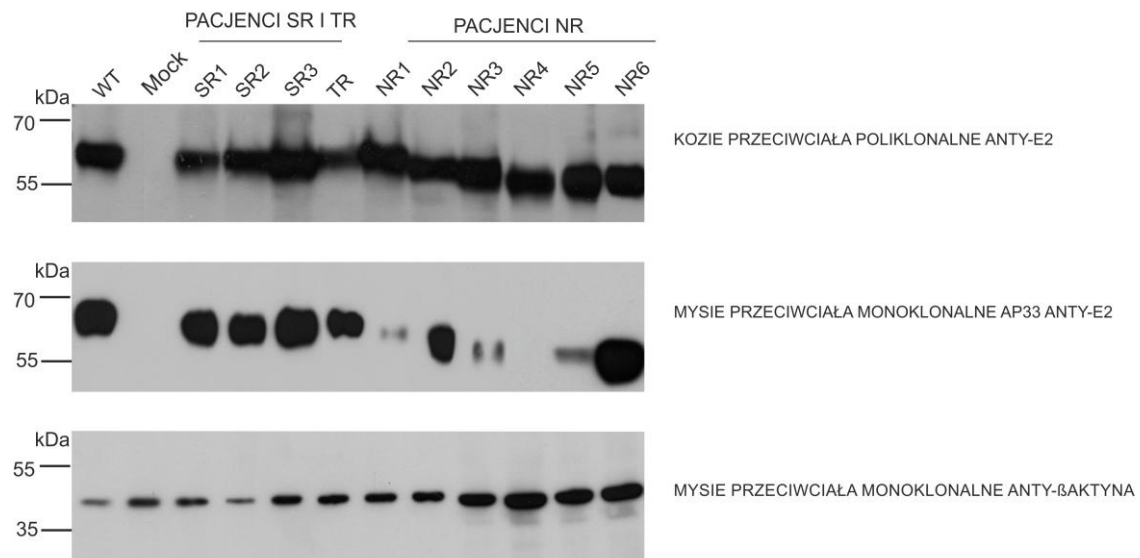
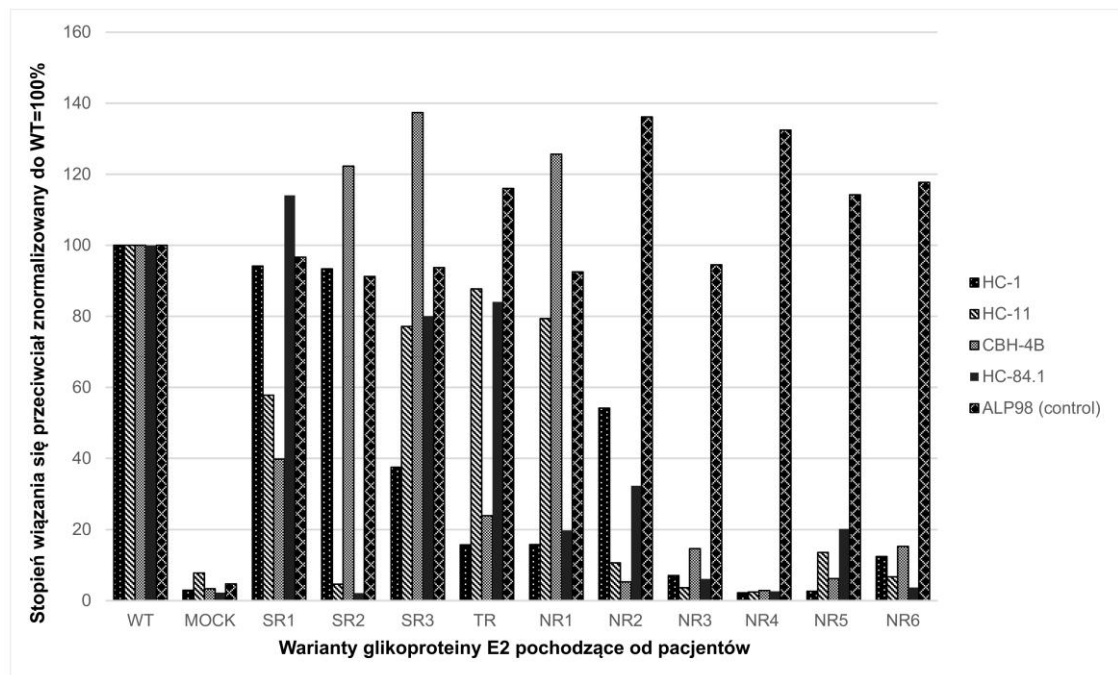
Badania stopnia wiązania wariantów genetycznych glikoproteiny E2 do receptora komórkowego CD81 dokonano przy pomocy testu ELISA. GST-CD81-LEL związany z powierzchnią studzienek płytki 96-dołkowej został wykorzystany do wiązania białek E1E2 pochodzących z lizatów komórkowych. Jako kontrolę negatywną zastosowano lizaty komórek transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA. Uzyskane wyniki wskazują, że chimeryczne heterodimery E1E2 były zdolne do wiązania rekombinowanego CD81-LEL z różną wydajnością. W pięciu z sześciu próbek pochodzących z grupy NR można zaobserwować znacznie niższą siłę wiązania niż w przypadku typu dzikiego (kontroli pozytywnej) oraz próbek należących do grup z SR i TR (Rysunek 26). Powyższe dane mogą sugerować, że zmiany we wzorze N-glikozylacji E2, występujące wyłącznie u pacjentów z grupy NR, mogą mieć wpływ na funkcjonowanie glikoproteiny E2, zwłaszcza na jej wiązanie z receptorem CD81. Jedną z hipotez, która mogłaby stanowić wyjaśnienie tego zjawiska, jest występowanie zmian w konformacji białka E2 spowodowanych utratą miejsc N-glikozylacji. Inne ułożenie przestrzenne glikoprotein, a nie zniszczenie sekwencji motywu będącego miejscem wiązania glikoproteiny E2 z receptorem CD81, może przyczynić się do osłabienia siły wiązania się ze sobą tych dwóch białek.



Rys. 26 Analiza siły wiązania chimerycznych heterodimerów E1E2 z receptorem CD81. Do wychwytywania heterodimerów glikoproteiny WT i chimerycznych E1E2 z lizatów przejściowo transfekowanych komórek HEK 293T zastosowano białko fuzyjne sprzężone z transferazą S-glutationową CD81-LEL-GST. Kompleksy CD81-E2 wykrywano za pomocą przeciwciał monoklonalnych ALP98 (1:500). Wynik, będący średnią trzech niezależnych eksperymentów, przedstawiono jako procent przyłączenia glikoprotein do receptora w odniesieniu do szczepu kontrolnego H77c = 100% (* $P < 0,01$). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna

8.3.3. Analiza poprawności faldowania białek – Western Blotting i ELISA z wykorzystaniem panelu przeciwciał konformacyjnych

Choć dostępne dane literaturowe pokazują, że mutacje w E2 wpływające na stan glikozylacji białka mogą prowadzić do zmniejszenia skuteczności neutralizujących przeciwciał HCV (Pantua i wsp., 2013) mechanizm ten nie został w pełni poznany. Przeciwciało monoklonalne AP33, uzyskane przez zespół prof. Arvinda Patela na Uniwersytecie w Glasgow, jest szeroko stosowane w wielu pracowniach badawczych ze względu na bardzo silne właściwości neutralizujące (Desombere i wsp., 2016). Jego unikalną cechą jest zdolność do szerokiego działania neutralizującego, poprzez krzyżowe rozpoznawanie glikoprotein pochodzących z różnych izolatów HCV. Częściowo konformacyjnym epitopem dla tego przeciwciała jest rejon 412-423 w sekwencji glikoproteiny E2, w obrębie którego znajdują się aż dwa miejsca N-glikozylacji (E2N1, E2N2). Rejon ten jest jednym z głównych celów branych pod uwagę przy projektowaniu szczepionek (Owsianka i wsp., 2005). Analiza western blotting z wykorzystaniem przeciwciał AP33 wykazała, że wszystkie warianty glikoproteiny E2 posiadające mutacje w pierwszym miejscu N-glikozylacji (miejsce N1) były zdecydowanie słabiej rozpoznawane przez to przeciwciało niż pozostałe próbki. Co więcej, wariant glikoproteiny E2 pozbawiona miejsc glikozylacji N1 i N3 (próbka NR4) nie została w ogóle wykryta przez to przeciwciało (Rysunek 27A). W celu zbadania potencjalnego wpływu zmian we wzorze glikozylacji E2 na lokalną konformację białka, a tym samym na rozpoznawanie przez wrażliwe na konformację przeciwciała neutralizujące, przeprowadzono test ELISA. Warianty E2 pochodzące od dziesięciu pacjentów poddano analizie za pomocą panelu czterech ludzkich przeciwciał rozpoznających konformacyjne epitopy (HC-1, HC-11, CBH-4B, HC84.1). Epitopy te zlokalizowane są w 4 z 5 domen antygenowych w obrębie sekwencji E2. Wszystkie przeciwciała posiadają zdolność do krzyżowego rozpoznawania białka E2 oraz szerokiej neutralizacji wirusów różnych genotypów (genotypy 1-6). Uzyskane wyniki wykazały, że próbki E2 pochodzące wyłącznie od pacjentów nieodpowiadających na terapię i posiadające mutacje we wzorze N-glikozylacji były zdecydowanie gorzej rozpoznawane przez wszystkie wykorzystane przeciwciała (Rysunek 27B), co wskazuje na możliwą zmianę lokalnej konformacji glikoproteiny E2. Daje to podstawę do stwierdzenia, że wiriony HCV niosące warianty glikoproteiny E2 ze zmienionym wzorem glikozylacji obecne u pacjentów jeszcze przed rozpoczęciem terapii, mogą przetrwać leczenie jako tzw. mutanty uciezkowe wirusa.

A**B**

Rys. 27 Analiza poprawności fałdowania wariantów glikoproteiny E2 – doświadczenia z wykorzystaniem panelu przeciwciał konformacyjnych oraz neutralizujących

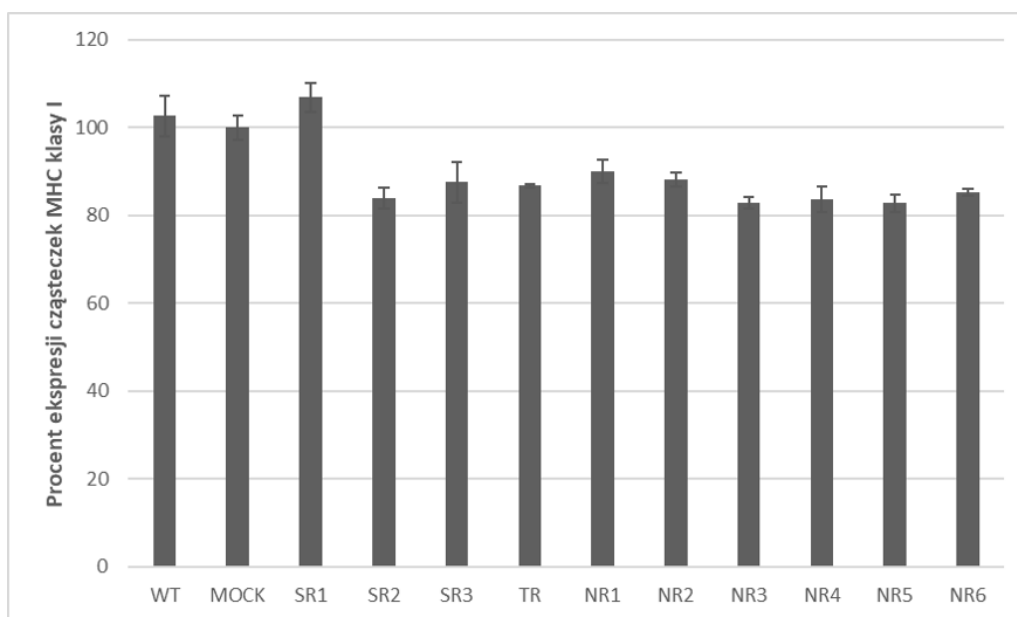
- A. Porównanie rozpoznawania wariantów glikoproteiny E2 pochodzących od pacjentów przez przeciwciała neutralizujące i nieneutralizujące – analiza typu Western Blotting. Glikoproteiny E2 pochodzące z lizatów komórek HEK293 wykrywano za pomocą nieneutralizujących oraz niekonformacyjnych przeciwciał (1:1000, górny panel) lub neutralizujących i nieznacznie konformacyjnych przeciwciał AP33 (1:2000, panel środkowy). Detekcję β -aktyny przeprowadzono jako kontrolę ilości materiału w próbkach nanoszonych na żel. WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna.

- B. Analiza obecności prawidłowych epitopów konformacyjnych w chimerycznych heterodimerach glikoprotein E1E2 – test typu ELISA. Lizaty komórkowe wykonane 48 godzin po transfekcji, dodano do dołków płytki 96-dołkowej uprzednio opłaszczonych roztworem lektyn GNA. Związane glikoproteiny wykrywano z wykorzystaniem panelu neutralizujących i wrażliwych na konformację przeciwciał anti-E2. Jako kontrolę negatywną zastosowano przeciwciało monoklonalne ALP98 rozpoznające liniowy epitop. Wynik, będący średnią trzech niezależnych eksperymentów, przedstawiono jako procent rozpoznawania glikoprotein przez przeciwciała w odniesieniu do szczepu kontrolnego H77C = 100% (* P < 0,01). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna

8.3.4. Ocena regulacji ekspresji cząsteczek MHC klasy I przez warianty genetyczne glikoproteiny E2 metodą cytometrii przepływową

Cząsteczki głównego układu zgodności tkankowej (MHC) odgrywają kluczową rolę w komunikacji między komórkami układu odpornościowego, a ich celami, takimi jak np. komórki zakażone wirusem lub komórki nowotworowe (Muntjewerff i wsp., 2020). Wirus zapalenia wątroby typu C na wiele sposobów unika działania układu immunologicznego gospodarza, aby wywołać przewlekłą infekcję. Wiadomo, że ekspresja białka rdzenia HCV zakłóca dojrzewanie cząsteczek MHC klasy I katalizowane przez peptydazę peptydu sygnałowego (ang. Signal peptide Peptidase, SPP), a także indukuje ich degradację, upośledzając w ten sposób prezentację antygenów. Chociaż zarówno u transgenicznych myszy zakażonych HCV, jak i u pacjentów z przewlekłym WZWC ekspresja MHC klasy I jest osłabiona, wraca ona do pierwotnego poziomu po osiągnięciu trwałej odpowiedzi wirusologicznej (Hirano i wsp., 2021). Dodatkowo udowodniono, że polimorfizm aminokwasów w białku C jest silnym predyktorem słabej odpowiedzi na terapię opartą na interferonie i czynnikiem ryzyka wystąpienia hepatokarcynogenezy. Mutacje obejmujące siedemdziesiąty aminokwas białka C skutkowały wewnątrzkomórkową akumulacją białek wirusowych i obniżeniem ekspresji cząsteczki MHC klasy I (Tasaka-Fujita i wsp., 2015). Wykazano także, że HCV aktywuje białkową kinazę R (ang. Protein Kinase R, PKR), która hamuje ekspresję interferonu (IFN) i genów stymulowanych przez IFN poprzez kontrolowanie translacji mRNA. Białkiem wirusowym odpowiedzialnym za silną indukcję fosforylacji PKR i jednocześnie osłabiającym ekspresję MHC klasy I jest NS5B (Suzuki i wsp., 2019). Biorąc pod uwagę powyższe dane, przeprowadziłam analizę regulacji poziomu ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek przez obecność wariantów genetycznych glikoproteiny E2. Doświadczenia wykorzystujące cytometrię przepływową

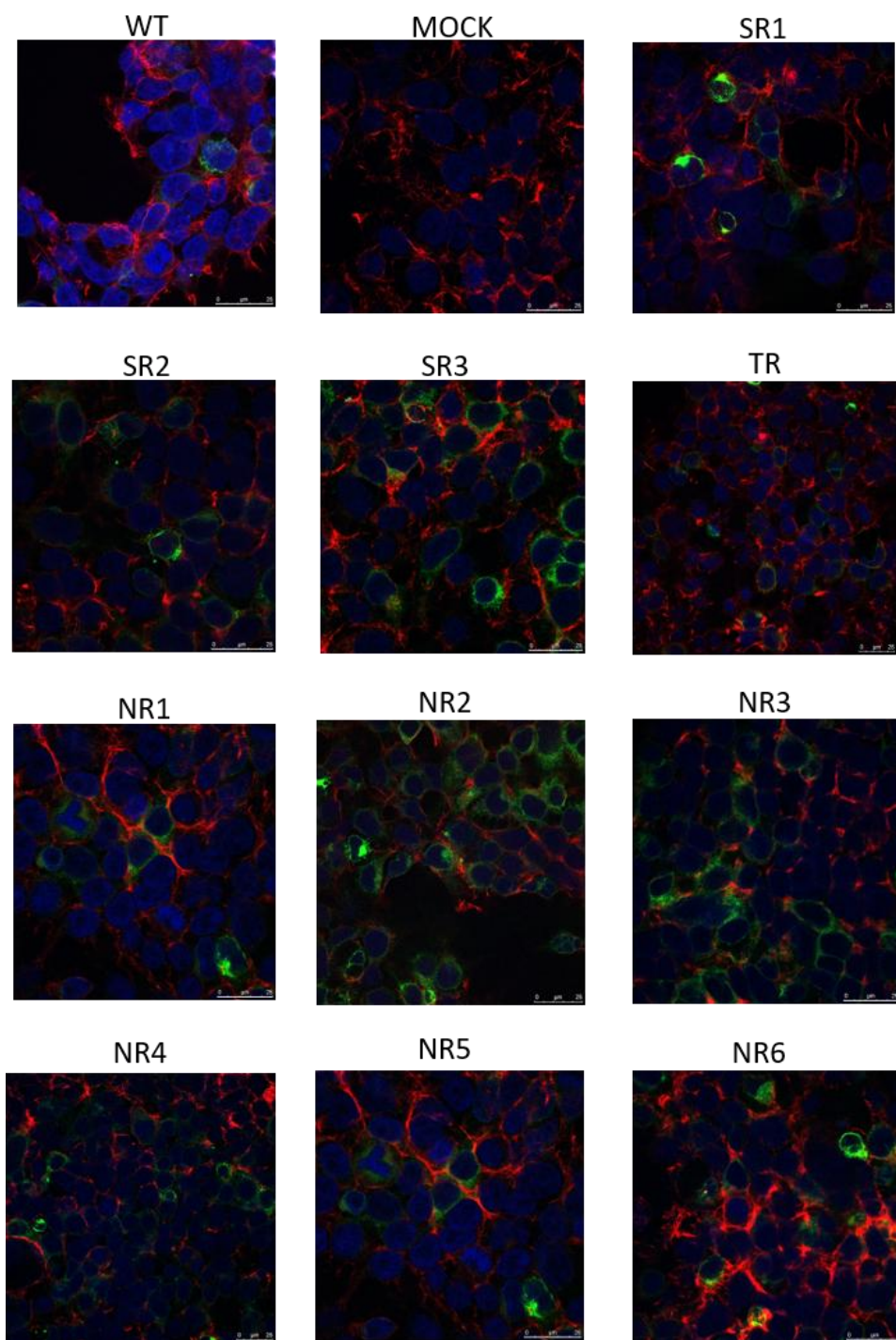
pozwołyły na ocenę tej zależności. Uzyskane przez mnie dane pokazują, że zdecydowana większość wariantów glikoproteiny E2, niezależnie od przynależności do grupy odpowiedzi na terapię, powoduje obniżenie poziomu ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni transfekowanych komórek. Jedynie próbka będąca kontrolą pozytywną (komórki ekspresyjnie glikoproteiny E2 pochodzące ze szczepu referencyjnego H77c) oraz jedna z próbek, pochodząca od pacjenta odpowiadającego na leczenie (SR1) wykazały zwiększenie poziomu ekspresji cząsteczek MHC klasy I o odpowiednio 10% i 11% w stosunku do komórek kontrolnych (MOCK) (Rysunek 28). Poziom ekspresji wariantów glikoproteiny E2 w każdej z analizowanych próbek był porównywalny, a zatem nie miał wpływu na wynik doświadczenia (dane niezaprezentowane w niniejszej pracy). Podsumowując, na podstawie otrzymanych wyników nie udało się wykazać istnienia jakiegokolwiek mechanizmu regulującego poziom ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek przez warianty genetyczne glikoproteiny E2.



Rys. 28 Analiza stopnia ekspresji cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek Huh7.5 – cytometria przepływowa. Detekcję cząsteczek MHC klasy I na powierzchni komórek Huh7.5 przeprowadzono za pomocą przeciwciał monoklonalnych W6/32 (1:100). Wynik, będący średnią trzech niezależnych eksperymentów, przedstawiono jako procent ekspresji cząsteczek MHC klasy I w odniesieniu do komórek Huh7 transfekowanych mieszaniną reakcyjną niezawierającą DNA (MOCK = 100%). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek Huh 7,5 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna.

8.3.5. Analiza wewnątrzkomórkowej lokalizacji wariantów glikoproteiny E2

Barwienie immunofluorescencyjne komórek HEK293 transfekowanych DNA kodującym różne warianty chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1E2 nie wykazało różnic w wewnątrzkomórkowej lokalizacji białek wirusowych. Zgodnie z przewidywaniami, wszystkie warianty glikoproteiny E2, niezależnie od przynależności do poszczególnych grup odpowiedzi na terapię, prezentowały lokalizację błonową (Rysunek 29).



Rys. 29 Analiza lokalizacji heterodimerów glikoprotein E1E2 wirusa HCV za pomocą immunofluorescencji w komórkach HEK293. 48 godzin po transfekcji komórki utrwalono i dodatkowo wybarwiono na obecność glikoproteiny E2 (zielony), F-aktyny (czerwony) i jąder komórkowych (niebieski). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna

8.3.6. Analiza sekwencji glikoproteiny E2 pochodzących od pacjentów i zdeponowanych w europejskiej bazie danych (euHCVdb) pod kątem częstotliwości występowania mutacji powodujących utratę miejsc N-glikozylacji

Istotnym etapem pracy było sprawdzenie częstotliwości pojawiania się wykrytych przeze mnie mutacji we wzorze N-glikozylacji glikoproteiny E2 w sekwencjach pochodzących z innych próbek. W tym celu przeanalizowałam status N-glikozylacji 100 losowo wybranych sekwencji E2 pochodzących od pacjentów zakażonych HCV genotypu 1a zdeponowanych w bazie danych euHCVdb. Zidentyfikowałam 18 sekwencji wykazujących zmiany we wzorze N-glikozylacji. Najczęstsze mutacje występowały w pozycjach N4, N5 i N6 (odpowiednio 5, 7 i 5 razy). Wszystkie przeanalizowane mutacje w miejscach N-glikozylacji wraz z ich procentowym udziałem w całej grupie badanej przedstawiono w Tabeli 7. Uzyskane mogą sugerować, że ten typ mutacji nie jest unikalny dla grupy badanej wykorzystywanej na potrzeby niniejszej pracy. Co więcej, opublikowana analiza przeprowadzona dla sekwencji E2 z genotypu 3a wykazała, że delecje miejsc N-glikozylacji były rzadkie dla N4 i N5, co sugeruje, że pojawienie się mutacji N-glikanów może być specyficzne dla genotypu.

Brakujące miejsce N-glikozylacji	Liczba pacjentów z brakującym miejscem N-glikozylacji	Procentowy udział zmienionych sekwencji w stosunku do analizowanej puli
N1	3	2,3%
N2	0	–
N3	2	1,5%
N4	5	3,8%
N5	7	5,3%
N6	5	3,8%
N7	2	1,5%
N8	3	2,3%
N9	2	1,5%
N10	0	–
N11	0	–

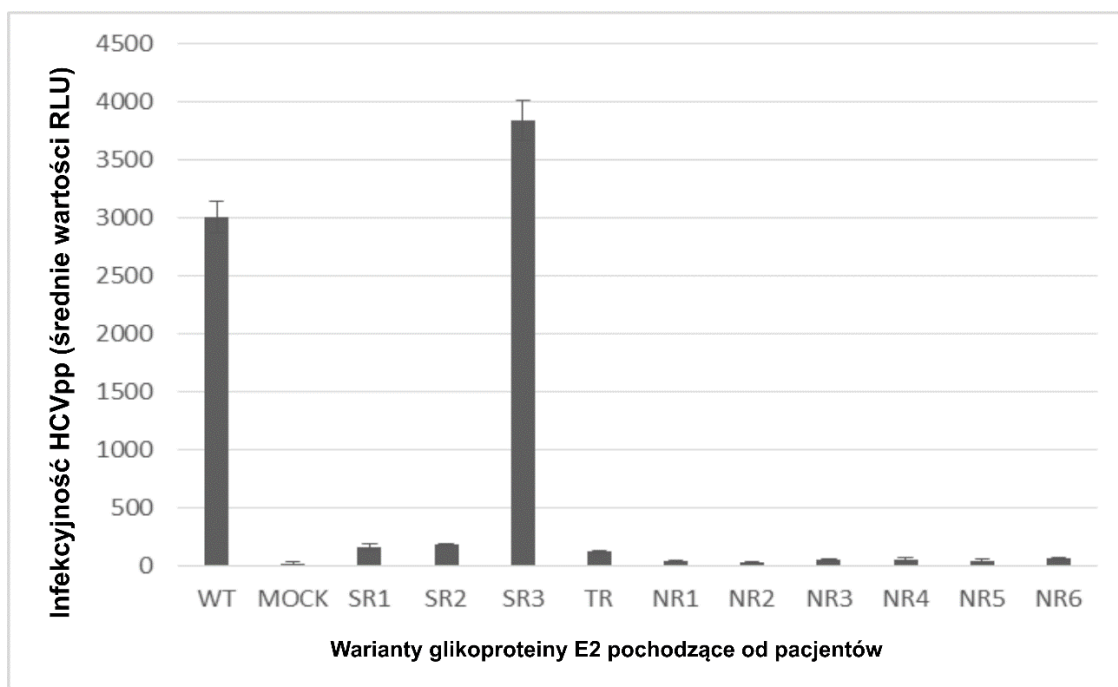
Tab. 7 Lista mutacji w sekwencji w obrębie wzoru charakterystycznego dla występowania miejsc N-glikozylacji Asn-X-Ser/Thr w 100 losowo wybranych sekwencjach glikoproteiny E2 pochodzących od pacjentów zdeponowanych w bazie danych euHCV.db.

8.3.7. Badanie wpływu zmienności genetycznej oraz różnic w profilu N-glikozylacji wariantów białka E2 na infekcyjność cząsteczek wirusowych za pomocą pseudocząsteczek HCV

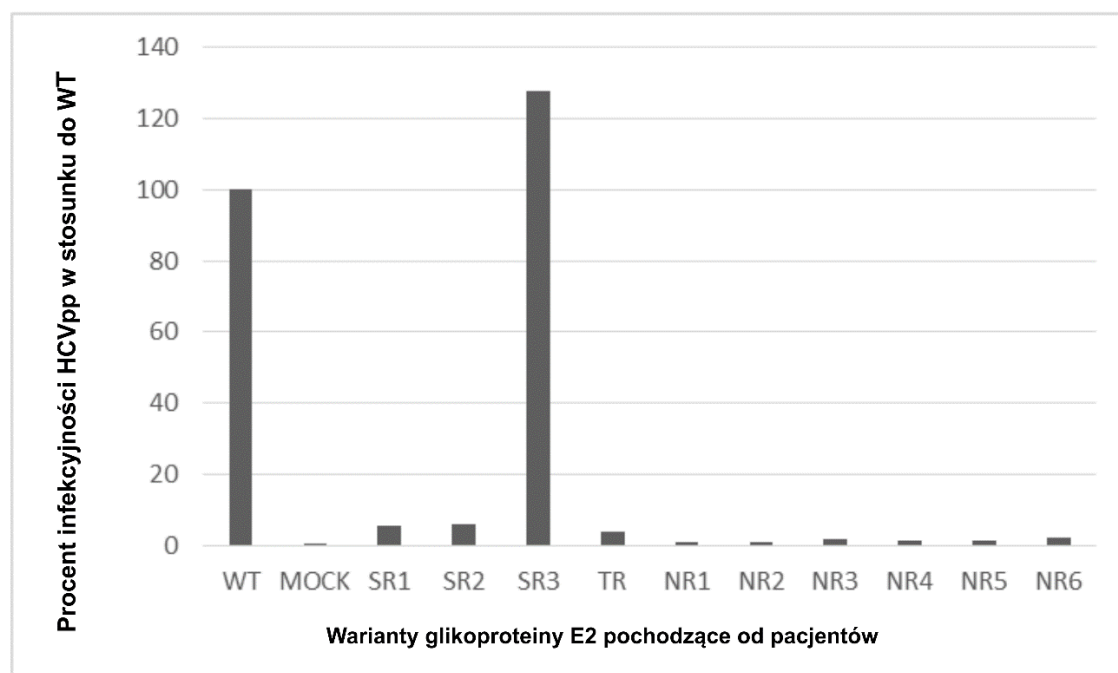
Pseudocząstki HCV (HCVpp) używane były przez wiele lat jako ważny model służący do badania procesu wnikania wirusa do komórki gospodarza, czyli wczesnych etapów infekcji wirusowej. Badania oparte na HCVpp odegrały ważną rolę w odkryciu receptorów komórkowych dla wirusa HCV, w szczególności kładyny-1 i okładyny, ale także w potwierdzeniu roli CD81 i SR- BI jako kluczowych elementów niezbędnych do wejścia wirusa do komórki gospodarza (Ramirez i Bukh, 2018). W celu zbadania wpływu mutacji we wzorze N-glikozylacji obecnych w testowanych przeze mnie wariantach glikoproteiny E2 na infekcyjność wirionów oraz zdolność wnikania cząsteczek wirusopodobnych do komórek gospodarza, wygenerowałam w komórkach HEK293 pseudocząsteczki HCV niosące analizowane warianty białka E2. Poziom infekcyjności oznaczałam poprzez pomiar poziomu

ekspresji białka reporterowego lucyferazy produkowanego w komórkach z plazmidu pTG126 Luc I znajdującego się we wnętrzu każdej funkcjonalnej pseudocząsteczki. Niestety uzyskane wyniki były niejednoznaczne (Rysunek 30).

A

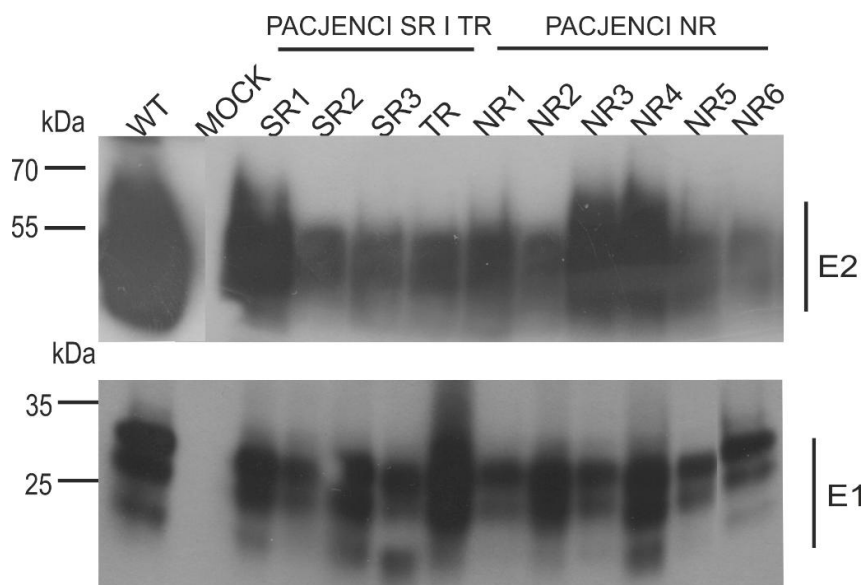


B



Rys. 30 Analiza poziomu infekcyjności pseudocząsteczek wirusowych niosących glikoproteiny E1E2 wirusa HCV za pomocą pomiar poziomu ekspresji białka reporterowego lucyferazy. 48 godzin po transfekcji zbierano pożywkę z nad transfekowanych komórek, wirowano i przeprowadzano infekcję komórek Huh7. Wynik, będący średnią trzech niezależnych eksperymentów, przedstawiono jako poziomu ekspresji białka reporterowego lucyferazy produkowanego w komórkach z plazmidu pTG126 Luc I (A) lub jako infekcyjności HCVpp w odniesieniu do szczepu kontrolnego H77C = 100% (B). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna

Aby wyjaśnić ten stan rzeczy powtórzyłam eksperyment, jednakże tym razem pseudocząsteczki zostały zagęszczone poprzez ultrawirowanie na poduszce sacharozowej, a następnie poddane rozdzielaniu elektroforetycznemu. Detekcję glikoprotein E1E2 w pseudocząsteczkach przeprowadziłam metodą western blotting. Doświadczenie to miało na celu zbadanie, czy wszystkie warianty glikoproteiny E2 zostały równomiernie włączone do powstających pseudocząsteczek. Uzyskane wyniki nie ujawniły żadnych znaczących różnic w poziomie inkorporacji poszczególnych wariantów glikoprotein w pseudocząsteczkach HCV (Rysunek 31) i tym samym nie dały wyjaśnienia wcześniejszych niejednoznacznych rezultatów.



Rys. 31 Analiza poziomu inkorporacji glikoprotein wirusa zapalenia wątroby typu C w pseudocząsteczkach wirusowych. Zagęszczone poprzez ultrawirowanie pseudocząsteczki wirusowe rozdzielono żelu poliakrylamidowym, a następnie glikoproteiny wykrywano z wykorzystaniem specyficznych przeciwciał monoklonalnych anti-E1 (1:2000) oraz anti-E2 (1:500). WT – typ dziki szczepu referencyjnego H77c, kontrola pozytywna; MOCK – lizat komórek HEK293 transfekowanych mieszaniną odczynników niezawierającą DNA, kontrola negatywna.

9. Podsumowanie wyników

- Opracowałam metodykę amplifikacji materiału genetycznego pochodzącego od pacjentów i na podstawie analiz filogenetycznych wybrałam warianty najbardziej typowe dla każdej puli pseudotypów wirusowych.
- Skonstruowałam panel chimerycznych heterodimerów glikoprotein E1E2 dla każdej z próbek pochodzących od pacjentów, umożliwiającą wykonanie analiz strukturalnych i funkcjonalnych. Poprawność wykonania konstruktorów potwierdziłam poprzez ich ekspresję w komórkach ssaczych linii HEK293 oraz immunocytochemiczne barwienie uzyskanych białek in situ.
- Wykazałam, że pomimo niezaburzonego procesu heterodimeryzacji glikoprotein E1E2, warianty glikoproteiny E2 pochodzące wyłącznie od pacjentów, którzy nie odpowiedzieli na terapię anty-HCV (non-responders, NR) cechowały się niższą masą cząsteczkową niż oczekiwane 62 kDa.
- Dowiodłam, że różnice w masie cząsteczkowej poszczególnych wariantów glikoproteiny E2 wynikały z mutacji prowadzących do utraty poszczególnych miejsc N-glikozylacji i występujących wyłącznie u pacjentów nieodpowiadających na terapię anty-HCV.
- Zademonstrowałam, że w przypadku wariantów białka E2 pochodzących od pacjentów należących do grupy NR, można zaobserwować znacznie niższą siłę wiązania do receptora komórkowego CD81 niż w przypadku E2 typu dzikiego (kontroli pozytywnej) oraz pozostałych próbek.
- Potwierdziłam, że próbki E2 pochodzące wyłącznie od pacjentów nieodpowiadających na terapię i posiadające mutacje we wzorze N-glikozylacji były zdecydowanie gorzej rozpoznawane przez wrażliwe na konformację przeciwciała neutralizujące, co wskazuje na możliwą zmianę lokalnej konformacji wspomnianych wariantów glikoproteiny E2.

- Przeprowadziłam analizę statusu N-glikozylacji 100 losowo wybranych sekwencji E2 pochodzących od pacjentów zakażonych HCV genotypu 1a zdeponowanych w bazie danych euHCVdb, w efekcie czego zidentyfikowałam 18 sekwencji wykazujących zmiany we wzorze N-glikozylacji. Uzyskane wyniki mogą sugerować, że ten typ mutacji nie jest unikalny dla grupy badanej wykorzystanej na potrzeby niniejszej pracy.

10. Dyskusja

Opracowanie i wprowadzenie do stosowania bezpośrednio działających leków przeciwwirusowych (DAA) umożliwiło usunięcie wirusa HCV w 90% przypadków, jednakże wysoki koszt tych terapii w dalszym ciągu ogranicza ich dostępność w wielu krajach. W 2016 r. 69. Światowe Zgromadzenie Zdrowia przyjęło Globalną Strategię Sektora Zdrowia dotyczącą wirusowego zapalenia wątroby, zgodnie z którą zakłada się eliminację wirusowego zapalenia wątroby typu C jako zagrożenia dla zdrowia publicznego poprzez redukcję zapadalności o 90% i śmiertelności o 65% do roku 2030 (WHO, 2017). Z tego powodu bardzo potrzebne jest zaprojektowanie szczepionki profilaktycznej, która indukowałaby odpowiedź ochronną. Nadal jednak istnieją luki w zrozumieniu odpowiedzi immunologicznej przeciwko HCV, co w połączeniu z dużą zmiennością genetyczną wirusa, utrudnia opracowanie tej szczepionki.

Wirus HCV charakteryzuje się wysokim polimorfizmem genetycznym. Podatna na błędy replikacja wirusowego RNA powoduje akumulację mutacji, w wyniku czego HCV nie tworzy jednorodnej populacji, ale istnieje jako pula spokrewnionych, ale nieznacznie różniących się między sobą wariantów, które nazywane są quasi-gatunkami. Wynikająca z tego zjawiska zmienność wirusa u osób zakażonych przekłada się na zmniejszenie wrażliwości na zastosowane środki terapeutyczne oraz generowanie tzw. wariantów uciezkowych (Ando i wsp., 2022). Genotyp 1 jest najbardziej rozpowszechniony i stanowi 46% wszystkich zakażeń (Messina i wsp., 2015). Najbardziej zmiennym składnikiem cząsteczki HCV jest jej glikoproteina osłonkowa E2. Ektodomeny zarówno E1, jak i E2 są silnie glikozylowane – E1 posiada do 5, a E2 do 11 miejsc N-glikozylacji. N-glikozylacja zachodzi na resztach asparaginy obecnych w motywach asparagina-X-seryna/treonina, przy czym X oznacza dowolną resztę z wyjątkiem proliny. Dziewięć miejsc glikozylacji białka E2 jest konserwowanych we wszystkich genotypach HCV i znajdują się one w pozycjach 417 (E2N1), 423 (E2N2), 430 (E2N3), 448 (E2N4), 532 (E2N6), 556 (E2N8), 576 (E2N9), 623 (E2N10) i 645 (E2N11) (Goffard i wsp., 2005). Glikozylacja jest podstawową modyfikacją potranslacyjną, kluczową dla różnych procesów komórkowych. Glikoproteiny występujące w postaci różnorodnych glikoform, cechują się niejednorodnością strukturalną odzwierciedlającą różne wzorce glikozylacji w poszczególnych miejscach glikozylacji (tzw. mikroheterogenność) oraz zmiennością zajmowania potencjalnych miejsc glikozylacji. (tzw. makroheterogenność) (de Haas i wsp., 2020; Fang i wsp., 2022).

W niniejszej pracy przeanalizowałam sekwencję i funkcjonalność glikoprotein E2 w materiale genetycznym uzyskanym z próbek pochodzących od dziesięciu pediatrycznych pacjentów zakażonych genotypem 1a wirusa HCV. Próbki zostały pobrane przed rozpoczęciem terapii skojarzonej IFN-RBV, po której zakończeniu pacjenci zostali pogrupowani zgodnie z trzema profilami odpowiedzi na terapię: osoby reagujące (SR), niereagujące (NR) oraz jedna osoba o odpowiedzi przejściowej (TR). W celu odtworzenia funkcjonalnego heterodimeru glikoprotein HCV, sekwencje E2 pochodzące od pacjentów zostały połączone *in vitro* z genem E1 pochodzącym ze szczepu laboratoryjnego H77c. Analiza uzyskanych sekwencji ujawniła, że wszystkie sekwencje HCV E2 wyizolowane od pacjentów z grupy NR charakteryzowały się mutacjami prowadzącymi do utraty miejsc N-glikozylacji.

Wcześniejsze doniesienia literaturowe wskazywały, że tylko prawidłowo sfałdowane białka E1 i E2 są w stanie utworzyć funkcjonalny niekowalencyjny heterodimer (Dubuisson i wsp., 1994; Deleersnyder i wsp., 1997). W celu potwierdzenia prawidłowości procesu heterodimeryzacji białek pochodzących z referencyjnego szczepu gt1a (E1) i od pacjenta (E2) uzyskanego w ssaczych hodowlach komórkowych, przeprowadziłam test immunoprecypitacji. Przeciwciała poliklonalne anti-E2 zostały użyte do wychwycenia kompleksów E1E2 z lizatów komórek HEK293. Wyniki wykazały podobne poziomy glikoprotein dla każdego skonstruowanego chimerycznego heterodimeru, co wskazuje, że wszystkie białka E2 produkowane w komórkach linii HEK293 były zdolne do tworzenia heterodimeru z E1. Zaskakującymi były zaobserwowane różnice w masie cząsteczkowej glikoproteiny E2. Prawie wszystkie białka E2 pochodzące od pacjentów z grupy NR miały niższą masę cząsteczkową niż próbki E2 uzyskane od pacjentów z grup TR i SR, co można przypisać utracie poszczególnych reszt cukrowych. Jedynym wyjątkiem był heterodimer E1E2 wyizolowany od pacjenta NR1, wykazujący podobną masę cząsteczkową do tych z grupy SR. Biorąc pod uwagę powyższe dane, postanowiłam sprawdzić status glikozylacji wszystkich badanych wariantów glikoproteiny E2. Analiza sekwencji E2 pacjentów wykonana za pomocą oprogramowania Net-N-Glyc 1.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>) ujawniła mutacje w konsensusowych motywach asparagina-X seryna/treonina, prowadzące do utraty co najmniej jednego miejsca N-glikozylacji dla każdego z niereagujących na terapię pacjentów. Dodatkowo przeanalizowałam status N-glikozylacji 100 losowo wybranych sekwencji białka E2 pochodzących od pacjentów zainfekowanych wirusem HCV genotyp 1a, zdeponowanych w bazie danych euHCVdb. Wyniki ujawniły

istnienie 18 sekwencji, które wykazały braki poszczególnych N-glikanów, co sugeruje, że ten typ mutacji nie jest unikalny dla grupy wykorzystanej w niniejszej pracy. Najczęstsze mutacje występowały w pozycjach N4, N5 i N6. Wart uwagi jest fakt, że opublikowane rezultaty analizy przeprowadzonej dla sekwencji E2 uzyskanych z gt 3a (Pantua i wsp., 2013) wykazały, że delecje miejsc N-glikozylacji N4 i N5 występują rzadko, co może sugerować, że pojawianie się mutacji w obrębie poszczególnych N-glikanów może być specyficzne dla genotypu.

Sugeruje się, że zjawisko tworzenia tarczy glikanowej (ang. glycan shielding) jest mechanizmem umożliwiającym maskowanie szeroko neutralizujących epitopów obecnych na powierzchni glikoprotein wirusa HCV (Czarnota i wsp., 2023). AP33 jest jednym z najsilniejszych przeciwciał neutralizujących, celującym w wysoce konserwatywny epitop E2 412-423, który zawiera dwa miejsca N-glikozylacji (417 E2N1, 423 E2N2) (Lavie i wsp., 2018). Wyniki przeprowadzonych przeze mnie badań wykazały, że wszystkie warianty E2 posiadające mutacje w miejscu glikozylacji N1 były mniej skutecznie rozpoznawane przez przeciwciało neutralizujące AP33 niż warianty niezmutowane. Co więcej, glikoproteina E2 pozbawiona miejsc glikozylacji N1 i N3 (próbka NR4) nie została w ogóle wykryta przez to przeciwciało. Dostępne dane literaturowe jasno wskazują, że mutacje w białku E2 wpływające na stan N-glikozylacji prowadziły do ucieczki wirusa przed działaniem przeciwciał szeroko neutralizujących. Zbieżnie z uzyskanymi przeze mnie wynikami badań, Dhillon i współpracownicy (Dhillon i wsp., 2010) wykazali, że izolaty HCV pochodzące z hodowli komórkowych (HCVcc) niosące mutacje w miejscach N415 i N417 (E2N1) były odporne na działanie przeciwciała AP33. Pantua i inni (Pantua i wsp., 2013) również donosili, że mutanty E2N1 HCVcc (N417S i N417T) nie były rozpoznawane przez panel przeciwciał szeroko neutralizujących: MRCT10.v362, hu5B3.v3, mu5B3 i HCV1. Fakt ten przypisano przesunięciu glikanu z pozycji N417 na N415. Większość opublikowanych wyników badań opartych na mutageniezie *in situ* i wykorzystaniu rekombinowanych białek, koncentrowała się na roli, jaką odgrywa przesunięcie glikanu w pojawianiu się mutantów odpornych na neutralizację. Dane uzyskane w mojej pracy mogą jednak sugerować, że zmiany we wzorze N-glikozylacji obecne w wariantach E2, mogą prowadzić do zmiany konformacji glikoproteiny, co może przekładać się na mniejszą skuteczność w stymulacji odpowiedzi immunologicznej gospodarza. Dane te znajdują potwierdzenie w ostatnio opublikowanych wynikach badań. Alzua i współautorzy zastosowali tzw. odwrotne podejście ewolucyjne polegające na pasażowaniu w hodowli komórkowej, bez selektywnej ze strony przeciwciał

neutralizujących, wirusów HCV zawierających glikoproteiny E1E2 należące do genotypów 1a, 1b, 2a, 3a i 4a, które uprzednio wyizolowano od przewlekle zakażonych pacjentów. Badania genetyczne mutacji nabytych przez E1/E2 w toku eksperymentu ujawniły glikany E2N1 i E2N6, jako kluczowe regulatory zmian stanu konformacyjnego heterodimeru E1E2, jednocześnie mające wpływ na wrażliwość wirusa na działanie przeciwciał neutralizujących (Alzua i wsp., 2023). Co więcej, taka modulacja konformacji przestrzennej może również wpływać na proces wejścia wirusa do komórki gospodarza poprzez modyfikację powinowactwa glikoprotein do receptorów komórkowych. Receptor CD81 odgrywa kluczową rolę w procesie wnikania HCV do komórki gospodarza, a blokowanie interakcji E1E2 z CD81, prowadzi do neutralizacji wirusa *in vitro* (Fénéant i wsp., 2014). Konserwowany motyw Gly436-Tyr443 w obrębie białka E2 jest determinantem wiązania receptora CD81 i wnikania wirusa do komórki gospodarza (Drummer i wsp., 2006). Biorąc pod uwagę powyższe informacje, postanowiłam sprawdzić stopień powinowactwa wariantów glikoproteiny E2 do tego receptora. Uzyskane wyniki wykazały znaczne zmniejszenie poziomu wiązania do CD81 wyłącznie przez warianty E2 należące do grupy NR. Warto zauważyć, że warianty o najniższym powinowactwie do receptora CD81 (NR4 i NR6) utraciły miejsce glikozylacji N3, które jest zlokalizowane w pobliżu wspomnianego kluczowego motywu Gly436-Tyr443 E2. Także Kong i współpracownicy wykazali (Kong i wsp., 2013), że dodatkowe miejsce N-glikozylacji w pozycji 442 lub 428 lub mutacja Lys-do-Tyr w pozycji 427 całkowicie hamowały wiązanie receptora CD81. Zebrane dane wskazują, że zmiany we wzorze N-glikozylacji E2 mają duży wpływ na wiązanie E2 do CD81. Może to być wynikiem zmian w konformacji białka, a niekoniecznie zmian prowadzących do przerwania miejsca wiązania receptora CD81. Taką elastyczność strukturalną zaobserwowano w kilku domenach E2, w tym w regionie zawierającym miejsca glikozylacji N1, N2, N6, N7 i N10 (Ströhi i wsp., 2023). Także Khera i wsp. (Khera i wsp., 2019) wykazali, że mutacje w E2 powodujące przerwanie miejsc N-glikozylacji prowadziły do słabszego rozpoznawania receptorów CD81. Jednak w tym raporcie inaktywacji miejsca glikozylacji 534 towarzyszyła delecja regionu HVR1, a usunięcie tego regionu wydawało się być kluczowym czynnikiem warunkującym wiązanie z CD81. Niemniej jednak, u pacjentów nieodpowiadających na terapię IFN-RVB z przetrwałą infekcją wirusową, powinowactwo E2 do receptora CD81 może stać się mniej ważne na korzyść bezpośredniego transferu wirusa między komórkami. Bezpośrednia transmisja HCV, która jest niezależna od CD81, może pomóc wirusowi uniknąć neutralizacji ze strony przeciwciał i przetrwać w organizmie

pacjenta (Zeisel i wsp., 2009). Zjawisko bezpośredniej transmisji wirusa pomiędzy komórkami organizmu gospodarza jest powszechne i opisano je m.in. dla wirusów grypy typu A, HIV i SARS-CoV-2 (Williams i wsp., 2024). Badania z wykorzystaniem systemu HCVcc (genotyp 2a) wykazały, że transmisja bezpośrednio z komórki do komórki z pominięciem wykorzystania receptorów jest główną drogą rozprzestrzeniania się wirusa HCV opornego na działanie DAA (Xiao i wsp., 2014).

Aby dokładniej przeanalizować możliwe zmiany w konformacji badanych wariantów E2, wykonałam testy ELISA przy użyciu panelu przeciwciał neutralizujących rozpoznających epitopy konformacyjne. Warianty E2 uzyskane od pacjentów z grupy NR były zdecydowanie mniej skutecznie rozpoznawane przez cztery przeciwciała konformacyjne (HC-1, HC-11, CBH-4B, HC84.1), co wskazuje na przypuszczalnie zmienioną lokalną konformację glikoproteiny E2. Dostępne dane literaturowe wskazują, że obecność konkretnych glikanów w obrębie E2 jest kluczowa dla wiązania niektórych przeciwciał neutralizujących, ponieważ mogą one być bezpośrednio zaangażowane w interakcje antygen-przeciwciało. Enzymatyczne usunięcie glikanów z E2 zdecydowanie zmniejszyło powinowactwo przeciwciał neutralizujących AR1A, co sugeruje, że glikany mogą być niezbędne podczas niektórych interakcji z przeciwciałami neutralizującymi E2 (Tzarum i wsp., 2019). Co ciekawe, badania przeprowadzone przez Prentoe i współautorów (Prentoe i wsp., 2019) oparte na modelu HCVcc wykazały, że skutki odchyień we wzorze glikozylacji mogą być zmienne. Autorzy udowodnili, że usunięcie glikanów w niektórych pozycjach (np. N1) czyni wirusa bardziej wrażliwym na przeciwciała neutralizujące, podczas gdy takiego efektu nie zaobserwowano w przypadku miejsc N5 lub N9. Co więcej, usunięcie innych miejsc glikozylacji (np. N3 i N9) wiązało się ze zmniejszoną zakaźnością HCVcc. Powyższe dane oraz prace innych autorów (Pierce i wsp., 2016) wskazują, że rola glikanów w zakażeniu HCV nie może być wyjaśniona jedynie poprzez opisane wcześniej zjawisko „glycan shielding”, ale koniecznym jest wzięcie pod uwagę ich wpływu na dynamiczne zmiany konformacyjne zachodzące w białku E2. Niektóre takie zmiany mogą być specyficzne dla genotypu – wykazano różnice we wpływie usunięcia poszczególnych miejsc glikozylacji w HCVcc dla genotypów 2a, 1a oraz 3a (Pierce i wsp., 2016).

Wyniki przedstawione w niniejszej pracy mogą sugerować, że zmiany we wzorze N-glikozylacji glikoproteiny HCV E2 obecne na początku leczenia anty-HCV mogą być związane z negatywnym wynikiem terapii. Zwalczenie zakażenia HCV zależy od skutecznej aktywności zarówno humoralnej, jak i komórkowej odpowiedzi immunologicznej. Można

postawić hipotezę, że pula przeciwciał wytwarzanych podczas zakażenia mutantami HCV opisanymi w niniejszej pracy nie zapewniała wystarczającej ochrony przed działaniem wirusa, w konsekwencji czego przeciwwirusowy efekt leczenia interferonem/rybawiryną mógł zostać osłabiony. Dostępne dane literaturowe potwierdzają wysnutą przeze mnie tezę o związku specyficznych mutacji w genomie HCV obecnych już na początkowym etapie terapii z niepowodzeniem leczenia. Wielokrotnie próbowano skorelować efekt zastosowanego leczenia z wzorcami mutacji w obrębie białek wirusa HCV. W badaniu z 2017 roku u 54,8% pacjentów, u których leczenie nie powiodło się, jedną z przyczyn niepowodzenia mogła być obecność mutacji związanych z opornością na leki. U większości z tych pacjentów z mutacje były obecne już na początku leczenia (Paolucci i wsp., 2017). Inne badanie dotyczące analizy niepowodzenia terapii u pacjentów zakażonych HCV genotypu 3 wykazało, że mutacje związane z opornością na terapeutyki w obrębie białka NS5A wykryto na początku badania u 15 z osób, a w momencie nawrotu zakażenia u kolejnych u 20 pacjentów z marskością wątroby i wcześniej leczonych interferonami (Mushtaq i wsp., 2022).

W oporności HCV na interferon pośredniczy głównie specyficzny rejon białka NS5A, jednak region E2, który oddziałuje z kinazą białkową R (PKR), został również wskazany jako związany z opornością na IFN. Stwierdzono, że tzw. region PePHD E2 (domena homologii fosforylacji PKR/eIF-2a), który znajduje się w C-końcowej części E2 (aminokwasy 659 do 670), jest zaangażowany w odpowiedź na interferony. Jednakże kilka opublikowanych artykułów nie potwierdziło żadnych istotnych korelacji między mutacjami w rejonie PePHD, a odpowiedzią pacjentów na terapię IFN (Muñoz de Rueda i wsp., 2008). Wiadomo, że glikozylacja białek wirusowych może również wpływać na poziom infekcyjności wirusa. Aby przeanalizować tę kwestię, uzyskałam pseudocząsteczki HCV (HCVpp) niosące warianty glikoproteiny E2 pochodzące od pacjentów i wykorzystałam je do badania infekcyjności wirionów, natomiast otrzymane wyniki były niejednoznaczne. Jednakże wcześniej opisano, że mutacje prowadzące do utraty miejsc glikozylacji E1N1, E1N4, E2N8 lub E2N10 mogą wpływać na włączenie glikoprotein E1E2 do HCVpp, prawdopodobnie z powodu nieprawidłowego fałdowania białka. Co więcej, zmiany w E2N2 i E2N4 zmniejszyły zakaźność HCVpp, mimo że nie miało to wpływu na włączanie glikoprotein do HCVpp (Helle i wsp., 2010). Wyniki innego eksperymentu z wykorzystaniem pseudocząsteczek HCV w komórkach owadzych i ssaczy wykazały, że usunięcie glikanów obecnych w miejscach glikozylacji E2N1 i E2N8 doprowadziło do akumulacji agregatów E1E2 i zahamowania składania wirionów. Te nieprawidłowo sfałdowane kompleksy E1E2 nie były w stanie

oddziaływać z jednym z receptorów (kalneksyną) i w efekcie tworzyć funkcjonalnego kompleksu glikoprotein E1E2 (Orlova i wsp., 2015).

Liczne doniesienia literaturowe ujawniły wpływ reszt cukrowych nie tylko na cykl infekcyjny wirusa, a także na odpowiedź immunologiczną gospodarza i mechanizmy związane z ucieczką immunologiczną. Najbardziej znane przykłady szeroko zakrojonych badań nad wpływem N-glikanów na funkcję białek obejmują hemaglutyninę wirusa grypy (np. Altman i wsp., 2019), białka env wirusa HIV (np. Jan i wsp., 2018, Feng i wsp., 2022), a ostatnio białka wirusa SARS-CoV-2 (np. Baboo i wsp., 2023; Newby i wsp., 2023). Na przestrzeni lat niewiele glikoproteinom poświęcono tyle uwagi, co białkom wirusa SARS-CoV-2. Badania ujawniły, m.in. działanie wspomnianej wcześniej tarczy glikanowej zapobiegającej rozpoznaniu białek wirusowych przez układ odpornościowy (Casalino i wsp., 2020) oraz funkcjonowania reszt cukrowych jako aktywatorów szlaku lektynowego (Malaquias i wsp., 2021). Jednak najważniejsze z punktu widzenia niniejszej pracy odkrycia dotyczyły wpływu zmian w glikozylacji białek wirusa SARS-CoV-2 na konformację, dynamikę i interakcje tych białek. Główną proteiną powierzchniową wspomnianego wirusa jest tzw. białko kolca (ang. spike, S). Składa się ono z N-końcowej podjednostki S1, C-końcowej podjednostki S2, peptydu fuzyjnego, domeny transbłonowej oraz domeny cytoplazmatycznej, która ma kluczowe znaczenie dla fuzji wirusa z błoną komórkową. Podjednostka S1 jest dalej podzielona na domenę wiążącą receptor (ang. Receptor binding domain, RBD) i domenę N-końcową, odgrywające role w wejściu wirusa do komórki gospodarza i służące jako potencjalny cel neutralizacji przez przeciwciała lub szczepionki (Song i wsp., 2018). Podobnie jak w przypadku analizowanych przeze mnie glikoprotein osłonkowych wirusa HCV, białko S wirusa SARS CoV-2 podlega intensywnej glikozylacji – podjednostka S1 zawiera 13, a podjednostka S2 – 9 potencjalnych miejsc N-glikozylacji (Harbison i wsp., 2021). Zbieżnie z uzyskanymi przeze mnie wynikami badań, udowodniono, że zaburzenie wzoru N-glikozylacji warunkuje wystąpienie zmian konformacyjnych. Dwa glikany obecne w białku S1 (N 165 i N234) zostały uznane za elementy strukturalne kluczowe dla utrzymania białka kolca w konformacji umożliwiającej wejście wirusa do komórek gospodarza (Casalino i wsp., 2020). Najnowsze publikacje w tym zakresie pozwoliły na odkrycie kolejnego miejsca glikozylacji kluczowego dla zachowania właściwej konformacji białka. Dzięki zastosowaniu metod dynamiki molekularnej uzyskano pewność, że struktura immunodominującej domeny RBD jest regulowana przez N-przyłączone reszty cukrowe w miejscu N343 (Ives i wsp., 2024). Inną cechą wspólną wirusów HCV i SARS-

CoV-2 jest ich wysoka zmienność genetyczna. Li i współautorzy przeanalizowali m.in. zjawisko ucieczki immunologicznej ostatnio krążących podwariantów SARS-CoV-2 Omicron (BA.2.86, JN.1, EG.5, EG.5.1 i HV.1). Udowodnili oni, że mutacja K356T obecna w podwariancie BA.2.86 i wprowadzająca nowe, dodatkowe miejsce N-glikozylacji (N354) przyczynia się do zmian w rozpoznawaniu epitopów przez neutralizujące przeciwciała monoklonalne S309 (Li i wsp., 2024). Tę samą mutację przeanalizowano także pod kątem osłabiania zakaźności wirusa. Przywrócenie pełnej infekcyjności możliwe jest w obecności siarczanu heparyny, który kieruje się do „kieszeni” powstałej w wyniku zmian konformacyjnych wywołanych zaburzeniem wzoru N-glikozylacji, niweluje te zmiany i tym samym reguluje zakaźność. Ponadto mutacja wprowadzająca dodatkowe miejsce glikozylacji N354 usprawnia proces fuzji błon, co przyczynia się do lepszego unikania niektórych przeciwciał (Liu i wsp., 2024). Ponadto Schwarze i inni w artykule z 2024 roku opisali znaczne zmniejszenie rozpoznawania białek (w szczególności domeny RBD) wirusa SARS-CoV-2 w teście ELISA przez przeciwciała pochodzące z surowic pacjentów (Schwarze i wsp., 2024). Powyższe doniesienia także są zbieżne z opisanymi przeze mnie wcześniej wynikami badań z wykorzystaniem panelu przeciwciał konformacyjnych i neutralizujących.

W wielu ze wspomnianych powyżej badań glikozylacja wirusa była badana zarówno jako potencjalny cel terapii, jak i w kontekście projektowania szczepionek. Ogromna ilość danych dotyczących złożoności glikanów i znaczenia glikozylacji białek wirusowych stanowi nową dziedzinę badań, która jest określana jako glikoproteomika wirusów (Bagdonaite i wsp., 2018). Postęp glikoproteomiki wirusowej zbiegł się w czasie rozwojem spektrometrii mas. Narzędzie to odegrało ogromną rolę w ujawnianiu właściwości chemicznych glikanów, zrozumieniu mechanizmów fałdowania i stabilizacji białek, maskowania antygenów, interakcji z układem immunologicznym gospodarza, czy oddziaływań receptor-ligand. Techniki glikoproteomiczne mogą być także przydatne w ocenie bezpieczeństwa i skuteczności szczepionek (Cipollo i Parsons, 2020).

Większość danych dotyczących wpływu usuwania lub dodawania wirusowych N-glikanów opiera się na analizie białek rekombinowanych generowanych *in vitro*, tymczasem istnieje stosunkowo niewiele badań glikoproteomicznych białek wirusowych pochodzących bezpośrednio od pacjentów. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy uzyskałam poprzez analizę sekwencji wariantów glikoprotein HCV wyizolowanych z próbek klinicznych. Dlatego powyższe obserwacje mogą przyczynić się do zrozumienia roli wirusowej N-glikozylacji w kontekście zakażenia HCV. Chociaż zaobserwowałam korelację

między nieprawidłową glikozylacją, a brakiem odpowiedzi na terapię skojarzoną interferonem i rybawiryną, liczba próbek była zbyt ograniczona, aby stwierdzić, że brak glikanów jest bezpośrednio związany z obserwacjami klinicznymi. W związku z tym konieczne są dalsze badania dynamicznych zmian glikozylacji białek wirusowych w izolatach klinicznych HCV w celu określenia wpływu glikozylacji białek wirusowych na przebieg zakażenia wirusem. Zastosowanie nowych technologii do badań struktury glikanów może ułatwić rozwój szczepionek wirusowych i leków przeciwwirusowych.

11. Bibliografia

Ait-Goughoulte M, Hourieux C, Patient R, Trassard S, Brand D, Roingard P. Core protein cleavage by signal peptide peptidase is required for hepatitis C virus-like particle assembly. *J Gen Virol*. **2006** Apr; 87(Pt 4):855-860. doi: 10.1099/vir.0.81664-0.

Akazawa D, Moriyama M, Yokokawa H, Omi N, Watanabe N, Date T, Morikawa K, Aizaki H, Ishii K, Kato T, Mochizuki H, Nakamura N, Wakita T. Neutralizing antibodies induced by cell culture-derived hepatitis C virus protect against infection in mice. *Gastroenterology*. **2013** Aug;145(2):447-55.e1-4. doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.007.

Alazard-Dany N, Denolly S, Boson B, Cosset FL. Overview of HCV Life Cycle with a Special Focus on Current and Possible Future Antiviral Targets. *Viruses*. **2019** Jan 6;11(1):30. doi: 10.3390/v11010030.

Alter HJ, Holland PV, Morrow AG, Purcell RH, Feinstone SM, Moritsugu Y. Clinical and serological analysis of transfusion-associated hepatitis. *Lancet*. **1975** Nov 1;2(7940):838-41. doi: 10.1016/s0140-6736(75)90234-2.

Altman MO, Angel M, Košík I, Trovão NS, Zost SJ, Gibbs JS, Casalino L, Amaro RE, Hensley SE, Nelson MI. Human Influenza A Virus Hemagglutinin Glycan Evolution Follows a Temporal Pattern to a Glycan Limit. *mBio* **2019**, 10, e00204-19. doi: 0.1128/mBio.00204-19.

Alvisi G, Madan V, Bartenschlager R. Hepatitis C virus and host cell lipids: an intimate connection. *RNA Biol*. **2011** Mar-Apr;8(2):258-69. doi: 10.4161/rna.8.2.15011.

Alzua GP, Pihl AF, Offersgaard A, Velázquez-Moctezuma R, Duarte Hernandez CR, Augestad EH, Fahnøe U, Mathiesen CK, Krarup H, Law M, Prentoe J, Bukh J, Gottwein JM. Identification of novel neutralizing determinants for protection against HCV. *Hepatology*. **2023** Mar 1;77(3):982-996. doi: 10.1002/hep.32772.

Ando T, Aizaki H, Sugiyama M, Date T, Hayashi K, Ishigami M, Katano Y, Goto H, Mizokami M, Muramatsu M, Kuroda M, Wakita T. Independent evolution of multi-dominant viral genome species observed in a hepatitis C virus carrier. *Biochem Biophys Rep*. **2022** Aug 29;32:101327. doi: 10.1016/j.bbrep.2022.101327.

Anjum S, Wahid A, Afzal MS, Albecka A, Alsaleh K, Ahmad T, Baumert TF, Wychowski C, Qadri I, Penin F, Dubuisson J. Additional glycosylation within a specific hypervariable region of subtype 3a of hepatitis C virus protects against virus neutralization. *J Infect Dis.* **2013** Dec 1;208(11):1888-97. doi: 10.1093/infdis/jit376.

Antaki N, Craxi A, Kamal S, Moucari R, Van der Merwe S, Haffar S, Gadano A, Zein N, Lai CL, Pawlotsky JM, Heathcote EJ, Dusheiko G, Marcellin P. The neglected hepatitis C virus genotypes 4, 5 and 6: an international consensus report. *Liver Int.* **2010** Mar;30(3):342-55. doi: 10.1111/j.1478-3231.2009.02188.x.

Appel N, Pietschmann T, Bartenschlager R. Mutational analysis of hepatitis C virus nonstructural protein 5A: potential role of differential phosphorylation in RNA replication and identification of a genetically flexible domain. *J Virol.* **2005** Mar;79(5):3187-94. doi: 10.1128/JVI.79.5.3187-3194.2005.

Augestad EH, Bukh J, Prentoe J. Hepatitis C virus envelope protein dynamics and the link to hypervariable region 1. *Curr Opin Virol.* **2021** Oct; 50:69-75. doi: 10.1016/j.coviro.2021.07.006.

Augestad EH, Castelli M, Clementi N, Ströh LJ, Krey T, Burioni R, Mancini N, Bukh J, Prentoe J. Global and local envelope protein dynamics of hepatitis C virus determine broad antibody sensitivity. *Sci Adv.* **2020** Aug 26;6(35): eabb5938. doi: 10.1126/sciadv. abb5938.

Baboo S, Diedrich JK, Torres JL, Copps J, Singh B, Garrett PT, Ward AB, Paulson JC, Yates JR. 3rd. Evolving spike-protein N-glycosylation in SARS-CoV-2 variants. *Biorxiv* **2023**, 2023.05.08.539897. <https://doi.org/10.1101/2023.05.08.539897>.

Bagdonaite I, Wandall HH. Global aspects of viral glycosylation. *Glycobiology* **2018**, 28, 443–467. <https://doi.org/10.1093/glycob/cwy021>.

Bailey JR, Barnes E, Cox AL. Approaches, Progress, and Challenges to Hepatitis C Vaccine Development. *Gastroenterology.* **2019** Jan;156(2):418-430. doi: 10.1053/j.gastro.2018.08.060.

Ball JK, Tarr AW, McKeating JA. The past, present and future of neutralizing antibodies for hepatitis C virus. *Antiviral Res.* **2014** May;105(100):100-11. doi: 10.1016/j.antiviral.2014.02.013.

Banse P, Moeller R, Bruening J, Lasswitz L, Kahl S, Khan AG, Marcotrigiano J, Pietschmann T, Gerold G. CD81 Receptor Regions outside the Large Extracellular Loop Determine Hepatitis C Virus Entry into Hepatoma Cells. *Viruses*. **2018** Apr 20;10(4):207. doi: 10.3390/v10040207.

Bartenschlager R, Frese M, Pietschmann T. Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res*. **2004**; 63:71-180. doi: 10.1016/S0065-3527(04)63002-8.

Beljelarskaya SN, Orlova OV, Drutsa VL, Orlov VA, Timohova AV, Koroleva NN, Popenko VI, Ivanov AV, Spirin PV, Prassolov VS, Rubtsov PM, Kochetkov SN. Hepatitis C virus: The role of N-glycosylation sites of viral genotype 1b proteins for formation of viral particles in insect and mammalian cells. *Biochem Biophys Rep*. **2016** May 30; 7:98-105. doi: 10.1016/j.bbrep.2016.05.019.

Blanchard E, Belouzard S, Goueslain L, Wakita T, Dubuisson J, Wychowski C, Rouillé Y. Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol*. **2006** Jul; 80(14):6964-72. doi: 10.1128/JVI.00024-06.

Boyce SE, Tirunagari N, Niedziela-Majka A, Perry J, Wong M, Kan E, Lagpacan L, Barauskas O, Hung M, Fenaux M, Appleby T, Watkins WJ, Schmitz U, Sakowicz R. Structural and regulatory elements of HCV NS5B polymerase-- β -loop and C-terminal tail--are required for activity of allosteric thumb site II inhibitors. *PLoS One*. **2014** Jan 9;9(1):e84808. doi: 10.1371/journal.pone.0084808.

Brasher NA, Adhikari A, Lloyd AR, Tedla N, Bull RA. Hepatitis C Virus Epitope Immunodominance and B Cell Repertoire Diversity. *Viruses*. **2021** May 25;13(6):983. doi: 10.3390/v13060983.

Brazzoli M, Helenius A, Fong SK, Houghton M, Abrignani S, Merola M. Folding and dimerization of hepatitis C virus E1 and E2 glycoproteins in stably transfected CHO cells. *Virology*. **2005** Feb 5;332(1):438-53. doi: 10.1016/j.virol.2004.11.034.

Brillanti S, Garson J, Foli M, Whitby K, Deaville R, Masci C, Miglioli M, Barbara L. A pilot study of combination therapy with ribavirin plus interferon alfa for interferon alfa-resistant chronic hepatitis C. *Gastroenterology*. **1994** Sep;107(3):812-7. doi: 10.1016/0016-5085(94)90131-7.

Bunchorntavakul C, Mitrani R, Reddy KR. Advances in HCV and Cryoglobulinemic Vasculitis in the Era of DAAs: Are We at the End of the Road? *J Clin Exp Hepatol*. **2018** Mar;8(1):81-94. doi: 10.1016/j.jceh.2017.11.012.

Casalino L, Gaieb Z, Goldsmith JA, Hjorth CK, Dommer AC, Harbison AM, Fogarty CA, Barros EP, Taylor BC, McLellan JS, Fadda E, Amaro RE. Beyond Shielding: The Roles of Glycans in the SARS-CoV-2 Spike Protein. *ACS Cent Sci*. **2020** Oct 28;6(10):1722-1734. doi: 10.1021/acscentsci.0c01056.

Catanese MT, Uryu K, Kopp M, Edwards TJ, Andrus L, Rice WJ, Silvestry M, Kuhn RJ, Rice CM. Ultrastructural analysis of hepatitis C virus particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **2013** Jun 4;110(23):9505-10. doi: 10.1073/pnas.1307527110.

Chandler DE, Penin F, Schulten K, Chipot C. The p7 protein of hepatitis C virus forms structurally plastic, minimalist ion channels. *PLoS Comput Biol*. **2012**;8(9):e1002702. doi: 10.1371/journal.pcbi.1002702.

Chen SL, Morgan TR. The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int J Med Sci*. **2006**;3(2):47-52. doi: 10.7150/ijms.3.47.

Chmielewska AM, Rychłowska M, Król E, Solarz K, Bieńkowska-Szewczyk K. Wirusowe zapalenie wątroby typu C-nowe metody leczenia i zapobiegania [Novel methods of hepatitis C treatment and prevention]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. **2015** Aug 19; 69:946-63. Polish. doi: 10.5604/17322693.1165197.

Choo QL, Kuo G, Ralston R, Weiner A, Chien D, Van Nest G, Han J, Berger K, Thudium K, Kuo C, et al. Vaccination of chimpanzees against infection by the hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **1994** Feb 15;91(4):1294-8. doi: 10.1073/pnas.91.4.1294.

Cipollo JF, Parsons LM. Glycomics and glycoproteomics of viruses: Mass spectrometry applications and insights toward structure-function relationships. *Mass Spectrom Rev*. **2020** Jul;39(4):371-409. doi: 10.1002/mas.21629.

Cox AL. Challenges and Promise of a Hepatitis C Virus Vaccine. *Cold Spring Harb Perspect Med*. **2020** Feb 3;10(2):a036947. doi: 10.1101/cshperspect.a036947.

Czarnota A, Offersgaard A, Owsianka A, Alzua GP, Bukh J, Gottwein JM, Patel AH, Bieńkowska-Szewczyk K, Grzyb K. Effect of Glycan Shift on Antibodies against Hepatitis C Virus E2 412-425 Epitope Elicited by Chimeric sHBsAg-Based Virus-Like Particles. *Microbiol Spectr*. **2023** Jan 31;11(2):e0254622. doi: 10.1128/spectrum.02546-22.

Dao Thi VL, Granier C, Zeisel MB, Guérin M, Mancip J, Granio O, Penin F, Lavillette D, Bartenschlager R, Baumert TF, Cosset FL, Dreux M. Characterization of hepatitis C virus particle subpopulations reveals multiple usage of the scavenger receptor BI for entry steps. *J Biol Chem.* **2012** Sep 7;287(37):31242-57. doi: 10.1074/jbc.M112.365924.

de Haas P, Hendriks WJAJ, Lefeber DJ, Cambi A. Biological and Technical Challenges in Unraveling the Role of N-Glycans in Immune Receptor Regulation. *Front Chem.* **2020**; 8:55. Published 2020 Feb 5. doi:10.3389/fchem.2020.00055.

De Jong YP, Dorner M, Mommersteeg MC, Xiao JW, Balazs AB, Robbins JB, Winer BY, Gerges S, Vega K, Labitt RN, Donovan BM, Giang E, Krishnan A, Chiriboga L, Charlton MR, Burton DR, Baltimore D, Law M, Rice CM, Ploss A. Broadly neutralizing antibodies abrogate established hepatitis C virus infection. *Sci Transl Med.* **2014** Sep 17;6(254):254ra129. doi: 10.1126/scitranslmed.3009512.

Denolly S, Granier C, Fontaine N, Pozzetto B, Bourlet T, Guérin M, Cosset FL. A serum protein factor mediates maturation and apoB-association of HCV particles in the extracellular milieu. *J Hepatol.* **2019** Apr;70(4):626-638. doi: 10.1016/j.jhep.2018.11.033.

Desombere I, Fafi-Kremer S, Van Houtte F, Pessaux P, Farhoudi A, Heydmann L, Verhoye L, Cole S, McKeating JA, Leroux-Roels G, Baumert TF, Patel AH, Meuleman P. Monoclonal anti-envelope antibody AP33 protects humanized mice against a patient-derived hepatitis C virus challenge. *Hepatology.* **2016** Apr;63(4):1120-34. doi: 10.1002/hep.28428.

Dhillon S, Witteveldt J, Gatherer D, Owsianka AM, Zeisel MB, Zahid MN, Rychłowska M, Fong SK, Baumert TF, Angus AG, Patel AH. Mutations within a conserved region of the hepatitis C virus E2 glycoprotein that influence virus-receptor interactions and sensitivity to neutralizing antibodies. *J Virol.* **2010** Jun;84(11):5494-507. doi: 10.1128/JVI.02153-09.

Di Bisceglie AM, Martin P, Kassianides C, Lisker-Melman M, Murray L, Waggoner J, Goodman Z, Banks SM, Hoofnagle JH. Recombinant interferon alfa therapy for chronic hepatitis C. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. *N Engl J Med.* **1989** Nov 30;321(22):1506-10. doi: 10.1056/NEJM198911303212204.

Dodd RY, Notari EP 4th, Stramer SL. Current prevalence and incidence of infectious disease markers and estimated window-period risk in the American Red Cross blood donor population. *Transfusion.* **2002** Aug;42(8):975-9. doi: 10.1046/j.1537-2995.2002.00174.x.

Domingo E, Perales C. Viral quasispecies. *PLoS Genet.* **2019** Oct 17;15(10):e1008271. doi: 10.1371/journal.pgen.1008271.

Douam F, Lavillette D, Cosset FL. The mechanism of HCV entry into host cells. *Prog Mol Biol Transl Sci.* **2015**; 129:63-107. doi: 10.1016/bs.pmbts.2014.10.003. Epub 2014 Dec 12.

Drummer HE, Boo I, Maerz AL, Pountourios P. 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.* **2006** Aug;80(16):7844-53. doi: 10.1128/JVI.00029-06.

D'Souza R, Sabin CA, Foster GR. Insulin resistance plays a significant role in liver fibrosis in chronic hepatitis C and in the response to antiviral therapy. *Am J Gastroenterol.* **2005** Jul;100(7):1509-15. doi: 10.1111/j.1572-0241.2005.41403.x.

Dubuisson J, Cosset FL. Virology and cell biology of the hepatitis C virus life cycle: an update. *J Hepatol.* **2014** Nov;61(1 Suppl): S3-S13. doi: 10.1016/j.jhep.2014.06.031.

Dubuisson J, Duvet S, Meunier JC, Op De Beeck A, Cacan R, Wychowski C, Cocquerel L. Glycosylation of the hepatitis C virus envelope protein E1 is dependent on the presence of a downstream sequence on the viral polyprotein. *J Biol Chem.* **2000** Sep 29;275(39):30605-9. doi: 10.1074/jbc.M004326200.

Dultz G, Graubard BI, Martin P, Welker MW, Vermehren J, Zeuzem S, McGlynn KA, Welzel TM. Liver transplantation for chronic hepatitis C virus infection in the United States 2002-2014: An analysis of the UNOS/OPTN registry. *PLoS One.* **2017** Oct 31;12(10):e0186898. doi: 10.1371/journal.pone.0186898.

Dustin LB. Innate and Adaptive Immune Responses in Chronic HCV Infection. *Curr Drug Targets.* **2017**;18(7):826-843. doi: 10.2174/1389450116666150825110532.

Einav S, Gerber D, Bryson PD, Sklan EH, Elazar M, Maerkl SJ, Glenn JS, Quake SR. dubuissonanalysis. *Nat Biotechnol.* **2008** Sep;26(9):1019-27. doi: 10.1038/nbt.1490.

Elmowalid GA, Qiao M, Jeong SH, Borg BB, Baumert TF, Sapp RK, Hu Z, Murthy K, Liang TJ. Immunization with hepatitis C virus-like particles results in control of hepatitis C virus infection in chimpanzees. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2007** May 15;104(20):8427-32. doi: 10.1073/pnas.0702162104.

Evans MJ, Rice CM, Goff SP. Phosphorylation of hepatitis C virus nonstructural protein 5A modulates its protein interactions and viral RNA replication. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2004** Aug 31;101(35):13038-43. doi: 10.1073/pnas.0405152101.

Falkowska E, Kajumo F, Garcia E, Reinus J, Dragic T. Hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 glycans modulate entry, CD81 binding, and neutralization. *J Virol*. **2007** Aug;81(15):8072-9. doi: 10.1128/JVI.00459-07.

Fang P, Ji Y, Oellerich T, Urlaub H, Pan KT. Strategies for Proteome-Wide Quantification of Glycosylation Macro- and Micro-Heterogeneity. *Int J Mol Sci*. **2022**;23(3):1609. Published 2022 Jan 30. doi:10.3390/ijms23031609.

Farquhar MJ, Hu K, Harris HJ, Davis C, Brimacombe CL, Fletcher SJ, Baumert TF, Rappoport JZ, Balfe P, McKeating JA. Hepatitis C virus induces CD81 and claudin-1 endocytosis. *J Virol*. **2012** Apr;86(8):4305-16. doi: 10.1128/JVI.06996-11. Epub 2012 Feb 8.

Fénéant L, Levy S, Cocquerel L. CD81 and hepatitis C virus (HCV) infection. *Viruses*. **2014** Feb 6;6(2):535-72. doi: 10.3390/v6020535.

Feng T, Zhang J, Chen Z, Pan W, Chen Z, Yan Y, Dai J. Glycosylation of viral proteins: Implication in virus-host interaction and virulence. *Virulence*. **2022** Dec;13(1):670-683. doi: 10.1080/21505594.2022.2060464.

Fenouillet E, Lavillette D, Loureiro S, Krashias G, Maurin G, Cosset FL, Jones IM, Barbouche R. Contribution of redox status to hepatitis C virus E2 envelope protein function and antigenicity. *J Biol Chem*. **2008** Sep 26;283(39):26340-8. doi: 10.1074/jbc.M805221200.

Figlerowicz M, Jackowiak P, Formanowicz P, Kędziora P, Alejska M, Malinowska N, Błażewicz J, Figlerowicz M. Hepatitis C virus quasispecies in chronically infected children subjected to interferon-ribavirin therapy. *Arch Virol*. **2010** Dec;155(12):1977-87. doi: 10.1007/s00705-010-0789-7.

Figlerowicz M, Sluzewski W, Kowala-Piaskowska A, Mozer-Lisewska I. Interferon alpha and ribavirin in the treatment of children with chronic hepatitis C. *Eur J Pediatr*. **2004** Apr;163(4-5):265-7. doi: 10.1007/s00431-004-1418-9.

Flisiak R, Zarębska-Michaluk D, Janczewska E, Staniaszek A, Gietka A, Mazur W, Tudrujek M, Tomasiewicz K, Belica-Wdowik T, Baka-Ćwierz B, Dybowska D, Halota W, Lorenc B, Sitko M, Garlicki A, Berak H, Horban A, Orłowska I, Simon K, Socha Ł, Wawrzynowicz-Syczewska M, Jaroszewicz J, Deroń Z, Czauż-Andrzejuk A, Citko J, Krygier R, Piekarska A, Laurans Ł, Dobracki W, Białkowska J, Tronina O, Pawłowska M. Treatment of HCV infection in Poland at the beginning of the interferon-free era-the EpiTer-2 study. *J Viral Hepat*. **2018** Jun;25(6):661-669. doi: 10.1111/jvh.12861.

Folgori A, Capone S, Ruggeri L, Meola A, Sporeno E, Ercole BB, Pezzanera M, Tafi R, Arcuri M, Fattori E, Lahm A, Luzzago A, Vitelli A, Colloca S, Cortese R, Nicosia A. A T-cell HCV vaccine eliciting effective immunity against heterologous virus challenge in chimpanzees. *Nat Med.* **2006** Feb;12(2):190-7. doi: 10.1038/nm1353.

Foster GR, Hézode C, Bronowicki JP, Carosi G, Weiland O, Verlinden L, van Heeswijk R, van Baelen B, Picchio G, Beumont M. Telaprevir alone or with peginterferon and ribavirin reduces HCV RNA in patients with chronic genotype 2 but not genotype 3 infections. *Gastroenterology.* **2011** Sep;141(3):881-889.e1. doi: 10.1053/j.gastro.2011.05.046.

Frey SE, Houghton M, Coates S, Abrignani S, Chien D, Rosa D, Pileri P, Ray R, Di Bisceglie AM, Rinella P, Hill H, Wolff MC, Schultze V, Han JH, Scharschmidt B, Belshe RB. Safety and immunogenicity of HCV E1E2 vaccine adjuvanted with MF59 administered to healthy adults. *Vaccine.* **2010** Aug 31;28(38):6367-73. doi: 10.1016/j.vaccine.2010.06.084.

García-Sastre A, Biron CA. Type 1 interferons and the virus-host relationship: a lesson in détente . *Science.* **2006** May 12;312(5775):879-82. doi: 10.1126/science.1125676. PMID: 16690858.

Gastaminza P, Dryden KA, Boyd B, Wood MR, Law M, Yeager M, Chisari FV. Ultrastructural and biophysical characterization of hepatitis C virus particles produced in cell culture. *J Virol.* **2010** Nov;84(21):10999-1009. doi: 10.1128/JVI.00526-10.

Gerresheim GK, Roeb E, Michel AM, Niepmann M. Hepatitis C Virus Downregulates Core Subunits of Oxidative Phosphorylation, Reminiscent of the Warburg Effect in Cancer Cells. *Cells.* **2019** Nov 8;8(11):1410. doi: 10.3390/cells8111410.

Ghany MG, Morgan TR; AASLD-IDS A Hepatitis C Guidance Panel. Hepatitis C Guidance 2019 Update: American Association for the Study of Liver Diseases-Infectious Diseases Society of America Recommendations for Testing, Managing, and Treating Hepatitis C Virus Infection. *Hepatology.* **2020** Feb;71(2):686-721. doi: 10.1002/hep.31060.

Goffard A, Callens N, Bartosch B, Wychowski C, Cosset FL, Montpellier C, Dubuisson J. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope glycoproteins. *J Virol.* **2005** Jul;79(13):8400-9. doi: 10.1128/JVI.79.13.8400-8409.2005.

Guidotti LG, Chisari FV. Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu Rev Pathol.* **2006**;1:23-61. doi: 10.1146/annurev.pathol.1.110304.100230.

Haddad JG, Rouillé Y, Hanouille X, Descamps V, Hamze M, Dabboussi F, Baumert TF, Duverlie G, Lavie M, Dubuisson J. Identification of Novel Functions for Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly. *J Virol.* **2017** Mar 29;91(8):e00048-17. doi: 10.1128/JVI.00048-17.

Hajarizadeh B, Grebely J, Dore GJ. Epidemiology and natural history of HCV infection. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* **2013** Sep;10(9):553-62. doi: 10.1038/nrgastro.2013.107.

Hansen MD, Johnsen IB, Stiberg KA, Sherstova T, Wakita T, Richard GM, Kandasamy RK, Meurs EF, Anthonsen MW. Hepatitis C virus triggers Golgi fragmentation and autophagy through the immunity-related GTPase M. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2017** Apr 25;114(17):E3462-E3471. doi: 10.1073/pnas.1616683114.

Harbison AM, Fogarty CA, Phung TK, Satheesan A, Schulz BL, Fadda E. Fine-tuning the spike: role of the nature and topology of the glycan shield in the structure and dynamics of the SARS-CoV-2 S. *Chem Sci.* **2021**;13(2):386-395. doi:10.1039/d1sc04832e.

Harris HJ, Clerte C, Farquhar MJ, Goodall M, Hu K, Rassam P, Dosset P, Wilson GK, Balfe P, Ijzendoorn SC, Milhiet PE, McKeating JA. Hepatoma polarization limits CD81 and hepatitis C virus dynamics. *Cell Microbiol.* **2013** Mar;15(3):430-45. doi: 10.1111/cmi.12047.

Helle F, Vieyres G, Elkrief L, Popescu CI, Wychowski C, Descamps V, Castelain S, Roingard P, Duverlie G, Dubuisson J. Role of N-linked glycans in the functions of hepatitis C virus envelope proteins incorporated into infectious virions. *J Virol.* **2010** Nov;84(22):11905-15. doi: 10.1128/JVI.01548-10.

Hirano J, Yoshio S, Sakai Y, Songling L, Suzuki T, Itoh Y, Zhang H, Chen DV, Haga S, Oomori H, Kodama T, Maeda Y, Ono Y, Takahashi Y, Standley DM, Yamamoto M, Moriishi K, Moriya K, Kanto T, Takehara T, Koike K, Matsuura Y, Okamoto T. Hepatitis C virus modulates signal peptide peptidase to alter host protein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2021** Jun 1;118(22):e2026184118. doi: 10.1073/pnas.2026184118.

Hoofnagle JH, Mullen KD, Jones DB, Rustgi V, Di Bisceglie A, Peters M, Waggoner JG, Park Y, Jones EA. Treatment of chronic non-A,non-B hepatitis with recombinant human alpha interferon. A preliminary report. *N Engl J Med.* **1986** Dec 18;315(25):1575-8. doi: 10.1056/NEJM198612183152503.

Hoofnagle JH, Seeff LB. Peginterferon and ribavirin for chronic hepatitis C. *N Engl J Med.* **2006** Dec 7;355(23):2444-51. doi: 10.1056/NEJMct061675.

Ives CM, Nguyen L, Fogarty CA, Harbison AM, Durocher Y, Klassen J, Fadda E. Role of N343 glycosylation on the SARS-CoV-2 S RBD structure and co-receptor binding across variants of concern. *Elife*. **2024** Jun 12;13:RP95708. doi: 10.7554/eLife.95708.

Jan M, Upadhyay C, Alcamí Pertejo J, Hioe CE, Arora SK. Heterogeneity in glycan composition on the surface of HIV-1 envelope determines virus sensitivity to lectins. *PLoS ONE* **2018**, 13, e0194498. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194498>.

Jiang J, Cun W, Wu X, Shi Q, Tang H, Luo G. Hepatitis C virus attachment mediated by apolipoprotein E binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol*. **2012** Jul;86(13):7256-67. doi: 10.1128/JVI.07222-11.

Jirasko V, Montserret R, Lee JY, Gouttenoire J, Moradpour D, Penin F, Bartenschlager R. Structural and functional studies of nonstructural protein 2 of the hepatitis C virus reveal its key role as organizer of virion assembly. *PLoS Pathog*. **2010** Dec 16;6(12):e1001233. doi: 10.1371/journal.ppat.1001233

Jung MK, Shin EC. Regulatory T Cells in Hepatitis B and C Virus Infections. *Immune Netw*. **2016** Dec;16(6):330-336. doi: 10.4110/in.2016.16.6.330.

Kaku H, Goldstein IJ. Snowdrop lectin. *Methods Enzymol*. **1989** May 01; 179():327-31

Keck ZY, Wang Y, Lau P, Lund G, Rangarajan S, Fauvelle C, Liao GC, Holtsberg FW, Warfield KL, Aman MJ, Pierce BG, Fuerst TR, Bailey JR, Baumert TF, Mariuzza RA, Kneteman NM, Fong SK. Affinity maturation of a broadly neutralizing human monoclonal antibody that prevents acute hepatitis C virus infection in mice. *Hepatology*. **2016** Dec;64(6):1922-1933. doi: 10.1002/hep.28850.

Kenfack-Momo R, Ngounoue MD, Kenmoe S, Takuissu GR, Ebogo-Belobo JT, Kengne-Ndé C, Mbaga DS, Zeuko'o Menkem E, Lontuo Fogang R, Tchatchouang S, Ndzie Ondigui JL, Kame-Ngasse GI, Kenfack-Zanguim J, Magoudjou-Pekam JN, Bowo-Ngandji A, Mahamat M, Nkie Esemu S, Ndip L, Njouom R. Global epidemiology of hepatitis C virus in dialysis patients: A systematic review and meta-analysis. *PLoS One*. **2024** Feb 8;19(2):e0284169. doi: 10.1371/journal.pone.0284169.

Khera T, Behrendt P, Bankwitz D, Brown RJP, Todt D, Doepke M, Khan AG, Schulze K, Law J, Logan M, Hockman D, Wong JAJ, Dold L, Gonzalez-Motos V, Spengler U, Viejo-Borbolla A, Ströh LJ, Krey T, Tarr AW, Steinmann E, Manns MP, Klein F, Guzman CA, Marcotrigiano J, Houghton M, Pietschmann T. Functional and immunogenic characterization

of diverse HCV glycoprotein E2 variants. *J Hepatol.* **2019** Apr;70(4):593-602. doi: 10.1016/j.jhep.2018.11.003.

Kim CW, Chang KM. Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clin Mol Hepatol.* **2013** Mar;19(1):17-25. doi: 10.3350/cmh.2013.19.1.17.

Knop V, Hoppe D, Vermehren J, Troetschler S, Herrmann E, Vermehren A, Friedrich-Rust M, Sarrazin C, Trebicka J, Zeuzem S, Welker MW. Non-invasive assessment of fibrosis regression and portal hypertension in patients with advanced chronic hepatitis C virus (HCV)-associated liver disease and sustained virologic response (SVR): 3 years follow-up of a prospective longitudinal study. *J Viral Hepat.* **2021** Nov;28(11):1604-1613. doi: 10.1111/jvh.13587.

Kong L, Giang E, Nieuwma T, Kadam RU, Cogburn KE, Hua Y, Dai X, Stanfield RL, Burton DR, Ward AB, Wilson IA, Law M. Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science.* **2013** Nov 29;342(6162):1090-4. doi:10.1126/science.1243876.

Kong L, Lee DE, Kadam RU, Liu T, Giang E, Nieuwma T, Garces F, Tzarum N, Woods VL Jr, Ward AB, Li S, Wilson IA, Law M. Structural flexibility at a major conserved antibody target on hepatitis C virus E2 antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016** Nov 8;113(45):12768-12773. doi: 10.1073/pnas.1609780113.

Kouroumalis E, Voumvouraki A. Hepatitis C virus: A critical approach to who really needs treatment. *World J Hepatol.* **2022** Jan 27;14(1):1-44. doi: 10.4254/wjh.v14.i1.1. PMID: 35126838; PMCID: PMC8790391.

Kumthip K, Chusri P, Jilg N, Zhao L, Fusco DN, Zhao H, Goto K, Cheng D, Schaefer EA, Zhang L, Pantip C, Thongsawat S, O'Brien A, Peng LF, Maneekarn N, Chung RT, Lin W. Hepatitis C virus NS5A disrupts STAT1 phosphorylation and suppresses type I interferon signaling. *J Virol.* **2012** Aug;86(16):8581-91. doi: 10.1128/JVI.00533-12.

Kurktschiev PD, Raziorrouh B, Schraut W, Backmund M, Wächtler M, Wendtner CM, Bengsch B, Thimme R, Denk G, Zachoval R, Dick A, Spannagl M, Haas J, Diepolder HM, Jung MC, Gruener NH. Dysfunctional CD8⁺ T cells in hepatitis B and C are characterized by a lack of antigen-specific T-bet induction. *J Exp Med.* **2014** Sep 22;211(10):2047-59. doi: 10.1084/jem.20131333.

Kushner T, Reau N. Changing epidemiology, implications, and recommendations for hepatitis C in women of childbearing age and during pregnancy. *J Hepatol.* **2021** Mar;74(3):734-741. doi: 10.1016/j.jhep.2020.11.027.

Larrubia JR, Moreno-Cubero E, Lokhande MU, García-Garzón S, Lázaro A, Miquel J, Perna C, Sanz-de-Villalobos E. Adaptive immune response during hepatitis C virus infection. *World J Gastroenterol.* **2014** Apr 7;20(13):3418-30. doi: 10.3748/wjg.v20.i13.3418.

Lavie M, Hanouille X, Dubuisson J. Glycan Shielding and Modulation of Hepatitis C Virus Neutralizing Antibodies. *Front Immunol.* **2018** Apr 27; 9:910. doi: 10.3389/fimmu.2018.00910.

Law JL, Chen C, Wong J, Hockman D, Santer DM, Frey SE, Belshe RB, Wakita T, Bukh J, Jones CT, Rice CM, Abrignani S, Tyrrell DL, Houghton M. A hepatitis C virus (HCV) vaccine comprising envelope glycoproteins gpE1/gpE2 derived from a single isolate elicits broad cross-genotype neutralizing antibodies in humans. *PLoS One.* **2013**;8(3):e59776. doi: 10.1371/journal.pone.0059776.

Law M, Maruyama T, Lewis J, Giang E, Tarr AW, Stamataki Z, Gastaminza P, Chisari FV, Jones IM, Fox RI, Ball JK, McKeating JA, Kneteman NM, Burton DR. Broadly neutralizing antibodies protect against hepatitis C virus quasispecies challenge. *Nat Med.* **2008** Jan;14(1):25-7. doi: 10.1038/nm1698.

LeBlanc EV, Kim Y, Capicciotti CJ, Colpitts CC. Hepatitis C Virus Glycan-Dependent Interactions and the Potential for Novel Preventative Strategies. *Pathogens.* **2021** Jun 1;10(6):685. doi: 10.3390/pathogens10060685.

Li D, Huang Z, Zhong J. Hepatitis C virus vaccine development: old challenges and new opportunities. *Nat Sci Rev.* **2015**; 2:285–95. doi: 10.1093/nsr/nwv040.

Li L, Shi K, Gu Y, et al. Spike structures, receptor binding, and immune escape of recently circulating SARS-CoV-2 Omicron BA.2.86, JN.1, EG.5, EG.5.1, and HV.1 sub-variants. *Structure.* **2024**;32(8):1055-1067.e6. doi:10.1016/j.str.2024.06.012.

Liu P, Yue C, Meng B, Xiao T, Yang S, Liu S, Jian F, Zhu Q, Yu Y, Ren Y, Wang P, Li Y, Wang J, Mao X, Shao F, Wang Y, Gupta RK, Cao Y, Wang X. Spike N354 glycosylation augments SARS-CoV-2 fitness for human adaptation through structural plasticity. *Nat Sci Rev.* **2024** Jun 14;11(7):nwae206. doi: 10.1093/nsr/nwae206.

Loureiro D, Tout I, Narguet S, Benazzouz SM, Mansouri A, Asselah T. miRNAs as Potential Biomarkers for Viral Hepatitis B and C. *Viruses*. **2020** Dec 14;12(12):1440. doi: 10.3390/v12121440.

Maillard P, Huby T, Andreo U, Moreau M, Chapman J, Budkowska A. The interaction of natural hepatitis C virus with human scavenger receptor SR-BI/Cla1 is mediated by ApoB-containing lipoproteins. *FASEB J*. **2006**; 20(6):735–7. doi:10.1096/fj.05-4728fje.

Malaquias MAS, Gadotti AC, Motta-Junior JDS, Martins APC, Azevedo MLV, Benevides APK, César-Neto P, Panini do Carmo LA, Zeni RC, Raboni SM, Fonseca AS, Machado-Souza C, Moreno-Amaral AN, de Noronha L. The role of the lectin pathway of the complement system in SARS-CoV-2 lung injury. *Transl Res*. **2021** May;231:55-63. doi: 10.1016/j.trsl.2020.11.008.

Mani H, Yen JH, Hsu HJ, Chang CC, Liou JW. Hepatitis C virus core protein: Not just a nucleocapsid building block, but an immunity and inflammation modulator. *Tzu Chi Med J*. **2021** Sep 24;34(2):139-147. doi: 10.4103/tcmj.tcmj_97_21.

Manns MP, Maasoumy B. Breakthroughs in hepatitis C research: from discovery to cure. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. **2022** Aug;19(8):533-550. doi: 10.1038/s41575-022-00608-8.

Martini S. Hepatitis C and liver transplantation. *Minerva Gastroenterol Dietol*. **2018** Jun;64(2):158-169. doi: 10.23736/S1121-421X.17.02448-5.

Maurin G, Fresquet J, Granio O, Wychowski C, Cosset FL, Lavillette D. Identification of interactions in the E1E2 heterodimer of hepatitis C virus important for cell entry. *J Biol Chem*. **2011** Jul 8;286(27):23865-76. doi: 10.1074/jbc.M110.213942.

Messina JP, Humphreys I, Flaxman A, Brown A, Cooke GS, Pybus OG, Barnes E. Global distribution and prevalence of hepatitis C virus genotypes. *Hepatology* **2015**; 61: 77–87. <https://doi.org/10.1002/hep.27259>.

Moosavy SH, Davoodian P, Nazarnezhad MA, Nejatizadeh A, Eftekhari E, Mahboobi H. Epidemiology, transmission, diagnosis, and outcome of Hepatitis C virus infection. *Electron Physician*. **2017** Oct 25;9(10):5646-5656. doi: 10.19082/5646.

Moradpour D, Penin F, Rice CM. Replication of hepatitis C virus. *Nat Rev Microbiol*. **2007** Jun;5(6):453-63. doi: 10.1038/nrmicro1645.

Moriishi K, Matsuura Y. Exploitation of lipid components by viral and host proteins for hepatitis C virus infection. *Front Microbiol.* **2012** Feb 14;3:54. doi: 10.3389/fmicb.2012.00054.

Morikawa K, Lange CM, Gouttenoire J, Meylan E, Brass V, Penin F, Moradpour D. Nonstructural protein 3-4A: the Swiss army knife of hepatitis C virus. *J Viral Hepat.* **2011** May;18(5):305-15. doi: 10.1111/j.1365-2893.2011.01451.x.

Morin TJ, Broering TJ, Leav BA, Blair BM, Rowley KJ, Boucher EN, Wang Y, Cheslock PS, Knauber M, Olsen DB, Ludmerer SW, Szabo G, Finberg RW, Purcell RH, Lanford RE, Ambrosino DM, Molrine DC, Babcock GJ. Human monoclonal antibody HCV1 effectively prevents and treats HCV infection in chimpanzees. *PLoS Pathog.* **2012**;8(8):e1002895. doi: 10.1371/journal.ppat.1002895.

Morozov VA, Lagaye S. Hepatitis C virus: Morphogenesis, infection and therapy. *World J Hepatol.* **2018** Feb 27;10(2):186-212. doi: 10.4254/wjh.v10.i2.186.

Muñoz de Rueda P, Casado J, Patón R, Quintero D, Palacios A, Gila A, Quiles R, León J, Ruiz-Extremera A, Salmerón J. Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of hepatitis C virus genotype 1 and their relationships to pegylated interferon-ribavirin treatment responses. *J. Virol.* **2008**, 82: 6644–6653. <https://doi.org/10.1128/JVI.02231-07>.

Muntjewerff EM, Meesters LD, van den Bogaart G, Revelo NH. Reverse Signaling by MHC-I Molecules in Immune and Non-Immune Cell Types. *Front Immunol.* **2020** Dec 15;11:605958. doi: 10.3389/fimmu.2020.605958.

Mushtaq S, Hashmi AH, Khan A, Asad Raza Kazmi SM, Manzoor S. Emergence and Persistence of Resistance-Associated Substitutions in HCV GT3 Patients Failing Direct-Acting Antivirals. *Front Pharmacol.* **2022** Apr 27;13:894460. doi: 10.3389/fphar.2022.894460.

Nakamoto N, Kaplan DE, Coleclough J, Li Y, Valiga ME, Kaminski M, Shaked A, Olthoff K, Gostick E, Price DA, Freeman GJ, Wherry EJ, Chang KM. Functional restoration of HCV-specific CD8 T cells by PD-1 blockade is defined by PD-1 expression and compartmentalization. *Gastroenterology.* **2008** Jun;134(7):1927-37, 1937.e1-2. doi: 10.1053/j.gastro.2008.02.033.

Neumann-Haefelin C, Frick DN, Wang JJ, Pybus OG, Salloum S, Narula GS, Eckart A, Biezyński A, Eiermann T, Klenerman P, Viazov S, Roggendorf M, Thimme R, Reiser M, Timm J. Analysis of the evolutionary forces in an immunodominant CD8 epitope in hepatitis C virus at a population level. *J Virol.* **2008** Apr;82(7):3438-51. doi: 10.1128/JVI.01700-07. Epub 2008 Jan 23. Erratum in: *J Virol.* **2011** May;85(9):4634.

Newby ML, Allen JD, Crispin M. Influence of glycosylation on the immunogenicity and antigenicity of viral immunogens. *Biotechnol. Adv.* **2023**, 70, 108283. Advance online publication. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2023.108283>.

Nwaohiri A, Schillie S, Bulterys M, Kourtis AP. Hepatitis C virus infection in children: How do we prevent it and how do we treat it? *Expert Rev Anti Infect Ther.* **2018** Sep;16(9):689-694. doi: 10.1080/14787210.2018.1509707.

Orlova OV, Drutsa VL, Spirin PV, Prasolo VS, Rubtsov PM, Kochetkov SN, Beljelarskaya SN. The role of HCV e2 protein glycosylation in functioning of virus envelope proteins in insect and Mammalian cells. *Acta Naturae* **2015**, 7: 87–97.

Osburn WO, Snider AE, Wells BL, Latanich R, Bailey JR, Thomas DL, Cox AL, Ray SC. Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology.* **2014** Jun;59(6):2140-51. doi: 10.1002/hep.27013.

Owsianka A, Tarr AW, Juttla VS, Lavillette D, Bartosch B, Cosset FL, Ball JK, Patel AH. Monoclonal antibody AP33 defines a broadly neutralizing epitope on the hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein. *J Virol.* **2005** Sep;79(17):11095-104. doi: 10.1128/JVI.79.17.11095-11104.2005.

Page K, Melia MT, Veenhuis RT, Winter M, Rousseau KE, Massaccesi G, Osburn WO, Forman M, Thomas E, Thornton K, Wagner K, Vassilev V, Lin L, Lum PJ, Giudice LC, Stein E, Asher A, Chang S, Gorman R, Ghany MG, Liang TJ, Wierzbicki MR, Scarselli E, Nicosia A, Folgori A, Capone S, Cox AL. Randomized Trial of a Vaccine Regimen to Prevent Chronic HCV Infection. *N Engl J Med.* **2021** Feb 11;384(6):541-549. doi: 10.1056/NEJMoa2023345.

Pantua H, Diao J, Ultsch M, Hazen M, Mathieu M, McCutcheon K, Takeda K, Date S, Cheung TK, Phung Q, Hass P, Arnott D, Hongo JA, Matthews DJ, Brown A, Patel AH, Kelley RF, Eigenbrot C, Kapadia SB. Glycan shifting on hepatitis C virus (HCV) E2

glycoprotein is a mechanism for escape from broadly neutralizing antibodies. *J Mol Biol.* **2013** Jun 12;425(11):1899-1914. doi: 10.1016/j.jmb.2013.02.025.

Paolucci S, Premoli M, Novati S, Gulminetti R, Maserati R, Barbarini G, Sacchi P, Piralla A, Sasser D, De Marco L, Girello A, Mondelli MU, Baldanti F. Baseline and Breakthrough Resistance Mutations in HCV Patients Failing DAAs. *Sci Rep.* **2017** Nov 22;7(1):16017. doi: 10.1038/s41598-017-15987-1.

Petruzzello A, Marigliano S, Loquercio G, Cozzolino A, Cacciapuoti C. Global epidemiology of hepatitis C virus infection: an up-date of the distribution and circulation of hepatitis C virus genotypes. *World J Gastroenterol.* **2016**; 22(34):7824–40. doi:10.3748/wjg.v22.i34.782

Pierce BG, Keck ZY, Lau P, Fauvelle C, Gowthaman R, Baumert TF, Fuerst TR, Mariuzza RA, Fong SKH. Global mapping of antibody recognition of the hepatitis C virus E2 glycoprotein: Implications for vaccine design. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2016** Nov 8;113(45):E6946-E6954. doi: 10.1073/pnas.1614942113.

Polaris Observatory HCV Collaborators. Global prevalence and genotype distribution of hepatitis C virus infection in 2015: a modelling study. *Lancet Gastroenterol Hepatol.* **2017** Mar;2(3):161-176. doi: 10.1016/S2468-1253(16)30181-9.

Potel J, Rassam P, Montpellier C, Kaestner L, Werkmeister E, Tews BA, Couturier C, Popescu CI, Baumert TF, Rubinstein E, Dubuisson J, Milhiet PE, Cocquerel L. EWI-2wint promotes CD81 clustering that abrogates Hepatitis C Virus entry. *Cell Microbiol.* **2013** Jul;15(7):1234-52. doi: 10.1111/cmi.12112.

Prentoe J, Velázquez-Moctezuma R, Augestad EH, Galli A, Wang R, Law M, Alter H, Bukh J. Hypervariable region 1 and N-linked glycans of hepatitis C regulate virion neutralization by modulating envelope conformations. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2019** May 14;116(20):10039-10047. doi: 10.1073/pnas.1822002116.

Raghuraman S, Park H, Osburn WO, Winkelstein E, Edlin BR, Rehermann B. Spontaneous clearance of chronic hepatitis C virus infection is associated with appearance of neutralizing antibodies and reversal of T-cell exhaustion. *J Infect Dis.* **2012** Mar 1;205(5):763-71. doi: 10.1093/infdis/jir835.

Rai R, Deval J. New opportunities in anti-hepatitis C virus drug discovery: targeting NS4B. *Antiviral Res.* **2011** May;90(2):93-101. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.01.009.

Ralston R, Thudium K, Berger K, Kuo C, Gervase B, Hall J, Selby M, Kuo G, Houghton M, Choo QL. Characterization of hepatitis C virus envelope glycoprotein complexes expressed by recombinant vaccinia viruses. *J Virol.* **1993** Nov;67(11):6753-61. doi: 10.1128/JVI.67.11.6753-6761.1993.

Ramirez S, Bukh J. Current status and future development of infectious cell-culture models for the major genotypes of hepatitis C virus: Essential tools in testing of antivirals and emerging vaccine strategies. *Antiviral Res.* **2018** Oct;158:264-287. doi: 10.1016/j.antiviral.2018.07.014.

Rana R, Dangal R, Singh Y, Gurung RB, Rai B, Sharma AK. Hepatitis C Virus Infection in Pregnancy and Children: Its Implications and Treatment Considerations with Directly Acting Antivirals: A Review. *JNMA J Nepal Med Assoc.* **2021** Sep 11;59(241):942-953. doi: 10.31729/jnma.5501.

Robinson E, Byrne CJ, Carberry J, Radley A, Beer LJ, Inglis SK, Tait J, Macpherson I, Goldberg D, Hutchinson SJ, Hickman M, Dillon JF. Laying the foundations for hepatitis C elimination: evaluating the development and contribution of community care pathways to diagnostic efforts. *BMC Public Health.* **2023** Jan 7;23(1):54. doi: 10.1186/s12889-022-14911-1.

Rockstroh JK. HCV cure for everyone or which challenges remain? *J Virus Erad.* **2015** Apr 1;1(2):55-8.

Roingard P, Beaumont E. Hepatitis C Vaccine: 10 Good Reasons for Continuing. *Hepatology.* **2020** May;71(5):1845-1850. doi: 10.1002/hep.31182.

Roingard P, Depla M. The birth and life of lipid droplets: learning from the hepatitis C virus. *Biol Cell.* **2011** May;103(5):223-31. doi: 10.1042/BC20100119.

Rollier C, Depla E, Drexhage JA, Verschoor EJ, Verstrepen BE, Fatmi A, Brinster C, Fournillier A, Whelan JA, Whelan M, Jacobs D, Maertens G, Inchauspé G, Heeney JL. Control of heterologous hepatitis C virus infection in chimpanzees is associated with the quality of vaccine-induced peripheral T-helper immune response. *J Virol.* **2004** Jan;78(1):187-96. doi: 10.1128/jvi.78.1.187-196.2004.

Romano KP, Ali A, Royer WE, Schiffer CA. Drug resistance against HCV NS3/4A inhibitors is defined by the balance of substrate recognition versus inhibitor binding. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2010** Dec 7;107(49):20986-91. doi: 10.1073/pnas.1006370107.

Romero-López C, Ríos-Marco P, Berzal-Herranz B, Berzal-Herranz A. The HCV genome domains 5BSL3.1 and 5BSL3.3 act as managers of translation. *Sci Rep.* **2018** Oct 31;8(1):16101. doi: 10.1038/s41598-018-34422-7.

Ryder SD, Irving WL, Jones DA, Neal KR, Underwood JC; Trent Hepatitis C Study Group. Progression of hepatic fibrosis in patients with hepatitis C: a prospective repeat liver biopsy study. *Gut.* **2004** Mar;53(3):451-5. doi: 10.1136/gut.2003.021691.

Schlotthauer F, McGregor J, Drummer HE. To Include or Occlude: Rational Engineering of HCV Vaccines for Humoral Immunity. *Viruses.* **2021** Apr 30;13(5):805. doi: 10.3390/v13050805.

Schregel V, Jacobi S, Penin F, Tautz N. Hepatitis C virus NS2 is a protease stimulated by cofactor domains in NS3. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **2009** Mar 31;106(13):5342-7. doi: 10.1073/pnas.0810950106.

Schreiber GB, Busch MP, Kleinman SH, Korelitz JJ. The risk of transfusion-transmitted viral infections. The Retrovirus Epidemiology Donor Study. *N Engl J Med.* **1996** Jun 27;334(26):1685-90. doi: 10.1056/NEJM199606273342601.

Schulze Zur Wiesch J, Ciuffreda D, Lewis-Ximenez L, Kasprovicz V, Nolan BE, Streeck H, Aneja J, Reyor LL, Allen TM, Lohse AW, McGovern B, Chung RT, Kwok WW, Kim AY, Lauer GM. Broadly directed virus-specific CD4+ T cell responses are primed during acute hepatitis C infection, but rapidly disappear from human blood with viral persistence. *J Exp Med.* **2012** Jan 16;209(1):61-75. doi: 10.1084/jem.20100388

Schwarze M, Volke D, Rojas Echeverri JC, et al. Influence of Mutations and N-Glycosylation Sites in the Receptor-Binding Domain (RBD) and the Membrane Protein of SARS-CoV-2 Variants of Concern on Antibody Binding in ELISA. *Biology (Basel).* **2024**;13(4):207. Published 2024 Mar 23. doi:10.3390/biology13040207.

Shi G, Ando T, Suzuki R, Matsuda M, Nakashima K, Ito M, Omatsu T, Oba M, Ochiai H, Kato T, Mizutani T, Sawasaki T, Wakita T, Suzuki T. Involvement of the 3' Untranslated Region in Encapsidation of the Hepatitis C Virus. *PLoS Pathog.* **2016** Feb 11;12(2):e1005441. doi: 10.1371/journal.ppat.1005441

Silva MO, Treitel M, Graham DJ, Curry S, Frontera MJ, McMonagle P, Gupta S, Hughes E, Chase R, Lahser F, Barnard RJ, Howe AY, Howe JA. Antiviral activity of boceprevir

monotherapy in treatment-naive subjects with chronic hepatitis C genotype 2/3. *J Hepatol.* **2013** Jul;59(1):31-7. doi: 10.1016/j.jhep.2013.02.018.

Smith S, Honegger JR, Walker C. T-Cell Immunity against the Hepatitis C Virus: A Persistent Research Priority in an Era of Highly Effective Therapy. *Cold Spring Harb Perspect Med.* **2021** Jan 4;11(1):a036954. doi: 10.1101/cshperspect.a036954.

Song W, Gui M, Wang X, Xiang Y. Cryo-EM structure of the SARS coronavirus spike glycoprotein in complex with its host cell receptor ACE2. *PLoS Pathog.* **2018**;14(8):e1007236. doi:10.1371/journal.ppat.1007236.

Stamatakis Z, Coates S, Evans MJ, Wining M, Crawford K, Dong C, Fong YL, Chien D, Abrignani S, Balfe P, Rice CM, McKeating JA, Houghton M. Hepatitis C virus envelope glycoprotein immunization of rodents elicits cross-reactive neutralizing antibodies. *Vaccine.* **2007** Nov 7;25(45):7773-84. doi: 10.1016/j.vaccine.2007.08.053.

Steinmann E, Pietschmann T. Hepatitis C virus p7-a viroporin crucial for virus assembly and an emerging target for antiviral therapy. *Viruses.* **2010** Sep;2(9):2078-2095. doi: 10.3390/v2092078.

Ströh LJ, Krey T. Structural insights into hepatitis C virus neutralization. *Curr Opin Virol.* **2023** Jun;60:101316. doi: 10.1016/j.coviro.2023.101316.

Strona internetowa Światowej Organizacji Zdrowia <https://iris.who.int/handle/10665/162765>, dostęp **30.08.2024**.

Strona internetowa Światowej Organizacji Zdrowia. Global Hepatitis Report 2017. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/255016>, dostęp **30.08.2024**.

Sung PS, Racanelli V, Shin EC. CD8(+) T-Cell Responses in Acute Hepatitis C Virus Infection. *Front Immunol.* **2014** Jun 6;5:266. doi: 10.3389/fimmu.2014.00266.

Suzuki R, Matsuda M, Shimoike T, Watashi K, Aizaki H, Kato T, Suzuki T, Muramatsu M, Wakita T. Activation of protein kinase R by hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase. *Virology.* **2019** Mar;529:226-233. doi: 10.1016/j.virol.2019.01.024.

Swadling L, Capone S, Antrobus RD, Brown A, Richardson R, Newell EW, Halliday J, Kelly C, Bowen D, Fergusson J, Kurioka A, Ammendola V, Del Sorbo M, Grazioli F, Esposito ML, Siani L, Traboni C, Hill A, Colloca S, Davis M, Nicosia A, Cortese R, Folgiori A, Klenerman P, Barnes E. A human vaccine strategy based on chimpanzee adenoviral and MVA vectors

that primes, boosts, and sustains functional HCV-specific T cell memory. *Sci Transl Med.* **2014** Nov 5;6(261):261ra153. doi: 10.1126/scitranslmed.3009185.

Tasaka-Fujita M, Sugiyama N, Kang W, Masaki T, Murayama A, Yamada N, Sugiyama R, Tsukuda S, Watashi K, Asahina Y, Sakamoto N, Wakita T, Shin EC, Kato T. Amino Acid Polymorphisms in Hepatitis C Virus Core Affect Infectious Virus Production and Major Histocompatibility Complex Class I Molecule Expression. *Sci Rep.* **2015** Sep 14;5:13994. doi: 10.1038/srep13994.

Tellinghuisen TL, Marcotrigiano J, Gorbalenya AE, Rice CM. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J Biol Chem.* **2004** Nov 19;279(47):48576-87. doi: 10.1074/jbc.M407787200.

Tomasiewicz K, Flisiak R, Jaroszewicz J, Małkowski P, Pawłowska M, Piekarska A, Simon K, Zarębska-Michaluk D. Recommendations of the Polish Group of Experts for HCV for the treatment of hepatitis C in 2023. *Clin Exp Hepatol.* **2023** Mar;9(1):1-8. doi: 10.5114/ceh.2023.125957.

Tong Y, Lavillette D, Li Q, Zhong J. Role of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 in Virus Entry and Assembly. *Front Immunol.* **2018** Jun 19;9:1411. doi: 10.3389/fimmu.2018.01411.

Tzarum N, Giang E, Kong L, He L, Prentoe J, Augestad E, Hua Y, Castillo S, Lauer GM, Bukh J, Zhu J, Wilson IA, Law M. Genetic and structural insights into broad neutralization of hepatitis C virus by human VH1-69 antibodies. *Sci Adv.* **2019** Jan 2;5(1):eaav1882. doi: 10.1126/sciadv.aav1882

Tzarum N, Wilson IA, Law M. The Neutralizing Face of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Front Immunol.* **2018** Jun 11;9:1315. doi: 10.3389/fimmu.2018.01315.

Vercauteren K, Mesalam AA, Leroux-Roels G, Meuleman P. Impact of lipids and lipoproteins on hepatitis C virus infection and virus neutralization. *World J Gastroenterol.* **2014** Nov 21;20(43):15975-91. doi: 10.3748/wjg.v20.i43.15975.

Vietheer PT, Boo I, Gu J, McCaffrey K, Edwards S, Owczarek C, Hardy MP, Fabri L, Center RJ, Pountourios P, Drummer HE. The core domain of hepatitis C virus glycoprotein E2 generates potent cross-neutralizing antibodies in guinea pigs. *Hepatology.* **2017** Apr;65(4):1117-1131. doi: 10.1002/hep.28989.

Walker A, Skibbe K, Steinmann E, Pfaender S, Kuntzen T, Megger DA, Groten S, Sitek B, Lauer GM, Kim AY, Pietschmann T, Allen TM, Timm J. Distinct Escape Pathway by Hepatitis C Virus Genotype 1a from a Dominant CD8+ T Cell Response by Selection of Altered Epitope Processing. *J Virol*. **2015** Oct 7;90(1):33-42. doi: 10.1128/JVI.01993-15.

Wang Y, Keck ZY, Fong SK. Neutralizing antibody response to hepatitis C virus. *Viruses*. **2011** Nov;3(11):2127-45. doi: 10.3390/v3112127.

Ward JW. Hepatitis C virus: the 25-year journey from discovery to cure. *Hepatology*. **2014** Nov;60(5):1479-82. doi: 10.1002/hep.27377.

Williams T, McCaw JM, Osborne JM. Spatial information allows inference of the prevalence of direct cell-to-cell viral infection. *PLoS Comput Biol*. **2024** Jul 23;20(7):e1012264. doi: 10.1371/journal.pcbi.1012264.

Wrensch F, Crouchet E, Ligat G, Zeisel MB, Keck ZY, Fong SKH, Schuster C, Baumert TF. Hepatitis C Virus (HCV)-Apolipoprotein Interactions and Immune Evasion and Their Impact on HCV Vaccine Design. *Front Immunol*. **2018** Jun 21;9:1436. doi: 10.3389/fimmu.2018.01436.

Xiao F, Fofana I, Heydmann L, Barth H, Soulier E, Habersetzer F, Doffoël M, Bukh J, Patel AH, Zeisel MB, Baumert TF. Hepatitis C virus cell-cell transmission and resistance to direct-acting antiviral agents. *PLoS Pathog*. **2014** May 15;10(5):e1004128. doi: 10.1371/journal.ppat.1004128.

Yechezkel I, Law M, Tzarum N. From Structural Studies to HCV Vaccine Design. *Viruses*. **2021** May 4;13(5):833. doi: 10.3390/v13050833.

Youn JW, Hu YW, Tricoche N, Pfahler W, Shata MT, Dreux M, Cosset FL, Folgori A, Lee DH, Brotman B, Prince AM. Evidence for protection against chronic hepatitis C virus infection in chimpanzees by immunization with replicating recombinant vaccinia virus. *J Virol*. **2008** Nov;82(21):10896-905. doi: 10.1128/JVI.01179-08.

Zeisel MB, Barth H, Schuster C, Baumert TF. Hepatitis C virus entry: Molecular mechanisms and targets for antiviral therapy. *Front. Biosci*. **2009**, 14: 3274–3285. <https://doi.org/10.2741/3450>.

Zhang M, Gaschen B, Blay W, Foley B, Haigwood N, Kuiken C, et al. Tracking global patterns of N-linked glycosylation site variation in highly variable viral glycoproteins: HIV,

SIV, and HCV envelopes and influenza hemagglutinin. *Glycobiology*. **2004**; 14:1229–46. doi: 10.1093/glycob/cwh106.

Zhao P, Praissman JL, Grant OC, Cai Y, Xiao T, Rosenbalm KE, Aoki K, Kellman BP, Bridger R, Barouch DH, Brindley MA, Lewis NE, Tiemeyer M, Chen B, Woods RJ, Wells L. Virus-Receptor Interactions of Glycosylated SARS-CoV-2 Spike and Human ACE2 Receptor. *Cell Host Microbe*. **2020** Oct 7;28(4):586-601.e6. doi: 10.1016/j.chom.2020.08.004.

Zubkova I, Duan H, Wells F, Mostowski H, Chang E, Pirollo K, Krawczynski K, Lanford R, Major M. Hepatitis C virus clearance correlates with HLA-DR expression on proliferating CD8+ T cells in immune-primed chimpanzees. *Hepatology*. **2014** Mar;59(3):803-13. doi: 10.1002/hep.26747.

12. Dorobek naukowy

Główne wyniki zamieszczone w niniejszej rozprawie doktorskiej zostały przedstawione w jednej publikacji naukowej:

- **Zimmer K**, Chmielewska AM, Jackowiak P, Figlerowicz M, Bienkowska-Szewczyk K. Alterations in N-glycosylation of HCV E2 Protein in Children Patients with IFN-RBV Therapy Failure. *Pathogens*. 2024;13(3):256. Published 2024 Mar 15. doi:10.3390/pathogens13030256

Autorka pracy jest ponadto współautorką następujących publikacji:

- Krapchev VB, Rychłowska M, Chmielewska A, **Zimmer K**, Patel AH, Bieńkowska-Szewczyk K. Recombinant Flag-tagged E1E2 glycoproteins from three hepatitis C virus genotypes are biologically functional and elicit cross-reactive neutralizing antibodies in mice. *Virology*. 2018 Jun;519:33-41. doi: 10.1016/j.virol.2018.03.026.
- Chmielewska AM, Rychłowska M, Król E, **Solarz K**, Bieńkowska-Szewczyk K. Wirusowe zapalenie wątroby typu C-nowe metody leczenia i zapobiegania [Novel methods of hepatitis C treatment and prevention]. *Postepy Hig Med Dosw (Online)*. 2015 Aug 19;69:946-63. Polish. doi: 10.5604/17322693.1165197.
- Dutka M, **Zimmer K**, Ćwiertnia M, Ilczak T, Bobiński R. The role of PCSK9 in heart failure and other cardiovascular diseases-mechanisms of action beyond its effect on LDL cholesterol. *Heart Fail Rev*. 2024 Sep;29(5):917-937. doi: 10.1007/s10741-024-10409-7. Epub 2024 Jun 18.
- Panasiuk M, Chraniuk M, **Zimmer K**, Hovhannisyan L, Krapchev V, Peszyńska-Sularz G, Narajczyk M, Węśławski J, Konopacka A, Gromadzka B. Characterization of surface-exposed structural loops as insertion sites for foreign antigen delivery in calicivirus-derived VLP platform. *Front Microbiol*. 2023 Feb 27;14:1111947. doi: 10.3389/fmicb.2023.1111947.
- Bobiński R, Mazurek U, Zmarzły N, Ulman-Włodarz I, Dutka M, Pizon M, Pollok-Waksmańska W, Pielesz A, Hajduga M, **Zimmer K**, Bujok J, Pająk C, Ilczak T. Placental expression of Fatty Acid Desaturases 1, 2 and 3 in selected pregnancy pathologies. *Acta Biochim Pol*. 2023 Jan 18;70(1):137-144. doi: 10.18388/abp.2020_6345.
- Panasiuk M, **Zimmer K**, Czarnota A, Narajczyk M, Peszyńska-Sularz G, Chraniuk M, Hovhannisyan L, Żołądowska S, Nidzworski D, Żaczek AJ, Gromadzka B. Chimeric virus-like particles presenting tumour-associated MUC1 epitope result in high titers of specific IgG antibodies in the presence of squalene oil-in-water adjuvant: towards safe

cancer immunotherapy. *J Nanobiotechnology*. 2022 Mar 27;20(1):160. doi: 10.1186/s12951-022-01357-1.

- Dutka M, Bobiński R, Francuz T, Garczorz W, **Zimmer K**, Ilczak T, Ćwiertnia M, Hajduga MB. SGLT-2 Inhibitors in Cancer Treatment-Mechanisms of Action and Emerging New Perspectives. *Cancers (Basel)*. 2022 Nov 25;14(23):5811. doi: 10.3390/cancers14235811.
- Panasiuk M, **Zimmer K**, Czarnota A, Grzyb K, Narajczyk M, Peszyńska-Sularz G, Żołędowska S, Nidzworski D, Hovhannisyán L, Gromadzka B. Immunization with *Leishmania tarentolae*-derived norovirus virus-like particles elicits high humoral response and stimulates the production of neutralizing antibodies. *Microb Cell Fact*. 2021 Sep 24;20(1):186. doi: 10.1186/s12934-021-01677-1.
- Dutka M, Bobiński R, Wojakowski W, Francuz T, Pająk C, **Zimmer K**. Osteoprotegerin and RANKL-RANK-OPG-TRAIL signalling axis in heart failure and other cardiovascular diseases. *Heart Fail Rev*. 2022 Jul;27(4):1395-1411. doi: 10.1007/s10741-021-10153-2. Epub 2021 Jul 27.
- Janczuk-Richter M, Gromadzka B, Richter Ł, Panasiuk M, **Zimmer K**, Mikulic P, Bock WJ, Maćkowski S, Śmietana M, Niedziółka Jönsson J. Immunosensor Based on Long-Period Fiber Gratings for Detection of Viruses Causing Gastroenteritis. *Sensors (Basel)*. 2020 Feb 3;20(3):813. doi: 10.3390/s20030813.

Autorka uzyskała środki finansowe na realizację projektów zatytułowanych:

- „Badanie zależności pomiędzy wzorem N-glikozylacji różnych wariantów glikoproteiny E2 wirusa HCV, a profilem odpowiedzi na terapię u pacjentów leczonych pegylowanym interferonem alfa i rybawiryną.”
- „Badanie powinowactwa różnych wariantów glikoproteiny E2 wirusa zapalenia wątroby typu C (HCV) do limfocytów T”

W ramach projektu „Finansowanie Badań Młodych Pracowników Nauki” finansowanego przez Uniwersytet Gdańsk