

Paulina Godzik*

Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny,
ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa

Wpłynęło w lipcu 2008

1. Wstęp. 2. Zwierzęce modele badawcze wirusa zapalenia wątroby typu C. 3. Pierwsze próby stworzenia systemu replikacji HCV. 4. Replikacja subgenomowego RNA HCV. 5. Replikacja pełnogenomowego RNA HCV *in vitro* oraz tworzenie zakaźnych cząstek wirusowych. 6. Podsumowanie

***In vitro* hepatitis C virus (HCV) replication system**

Abstract: Infection with hepatitis C virus, a major cause of chronic liver diseases, is a serious worldwide health problem. The number of infected individuals has been estimated at around 170 millions. More than 80% of patients develop a persistent infection, which can be asymptomatic for many years. Despite increasing knowledge about the virus replication and pathogenesis, there is still no vaccination and successful antiviral therapy. Problems with the development of efficient drugs against HCV are connected with the lack of tissue culture or small animal models for HCV. Since HCV discovery in 1989, the development of a cell culture system for HCV has been a major goal for scientists worldwide. Due to difficulties in creating a robust cell culture model based on full-length HCV genome, Lohmann et al. and other independent groups established subgenomic replicons, which replicated in hepatoma cell line. Results of these experiments extended knowledge about HCV RNA replication. The next goal was to construct a cell culture system, which could produce virus particles. Wakita et al. created the first tissue culture that led to the production of HCV particles (2a genotype), which were infectious for both cells and chimpanzees. It was a major breakthrough in investigations on the efficiency of new vaccines and antivirals. However, the genotype 2a is not representative of the genotype 1 HCV, which is the most prevalent and typically associated with liver diseases. Therefore, there is a need to create a robust cell culture system for HCV genotype 1.

1. Introduction. 2. Animal models for hepatitis C virus. 3. First attempts to create a HCV replication system. 4. Replication of subgenomic HCV RNA. 5. *In vitro* replication of full-length HCV RNA genome and production of infectious virus particles. 6. Summary

Słowa kluczowe: hodowla komórkowa, replikacja, replikon, wirus zapalenia wątroby typu C (HCV)

Key words: cell culture, hepatitis C virus (HCV), replication, replicon

1. Wstęp

Wirusowe zapalenie wątroby typu C stanowi globalny problem zdrowotny. Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) u około 80% chorych przechodzi w zakażenie przewlekłe, którego skutkiem może być włóknienie, marskość wątroby i rak wątrobowo-komórkowy [23]. Szacuje się, iż na świecie jest 170 mln osób zakażonych HCV [7, 35]. Nie ma dokładnych danych dotyczących epidemiologii tego wirusa wśród populacji polskiej. Dostępne są jedynie informacje dotyczące wybranych grup ryzyka. Częstość występowania anty-HCV wśród kandydatów na dawców krwi wynosi 0,86% [32]. Wysokie rozpowszechnienie przeciwciał anty-HCV odnotowuje się u osób, które co najmniej raz przyjmowały narkotyk pod postacią iniekcji, 60% [30] oraz osób dializowanych, 23–44% [29].

HCV należy do rodziny *Flaviviridae*, jest wirusem osłonkowym i zawiera materiał genetyczny pod postacią nici RNA o dodatniej polarności. Pojedyncza otwarta ramka odczytu (ORF) koduje polipeptynę, z której na skutek kotranslacyjnego oraz potranslacyjnego dzia-

łania komórkowych i wirusowych proteaz generowanych jest 10 białek. Wśród nich występują białka strukturalne: białko rdzenia, białka osłonki (E1, E2), p7 oraz białka niestrukturalne, nazwane odpowiednio NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A oraz NS5B. ORF oflanowana jest niezwykle konserwatywnymi regionami, które nie ulegają translacji – NTRs (nontranslated regions) [9]. 5' NTR zawiera sekwencję IRES (internal ribosome entry site) niezbędną w procesie translacji polipeptyny [5,14].

Izolaty HCV charakteryzują się dużym zróżnicowaniem pod względem sekwencji. Uważa się, iż wynika to z niskiej wierności i braku funkcji naprawczych RNA-zależnej polimerazy RNA (NS5B). Znanych jest 6 głównych genotypów HCV oraz kilkadziesiąt podtypów. Zróżnicowanie to wpływa na szereg cech wirusa. Genotyp 1 jest najbardziej rozpowszechniony na świecie i zakażenie tym genotypem najczęściej prowadzi do uszkodzeń wątroby oraz nowotworów [4, 11, 41]. Różnice występują również w odpowiedzi na terapię antywirusową. Pacjenci zakażeni genotypami 1, 4, 5 i 6 zdecydowanie gorzej odpowiadają na leczenie

* Autor korespondencyjny: Zakład Wirusologii, Narodowy Instytut Zdrowia Publicznego – Państwowy Zakład Higieny, ul. Chocimska 24, 00-791 Warszawa; tel. 022 849 79 17; pgodzik@pzh.gov.pl

interferonem niż chorzy z genotypami 2 i 3 [41, 42]. Biorąc pod uwagę te fakty system replikacji HCV w liniach komórkowych (system replikacji *in vitro*) oparty na materiale genetycznym genotypu 1, powinien mieć największe znaczenie w prowadzeniu badań nad terapią antywirusową.

2. Zwierzęce modele badawcze HCV

Mimo wielu badań nie udało się stworzyć skutecznej szczepionki oraz standardów leczenia, które dawałyby satysfakcjonujące rezultaty. Eksperymenty są utrudnione ze względu na brak odpowiedniego modelu zwierzęcego do badań. Jedynymi zwierzętami, u których dochodzi do zakażenia HCV są szympansy. Przeprowadzanie badań na małpach wiąże się z jednej strony z bardzo dużymi kosztami, a z drugiej strony obarczone jest problemami etycznymi. Dlatego prowadzono eksperymenty w celu uzyskania myszy, które ulegałyby zakażeniu przez HCV. Mercer wraz ze swoim zespołem, korzystając z transgenicznymi gryzoni (SCID-mouse; severe combined immunodeficient mice), stworzył myszy posiadające chimeryczne wątroby zbudowane z ludzkich oraz mysich hepatocytów. Po zakażeniu tych zwierząt HCV wykrywano w wątrobie wirusowe RNA [25]. Jednak ze względu na fakt, iż myszy były pozbawione prawidłowo działającego układu odpornościowego, nie mogły one służyć jako model do badań nad szczepionką, czy nową terapią antywirusową [26].

W 1989 roku Choo i wsp. przy pomocy metod biologii molekularnej zidentyfikowali HCV. Udało się tego dokonać poprzez analizę biblioteki cDNA, skonstruowanej na podstawie RNA wyizolowanego z surowicy pacjenta chorego na wirusowe zapalenie wątroby typu nie-A, nie-B [8]. Od tego czasu prowadzone są badania nad stworzeniem wzorcowego modelu hodowli komórkowej, umożliwiającej namnażanie wirusa *in vitro*. Możliwość replikacji HCV w linii komórkowej pozwoliłaby na pogłębienie wiedzy na temat cyklu replikacyjnego wirusa, interakcji patogenu z komórkami oraz na sprawdzenie skuteczności potencjalnych związków antywirusowych. Ostatni aspekt badań jest niezwykle ważny, gdyż obecnie stosowana terapia przeciw HCV oparta na podawaniu pegylowanego interferonu i rybawiryny jest skuteczna jedynie u około 50% pacjentów, a ponadto prowadzi do wielu działań niepożądanych [36, 40].

3. Pierwsze próby stworzenia systemu replikacji wirusa zapalenia wątroby typu C

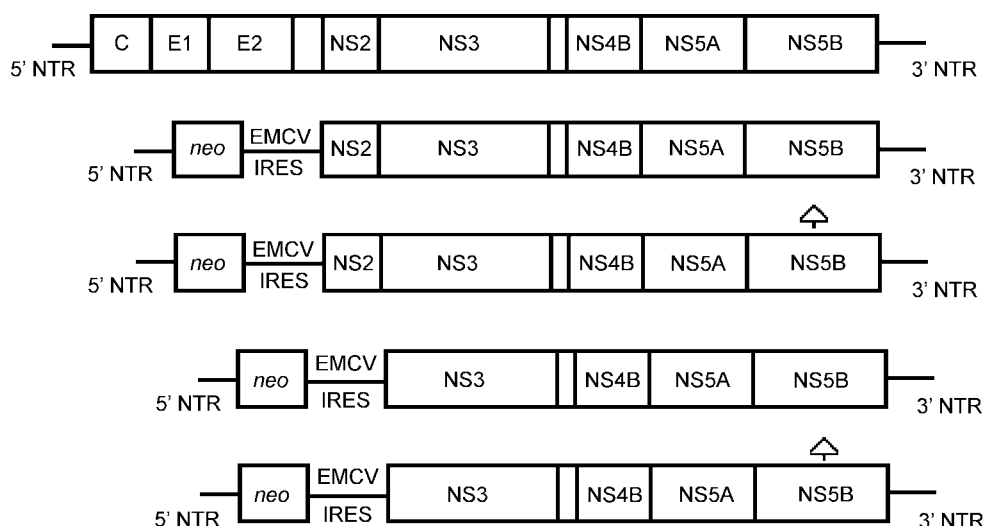
Pierwsze badania, które posłużyły do stworzenia systemu replikacji HCV w liniach komórkowych, polegały na stworzeniu infekcyjnego cDNA wirusa. Ekspe-

ryment ten został wykonany w 1997 roku przez dwie niezależnie pracujące grupy badawcze [19, 37]. Genom wirusa (o genotypie 1a) nazwany 'H77', został wyizolowany z surowicy zakażonych pacjentów, następnie przepisany na cDNA przy pomocy odwrotnej transkrypcji i wklonowany w odpowiedni wektor plazmidowy. Plazmidy zawierające pełnej długości HCV cDNA (pCV-H77), zostały zlinearyzowane poprzez cięcie enzymem restrykcyjnym i posłużyły jako matryca do przeprowadzonej *in vitro* transkrypcji z zastosowaniem T7 RNA polimerazy. Tak przygotowanym materiałem zakażano szympansy, poprzez bezpośrednią iniekcję do wątroby. Żaden z klonów H77 nie był zakaźny [37]. Opierając się na wynikach tych badań Chung i wsp. zmodyfikowali konstrukt pCV-H77 dodając na końcu 3' genomu H77 rybozym wirusa delta (hepatitis D virus) oraz terminator T7 wirusa krowianki, zaś na końcu 5' promotor T7. Konstrukty następnie były transfekowane do dwóch linii komórkowych: HepG2 i CV-1. Replikacja miała zachodzić przy udziale dodanej do zakażonej hodowli zrekombinowanej polimerazy T7. Jednak wynik pozytywny (replikację wirusa HCV) uzyskano jedynie w przypadku hodowli CV-1 [10].

Badania nad replikacją wirusa HCV z wykorzystaniem konstruktów zawierających pełnogenomowe cDNA H77 były prowadzone w różnych ośrodkach, jednak żadne z nich nie dawały satysfakcjonujących wyników [2, 20]. Replikacja HCV zachodziła na bardzo niskim poziomie i nie udało się zaadaptować hodowli komórkowej tak, aby otrzymać wysoki poziom replikacji wirusa [12]. Należy pamiętać o tym, iż badanie replikacji wirusa przy pomocy technik RT-PCR w tego typu eksperymentach jest niezwykle skomplikowane ze względu na obecność dużych ilości DNA plazmidowego, które posłużyły do transfekcji komórek [26].

4. Replikacja subgenomowego RNA wirusa zapalenia wątroby typu C

Ze względu na małą efektywność replikacji pełnogenomowego RNA wirusa w liniach komórkowych, podejmowano próby tworzenia replikonów zawierających subgenomowe RNA [1, 15, 16, 24, 27]. Lohmann i wsp. jako pierwszy stworzył subgenomowy replikon, który replikował się w linii komórkowej Huh-7 (hepatoma cell line). Jako materiał wyjściowy do stworzenia konstruktów posłużyło RNA o genotypie 1b, wyizolowane z wątroby pacjenta przewlekle zakażonego HCV. Przy pomocy reakcji RT-PCR przepisano na cDNA i namnożono całą ORF wirusa. Ze względu na istotną rolę sekwencji 3' i 5' NTR w procesie replikacji, zostały one zamplifikowane w dwóch oddzielnych



Rys. 1. Schemat przedstawiający sekwencje subgenomowego replikonu HCV. Pierwszy schemat przedstawia organizację genu HCV, zaś cztery kolejne to bicystronowe replikony (opis w tekście).

reakcjach RT-PCR, tak aby zapobiec utracie końcowych nukleotydów podczas reakcji łańcuchowej polimeryzacji. Na podstawie namnożonych fragmentów stworzono cztery bicystronowe plazmidy zawierające różne warianty sekwencji wirusowych (Rys. 1). Wszystkie rozpoczynały się od sekwencji 5' HCV-IRES, genu *neo* (kodującego fosfotransferazę neomycyny), EMCV-IRES oraz sekwencji HCV (odpowiednio w dwóch wariantach rozpoczynając od NS2 lub NS3 do autentycznego końca 3' RNA), z wprowadzoną delecją w obrębie NS5B oraz bez delecji. Po przepisaniu sekwencji na RNA, transfekowano nim komórki Huh-7, a następnie hodowlę prowadzono z dodatkiem neomycyny. IRES wirusa zapalenia mózgu i mięśnia sercowego (EMCV) umożliwiał bezpośrednią translację wirusowej polipeptydu, zaś obecność genu *neo* nadawała oporność na neomycynę komórkom, w którym dochodziło do replikacji i translacji replikonu HCV. Wyniki eksperymentu L o h m a n n a były obiecujące, uzyskano klony odporne na neomycynę, co świadczyło o zachodzącej replikacji sekwencji wirusowych. W przypadku zastosowania do transfekcji konstruktów z delecją w genie NS5B uzyskiwano zdecydowanie mniejszy poziom replikacji niż w przypadkach bez mutacji. Ponadto, nie zauważono różnic w zdolności namnażania replikonów z sekwencją kodującą NS2 oraz bez niej, co wykluczyło rolę białka NS2 w procesie replikacji HCV [24]. W uzyskanych liniach komórkowych, replikację sekwencji wirusowych wykrywano nawet po roku prowadzenia ciągłej hodowli pod presją antybiotyku. Wydaje się, iż można mówić o wysokiej stabilności tych replikonów [27].

Doświadczenia wykonane przez L o h m a n n a i wsp. zapoczątkowały eksperymenty prowadzące do udoskonalenia metod replikacji materiału genetyczne-

go HCV *in vitro*. Wyniki tych badań nie tylko dały nadzieję na stworzenie metodyki replikacji całego genu HCV, ale również udowodniły możliwość zastosowania tego typu doświadczeń w poznawaniu cyklu replikacyjnego wirusa oraz funkcji poszczególnych białek. Poważnym ograniczeniem tej metody był brak możliwości tworzenia cząsteczek wirusowych, ze względu na brak sekwencji kodujących białka strukturalne w obrębie replikonu.

A l i i wsp. zaobserwował replikację subgenomowego RNA w linii komórkowej HEK 293 (Human Embryonic Kidney), transfekowanej wcześniej przy pomocy bicystronowego replikonu stworzonego przez L o h m a n n a [1, 24]. Wynik tych badań zasugerował możliwość replikacji genu HCV w różnych rodzajach komórek, co ma istotne znaczenie między innymi ze względu na sposób leczenia wirusowego zapalenia wątroby typu C. Już wcześniej badania polsko-amerykańskiej grupy naukowców potwierdziły replikację HCV w innych komórkach niż hepatocyty (komórki jednojądrowe krwi obwodowej, szpiku kostnego, tkanki mózgowej oraz wiele innych), natomiast nie udało się dokonać replikacji *in vitro* RNA wirusa w innej niż hepatoma (rak wątrobowokomórkowy) linii komórkowej [21]. Pod tym względem eksperyment A l i' e g o był przełomowy. Kontynuowane przez niego badania pozwoliły na zaobserwowanie istotnych zmian w skuteczności hamowania replikacji replikonu HCV w liniach Huh-7 i HEK 293 po zastosowaniu interferonu alfa. Stężenie IFN- α , które w 50% hamowało replikację wirusa w przypadku linii HEK 293 było aż 14 razy większe niż w Huh-7 [1]. Wynik ten oraz fakt, iż RNA HCV ulega replikacji w różnych komórkach, potwierdziły sens prowadzenia badań nad replikacją oraz jej inhibicją w różnych liniach komórkowych.

Ze względu na zróżnicowanie HCV pod względem genotypów, badania nad replikacją RNA w liniach komórkowych prowadzone były również w kierunku tworzenia subgenomowych replikonów na podstawie RNA o innych genotypach niż opisany powyżej 1b [15, 16]. Brak możliwości utworzenia efektywnego systemu replikacyjnego z wykorzystaniem całego cDNA genotypu 1a [2, 10, 19, 20, 37] nie zniechęcił naukowców do pracy nad subgenomowym replikonem. W 2003 roku Gu i wsp. utworzył subgenomowy replikon z zastosowaniem materiału genetycznego szczepu H77 (genotyp 1a) [15]. Schemat eksperymentu był bardzo podobny do tego, który przeprowadził Lohmann w 1999 roku [24]. Konstruktor zawierał 5' HCV IRES, gen *neo*, EMCV IRES oraz sekwencje wirusowe począwszy od NS3 do końca 3' NTR. Jako kontrolę zastosowano konstruktor zawierający analogiczne sekwencje genotypu 1b. Po przeprowadzonej *in vitro* transkrypcji, powstałe RNA elektroporowano do linii Huh-7 i prowadzono hodowlę z dodatkiem neomycyny. W przypadku genotypu 1a replikacja nie zachodziła. Wydaje się, iż nie dochodziło do translacji RNA wirusowego i tworzenia białek wirusowych niezbędnych w procesie replikacji [15]. Dalsze doświadczenie pozwoliły na wysunięcie hipotezy, iż pierwsze 200 nukleotydów sekwencji NS3 genotypu 1a może tworzyć drugorzędową strukturę uniemożliwiającą przyłączenie rybosomów do EMCV IRES [16]. Z tego powodu Gu podjął próbę stworzenia chimericznych replikonów 1a-1b. Zmienił swój konstruktor poprzez zamianę 75-nukleotydowej sekwencji kodującej N-terminalny region NS3 na odpowiadającą temu fragmentowi sekwencję genotypu 1b. Po elektroporacji do linii Huh-7 i hodowli z dodatkiem neomycyny udało się uzyskać replikację sekwencji wirusowych. Mimo wszystko replikacja w przypadku genotypu 1a była kilkakrotnie słabsza niż w przypadku 1b. Poziom białka NS5B (RNA zależnej polimerazy RNA) był 5–10 razy mniejszy, kiedy do elektroporacji zastosowano chimeryczny replikon [15]. Gu i wsp. kontynuowali swoją pracę w kierunku sprawdzenia i porównania efektywności interferonu alfa w inhibicji replikacji obu replikonów. Okazało się, iż replikony kodujące polimerazę genotypu 1a były mniej wrażliwe na działanie interferonu. Wyniki tych badań potwierdzają znany fakt, iż genotypy HCV w różny sposób reagują na terapię antywirusową [39, 42].

5. Replikacja pełnogenomowego RNA wirusa zapalenia wątroby typu C *in vitro* oraz tworzenie zakaźnych cząstek wirusowych

Pomimo, iż nie udało się stworzyć systemu replikacji HCV *in vitro* na podstawie pełnogenomowego RNA 'H77', naukowcy nie przestali prowadzić badań

w kierunku replikacji innego pełnogenomowego genotypu wirusa [6, 22, 34, 38, 39, 44]. W 2005 roku pojawiło się pierwsze doniesienie o udanej próbie replikacji całego genomu HCV w linii komórkowej [34]. Jako materiał genetyczny wirusa posłużyło RNA genotypu 2a (JFH1 – Japanese Fulminant Hepatitis) wyizolowane od japońskiego pacjenta z piorunującym zapaleniem wątroby. Przepisany na cDNA pełnej długości RNA został wklonowany w plazmid. Produkt przeprowadzonej *in vitro* transkrypcji został transfekowany do linii Huh-7. Wyniki tego eksperymentu były zaskakujące. Już po 24 godzinach hodowli wykrywano w komórkach obecność pełnogenomowego JFH1, zaś po 72 godzinach w 70–80% komórek obecność białka rdzeniowego oraz białek niestrukturalnych wirusa. Świadczyło to o wysokim poziomie replikacji w komórkach transfekowanych przy pomocy JFH1. W supernatancie pochodzonym z hodowli znajdowane były, przy zastosowaniu technik mikroskopii elektronowej, cząstki wirusowe o średnicy około 55nm, czyli wielkością nie odbiegające od cząstek HCV opisywanych w piśmiennictwie [33]. Cząstki te były zakaźne zarówno w stosunku do linii Huh-7, jak i szympanсів. Eksperyment Wakit'y i wsp. był pierwszą udaną próbą przeprowadzenia replikacji HCV *in vitro* z uzyskaniem zakaźnych cząstek wirusowych. Ponadto posłużył do potwierdzenia wysuwanej wcześniej hipotezy, iż CD81 uczestniczy we wnikaniu wirusa do komórki [13, 28, 31, 43]. Zastosowanie swoistych przeciwciał skierowanych przeciwko CD81 hamowało zakaźność JFH1 w stosunku do linii Huh-7 [34]. Zhong i wsp. kontynuował badania z zastosowaniem przeciwciał. Inkubował JFH1 z przeciwciałami anti-E2, a następnie zakażał nimi komórki linii Huh-7. W komórkach tych obserwowano 5 razy mniejsze stężenie HCV RNA, niż w komórkach kontrolnych, zakażonych JFH1 [44]. Potwierdziło to wcześniejsze przypuszczenia, iż interakcja białka E2 z CD81 jest kluczowa w procesie wnikania wirusa do komórek [13, 28, 31, 43].

Dalsze eksperymenty pozwoliły na uzyskanie linii komórkowej zawierającej zintegrowany z genomem pJFH1. Przy pomocy technik inżynierii genetycznej zintegrowano cDNA HCV z genomem komórek linii Huh-7. W ten sposób uzyskano linię komórkową, która w stabilny sposób produkowała cząstki wirusowe. Ich zdolność do infekcji była hamowana przez zastosowanie monoklonalnych przeciwciał przeciw CD81 oraz E2. Cai i wsp. udowodnili również hamujący wpływ interferonu alfa na replikację pełnogenomowego RNA HCV z konstruktów cDNA zintegrowanego z genomem komórki, co potwierdziło skuteczność terapii interferonem w przypadku zakażenia genotypem 2a [6].

Ze względu na wspomniane już zróżnicowanie HCV pod względem genotypów, podejmowano próby stworzenia systemu replikacji opartego na pełnogeno-

mowych RNA o różnych genotypach [3, 17, 18, 22]. Ciekawe wyniki uzyskał Lindénbach po stworzeniu chimerycznych pełnogenomowych replikonów. Zamieniono sekwencje kodujące białka strukturalne oraz białko NS2 w JFH1 na odpowiadające temu sekwencje genotypu 1a (H77). Uzyskaną chimerę transfekowano do linii Huh-7. Replikon 1a/2a replikował się w komórkach, natomiast powstałe w ten sposób cząstki wirusowe nie były zakaźne *in vitro*. Wyniki te zasugerowały, iż pomiędzy sekwencjami kodującymi strukturalne i niestrukturalne białka mogą zachodzić interakcje niezbędne do utworzenia prawidłowo działającego systemu replikacji HCV *in vitro* [22].

W 2006 roku pojawiło się doniesienie o możliwości produkcji cząstek zakaźnych genotypu 1a HCV w linii Huh-7 [39]. Miało to olbrzymie znaczenie ze względu na duże rozpowszechnienie tego genotypu wśród osób zakażonych HCV oraz większą tolerancję na leczenie interferonem w porównaniu z innymi genotypami. Niestety w wyniku prowadzenia hodowli Huh-7, zakażonej wcześniej odpowiednio skonstruowanym replikonem, powstające cząstki wirusowe charakteryzowały się dużo mniejszą infekcyjnością *in vitro* niż cząstki powstałe w wyniku zakażenia komórek materiałem genetycznym JFH1 (genotyp 2a). Ponadto replikacja zachodziła tylko po wyselekcjonowaniu mutacji adaptacyjnych w obrębie sekwencji NS3, NS4A, NS5A [38, 39]. Mimo wszystko, doświadczenie to pozwoliło na zaobserwowanie różnic pomiędzy genotypem 1a oraz 2a, co może mieć kluczowe znaczenie w terapii antywirusowej. W komórkach zakażonych replikonem zawierającego RNA genotypu 1a powstawały zdecydowanie większe ilości RNA wirusowego niż w przypadku transfekcji komórek szczepem JFH1. JFH1 produkował mniej białka rdzeniowego i jednocześnie mniej RNA wirusowego ulegało sekrecji do supernatantu [39].

6. Podsumowanie

Badania nad stworzeniem systemu replikacyjnego HCV *in vitro* trwają do chwili obecnej. Naukowcom udało się doprowadzić do replikacji i tworzenia cząstek zakaźnych genotypu 2a (JFH1) [34]. System ten pozwolił na poznanie szczegółów dotyczących cyklu replikacyjnego, funkcji poszczególnych białek wirusowych oraz skuteczności stosowanej obecnie terapii antywirusowej. Jednak doprowadzenie do replikacji genotypu 1 w liniach komórkowych okazało się być o wiele trudniejsze [3, 17, 18, 22, 38, 39]. Opublikowane w 2007 roku wyniki badań Kato i wsp. potwierdziły, iż genotypy 1a oraz 1b replikują się *in vitro* znacznie słabiej niż JFH1 [18]. Po raz kolejny dostarczyło to dowodów na istniejące różnice w replikacji pomiędzy genotypami. Stworzone do tej pory systemy

replikacji genotypu 1 wymagają dalszych badań, gdyż ograniczona zdolność replikacji nie pozwala na prowadzenie sukcesywnych oraz wiarygodnych badań nad biologią molekularną tego wirusa. Jednocześnie uniemożliwia to znalezienie nowych, skuteczniejszych związków antywirusowych, co w przypadku genotypu 1 ma szczególne znaczenie ze względu na jego rozpowszechnienie. Genotyp ten jest również uważany za sprawcę większości uszkodzeń wątroby oraz innych powikłań powodowanych przez zakażenie HCV [4, 11]. Gorsza odpowiedź genotypu 1 na terapię interferonem zmusza do konieczności stworzenia nowego leku, w czym niewątpliwie olbrzymią rolę odegrałyby badania prowadzone na liniach komórkowych. Dlatego tak duże znaczenie ma stworzenie odpowiednio funkcjonującego systemu replikacji *in vitro* dla genotypu 1.

Podziękowania

Serdeczne podziękowania dla dr Wadima Kapulkina za cenne uwagi podczas pisania tej pracy.

Piśmiennictwo

1. Ali S., Pellerin C., Lamarre D., Kukolj G.: Hepatitis C virus subgenomic replicons in the Human Embryonic Kidney 293 cell line. *J. Virol.* **78**, 491–501 (2004)
2. Beard M.R., Abell G., Honda M., Carroll A., Gartland M., Clarke B., Suzuki K., Lanford R., Sangar D.V., Lemon S.M.: An infectious molecular clone of Japanese genotype 1b hepatitis C virus. *Hepatology*, **30**, 316–324 (1999)
3. Blight K.J., McKeating J.A., Marcocigiano J., Rice C.M.: Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J. Virol.* **77**, 3181–3190 (2003)
4. Bruno S., Mondelli M.U.: i wsp. Hepatitis C virus genotypes and risk of hepatocellular carcinoma in cirrhosis: a prospective study. *Hepatology*, **25**, 754–758 (1997) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
5. Bukh J, Purcell R.H., Miller R.H.: Sequence analysis of the 5' noncoding region of hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 4942–4946 (1992)
6. Cai Z., Hang C., Chang K.-S., Jiang J., Ahn B.-C., Wakita T., Liang T.J., Luo G.: Robust production of infectious hepatitis C virus (HCV) from stably HCV cDNA-transfected human hepatoma cells. *J. Virol.* **79**, 13963–13973 (2005)
7. Chen S.L., Morgan T.R.: The natural history of hepatitis C virus (HCV) infection. *Int. J. Med. Sci.* **3**, 47–52 (2006)
8. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M.: Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science*, **244**, 359–362 (1989)
9. Choo Q.L., Houghton M.: Genetic organization and diversity of the hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **88**, 2451–2455 (1991)
10. Chung R.T., He W., Saquib A., Contreras A.M., Xavier R.J., Chawala A., Wang T.C., Schmidt E.V.: Hepatitis C virus replication is directly inhibited by IFN- α in a full-length binary expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9847–9852 (2001)
11. Dusheiko G., Schmilovitz-Weiss H., Brown D., McOmish F., Yap P.-L., Sherlock S., McIntyre N., Simmonds P.: Hepatitis C

- virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology*, **19**, 13–18 (1994)
12. Duverlie G., Wychowski C.: Cell culture systems for the hepatitis C virus. *World J. Gastroenterol.* **13**, 2442–2445 (2007)
 13. Flint M., von Hahn T., Zhang J., Farquhar M., Jones C.T., Balfe P., Rice C.M., McKeating J.A.: Diverse CD81 proteins support hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **80**, 11331–11342 (2006)
 14. Friebe P, Lohmann V., Krieger N., Bartenschlager R.: Sequences in the 5' nontranslated region of the hepatitis C required for RNA replication. *J. Virol.* **75**, 12047–12057 (2001)
 15. Gu B., Gates A.T., Isken O., Behrens S.-E., Sarisky R.T.: Replication studies using genotype 1a subgenomic hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **77**, 5352–5359 (2003)
 16. Guo J.-T., Bichko V.V., Seeger C.: Effect of alpha interferon on hepatitis C virus replication. *J. Virol.* **75**, 8516–8523 (2001)
 17. Heller T., Liang T.J. i wsp.: An in vitro model of hepatitis C virion production. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 2579–2583 (2005) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
 18. Kato T., Matsumura T., Heller T., Saito S., Sapp R.K., Murthy K., Wakita T., Liang T.J.: Production of infectious hepatitis C virus of various genotypes in cell cultures. *J. Virol.* **81**, 4405–4411 (2007)
 19. Kolykhalov A.A., Agapov E.V., Blight K.J., Mihalik K., Feinstone S.M., Rice C.M.: Transmission of hepatitis C by intrahepatic inoculation with transcribed RNA. *Science*, **277**, 570–574 (1997)
 20. Lanford R.E., Lee H., Chavez D., Guerra B., Brasky K.M.: Infectious cDNA clone of hepatitis C virus genotype 1 prototype sequence. *J. Gen. Virol.* **82**, 1291–1297 (2001)
 21. Laskus T., Radkowski M., Wang L.-F., Nowicki M., Rakela J.: Uneven distribution of hepatitis C virus quasispecies in tissues from subjects with end-stage liver disease: confounding effect of viral adsorption and mounting evidence for the presence of low-level extrahepatic replication. *J. Virol.* **74**, 1014–1017 (2000)
 22. Lindenbach B.D., Rice C.M. i wsp.: Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science*, **309**, 623–626 (2005) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
 23. Lohmann V., Hoffmann S., Herman U., Penin F., Bartenschlager R.: Viral and cellular determinants of hepatitis C virus RNA replication in cell culture. *J. Virol.* **77**, 3007–3019 (2003)
 24. Lohmann V., Korner F., Koch J.O., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R.: Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science*, **285**, 110–113 (1999)
 25. Mercer D.F., Kneteman N.M. i wsp.: Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* **7**, 921–933 (2001) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
 26. Pietschmann T., Bartenschlager R.: Tissue culture and animal models for hepatitis C virus. *Clin. Liver. Dis.* **7**, 23–43 (2003)
 27. Pietschmann T., Lohmann V., Rutter G., Kurpanek K., Bartenschlager R.: Characterization of cell lines carrying self-replicating hepatitis C virus RNAs. *J. Virol.* **75**, 1252–1264 (2001)
 28. Pileri P., Abrignani S. i wsp.: Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, **282**, 938–941 (1998) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
 29. Podlasin R.B.: Zakażenie wirusem zapalenia wątroby typu C u chorych leczonych powtarzanymi dializami. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 541–547 (2005)
 30. Rosińska M., Zieliński A.: Oszacowanie występowania chorób zakaźnych (wirusowe zapalenie wątroby typu C i B, HIV) wśród narkomanów przyjmujących środki odurzające w iniekcji w miastach o różnym stopniu realizacji programów redukcji szkód. Raport z programu badawczego, dostępny na stronie: <http://www.narkomania.gov.pl/epidemiologia.htm> (01 lipca 2008, data ostatniego sprawdzenia adresu)
 31. Rothwangl K.B., Manicassamy B., Uprichard S.L., Rong L.: Dissecting the role of putative CD81 binding regions of E2 in mediating HCV entry: putative CD81 binding region 1 is not involved in CD81 binding. *Virology* **5**, 46 (2008)
 32. Seyfried H., Brojer E., Grabarczyk P., Rosińska M., Gronowska A., Łętowska M.: Analiza częstości wykrywania markerów zakażenia wirusem zapalenia wątroby typu C (HCV) u polskich dawców krwi w latach 1994–2003. *Przegl. Epidemiol.* **59**, 807–814 (2005)
 33. Shimizu Y.K., Feinstone S.M., Kohara M., Purcell R.H., Yoshikura H.: Hepatitis C virus: detection of intracellular virus particles by electron microscopy. *Hepatology*, **23**, 205–209 (1996)
 34. Wakita T., Liang T.J. i wsp.: Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796 (2005) (cytowana praca jest dziełem 12 autorów)
 35. Windisch M.P., Frese M., Kaul A., Trippler M., Lohmann V., Bartenschlager R.: Dissecting the interferon-induced inhibition of hepatitis C virus replication by using a novel host cell line. *J. Virol.* **79**, 13778–13793 (2005)
 36. Witthoft T., Alshuth U. i wsp.: Safety, tolerability and efficiency of peginterferon alfa-2a and ribavirin in chronic hepatitis C in clinical practice: The German Open Safety Trial. *J. Viral. Hepat.* **14**, 788–796 (2007) (cytowana praca jest dziełem 11 autorów)
 37. Yanagi M., Purcell R.H., Emerson S.U., Bukh J.: Transcripts from a single full-length cDNA clone of hepatitis C virus are infectious when directly transfected into the liver of a chimpanzee. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 8738–8743 (1997)
 38. Yi M., Lemon S.M.: Adaptive mutations producing efficient replication of genotype 1a hepatitis C virus RNA in normal Huh7 cells. *J. Virol.* **78**, 7904–7915 (2004)
 39. Yi M., Villanueva R.A., Thomas D.L., Wakita T., Lemon S.M.: Production of infectious genotype 1a hepatitis C virus (Hutchinson strain) in cultured human hepatoma cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 2310–2315 (2006)
 40. Zarebska-Michaluk D., Lebensztejn D.M., Kryczka W.: Skuteczność skojarzonego leczenia rekombinowanym interferonem alfa z rybawiryną chorych z przewlekłym zapaleniem wątroby typu C i obecnością zespołów pozawątrobowych. *Przegl. Epidemiol.* **61**, 551–558 (2007)
 41. Zein N.N.: Clinical significance of hepatitis C virus genotypes. *Clin. Microbiol. Rev.* **13**, 223–235 (2000)
 42. Zein N.N., Rakela J., Krawitt E.L., Reddy K.R., Tominaga T., Persing D.H.: Hepatitis C virus genotypes in the United States: epidemiology, pathogenicity, and response to interferon therapy. Collaborative study group. *Ann. Intern. Med.* **125**, 634–639 (1996)
 43. Zhang J., Randall G., Higginbottom A., Monk P., Rice C.M., McKeating J.A.: CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J. Virol.* **78**, 1448–1455 (2004)
 44. Zhong J., Gastaminza P., Cheng G., Kapadia S., Kato T., Burton D.R., Wieland S.F., Uprichard S.L., Wakita T., Chisari F.V.: Robust hepatitis C virus infection *in vitro*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 9294–9299 (2005)