

Jadwiga Nitkiewicz

EPIDEMIOLOGIA MOLEKULARNA WIRUSA PRZEWLEKŁEGO ZAPALENIA WĄTROBY TYPU C (HCV)

Molecular Virology Division, Pathology Department
Kierownik: Prof. David Julian Volsky, Ph.D
Columbia University

Zastosowanie w ostatnich latach heterologicznych systemów ekspresji białek wirusowych, funkcjonalnych cDNA klonów oraz systemu subgenomowego replikonu umożliwiło pełniejsze poznanie wirusa przewlekłego zapalenia wątroby typu C (HCV). Jego cechą charakterystyczną jest silne zróżnicowanie genomu. Częściowa lub całkowita genetyczna analiza sekwencji pozwoliła na ustalenie genotypów wirusa, jak również wykazała różnorodność jego populacji – ‘quasi-species’ form w zakażonym organizmie.

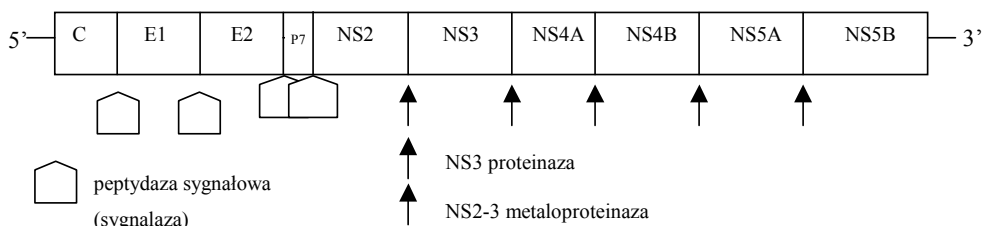
Słowa kluczowe: HCV, przewlekłe zapalenie wątroby, genom, białka wirusowe, genotypy
Key words: Hepatitis C virus (HCV), genom, viral proteins, genotypes

I. BUDOWA GENOMU WIRUSA, PROCES REPLIKACJI

Wirus przewlekłego zapalenia wątroby typu C jest wirusem otoczkowym, kulistym, zaliczanym na podstawie molekularnej organizacji genomu, uporządkowania genów oraz homologii RNA do rodziny *Flaviviridae*. Jego genom jest jednoniciowy, dodatnio-spolaryzowany, niepodzielony na segmenty RNA, zbudowany z ok. 9500 nukleotydów.

Większą jego część stanowi pojedyncza, długa ramka odczytu (ORF), kodująca prekursorową poliproteinę złożoną z 3010-3011 aminokwasów. Po obu stronach genomu w końcach 5' oraz 3', podobnie jak u innych RNA wirusów, występują sekwencje niekodujące UTR, nie podlegające procesowi translacji. Są one niezbędne do prawidłowej replikacji i translacji białek wirusa (1, 2). Proces replikacji zachodzi całkowicie w błonowych strukturach komórki i wszystkie białka wirusowe powstające z prekursorowej poliproteiny są zasocjowane bezpośrednio lub pośrednio z błoną retikulum endoplazmatycznego (3,4).

Prekursorowa poliproteina podlega procesowi przekształceń w trakcie i- po translacji, w wyniku którego powstaje szereg mniejszych produktów stanowiących białka strukturalne i niestrukturalne wirusa (5,6). Uważa się, że genom koduje co najmniej 10 białek. Białka strukturalne formujące cząstki wirusowe są kodowane począwszy od 342-go nukleotydu fragmentu 5' amino-końcowego i przechodzą w kierunku końca 3' w białka niestrukturalne NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B niezbędne dla wirusa w procesie replikacji (1,7,8).



Budowa genomu wirusa HCV

Końce UTR obszaru 5' formują wyraźną strukturę drugorzędową, układając się w cztery do pięciu pętli, utworzonych z tripletów AUG (2,7). Komputerowa i enzymatyczna analiza wykazała, że stanowią one tzw. obszary IRES (internal ribosomal entry side), umożliwiające ścisłe wiązanie się rybosomów z kodonem ORF. Krytyczne znaczenie funkcjonalne, warunkujące aktywność obszaru IRES stanowi 3 pętla, natomiast znaczenie 3 pozostałych jest kontrowersyjne (2). Analogicznie jak u innych przedstawicieli rodziny *Flaviviridae*, RNA genomu wirusa replikowane jest bezpośrednio z RNA do RNA. Ujemna nica RNA stanowi interfazową postać jego genomu i jest matrycą do produkcji nadmiaru kopii nici dodatkowej RNA, będących potomnymi cząstkami wirusowymi (2,7).

Na podstawie ograniczonych dostępnych danych, dotyczących molekularnego mechanizmu replikacji wirusa HCV, związanych z brakiem modelu zwierzęcego, jak i długoterminowej hodowli komórkowej z namnażającym się wirusem, a w oparciu o wyniki badań nad ekspresją jego białek rekombinowanych, *Bartenschlager i Lohmann* opisują w cyklu replikacyjnym wirusa następujące fazy:

- 1) wnikanie do komórki gospodarza i uwolnienie genomowego RNA z cząsteczek wirusowych do cytoplazmy,
- 2) translacja informacji zawartej w RNA, powstanie poliproteiny prekursorowej i formowanie kompleksu replikazy, zasocjowanego z wewnątrzkomórkowymi błonami, dojrzewanie białek wirusowych,
- 3) synteza interfazowej nici RNA-minus na matrycy nici RNA-plus,
- 4) produkcja nowych dodatnich nici RNA budujących cząsteczki wirusa, na matrycy których ponownie zachodzi translacja jak w punkcie 2, lub
- 5) upakowanie cząstek wirusowych i ich uwolnienie z zakażonych komórek (7).

Pierwszy etap cyklu życiowego wirusa, uwarunkowany jest swoistą interakcją pomiędzy jego białkami powierzchniowymi a receptorem na powierzchni zakażonej komórki. Istnieją doniesienia sugerujące, że domniemanym receptorem dla wirusa HCV jest receptor CD81 (7). Według innych autorów (*Thomsen, Monazahian*), receptorem tym może być receptor dla beta- LDL, analogicznie jak u innych przedstawicieli *Flaviviridae* (9,10). Wiadome jest natomiast, że głównym białkiem wirusowym, inicjującym przyleganie wirusa do komórki jest glikoproteina otoczkowa E2 (7).

W miejscu 340-342 nukleotydu, który stanowi początek otwartej ramki odczytu ORF, rozpoczyna się proces translacji (1,7). Powstała poliproteina prekursorowa, której translacja zapoczątkowana jest na rybosomach, ściśle w IRES, przemieszcza się do siateczki endoplazmatycznej, gdzie w trakcie i po translacji podlega proteolitycznemu przekształceniu.

Uczestniczą w tym procesie enzymy pochodzenia zarówno wirusowego, jak i komórkowego; sygnaliza komórkowa gospodarza, zlokalizowana w świetle siateczki endoplazmatycznej (ER) oraz dwie wirusowe proteinazy (7,8). Powstające białka strukturalne wirusa, charakteryzują się obecnością hydrofobowych domen zlokalizowanych w końcu C i odgrywających ważną rolę w asocjacji z błonami siateczki endoplazmatycznej.

Pierwszym produktem proteolitycznego rozszczepienia poliproteiny prekursorowej przy 191 aminokwasie (aa), jest białko rdzenia wirusa o ciężarze cząsteczkowym 21 kD (białko P21). Drugie rozszczepienie możliwe w miejscu 173 aa., daje produkt określany jako P19, będący głównym białkiem ekspresji w komórkach ssaków. Obie cząsteczki P21 i P19 są zlokalizowane w błonach siateczki endoplazmatycznej i konwersja P21 do P19 jest dokonywana przez enzymy umiejscowione w błonie komórkowej. Trzecim białkiem rdzenia wykrywanym w badaniach nad ekspresją tego antygeny HCV jest cząstka o długości 151 aa., opisywana jako proteina p16, występująca w jądrze komórki (1). Różnice w subkomórkowej lokalizacji pomiędzy P16 i P21/19 sugerują różnice w ich biologicznym znaczeniu, aczkolwiek ich różna rola w morfogenezie wirusa jest niejasna. Jądrowemu umiejscowieniu białka P16 przypisuje się rolę w wiązaniu do zgromadzonych tam rybosomów. Liczne, hydrofobowe domeny rdzenia wirusa umiejscowione pomiędzy 121-151 aa. i 170-191 aa. warunkują translokację i następnie asocjację cząsteczki białka P21 i P19 z błoną siateczki endoplazmatycznej. Ma to podstawowe znaczenie dla 'błonowo-zależnego' dojrzewania białek wirusa, uwarunkowanego występującymi tam enzymami (1,4).

Białko rdzenia silnie immunogenne, jest pierwszym i jak dotąd jedynym białkiem wirusowym wykrywanym we krwi obwodowej przewlekle zakażonych nim osób (11).

Ostatnio wykazano obecność nowego białkowego produktu genomu wirusa HCV, nazywanego białkiem F (12). Powstaje ono podczas naturalnego zakażenia HCV z następującym wytworzeniem reaktywnych przeciwciał przez system odpornościowy zakażonego organizmu. Jest kodowane przez obszar genomu wirusa obejmujący fragment rdzeniowy. Sekwencje aminokońcowe obu białek (F i rdzenia) są homologiczne przez odcinek 10. pierwszych aminokwasów, po czym są różne. Długość sekwencji białka F uzależniona jest od genotypu wirusa, np. dla genotypu 1a wynosi 161 a.a. Rola białka F pozostaje nieznana.

W dalszym procesie proteolitycznego przekształcania poliproteiny prekursorowej, uwalniane są kolejne białka strukturalne E1, E2 stanowiące otoczkę wirusa oraz krótki hydrofobowy peptyd p7. Analiza ich N-końcowego fragmentu wykazała, że rozszczepienie poliproteiny prekursorowej ma miejsce odpowiednio na poziomie 384 oraz 746 aminokwasu (1,3). Białka E1, E2 są silnie modyfikowane w procesie glikozylacji, dając w końcowej swej formie glikoproteiny otoczkowe wirusa (3,6,7). Poza prawidłowo glikozylowaną formą białka otoczki E2 gromadzoną i zasocjowaną z błoną retikulum endoplazmatycznego, powstają duże nieglikozylowane agregaty białka otoczki E2 pozostające w cytosolu. Okres ich trwałości jest krótki i po naznaczeniu przez ubikwitynę są rozkładane w proteosomach (13).

Sekwencje hydrofobowe w końcu C obu glikoprotein otoczkowych, odgrywają podobnie jak w przypadku odcinka rdzeniowego podstawową rolę w asocjacji z błoną siateczki endoplazmatycznej (14,15). W procesie proteolitycznego przekształcania otoczki E1, E2 również bierze udział enzym pochodzenia komórkowego-sygnaliza komórkowa. W końcowej swej postaci stanowią one niekowalencyjnie połączony, heterodimerowy kompleks z transmembranowymi domenami (TMD), złożonymi z dużej N-końcowej domeny zewnętrz-

nej (ektodomeny) i C-końcowej hydrofobowej 'kotwicy' (3,7). W ich C-końcach zlokalizowane są sekwencje sygnałowe. Uważa się, że TMD-domeny E1, E2 odgrywają zasadniczą rolę w wewnątrzkomórkowej lokalizacji glikoproteinowego kompleksu, zatrzymanie go oraz dojrzewanie białek wirusowych w świetle siateczki endoplazmatycznej (3,15,16).

Transmembranowym domenom otoczki E1, a w szczególności E2 przypisuje się funkcje wielozadaniowe:

- rolę w wejściu wirusa do komórki
- warunkowanie błonowej asocjacji; 'zakotwiczenia' w błonie siateczki endoplazmatycznej, krytycznego dla replikacji wirusa,
- zawierają funkcjonujące sekwencje sygnałowe, odgrywające podstawową rolę w translokacji i subkomórkowej lokalizacji (C-końcowy fragment 29 aa.)
- ponadto C-końcowemu fragmentowi 29 aa. TMD otoczki E2 przypisuje się rolę w asocjacji wirusa z 'kroplami' lipidowymi (14).

W obszarze N-końcowym otoczki E2 pomiędzy 384 - 410; 414 aa., zlokalizowany jest region stanowiący superzmienną sekwencję HVR1 z epitopami konformacyjnymi dla przeciwciał neutralizujących (1,17). Wysoki stopień zmienności genetycznej tego regionu nadaje wirusowi wyjątkową ochronę przed odpowiedzią immunologiczną gospodarza.

Białka niestrukturalne obejmujące proteiny NS są zlokalizowane w kierunku końca 3' genomu wirusa. Region NS2 silnie hydrofobowy, stanowi również trans-membranowe białko, z C-końcowym fragmentem, biorącym udział w translokacji w świetle siateczki endoplazmatycznej. Poza faktem, że NS2 uczestniczy w przyleganiu do błony komórki, inna funkcja biologiczna tego fragmentu jest nieznana. Sekwencje NS2 zachodzą na 1/3 regionu NS3 kodują proteinazę; ściśle metaloproteinazę zależną od jonów cynku, powodującą autoproteolityczne rozszczepienie w miejscu NS2-3 (1, 6). W dalszym przebiegu formowania funkcjonalnych białek wirusowych z prekursorowej poliproteiny, uczestniczy druga proteinaza kodowana w regionie NS3-seryny, zaliczana do nadrodziny trypsyn. Ponadto odcinek NS3 koduje nukleozydo-trójfosfatę NTP i RNA-helikazę (1). Białko NS3 jest zależne funkcjonalnie od białka NS4A, a enzymatyczna aktywność tych białek jest kluczowym elementem w formowaniu tzw. kompleksu replikazy (18).

W związku z trudnościami w otrzymaniu szczepionki oraz brakiem skutecznego leczenia, a łączne leczenie interferonem alfa z ribawiryną jest skuteczne tylko u ograniczonej grupy pacjentów, badania naukowe ostatnich lat obejmowały potencjalne inhibitory HCV RNA zależnej polimerazy oraz RNA-helikazy z ewentualną możliwością ich stosowania w terapii antywirusowej (19,20,21). Brano pod uwagę nieliczne inhibitory HCV helikazy w związku ze słabo znanym mechanizmem aktywności tego enzymu i danych, jak dalece w swej aktywności różni się od podobnych mu komórkowych enzymów.

W obrębie drugiej domeny HCV helikazy zidentyfikowano 2 sekwencje krytyczne dla DNA/RNA wiązania i rozdzielania się obu nici. Co ważne okazało się, że sekwencje te wykazują strukturę konserwatywną u wszystkich znanych genotypów wirusa oraz jego *quasi-species* form, w związku z czym uważa się, że mogą one stanowić cel w antywirusowej terapii (19). Istnieją doniesienia, że białko NS3 poprzez zdolność łączenia się z czynnikami komórkowymi lub poprzez ich modyfikację, powodować może transformację komórki mając udział w patogenezie (22).

Podobnie do NS2, odcinek NS4 wykazuje charakter hydrofobowy, co sugeruje jego udział w przyleganiu do błony ER (1). Powstające w wyniku aktywności proteiny seryno-

wej- NS3 produkty genów NS4, NS5 nie są dobrze poznane. Są to – proteina NS4A o masie ok. 8 kD, będąca prawdopodobnie kofaktorem dla seryny, proteina NS4B oraz NS5A. Według ostatnich danych, białko NS4B spokrewnionych z HCV pestiwirusów odgrywa rolę w ich cytopatogenności, natomiast NS4B HCV – pełni wyraźną funkcję w zmianach struktury błony związanych z procesem replikacji wirusa (4). Jest to pierwsza poznana rola białka niestrukturalnego NS4B, obecnie rozważa się jego rolę w patogenezie. Białko NS5A (p58), któremu przypisuje się zasadniczą rolę we wrażliwości wirusa na interferon, zawiera region określany jako Interferon Sensitivity Determining Region (ISDR) (23-25). Interakcja NS5A z interferonem wzmacnia syntezę RNA-zależnej kinazy białkowej (PKR), będącej czynnikiem krytycznym w antywirusowej aktywności interferonu. Uważa się ponadto, że mutacja w regionie NS5A jest jednym z głównych czynników przyczyniających się do mechanizmu omijania przez wirusa odpowiedzi immunologicznej zakażonego organizmu.

Sekwencje odcinka NS5B są wysoce konserwatywne, co jest cechą nie tylko charakterystyczną dla rodziny *Flaviviridae*, ale również dla innych RNA wirusów. Białko to zbudowane jest z 591 aminokwasów, z 21 a.a. hydrofobową C-końcową sekwencją odpowiedzialną za ‘błonowe zakotwiczenie’ NS5B w komórce (5,20). Produktem tego odcinka genomu jest RNA-zależna RNA polimeraza, biorąca udział w całym procesie replikacji wirusa, w związku z czym białko to stanowi ważny cel badawczy w aspekcie antywirusowej terapii (20). Obecność wielu hydrofobowych sekwencji we fragmentach zarówno strukturalnych, jak i niestrukturalnych, jest związana z ‘błonowo-zależnym’ mechanizmem replikacji wirusa HCV, podobnie jak u innych przedstawicieli *Flaviviridae* (4). Formowanie cząstek wirusowych jest inicjowane prawdopodobnie przez białko rdzenia, pełniące rolę nukleokapsydu. Wykazano, że jego łączenie się z nicią RNA postępuje od pierwszej połowy odcinka 5’ końcowego genomu (7). Formowanie cząstek wirusowych zachodzi prawdopodobnie w błonach retikulum endoplazmatycznego z transportem poprzez aparat Golgiego.

II. ZRÓŻNICOWANIE GENETYCZNE WIRUSA HCV, OBECNOŚĆ *QUASI-SPECIES* FORM

Filogenetyczna analiza skonstruowana na podstawie danych dostarczonych z sekwencjonowania genomu wirusa przewlekłego zapalenia wątroby wykazała, że różnorodność genetyczna dzieli go na sześć głównych grup – typów, z których wiele zawiera więcej spokrewnionych podtypów. Zauważono związek pomiędzy genotypem wirusa, występowaniem geograficznym, jak i skutecznością leczenia antywirusowego.

Heterogenność genetyczna wirusa HCV wynika z właściwości jego genomu. Zróżnicowanie genetycznych sekwencji RNA izolowanych z różnych szczepów wirusa HCV sięga 35% (4).

Najbardziej konserwatywne sekwencje genomu zlokalizowane są w obu końcach 5’ oraz 3’ NCR regionów (noncoding regions) lub UTR (untranslated regions). Region 340 nukleotydów końca 5’ obejmujący domeny rdzenia jest silnie konserwatywny (powyżej 85% podobieństwa pomiędzy różnymi podtypami wirusa HCV) i ta właściwość została wykorzystana w syntezie starterów stosowanych w diagnostyce molekularnej, czyli w RT PCR (6,24). Różnice nukleotydowe w obrębie tego obszaru, wykorzystuje się w genotypowaniu wirusa HCV metodą PCR (6).

Genetyczne zróżnicowanie wirusa HCV opisano po raz pierwszy porównując wzajemnie sekwencje nukleotydową wirusa izolowanego w USA i Japonii. Szczepy izolowane w Japoni sklasyfikowane jako typ 2 wykazywały 92% wzajemnej homologii oraz tylko 79% ze szczepami z USA nazwanymi typem 1 (13). Porównanie sekwencji nukleotydowej genu stało się podstawą klasyfikacji wirusa.

Według klasyfikacji Simmonsa istnieje 6 genotypów z podtypami wirusa HCV. Klasyfikacja ta opiera się głównie na porównaniu sekwencji odcinka o długości 222 par zasad (bp) w obrębie regionu NS5b (13,25,30). Niektóre genotypy wirusa, jak np. 1a,2a,2b występują szeroko w świecie w różnych regionach geograficznych, podczas gdy inne, jak np. typ 5a (południowa Afryka) oraz 6a (Hong Kong, Macao), 4a (Egipt), ograniczone są do specyficznego, wąskiego regionu świata (13, 25). Tokita i wsp. proponują klasyfikację opartą na 11 głównych genotypach wirusa HCV (30).

W zachodniej Europie oraz USA najczęstsze są genotypy 1a, 1b, 2a, 2b i 3a, chociaż częstotliwość ich występowania jest zmienna. We wschodniej i południowej Europie występuje głównie typ 1b (13). Obecność różnych genotypów wirusa HCV ma duże znaczenie w odpowiedzi na leczenie antywirusowe. Genotyp 1 z reguły wiąże się ze słabą odpowiedzią na leczenie interferonem oraz łączne leczenie interferonem z ribawiryną. Genotypy 2 i 3 są znacznie bardziej podatne na terapię antywirusową (19, 28). Zauważono również związek pomiędzy genotypem 1b, a częstością przechodzenia zapalenia przewlekłego wątroby w marskość i rozwojem pierwotnego raka wątroby (13, 28). W Polsce, według przeprowadzonych badań w grupach dorosłych chorych i bezobjawowych nosicieli, najczęściej wykrywany jest genotyp 1b, rzadziej 3a, pozostałe genotypy wirusa wykrywane są w pojedynczych przypadkach (3). Wśród dzieci częściej zaobserwowano występowanie genotypu 1a. Proporcje liczby dzieci zakażonych genotypem 1a i 1b były różne w poszczególnych regionach kraju, np. 1a wykrywano najczęściej w Łodzi i Bydgoszczy, natomiast nie stwierdzono tego podtypu u żadnego z zakażonych wirusem dzieci w Kielcach. Przyczyny różnic w genotypach, którymi zakażone są osoby młode w porównaniu ze starszymi nie są znane, aczkolwiek sugerowany jest związek z odmiennymi drogami zakażenia. Badania wykonane w Zakładzie Immunologii szpitala Instytut Pomnik – Centrum Zdrowia Dziecka wykazały obecność u dzieci genotypu 1b 50% i genotypu 1a u 40%, potwierdzając zdecydowanie częstsze jego występowanie u dzieci niż u dorosłych (9). Ponadto wyraźne różnice w występowaniu obu genotypów wykazano u dzieci do 10 roku życia, u których dominował genotyp 1a – 57% nad 1b – 38%.

Wirus HCV należy do silnie mutujących wirusów, czego efektem jest pojawianie się form rzekomych (*quasi-species*), będących mutantami pierwotnego wirusa, wywołującego zakażenie. Region zbudowany z około 27-30 aminokwasów (aa.) w obrębie glikoproteiny otoczkowej E2 pomiędzy 384-410:414 aa. stanowi region o bardzo wysokiej zmienności określanej jako HVR1. Uważa się, że w regionie HVR1 zlokalizowane są epitopy dla przeciwciał neutralizujących, a pojawiające się stale nowe mutanty stanowią formy, nierozpoznawalne czyli odporne na działanie neutralizujące pojawiających się przeciwciał (32). Drugi region o wysokiej zmienności – HVR2 utworzony z około 7 aminokwasów opisany został dla genotypu 1b wirusa HCV (19). Odtworzenie struktury konformacyjnej epitopów regionu zmiennej otoczki E2 metodami inżynierii genetycznej jest praktycznie niemożliwe, a ponieważ stanowią one cel przeciwciał neutralizujących wirusa, jest to od wielu lat barierą uniemożliwiającą otrzymanie skutecznej szczepionki.

PODSUMOWANIE

Zakażenia wirusem przewlekłego zapalenia wątroby typu C (HCV) stanowią nadal problem w skali ogólnoświatowej. Wysoka zmienność genetyczna wirusa, niepowodzenia prób izolowania cząstek wirusowych, są przyczynami utrudniającymi postęp w zrozumieniu jego biologii i w skutecznym leczeniu zakażeń HCV.

Cechą charakterystyczną HCV jest silne zróżnicowanie jego genomu, wyrażające się obecnością heterogennej populacji *quasi-species* form mutującego wirusa w zakażonym organizmie, jak i w zróżnicowaniu geograficznym w skali ogólnoświatowej. Na podstawie danych uzyskanych z analizy sekwencji genomu wirusa, wykazano jego występowanie w co najmniej sześciu głównych typach, z wieloma spokrewnionymi podtypami. Częstość zakażeń wywołanych określonym podtypem wykazuje zróżnicowanie geograficzne. Patogenność i podatność wirusa HCV na terapię interferonową jest wyraźnie związana z jego podtypem.

J Nitkiewicz

MOLECULAR EPIDEMIOLOGY OF CHRONIC HEPATITIS C (HCV) VIRUS

SUMMARY

Hepatitis C virus (HCV) is a major etiologic causative agent of *chronic hepatitis*, *cirrhosis* with its attendant risks of *hepatocellular carcinoma*. Efforts to isolate the virus by standard immunologic and virologic techniques were unsuccessful and HCV was finally identified by direct cloning and sequencing of its genome.

Although the virus was identified 15 years ago, its pathogenesis and replication are not fully understood. Progress in the molecular biology of HCV was achieved by expressing viral recombinant proteins in culture cells and utilizing recombination DNA techniques.

An important feature of HCV is that the viral genomes display extensive genetic heterogeneity at the local as well as the global level. Within a host, the HCV genome population circulates as a '*quasi-species*' of closely related sequences. Worldwide, a high degree of genetic variation exists resulting in at least six major genotypes of more distantly related subtypes. It has been reported, that the prevalence of each subtype varies in different geographical areas and that virus pathogenicity and sensitivity to interferon treatment, appear to vary with different subtypes.

PIŚMIENICTWO

1. Clarke B. Molecular virology of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 1997;78:2397-2410.
2. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, i wsp. Sequences in 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047-12057.
3. Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, i wsp. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* 2000; 74(8):3623-3633.
4. Egger D, Wölk B, Gosert R, i wsp. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974-5984.
5. Schmidt- Medne J, Bieck E, Hugle T, i wsp. Determinants for membrane association of the hepatitis C virus RNA- dependent RNA polymerase. *J Biol Chem* 2001;276:44052- 44063.
6. Walker M Ch. Hepatitis C virus ; Persistent Viral Infection. Ed. Ahmed R, Chen I 1999;4:93-115.
7. Bartenschlager R, Lohmann V. Replication of hepatitis C virus. *J Gen Virol* 2000;81:1631-1648.

8. Lohmann V, Koch JO, Bartenschlager R. i wsp. Processing pathways of the hepatitis C virus proteins. *J Hepatol* 1996;24:11-19.
9. Monazahian M, Bohme I, Bonk S, i wsp. Low density lipoprotein receptor as a candidate receptor for hepatitis C virus. *J Med Virol* 1999;57:223-229.
10. Thomssen R, Bonk S, Thiele A, i wsp. Density heterogeneities of hepatitis C virus in human sera due to the binding of beta-lipoprotein and immunoglobulins. *Med Microbiol Immunol* 1993;82:329-334.
11. Maillard P, Krawczyński K, Nitkiewicz J, i wsp. Nonenveloped nucleocapsids of hepatitis C virus in the serum of infected patients. *J. Virol* 2001;75:8240-8250.
12. Xu Z, Coi J, Lu W, i wsp. Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with endoplasmic reticulum. *J. Virol* 2003;77:1578-1583.
13. Pavo N, Taylor D, Lai M. Detection of novel unglycosylated form of hepatitis C virus E2 envelope protein that is located in the cytosol and interacts with PKR. *J Virol* 2002;76: 1265-1272.
14. Cocquerel L, Meunier J-Ch, Pillez A, i wsp. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* 1998;72(3):2183-2191.
15. Flint M, McKeating J. The C-terminal region of the hepatitis C virus E1 glycoprotein confers localization within the endoplasmic reticulum. *J Gen Virol* 1999;80:1943-1947.
16. Choukhi A, Pillez A, Drobecq H, i wsp. Characterization of aggregates of hepatitis C virus glycoproteins. *J Gen Virol* 1999;80:3099-3107.
17. Zibert A, Dudziak P, Schreier E, i wsp. Characterization of antibody response to hepatitis C virus protein E2 and significance of hypervariable region 1-specific antibodies in viral neutralization. *Arch Virol* 1997;142:523-534.
18. Shi S, Lee Ki-J, Aizaki H, i wsp. Hepatitis C virus RNA replication occurs on a detergent-resistant membrane that cofractionates with caveolin-2. *J Virol* 2003;77:4160-4168.
19. Lamm A, Keeney D, Frick D. Two novel conserved motifs in the hepatitis C virus NS3 protein critical for helicase action. Manuscript M306444200: American Society for Biochemistry and Molecular Biology 2003.
20. Leveque VJ-P, Johnson R, Parson S, i wsp. Identification of a C-terminal regulatory motif in hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase: structural and biochemical analysis. *J. Virol* 2003;77: 9020-9028.
21. Tai Chun-Ling, Wen-Ching pan, Shwu-Huey Liaw, i wsp. Structure based mutational analysis of the hepatitis C virus NS3 helicase *J Virol* 2001;75:8289-8297.
22. Rho J, Choi S, Young R Seong, i wsp. The arginine-1493 residue in QRRGRTGR 1493G motif IV of HCV NS3 helicase domain is essential for NS3 protein methylation by the protein arginine methyltransferase 1. *J Virol* 2001;75: 8031-8044.
23. Neumann A, Lam N, Dahari H, i wsp. Differences in viral dynamic between genotypes 1 and 2 of hepatitis C virus. *J Infect Dis* 2000;182:28-35.
24. Song J, Fujii M, Wang F, i wsp. The NS5 protein of hepatitis C virus partially inhibits the antiviral activity of interferon. *J Gen Virol* 1999;80: 879-886.
25. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, i wsp. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-109.
26. Bukh J, Emerson SU, Purcell RH. Genetic heterogeneity of hepatitis C virus and related viruses. *Viral hepatitis and liver diseases*. Ed. Minerva Medica, Purcell R, Gerin J, Verme G. 1997:167-175.
27. Simmonds P, Alberti A, Alter H, i wsp. A proposed system for the nomenclature of hepatitis C viral genotypes. *Hepatology* 1994;19:1321-1324.
28. International Consensus Conference on Hepatitis C, EASL, Paris 1999;1,2.
29. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995; 21:570-583.
30. Tokita H, Okamoto H, Lizuka H, i wsp. The entire nucleotide sequences of three hepatitis C virus

- isolates in genetic groups 7-9 and comparison with those in the other eight genetic groups. *J Gen Virol* 1998;79:1847-1857.
31. Brojer E, Grabarczyk P, Medyńska J, i wsp. Analiza częstości występowania genotypów wirusa HCV u chorych na zapalenie wątroby oraz u bezobjawowych nosicieli wirusa w różnych regionach kraju; badanie wieloośrodkowe. *Hepatology Polska* 2000;7:53-55.
 32. Dzierżanowska-Fangrat K. Zastosowanie metod opartych na polimerazowej reakcji łańcuchowej do charakterystyki przewlekłych zakażeń wirusami hepatotropowymi HBV i HCV u dzieci. Rozprawa doktorska, CZD, Warszawa: CZD;2001.

Otrzymano: 31.05.2004 r.

Adres autora:

Jadwiga Nitkiewicz, Postdoctoral Research Scientist
Molecular Virology Division, Pathology Department
Columbia University,
432 West 59 Street, Antenucci Bld. 7F1
New York, 10019 NY
Tel. +212- 582 4927
Fax + 212 - 582 5027
e-mail: jbn2101@columbia.edu