

中國醫藥大學
醫學研究所
碩士學位論文

細胞因子 PTB 對 C 型肝炎病毒複製機制的探討

The function role of polypyrimidine
tract-binding protein in HCV replication



指導教授：鄭如茜 博士

研究生：葉維洲

中華民國九十四年七月

目錄

中文摘要	4
英文摘要	5
一、前言	7
1.1 C 型肝炎病毒的發現	7
1.2 病毒基因體	8
1.3 病毒基因產物	9
1.4 細胞培養系統	11
1.5 細胞因子 PTB 蛋白質	12
1.6 本論文的目的	13
二、材料與方法	14
2.1 DNA 轉染(DNA Transfection)	14
2.2 細胞 RNA 的萃取：	14
2.3 細胞蛋白質的萃取	15
2.4 Real-Time One-step RT-PCR	16
2.5 positive-strand cDNA 的製備	16
2.6 Real-Time PCR (positive strand)	17
2.7 negative-strand cDNA 的製備	17
2.8 Real-Time PCR (negative strand)	18
2.9 間接免疫螢光染色法	18
2.10 細胞核與細胞質蛋白分析	19
三、結果	20
3.1 在 HCV subgenomic replicon 細胞內轉染細胞因子 PTB 蛋白質， 觀察細胞內 HCV 非結構蛋白質的變化	20
3.2 細胞因子 PTB 蛋白質在 HCV subgenomic replicon 細胞內被抑制時， 觀察細胞內 HCV 非結構蛋白質的變化。	21
3.3 HCV subgenomic replicon 細胞內進行表現不同刪除突變 PTB 蛋白質， 觀察 HCV subgenomic replicon RNA 的變化	22
3.4 藉由間接免疫螢光法以及細胞核/細胞質蛋白分析 得知 NS5B 與 PTB 在細胞內的分佈	23

四、討論 25

附錄 1. 圖表 29

Figure. 1. 細胞內表現 PTB 蛋白質的 RNA 結果 29

Figure. 2. 細胞內表現 PTB 蛋白質的 Western blot 結果 30

Figure. 3. 細胞內表現 PTB siRNA 的 RNA 結果 31

Figure. 4. 細胞內表現 PTB siRNA 的 Western blot 結果 32

Figure. 5. 不同刪除突變 PTB 蛋白質示意圖及 Western blot 結果 33

Figure. 6. 細胞內表現不同刪除突變 PTB 蛋白質的 RNA 結果 34

Figure. 7. HEK293 細胞經分別轉染表現 NS5B 及 PTB 35

Figure. 8. HEK293 細胞經共同轉染表現 NS5B 及 PTB 36

Figure. 9. 細胞核與細胞質蛋白分析結果 37

附錄 2. 參照文獻: 38

摘要

C 型肝炎病毒屬於黃病毒科，是造成非 A 非 B 型肝炎的主要致病原。C 型肝炎病毒基因體為一條單股正向的 RNA 分子，全長 9.6 kb，可產生至少十個結構與非結構性病毒蛋白質。非結構性蛋白質 NS5B 是 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，它是病毒複製機制中最重要之酵素。細胞因子 PTB 會和 C 型肝炎病毒非轉譯區產生交互作用，不論是 5' 端或是 3' 端。此外，實驗室從 *in vivo* 和 *in vitro* 的實驗結果得知 PTB 會和 NS5B 的交互作用。因此 PTB 可能參與病毒 RNA 合成。

為瞭解 PTB 在 C 型肝炎病毒複製機制中的角色，我們藉由即時反轉錄聚合酶連鎖反應(real-time RT-PCR)和西方墨點法分析 PTB 對 HCV replicon 細胞的影響。PTB 會抑制 HCV RNA 的合成以及非結構蛋白質的表現。除此之外，PTB 靠近胺基端的蛋白質能明顯的抑制 HCV RNA 的合成。最後，我們看到 PTB 和 NS5B 在細胞質共同表現。綜合實驗結果，PTB 會藉由和 NS5B 的交互作用影響 HCV 病毒的 RNA 和蛋白質的合成。

Abstract

Hepatitis C virus (HCV) belongs to the *Flaviviridae*. It is the major cause of post-transfusion non-A, non-B hepatitis. HCV contains a positive single-stranded RNA genome of 9.6 kb that encodes at least 10 structural and nonstructural viral proteins. The NS5B is an RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) that serves as a key player to synthesize viral RNA. PTB was shown to interact with HCV 5' - and 3' - untranslated regions. In addition, our previous data showed that PTB could interact with HCV NS5B *in vivo* and *in vitro*. Therefore, PTB should involve in HCV RNA synthesis.

To understand the functional role of PTB in HCV replication, we analyzed the effects of PTB on HCV RNA synthesis using real-time RT-PCR and Western blot analysis in HCV replicon cells. PTB appears to partially repress HCV RNA synthesis, and HCV nonstructural protein expression. In addition, N-terminal of PTB dramatically inhibit in HCV RNA synthesis. Finally, we demonstrate that PTB and HCV NS5B colocalize in cytoplasm

region. Taken together, PTB could affect HCV RNA synthesis through interacting with HCV NS5B.

一、前言

1.1 C 型肝炎病毒的發現

C 型肝炎病毒是造成非 A 非 B 型病毒性肝炎(non-A, non-B hepatitis)的主要致病原。在 1989 年, Choo *et al.* 首先分離出 C 型肝炎病毒的基因體, 他們是使用免疫學方法篩選比對 cDNA 資料庫才從受感染的黑猩猩的血清中分離出來。當時 C 型肝炎病毒基因體被認定為正股 RNA 分子, 長度大約為 10 kilobase (kb)[Choo *et al.*, 1989]。後來, 利用重組 C 型肝炎病毒抗原發展出一套 ELISA 分析方法, 偵測人體內是否存在病毒抗體[Kuo *et al.*, 1989]。在那些經由輸血後感染非 A 非 B 型肝炎的病患體內以及許多捐血袋中偵測 C 型肝炎病毒抗體, 因此確認 C 型肝炎病毒是造成非 A 非 B 型肝炎散佈全球的原因[Kuo *et al.*, 1989; Nishioka *et al.*, 1991; Colombo *et al.*, 1989; Esteban *et al.*, 1989; Kuhl *et al.*, 1989; Mortimer *et al.*, 1989; Van der Poel *et al.*, 1989]。而且感染 C 型肝炎的病患經常伴隨著肝臟硬化, 並在 20 到 30 年後轉變成肝癌[Bruix *et al.*, 1989; Ohkoshi *et al.*, 1990; Saito *et al.*, 1990; Kiyosawa *et al.*, 1990; Nishioka *et al.*, 1991]。然而 C 型肝炎病毒的分子特徵直到 1994 年才完全被鑑定出來, C 型肝炎病毒是具有套膜的病毒在電子顯微鏡的觀察下, 直徑約 55~60 nm 的圓球體, 在膜

內的核心顆粒(nucleocapsid)呈二十面體，直徑約 33 nm。因為這些分子特徵所以才將 C 型肝炎病毒歸類在黃病毒科[Kaito *et al.*, 1994; Li *et al.*, 1995; Shimizu *et al.*, 1996]。

1.2 病毒基因體

C 型肝炎病毒具有一條單股正向的 RNA 分子，其基因體全長 9.6 kb，包含單一個 open reading frame，並且在 5' 及 3' 各有一個非轉譯區(untranslated regions, UTR)[Kato *et al.*, 1990; Takamizawa *et al.*, 1991]。5' 的非轉譯區長 341 bp 這個區域具有 internal ribosome entry site(IRES)，它控制 C 型肝炎病毒的轉譯反應，也因此 5' 非轉譯區在各個 genotypey 的 C 型肝炎病毒還保留很高的一致性[Friebe *et al.*, 2001; Rijnbrand and Lemon, 2000; Tsukiyama-Kohara *et al.*, 1992]。3' 非轉譯區的長度變異較大，接在 open reading frame 之後可分為三個部分，(1)一段約 40 個核苷酸序列的高度變異區(variable region)，(2)一段 poly(U)與 poly(C)序列聚集(3)一段具有高度保守性序列由 98 個核苷酸組合成的 X tail 區域，X tail 會形成穩定的二級結構[Kolykhalov *et al.*, 1996; Kolykhalov *et al.*, 1997; Tanaka *et al.*, 1996]。而這段 3' 端非轉譯區在 C 型肝炎病毒複製過程和轉作用中扮演重要角色[Friebe *et al.*, 2002]。

1.3 病毒基因產物

夾在這兩個非轉譯區的 open reading frame 能夠轉譯出長約 3000 個胺基酸的多蛋白質前驅物，而形成 C 型肝炎病毒成熟蛋白質則需將多蛋白質前驅物水解分割，而參與分割的酵素至少有三種分別是 cellular signal peptidase 和病毒的 NS2-NS3 以及 NS3 蛋白質水解酶 [Hijikata *et al.*, 1991; Hijikata *et al.*, 1993a; Hijikata *et al.*, 1993b; Grakoui *et al.*, 1993a; Grakoui *et al.*, 1993b; Selby *et al.*, 1993; Tomei *et al.*, 1993; Manabe *et al.*, 1994]。多蛋白質前驅物靠近氨基端部份可分割出病毒的結構蛋白質(structure protein)，分別是核心蛋白質(core protein)、套膜蛋白質 E1 和 E2 (envelope protein)、p7，這些蛋白質是由 cellular signal peptidase 作用分割出來，一般所說的 E2(E2-B)包括了 E2-A 和 p7，因為 p7 是將 E2-B 的羧基端切割下來，所以 E2-A 和 p7 就比較少見多數看到的是 E2-B [Hijikata *et al.*, 1991; Lin *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994; Mizushima *et al.*, 1994;]。

多蛋白質前驅物靠近羧基端部份則可分割出病毒的非結構蛋白質(nonstructure protein)，分別是 NS2、NS3、NS4A、NS4B、NS5A、NS5B，這後半部的蛋白質是由兩個病毒的蛋白質水解酶(NS2-NS3 和 NS3 serine protease)進行切割，首先 NS2-NS3 蛋白質水解酶的自我切割從 NS2-NS3 的中間切開[Grakoui *et al.*, 1993b; Hijikata *et al.*,

1993]。NS2 將和多蛋白質前驅物分開，而 NS2-NS3 蛋白質水解酶也因此失去了水解酶的活性，因為 NS3 靠近氨基端三分之一的部份具有 serine protease 的功能，也在 NS2 被切開後開始執行蛋白質水解酶的功能，進一步將 NS3/NS4A、NS4A/NS4B、NS4B/NS5A、NS5A/NS5B 切開[Bartenschlager *et al.*, 1993; Grakoui *et al.*, 1993a; Tomei *et al.*, 1993]。

非結構性蛋白質 5A (nonstructural protein 5A, NS5A) 具有 447 個胺基酸，是磷酸化蛋白質(phosphorylated protein)，大小為 56 kDa；若與 NS4A 進一步結合則會形成過磷酸化產物(hyperphosphorylated protein)，大小為 58 kDa。而高度磷酸化時需要 NS3、NS4A 和 NS4B 參與反應[Asabe *et al.*, 1997]。當 NS4A 與 NS5A 直接進行交互作用，NS5A 磷酸化的程度會受到影響[Kaneko *et al.*, 1994; Tanji *et al.*, 1995]，其功能推測可能與病毒複製及轉譯有關[Kaneko *et al.*, 1994; Koch *et al.*, 1999; Neddermann *et al.*, 1999]

非結構性蛋白質 5B (nonstructural protein 5B, NS5B) 的分子量約為 68 kDa，是以 RNA 為模版進行複製的 RNA 聚合酶(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)，參與 HCV 病毒複製過程中合成正股以及負股基因體 RNAs，即以正股 RNA 當模板來複製負股 RNA，或是以負股 RNA 當作模板複製新的正股 RNA[Behrens *et al.*, 1996; Lohmann *et al.*, 1997; Yuan *et al.*, 1997; Al *et al.*, 1998; Yamashita *et al.*, 1998;

Ferrari *et al.*, 1999; Ishii *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 1999]。NS5B 會利用兩個 RNA binding domains 結合至 HCV ORF 的 3'端，靠近 X tail 的 stem-loop 結構，推測主要參與病毒的複製過程 [Cheng *et al.*, 1999; Oh *et al.*, 2000]。

1.4 細胞培養系統

HCV 的研究因缺乏有效的細胞培養系統，以致於造成 HCV 的感染過程、複製過程、病毒顆粒合成等致病機轉仍未清楚。因此發展了許多替代模式系統，方便 HCV 做更進一步的研究。近年來建立了一套可以研究 HCV 複製的細胞培養系統，利用帶有 HCV 5'端非轉譯區、neomycin phosphotransferase 基因、EMCV 的 IRES、HCV 非結構性蛋白質 NS3 至 NS5B 的 RNA 及 HCV 3'端非轉譯區的 subgenomic replicon。這個 subgenomic replicon 的結構是 bi-cistronic 的形式：前面帶有 neomycin resistant gene 可使用 G418 藥物篩選出能表現此 subgenomic replicon 的轉染(transfection)細胞；後面則接上 C 型肝炎病毒基因型 1b(genotype 1b)基因體中非結構性蛋白質(non-structural proteins)的部分(由 NS3 到 NS5B)。轉染至人類肝癌細胞株 Huh-7 內，並經過 G418 的篩選後可以得到帶有 subgenomic replicon 的細胞株，可以進行持續性的病毒基因體複製，並可偵測到病毒蛋白質的表現

[Lohmann *et al.*, 1999; Pietschmann *et al.*, 2001]。將那些可在 Huh-7 細胞株中穩定複製 subgenomic replicons 及表現非結構性蛋白質的細胞進行分析，發現這些 subgenomic replicons 在細胞內不斷地進行適應性突變(adaptive mutations)。最後這些突變的 replicons 在 Huh-7 細胞中的 RNA 複製效率則有顯著的提高[Blight *et al.*, 2000; Guo *et al.*, 2001; Krieger *et al.*, 2001; Lohmann *et al.*, 2001]。由 subgenomic replicon 細胞培養系統可瞭解許多關於 HCV 複製機轉的解答。

1.5 細胞因子 PTB 蛋白質

細胞因子 PTB (polypyrimidine tract-binding protein)的分子量為 57/60 kDa，是 hnRNPI family 的其中之一屬於 RNA 結合蛋白質，在細胞內具有 RNA splicing 的功能[Lin *et al.*, 1995]，並且會和許多病毒 RNA 的 3'端結合[Huang *et al.*, 1999; Ito *et al.*, 1997]。有文獻提出 PTB 不但會和 HCV RNA 有相互作用，而且在 HCV 的 5'-UTR 就有三處不同的地方[Ali and Siddiqui *et al.*, 1995]，並證實了 PTB 對於 HCV IRES 的功能是不可或缺的[Anwar *et al.*, 2000]，除此之外 HCV 3'-UTR 的 X tail 區域也是 PTB 會結合的地方[Ito *et al.*, 1998]。因為 HCV 5'-UTR 是病毒轉譯反應的起始位置，所以 PTB 和 HCV 5'-UTR 的相互作用就說明了細胞因子 PTB 極有可能參與 HCV 轉譯過程的調控，

在最近的文獻也提出了證明，當細胞因子 PTB 受到抑制時，HCV 轉譯反應也會受到抑制[Zhang *et al.*, 2004;Domitrovich *et al.*, 2005]。至於 HCV 3'-UTR 則被假設為病毒複製 RNA 的起始位置，所以 PTB 和 HCV 3'-UTR 的相互作用也可能影響複製機轉。

1.6 本論文的目的

肝癌是國內十大死因之一，而 C 型肝炎正是形成肝癌的原因之一。然而目前對於感染 C 型肝炎的患者並沒有可以徹底治療的方法或藥物，對於病毒複製的機轉也不夠清楚。目前認為病毒的複製需要其他細胞及病毒因子共同協助。本實驗室先前已由廖美惠學姐利用 GST pull-down assay 和免疫沈澱法證明 PTB 與 HCV NS5B 有交互作用。本論文則進一步探討 PTB 在 C 型肝炎病毒複製上的影響，希望能對 C 型肝炎病毒的複製機制有進一步瞭解，以利對病毒更深入的研究或治療藥物的研發。

二、材料與方法

2.1 DNA 轉染(DNA Transfection)

取 1.2×10^6 細胞分盤到 3.5 公分的培養皿中，培養 24 小時後，此時培養皿中的細胞大約呈九分滿，以不含抗生素的細胞培養液清洗培養皿中的細胞，將 10 μ l Lipofectamine 2000(invitrogen)以及 6 μ g 質體 DNA 先分別和 250 μ l Opti-MEM(invitrogen)作用 5 分鐘，再將 Lipofectamine 2000 及質體 DNA 混合均勻，在室溫中靜置二十分鐘，再緩慢加入培養皿中，並均勻搖晃培養皿，放入 37°C 培養箱中反應 4 小時後，更換培養皿中的培養液，經過 24 小時後再進行一次相同的 DNA 轉染，培養 48 小時後將培養皿中的細胞收集起來。

2.2 細胞 RNA 的萃取：

抽取 RNA 的試劑為 PROtech Technology 公司生產之 Rezol™ C&T 試劑。將 DNA 轉染後的細胞收集到 1.5 ml 離心管中，加入 0.5 ml Rezol™ C&T 試劑，把細胞完全打散混合均勻，在室溫下靜置 5 分鐘，加入 100 μ l Chloroform，劇烈震盪 15 秒，室溫下作用 10 分鐘，離心 13000 rpm 4°C 15 分鐘，取出上清液，加入 250 μ l Isopropanol

混合均勻放置在 -80°C 冰箱 1 小時，取出再離心 13000 rpm 4°C 10 分鐘，將 Isopropanol 倒掉，加入 75 % 酒精清洗，離心 13000 rpm 4°C 5 分鐘，使用真空抽氣機將 RNA 乾燥，最後 RNA 溶於 40 μl 的滅菌水中。

2.3 細胞蛋白質的萃取

將 DNA 轉染後 48 小時的細胞收集在 1.5 ml 離心管中，用 1 ml PBS 將細胞重新懸浮後，離心 3000 rpm 4°C 5 分鐘，清洗動作重覆二次後倒掉上清液，加入適量的 Lysis buffer (50 mM Hepes pH 7.5 sodium salt, 150 mM NaCl, 10 % glycerol, 1 % Triton X-100, 1.5 mM MgCl_2 , 1 mM PMSF, 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptin and aprotinin, 200 μM NaO, 10 mM NaF, 100 μM EGTA)，劇烈震盪後放在冰上反應 1 小時，每 10 分鐘震盪一次，最後 10000 rpm 4°C 10 分鐘離心，收集上清液並取出一小部份測蛋白質濃度。其餘的蛋白質加入 4x protein loading dye(20% glycerol, 10% β -mercaptoethanol, 60% SDS, 0.25 M 4X Tris-HCl pH 6.8, 0.01% bromophenyl blue, 二次水加至總體積為 10 ml)，置於 95°C 乾浴機上反應 5 分鐘，使蛋白質完全 denature。

2.4 Real-Time One-step RT-PCR

從準備好的細胞 RNA 中取出 100 ng 的 RNA，加入 12.5 μ l 2x SYBR Green Master Mix，0.5 μ l 5 μ M c149 (5'-TGCGGAACCGGT GAGTACA-3')，0.5 μ l 5 μ M c342 (5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTG CTCAT-3')，0.25 μ l RNasine (20 unit / μ l)，0.125 μ l RTase (50 unit / μ l)，最後補二次水到總體積 25 μ l，並立即將試管放入 ABI 7000 機器中進行 One-step RT-PCR (48°C 30 分鐘，95°C 10 分鐘，95°C 10 秒，60°C 1 分鐘，進行 40 個循環)，最後使用 3 % Argarose Gel 做再次確認反應後的結果。

2.5 positive-strand cDNA 的製備

從準備好的細胞 RNA 中取出 2 μ g 的 RNA，加入 4 μ l 5x RT buffer (1X : 50 mM Tris, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)，2 μ l 10 mM dNTP(各別為 10 mM 的 dATP,dTTP,dCTP,dGTP)，500 ng Tag-c342 (5'-acatgcgcgcatctagaCTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3')，0.5 μ l RNasine (20 unit / μ l)，0.5 μ l MMLV-RTase (200 unit / μ l)，加入二次水使最後反應體積為 20 μ l，42°C 反應 1 小時，接著再以 100°C 加熱 1 小時去除酵素活性，加熱完立即放入冰上降溫並 spin down。

2.6 Real-Time PCR (positive strand)

從 cDNA 中取出 3 μ l 的 cDNA，加入 12.5 μ l 2x SYBR Green Master Mix，0.5 μ l 5 μ M Tag (5'-acatgcgcggcatctaga-3')，0.5 μ l 5 μ M c149 (5'-TGCGGAACCGGTGAGTACA-3')，0.25 μ l RNasine(20 unit / μ l)，0.125 μ l RTase (50 unit / μ l)，最後補二次水到總體積 25 μ l，並立即將試管放入 ABI 7000 機器中進行 One-step RT-PCR(48°C 30 分鐘，95°C 10 分鐘，95°C 10 秒，60°C 1 分鐘，進行 40 個循環)，最後使用 3 % Argarose Gel 做再次確認反應後的結果。

2.7 negative-strand cDNA 的製備

從準備好的細胞 RNA 中取出 2 μ g 的 RNA，加入 4 μ l 5x RT buffer (1X : 50 mM Tris, pH 8.3, 75 mM KCl, 3 mM MgCl₂)，2 μ l 10 mM dNTP(各別為 10 mM 的 dATP,dTTP,dCTP,dGTP)，500 ng Tag-c149 (5'-acatgcgcggcatctagaTGCGGAACCGGTGAGTACA-3')，0.5 μ l RNasine (20 unit / μ l)，0.5 μ l MMLV-RTase (200 unit / μ l)，42°C 反應 1 小時，接著再以 100°C 加熱 1 小時去除酵素活性，加熱完立即放入冰上降溫並 spin down。

2.8 Real-Time PCR (negative strand)

從 cDNA 中取出 3 μ l 的 cDNA，加入 12.5 μ l 2x SYBR Green Master Mix，0.5 μ l 5 μ M Tag (5'-acatgcgcggcatctaga-3')，0.5 μ l 5 μ M c342 (5'-CTTAAGGTTTAGGATTCGTGCTCAT-3')，0.25 μ l RNasine(20 unit / μ l)，0.125 μ l RTase (50 unit / μ l)，最後補二次水到總體積 25 μ l，並立即將試管放入 ABI 7000 機器中進行 One-step RT-PCR(48°C 30 分鐘，95°C 10 分鐘，95°C 10 秒，60°C 1 分鐘，進行 40 個循環)，最後使用 3 % Argarose Gel 做再次確認反應後的結果。

2.9 間接免疫螢光染色法

將 18 mm X 18 mm 的正方形蓋玻片浸泡於 99%工業酒精中 1 分鐘，用鑷子將蓋玻片夾起並用拭鏡紙擦乾，置於 3.5 cm dish 中，以 UV 燈照射 30 分鐘，放入 5×10^5 HEK293 細胞並加入 1.5 ml 的 DMEM，均勻搖晃使細胞平均散佈在 dish 中，靜置培養 24 小時，進行 DNA 轉染後 48 小時，將蓋玻片取出放置 parafilm 上，PBS 清洗一次，加入 100 μ l 4% paraformaldehyde 室溫中反應 20 分鐘，吸去 paraformaldehyde，加入 100 μ l 0.2% Triton X-100 並置於冰上反應 20 分鐘，吸去 Triton X-100，加入 100 μ l 4% BSA 並置於 37°C 培養箱中反應 1 小時，吸去 BSA，加入以 1% BSA 稀釋的 primary antibody 並

置於4°C靜置反應o/n, PBS沖洗5次, 加入以1% BSA稀釋的secondary antibody 並避光放於室溫反應1小時, PBS沖洗10次, 用擦手紙將多餘的PBS吸乾, 先將10 µl Mounting media放在載玻片上, 再將蓋玻片倒蓋於載玻片上, 用指甲油將蓋玻片周圍密封, 用棉花棒將蓋玻片上的水漬擦拭乾淨, 放於共軛焦顯微鏡(Leica TCS SP2)下觀察。

2.10 細胞核與細胞質蛋白分析

這個實驗主要是採用 Nuclear / Cytosol Fractionation kit (Biovision, USA), 方法簡述如下將 1×10^6 HEK293 細胞放入 3.5 cm dish 中培養 24 小時, 進行 DNA 轉染 48 小時後, 以 600 xg 4°C 5 分鐘將細胞收集到 1.5 ml 離心管中, 加入 200 µl CEB-A buffer(含 DTT 和 protease inhibitor cocktail), vortex 15 秒後靜置冰上 10 分鐘, 加入 11 µl CEB-B buffer, vortex 15 秒靜置冰上 1 分鐘, vortex 5 秒直接離心 16000 xg 4°C 5 分鐘, 收集上清液此為細胞質蛋白, PBS 清洗一次並離心 16000 xg 4°C 5 分鐘, 吸乾剩餘的 PBS 後加入 100 µl NEB buffer, 使 pellet 重新懸浮, vortex 15 秒並靜置於冰上反應 10 分鐘, 重覆此步驟 4 次, 離心 16000 xg 4°C 10 分鐘, 收集上清液此為細胞核蛋白。取一小部分測蛋白質濃度, 其餘進行 Western blot 實驗。

三、結果

3.1 在 HCV subgenomic replicon 細胞內轉染細胞因子 PTB

蛋白質，觀察細胞內 HCV 非結構蛋白質的變化

將準備好的 HCV subgenomic replicon 細胞， 1.2×10^6 cell/3.5 cm dish，在培養 24 小時後依序轉染 Mock、Vector (pCMV-myc)(BD)、pCMV-myc-PTB 在轉染後 48 小時收集各組細胞蛋白質，以 Western blot assay 觀察實驗結果(fig. 2)，Mock 是實驗的對照組，證實在轉染過程中的 LF2000 試劑(invitrogene)並不會對細胞生長造成傷害。pCMV-myc 則是第二個對照組，證明單純的表現質體並不會影響細胞內的非結構蛋白質。而後在實驗組觀察到的變化完全可以視為細胞表現 PTB 蛋白質所造成的。在這次實驗的 Western 結果中除了 PTB 這組的 pCMV-myc 較明顯少於 Mock 外，其他 NS5A、Actin 和 NPT II 等三組，其 Mock 和 pCMV-myc 結果都相近。在實驗組結果中可觀察到經轉染 pCMV-myc-PTB 的細胞，確實會表現 PTB 蛋白質而且是數倍高於 Mock 和 pCMV-myc。至於非結構性蛋白質 NS5A 則是受到影響而降低表現，此結果和 2001 年的文獻結果一致[Murakami *et al.*, 2001]。Actin 的結果則是比較此次實驗中，每個樣本取的量是一致的，並不是因為樣本量的不一致所造成觀察結果的變化。因為在這個

subgenomic replicon 的結構是 bi-cistronic 的形式，前半帶有 neomycin resistant gene 此基因不僅僅只是用來篩選細胞內是否存在 subgenomic replicon RNA，在這個基因前面還接上了一段 HCV 5'-UTR 的序列，因此 NPT II 這個蛋白質的產生是經由 HCV IRES 的轉譯反應，所以 NPT II (neomycin phosphotransferase)蛋白質的變化就是表示 HCV IRES 控制轉譯反應是否受到影響。由實驗結果得知 HCV IRES 的轉譯反應並不會因為 PTB 蛋白質的大量表現而改變。而 HCV RNA 的表現量則是下降的。

3.2 細胞因子 PTB 蛋白質在 HCV subgenomic replicon 細胞內被抑制時，觀察細胞內 HCV 非結構蛋白質的變化。

將準備好的 HCV subgenomic replicon 細胞， 1.2×10^6 cell/3.5 cm dish，在培養 24 小時後依序轉染 Mock、Vector (pU6)、pU6-PTB43 在轉染後 24 小時會再進行一次轉染反應，並在第二次轉染完成後 24 小時內收集各組細胞蛋白質，以 Western blot assay 觀察實驗結果(fig. 4)。Mock 是實驗的對照組，證實在轉染過程中的 LF2000 試劑 (invitrogene)並不會對細胞生長造成傷害。pU6 則是第二個對照組，證明單純的表現質體並不會影響細胞內的非結構蛋白質。在實驗結果中觀察到實驗組和對照組的結果在互相比較下，實驗組的 PTB 和 NS5A 蛋白質表現質都受到抑制，也就是 subgenomic replicon 細胞內

的 PTB 蛋白質會因轉染 pU6-PTB43 進而達到抑制 PTB 蛋白質的效果，而非結構性蛋白質 NS5A 也因此受到抑制。HCV RNA 的表現則是增加。

3.3 HCV subgenomic replicon 細胞內進行表現不同刪除突變 PTB 蛋白質，觀察 HCV subgenomic replicon RNA 的變化

將準備好的 HCV subgenomic replicon 細胞， 1.2×10^6 cell/3.5 cm dish，在培養 24 小時後依序轉染 Vector (pCMV-myc)、pCMV-myc-PTB、pCMV-myc-PTB(1-169)、pCMV-myc-PTB(169-294)、pCMV-myc-PTB(1-329)、pCMV-myc-PTB(330-531)，在轉染完成後 48 小時內收集各組細胞蛋白質，以 Western blot assay 觀察實驗結果 (fig. 5)。由結果得知雖然轉染反應的每個條件都一致，但轉染出來的效果還是有所不同，其中以 pCMV-myc-PTB(1-329)轉染效果最好，pCMV-myc-PTB(330-531)最差。然而 HCV subgenomic RNA 的正股及負股 Real-time PCR 結果，是把收集好的細胞 RNA 先進行反轉錄作用將 RNA 轉變成互補 DNA，再接著進行 Real-time PCR 由機器偵測的數據經電腦軟體運算得到的結果，最後以蛋白質的表現作為基準，比較 PTB 和 PTB deletion 蛋白質之間的差異 (fig. 6)，從圖表可以明顯觀察到除了 pCMV-myc-PTB(330-531)外，其餘三個 PTB deletion 蛋白質的正股及負股結果都是被抑制的。

3.4 藉由間接免疫螢光法以及細胞核/細胞質蛋白分析得知

NS5B 與 PTB 在細胞內的分佈

以螢光染色觀察 NS5B 與 PTB 在細胞內的分佈狀況時，首先內生性的 PTB 蛋白質，不管是否在 HEK293 細胞內進行大量表現 PTB (fig. 7)，卻只能觀察到 PTB 出現在細胞核內，這表示 PTB 只會出現在細胞核。而 NS5B 並不是 HEK293 所具有的蛋白質，所以經由細胞轉染才能在細胞中觀察到 NS5B 在細胞內的分佈，在那些有大量表現 NS5B 的細胞，看到 NS5B 只散佈在細胞質，並未進一步進入到細胞核。即使是 PTB/NS5B 共轉染表現蛋白質時(fig. 8)，也是一樣只能看到 PTB 在細胞核，NS5B 在細胞質，很少數則可以看到 PTB 和 NS5B 會共同表現在靠近核膜附近的位置。

此外，我們也分別取細胞質及細胞核蛋白質觀察 PTB 與 NS5B 蛋白質的分佈狀況(fig. 9)：HEK293 細胞做細胞轉染後，觀察 PTB 或 NS5B 在細胞內的分佈是否有變化，pCMV-flag(Sigma)是 NS5B 的 vector，這只是證實 NS5B 在大量表現後，如果 PTB 有受到影響並不是因質體轉染所造成的。HCV subgenomic replicon cell 是這個實驗的對照組，由此觀察細胞內 PTB 和 NS5B 兩個蛋白質之間的互動，PTB 還是只存在細胞核內，而 NS5B 也是只分佈在細胞質中，但這是指大部分 NS5B 而言因為有發現極微量的 NS5B 會出現在細胞核內。在只

單獨表現在 NS5B 的結果上看到 PTB 仍然只存在細胞核內不論是在轉染 Vector 或是 pCMV-flag-NS5B 表現的結果，然而 NS5B 在大量表現之後卻看到 NS5B 會平均散佈在細胞質和細胞核，當 PTB/NS5B 共同表現在細胞內時卻見到 PTB 不只出現在細胞核就連細胞質也有出現。

四、討論

已經有文獻證明 PTB 和 HCV 5'-UTR IRES 區域會交互作用結合在一起，說明了 PTB 會參與 HCV 轉譯反應的調控。目前知道過量 PTB 蛋白質對 HCV 轉譯反應會有抑制作用[Murakami *et al.*, 2001]，從本論文 Western blot 的分析也得到一樣的結果；當細胞大量表現 PTB 蛋白質時，非結構性蛋白質 NS5A 的表現下降，但是 NPT II 蛋白質的表現並沒有變化的現象 (Fig. 2)，也就是 HCV IRES 控制的轉譯反應並沒有受到抑制，雖然這樣的結果和文獻提出的結果並不符合，也許在細胞內還存在某些未知的因素才造成這樣的情況發生。其實在 Domitrovich *et al.*[2005]也有提到，PTB 會和 HCV 非結構性蛋白質 NS5B 和 NS3 都有交互作用產生，而 NS3 protease 的功能就是控制多蛋白質前驅物的切割，或許因為 PTB 的大量表現間接地影響到 NS3，最後造成 NS5A 的下降，然而這個推論需要更進一步的求證。和 PTB 有交互作用的非結構性蛋白質 NS5B 是個 RdRp (RNA dependent RNA polymerase) 酵素，在 HCV RNA 的複製機制中扮演決定性的角色，因此 PTB 的大量表現極可能會對 HCV RNA 的合成造成影響。由 Real-time RT-PCR 的結果得知，PTB 大量表現時，HCV RNA 的合

成下降 (Fig. 1)，因此可以推測出 PTB 參與 HCV subgenomic replicon RNA 的合成，可能因此造成 HCV 蛋白質表現量的減少。

相對的，利用 RNAi 抑制 PTB 的表現，此時 HCV 蛋白質的表現也有些微的下降 (Fig. 4)，特別的是，HCV RNA 的合成有些微的增加 (Fig. 3)。根據 Domitrovich *et al.*[2005]發表的結果有兩個地方必須注意，(1)利用 RNAi 抑制 PTB 的表現後，HCV IRES 的轉譯反應也會跟著被抑制。但是單獨觀察 HCV IRES 調控的 GFP 報導基因時，PTB RNAi 也會增加 GFP 的表現 (data not shown)，顯示除了 IRES 外，可能仍有其他調控 HCV 轉譯的機制。(2)隨著 PTB 抑制時間的延長，雖然 HCV 複製機制剛始會被抑制，但隨著時間的拉長 HCV 複製反應卻漸漸回復甚至於更強，因此推論 HCV RNA 的複製機制應有許多的細胞因子可供病毒進行複製。

若以大量表現 PTB 蛋白質的細胞 RNA 為基準，則其他 PTB deletion 蛋白質存在的細胞，其 HCV subgenomic replicon RNA 的複製機制似乎是被抑制，其中 PTB(1-329)不但能抑制 HCV subgenomic replicon 的複製機轉，而且其抑制的效果比 PTB 多出許多，而包含 PTB 蛋白質 C 端部分的 PTB(330-531)蛋白質，抑制 HCV RNA 的合成較不明顯。而且實驗室其他人的結果顯示，PTB 的 N 端而非 C 端與 NS5B 結合。再加上根據 Kamath *et al.*[2001]的描述 PTB 具有 4 個 RRM 的

(RNA recognition motifs)，其中靠近 N 端 RRM 1 和 RRM 2 的功能是控制進出細胞核，另外靠近 C 端 RRM 3 和 RRM 4 是和 RNA 結合的主要區域，或許這可以解釋為何 PTB(1-329)能夠抑制複製機制。

在 FA 的結果看到，單獨表現 PTB 或 NS5B 時，都只看到 PTB 在細胞核內不會到細胞質，而 NS5B 散佈在細胞質中沒有進入細胞核內，如果 PTB 只會存在細胞核這是正確的話，那麼當大量表現 NS5B 或是 PTB/NS5B 共同表現時，應該可以看到多數 PTB 和 NS5B 共同表現在同一位置的結果，因為 PTB/NS5B 的 IP Western 結果是兩個蛋白質會交互作用結合在一起，但共同表現蛋白質 PTB/NS5B 的 FA 結果卻不是如此，因為能看到 PTB 和 NS5B 共同表現的結果實在太少了，在 400 倍的顯微鏡下觀察有共同表現蛋白的細胞約每 1000 個才能看到一個，這是否說明 PTB 和 NS5B 的結合並非一直持續在進行，而是在某個特定的狀況才在結合在一起。還是說 PTB 和 NS5B 雖然能夠直接相互結合但是必須存在某個條件，因為未滿足那個條件所以在 FA 看不到在細胞內共同表現。

有些細胞內發生的結果可能無法經由間接的免疫螢光呈色分析方法(IFA)觀察，所以必須藉助其他較特別的分析方法瞭解蛋白質在細胞內分佈的情形，再經由不同實驗結果的相互印證和比較，推測細

胞內較接近真實狀況的結果。藉由分離 HCV subgenomic replicon 細胞蛋白質，可觀察到 PTB 依然只存在細胞核內，而 NS5B 主要是分佈在細胞質，但是卻有一小部分的 NS5B 似乎會進入細胞核內，這是否表示在一般狀況下 PTB 和 NS5B 都是各自分布在細胞核和細胞核，唯有在特定的情況下才會促使 NS5B 進入到細胞核內。在 HEK293 細胞轉染 pCMV-flag 和 pCMV-flagNS5b 的結果，得知不論是表現載體或是 NS5B 都不會影響 PTB 的分佈(只存在細胞核內)，但是當大量表現 NS5B 時卻可以觀察到在細胞核和細胞質內都有 NS5B 的存在，然而 β -Actin 的結果也同樣在細胞核和細胞質都有表現，這意味著在細胞核與細胞質蛋白分析的實驗會互相干擾，可能因此和間接免疫螢光呈色法(IFA)觀察到的結果不同。由 IFA 結果得知 NS5B 單獨表現時只在分佈在細胞質並不會進入細胞核內，而且少數細胞可以觀察到 PTB 和 NS5B 共同表現在細胞核膜周圍。

綜上所述，細胞因子 PTB 與 HCV NSB 具交互作用，此交互作用影響 HCV RNA 的合成，並進一步可影響 HCV 蛋白質的轉譯作用。但 PTB 只是參與 HCV 病毒複製機制宿主蛋白質中其中之一，仍需其他病毒及宿主細胞因子的參與。

附錄 1. 圖表

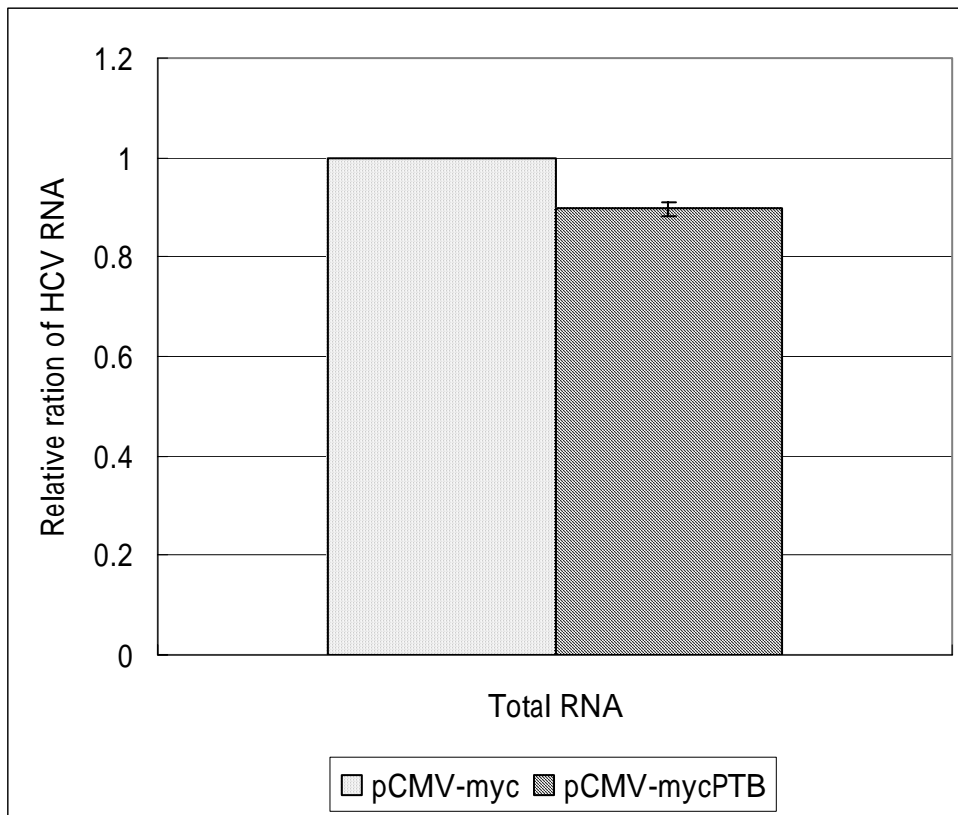


Figure. 1. 細胞內表現 PTB 蛋白質的 RNA 結果

HCV subgenomic replicon 細胞在大量表現 PTB 蛋白質時觀察細胞內 HCV subgenomic replicon RNA 正股及負股的變化。以 HCV subgenomic replicon 細胞進行轉染分別送入 Mock、Vector(pCMV-myc)、pCMV-myc-PTB，在轉染 48 小時後，萃取細胞 RNA，Total RNA 是直接進行 One-step RT-PCR 同時偵測正股及負股 RNA 的變化，負股(minus strand)和正股(plus strand)的結果則是將 RNA 先進行反轉錄作用，再取互補 DNA 進行 real-time PCR。

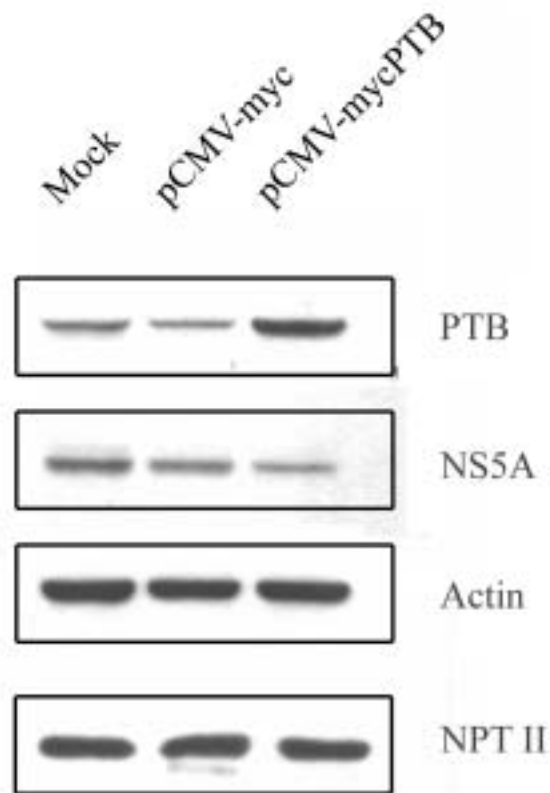


Figure. 2. 細胞內表現 PTB 蛋白質的 Western blot 結果

HCV subgenomic replicon 細胞在大量表現 PTB 蛋白質時觀察細胞內 HCV 非結構蛋白的變化。以 HCV subgenomic replicon 細胞進行 transfection 分別送入 Mock、Vector(pCMV-myc)、pCMV-myc-PTB，在 transfection 48 小時後，萃取細胞蛋白質，以 8% SDS-PAGE 將蛋白質分離並分別以 anti-PTB、anti-NS5A、anti-Actin 及 anti-NPT II 抗體偵測。

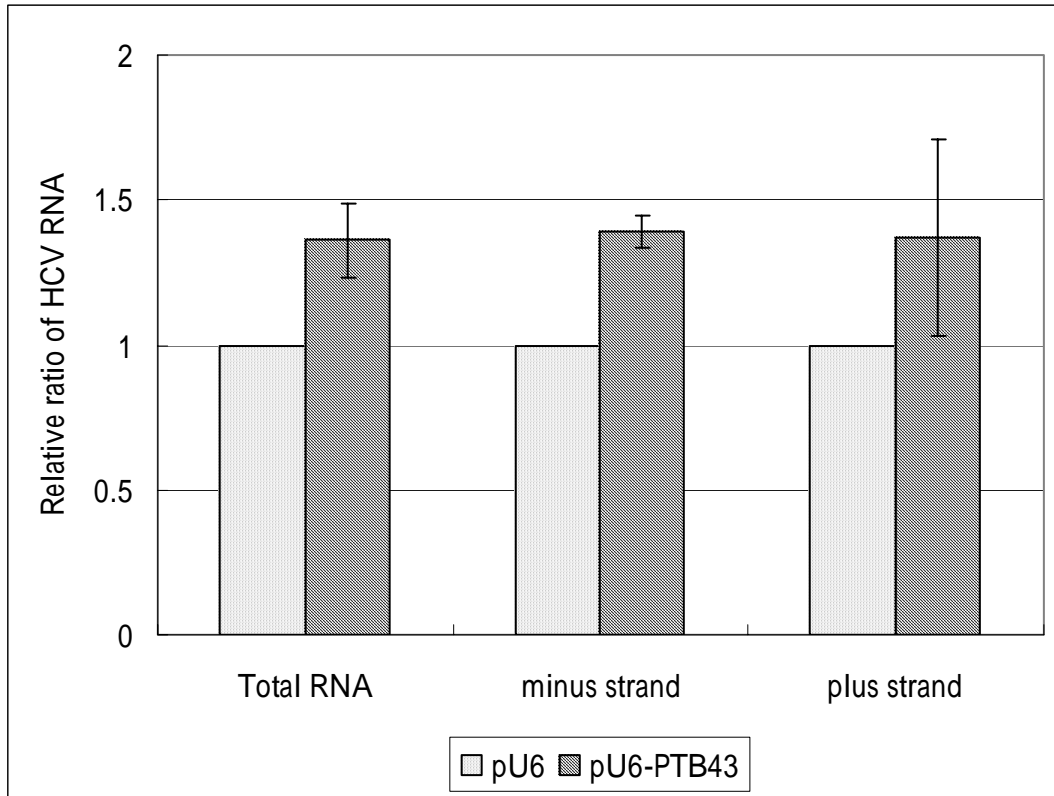


Figure. 3. 細胞內表現 PTB siRNA 的 RNA 結果

HCV subgenomic replicon 細胞在 PTB 蛋白質被抑制時觀察細胞內 HCV subgenomic replicon RNA 正股及負股的變化。以 HCV subgenomic replicon 細胞進行轉染分別送入 Mock、Vector(pU6)、 pU6-PTB43，在轉染 24 小時後，用相同條件再次進行轉染，在二次轉染後 24 小時，萃取細胞 RNA，Total RNA 是進行 One-step RT-PCR，同時偵測正股及負股 RNA 的變化，負股(minus strand)和正股(plus strand)的結果則是將 RNA 先進行反轉錄作用，再取互補 DNA 進行 real-time PCR。

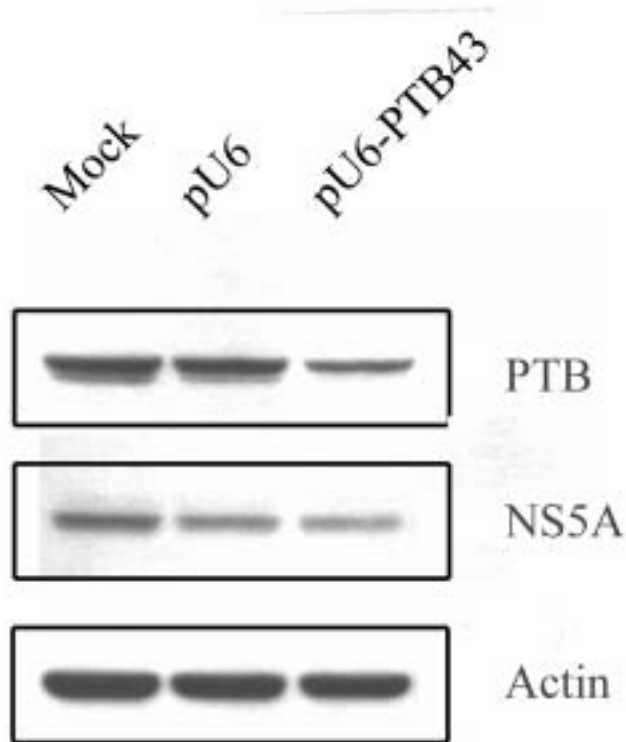


Figure. 4. 細胞內表現 PTB siRNA 的 Western blot 結果

HCV subgenomic replicon 細胞內 PTB 蛋白質被 knock-down 後，觀察細胞內 HCV 非結構蛋白的變化。以 HCV subgenomic replicon 細胞進行 transfection 分別送入 Mock、Vector(pU6)、pU6-PTB，在 transfection 48 小時後，萃取細胞蛋白質，以 8% SDS-PAGE 將蛋白質分離並分別以 anti-PTB、anti-NS5A 和 anti-Actin 抗體偵測。

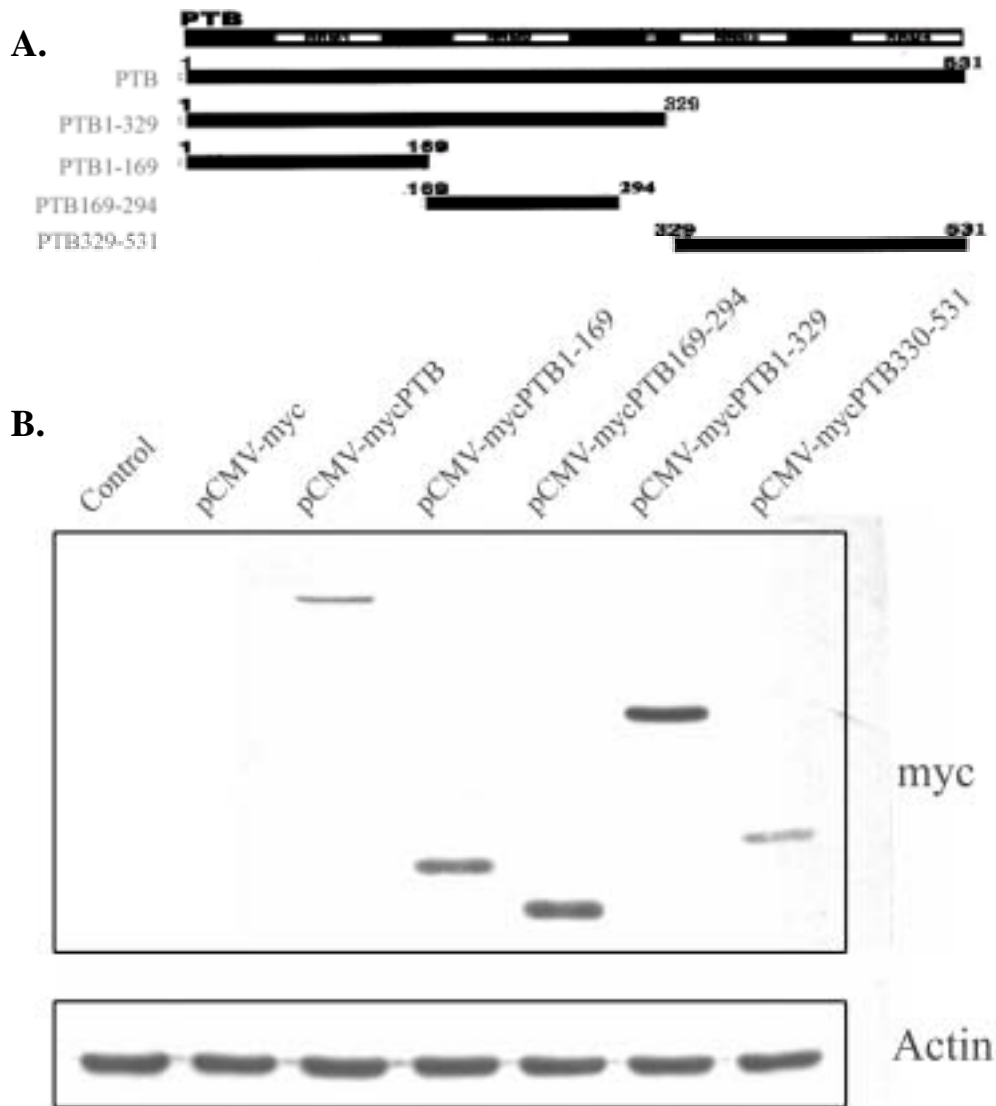


Figure. 5. 不同刪除突變 PTB 蛋白質示意圖及 Western blot 結果

(A.)不同刪除突變 PTB 蛋白質的示圖。(B.)HCV subgenomic replicon 細胞在大量表現 PTB 以及 PTB deletion 蛋白質時觀察細胞內 HCV subgenomic replicon RNA 的變化。以 HCV subgenomic replicon 細胞進行 transfection 分別送入 Vector(pCMV-myc)、pCMV-myc-PTB、pCMV-myc-PTB(1-169)、pCMV-myc-PTB(169-294)、pCMV-myc-PTB(1-329)、pCMV-myc-PTB(330-531)，在 transfection 48 小時後，萃取細胞蛋白質，以 8% SDS-PAGE 將蛋白質分離並分別以 anti-myc 和 anti-Actin 抗體偵測。

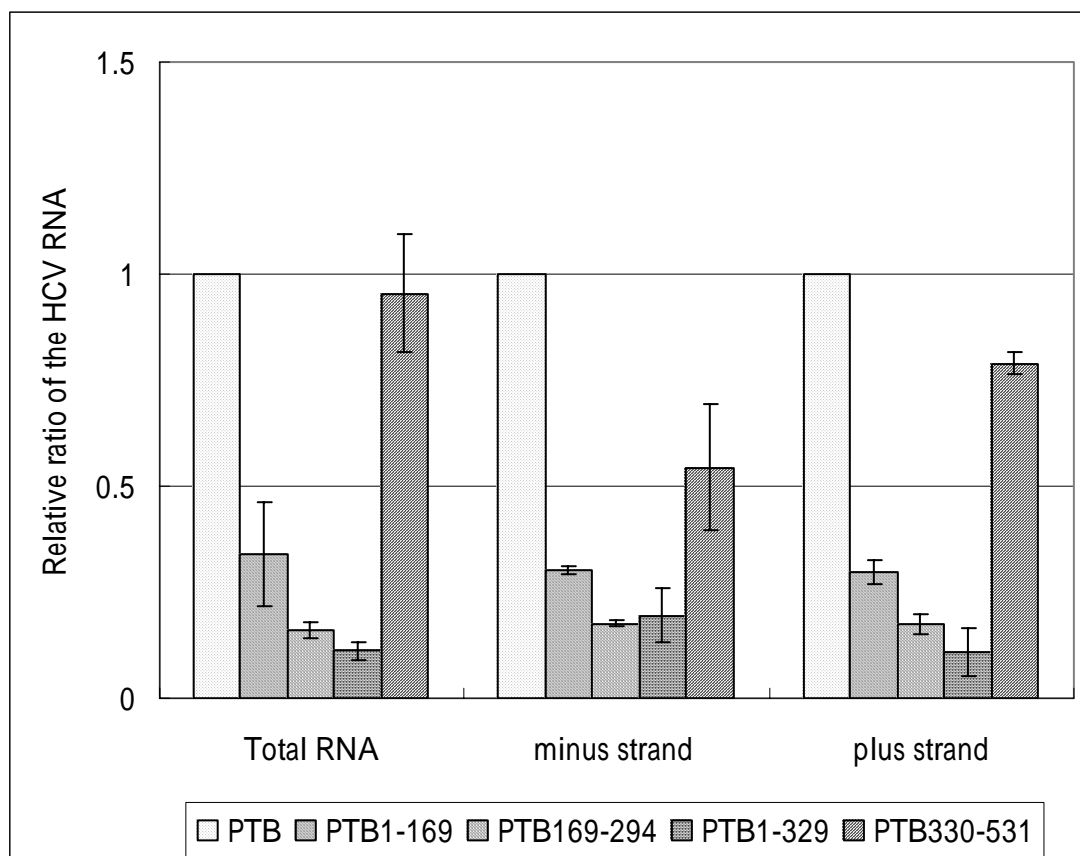


Figure. 6. 細胞內表現不同刪除突變 PTB 蛋白質的 RNA 結果

HCV subgenomic replicon 細胞在大量表現刪除突變 PTB 蛋白質時觀察細胞內 HCV subgenomic replicon RNA 正股及負股的變化。以 HCV subgenomic replicon 細胞進行轉染分別送入 Mock、Vector(pCMV-myc)、pCMV-myc-PTB、pCMV-myc-PTB(1-169)、pCMV-myc-PTB(169-294)、pCMV-myc-PTB(1-329)、pCMV-myc-PTB(330-531)，在轉染 48 小時後，萃取細胞 RNA，Total RNA 是進行 One-step RT-PCR 同時偵測正股及負股 RNA 的變化，負股(minus strand)和正股(plus strand)的結果則是將 RNA 先進行反轉錄作用，再取互補 DNA 進行 real-time PCR。

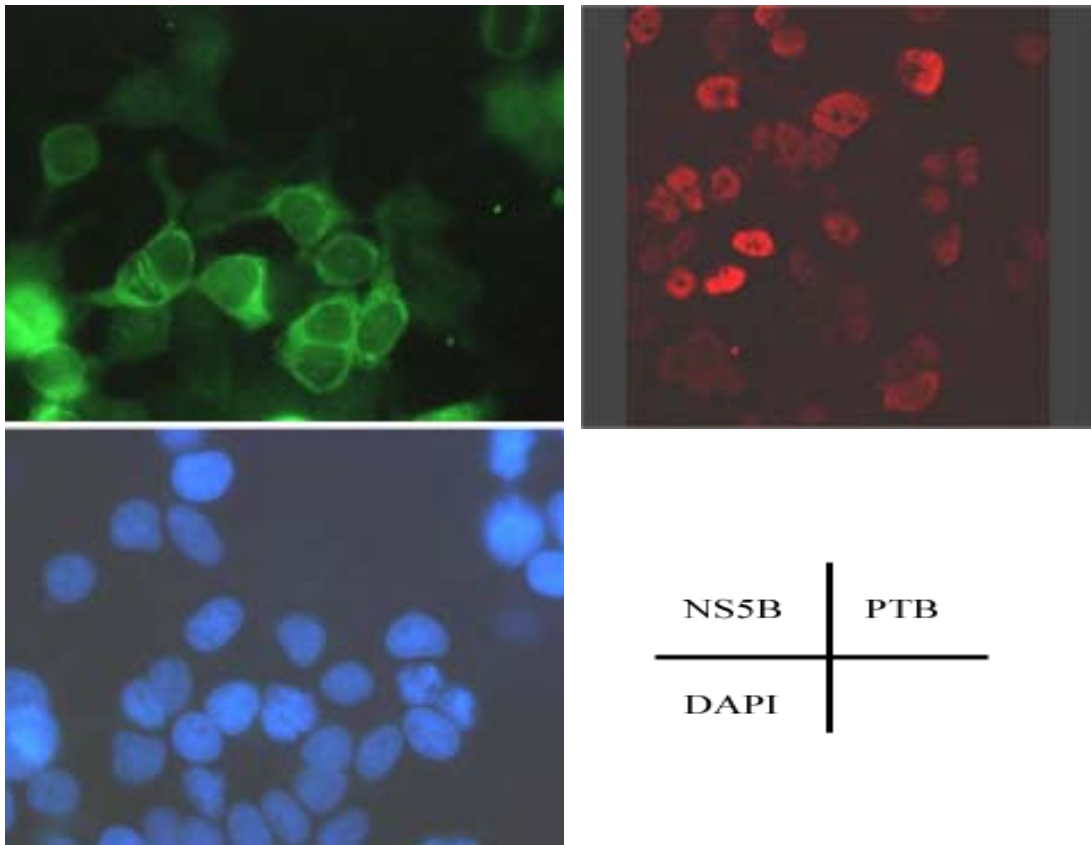


Figure. 7. HEK293 細胞經分別轉染表現 NS5B 及 PTB

在 HEK293 轉染完後 48 小時，生長在蓋玻片上的細胞進行一系列的固定、增加通透性、BSA blocking、一級抗體反應、二級抗體反應等間接免疫螢光呈色法的步驟，最後以 mounting media 將細胞封片。左圖 NS5B 使用的一級抗體為 rabbit-anti-flag、二級抗體為 goat-anti-rabbit-FITC，左下圖使用 DAPI(存在 mounting media 中)將細胞核染色。右圖 PTB 使用的一級抗體為 mouse-anti-myc、二級抗體為 goat-anti-mouse-TRITC。

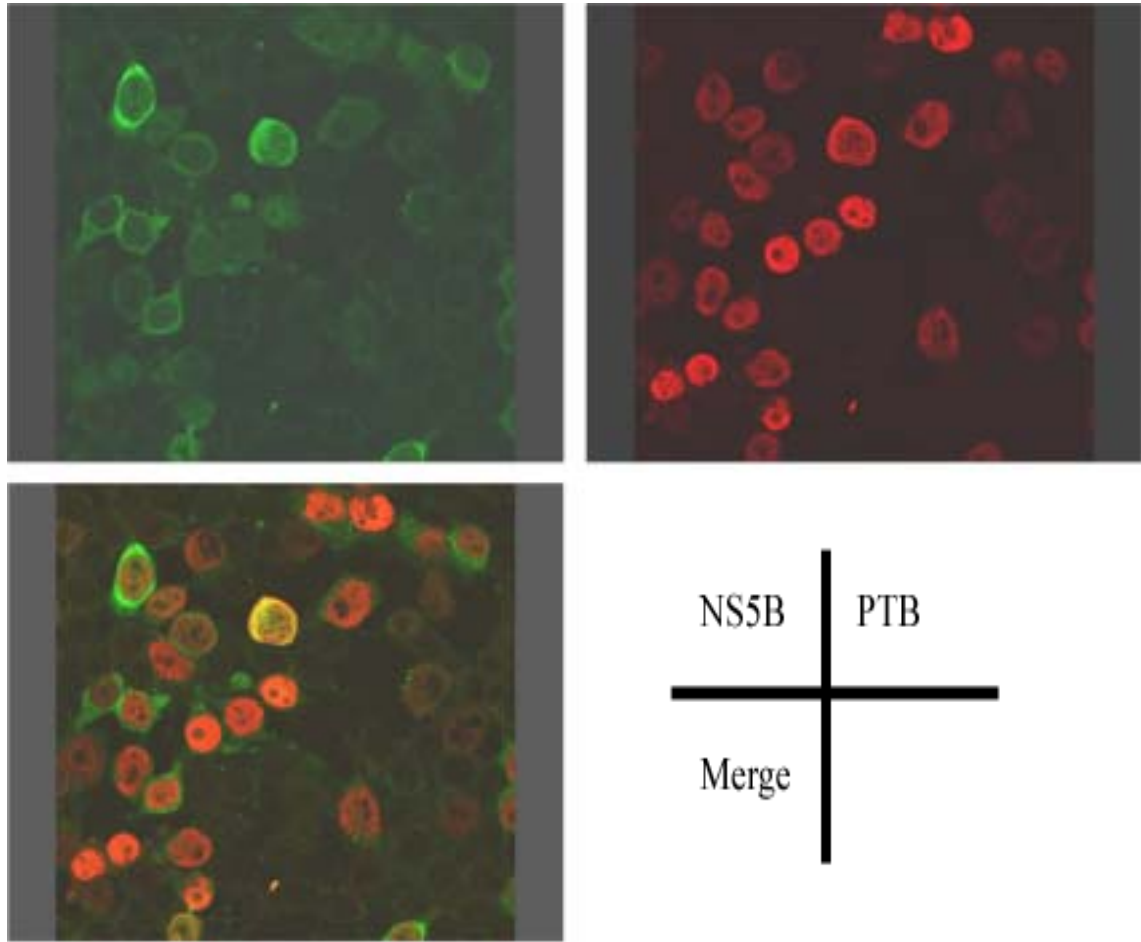


Figure. 8. HEK293 細胞經共同轉染表現 NS5B 及 PTB

在 HEK293 轉染完後 48 小時，進行間接免疫螢光呈色法的步驟，以 mounting media 將蓋玻片封片。在共軛焦顯微鏡下觀察，細胞內螢光分布狀況。左圖 NS5B 使用的一級抗體為 rabbit-anti-flag、二級抗體為 goat-anti-rabbit-FITC，左下圖為 NS5B 和 PTB 兩個圖片重疊在一起的結果，若 NS5B 和 PTB 是單獨存在，細胞則呈現原本的綠色或是紅色，當 NS5B 和 PTB 存在同一個位置時，就會因為顏色的疊加產生黃色結果。右圖 PTB 使用的一級抗體為 mouse-anti-myc、二級抗體為 goat-anti-mouse-TRITC。

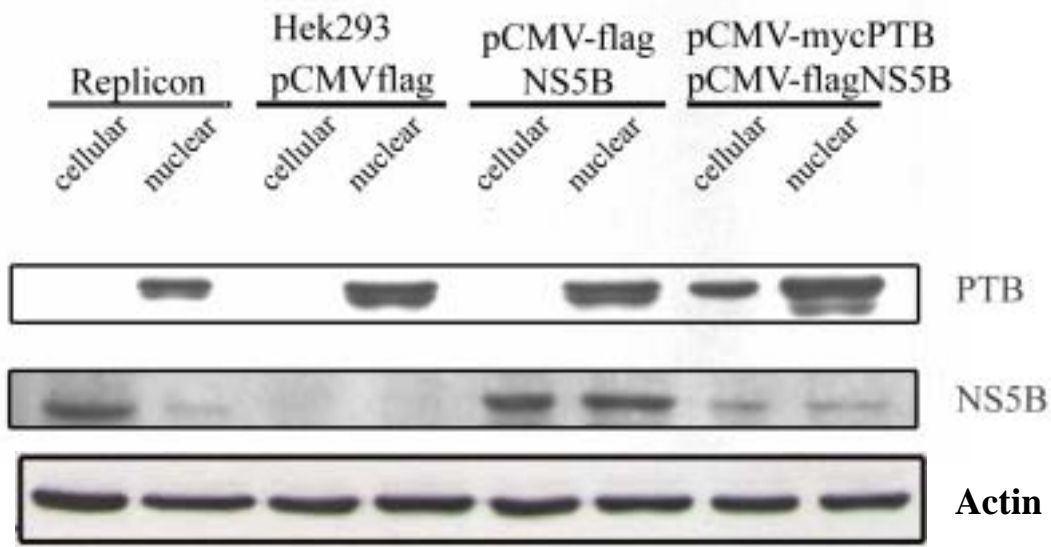


Figure. 9. 細胞核與細胞質蛋白分析結果

萃取分離細胞核與細胞質的蛋白質。觀察 NS5B 及 PTB 在細胞內分佈的狀況。HCV subgenomic replicon 為實驗對照組，以 HEK293 細胞進行 transfection 分別送入 Vector(pCMV-flag)、NS5B、PTB/NS5B、在 transfection 48 小時後，以 Nuclear/Cytosol fractionation kit 分離出細胞質與細胞核的蛋白質，以 8% SDS-PAGE 將蛋白質分開並分別以 anti-PTB 和 anti-NS5B 抗體偵測。

附錄 2. 參照文獻:

Al, R. H., Xie Y., Wang Y., Hagedorn C.H. "Expression of Recombinant Hepatitis C Virus Non-Structural Protein 5B in Escherichia Coli." Virus research 53.2 (1998): 141-9.

Ali, N., and A. Siddiqui. "Interaction of Polypyrimidine Tract-Binding Protein with the 5' Noncoding Region of the Hepatitis C Virus RNA Genome and its Functional Requirement in Internal Initiation of Translation." Journal of virology 69.10 (1995): 6367-75.

Anwar, A., Ali N., Tanveer R., Siddiqui A. "Demonstration of Functional Requirement of Polypyrimidine Tract-Binding Protein by SELEX RNA during Hepatitis C Virus Internal Ribosome Entry Site-Mediated Translation Initiation." Journal of Biological Chemistry 275.44 (2000): 34231-5.

Asabe, S. I., Tanji Y., Satoh S., Kaneko T., Kimura K., Shimotohno K. "The N-Terminal Region of Hepatitis C Virus-Encoded NS5A is Important for NS4A-Dependent Phosphorylation." Journal of virology 71.1 (1997): 790-6.

Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake L., Mous J., Jacobsen H. "Nonstructural Protein 3 of the Hepatitis C Virus Encodes a Serine-Type Proteinase Required for Cleavage at the NS3/4 and NS4/5 Junctions." Journal of virology 67.7 (1993): 3835-44.

Behrens, S. E., L. Tomei, and R. De Francesco. "Identification and Properties of the RNA-Dependent RNA Polymerase of Hepatitis C Virus." The EMBO journal 15.1 (1996): 12-22.

Blight, K. J., A. A. Kolykhalov, and C. M. Rice. "Efficient Initiation of HCV RNA Replication in Cell Culture." Science 290.5498 (2000): 1972-4.

Buckwold, V. E., B. E. Beer, and R. O. Donis. "Bovine Viral Diarrhea Virus as a Surrogate Model of Hepatitis C Virus for the Evaluation of Antiviral Agents." Antiviral Research 60.1 (2003): 1-15.

- Casino, C., McAllister J., Davidson F., Power J., Lawlor E., Yap PL., Simmonds P., Smith DB. "Variation of Hepatitis C Virus Following Serial Transmission: Multiple Mechanisms of Diversification of the Hypervariable Region and Evidence for Convergent Genome Evolution." The Journal of general virology 80 (Pt 3).Pt 3 (1999): 717-25.
- Cerretani, M., Di Renzo L., Serafinis S., Vitelli A., Gennari N., Bianchi E., Pessi A., Urbani A., Colloca S., De Francesco R., Steinkuhler C., Altamura S. "A High-Throughput Radiometric Assay for Hepatitis C Virus NS3 Protease." Analytical Biochemistry 266.2 (1999): 192-7.
- Cheng, J. C., M. F. Chang, and S. C. Chang. "Specific Interaction between the Hepatitis C Virus NS5B RNA Polymerase and the 3' End of the Viral RNA." Journal of virology 73.8 (1999): 7044-9.
- 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 244.4902 (1989): 359-62.
- Colombo, M., Kuo G., Choo Q. L., Donato M. F., Del Ninno E., Tommasini M. A., Dioguar N., Houghton M. "Prevalence of Antibodies to Hepatitis C Virus in Italian Patients with Hepatocellular Carcinoma." Lancet 2.8670 (1989): 1006-8.
- De Francesco, R., Tomei L., Altamura S., Summa V., Migliaccio G. "Approaching a New Era for Hepatitis C Virus Therapy: Inhibitors of the NS3-4A Serine Protease and the NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase." Antiviral Research 58.1 (2003): 1-16.
- Domitrovich, A. M., Diebel K. W., Ali N., Sarker S., Siddiqui A. "Role of La Autoantigen and Polypyrimidine Tract-Binding Protein in HCV Replication." Virology 335.1 (2005): 72-86.
- Esteban, J. I., Esteban R., Viladomiu L., Lopez-Talavera, J. C., Gonzalez A., Hernandez J. M., Roget M., Vargas V., Genesca J., Buti M. "Hepatitis C Virus Antibodies among Risk Groups in Spain." Lancet 2.8658 (1989): 294-7.

- Ferrari, E., Wright-Minogue, J., Fang J. W., Baroudy B. M., Lau J. Y., Hong Z. "Characterization of Soluble Hepatitis C Virus RNA-Dependent RNA Polymerase Expressed in Escherichia Coli." Journal of virology 73.2 (1999): 1649-54.
- Grakoui, A., McCourt D. W., Wychowski C., Feinstone S. M., Rice C. M. "Characterization of the Hepatitis C Virus-Encoded Serine Proteinase: Determination of Proteinase-Dependent Polyprotein Cleavage Sites." Journal of virology 67.5 (1993): 2832-43.
- Grakoui, A., McCourt D. W., Wychowski C., Feinstone S. M., Rice C. M. "A Second Hepatitis C Virus-Encoded Proteinase." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90.22 (1993): 10583-7.
- Guo, J. T., V. V. Bichko, and C. Seeger. "Effect of Alpha Interferon on the Hepatitis C Virus Replicon." Journal of virology 75.18 (2001): 8516-23.
- Hijikata, M., Kato N., Ootsuyama Y., Nakagawa M., Shimotohno K. "Gene Mapping of the Putative Structural Region of the Hepatitis C Virus Genome by in Vitro Processing Analysis." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 88.13 (1991): 5547-51.
- Hijikata, M., Mizushima H., Akagi T., Mori S., Kakiuchi N., Kato N., Tanaka T., Kimura K., Shimotohno K. "Two Distinct Proteinase Activities Required for the Processing of a Putative Nonstructural Precursor Protein of Hepatitis C Virus." Journal of virology 67.8 (1993): 4665-75.
- Hijikata, M., Mizushima H., Tanji Y., Komoda Y., Hirowatari Y., Akagi T., Kato N., Kimura K., Shimotohno K. "Proteolytic Processing and Membrane Association of Putative Nonstructural Proteins of Hepatitis C Virus." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 90.22 (1993): 10773-7.
- Ishii, K., Tanaka Y., Yap C. C., Aizaki H., Matsuura Y., Miyamura T. "Expression of Hepatitis C Virus NS5B Protein: Characterization of

- its RNA Polymerase Activity and RNA Binding." Hepatology (Baltimore, Md.) 29.4 (1999): 1227-35.
- Ito, T., and M. M. Lai. "Determination of the Secondary Structure of and Cellular Protein Binding to the 3'-Untranslated Region of the Hepatitis C Virus RNA Genome." Journal of virology 71.11 (1997): 8698-706.
- Ito, T., S. M. Tahara, and M. M. Lai. "The 3'-Untranslated Region of Hepatitis C Virus RNA Enhances Translation from an Internal Ribosomal Entry Site." Journal of virology 72.11 (1998): 8789-96.
- Kaito, M., Watanabe S., Tsukiyama-Kohara K., Yamaguchi K., Kobayashi Y., Konishi M., Yokoi M., Ishida S., Suzuki S., Kohara M. "Hepatitis C Virus Particle Detected by Immunoelectron Microscopic Study." The Journal of general virology 75 (Pt 7).Pt 7 (1994): 1755-60.
- Kaneko, T., Tanji Y., Satoh S., Hijikata M., Asabe S., Kimura K., Shimotohno K. "Production of Two Phosphoproteins from the NS5A Region of the Hepatitis C Viral Genome." Biochemical and biophysical research communications 205.1 (1994): 320-6.
- Kato, N. "Molecular Virology of Hepatitis C Virus." Acta Medica Okayama 55.3 (2001): 133-59.
- Koch, J. O., and R. Bartenschlager. "Modulation of Hepatitis C Virus NS5A Hyperphosphorylation by Nonstructural Proteins NS3, NS4A, and NS4B." Journal of virology 73.9 (1999): 7138-46.
- Krieger, N., V. Lohmann, and R. Bartenschlager. "Enhancement of Hepatitis C Virus RNA Replication by Cell Culture-Adaptive Mutations." Journal of virology 75.10 (2001): 4614-24.
- Kuhnl, P., Seidl S., Stangel W., Beyer J., Sibrowski W., Flik J. "Antibody to Hepatitis C Virus in German Blood Donors." Lancet 2.8658 (1989): 324.
- Kuo, G., Choo Q. L., Alter H. J., Gitnick G. L., Redeker A. G., Purcell R. H., Miyamura T., Dienstag J. L., Alter M. J., Stevens C. E. "An

- Assay for Circulating Antibodies to a Major Etiologic Virus of Human Non-A, Non-B Hepatitis." Science 244.4902 (1989): 362-4.
- Li, H. P., Huang P., Park S., Lai M. M. "Polypyrimidine Tract-Binding Protein Binds to the Leader RNA of Mouse Hepatitis Virus and Serves as a Regulator of Viral Transcription." Journal of virology 73.1 (1999): 772-7.
- Li, X., Jeffers L. J., Shao L., Reddy K. R., de Medina, M., Scheffel J., Moore B., Schiff E. R. "Identification of Hepatitis C Virus by Immunoelectron Microscopy." Journal of viral hepatitis 2.5 (1995): 227-34.
- Lin, C., Lindenbach B. D., Pragai B. M., McCourt D. W., Rice C. M. "Processing in the Hepatitis C Virus E2-NS2 Region: Identification of p7 and Two Distinct E2-Specific Products with Different C Termini." Journal of virology 68.8 (1994): 5063-73.
- Lin, C. H., and J. G. Patton. "Regulation of Alternative 3' Splice Site Selection by Constitutive Splicing Factors." RNA (New York, N.Y.) 1.3 (1995): 234-45.
- Lohmann, V., Korner F., Dobierzewska A., Bartenschlager R. "Mutations in Hepatitis C Virus RNAs Conferring Cell Culture Adaptation." Journal of virology 75.3 (2001): 1437-49.
- Lohmann, V., Korner F., Herian U., Bartenschlager R. "Biochemical Properties of Hepatitis C Virus NS5B RNA-Dependent RNA Polymerase and Identification of Amino Acid Sequence Motifs Essential for Enzymatic Activity." Journal of virology 71.11 (1997): 8416-28.
- Lohmann, V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. "Replication of Subgenomic Hepatitis C Virus RNAs in a Hepatoma Cell Line." Science 285.5424 (1999): 110-3.
- Lou, H., Helfman D. M., Gagel R. F., Berget S. M. "Polypyrimidine Tract-Binding Protein Positively Regulates Inclusion of an Alternative 3'-Terminal Exon." Molecular and cellular biology 19.1 (1999): 78-85.

- Manabe, S., Fuke I., Tanishita O., Kaji C., Gomi Y., Yoshida S., Mori C., Takamizawa A., Yosida I., Okayama H. "Production of Nonstructural Proteins of Hepatitis C Virus Requires a Putative Viral Protease Encoded by NS3." Virology 198.2 (1994): 636-44.
- Mizushima, H., Hijikata M., Asabe S., Hirota M., Kimura K., Shimotohno K. "Two Hepatitis C Virus Glycoprotein E2 Products with Different C Termini." Journal of virology 68.10 (1994): 6215-22.
- Mizushima, H., Hijikata M., Tanji Y., Kimura K., Shimotohno K. "Analysis of N-Terminal Processing of Hepatitis C Virus Nonstructural Protein 2." Journal of virology 68.4 (1994): 2731-4.
- Murakami, K., Abe M., Kageyama T., Kamoshita N., Nomoto A. "Down-Regulation of Translation Driven by Hepatitis C Virus Internal Ribosomal Entry Site by the 3' Untranslated Region of RNA." Archives of Virology 146.4 (2001): 729-41.
- Neddermann, P., A. Clementi, and R. De Francesco. "Hyperphosphorylation of the Hepatitis C Virus NS5A Protein Requires an Active NS3 Protease, NS4A, NS4B, and NS5A Encoded on the Same Polyprotein." Journal of virology 73.12 (1999): 9984-91.
- Nishioka, K. "Hepatitis C Virus Infection in Japan." Gastroenterologia Japonica 26 Suppl 3 (1991): 152-5.
- Oh, J. W., G. T. Sheu, and M. M. Lai. "Template Requirement and Initiation Site Selection by Hepatitis C Virus Polymerase on a Minimal Viral RNA Template." Journal of Biological Chemistry 275.23 (2000): 17710-7.
- Pietschmann, T., Lohmann V., Rutter G., Kurpanek K., Bartenschlager R. "Characterization of Cell Lines Carrying Self-Replicating Hepatitis C Virus RNAs." Journal of virology 75.3 (2001): 1252-64.
- Selby, M. J., Choo Q. L., Berger K., Kuo G., Glazer E., Eckart M., Lee C., Chien D., Kuo C., Houghton M. "Expression, Identification and Subcellular Localization of the Proteins Encoded by the Hepatitis C

- Viral Genome." The Journal of general virology 74 (Pt 6).Pt 6 (1993): 1103-13.
- 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 (Baltimore, Md.) 23.2 (1996): 205-9.
- Tanji, Y., Kaneko T., Satoh S., Shimotohno K. "Phosphorylation of Hepatitis C Virus-Encoded Nonstructural Protein NS5A." Journal of virology 69.7 (1995): 3980-6.
- Tomei, L., Failla C., Santolini E. De Francesco, R., La Monica, N. "NS3 is a Serine Protease Required for Processing of Hepatitis C Virus Polyprotein." Journal of virology 67.7 (1993): 4017-26.
- van der Poel, C. L., Reesink H. W., Lelie P. N., Leentvaar-Kuypers A., Choo Q. L., Kuo G., Houghton M. "Anti-Hepatitis C Antibodies and Non-A, Non-B Post-Transfusion Hepatitis in the Netherlands." Lancet 2.8658 (1989): 297-8.
- Yamashita, T., Kaneko S., Shiota Y., Qin W., Nomura T., Kobayashi K., Murakami S. "RNA-Dependent RNA Polymerase Activity of the Soluble Recombinant Hepatitis C Virus NS5B Protein Truncated at the C-Terminal Region." Journal of Biological Chemistry 273.25 (1998): 15479-86.
- Yuan, Z. H., Kumar U., Thomas H. C., Wen Y. M., Monjardino J. "Expression, Purification, and Partial Characterization of HCV RNA Polymerase." Biochemical and biophysical research communications 232.1 (1997): 231-5.
- Zhang, J., Yamada O., Sakamoto T., Yoshida H., Iwai T., Matsushita Y., Shimamura H., Araki H., Shimotohno K. "Down-Regulation of Viral Replication by Adenoviral-Mediated Expression of siRNA Against Cellular Cofactors for Hepatitis C Virus." Virology 320.1 (2004): 135-43.