

همسانه سازی تمام طول ژن E2 از ژنوتیپ 2a استرین JFH1 ویروس هپاتیت سی درون وکتور pET28a(+) و انتقال آن به باکتری اشریشیاکلی سویه DH5α

سارا باقری^۱، پونه رحیمی^{۲*}، روح الاله وهاب پور^۲، سید مهدی سادات^۲، محمدرضا آقا صادقی^۲، فاطمه متولی^۲

۱- گروه زیست شناسی دانشکده علوم پایه دانشگاه پیام نور تهران، ایران
۲- گروه ویروس شناسی، بخش هپاتیت و ایدز، انسیتوپاستور تهران، ایران.

چکیده:

سابقه و هدف: پوشش گلیکوپروتئینی E2 ویروس هپاتیت سی برای ورود ویروس به سلول های میزبان مورد نیاز است، هم چنین به دلیل اختلاف توالی نوکلئوتیدی در ناحیه C ترمینال ژن E2 تنوع ویروسی به وجود می آید که موجب پایداری عفونت می گردد، در نتیجه این ژن هدف اصلی برای تولید آنتی بادی های خنثی کننده و ساخت واکسن می باشد. در این تحقیق نیز جهت مطالعه های مقدماتی، تمام طول ژن E2 از ژنوتیپ 2a استرین JFH1 ویروس هپاتیت سی درون وکتور pET28a(+) قرار گرفته و به درون باکتری E-coli انتقال یافته است.

مواد و روش ها: ژن ناحیه E2 از ژنوتیپ 2a استرین JFH1 ویروس هپاتیت سی پس از طراحی پرایمرهای دارای جایگاه آنزیم های محدودگر EcoR1 و Nde1 توسط واکنش PCR تکثیر گردید و محصول آن پس از تایید درون وکتور pET28a(+) نو ترکیب گشت، سپس به روش شوک حرارتی درون سلول باکتری E-coli سویه DH5α، ترانسفورم شده و تایید گردید.

یافته ها: همسانه سازی ژن E2 به صورت تمام طول درون وکتور pET28a(+) با موفقیت انجام شد و سازه نو ترکیب (-) pET28a E2) به درون سلول باکتری DH5α E-coli منتقل شده و تایید گردید.

نتیجه گیری: ساخت وکتور نو ترکیب pET28a(+) دارای ناحیه تمام طول ژن E2 از ژنوتیپ 2a استرین JFH1 ویروس هپاتیت سی و انتقال به درون باکتری E-coli این امکان را فراهم می کند تا جهت بیان ژن مزبور در سویه های بیانی از این وکتور نو ترکیب استفاده شود.

کلمات کلیدی: ویروس هپاتیت سی، تمام طول ژن E2، ژنوتیپ 2a استرین JFH1، وکتور pET28a(+)، باکتری E-coli.

مقدمه:

پروتئین تقسیم می شود که شامل سه پروتئین ساختمانی core (نوکلئوکسپید هسته) ، E1 و E2 (پوشش گلیکوپروتئینی) و P7 (پروتئین غشائی) و هفت پروتئین غیر ساختمانی (NS1، NS2، NS3، NS4A، NS4B، NS5A، NS5B) می باشد که برای تکثیر ژنوم ویروسی مورد نیاز هستند (۶، ۹ و ۲۰). طبق آمار سازمان بهداشت جهانی (WHO) حداقل ۱۷۰ میلیون نفر در سراسر جهان مبتلا به HCV هستند (۱۲-۱۷). عمده ترین راه های انتقال آن تزریق مواد مخدر، تماس مستقیم با خون و سایر فراورده های خونی آلوده و غیره می باشد. هم چنین تشخیص در مراحل اولیه دشوار است و بر پایه شناسایی آنتی بادی هایی است که در برابر چندین پروتئین HCV تولید شده اند (۲۳). در حال حاضر هیچ واکسنی برای درمان آن وجود ندارد و تنها راه مقابله با عفونت هپاتیت سی تجویز اینترفرون آلفا و بتا برای فعال کردن مکانیسم دفاعی ایمنی ذاتی در بدن و سپس استفاده از اینترفرون به صورت پگیله و ریباویرین^۵ می باشد (۱۳، ۱۴، ۱۵، ۲۲).

ویروس هپاتیت سی (HCV) عامل بیماری کبدی است و عفونت مزمن آن سیروز^۱ ایجاد کرده در نتیجه منجر به سرطان و در نهایت مرگ می شود (۳، ۱۰، ۲۳). هپاتیت سی از خانواده هپاسی ویروس^۲ و جنس فلاوی ویریده^۳ می باشد (۱، ۲، ۱۱، ۲۶). RNA خطی تک رشته ای مثبت آن ۹۶۰۰ نوکلئوتید دارد که در واقع پلی پروتئینی با حدود ۳۰۱۰ اسید آمینه را کد می کند (۱، ۱۷، ۲۳، ۲۶) و پس از ترجمه به ۱۰

مسئول نویسنده: تهران - میدان انقلاب اسلامی - خیابان دوازده فروردین -

انسیتوپاستور ایران - بخش هپاتیت و ایدز
پست الکترونیکی: prahimi@pasteur.ac.ir

تاریخ دریافت: ۱۳۹۴/۰۴/۲۳

تاریخ پذیرش: ۱۳۹۴/۰۷/۰۸

مواد و روش ها:

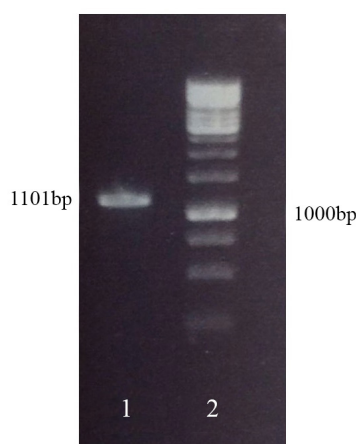
مولکول cDNA ژنوم کامل ویروس هپاتیت سی ژنوتیپ ۲a JFH۱ که درون وکتور pUC۵۷ به صورت نوترکیب از قبل ساخته شده بود از بانک ژن انستیتو پاستور تهران تهیه گردید. از این الگو برای طراحی پرایمر توسط نرم افزارهای CLC و Gene Runner به منظور تکثیر ناحیه E۲ استفاده شد، هم چنین جایگاه آنزیم های محدودگر مورد نظر از قبل در طراحی پرایمرهای جلویی و برگشتی^۷ قرار گرفتند، و جهت ساخت به شرکت تکاپو زیست سفارش داده شدند. تکثیر ژن کامل E۲ به طول ۱۱۰۱ نوکلئوتید توسط روش PCR انجام شد و مقادیر استفاده شده جهت انجام واکنش به این شرح است: پرایمرهای جلویی و برگشتی و ژنوم کامل ویروسی به عنوان الگو با مقادیر هر کدام ۲ میکرولیتر، آنزیم Pfu پلی مرز با واحد آنزیمی U/μl ۲/۵، مخلوط دی نوکلئوتید تری فسفات ۱۰ mM (Thermo scientific, Fermentas, Lithuania) هر کدام به مقدار ۱ μl، بافر ۱۰x آنزیم پلی مرز (Thermo scientific, Fermentas, Lithuania) به مقدار ۵ μl و در نهایت ۳۷ μl آب مقطر دو بار تقطیر برای حجم کلی ۵۰ μl. همه مواد ترکیب گشته و در دستگاه ترموسایکلر (Mastercycler eppendorf, Germany) قرار گرفت. برنامه دمایی PCR به ترتیب عبارت است از ۹۴ درجه سانتی گراد به مدت ۵ دقیقه واسرشتگی اولیه (initial denaturation)، ۹۴ درجه به مدت ۴۵ ثانیه واسرشتگی اصلی، ۶۰ درجه به مدت ۴۵ ثانیه اتصال پرایمرها، ۷۲ درجه به مدت ۹۰ ثانیه طویل سازی، سپس ۳۵ بار تکرار چرخه تکثیر و در نهایت ۷۲ درجه به مدت ۵ دقیقه به منظور دمای انتهایی طویل سازی. محصول PCR روی ژل آگارز ۱ درصد حاوی ۳ μl اتیدیوم بروماید تایید شد سپس باند ژن مورد نظر از روی ژل توسط کیت شرکت کیان (QIA quick Gel extraction kit, Germany) خالص گردید. در مرحله بعد محصول PCR به مقدار ۲۶ μl جهت هضم آنزیمی توسط آنزیم های محدودگر سریع EcoR۱ و Nde۱ (Thermo scientific, Fermentas, Lithuania) هر کدام به مقدار ۱ μl و بافر Green x۱۰ (Thermo scientific, Fermentas, Lithuania) به مقدار ۲ μl در دمای ۳۷ درجه به مدت ۲ ساعت انکوبه گردید. سپس وکتور pET۲۸a(+) استخراج شده از باکتری E-coli سوش DH۵α توسط کیت شرکت کیان (QIAprep spin Miniprep kit, Germany) به مقدار ۱۵ μl با همان آنزیم های محدودگر سریع EcoR۱ و Nde۱ هر کدام ۱ μl و بافر Green به مقدار ۳ μl طی ۲ ساعت گرمخانه گذاری (incubation) در ۳۷ درجه به صورت خطی در آمده و آماده پذیرش ژن E۲ می گردد. وکتور نوترکیب با ورود ژن E۲ بین

۲۴، ۲۷). از آنجا که ژنوم تک رشته ایی این ویروس چندین ناحیه متغیر دارد (۹)، هفت ژنوتیپ از آن تا کنون شناخته شده که حدود ۳۰ درصد در ترتیب نوکلئوتیدی و در نتیجه در سطح اسید آمینه ایی تفاوت دارند و این اختلاف در زیرتیپ ها به حدود ۱۰ تا ۳۰ درصد می رسد (۱۷ و ۲۳). از مهم ترین مناطق متغیر در ویروس، پروتئین E۲ با حدود ۴۰-۳۵ درصد اختلاف در توالی نوکلئوتیدی است و این تنوع ویروسی سبب پایداری عفونت HCV و مقاومت به اینترفرون و در نتیجه مزمن شدن بیماری می گردد (۵). پروتئین E۲ دارای ۳۶۳-۳۷۰ اسید آمینه است که اسید آمینه های ۳۸۴ تا ۷۴۶ را شامل می شود (۹، ۱۵، ۱۷) و جرم مولکولی آن بین ۲۵ تا ۳۱ کیلودالتون بوده که به همراه اضافه شدن الیگوساکاریدها وزنی حدود ۶۰-۷۰ کیلو دالتون خواهد داشت (۲، ۱۰، ۱۵). این پروتئین برای ورود به سلول میزبان و اتصال به رسپتور مورد نیاز است و این اتصال از طریق ناحیه HVR-۱ که بیش ترین ناحیه متغیر پروتئین E۲ است و در انتهای آمینی آن قرار دارد صورت می گیرد (۱۶، ۱۸، ۲۰، ۲۱). HVR-۱ به CD۸۱ انسانی که در سطح سلول های مختلف از جمله کبد بیان می شود متصل می گردد (۱، ۲۳) و از آنجا که این ناحیه در HCV بسیار حفاظت شده است، هدف اولیه و عمده دارویی و درمان از جمله طراحی واکسن ها و تولید آنتی بادی های خنثی کننده می باشد (۵، ۱۶، ۱۸). تفاوت های جزئی در ژنوم HCV روی همانندسازی و تکثیر ویروس هم چنین روی بیماری زایی و پاسخ میزبان اثر دارد، بنابراین تا کنون در مواجهه با این بیماری با ژنوتیپ های متفاوت درمان قطعی صورت نگرفته و واکسن ها و درمان های کنونی موفقیت چندانی کسب نکرده اند، در نتیجه مطالعه ها هم چنان بر روی ساختار و عمل کرد این ژن ادامه دارد (۱۳). مطالعه پیش رو بر روی ژن E۲ از ژنوتیپ ۲a (JFH۱) صورت گرفته است که اولین بار این ژنوتیپ از یک بیمار ژاپنی با هپاتیت برق آسا جداسازی شد (۱۴، ۲۳). این ژن به صورت تمام طول درون وکتور pET۲۸a(+) که پلاسمیدی حلقوی به طول ۵۳۶۹ جفت باز دارای ژن مقاومت به آنتی بیوتیک کانامایسین، ۱۳ جایگاه برای برش آنزیم های محدودکننده^۶ و هم چنین ۶ برجسب هیستیدینی در انتهای N و C با پروموتور TV می باشد نوترکیب گردید و سپس به باکتری E-coli انتقال یافت.

- 1-cirrhosis
- 2-hepacivirus
- 3-flaviviridae
- 4-world health organization
- 5-ribavirin
- 6-restriction enzyme

نام پرایمر	توالی پرایمر	نام آنزیم محدودالایتر	محل اتصال پرایمر
پرایمر جلویی ژن E2	5'-CAT ATG GGC ACC ACC GT-3'	Nde1 (CAT ATG)	از ابتدای ژنوم ویروس (بدون کدون آغاز) از نوکلئوتید ۱۴۸۹
پرایمر برگشتی ژن E2	5'-GAA TTC TTA CAA CTT CTC CAA TGC TGC-3'	EcoR1 (CAA TTC)	از انتهای ژنوم ویروس از نوکلئوتید ۲۵۹۰

جدول شماره ۱: پرایمرهای استفاده شده در واکنش زنجیره ای پلیمرز: پرایمرهای اختصاصی سنتز شده برای ژن E2 ویروس هپاتیت سی که ۶ نوکلئوتید ابتدای سمت ۵' محل قرارگیری توالی آنزیم های محدود الاثر می باشد.



تصویر ۱: محصول PCR (ژن E2 ویروس هپاتیت سی) تایید شده توسط الکتروفورز. ردیف ۱: باند نمونه تکثیر شده ژن E2 تمام طول ۱۱۰۱ جفت باز نوکلئوتید. ردیف ۲: مارکر ۱ کیلو جفت بازی.

سپس همسانه سازی ژن E2 درون وکتور pET28a(+) انجام گرفت به صورتی که حجم ژن E2 چهار برابر حجم وکتور خطی شده در نظر گرفته شد و پلاسمید نوترکیب به باکتری E-coli(DH5α) انتقال یافت، در نهایت یک بار دیگر نتیجه هضم آنزیمی پلاسمید نوترکیب بر روی ژل الکتروفورز نشان داد که ژن E2 درون پلاسمید حضور دارد (تصویر ۲)، و تایید نهایی نیز با روش تعیین توالی به صورت تطبیق ژن موردنظر با ژن توالی یابی شده انجام گرفت.

جایگاه برش آنزیم های محدودگر درون pET28a(+) توسط آنزیم T4 DNA ligase (Thermo scientific, Fermentas, Lithuania, ۲۰۰U) به مقدار ۱ μl و بافر لیگاز (Ther-X1۰, mo scientific, Fermentas, Lithuania) به مقدار ۲ μl و قرارگیری در دمای ۴ درجه به مدت یک شبانه روز به دست آمد. باکتری (DH5α E-coli) از طریق افزودن FBbuffer (حاوی Glycerol, Mops KCl و ۲H₂O-۲CaCl) و پس از رسیدن به فاز لگاریتمی ۰.۶=OD۶۰۰ که توسط دستگاه اسپکتروفوتومتر^۸ (Milton Roy-USA۵۰۱) سنجیده شد، مستعد پذیرش وکتور گردید. سپس وکتور نوترکیب (E2-pET28a) به درون باکتری به روش شوک حرارتی^۹ ترانسفورم شد و باکتری ها در پلیت آگار حاوی کانامایسین به غلظت ۵۰ mg/ml کشت داده شدند و پس از یک شبانه روز گرم خانه گذاری در ۳۷ درجه از کلونی های رشد کرده در محیط کشت تازه LB^{۱۰} براث حاوی کانامایسین (۵۰ mg/ml) کشت داده و روز بعد جهت اطمینان از حضور پلاسمید نوترکیب درون باکتری، کلنی PCR با پرایمرهای جلویی و برگشتی ژن E2 انجام گردید. هم چنین پس از استخراج پلاسمید توسط کیت شرکت کیاژن (QIaprep spin Miniprep kit, Germany) با روش هضم آنزیمی توسط آنزیم های fastNde1 و fastEcoR1 هر کدام ۱ μl و بافر ۱۰X Green به مقدار ۲ μl و گرمخانه گذاری به مدت ۳۰ دقیقه در دمای ۳۷ درجه، حضور ژن E2 درون پلاسمید پس از بررسی روی ژل آگارز ۱ درصد تایید گردید، و تایید نهایی وکتور نوترکیب برای اطمینان از عدم جهش (Mutation) در ژن E2 درون وکتور pET28a(+) به روش تعیین توالی سنجر^{۱۱} توسط شرکت زیست فناوری پیشگام صورت گرفت.

یافته ها:

پس از تکثیر ژن E2 توسط واکنش PCR با پرایمرهای اختصاصی که توالی آن ها به همراه جایگاه آنزیم های محدودالایتر (جدول ۱) آمده است، محصول PCR یک بار جهت تایید بر روی ژل آگارز مشاهده شد، تا از نظر اندازه با ژن مورد نظر هم خوانی داشته باشد (تصویر ۱).

- 7-forward and reverse primers
- 8- spectrophotometer
- 9- heat shock method
- 10-luria bertani
- 11-sanger

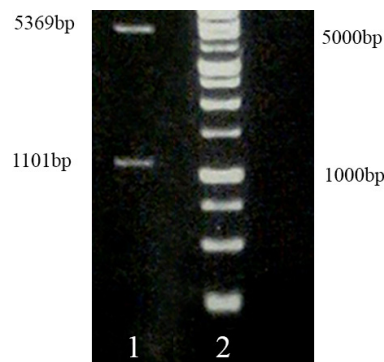
چنین وکتور نو ترکیب به دست آمده در این تحقیق حاوی تمام طول ژن E2 از ژنوتیپ 2a استرین JFH1 و ویروس هپاتیت سی می باشد که به عنوان مدل استاندارد و پر کاربرد در مطالعه ویروس هپاتیت سی در نظر گرفته شده است و می توان ویژگی های ایمنولوژیکی این استرین را نیز پس از بیان در میزبان های پروکاریوتی و یوکاریوتی بررسی نمود، که در گذشته نیز سیستم های کشت سلولی بر اساس JFH1 برای مقابله با HCV توسعه داده شدند ولی ژن E2 به صورت نو ترکیب با ژنوتیپ های دیگر در کشت سلول هپاتومای انسانی بررسی گردیده است (۲۲)، هم چنین این ژن به صورت کوتاه شده با حذف ناحیه هیدروفوبیک و با هدف بیان پروتئین به صورت ترشحی بررسی گردیده است (۸). ژن مورد نظر هم چنین در وکتورهای دیگری چون pUC و pPic9k نیز کلون گردیده است (۱۴، ۱۹، ۲۵) ولی تاکنون مطابق با تحقیق پیش رو پژوهشی صورت نگرفته است که قابل مقایسه باشد.

نتیجه گیری:

کلون ژن E2 تمام طول از ژنوتیپ 2a (JFH1) درون وکتور (+)pET28a و انتقال به سلول E-coli (DH5α) با موفقیت انجام شد، پیشنهاد می شود که برای مطالعه های بعدی جهت بیان تمام طول این پروتئین در سیستم های بیانی مختلف، این وکتور نو ترکیب مورد استفاده قرار گیرد تا با ساخت آنتی بادی خنثی کننده دارای بیش ترین شباهت به پروتئین کامل E2 ایمنی سازی بهینه و بیش از پیشی را در برابر ویروس هپاتیت سی با این ژنوتیپ به دست آورد.

سپاسگزاری:

پژوهش حاضر با استفاده از منابع و امکانات بخش هپاتیت و ایدز انستیتو پاستور تهران، ایران انجام گردیده است، لذا مراتب سپاس و قدر دانی خود را از همکاران محترم آن بخش اعلام می داریم.



تصویر ۲: تائید حضور ژن E2 درون پلاسمید pET28a(+) توسط هضم آنزیمی با آنزیم های محدودالایر EcoRI و NdeI. ردیف ۱: باند ۱۱۰۱ جفت بازی ژن E2. باند ۵۳۶۹ جفت بازی در بالا مربوط به وکتور pET28a(+) می باشد که بعد از برش با آنزیم های محدودالایر به دست آمده اند. ردیف ۲: مارکر ۱ کیلو جفت بازی.

بحث:

یک وکتور نو ترکیب حاوی ژن تمام طول E2 از ژنوتیپ 2a (JFH1) تهیه شد، طبق بررسی این ژنوتیپ توسط کاتو (Kato) و همکاران در سال ۲۰۰۳، نشان داده شد که تمام طول ژنوم این ویروس قادر به تولید ذرات عفونی با تیترا متوسط در کشت سلولی می باشد که البته دلایل آن هنوز نامعلوم است (۱۴). از آنجا که تا کنون دارو و واکسنی در سراسر جهان ساخته نشده که به طور کامل با بیماری هپاتیت سی مقابله کند (۱۵، ۲۴، ۲۵، ۲۷) بنابراین تحقیق های هم چنان بر روی این ویروس ادامه دارد. با توجه به اینکه ژن E2 دارای ناحیه بسیار متغیر در انتهای آمینی با سایت آنتی ژنیک ۴۱۲ تا ۴۲۳ است هدف اولیه و عمده برای طراحی واکسن و مقابله با تنوع ژنتیکی ویروس می باشد. ژن E2 پوشش گلیکوپروتئینی ویروس هپاتیت سی را به وجود می آورد که برای ورود به سلول میزبان و اتصال به رسپتور مورد نیاز است (۱۱، ۲۳)، هم چنین این پروتئین از ژنوتیپ 2a (JFH1) دارای ۱۱ جایگاه گلیکوزیلاسیون در انتهای آمینی با ۳۳۴ تا ۳۳۷ اسید آمینه می باشد که سبب شکل گیری صحیح پروتئین و ورود ویروس به درون سلول می شود (۹، ۱۹)، ناحیه آب گریز (hydrophobic) در انتهای C (کربوکسی ترمینال) پروتئین E2 قرار دارد که شامل ۳۱ اسید آمینه از ۷۱۶ تا ۷۴۶ می باشد که به عنوان لنگر غشایی^{۱۲} نامیده می شود و حذف این ناحیه منجر به ترشح پروتئین می گردد (۴، ۷، ۸) که در مطالعه های گذشته این ناحیه حذف شده تا بیان آن راحت تر صورت گیرد ولی هدف این تحقیق قرارگیری ژن E2 به صورت تمام طول در وکتور می باشد تا با بیان طول کامل ژن در میزبان های پروکاریوتی و یوکاریوتی بتواند در آینده اطلاعات ساختاری صحیحی را از این پروتئین به دست آورد. هم

منابع:

1. اعلائی اندبیلی ح، هپاتیت C: با نگاهی به هپاتیت C در بیماری های خاص هموفیلی تالاسمی دیالیزی و پیوند کلیه، ۱۰۰۰، مرکز تحقیقات بیماری های گوارشی و کبد دانشگاه علوم پزشکی بقیه الله الاعظم، ۱۳۹۱، ۸۰-۱.
2. Bianchi A, Crotta S, Brazzoli M, K.H.Foung S, Merola M. Hepatitis C Virus E2 Protein Ectodomain is Essential for Assembly of Infectious Virions. *Int J Hepatol*. 2011; 2011(12): 1-15.
3. Cai Z, Zhang CH, Chang KS, Jaing J, ChulAhn B, Wakita T. Robust Production of Infectious Hepatitis C Virus (HCV) From Stably HCV CDNA-Transfected Human Hepatoma Cells. *J Virol*. 2005; 79(22): 13963-73.
4. Charlotheaux B, Lins L, Moereels H, Brasseur R. Analysis of the C-terminal Membrane Anchore Domains of Hepatitis C Virus Glycoproteins E1 and E2: Toward a Topological Model. *J Virol*. 2002; 76(4): 1944-58.
5. Chen Z, Zhu Y, Ren Y, Tong Y, Hua X, Zhu F, et al. Hepatitis C Virus Protects Human B Lymphocytes From Fas-Mediated Apoptosis via E2-CD81 Engagement. *PLoS ONE*. 2011; 6(4): 1-30.
6. Clayton RF, Owasianka A, Aiken J, Graham S, Bhella D, Patal AH. Analysis of Antigenicity and Topology of E2 Glycoprotein Present on Recombinant Hepatitis C Virus-Like Particles. *J Virol*. 2002; 76(18): 7672-82.
7. Duenas-carrera S, Vina A, Garay HE, Reyes O, Alvarez-lajonchere L, Guerra I, et al. Immunological Evaluation of Escherchia Coli-Derived Hepatitis C Virus Second Envelope Protein E2 Variants. *J Pept Res*. 2001; 58(3): 221-8.
8. Heile JM, Fong YL, Rosa D, Berger K, Saletti G, Campagnoil S, et al. Evaluation of Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 for Vaccine Design: an Endoplasmic Reticulum-Retained Recombinant Protein is Superior to Secreted Recombinant Protein and DNA-Based Vaccine Candidates. *J Virol*. 2000; 74(15): 6885-92.
9. Iacob RE, Perdivara I, PrzbyIski M, Tomer KB. Mass Spectrometric Characterization of Glycosylation of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Reveals Extended Microheterogeneity of N-Glycans. *J Am Soc Mass Spectrum*. 2008; 19(3): 428-444.
10. Ki Jeong L, Young-Ah S, Young GC, Young SC, Gun WH, Kwang-Hoe C, et al. Hepatits C Virus E2 Protein Purified From Mammalian Cells Is Frequently Recognized by E2-Specific Antibodies in Patient Sera. *J Biol Chem*. 1997; 272(48): 30040-6.
11. Kong L, Giang E, Nieuwma T, Robbins JB, Deller MC, Stanfield RL, et al. Structure of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Antigenic Site 412 to 423 in Complex With Antibody Ap33. *J Virol*. 2012; 86(23): 13085-8
12. Kong L, Giang E, Nieuwma T, U. Kadam R, Cogburn KE, Hua Y, et al. Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein Core Structure. *Science*. 2013; 342(6162): 1090-4.
13. Krey T, Meola A, Keck ZY, Damier-Piolle L, Foung SKH, Rey FA. Structural Basis of HCV Neutralization by Human Monoclonal Antibodies Resistant to Viral Neutralization Escape. *PLoS Pathog*. 2013; 9(5): 1-34.
14. Mateu G, Donis R.O, Wakita T, Bukh J, Grakoui A. Intragenotypic JFH1 Based Recombinant Hepatitis C Virus Produces High Levels of Infectious Particles but Causes Increased Cell Death. *J Virol*. 2008; 376(2): 397-407.
15. Lucas M, Tsitoura E, Montoya M, Lalitotou B, Aslanoglou E, Kouvatsis V, et al. Characterization of

Secreted and Intracellular Forms of a Truncated Hepatitis C Virus E2 Protein Expressed by a Recombinant Herpes Simplex Virus. *J Gen Virol.* 2003; 84(3): 545-54.

16. Owasianka A, Clayton RF, Loomis-price LD, McKeating JA, Patel AH. Functional Analysis of Hepatitis C Virus E2 Glycoproteins and Virus-Like Particles Reveals Structural Dissimilarities Between Different Forms of E2. *J Gen Virol.* 2001; 82(8): 1877-83.

17. Owasianka AM, Tarr AW, Keck ZY, Li TK, Witteveldt J, Adair R, et al. Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to the Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein. *J Gen Virol.* 2008; 89(3): 653-659.

18. Petracca R, Falngi F, Galli G, Norais N, Rosa D, Campagnoli S, et al. Structure-Function Analysis of Hepatitis C Virus Envelope-CD81 Binding. *J Virol.* 2000; 74(10): 4824-30.

19. Pietschmann T, Kaul A, Koutsoudakis G, Shaviskaya A, Kallis S, Steinmann E, et al. Construction and Characterization of Infectious Inter Genotypic Hepatitis C Virus Chemeras. *Pnas.* 2006; 103(19): 7408-13.

20. Sautto G, Mancini N, Solforosi L, Diotti RA, Clementi M, Burioni R. HCV Proteins and Immunoglobulin Variable Gene (Igv) Subfamilies in HCV-Induced Type II Mixed Cryoglobulinemia.: A Concurrent Pathogenetic Role. *Clin Dev Immunol.* 2012; 2012(29): 1-11.

21. Sautto G, W.Tarr A, Mancini N, Clementi M. Structural and Antigenic Definition of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein Epitopes Targeted by Monoclonal Antibodies. *Clin Dev Immunol.* 2013; 2013(9): 1-12.

22. Scheel TK, Gottwein JM, Jensen TB, Prentoe JC, Hoegh AM, Alter HJ, et al. Development of JFH1-Based Cell Culture Systems for Hepatitis C Virus Genotype 4a and Evidence for Cross-Genotype Neutralization. *Pnas.* 2008; 105(3): 997-1002.

23. Sharma SD. Hepatitis C Virus: Molecular Biology and Current Therapeutic Options. *Indian J Med Res.* 2010 jan; 131: 17-34.

24. Taylor DR, Tian B, Pomano PR, Hinnebusch AG, Lai MMC, Mathews MB. Hepatitis C Virus Envelope Protein E2 Does not Inhibit PKR by Simple Competition with Auto Phosphorylation Sites in the RNA-Binding Domain. *J Virol.* 2001; 75(3): 1265-73.

25. Weijia Cai, Liya Su, Qingjiao L, Linbai Ye, Young Wu, Zhenghui Wu, et al. Expression Purification and Immunogenic Characterization of Hepatitis C Virus Recombinant E1E2 Protein Expressed by *Pichia Pastoris* Yeast. *J Anti Viol.* 2010; 88(1): 80-85.

26. Weng L, Du J, Zhou J, Ding J, Wakita T, Kohara M, et al. Modification of Hepatitis C Virus 1b RNA Polymerase to Make a Highly Active JFH1-Type Polymerase by Mutation of the Thumb Domain. *Arch Virol.* 2009; 154(5): 765-773.

27. Zesel MB, Turek M, Banmert TF. Getting Closer to the Patient: Upgrade of Hepatitis C Virus Infection in Primary Human Hepatocytes. *J Hep.* 2010; 53(2): 388-9.