



**ACADEMIA ROMÂNĂ**  
**Școala de Studii Avansate a Academiei Române**  
**Institutul de Biochimie**

## **REZUMATUL TEZEI DE DOCTORAT**

**Producerea și caracterizarea unor antigene ale VHC bazate pe  
proteina de anvelopă E2 pentru dezvoltarea unui vaccin**

**CONDUCĂTOR DE DOCTORAT: CS I Dr. Norica Nichita**

**DOCTORAND: Cucoș Lia Maria**

**2024**

## CUPRINS

Listă Figuri.....	5
Listă Tabele.....	7
Listă abrevieri.....	8
Rezumat.....	12
Capitol 1. INTRODUCERE.....	14
1.1 Virusul Hepatitei C (VHC) .....	14
1.1.1 Descoperirea VHC.....	14
1.1.2 Răspândirea și impactul global al infecției cu VHC.....	15
1.1.3 Evoluția infecției.....	15
1.1.4 Structura VHC.....	16
1.1.5 Ciclul de viață al VHC.....	18
1.1.6 Terapii antivirale.....	22
1.1.7 Structura și imunogenitatea glicoproteinei E2.....	22
1.1.8 Profilaxia și necesitatea unui vaccin.....	24
1.1.9 Modele de studiu celulare și animale VHC utilizate în dezvoltarea de vaccin.....	28
1.2 Microalgele ca platformă pentru producția de vaccinuri.....	29
1.2.1 Sisteme actuale de expresie.....	29
1.2.2 Sisteme alternative.....	30
1.3 Scopul studiului.....	32
Capitol 2. MATERIALE ȘI METODE.....	35
2.1 Linii celulare.....	35
2.2 Proiectarea librăriei de antigene.....	35
2.3 Plasmide.....	37
2.4 Izolarea ADN plasmidial .....	38
2.5 Expresia antigenelor în celule mamaliene.....	38
2.6 Expresia antigenelor în microalge <i>P. purpureum</i> .....	39
2.7 Extracția și purificarea antigenelor din microalge <i>P. Purpureum</i> .....	40
2.8 Purificarea antigenelor produse în celule mamaliene.....	40
2.9 SDS-PAGE și western blot.....	41
2.10 Determinarea traficului intracelular al antigenelor prin digestie cu EndoH și PNGaseF.....	42
2.11 Selecția antigenelor prin experimente de imunofluorescență.....	42
2.12 Pulse-chase și imunoprecipitare.....	42
2.13 Selecția antigenelor prin ELISA.....	43
2.14 Testarea antigenicității prin ELISA.....	43
2.15 Testarea conformației antigenelor prin legarea la receptorul CD81.....	44
2.16 Determinarea concentrației de antigen.....	44
2.17 Determinarea punților de cisteină prin spectrometrie de masă.....	44
2.18 Imunizarea animalelor.....	45
2.18.1 Imunizarea șoarecilor Balb/C.....	48
2.18.2 Imunizarea șoarecilor CD1.....	48
2.18.3 Imunizarea cu antigenul provenit din microalge.....	48
2.19 Analiza răspunsului imun.....	49
2.20 Analiza capacității de neutralizare a serului imun față de VHCpp.....	49
Capitol 3. REZULTATE.....	51
3.1 Construcția și obținerea antigenelor VHC.....	51
3.2 Selecția antigenelor în funcție de expresie și pliere.....	52

3.3	Selecția antigenelor în funcție de legarea lui AP33.....	54
3.4	Producția și purificarea antigenelor din celule mamaliene.....	58
3.5	Caracterizarea antigenelor produse în celule mamaliene.....	62
3.6	Imunogenitatea antigenelor sE2 ΔHVR1 în șoareci Balb/C și CD1.....	70
3.7	Analiza capacității de neutralizare a serului imun obținut prin imunizarea cu sE2 ΔHVR1/-6.....	78
3.8	Purificarea și caracterizarea antigenului provenit din microalge.....	79
3.9	Imunogenitatea antigenelor produse în microalge.....	82
3.10	Analiza capacității de neutralizare a serului obținut prin imunizare cu antigenul provenit din microalge.....	89
	Capitol 4. DISCUȚII.....	90
	CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE.....	95
	Mulțumiri.....	97
	Lista lucrărilor publicate.....	98
	Participări la conferințe.....	99
	BIBLIOGRAFIE.....	100

## Scopul studiului

Infecția cu VHC reprezintă o problemă de sănătate la nivel global. Organizația Mondială a Sănătății (OMS) estimează prevalența infecțiilor cronice la un număr de 58 milioane indivizi la care se adaugă 1.5 milioane de noi infecții anual (World Health Organisation, 2024).

Infecția cronică determină apariția complicațiilor asociate, cele mai letale fiind ciroza și carcinomul hepatocelular. Estimările ne arată că în 2019 au murit aproximativ 290.000 de indivizi datorită acestor complicații. Prevalența VHC a scăzut totuși în ultimii ani o dată cu introducerea medicamentelor antivirale foarte specifice dar și a programelor de testare în masă a populației. Cu toate acestea, nu există metode profilactice împotriva VHC, de tipul unui vaccin, deși OMS a stabilit drept obiective principale reducerea cu 90% a numărului de infecții cronice și cu 65% a mortalității asociate VHC până în 2030.

Dezvoltarea unui vaccin împotriva VHC rămâne o prioritate în domeniu, fiind cea mai eficientă metodă de prevenție și de control a răspândirii virusului. Fiind un virus ARN, acesta prezintă o diversitate genetică mare, făcând dificilă dezvoltarea unui vaccin pan genotipic capabil să inducă anticorpi cross-neutralizanți. Pe lângă diversitatea genetică, virusul prezintă mai multe strategii de evadare a răspunsului imun, cum sunt interferența directă cu imunitatea antivirală, prezența unui scut de glicani, cât și o flexibilitate conformațională crescută în epitopii ce generează nAb, făcând aceste regiuni să fie inaccesibile sistemului imun.

Inspirându-ne din noile strategii de vaccinologie inversă aplicate pentru virusuri precum HIV și RSV, ne-am propus să stabilizăm un epitop flexibil capabil de a genera anticorpi foarte neutralizanți. S-a observat existența unor anticorpi extrem de puternic neutralizanți, atât la om (HCV1) cât și la șoarece (AP33) ce țintesc regiunea 412-423 a glicoproteinei de anvelopă E2. Acești anticorpi sunt capabili să neutralizeze complet infecția, dar apar foarte rar în cursul infecției clinice. Pentru a obține un anumit idiotip de anticorp prin vaccinare s-au stabilit fluxuri de dezvoltare care presupun conceptualizarea rațională a antigenului. Astfel că, pentru dezvoltarea unui nou imunogen se pornește de la cristalul antigenului nativ în complex cu diferiți anticorpi.

Prin urmare, primul scop al studiului prezent a fost de a dezvolta noi antigene bazate pe proteina de anvelopă E2 a VHC care să inducă anticorpi de tipul AP33, puternic și *cross-neutralizanți*. Acești anticorpi recunosc preferențial o buclă de tip ac-de-păr adiacentă HVR1 și situsului de legare la CD81. Astfel, acest studiu urmărește stabilizarea situsului antigenic

412 inserând o nouă punte de cisteine, prin modelare computațională, testarea expresiei și a conformației cât și a imunogenității candidatului de vaccin propus.

De asemenea, am dorit să testăm posibilitatea producției antigenelor VHC în sisteme alternative de tipul microalgelor roșii. Acest studiu a utilizat în premieră *P. purpureum* ca platformă de expresie, o specie de microalge roșii cu o capacitate foarte ridicată de expresie intra și extracelulară. Astfel, am dorit să verificăm fezabilitatea producției de vaccin în *P. purpureum* prin caracterizarea capacității de producție, a conformației și antigenității antigenelor VHC produse, pentru ca mai apoi să studiem imunogenitatea, capacitatea de neutralizare a anticorpilor induși, dar și glicozilarea specifică acestei specii.

## Capitol 1. Introducere

Virusul Hepatitei C este un virus hepatotropic ARN anvelopat ce aparține genului Hepacivirus din familia *Flaviviridae*. Prezintă un genom ARN monocatenar cu orientare pozitivă. Genomul viral prezintă un cadru de citire continuu flancat de regiuni netranslate la capetele 5' și 3' (Brown et al., 1992; Wang et al., 1995). Regiunile netranslate conțin, de asemenea, și secvența de atașare ribozomală internă, locul de unde începe translația genomului viral într-o singură poliproteină (Wang et al., 1995). Genomul conține între 9024 și 9111 nucleotide, ce codifică pentru o poliproteină unică, ce este mai apoi clivată în 10 proteine individuale de proteaze endogene sau codificate de virus (Alvisi et al., 2011).

Proteinele structurale sunt core, E1 și E2. Core reprezintă proteina de nucleocapsidă virală și are numeroase funcții precum legarea de ARN, modularea sistemului imun, semnalizare celulară și potențial oncogenic și apoptotic (Kim & Chang, 2013). E1 și E2 sunt glicoproteine transmembranare care formează un heterodimer necovalent ce decorează suprafața virusului. E1 și E2 sunt puternic glicozilate cu 4-5 glicani pentru E1 și 11 glicani pentru E2 (Goffard & Dubuisson, 2003). Pe suprafața virusului heterodimerii E1E2 pot să interacționeze covalent prin punți disulfurice, și necovalent intracelular (Jean Dubuisson JVI, de la Peña et al., 2022) (de la Peña et al., 2022). E1 participă în procesul de pătrundere a virusului în celulă prin interacțiuni slabe cu receptori celulari. Inițial se credea că E1 este esențială în pasul de fuziune, din considerentul că prezintă o regiune similară cu peptidele de fuziune găsite la proteinele de anvelopă ale altor Flavivirusuri (Li & Modis, 2014). Studiile de cristalografie pentru E1 care să confirme această ipoteză sunt dificil de realizat, deoarece în absența proteinei E2, aceasta agregă (Cocquerel et al., 2000; Michalak et al., 1997; Patel et al., 2001). Primul cristal al E1 a fost realizat în condiții de pH scăzut, astfel reprezentând o conformație a proteinei post-atașare, ce sugerează că dimerii E1 cristalizați nu seamănă cu proteinele de fuziune clasice ale

flavivirusurilor, propunând ca rol pentru aceasta legarea apolipoproteinelor (El Omari et al., 2014). În 2022 a fost rezolvat cristalul heterodimerului E1E2, unde se observă că domeniul N-terminal al E1 adoptă o altă conformație, confirmând necesitatea prezenței proteinei E2 pentru o pliere corectă a E1, dar neconcluzionând clasificarea ca proteină de fuziune (de la Peña et al., 2022). E1 reprezintă o țintă pentru anticorprii neutralizanți (NAbs) având câteva regiuni antigenice: capătul N-terminal (aminoacizii 197-207) (Keck et al., 2004; Kong et al., 2015) și o regiune bine conservată adiacentă capătului C-terminal (aminoacizii 313-328) (Meunier et al., 2008). Totuși, anticorprii generați anti-E1 au activitate slabă în testele *in vitro* și sunt reprezentați într-un titru mult mai mic comparativ cu anticorprii anti-E2 (Keck et al., 2004).

Glicoproteina E2 (aa 384-746) este puternic modificată post-translațional, cu 11 N-glicani și 9 punți disulfurice (Goffard & Dubuisson, 2003). Aceasta prezintă trei regiuni variabile (VRs) anume *hypervariable region 1* (HVR1), VR2 și VR2 ce reprezintă aproximativ 25% din secvența proteinei E2 și contribuie semnificativ la diversitatea genetică a VHC. E2 este responsabilă de interacțiunea specifică cu receptorii celulari care mediază intrarea virusului în celulă (Meredith et al., 2012). În ultima decadă, au apărut date noi structurale în care varianta sE2 (solubilă) este caracterizată structural și antigenic în complex cu fragmente de mAbs (*monoclonal antibodies*) umani, murinici sau de macac (Flyak et al., 2018; Khan et al., 2014a; Kong et al., 2013, 2016; Kong, Giang, Nieusma, et al., 2012; Tzarum et al., 2019; Weber et al., 2022). Astfel, s-a observat că E2 are un ectodomeniu central de tip  $\beta$ -sandwich flancat de un strat frontal și altul distal care sunt stabilizate prin punți disulfurice (Kong et al., 2013). Studii de mutagenză prin substituții la alanină împreună cu datele de competiție dintre diferiți mAbs au dus la găsirea și denumirea grupurilor de epitopi lineari, conformaționali, neutralizanți sau non-neutralizanți împărțiți pe domenii (A-E), regiuni antigenice (AR 1-3), situsuri antigenice (AS) sau epitopi (I, II, III).

Primul pas din ciclul de viață viral presupune atașarea particulei virale la co-receptorii celulari. Determinantul major este proteina E2, ce facilitează întâi interacțiunea cu hepatocitul prin recunoașterea proteoglicanilor heparan suflat (Barth et al., 2003). *Cluster of differentiation 81* (CD81), SRB1, *claudin-1* (CLDN) și *occludin* (OCLN) reprezintă factorii celulari necesari pentru pătrunderea particulei virale în celulă.

Primii factori identificați au fost SRB1 și CD81. SRB1 este un receptor glicoproteic de 509-aminoacizi (aa) având rol principal în legarea lipoproteinelor de densitate mare (Acton et al., 1996). Este exprimat intens în țesutul hepatic promovând preluarea selectivă de colesterol în hepatocite, considerându-se astfel că este un determinant al hepatotropismului viral (Scarselli

et al., 2002). SRB1 facilitează internalizarea întâi prin legarea la lipoproteinele de pe suprafața particulei virale, apoi activitatea sa de transfer lipidic mediază evenimente post legare care permit internalizarea prin expunerea aminoacizilor de legare la CD81 ai E2 (Bankwitz et al., 2010). CD81 este o tetraspanină exprimată pe suprafața majorității tipurilor celulare și are implicări în adeziune, morfologie, proliferare și diferențiere. Prezintă 4 domenii transmembranare, 2 domenii intracelulare scurte și 2 domenii de tip buclă extracelulară (Meredith et al., 2012). Legarea lui E2 la CD81 reprezintă un pas succesiv după prinderea de SRB1 și implicit expunerea domeniului de legare a E2 la bucla mare extracelulară a CD81 (Prentoe et al., 2019). (Flint et al., 2006). Regiunea AS412 și domeniul frontal sunt determinanți critici în legarea la CD81. Datele recente de crio-microscopie sugerează că AS412 este în contact direct cu bucla de legare la CD81 în absența receptorului și că cele două regiuni își modifică conformația dramatic după legarea la CD81. Cele două proteine de joncțiune, CLDN1 și OCLN nu interacționează direct cu particula virală, ci, cel mai probabil, formează co-receptori cu CD81-E2 în forma unui complex ce poate fi internalizat (Harris et al., 2008). Tratamentele antivirale, deși foarte eficiente, nu pot asigura eradicarea virusului. Majoritatea infecțiilor VHC sunt asimptomatice înainte de apariția leziunilor hepatice, așadar mulți indivizi infectați nu sunt identificați (Walker & Grakoui, 2015). Mai mult, indivizii ce nu răspund la tratamentul cu antivirale dezvoltă și rezistență la aceste medicamente, răspândind astfel forme incurabile (Howe et al., 2022). În plus, consecințele infecției cu VHC cum sunt ciroza și carcinomul, nu pot fi evitate prin terapie antivirală dacă infecția a avansat (Sanduzzi-Zamparelli et al., 2019). Un vaccin eficient împotriva tuturor genotipurilor curente ar putea să ducă la un mai bun control epidemiologic al VHC, costuri reduse asociate cu diagnosticul și tratarea VHC și posibil la eradicarea virală.

Eliminarea spontană a infecției apare la aproximativ 25% din pacienții cu infecție acută (Micallef et al., 2006). Totuși, la o nouă expunere la virus, pacienții se pot reinfecța, RI nefiind complet protector împotriva unei reinfecții. Reinfecția se caracterizează printr-o reducere a viremiei și a duratei infecției și prin apariția unor NAbs puternic neutralizanți, capabili în 80% din cazuri să suprimă infecția (Osburn et al., 2014). Aceste date indică inducerea unui RI adaptativ, care deși nu oferă protecție 100%, protejează împotriva infecției cronice. RI protector implică o sinergie a răspunsurilor SI adaptativ, iar un vaccin ideal ar trebui să inducă un răspuns imunologic dual (Obaid et al., 2018).

Deoarece E2 mediază atașarea la receptorii SRB1 și CD81, ea este și principală țintă a Răspunsului Imun (RI). Se consideră că prin generarea de anticorpi anti-E2 care țintesc foarte specific zonele de legare la receptori, se poate bloca infecția, determinând apariția de NAbs cu

capacitate mare de neutralizare, sau *broadly* NAbS (capabili să neutralizeze majoritatea genotipurilor circulante) (Potter et al., 2012; Ströh & Krey, 2020; Yechezkel et al., 2021). Generarea acestor anticorpi este foarte dificilă deoarece virusul are mai multe mecanisme prin care poate evada RI umoral. În infecții acute și cronice, RI umoral țintește regiunile variabile, care sunt constant sub presiune selectivă imunologică. Regiunile variabile și glicanii cresc heterogenitatea proteinei influențând astfel și răspunsul imun (Li et al., 2015). NAbS care țintesc HVR1 sunt în general specifici izolatului respectiv, iar virusul dezvoltă rapid rezistență împotriva lor. În plus, atașarea acestor anticorpi la HVR1 poate acoperi alți epitopi importanți în neutralizare, inhibând legarea acestora steric (Bankwitz et al., 2010). Majoritatea NAbS se leagă de E2 inhibând interacțiunea cu CD81 și sunt extrem de eficienți în neutralizarea infecției indiferent de genotip datorită conservării secvenței de legare la CD81 (Tzarum et al., 2018).

Studiile de cristalografie arată un grad mare de flexibilitate conformațională în epitopul I (412-423) pe stratul frontal și în epitopul II de pe stratul distal, care sunt foarte bine conservate (Flyak et al., 2020; Gu et al., 2018; Kong et al., 2016; Kong, Giang, Nieusma, et al., 2012; Kong, Giang, Robbins, et al., 2012; Li et al., 2015; Potter et al., 2012). Flexibilitatea celor două straturi, sugerează existența unei dinamici conformaționale globale. Această dinamică pare să influențeze diferitele stări funcționale ale virusului în timpul intrării în celulă (Tzarum et al., 2020). Proprietatea anvelopei de a suferi mișcări funcționale, afectează și RI, determinând un răspuns umoral mult prea divers și prea puțin țintit. Un număr mare de virioni, printre care și cei aparținând flavivirusurilor, sunt descriși ca structuri dinamice care există în conformații și aranjamente specifice unui anumit rol biologic, fiind caracterizate de rearanjarea reversibilă conformațională a glicoproteinelor de anvelopă (Dowd & Pierson, 2018). Acest proces denumit *virus breathing* a fost observat și la VHC prin experimente de neutralizare dependente de timp și temperatură și poate oferi indicii structurale extrem de prețioase în alegerea sau conceptualizarea unui potențial vaccin (Prentoe et al., 2019; Sabo et al., 2012).

Așadar, scopul acestui studiu a fost de a stabili epitopul conservat 412-423 pentru a direcționa RI înspre generarea anticorpilor de tipul AP33. Am construit o librărie de antigene HCV E2 prin introducerea unor noi punți de cisteine ce flanchează epitopul de interes pentru a stabili epitopul 412-423 într-o buclă tip ac-de-păr.

## **Sisteme alternative de producție a antigenelor VHC**

Se estimează că pentru dezvoltarea unui vaccin de la faza de conceptualizare la punerea în distribuție, durează între 5-18 ani, costurile asociate fiind între 200-500 milioane dolari (Plotkin



et al., 2017; Wayne et al., 2013). Suplimentar, dezvoltarea unei facilități de producție poate costa între 50-700 milioane dolari și durează în medie 7 ani (Vidor & Soubeyrand, 2016). Dezvoltarea unor tehnologii de producție și dezvoltare care să fie flexibile, rapide și care să presupună costuri scăzute ar permite țărilor slab dezvoltate să contracareze o eventuală epidemie. Un sistem alternativ de producție care să îmbine productivitatea sistemului bacterian cu procesarea de tip eucariot ar rezolva o parte dintre limitările actuale referitoare la costuri și accesibilitate.

Plantele prezintă un potențial imens de producție pentru proteine recombinante. Ele permițând expresia unor proteine complexe fără costurile asociate producției în celule de insecte sau linii celulare mamaliene. Plantele utilizează energie solară și captează CO<sub>2</sub>, reprezentând un sistem mai favorabil pentru mediul înconjurător, cu costuri extrem de reduse și o fezabilitate de implementare mai mare. Un alt avantaj al acestui sistem îl prezintă posibilitatea administrării orale, de biomasă, a vaccinului (Tacket, 2009). Astfel, se evită pasul de purificare a antigenului, care este adesea costisitor și laborios. În plus, liofilizarea materialului vegetal comestibil poate facilita transportul acestuia (Rosales-Mendoza, 2020). Totuși, plantele prezintă un profil de glicozilare specific și diferit. Deși acest impediment se poate rezolva prin dezvoltarea de organisme transgenice cu un sistem de glicozilare apropiat celulei mamaliene (Pantazica et al., 2023), problema principală este randamentul scăzut de expresie (Waheed et al., 2016). Totodată, standardizarea dozei de antigen în cazul administrării orale e dificil de realizat deoarece concentrația de antigen diferă între părțile plantei (Dobrica et al., 2021).

Microalgele reprezintă o opțiune atractivă ca sistem alternativ de producție pentru producția de proteine recombinante. Acest sistem prezintă multe avantaje, cum sunt rata rapidă de creștere, ușurința cultivării, transformarea rapidă, dar și capacitatea de a permite modificări post-tranlaționale și împachetarea corectă a proteinelor complexe (Lindh et al., 2014). Microalgele pot fi cultivate în medii de cultură extrem de puțin costisitoare, în special speciile fotosintetizante ce au cerințe nutriționale minime, care se pot scala în bioreactoare, reducând astfel necesitatea terenurilor sau serelor de cultivare pentru plante (Barbosa et al., 2023a).

De asemenea, microalgele prezintă un profil de siguranță extrem de crescut, neavând compuși endogeni toxici și neprezentând riscuri de contaminări biologice animale. Producția bazată pe transformarea cloroplastelor rezultă într-o acumulare de proteină exogenă între 0.03-3 mg/L de cultură (Rosales-Mendoza et al., 2020). Transformarea nucleară permite producția unor proteine mai complexe, dar aceasta încă necesită optimizări pentru a atinge un nivel bun de expresie. Cea mai populară specie este *C. reinhardtii*, pentru care există metode de

transformare, mutageneză, vectori de expresie pentru proteine recombinante secretate sau intracelulare (Legastelois et al., 2017). Astfel că, deși s-a raportat expresia prin transformare nucleară de anticorpi, hormoni de creștere, epitopi tumorali, vaccinuri și peptide cu activitate anti-microbiană, nivelul de expresie a acestora a fost scăzut (Geng et al., 2003).

Diversitatea microalgelor este imensă, astfel, se pot găsi alte specii de microalge cu o capacitate de expresie transgenică mai mare și care pot fi cultivate la densități mai mari. Recent, s-a studiat fezabilitatea utilizării speciei de microalge roșii *Porphyridium purpureum* (*P. purpureum*) pentru producția de proteine recombinante. Astfel, s-a observat că *P. purpureum* poate exprima proteine recombinante la aproximativ 5% din totalul proteinelor celulare (de 5 ori mai mult decât *C. reinhardtii*) și că prezintă capacitatea de a secreta aceste proteine în mediul extracelular (Hammel, Neupert, et al., 2024).

Transformarea cloroplastelor microalgelor determină un nivel ridicat de expresie, dar nu permite secreția și glicozilarea proteinelor recombinante. Astfel că în ultimii ani, diferite grupuri au dezvoltat metode biotehnologice de transformare și expresie nucleară. Aceste metode se bazează pe optimizarea metodelor de transformare, pe găsirea a noi promotori și terminatori genetici care să permită un nivel crescut de expresie, dar și modificări post-tranlaționale corecte (Barbosa et al., 2023b). O necunoscută în cadrul acestui sistem o constituie sistemul de glicozilare, glicozilarea fiind extrem de importantă în cazul antigenelor virale complexe care modulează RI. Studiile care explorează glicozilarea la *P. purpureum* sunt puține la momentul actual și indică un profil de glicozilare modificat, de tipul  $\text{Man}_{8-9} \text{Xyl}_{1-2} \text{Me}_3 \text{GlcNAc}_2$  (Mathieu-Rivet et al., 2020).

Scopul nostru a fost acela de a testa fezabilitatea producției de antigen HCV E2 în *P. purpureum* prin studii de expresie, caracterizare și imunizare.

## **Capitolul 2. MATERIALE ȘI METODE**

Antigenele VHC propuse au fost exprimate în celule mamaliene urmând un proces de selecție bazat pe nivelul de expresie, profilul de glicozilare și capacitatea de legare a celor doi anticorpi ce recunosc structuri conformaționale diferite ale epitopului. Candidatul selectat a fost mai departe exprimat în celule în suspensie și purificat la un grad înalt de puritate prin cromatografie de afinitate cuplată cu cromatografie de excludere de masă. Antigenul pur a fost mai departe caracterizat din punct de vedere conformațional prin legarea la anticorpi, receptorul CD81 cât și prin analiza punților de cisteină prin spectrometrie de masă. Acesta a

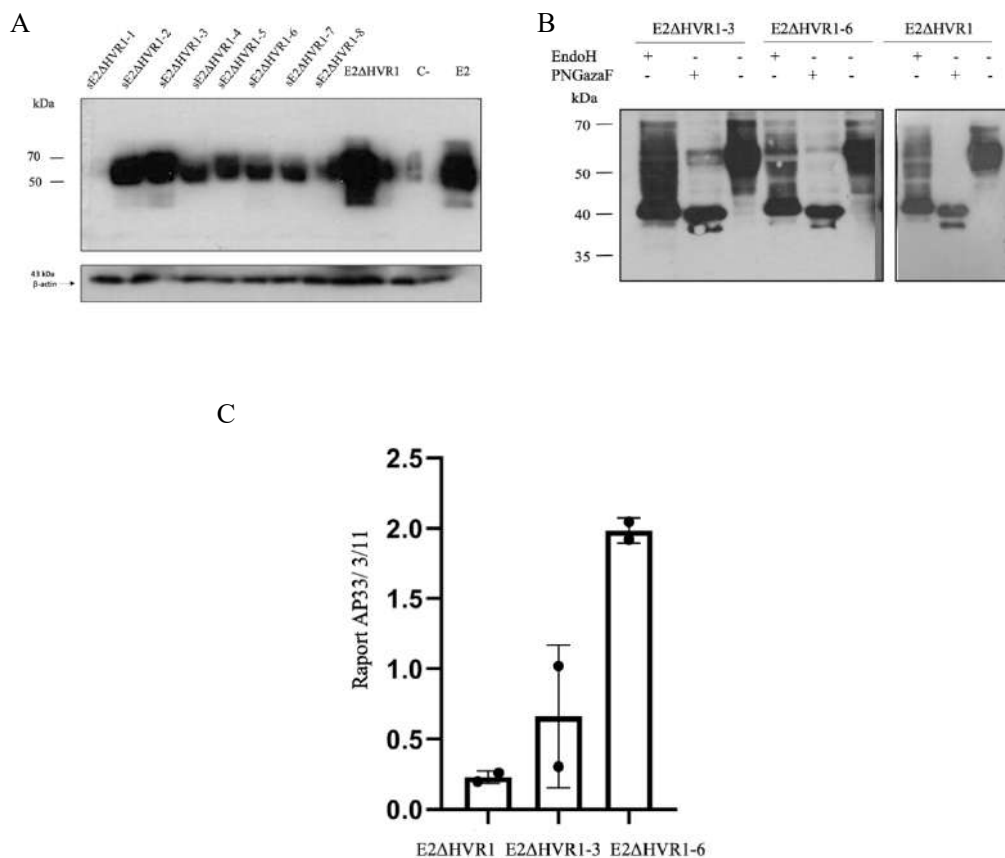
fost utilizat în studii de imunizare, în urma cărora au fost cuantificate titrurile de IgG dar și capacitatea de neutralizare VHCpp a serului obținut din imunizare.

Pentru testarea *P. purpureum* ca platformă de expresie, am purificat antigenul din biomasă liofilizată folosind cromatografie de afinitate. Antigenul purificat a fost ulterior caracterizat din punct de vedere conformațional prin legarea la anticorpi specifici și la receptorul CD81 și utilizat mai departe în studii de imunizare. În urma imunizării, s-au determinat titrurile de anticorpi induse cât și capacitatea serurilor obținute de a neutraliza infecția cu VHCpp.

### **Capitol 3. REZULTATE**

Antigenele propuse prin experimente de biologie computațională au fost obținute prin clonarea în vectorul pcDNA3.1 și selectate prin caracterizarea preliminară a acestora în formă transmembranară. Astfel, prin transfecție tranzientă în celule HEK293T, am observat nivelul de expresie al mutantelor. Am observat că unele substituții la cisteina sunt detrimentale pentru expresia proteinei E2, sugerând o pliere defectuoasă și implicit o stabilitate redusă a proteinelor.

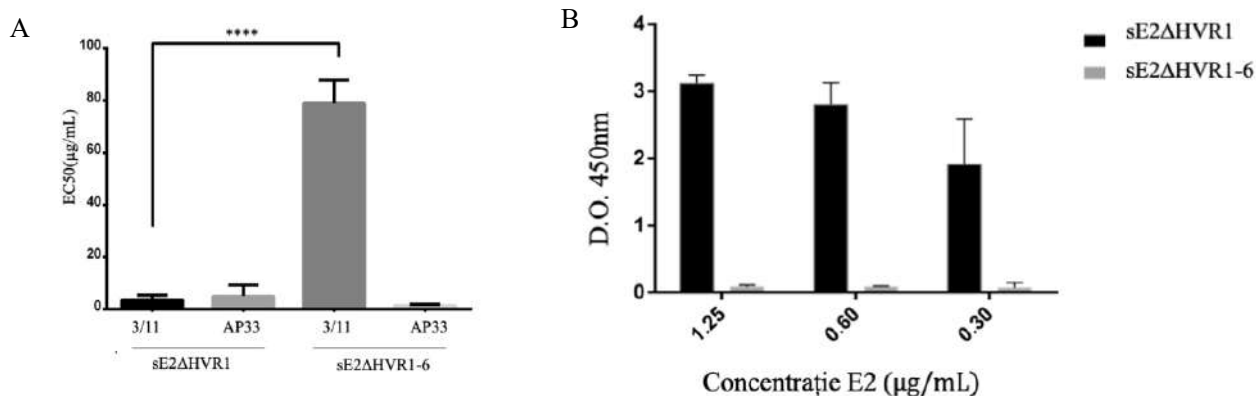
Pentru candidatele cu un nivel bun de expresie comparativ cu proteina nativă, s-a realizat digestia cu EndoH pentru a se urmări traficul intracelular al acestora și achiziția de glicani. Această analiză a arătat că două antigene din cele 6 selectate, prezintă o populație EndoH rezistentă, confirmând achiziția glicanilor bogați în manoză și pliarea corectă a antigenului intracelular. Din cele două antigene cu profil bun de expresie și un profil de glicozilare nativ, unul dintre acestea a prezentat și un profil de legare mai bun al anticorpului AP33 ce recunoaște conformația de tip buclă. Astfel, am selectat antigenul E2 ΔHVR1-6 pentru expresie la scară mare în celule Expi293 și purificare prin cromatografie de afinitate cuplată cu cromatografia de excludere de masă.



**Figura 1. Expresia noilor antigene VHC mutante în celule mamaliene (A).** Celulele HEK293T au fost transfectate cu plasmide pcDNA3.1 ce codifică antigenele indicate sau plasmid gol drept control (C). Lizatele celulare au fost analizate prin *western blot* în condiții reducătoare (+DTT). Anticorpul anti-E2 3/11 a fost utilizat pentru detecția proteinelor E2. Beta actina a fost utilizată drept control al cantității de proteină totală încărcată. **Glicozilarea antigenelor selectate și traficul intracelular al acestora (B).** Celulele HEK293T au fost transfectate cu plasmide pcDNA3.1 ce codifică antigenele indicate. Lizatele celulare au fost supuse digestiei fie cu enzima EndoH, fie cu PNGazaF, fie netratate. Detecția formelor de glicozilare s-a realizat prin *western blot* cu ajutorul anticorpilor anti-E2 3/11. **Selecția antigenelor în baza legării diferențiate a anticorpului AP33 prin ELISA (C).** Celulele HEK293T au fost transfectate cu plasmide pcDNA3.1 ce codifică antigenele indicate. Lizatul celular obținut a fost incubat în plăci de 96-godeuri cotate cu GNA în diluții specifice nivelului de expresie a antigenului, iar detecția s-a realizat cu ajutorul 3/11 și AP33, respectiv cu anticorpi secundari conjugați cu HRP. În final a fost determinată luminiscenta, rezultatele fiind reprezentate ca raportul de legare dintre AP33 la 3/11 pentru fiecare antigen în parte, după

normalizarea unităților de luciferază ale controlului. Graficul reprezintă 2 experimente independente biologic realizate în triplicate tehnice cu media și deviația standard.

Antigenul astfel purificat a fost utilizat în studii de caracterizare prin verificarea nivelului de legare al anticorpilor conformaționali, a buclei extracelulare a receptorului CD81 cât și prin caracterizarea punților disulfurice formate.



**Figura 2. Determinarea nivelului de legare a anticorpilor AP33 și 3/11 la noul antigen E2 (A).** Pentru determinarea a jumătate din concentrația maximă de anticorp ce poate lega antigenul (EC50) s-au cotoat plăci cu 96-godeuri cu 100ng antigen per godeu. Anticorpilor anti-E2 testați (3/11 și AP33) au fost utilizați în diluții seriale de 8 ori a câte 10 (100μg/mL-0.00μg/mL) în duplicat, cu 3 experimente independente. Pentru detecție s-au utilizat anticorpi anti-șoarece (AP33) și anti-șobolan (3/11). După calcularea valorilor EC50 din cele 3 experimente, s-a realizat media acestora și s-a aplicat testul One way Anova (Tukey's multiple comparisons test) \*\*\*\*P < 0.0001. **Recunoașterea proteinei E2 de către bucla extracelulara a receptorului uman CD81 (B).** S-au cotoat plăci cu 96-godeuri cu 200ng CD81-LEL-Fc per godeu pentru o incubare succesivă cu concentrațiile indicate de sE2ΔHVR1 și sE2 ΔHVR1-6. Detecția s-a realizat prin incubarea cu anticorp anti-Fc-uman conjugat cu peroxidază de hrean. Experimentul a fost realizat în duplicat de două ori.

Testând capacitatea de legare a anticorpilor în contextul unei proteine purificate de concentrație cunoscută, putem observa direct efectul legării anticorpilor, nemaifiind necesară raportarea internă la unul dintre anticorpi. Suplimentar, acest experiment urmărește cantitatea necesară de anticorp pentru a atinge jumătate din concentrația maximă ce poate lega antigenul.

Astfel, putem observa că pentru sE2 ΔHVR1-6 cantitatea necesară de anticorp 3/11 pentru a atinge EC50 este de aproximativ 80 de ori mai mare decât în cazul proteinei sE2 ΔHVR1. De asemenea, observăm o scădere a concentrației necesare de AP33 utilizat pentru atingerea

valorii EC50, sugerându-ne într-adevăr, o modificare conformațională directă a epitopului ce împiedică semnificativ legarea lui 3/11 menținând totodată nivelul de legare pentru AP33.

Mai departe, am dorit să vedem dacă sE2  $\Delta$ HVR1-6 mai poate interacționa cu CD81-LEL. Bucla extracelulară a receptorului CD81 este cea care participă la interacțiunea cu regiunea N-terminală a lui E2, interacțiune facilitată de starea conformațională de tip deschis a epitopului 412-423. Prin prisma acestui experiment de legare am observat că interacțiunea cu sE2  $\Delta$ HVR1 este dependentă de doza de antigen utilizată, iar pentru sE2  $\Delta$ HVR1-6 interacțiunea este complet blocată, indiferent de concentrația utilizată de antigen. Acest rezultat indică într-adevăr că din punct de vedere funcțional, antigenul propus nu mai prezintă dinamica conformațională ce permite legarea la receptor.

Pentru o mai bună înțelegere a structurii antigenului propus, am efectuat o analiză de spectrometrie de masă în care am urmărit participarea diverselor resturi de cisteină ale E2 la punți disulfurice. Astfel, am folosit probe de E2 reduse (cu agent reducător) sau nereduse (fără agent reducător) ce au fost alchilate și digerate cu chimotripsină. Modificarea resturilor de cisteină ce participă la formarea unei punți are loc doar în forma redusă a probei, ele nefiind accesibile alchilării în condiții nereducătoare. Pentru a determina formarea punții între două cisteine acestea trebuie să se regăsească în același peptid identificat.

Astfel, la nivelul probelor analizate am identificat două punți frecvent descrise în literatură pentru diverse genotipuri, C564+C569 și C581+C585 (de la Peña et al., 2022; Krey et al., 2010; Metcalf et al., 2023), ceea ce sugerează prezența lor constantă în proteina E2. Pentru a compara structura globală a antigenului mutant cu a proteinei de tip sălbatic, am realizat și analiza acesteia din urmă. Astfel pe lângă cele două punți comune identificate, am identificat și formarea unei punți comune între C494 și C503, neregăsită în literatură. C429 pare să formeze punți heterogene, fiind regăsită atât ocupată cât și neocupată în proteina de tip sălbatic, pe când în antigenul propus, pare să formeze o punte nouă prin împerechere cu una dintre cisteinele nou introduse. Totuși, datele arată o pliere globală corectă a antigenului și atestă cel puțin parțial formarea unei punți în domeniul frontal al proteinei.

Antigenul a fost exprimat la scală mare, purificat și caracterizat. Prin purificarea de tip excludere de masă nu s-au observat forme de agregate în cantități diferite față de proteina de tip sălbatic, ceea ce întărește ipoteza unei plieri corecte. Analiza de legare a anticorpilor arată că anticorpul ce leagă conformația deschisă a epitopului, 3/11, prinde antigenul sE2 $\Delta$ HVR1-6 cu o capacitate de aproximativ 80% mai mică față de recunoașterea proteinei de tip sălbatic, și cu 10% mai mare pentru anticorpul AP33, cel ce recunoaște conformația de tip ac-de-păr. Acest rezultat indică într-adevăr, o stabilizare a conformației epitopului 412-423.

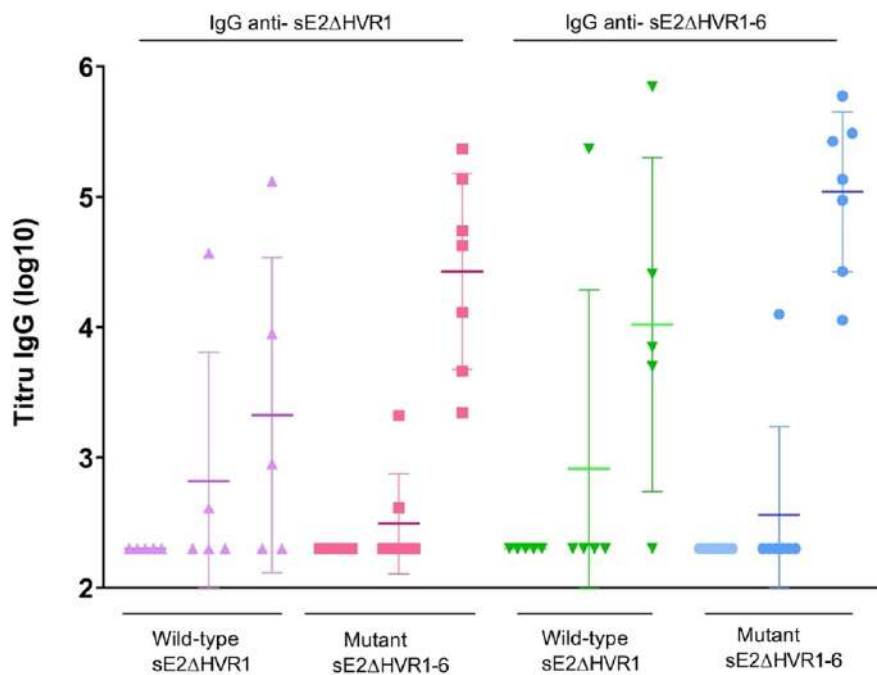
Caracterizarea acestui antigen vaccinal relevă însă incapacitatea de legare la receptorul viral, proteina CD81. Acest fapt ar putea fi explicat prin expunerea redusă a restului de triptofan 420 care este esențial în legarea proteinei E2 la CD81. Totuși, datele de legare la AP33 contrazic această ipoteză, același rest de triptofan fiind necesar și în legarea anticorpului. Dacă excludem ipoteza conform căreia această interacție este blocată prin substituția unui punct de contact esențial, ne putem gândi cum influențează noua conformație această legare. Datele de MS obținute privind formarea de punți disulfurice în antigenul nou, indică o conservare a punților deja identificate în literatură (Khan et al., 2014b; Krey et al., 2010; Metcalf et al., 2023) și relevă o posibilă heterogenitate a punților formate de resturile de cisteină nou introduse. Așadar, modificarea conformațională indusă este locală epitopului de interes, iar această conformație cel mai probabil nu este cea recunoscută de receptorul celular. În absența lui CD81, ectodomeniul E2 prezintă o buclă de legare la CD81 internă, ascunsă în spatele restului de izoleucină 422 sau al epitopului 412-423 pe stratul frontal. Când are loc legarea la receptor, E2 cel mai probabil suferă două modificări conformaționale, stratul frontal interacționând cu CD81 prin plierea epitopului 412-423 în jurul unei porțiuni de interacție din CD81, în timp ce bucla de legare la CD81 se îndepărtează de ectodomeniul proteinei. Astfel cele două reziduuri hidrofobe de la vârful buclei (resturile de tirozină 529 și triptofan 531) se pot lega de membrana celulei gazdă (Kumar et al., 2023, Bankwitz et al., 2010).

Studiile recente arată că în absența lui CD81 sau în absența unor condiții de pH scăzut, restul de izoleucină 422 menține bucla de legare retractată, nepermițând interacția cu receptorul (Kumar et al., 2023). De asemenea, se cunoaște că îndepărtarea lui HVR1 determină o creștere a legării la receptorii celulari. Așadar, se consideră ca E2 interacționează întâi cu SRB1 prin regiunea HVR1, făcând epitopul 412-423 accesibil interacției cu CD81, această interacție inducând la rândul ei modificarea conformațională a buclei de legare (520-539) ce permite legarea la receptor (Bankwitz et al., 2010). Un studiu recent de cristalografie, sugerează că proteina se poate afla într-o stare conformațională închisă, unde HVR1 acoperă epitopul anticorpului AR4A (ce recunoaște regiunea N-terminală a E2) și împiedică legarea la CD81 într-o manieră dependentă de temperatură (Augestad et al., 2020). Teoretic, un imunogen fără HVR1 stabilizat într-o conformație pre-legare, ar putea induce anticorpi cu o diversitate mai mică și de o calitate mai bună. Acești anticorpi s-ar putea lega de anvelopa virală cât aceasta este încă prezentă în conformația ce precede legarea la receptorul CD81, astfel blocând alte modificări conformaționale ulterioare ale anvelopei și blocând interacția virus-receptor.

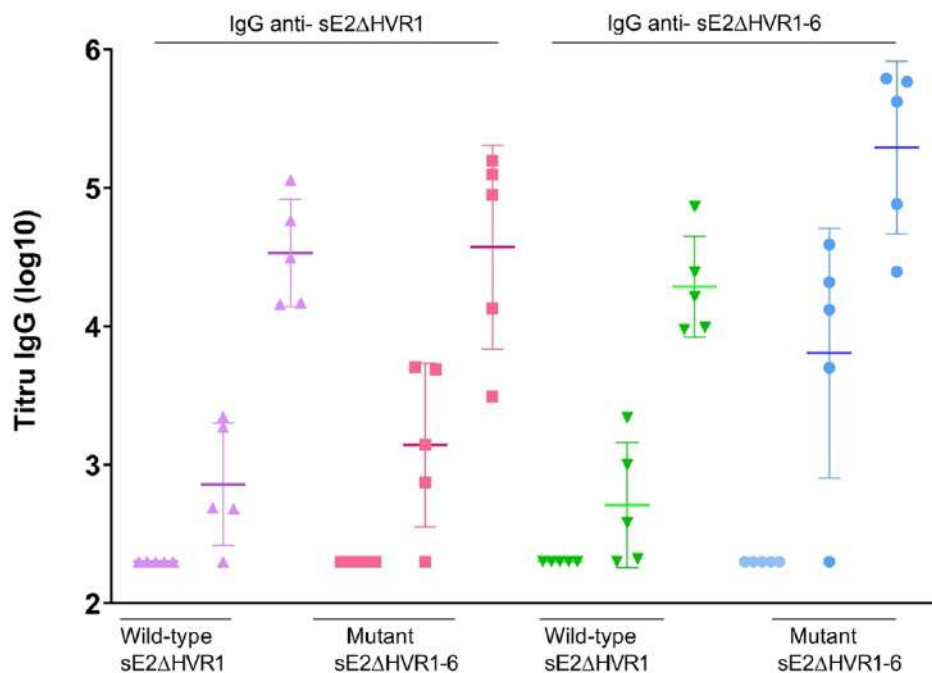
Cele două antigene purificate și caracterizate au fost ulterior utilizate în studii de imunologie *in vivo*. Prin aceste studii am putut determina imunogenitatea antigenului mutant în comparație

cu proteina de tip sălbatic. Pentru a avea o perspectivă reală asupra heterogenității răspunsului imun, am realizat două studii de imunizare complet independente folosind atât șoareci Balb/C cât și șoareci CD1. Balb/C reprezintă o tulpină de șoareci de tip *inbred*, cu o variabilitate genetică redusă și cu un răspuns imunologic înclinat spre activarea de tip Th2. Șoarecii CD1 în schimb, prezintă un răspuns echilibrat Th1-Th2, cât și o variabilitate intrinsecă genetică ridicată fiind șoareci de tip *outbred*. Șoarecilor Balb/C li s-a administrat peritoneal un *prime* de 50  $\mu\text{g}$  și două boost-uri a câte 20  $\mu\text{g}$  iar șoarecilor CD1 intramuscular un *prime* de 10  $\mu\text{g}$  cu două boost-uri de 5  $\mu\text{g}$ .

A



B





**Figura 3. Analiza răspunsului imun umoral IgG total indus de imunizarea șoarecilor Balb/C cu antigenele sE2 produse în celule mamaliene (A).** Grupuri de 5 șoareci per lot au fost imunizate la interval de 14 zile cu 3 doze de proteină adjuvantată sE2 ΔHVR1 sau sE2 ΔHVR1-6 sau doar adjuvant Al(OH)<sub>3</sub>. Titrul final de anticorpi anti sE2 ΔHVR1 sau sE2 ΔHVR1-6 la 0, 28 și 42 de zile post-imunizare a fost determinat prin ELISA și calculat folosind o curbă de regresie logistică cu 4-parametri ajustată la un amestec de ser imun (n=5). **Analiza răspunsului imun umoral IgG total indus de imunizarea șoarecilor CD1 cu antigenele sE2 produse în celule mamaliene (B).** Grupuri de 5 șoareci per lot au fost imunizați la interval de 14 zile cu 3 doze de proteină adjuvantată sE2 ΔHVR1 sau sE2 ΔHVR1-6 sau doar adjuvant AddaVax. Titrul final de anticorpi anti sE2 ΔHVR1 sau sE2 ΔHVR1-6 la 0, 28 și 42 de zile post-imunizare a fost determinat prin ELISA și calculat folosind o curbă de regresie logistică cu 4-parametrii ajustată la un amestec de ser imun (n=5).

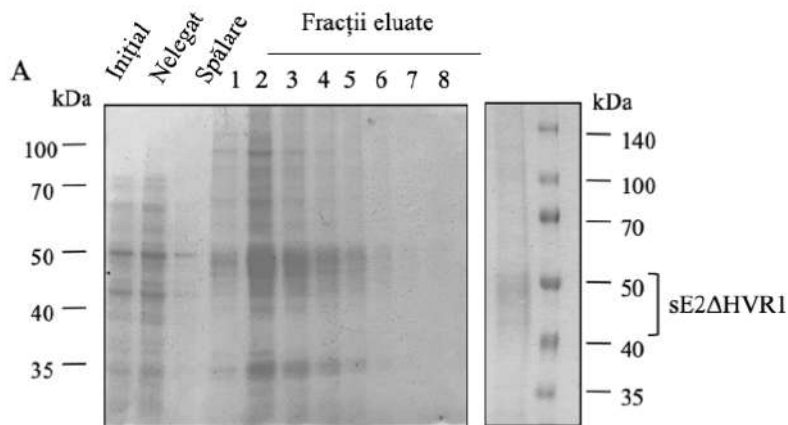
Astfel, prin experimente de tip ELISA s-au determinat titrurile de anticorpi IgG total, IgG1 și IgG2a pentru cele două studii de imunizare, împotriva proteinei de tip sălbatic, cât și împotriva mutantei. Pentru șoarecii Balb/C observăm ca nivelul total de anticorpi IgG este similar pentru răspunsul anti- proteina de tip sălbatic, dar urmărind nivelul de anticorpi anti-mutantă, observăm o creștere a titrului pentru serul provenit din imunizarea cu antigenul autolog atât prin comparație cu serul provenit din imunizarea cu antigen de tip sălbatic cât și dacă comparăm valoarea titrului pentru același ser recunoscând cele două proteine diferite pentru titrul obținut în urma recoltării finale. Nivelul ridicat de anticorpi cât și activarea timpurie a răspunsului imun umoral sugerează o mai bună imunogenicitate a antigenului nou propus. La șoarecii CD1 observăm o variabilitate mai crescută a RI. Totuși, chiar și administrat în doze mici, sE2 ΔHVR1-6 induce un titru de anticorpi mai mare împotriva ambelor antigene, sugerând o imunogenicitate crescută.

Inhibarea legării anticorpului 3/11 și creșterea nivelului de legare a anticorpului AP33 de către antigenul E2 propus sugerează o expunere corectă a epitopului. Profilul de glicozilare determinat prin digestia cu EndoH indică un trafic intracelular corect. Lipsa agregării este evidențiată prin profilul de excludere de masă iar identificarea unor punți cunoscute de cisteină confirmă plierea globală corectă a antigenului. Studiile de imunizare independente au arătat că antigenul este superior din punct de vedere imunogenic variantei de tip sălbatic, serul recoltat din imunizarea cu antigenul candidat recunoscând mai bine proteina de tip sălbatic. Acest fapt întărește ipoteza plierii corecte a antigenului propus cât și obținerea unui antigen mai imunogen.

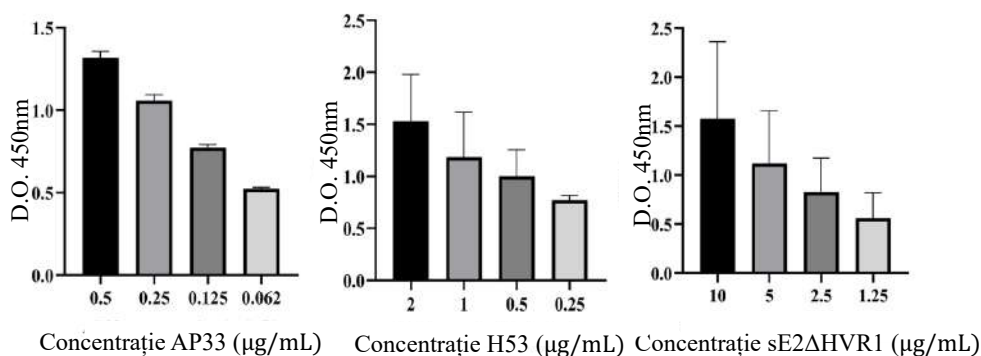
Putem spune că strategia de stabilizare a antigenului E2 în regiuni hiper-flexibile și imunodominante este una promițătoare și că sE2ΔHVR1-6 prezintă într-adevăr o conformație capabilă de a direcționa răspunsul imun către un răspuns *cross*-neutralizant. La momentul redactării acestei teze de doctorat, nu deținem informații privind capacitatea *cross*-neutralizantă a serurilor obținute. Dar, din datele preliminarilor observăm o mai bună neutralizare a genotipului autolog în urma imunizării cu antigenul propus. În continuarea proiectului vom testa capacitatea de neutralizare a serurilor în contextul unor izolate rezistente la neutralizare, cât și potența acestora în contextul altor genotipuri.

Mai departe am dorit să testăm fezabilitatea microalgelor *P. purpureum* în contextul dezvoltării unui vaccin. Ulterior expresiei antigenului în microalge, acesta a fost extras și purificat din microalge prin sonicare și cromatografie de afinitate și utilizat în studii de caracterizare. Pentru a verifica conformația antigenului purificat am realizat experimente de tip ELISA de prindere la anticorpi conformaționali cât și la receptorul CD81. Astfel, am verificat plierea proteinei prin legarea la doi anticorpi anti-E2 conformaționali, AP33 (ce recunoaște domeniul frontal), H53 (recunoaște domeniul distal împreună cu cel frontal) și la receptorul CD81 (recunoaște domeniul frontal). Pentru toate cele 3 interacții am obținut un nivel de legare dependent de doză în experimentele de tip ELISA, confirmându-se astfel o recunoaștere specifică anticorp-antigen și receptor-antigen și deci o pliere globală nativă.

A



B



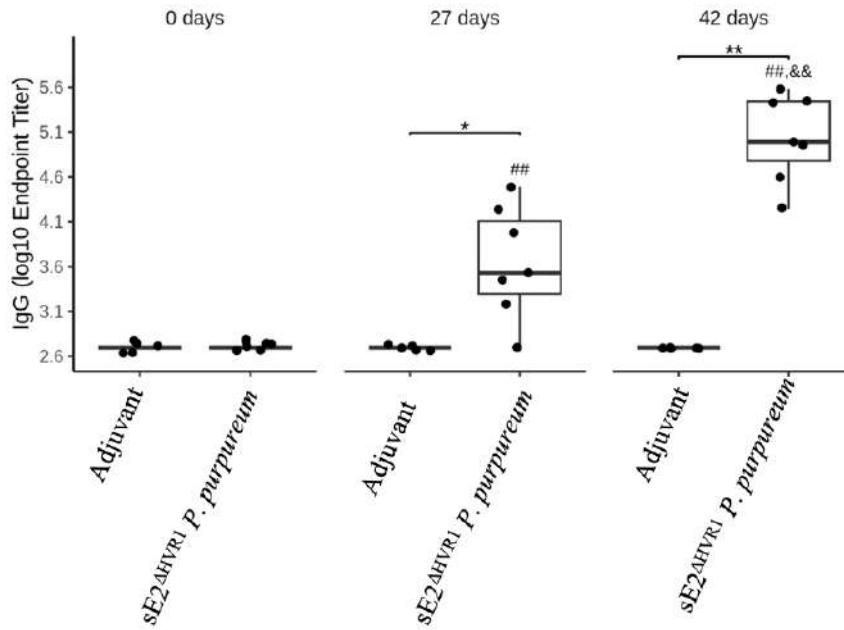
**Figura 4. Purificarea antigenului sE2 ΔHVR1 din fracția solubilă a lizatului de microalge roșii (A).** Extractul solubil al lizatului obținut prin metoda de liză dezvoltată a fost succesiv adăugat pe o coloană gravitațională împachetată cu rășină NiNTA. Frațiile eluate prin gradient treptat (20-450mM) de imidazol au fost confirmate prin SDS-PAGE cu colorație Coomassie Blue (A) Frațiile au fost unite, dializate în PBS și concentrate folosind un Amicon cu mărime limită de 30 kDa (A-dreapta) Figură preluată și adaptată după (Hammel, Cucos, et al., 2024). **Caracterizarea conformațională a antigenului sE2 ΔHVR1 purificat din microalge roșii (B).** Plăci de 96 godeuri de tip Nunc MaxiSorp au fost incubate cu antigen purificat (stanga, mijloc) sau cu receptor CD81 (dreapta) peste noapte. A doua zi godeurile au fost incubate cu diluții seriale de anticorp (AP33/H53) sau cu diluții de antigen (pentru legarea la CD81). Citirea s-a realizat cu ajutorul anticorpilor secundari conjugați cu peroxidază de hrean. Experimentele au fost realizate de două ori în duplicat tehnic. Figură preluată și adaptată după (Hammel, Cucos, et al., 2024).

Având la dispoziție antigen purificat cât și sub formă de biomasă, am decis investigarea răspunsului imun umoral în condiții de administrare intramusculară (cu proteina provenită din lizatul microalgelor), cât și în condiții de rapel oral după administrarea unui *prime* intramuscular cu E2 provenit din celule mamaliene (cu biomasă de microalge administrată oral; *Prime + Boost*<sup>+</sup>). Pentru fiecare studiu de imunizare s-a adăugat un lot cu adjuvant, iar pentru studiul de rapel prin administrare orală s-au adăugat drept controale un lot cu administrare intramusculară de antigen produs în celule mamaliene la doza maximă utilizată (drept control pozitiv al răspunsului imun; sE2 ΔHVR1Expi293), un lot cu rapel de hrănire cu microalge de tip sălbatic (drept control negativ pentru răspunsul la rapel; *Prime + Boost*<sup>-</sup>) și un lot cu imunizare cu microalge de tip sălbatic (drept control negativ suplimentar pentru răspunsul la

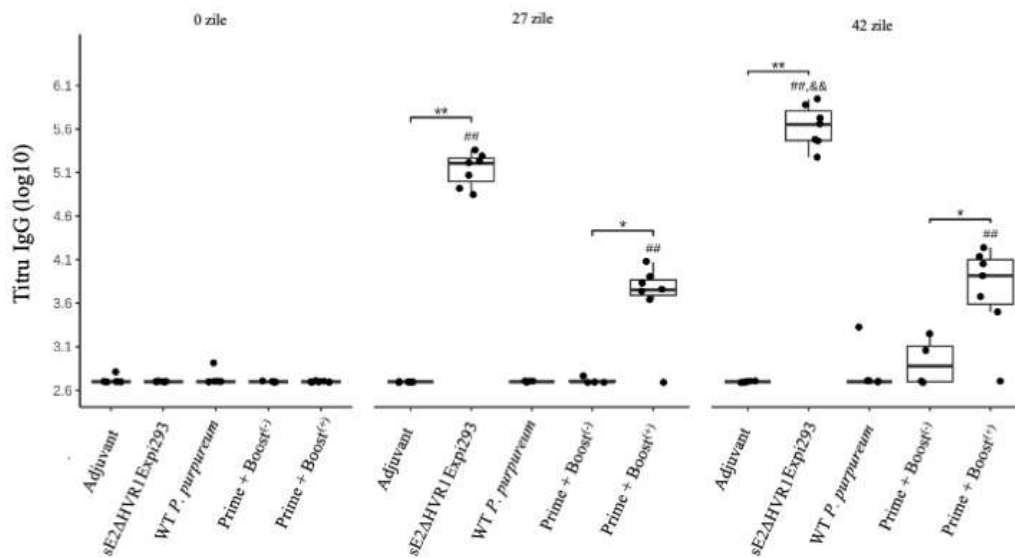
rapelul oral; WT *P. purpureum*). Înainte de administrarea fiecărei doze, cât și la sacrificare, a fost recoltat ser care a fost testat pentru răspunsul anti-E2 prin ELISA.

Putem observa inducerea unui răspuns imun semnificativ în cazul administrării orale de biomasă ce exprimă antigen comparativ cu administrarea biomasei de tip sălbatic. Totuși, cantitativ se observă că titrul obținut prin administrare orală este mult mai mic decât cel obținut prin imunizare cu antigen provenit din celule mamaliene, ceea ce e de așteptat având în vedere și cantitatea totală de antigen mai mică administrată. În cazul administrării intramusculare de antigen purificat din microalge se notează o creștere a răspunsului imun anti-E2 mai mare decât în cazul administrării orale, dar mai mică decât în cazul antigenului provenit din celule mamaliene, acest fapt datorându-se cel mai probabil cantității mai reduse de imunogen administrat. Secreția de IgG indică o activare eficientă a sistemului imun, o prezentare corectă a antigenului ce induce un răspuns complex care va fi testat ulterior pentru activitate neutralizantă.

A



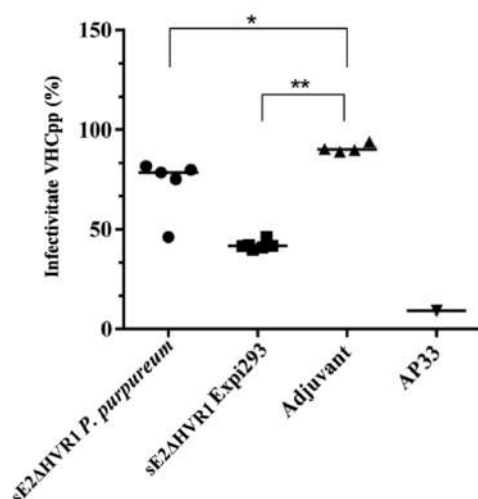
B



**Figura 5. Analiza răsunsului imun umoral IgG total indus prin imunizarea șoarecilor Balb/C cu antigenele sE2 produse în microalge.** Grupuri de 5 sau 7 șoareci per lot au fost imunizați la interval de 14 zile cu 3 doze de proteină adjuvantată sE2  $\Delta$ HVR1 produsă în microalge prin administrare intramusculară (sE2  $\Delta$ HVR1 *P. purpureum*) sau doar adjuvant (A), sau prin administrarea unei doze inițiale intramusculare urmate de administrare orală de pelet de alge ce nu exprimă E2 (*Prime + Boost*<sup>(-)</sup>) sau exprimă E2 (*Prime + Boost*<sup>(+)</sup>), sau prin administrarea de E2 produs în celule mamaliene (sE2  $\Delta$ HVR1 Expi293) sau administrarea exclusiv orală de pelet de alge ce nu exprimă E2 (WT *P. purpureum*) (B). Titrul final de

anticorpi anti sE2 ΔHVR1 la 0, 27 și 42 de zile post-imunizare a fost determinat prin ELISA și calculat folosind o curbă de regresie logistică cu 4-parametrii ajustată la un amestec de ser imun (n=5). Se arată comparațiile realizate între grupuri la același timp (\*P < 0.05; \*\*P < 0.01), la zilele 27 și 42 comparativ cu ziua 0 (#P < 0.05; ##P < 0.01) și la 42 zile comparativ cu 27 zile (&&P < 0.01). Figură preluată și adaptată după (Hammel, Cucos, et al., 2024).

Serurile imune obținute în urma imunizării au fost testate pentru activitate neutralizantă împotriva infecției cu pseudoparticule VHC ce prezintă pe suprafața lor proteinele de anvelopă E1E2 complete, aparținând izolatului folosit ca imunogen (H77). Drept control pozitiv pentru neutralizarea infecției am utilizat anticorpul anti-E2 AP33 în fiecare experiment, acesta având o potență de neutralizare mare și specifică. Drept control pozitiv pentru imunizare am utilizat serul provenit din imunizarea cu antigenul produs în Expi293, care prezintă o capacitate de a inhiba infecția de aproximativ 60%. Pentru a urmări activitatea neutralizantă nespecifică a serurilor imune am utilizat drept control negativ serul provenit de la lotul de șoareci imunizați doar cu adjuvant, recoltat la același timp precum serurile imune, pentru care am observat o inhibiție nespecifică de aproximativ 10%. Precum am anticipat, serurile imune provenind din imunizarea cu antigen purificat din microalge și administrat parenteral, prezintă o activitate neutralizantă de 30-40%, semnificativ mai mare decât a adjuvantului, dar și semnificativ mai mică decât a serului provenit din imunizarea cu antigen din celule mamaliene. Totuși, neutralizarea mai mare în cazul antigenului provenit din celule mamaliene este explicată prin faptul că acest antigen era mai pur (95% vs 65%) și a fost folosit în cantități mult mai mari (25μg vs 10μg per doză) pentru a asigura un control pozitiv al studiului de imunizare, respectiv răspunsul maxim posibil. Așadar comparațiile între cele două antigene nu sunt de folos în acest studiu.



**Figura 6. Analiza capacității de neutralizare a serului imun obținut în urma imunizării cu antigenele sE2 produse în microalge.** Celule Huh7 au fost infectate cu pseudoparticule virale produse în celule HEK293T. Infecția cu VHCpp a fost realizată în prezență de ser de la șoareci individuali imunizați cu adjuvant, sE2 din microalge (sE2<sup>ΔHVRI</sup> *P. purpureum*), sE2 din celulele mamaliene (sE2<sup>ΔHVRI</sup> Expi293) sau în prezența unui anticorp puternic neutralizant drept control de neutralizare (AP33). Celulele au fost recoltate la 72 ore post-infecție și utilizate pentru a cuantifica nivelul de luciferază cu ajutorul kitului Luciferase Assay System (Promega). Datele sunt prezentate ca procent de infecție cu VHCpp în prezența serurilor post-imune din procentul de infecție al celulelor infectate netratate cu ser. Sunt reprezentate procentele medii de infectivitate obținute în două experimente independente realizate în triplicat. Analiza statistică s-a realizat folosind testul Kruskal-Wallis (\*P < 0.05; \*\*\*\*P < 0.0001). Figură preluată și adaptată după (Hammel, Cucos, et al., 2024).

## CONCLUZII ȘI PERSPECTIVE

Studiul actual prezintă dezvoltarea și caracterizarea unui nou antigen E2 al VHC care se bazează pe stabilizarea conformațională a unui epitop imunodominant. Noul candidat antigenic a prezentat un profil antigenic mai favorabil recunoașterii de către AP33, un anticorp foarte neutralizant. Mai mult decât atât, antigenul propus induce un răspuns imunologic mai puternic decât proteina de tip sălbatic, generând un titru mai mare cantitativ în cele două studii de imunizare independente.

Însă, calitatea acestor anticorpi este esențială pentru un răspuns imun protector. Prin stabilizarea dinamicii conformaționale a stratului frontal al proteinei, ne așteptăm să obținem un răspuns imun capabil să neutralizeze majoritatea genotipurilor, cât și izolate rezistente la neutralizare. Experimentele de neutralizare vor defini definitiv așadar scopul acestui studiu, plasând sau nu antigenul propus ca potențial vaccin.

O egală importanță o au totuși și studiile structurale ce momentan lipsesc în completarea ipotezei. În viitor ne propunem așadar să determinăm cu precizie localizarea punții disulfurice introduse, datele de spectrometrie de masă nefiind definitive. Astfel, prin HDX-MS am putea analiza gradul de mișcare conformațională, precum și structura proteinei și a epitopului de interes în diverse condiții de temperatură și pH. Rafinarea și îmbunătățirea imunogenului se poate realiza și prin cuplarea la proteina de anvelopă E1 care oferă într-adevăr un răspuns imun complet și fidel împotriva anvelopei virale. La momentul inițierii studiului nu exista încă o formă a heterodimerului solubilă însoțită de studii structurale care să ateste plierea conform heterodimerului membranar. Recent însă, au apărut studii și modele antigenice care să permită integrarea noului antigen propus în studiul actual, în forma heterodimerică E1E2. Așadar, mai departe ne propunem studiul acestui antigen în forma heterodimerului complet urmărind un flux de lucru similar.

În acest studiu am demonstrat în premieră fezabilitatea utilizării microalgelor ca platformă de expresie pentru producția de vaccinuri. Rezultatele obținute atestă un nivel de expresie superior oricărui alt sistem fotosintetizant utilizat anterior pentru expresia de antigene virale. Antigenul obținut este unul corect pliat, și cel puțin parțial corect glicozilat, demonstrând capacitatea organismului *Porphiridium purpureum* de a exprima proteine complexe ce rețin modificările post translaționale specifice celulelor mamaliene. Antigenul obținut s-a dovedit a fi imunogen atât purificat și administrat sub formă de injecție intramusculară, cât și administrat ca biomasă prin hrănire. Caracterul său imunogenic oral poate fi îmbunătățit în viitor prin folosirea unor adjuvanți specifici imunității de mucoasă cât și prin reglarea dozelor de antigen și a schemei de administrare. Mai mult decât atât, anticorpul rezultat prezintă caracter neutralizant. Prin utilizarea unui antigen modificat și stabilizat cum este cel propus în prima parte a studiului, putem, de asemenea, îmbunătăți calitatea răspunsului imun.

Datele preliminare atestă și secreția antigenului produs în microalge în mediul extracelular. Acest fapt ar putea facilita o producție mai eficientă a unui antigen mai puțin divers structural și din punct de vedere al profilului de glicozilare. Folosirea unui antigen solubil ar scădea, de asemenea, costurile asociate lizei microalgelor și ar îmbunătăți nivelul de purificare a proteinei,



determinând un flux de lucru mult mai ușor. Ne propunem așadar ca în viitor să studiem proprietățile unui nou antigen care să fie secretat de către microalge, prin studii de imunizare ce folosesc cantități mai crescute de antigen și prin studii de neutralizare ce vizează și genotipuri diferite de cel autolog.

Având în vedere proprietățile favorabile ale noului antigen, precum și dezvoltarea unui nou sistem de expresie, un alt următor pas ar fi stabilirea unor studii preclinice avansate. Aceste studii se realizează în șoareci sau șobolani umanizați, ce prezintă grefe umane hepatocitare și imunologice care permit infecția cu virus. Mai mult, cunoscându-se liniile de expansiune ale limfocitelor B care duc la eradicarea virusului în mod natural la pacienți, putem urmări și la șoareci activarea acestor linii și implicit eficacitatea răspunsului imun. Aceste tipuri de studii pot duce și la identificarea de noi anticorpi pe care îi putem produce în institut și utiliza în diverse contexte, de la dezvoltarea unor metode de diagnostic noi și chiar ca reactivi utilizați în dezvoltarea de vaccinuri pentru VHC.

## Mulțumiri

Întâi de toate doresc sa îi mulțumesc conducătoarei de doctorat, Dr. Norica Nichita, pentru ca mi-a oferit posibilitatea de a îmi desfășura teza în cadrul Institutului de Biochimie, în Departamentul de Glicoproteine Viral cât și în cadrul proiectului ISEE. Vă mulțumesc pentru încrederea și sprijinul științific și personal acordat, fără de care această teză cât și eu în forma actuală, nu am fi existat. Îi mulțumesc lui Ionuț (Dr. Costin-Ioan Popescu) pentru mentoratul științific, discuțiile aprinse, și poate cel mai important, o ipoteză fără de care această lucrare nu avea un scop.

Apoi, aș dori sa mulțumesc colegilor din departament. Dr. Ana Pantazică care a fost și este un partener de laborator, de discuții cât și o prietenă desăvârșită. Drd. Ștefania Buzățoiu pentru ajutor în derularea experimentelor, Dr. Olivia Dobrică pentru discuțiile care au dus la îmbunătățirea tezei, Dr. Mihaela Uță, Dr. Cătălin Lazăr, Cristina Scurtu și drd. David Patriche pentru ajutorul oferit constant în laborator.

Mulțumesc tuturor colegilor din institut, în special Dr. Laurențiu Spiridon și drd. Teodor Șulea pentru proiectarea antigenelor, Dr. Cristian Munteanu pentru conceptualizarea experimentelor de determinare a punților de cisteină și doamnei tehnician Emilia Ardelean pentru ajutorul și grija constantă.

Mulțumesc colegilor care mi-au devenit prieteni în acești 5 ani, care m-au susținut și suportat constant și necondiționat. Printre cei menționați mai sus doresc sa le mulțumesc și drd. Cristiana Triță, drd. Cosmin Trif, drd. Andreea Anghel cât și lui Dr. Sorin Tunaru, o echipă de cercetători cât și prieteni geniali.

Totodată doresc să mulțumesc colaboratorilor din cadrul proiectului, în special lui Dr. Ralph Bock și Dr. Alexander Hammel pentru expresia în microalge și colaborare. Mulțumesc colaboratorilor Dr. Crina Stăvaru, Dr. Adrian Onu, Drd. Cătălin Țucureanu, Dr. Iuliana Caraș, Irina Ionescu, Dr. Adriana Costache de la Institutul Național de Cercetare Cantacuzino, pentru realizarea studiilor de imunizare și colaborare.

Cel mai important, doresc să mulțumesc familiei mele și prietenilor. Mulțumesc mamei mele Lavinia pentru încrederea și sprijinul oferit în acești ani, cât și pentru ca m-a motivat să aleg acest drum. Mulțumesc prietenelor mele dragi, Lorena, Casiana și Teodora pentru toată susținerea oferită.

*Studiile prezentate în teză au fost dezvoltate în cadrul proiectului **EEA-RO-NO-2018- 0078**, “Next generation viral hepatitis B and C vaccine development in plants and algae using advanced biotechnological tools” (SmartVac 2).*

## **Listă lucrări publicate în cadrul temei de doctorat**

1. Hammel, A.\*, **Cucos, L. M.\***, Caras, I., Ionescu, I., Tucureanu, C., Tofan, V., Costache, A., Onu, A., Hoepfner, L., Hippler, M., Neupert, J., Popescu, C. I., Stavaru, C., Branza-Nichita, N., & Bock, R. (2024). The red alga *Porphyridium* as a host for molecular farming: Efficient production of immunologically active hepatitis C virus glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(24), e2400145121. <https://doi.org/10.1073/pnas.2400145121> **IF 12.779, AIS 4.48, Q1**
2. Pantazica, A. M.\*, **Cucos, L. M.\***, Stavaru, C., Clarke, J. L., & Branza-Nichita, N. (2021). Challenges and Prospects of Plant-Derived Oral Vaccines against Hepatitis B and C Viruses. *Plants* (Basel, Switzerland), 10(10), 2037. <https://doi.org/10.3390/plants10102037> **IF 4.658, AIS 0.654, Q1**
3. Popescu, C. C.\*, Stoian, M. C.\*, **Cucos, L. M.\***, Coman, A. G., Radoi, A., Paun, A., Hădade, N. D., Gautier, A., Popescu, C. I., & Matache, M. (2020). A polycarboxylic chelating ligand for efficient resin purification of His-tagged proteins expressed in mammalian systems. *RSC advances*, 10(40), 23931–23935. <https://doi.org/10.1039/d0ra02382e>. **IF 3.9, AIS 0.678 , Q2**

\* co-prim autor, contribuție egală

## Bibliografie

- Acton, S., Rigotti, A., Landschulz, K. T., Xu, S., Hobbs, H. H., & Kriegert, M. (1996). Identification of scavenger receptor SR-BI as a high density lipoprotein receptor. *Science (New York, N.Y.)*, 271(5248), 518–520. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.271.5248.518>
- Alvisi, G., Madan, V., & Bartenschlager, R. (2011). Hepatitis c virus and host cell lipids: An intimate connection. *RNA Biology*, 8(2), 258–269. <https://doi.org/10.4161/RNA.8.2.15011>
- Augestad, E. H., Castelli, M., Clementi, N., Ströh, L. J., Krey, T., Burioni, R., Mancini, N., Bukh, J., & Prentoe, J. (2020). Global and local envelope protein dynamics of hepatitis C virus determine broad antibody sensitivity. *Science Advances*, 6(35), eabb5938. <https://doi.org/10.1126/sciadv.abb5938>
- Bankwitz, D., Steinmann, E., Bitzegeio, J., Ciesek, S., Friesland, M., Herrmann, E., Zeisel, M. B., Baumert, T. F., Keck, Z., Fong, S. K. H., Pécheur, E.-I., & Pietschmann, T. (2010). Hepatitis C Virus Hypervariable Region 1 Modulates Receptor Interactions, Conceals the CD81 Binding Site, and Protects Conserved Neutralizing Epitopes. *Journal of Virology*, 84(11), 5751. <https://doi.org/10.1128/JVI.02200-09>
- Barbosa, M. J., Janssen, M., Südfeld, C., D’Adamo, S., & Wijffels, R. H. (2023a). Hypes, hopes, and the way forward for microalgal biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 41(3), 452–471. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2022.12.017>
- Barbosa, M. J., Janssen, M., Südfeld, C., D’Adamo, S., & Wijffels, R. H. (2023b). Hypes, hopes, and the way forward for microalgal biotechnology. *Trends in Biotechnology*, 41(3), 452–471. <https://doi.org/10.1016/J.TIBTECH.2022.12.017>
- Barth, H., Schäfer, C., Adah, M. I., Zhang, F., Linhardt, R. J., Toyoda, H., Kinoshita-Toyoda, A., Toida, T., Van Kuppevelt, T. H., Depla, E., Von Weizsäcker, F., Blum, H. E., & Baumert, T. F. (2003). Cellular binding of hepatitis C virus envelope glycoprotein E2 requires cell surface heparan sulfate. *The Journal of Biological Chemistry*, 278(42), 41003–41012. <https://doi.org/10.1074/JBC.M302267200>
- Brown, E. A., Zhang, H., Ping, L. hua, & Lemon, S. M. (1992). Secondary structure of the 5’ nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Research*, 20(19), 5041–5045. <https://doi.org/10.1093/NAR/20.19.5041>
- Cocquerel, L., Wychowski, C., Minner, F., Penin, F., & Dubuisson, J. (2000). 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. *Journal of Virology*, 74(8), 3623–3633. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.8.3623-3633.2000>
- de la Peña, A. T., Sliepen, K., Eshun-Wilson, L., Newby, M. L., Allen, J. D., Zon, I., Koekkoek, S., Chumbe, A., Crispin, M., Schinkel, J., Lander, G. C., Sanders, R. W., & Ward, A. B. (2022). Structure of the hepatitis C virus E1E2 glycoprotein complex. *Science*, 378(6617), 263–269. <https://doi.org/10.1126/science.abn9884>
- Dobrica, M. O., van Eerde, A., Tucureanu, C., Onu, A., Paruch, L., Caras, I., Vlase, E., Steen, H., Haugslie, S., Alonzi, D., Zitzmann, N., Bock, R., Dubuisson, J., Popescu, C. I., Stavaru, C., Liu Clarke, J., & Branza-Nichita, N. (2021). Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein produced in *Nicotiana benthamiana* triggers humoral response with virus-neutralizing activity in vaccinated mice. *Plant Biotechnology Journal*, 19(10), 2027. <https://doi.org/10.1111/PBI.13631>

- Dowd, K. A., & Pierson, T. C. (2018). The Many Faces of a Dynamic Virion: Implications of Viral Breathing on Flavivirus Biology and Immunogenicity. *Annual Review of Virology*, 5(1), 185–207. <https://doi.org/10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-092917-043300>
- Egger, D., Wölk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H. E., Moradpour, D., & Bienz, K. (2002). Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *Journal of Virology*, 76(12), 5974–5984. <https://doi.org/10.1128/JVI.76.12.5974-5984.2002>
- El Omari, K., Iourin, O., Kadlec, J., Sutton, G., Harlos, K., Grimes, J. M., & Stuart, D. I. (2014). Unexpected structure for the N-terminal domain of hepatitis C virus envelope glycoprotein E1. *Nature Communications 2014 5:1*, 5(1), 1–5. <https://doi.org/10.1038/ncomms5874>
- Flint, M., Hahn, T. von, Zhang, J., Farquhar, M., Jones, C. T., Balfe, P., Rice, C. M., & McKeating, J. A. (2006). Diverse CD81 Proteins Support Hepatitis C Virus Infection. *Journal of Virology*, 80(22), 11331. <https://doi.org/10.1128/JVI.00104-06>
- Flyak, A. I., Ruiz, S., Colbert, M. D., Luong, T., Crowe, J. E., Bailey, J. R., & Bjorkman, P. J. (2018). HCV Broadly Neutralizing Antibodies Use a CDRH3 Disulfide Motif to Recognize an E2 Glycoprotein Site that Can Be Targeted for Vaccine Design. *Cell Host & Microbe*, 24(5), 703-716.e3. <https://doi.org/10.1016/J.CHOM.2018.10.009>
- Flyak, A. I., Ruiz, S. E., Salas, J., Rho, S., Bailey, J. R., & Bjorkman, P. J. (2020). An ultralong CDRH2 in HCV neutralizing antibody demonstrates structural plasticity of antibodies against E2 glycoprotein. *ELife*, 9. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.53169>
- Geng, D., Wang, Y., Wang, P., Li, W., & Sun, Y. (2003). Stable expression of hepatitis B surface antigen gene in *Dunaliella salina* (Chlorophyta). *Journal of Applied Phycology*, 15(6), 451–456. <https://doi.org/10.1023/B:JAPH.0000004298.89183.e5>
- Goffard, A., & Dubuisson, J. (2003). Glycosylation of hepatitis C virus envelope proteins. *Biochimie*, 85(3–4), 295–301. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(03\)00004-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(03)00004-X)
- Gosert, R., Egger, D., Lohmann, V., Bartenschlager, R., Blum, H. E., Bienz, K., & Moradpour, D. (2003). Identification of the hepatitis C virus RNA replication complex in Huh-7 cells harboring subgenomic replicons. *Journal of Virology*, 77(9), 5487–5492. <https://doi.org/10.1128/JVI.77.9.5487-5492.2003>
- Gu, J., Hardy, J., Boo, I., Vietheer, P., McCaffrey, K., Alhammad, Y., Chopra, A., Gaudieri, S., Pountourios, P., Coulibaly, F., & Drummer, H. E. (2018). Escape of Hepatitis C Virus from Epitope I Neutralization Increases Sensitivity of Other Neutralization Epitopes. *Journal of Virology*, 92(9), 2066–2083. <https://doi.org/10.1128/JVI.02066-17>
- Hammel, A., Cucos, L. M., Caras, I., Ionescu, I., Tucureanu, C., Tofan, V., Costache, A., Onu, A., Hoepfner, L., Hippler, M., Neupert, J., Popescu, C. I., Stavaru, C., Branza-Nichita, N., & Bock, R. (2024). The red alga *Porphyridium* as a host for molecular farming: Efficient production of immunologically active hepatitis C virus glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 121(24), e2400145121. [https://doi.org/10.1073/PNAS.2400145121/SUPPL\\_FILE/PNAS.2400145121.SD01.TXT](https://doi.org/10.1073/PNAS.2400145121/SUPPL_FILE/PNAS.2400145121.SD01.TXT)
- Hammel, A., Neupert, J., & Bock, R. (2024). Optimized transgene expression in the red alga *Porphyridium purpureum* and efficient recombinant protein secretion into the culture medium. *Plant Molecular Biology*, 114(1). <https://doi.org/10.1007/S11103-024-01415-2>
- Harris, H. J., Farquhar, M. J., Mee, C. J., Davis, C., Reynolds, G. M., Jennings, A., Hu, K., Yuan, F., Deng, H., Hubscher, S. G., Han, J. H., Balfe, P., & McKeating, J. A. (2008). CD81 and claudin 1 coreceptor association: role in hepatitis C virus entry. *Journal of Virology*, 82(10), 5007–5020. <https://doi.org/10.1128/JVI.02286-07>

- Helle, F., Vieyres, G., Elkrief, L., Popescu, C.-I., Wychowski, C., Descamps, V., Castelain, S., Roingeard, P., Duverlie, G., & Dubuisson, J. (2010). Role of N-Linked Glycans in the Functions of Hepatitis C Virus Envelope Proteins Incorporated into Infectious Virions. *Journal of Virology*, *84*(22), 11905. <https://doi.org/10.1128/JVI.01548-10>
- Howe, A. Y. M., Rodrigo, C., Cunningham, E. B., Douglas, M. W., Dietz, J., Grebely, J., Popping, S., Sfalcin, J. A., Parczewski, M., Sarrazin, C., de Salazar, A., Fuentes, A., Sayan, M., Quer, J., Kjellin, M., Kileng, H., Mor, O., Lennerstrand, J., Fourati, S., ... Figueruela, B. (2022). Characteristics of hepatitis C virus resistance in an international cohort after a decade of direct-acting antivirals. *JHEP Reports*, *4*(5), 100462. <https://doi.org/10.1016/J.JHEPR.2022.100462>
- Huang, H., Sun, F., Owen, D. M., Li, W., Chen, Y., Gale, M., & Ye, J. (2007). Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *104*(14), 5848–5853. <https://doi.org/10.1073/PNAS.0700760104>
- Keck, Z.-Y., Sung, V. M. H., Perkins, S., Rowe, J., Paul, S., Liang, T. J., Lai, M. M. C., & Fong, S. K. H. (2004). Human Monoclonal Antibody to Hepatitis C Virus E1 Glycoprotein That Blocks Virus Attachment and Viral Infectivity. *Journal of Virology*, *78*(13), 7257. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.13.7257-7263.2004>
- Khan, A. G., Whidby, J., Miller, M. T., Scarborough, H., Zatorski, A. V., Cygan, A., Price, A. A., Yost, S. A., Bohannon, C. D., Jacob, J., Grakoui, A., & Marcotrigiano, J. (2014a). Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature*, *509*(7500), 381–384. <https://doi.org/10.1038/NATURE13117>
- Khan, A. G., Whidby, J., Miller, M. T., Scarborough, H., Zatorski, A. V., Cygan, A., Price, A. A., Yost, S. A., Bohannon, C. D., Jacob, J., Grakoui, A., & Marcotrigiano, J. (2014b). Structure of the core ectodomain of the hepatitis C virus envelope glycoprotein 2. *Nature*, *509*(7500), 381–384. <https://doi.org/10.1038/NATURE13117>
- Kim, C. W., & Chang, K. M. (2013). Hepatitis C virus: virology and life cycle. *Clinical and Molecular Hepatology*, *19*(1), 17. <https://doi.org/10.3350/CMH.2013.19.1.17>
- Kong, L., Giang, E., Nieuwsma, T., Kadam, R. U., Cogburn, K. E., Hua, Y., Dai, X., Stanfield, R. L., Burton, D. R., Ward, A. B., Wilson, I. A., & Law, M. (2013). Hepatitis C virus E2 envelope glycoprotein core structure. *Science (New York, N.Y.)*, *342*(6162), 1090–1094. <https://doi.org/10.1126/SCIENCE.1243876>
- Kong, L., Giang, E., Nieuwsma, T., Robbins, J. B., Deller, M. C., Stanfield, R. L., Wilson, I. A., & Law, M. (2012). Structure of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E2 Antigenic Site 412 to 423 in Complex with Antibody AP33. *Journal of Virology*, *86*(23), 13085. <https://doi.org/10.1128/JVI.01939-12>
- Kong, L., Giang, E., Robbins, J. B., Stanfield, R. L., Burton, D. R., Wilson, I. A., & Law, M. (2012). Structural basis of hepatitis C virus neutralization by broadly neutralizing antibody HCV1. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(24), 9499–9504. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1202924109/-/DCSUPPLEMENTAL/PNAS.201202924SI.PDF>
- Kong, L., Kadam, R. U., Giang, E., Ruwona, T. B., Nieuwsma, T., Culhane, J. C., Stanfield, R. L., Dawson, P. E., Wilson, I. A., & Law, M. (2015). Structure of Hepatitis C Virus Envelope Glycoprotein E1 Antigenic Site 314-324 in Complex with Antibody IGH526. *Journal of Molecular Biology*, *427*(16), 2617–2628. <https://doi.org/10.1016/J.JMB.2015.06.012>
- Kong, L., Lee, D. E., Kadam, R. U., Liu, T., Giang, E., Nieuwsma, T., Garces, F., Tzarum, N., Woods, V. L., Ward, A. B., Li, S., Wilson, I. A., & Law, M. (2016). Structural flexibility at a major conserved antibody target on Hepatitis C virus E2 antigen.

*Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(45), 12768–12773. <https://doi.org/10.1073/PNAS.1609780113/-/DCSUPPLEMENTAL>

- Krey, T., D'Alayer, J., Kikuti, C. M., Saulnier, A., Damier-Piolle, L., Petitpas, I., Johansson, D. X., Tawar, R. G., Baron, B., Robert, B., England, P., Persson, M. A. A., Martin, A., & Rey, F. A. (2010). The disulfide bonds in glycoprotein E2 of hepatitis C virus reveal the tertiary organization of the molecule. *PLoS Pathogens*, 6(2). <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1000762>
- Kumar, A., Rohe, T. C., Elrod, E. J., Khan, A. G., Dearborn, A. D., Kissinger, R., Grakoui, A., & Marcotrigiano, J. (2023). Regions of hepatitis C virus E2 required for membrane association. *Nature Communications*, 14(1). <https://doi.org/10.1038/S41467-023-36183-Y>
- Lavie, M., Hanouille, X., & Dubuisson, J. (2018). Glycan shielding and modulation of hepatitis C virus neutralizing antibodies. *Frontiers in Immunology*, 9(APR). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.00910>
- Legastelois, I., Buffin, S., Peubez, I., Mignon, C., Sodoyer, R., & Werle, B. (2017). Non-conventional expression systems for the production of vaccine proteins and immunotherapeutic molecules. *Human Vaccines & Immunotherapeutics*, 13(4), 947–961. <https://doi.org/10.1080/21645515.2016.1260795>
- Li, Y., & Modis, Y. (2014). A novel membrane fusion protein family in Flaviviridae? *Trends in Microbiology*, 22(4), 176–182. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2014.01.008>
- Li, Y., Pierce, B. G., Wang, Q., Keck, Z. Y., Fuerst, T. R., Fong, S. K. H., & Mariuzza, R. A. (2015). Structural Basis for Penetration of the Glycan Shield of Hepatitis C Virus E2 Glycoprotein by a Broadly Neutralizing Human Antibody. *The Journal of Biological Chemistry*, 290(16), 10117. <https://doi.org/10.1074/JBC.M115.643528>
- Lindh, I., Bråve, A., Hallengård, D., Hadad, R., Kalbina, I., Strid, Å., & Andersson, S. (2014). Oral delivery of plant-derived HIV-1 p24 antigen in low doses shows a superior priming effect in mice compared to high doses. *Vaccine*, 32(20), 2288–2293. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2014.02.073>
- Mathieu-Rivet, E., Mati-Baouche, N., Walet-Balieu, M. L., Lerouge, P., & Bardor, M. (2020). N- and O-Glycosylation Pathways in the Microalgae Polyphyletic Group. *Frontiers in Plant Science*, 11. <https://doi.org/10.3389/FPLS.2020.609993>
- Meredith, L. W., Wilson, G. K., Fletcher, N. F., & McKeating, J. A. (2012). Hepatitis C virus entry: beyond receptors. *Reviews in Medical Virology*, 22(3), 182–193. <https://doi.org/10.1002/RMV.723>
- Merz, A., Long, G., Hiet, M. S., Brügger, B., Chlanda, P., Andre, P., Wieland, F., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2011). Biochemical and Morphological Properties of Hepatitis C Virus Particles and Determination of Their Lipidome. *The Journal of Biological Chemistry*, 286(4), 3018. <https://doi.org/10.1074/JBC.M110.175018>
- Metcalf, M. C., Janus, B. M., Yin, R., Wang, R., Guest, J. D., Pozharski, E., Law, M., Mariuzza, R. A., Toth, E. A., Pierce, B. G., Fuerst, T. R., & Ofek, G. (2023). Structure of engineered hepatitis C virus E1E2 ectodomain in complex with neutralizing antibodies. *Nature Communications* 2023 14:1, 14(1), 1–14. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-39659-z>
- Meunier, J.-C., Russell, R. S., Goossens, V., Priem, S., Walter, H., Depla, E., Union, A., Faulk, K. N., Bukh, J., Emerson, S. U., & Purcell, R. H. (2008). Isolation and Characterization of Broadly Neutralizing Human Monoclonal Antibodies to the E1 Glycoprotein of Hepatitis C Virus. *Journal of Virology*, 82(2), 966. <https://doi.org/10.1128/JVI.01872-07>

- Micallef, J. M., Kaldor, J. M., & Dore, G. J. (2006). Spontaneous viral clearance following acute hepatitis C infection: a systematic review of longitudinal studies. *Journal of Viral Hepatitis*, *13*(1), 34–41. <https://doi.org/10.1111/J.1365-2893.2005.00651.X>
- Michalak, J. P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J. C., Ung, S., Rice, C. M., & Dubuisson, J. (1997). Characterization of truncated forms of hepatitis C virus glycoproteins. *The Journal of General Virology*, *78* ( Pt 9)(9), 2299–2306. <https://doi.org/10.1099/0022-1317-78-9-2299>
- Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M., & Shimotohno, K. (2007). The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nature Cell Biology*, *9*(9), 1089–1097. <https://doi.org/10.1038/NCB1631>
- Obaid, A., Naz, A., Ikram, A., Awan, F. M., Raza, A., Ahmad, J., & Ali, A. (2018). Model of the adaptive immune response system against HCV infection reveals potential immunomodulatory agents for combination therapy. *Scientific Reports* *2018* *8*:1, *8*(1), 1–19. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-27163-0>
- Osburn, W. O., Snider, A. E., Wells, B. L., Latanich, R., Bailey, J. R., Thomas, D. L., Cox, A. L., & Ray, S. C. (2014). Clearance of hepatitis C infection is associated with the early appearance of broad neutralizing antibody responses. *Hepatology (Baltimore, Md.)*, *59*(6), 2140–2151. <https://doi.org/10.1002/HEP.27013>
- Owsianka, A. M., Timms, J. M., Tarr, A. W., Brown, R. J. P., Hickling, T. P., Szwejk, A., Bienkowska-Szewczyk, K., Thomson, B. J., Patel, A. H., & Ball, J. K. (2006). Identification of Conserved Residues in the E2 Envelope Glycoprotein of the Hepatitis C Virus That Are Critical for CD81 Binding. *Journal of Virology*, *80*(17), 8695. <https://doi.org/10.1128/JVI.00271-06>
- Pantazica, A. M., van Eerde, A., Dobrica, M. O., Caras, I., Ionescu, I., Costache, A., Tuceanu, C., Steen, H., Lazar, C., Heldal, I., Haugslie, S., Onu, A., Stavaru, C., Branza-Nichita, N., & Liu Clarke, J. (2023). The “humanized” N-glycosylation pathway in CRISPR/Cas9-edited *Nicotiana benthamiana* significantly enhances the immunogenicity of a S/preS1 Hepatitis B Virus antigen and the virus-neutralizing antibody response in vaccinated mice. *Plant Biotechnology Journal*, *21*(6), 1176–1190. <https://doi.org/10.1111/PBI.14028>
- Patel, J., Patel, A. H., & McLauchlan, J. (2001). The transmembrane domain of the hepatitis C virus E2 glycoprotein is required for correct folding of the E1 glycoprotein and native complex formation. *Virology*, *279*(1), 58–68. <https://doi.org/10.1006/VIRO.2000.0693>
- Plotkin, S., Robinson, J. M., Cunningham, G., Iqbal, R., & Larsen, S. (2017). The complexity and cost of vaccine manufacturing - An overview. *Vaccine*, *35*(33), 4064–4071. <https://doi.org/10.1016/J.VACCINE.2017.06.003>
- Popescu, C.-I., & Dubuisson, J. (2010). Role of lipid metabolism in hepatitis C virus assembly and entry. *Biology of the Cell*, *102*(1), 63–74. <https://doi.org/10.1042/BC20090125>
- Potter, J. A., Owsianka, A. M., Jeffery, N., Matthews, D. J., Keck, Z.-Y., Lau, P., Fong, S. K. H., Taylor, G. L., & Patel, A. H. (2012). Toward a Hepatitis C Virus Vaccine: the Structural Basis of Hepatitis C Virus Neutralization by AP33, a Broadly Neutralizing Antibody. *Journal of Virology*, *86*(23), 12923. <https://doi.org/10.1128/JVI.02052-12>
- Prentoe, J., Velázquez-Moctezuma, R., Augestad, E. H., Galli, A., Wang, R., Law, M., Alter, H., & Bukh, J. (2019). Hypervariable region 1 and N-linked glycans of hepatitis C regulate virion neutralization by modulating envelope conformations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *116*(20), 10039–10047. [https://doi.org/10.1073/PNAS.1822002116/SUPPL\\_FILE/PNAS.1822002116.SAPP.PDF](https://doi.org/10.1073/PNAS.1822002116/SUPPL_FILE/PNAS.1822002116.SAPP.PDF)



- Romero-Brey, I., Merz, A., Chiramel, A., Lee, J. Y., Chlanda, P., Haselman, U., Santarella-Mellwig, R., Habermann, A., Hoppe, S., Kallis, S., Walther, P., Antony, C., Krijnse-Locker, J., & Bartenschlager, R. (2012). Three-Dimensional Architecture and Biogenesis of Membrane Structures Associated with Hepatitis C Virus Replication. *PLOS Pathogens*, 8(12), e1003056. <https://doi.org/10.1371/JOURNAL.PPAT.1003056>
- Rosales-Mendoza, S. (2020). Will plant-made biopharmaceuticals play a role in the fight against COVID-19? *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(6), 545–548. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1752177>
- Rosales-Mendoza, S., Solís-Andrade, K. I., Márquez-Escobar, V. A., González-Ortega, O., & Bañuelos-Hernandez, B. (2020). Current advances in the algae-made biopharmaceuticals field. *Expert Opinion on Biological Therapy*, 20(7), 751–766. <https://doi.org/10.1080/14712598.2020.1739643>
- Sabo, M. C., Luca, V. C., Ray, S. C., Bukh, J., Fremont, D. H., & Diamond, M. S. (2012). Hepatitis C virus epitope exposure and neutralization by antibodies is affected by time and temperature. *Virology*, 422(2), 174–184. <https://doi.org/10.1016/J.VIROL.2011.10.023>
- Sanduzzi-Zamparelli, M., Boix, L., Leal, C., & Reig, M. (2019). Hepatocellular Carcinoma Recurrence in HCV Patients Treated with Direct Antiviral Agents. *Viruses*, 11(5). <https://doi.org/10.3390/V11050406>
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., & Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *The EMBO Journal*, 21(19), 5017–5025. <https://doi.org/10.1093/EMBOJ/CDF529>
- Ströh, L. J., & Krey, T. (2020). HCV glycoprotein structure and implications for b-cell vaccine development. *International Journal of Molecular Sciences*, 21(18), 1–20. <https://doi.org/10.3390/ijms21186781>
- Suzuki, T., & Suzuki, R. (2016). Role of Nonstructural Proteins in HCV Replication. *Hepatitis C Virus I: Cellular and Molecular Virology*, 129–148. [https://doi.org/10.1007/978-4-431-56098-2\\_7](https://doi.org/10.1007/978-4-431-56098-2_7)
- Tacket, C. O. (2009). Plant-based oral vaccines: results of human trials. *Current Topics in Microbiology and Immunology*, 332, 103–117. [https://doi.org/10.1007/978-3-540-70868-1\\_6](https://doi.org/10.1007/978-3-540-70868-1_6)
- Targett-Adams, P., Hope, G., Boulant, S., & McLauchlan, J. (2008). Maturation of hepatitis C virus core protein by signal peptide peptidase is required for virus production. *The Journal of Biological Chemistry*, 283(24), 16850–16859. <https://doi.org/10.1074/JBC.M802273200>
- Tzarum, N., Giang, E., Kadam, R. U., Chen, F., Nagy, K., Augestad, E. H., Velázquez-Moctezuma, R., Keck, Z. Y., Hua, Y., Stanfield, R. L., Dreux, M., Prentoe, J., Fong, S. K. H., Bukh, J., Wilson, I. A., & Law, M. (2020). An alternate conformation of HCV E2 neutralizing face as an additional vaccine target. *Science Advances*, 6(30). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.ABB5642>
- Tzarum, N., Giang, E., Kong, L., He, L., Prentoe, J., Augestad, E., Hua, Y., Castillo, S., Lauer, G. M., Bukh, J., Zhu, J., Wilson, I. A., & Law, M. (2019). Genetic and structural insights into broad neutralization of hepatitis C virus by human VH1-69 antibodies. *Science Advances*, 5(1). <https://doi.org/10.1126/SCIADV.AAV1882>
- Tzarum, N., Wilson, I. A., & Law, M. (2018). The Neutralizing Face of Hepatitis C Virus E2 Envelope Glycoprotein. *Frontiers in Immunology*, 9(JUN). <https://doi.org/10.3389/FIMMU.2018.01315>

- Vidor, E., & Soubeyrand, B. (2016). Manufacturing DTaP-based combination vaccines: industrial challenges around essential public health tools. *Expert Review of Vaccines*, *15*(12), 1575–1582. <https://doi.org/10.1080/14760584.2016.1205492>
- Vieyres, G., & Pietschmann, T. (2019). HCV Pit Stop at the Lipid Droplet: Refuel Lipids and Put on a Lipoprotein Coat before Exit. *Cells*, *8*(3). <https://doi.org/10.3390/CELLS8030233>
- Waheed, M. T., Sameeullah, M., Khan, F. A., Syed, T., Ilahi, M., Gottschamel, J., & Lössl, A. G. (2016). Need of cost-effective vaccines in developing countries: What plant biotechnology can offer? *SpringerPlus*, *5*(1), 1–9. <https://doi.org/10.1186/S40064-016-1713-8>
- Walker, C. M., & Grakoui, A. (2015). Hepatitis C virus: Why do we need a vaccine to prevent a curable persistent infection? In *Current Opinion in Immunology* (Vol. 35, pp. 137–143). Elsevier Ltd. <https://doi.org/10.1016/j.coi.2015.06.010>
- Wang, C., Le, S. Y., Ali, N., & Siddiqui, A. (1995). An RNA pseudoknot is an essential structural element of the internal ribosome entry site located within the hepatitis C virus 5' noncoding region. *RNA*, *1*(5), 526. [/pmc/articles/PMC1482419/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/1482419/)
- Waye, A., Jacobs, P., & Schryvers, A. B. (2013). Vaccine development costs: a review. *Expert Review of Vaccines*, *12*(12), 1495–1501. <https://doi.org/10.1586/14760584.2013.850035>
- Weber, T., Potthoff, J., Bizu, S., Labuhn, M., Dold, L., Schoofs, T., Horning, M., Ercanoglu, M. S., Kreer, C., Gieselmann, L., Vanshylla, K., Langhans, B., Janicki, H., Ströh, L. J., Knops, E., Nierhoff, D., Spengler, U., Kaiser, R., Bjorkman, P. J., ... Klein, F. (2022). Analysis of antibodies from HCV elite neutralizers identifies genetic determinants of broad neutralization. *Immunity*, *55*(2), 341-354.e7. <https://doi.org/10.1016/J.IMMUNI.2021.12.003>
- Yechezkel, I., Law, M., & Tzarum, N. (2021). From structural studies to hcv vaccine design. *Viruses*, *13*(5). <https://doi.org/10.3390/v13050833>