
EXPRESIÓN DE LA PROTEÍNA VERDE FLUORESCENTE Y DE LA PROTEÍNA CORE DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C EN LA LÍNEA DE HEPATOMA HepG2 MEDIANTE EL SISTEMA DE EXPRESIÓN DEL SEMLIKI FOREST VIRUS

EXPRESSION OF THE GREEN FLUORESCENT PROTEIN AND THE HEPATITIS C VIRUS CORE PROTEIN IN THE HUMAN HEPATOMA CELL LINE HepG2 USING SEMLIKI FOREST VIRUS EXPRESSION SYSTEM

Luis Felipe Henao¹, Jesús Orlando Yepes¹, Claudia Marcela Álvarez¹, Norman Balcázar², María-Cristina Navas^{1,3}

Resumen

Se utilizó un vector replicón del SFV (Semliki Forest Virus) que codifica la proteína verde fluorescente (GFP) para determinar la eficiencia de este sistema de expresión en la línea celular HepG2. La transcripción *in vitro* de los plásmidos pSFV1-GFP y pSFV-helper se efectuó usando un estuche comercial. Se llevó a cabo la transducción de células HepG2 con las partículas virales recombinantes (rSFV1-GFP). Un alto nivel de expresión de GFP se detectó por citometría de flujo en células HepG2, hasta 96 horas postransducción (h. p. t.), con un nivel máximo 48 h. p. t. Se observó un efecto citopático moderado en las células HepG2 hasta 72 h. p. t. La validación del sistema de expresión en la línea HepG2 con la proteína reportera GFP, justificó la continuación de los ensayos con la proteína Core del virus de la Hepatitis C (VHC). En células HepG2 transducidas con rSFV1-Core se demostró la expresión de la proteína viral entre 24 y 96 h. p. t., aunque en menor nivel que la proteína reportera. Se observó un efecto citopático marcado 24 h. p. t. Estos resultados indican que el sistema de expresión basado en el SFV, puede ser una herramienta útil para la expresión transitoria de proteínas heterólogas, como la proteína Core, en líneas celulares hepáticas, estableciendo así un modelo de estudio de la patogénesis del VHC.

Palabras clave: Semliki Forest Virus, vector viral, sistema de expresión, proteína heteróloga, partículas recombinantes, HepG2.

Abstract

A SFV replicon vector encoding the enhanced green fluorescent protein (GFP) was used to determine the kinetics of expression of the reporter gene GFP in the liver cell line HepG2. *In vitro* transcription of the pSFV1-GFP and pSFV-helper plasmids was performed using a commercial kit. Transduction of HepG2 cells with recombinant viral particles (rSFV1-GFP) was performed. Expression of GFP was detected by flow cytometry in rSFV-transduced HepG2 cells. The protein was expressed to high levels with maximum expression 48 hours postransduction (h. p. t.) and was detected up to 96 h. p. t. There was a low cytopathic effect in HepG2 cells at 72 h. p. t. Confirmation of expression of the reporter protein in HepG2 cells using the SFV expression system justified pursuing assays with the Hepatitis C virus (HCV) Core protein. Viral protein expression was demonstrated in rSFV1-Core-transduced HepG2 cells between 24 and 96 h. p. t., although to lower levels than the reporter protein. A marked cytopathic effect was observed 24 h. p. t. These results indicate that the SFV-based expression system can be a useful tool for transient heterologous protein expression such as the HCV Core in hepatic cell lines, therefore establishing a model for studying HCV pathogenesis.

Key words: Semliki Forest Virus, viral vector, expression system, heterologous protein, recombinant particles, HepG2.

INTRODUCCIÓN

Recibido: noviembre de 2003; aprobado para publicación: abril de 2004.

¹ Grupo de Gastrohepatología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

² Grupo de Inmunovirología, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia.

³ Autor para correspondencia: macrisnavas@medicina.udea.edu.co, Facultad de Medicina, Universidad de Antioquia. A. A. 1226, Medellín, Colombia.

Los vectores virales tienen múltiples aplicaciones en el campo de la biología molecular, en estudios estructurales, en terapia génica, en producción de vacunas y en el desarrollo de drogas (Lundstrom *et al.*, 1999).

Entre estos vectores se encuentra el Semliki Forest Virus (SFV), que pertenece a la familia *Togaviridae*, género *Alfavirus*. Su amplio rango de hospederos y su capacidad para producir un alto nivel de proteínas, incluyendo la proteína heteróloga, hacen del SFV un vector muy eficiente para la expresión transitoria de proteínas (Lundstrom *et al.*, 1999, 2001). Además, este virus infecta eficientemente diversas líneas celulares de mamíferos (Ehrengruber *et al.*, 1999; Liljeström y Garoff, 1991; Lundstrom *et al.*, 1999; Zhang *et al.*, 1997).

El sistema de expresión del SFV utiliza dos plásmidos, subclonados a partir del ácido desoxirribonucleico copia (ADNc) del genoma del SFV. El primero es el vector replicón, pSFV1-3, que tiene un gen heterólogo que reemplaza la secuencia que codifica las proteínas estructurales virales, pero conserva el promotor subgenómico 26S, el cual permite alta expresión de la proteína heteróloga. Para la producción de las partículas recombinantes, se transcribe el vector replicón a ácido ribonucleico (ARN) y luego se contranfecta con el transcrito correspondiente al segundo de los plásmidos, el vector ayudador (pSFV-helper). Este le proporciona al vector replicón las secuencias de las proteínas estructurales en *trans*, aunque carece de la secuencia que codifica las proteínas no estructurales necesarias para la replicación viral. Como resultado, las partículas que se generan contienen un genoma defectuoso (solo contiene el ARN replicón) y aunque son capaces de replicarse, no producen partículas de novo, garantizando la bioseguridad del sistema. Cuando tales partículas recombinantes (partículas suicidas) son usadas para transducir células animales, sólo se expresan el complejo de replicación y la proteína heteróloga (DiCiommo y Bremner, 1998; Liljeström y Garoff, 1991; Schlesinger y Dubensky, 1999).

El desarrollo de sistemas adecuados de expresión de proteínas en células de mamíferos es una herramienta muy importante en el estudio de modelos de infección viral. En el caso de la infección por el virus de la Hepatitis C (VHC), no existe un sistema eficiente de replicación *in vitro*, por lo cual una técnica eficaz de expresión de proteínas de este virus hepatotrópico, es una buena estrategia para el estudio de las propiedades de las proteínas virales en células del ambiente hepático (Bartenschlager y Lohmann, 2000; Fournier *et al.*, 1998; Ito *et al.*, 1996; Lauer y Walker, 2001).

Diversos estudios sugieren que la proteína Core del VHC, además de ser la subunidad estructural de la cápside, modula diferentes procesos, tales como la regulación de la expresión de proteínas, la proliferación celular, la apoptosis mediada por el factor de necrosis tumoral (TNF), el estrés oxidativo e interviene en diversas vías de señalización; p. ej. las de las MAP quinasas y las de factores de transcripción como NF- κ B; además es inmunomoduladora, lo cual podría contribuir al establecimiento de la infección persistente (Erhardt *et al.*, 2002; Langhans *et al.*, 2000; Large *et al.*, 1999; McLauchlan, 2000; Okuda *et al.*, 2002; Ray y Ray, 2001).

La necesidad de sistemas de expresión eficientes, además del hecho de que no existan publicaciones sobre el uso del SFV como vector en la línea celular HepG2, justificaron la realización de este estudio. En él se determinó la eficiencia de la expresión de proteína heteróloga en la línea de hepatoma humano HepG2, usando la proteína verde fluorescente (GFP, por sus siglas en inglés) como proteína reportera, por medio de la transducción con partículas recombinantes del SFV.

MATERIALES Y MÉTODOS

Plásmidos. Se utilizó el sistema de expresión del SFV, descrito por Liljeström y Garoff (1991). Los plásmidos pSFV1 y pSFV-helper fueron donados gentilmente por el doctor Peter Liljeström (Instituto Karolinska, Estocolmo, Suecia). Se utiliza-

ron, además, los plásmidos pSFV1-GFP y pSFV1-Core construidos previamente en el Instituto de Virología, Universidad Louis Pasteur, Francia e Instituto de Virología, Universidad de Zurich, Suiza. El pSFV1-GFP se obtuvo mediante amplificación de una secuencia de 754 bases del plásmido pEGFP (enhanced green fluorescent protein), para clonar posteriormente el producto de amplificación en el sitio *Bam*HI del pSFV1, corriente abajo del promotor viral 26S. El pSFV1-Core se obtuvo mediante amplificación de la secuencia que corresponde al marco de lectura abierta de la proteína Core del VHC (nucleótidos 342-914) del clon infeccioso p90/HCV FL-Long pU (donado gentilmente por el doctor Charles Rice, The Rockefeller University, New York), para clonar posteriormente el producto de amplificación en el sitio *Bam*HI del pSFV1, corriente abajo del promotor viral 26S.

Cultivos celulares. Se cultivaron células BHK-21 y células de hepatoma humano HepG2 en medio RPMI-1640 (Gibco) suplementado con 1% de Penicilina/Estreptomina (ICN), 1% de piruvato (ICN), 1% de L-Glutamina (ICN) y 10% de suero fetal bovino (Gibco). Se cultivaron en frascos estériles de poliestireno (Greiner) a 37 °C y en atmósfera con 5% de CO₂ y humidificada.

Transcripción in vitro. Para la transcripción in vitro se linearizaron los plásmidos por digestión con la enzima *Spe*I (Promega). Se efectuó la síntesis de ARN usando el estuche de transcripción a gran escala mMessage mMachin Sp6 (Ambion Inc), el cual incluye el análogo de Cap, m⁷G(5')ppp(5')G, previo tratamiento con proteinasa K y SDS para la eliminación de RNasas.

Obtención de partículas virales. Se cotransfectaron por electroporación células BHK-21 con los ARN mensajeros (ARNm) sintetizados (SFV1-GFP y SFV-helper o SFV1-Core y SFV-helper) en proporción 1:1 (v/v) (Genepulser II, BioRad), según se describió previamente (Liljeström y Garoff, 1993). Las células cotransfectadas se cultivaron en cajas de petri con medio suplementado y se recogió el sobrenadante del cultivo 36 horas después.

Titulación. Para determinar el título de virus recombinantes SFV1-GFP (rSFV1-GFP), se realizó un ensayo de transducción en monocapas de células BHK-21 (1 x 10⁶) por incubación con diferentes diluciones (desde 10⁰ hasta 10⁻⁴) del sobrenadante del cultivo transfectado a 37 °C por 24 horas; pasado este tiempo, las células se digirieron con tripsina al 0,05% y luego se fijaron con 150 µL de paraformaldehído al 0,5%. El porcentaje de células fluorescentes se evaluó en un citómetro de flujo. Para determinar el título de virus recombinantes SFV1-Core (rSFV1-Core), se procedió según lo descrito anteriormente; las monocapas se fijaron con paraformaldehído al 3%, y se permeabilizaron con triton X-100 al 0,5%. Se incubaron con el anticuerpo monoclonal humano anti Core B12.F8 (donado por el doctor Mario Mondelli, Universidad de Pavia, Italia) y con un segundo anticuerpo anti IgG humana marcado con fluoresceína isotiocianato (FITC) (Sigma). La detección de la proteína Core en las células transducidas se hizo por microscopía de fluorescencia utilizando el filtro B-2A de un microscopio epifluorescente (Nikon). El título viral se calculó mediante la dosis infecciosa 50 en cultivo tisular (TCID₅₀) por el método de Reed-Münch (Reed y Münch, 1938).

Expresión de GFP en HepG2. Se realizó un ensayo de transducción de monocapas de células HepG2 (1 x 10⁶) con la dilución correspondiente al TCID₅₀ de rSFV1-GFP, para lo cual se hicieron crecer las células en laminillas. La expresión de GFP se analizó por citometría de flujo, según el protocolo descrito anteriormente. Se detectó la expresión de GFP en las células BHK-21, 24 horas posttransducción (h. p. t.), por microscopía de epifluorescencia, previa fijación con acetona al 20% por 10 min.

Expresión de la proteína Core en HepG2. Se transdujeron monocapas de células HepG2 con la dilución correspondiente al TCID₅₀ de rSFV1-Core. La expresión de la proteína heteróloga Core se detectó 24 horas y hasta 96 h. p. t. mediante microscopía de fluorescencia y mediante western blot; para este último se realizaron los ensayos a partir de extractos celulares obtenidos 24 h. p. t.

Se utilizó el anticuerpo anti Core y un anticuerpo secundario de ratón anti IgG humana marcado con peroxidasa de rábano (Amersham); el revelado se hizo en una película de rayos X (Kodak) con un estuche de quimioluminiscencia (ECL western blot, Amersham) (Sambrook *et al.*, 1989).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El uso de vectores virales que expresan transitoriamente proteínas heterólogas en células eucariotas es una herramienta útil para el estudio de diferentes proteínas, tanto virales como celulares (Lundstrom *et al.*, 1999). Teniendo en cuenta que el VHC no se replica eficientemente *in vitro* (Bartenschlager y Lohmann, 2000; Lauer y Walker, 2001), se han utilizado sistemas de expresión que permiten estudiar las proteínas del virus en líneas celulares derivadas de hepatoma; p. ej. HepG2 (McCormick *et al.*, 2002). Esta línea celular se utilizó en el presente estudio, demostrando ser útil para la expresión de proteínas del VHC.

El SFV es un vector desarrollado recientemente, muy eficaz para la expresión transitoria de proteínas por su amplio rango de hospederos y por su capacidad para producir un alto nivel de proteínas, incluyendo la heteróloga. Además, tiene otras ventajas como la replicación del ARN en el citoplasma y una capacidad relativamente alta de clonación (5-8 kb). Utilizando este vector se ha demostrado, en diversos estudios, la expresión de proteínas nucleares, citoplasmáticas, de membrana y secretadas, y la producción comercial de diferentes productos génicos. Los vectores del SFV también se han comenzado a usar para el desarrollo de vacunas y en terapia génica (Lundstrom *et al.*, 1999, 2001).

Con el fin de determinar la eficiencia del SFV como sistema de expresión en la línea de hepatoma HepG2, se evaluó en primera instancia la expresión de la proteína reportera GFP, teniendo en cuenta que su expresión se ha demostrado en diferentes líneas celulares, por lo cual es un indicador adecuado de la eficiencia del sistema del SFV (Ehrengruber *et al.*, 1999).

El TCID₅₀ de rSFV1-GFP fue de $10^{-1.06769}$ en las células BHK-21 transducidas (figura 1A), por lo cual se utilizó la dilución 10^{-1} en diferentes ensayos para transducir células HepG2. Mediante microscopía de epifluorescencia se determinó la localización subcelular de GFP y se encontró distribuida, tanto en el citoplasma como en el núcleo (figura 1B), como se ha descrito previamente en la literatura (Ehrengruber *et al.*, 1999).

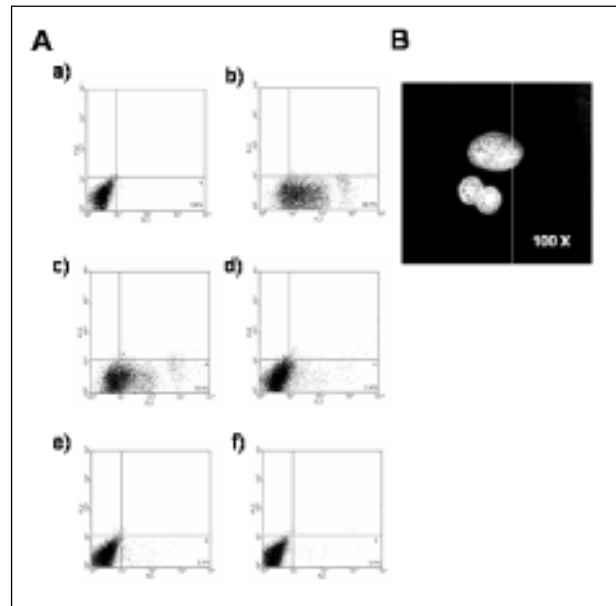


Figura 1. A. Titulación de rSFV1-GFP en células BHK-21 por citometría de flujo. Los eventos en la región 4 del canal FL1 corresponden a células fluorescentes positivas para GFP. En el eje X (FL1) se observa la intensidad de fluorescencia. a) Células BHK-21 sin transducir, b)-f) células 24 h. p. t. correspondientes a las diluciones 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} de rSFV1-GFP, respectivamente (el porcentaje de células fluorescentes se indica en cada dot plot). B. Detección de GFP por microscopía de epifluorescencia

Se demostró un alto grado de expresión de proteína heteróloga (GFP) hasta en 75% de las células HepG2 transducidas, antes de las 48 h. p. t. (figuras 2A, 2B), muy similar al observado en células BHK-21 (Ehrengruber *et al.*, 1999; DiCiommo y Bremner, 1998). La expresión de GFP hasta las 96 h. p. t. y la aparición tardía (72 h. p. t.) de un efecto citopático marcado y muerte celular típicos inducidos por el SFV (resultados no mostrados), sugieren una buena tolerancia de la

línea celular a este alfavirus. La aparición del efecto citopático inducido por el SFV, se correlacionó con bajos niveles de expresión 72 h. p. t.

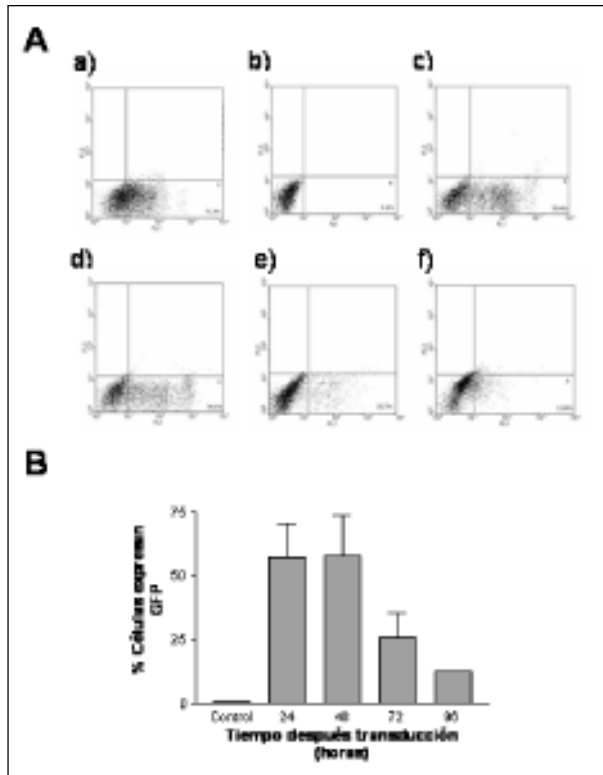


Figura 2. A. Cinética de expresión de GFP en HepG2. Los eventos en la región 4 del canal FL1 corresponden a células fluorescentes positivas para GFP. En el eje X (FL1) se observa la intensidad de fluorescencia. a) células BHK-21 transducidas con rSFV1-GFP TCID₅₀, b) células HepG2 control, c)-f) células HepG2 transducidas con rSFV1-GFP TCID₅₀ 24h, 48h, 72h, 96 h. p. t., respectivamente (el porcentaje de células fluorescentes se indica en cada dot plot). B. Promedio de expresión de GFP en células HepG2 transducidas con rSFV1-GFP TCID₅₀

Este estudio aporta evidencias de la eficiencia del sistema del SFV para la expresión transitoria de altos niveles de proteína heteróloga en células HepG2. La validación del sistema de expresión en la línea celular HepG2, permitió iniciar el estudio de expresión de la proteína Core del VHC en esta línea celular utilizando el SFV como vector viral.

El TCID₅₀ de rSFV1-Core correspondió a $10^{-0,5435}$ en células BHK-21, por lo que se utilizó una dilución $10^{-0,5}$ para la transducción de células

HepG2. El porcentaje de células HepG2 que expresaban Core fue alrededor del 20 al 25% entre las 24 y 48 h. p. t., y de menos del 10% hasta 96 h.p.t. (resultados no mostrados). Contrario a lo observado con la proteína reportera GFP, la eficacia del sistema SFV para la expresión de la proteína Core fue menor en la línea HepG2 (25% de células 24 h. p. t.), comparado con el resultado obtenido en BHK-21 (50% de células 24 h. p. t.); además se observó un efecto citopático marcado a las 24 h. p. t. (resultados no mostrados). La cinética de expresión tanto de GFP como de Core, evidenció un tiempo óptimo de expresión entre las 24 h y 48 h. p. t.

La menor eficiencia de expresión de la proteína Core del VHC en las células HepG2 y BHK-21 comparada con la eficiencia de expresión de la proteína reportera (GFP), puede ser debido a diferencias en la sensibilidad de las técnicas de detección correspondientes. Otros autores han descrito que la sensibilidad de la microscopía es menor comparada con la sensibilidad de la citometría (Andersson *et al.*, 1988). La estandarización de la detección de la proteína Core del VHC por citometría podría ser una alternativa; sin embargo, ensayos preliminares (resultados no mostrados) no permitieron la detección de células fluorescentes, posiblemente por inconvenientes técnicos. Es de anotar que el anticuerpo B12.F8 se ha utilizado por otros autores sólo en técnicas de western blot e inmunofluorescencia por microscopía (Burratti *et al.*, 1998; Esposito *et al.*, 1995).

Se cree que la proteína Core es de gran importancia en la patogénesis del VHC (McLauchlan, 2000), por lo cual es importante estudiar el efecto de esta proteína en células del ambiente hepático, con un sistema que permita su expresión rápida y en grado significativo.

La localización en el citoplasma de Core se observó por microscopía de epifluorescencia (figura 3A) y se detectó por western blot (banda de 21 kd) (figura 3B). Esta técnica permitió observar cantidades cualitativamente similares de Core en las células HepG2 y en las BHK-21. Es importante agregar, que el efecto citopático más acentuado

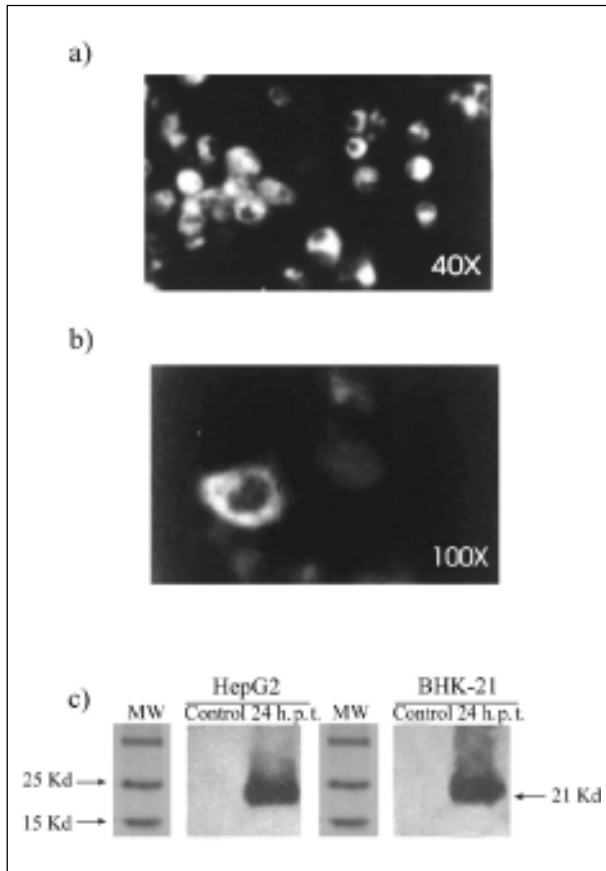


Figura 3. Expresión de la proteína Core en células BHK-21 o HepG2 transducidas con rSFV1-Core. A. Detección por microscopía de fluorescencia: a) Células BHK-21. B. Células HepG2 (contraste con azul de Evans). C. Detección por western blot. Electroforesis, en gel de poliacrilamida al 10% y en condiciones reductoras, de proteínas transferidas a membrana de PVDF y revelada por quimioluminiscencia (ECL western blot, Amersham). MW: Marcador de peso de proteínas

en las células HepG2 transducidas con rSFV1-Core, con respecto a las transducidas con rSFV1-GFP, puede deberse a la capacidad de inducir apoptosis de la proteína Core, lo cual se ha descrito en varios estudios (Goh *et al.*, 2001; Honda *et al.*, 2000).

Este estudio permitió demostrar por primera vez que el sistema basado en el SFV es útil para la expresión eficiente de proteínas heterólogas en células HepG2. Actualmente, se está realizando un estudio de expresión diferencial utilizando este modelo de células HepG2 transducidas con rSFV1-Core.

AGRADECIMIENTOS

Al doctor Sócrates Herrera, profesor de la Universidad del Valle, por la donación de la línea celular HepG2. Los plásmidos pSFV1-Core y pSFV1-GFP fueron construidos durante los estudios doctorales de María-Cristina Navas en el Instituto de Virología, Universidad Louis Pasteur, Francia e Instituto de Virología, Universidad de Zurich, Suiza. Este proyecto fue financiado por el Instituto Colombiano para el Desarrollo de la Ciencia y la Tecnología “Francisco José de Caldas” (Colciencias) y el Comité para el Desarrollo de la Investigación de la Universidad de Antioquia (CODI).

REFERENCIAS

- Andersson U, Hallden G, Persson U, Hed J, Moller G, DeLey M. 1988. Enumeration of IFN-gamma-producing cells by flow cytometry. Comparison with fluorescence microscopy. *J Immunol Methods* 112:139-142.
- Bartenschlager R, Lohmann V. 2000. Replication of hepatitis C virus (review). *J Gen Virol* 81:1631-1648.
- Buratti E, Baralle FE, Tisminetzky SG. 1998. Localization of the different hepatitis C virus Core gene products expressed in COS-1 cells. *Cell Mol Biol* 44:505-12.
- DiCiommo DP, Bremner R. 1998. Rapid, high level protein production using DNA-based Semliki Forest virus vectors. *J Biol Chem* 273:18060-18066.
- Ehrengruber MU, Lundstrom K, Schweitzer C, Heuss C, Schlesinger S, Gahwiler BH. 1999. Recombinant Semliki Forest virus and Sindbis virus efficiently infect neurons in hippocampal slice cultures. *Proc Natl Acad Sci USA* 96:7041-7046.
- Erhardt A, Hassan M, Heintges T, Haussinger D. 2002. Hepatitis C virus Core protein induces cell proliferation and activates ERK, JNK, and p38 MAP kinases together with the MAP kinase phosphatase MKP-1 in a HepG2 Tet-Off cell line. *Virology* 292:272-84.
- Esposito G, Scarselli E, Cerino A, Mondelli MU, La Monica N, Traboni C. 1995. A human antibody specific for hepatitis C virus Core protein: synthesis in a bacterial system and characterization. *Gene* 164:203-9.
- Fournier C, Sureau C, Coste J, Ducos J, Pageaux G, Larrey D, Domergue J, Maurel P. 1998. In vitro infection of adult normal human hepatocytes in primary culture by hepatitis C virus. *J Gen Virol* 79:2367-2374.

- Goh PY, Tan YJ, Lim SP, Lim SG, Tan YH, Hong WJ.** 2001. The hepatitis C virus Core protein interacts with NS5A and activates its caspase-mediated proteolytic cleavage. *Virology* 290:224-236.
- Honda M, Kaneko S, Shimazaki T, Matsushita E, Kobayashi K, Ping LH, Zhang HC, Lemon SM.** 2000. Hepatitis C virus Core protein induces apoptosis and impairs cell-cycle regulation in stably transformed Chinese hamster ovary cells. *Hepatology* 31:1351-1359.
- Ito T, Mukaigawa J, Zuo J, Hirabayashi Y, Mitamura K, Yasui K.** 1996. Cultivation of hepatitis C virus in primary hepatocyte culture from patients with chronic hepatitis C results in release of high titre infectious virus. *J Gen Virol* 77:1043-1054.
- Langhans B, Lechmann M, Ihlenfeldt H, Jung G, Giers G, Schweitzer S, Bakri M, Sauerbruch T, Spengler U.** 2000. A Hepatitis C virus Core protein derived peptide inhibits HCV specific lymphocyte proliferation. *Eur J Med Res* 5:115-20.
- Large MK, Kittlesen DJ, Hahn YS.** 1999. Suppression of host immune response by the Core protein of hepatitis C virus: possible implications for hepatitis C virus persistence. *J Immunol* 162:931-8.
- Lauer GM, Walker BD.** 2001. Medical Progress: Hepatitis C Virus Infection (review). *N Engl J Med* 345:41-52.
- Liljeström P, Garoff H.** 1991. A new generation of animal cell expression vectors based on the Semliki Forest virus replicon. *Biotechnology* 8:2031-2041.
- Liljeström P, Garoff H.** 1993. SFV expression systems. Technical manual. Novum Research Center, Huddinge, Sweden.
- Lundstrom K, Schweitzer C, Richards JG, Ehrenguber MU, Jenck F, Mülhardt K.** 1999. Semliki Forest virus vectors for in vitro and in vivo applications (review). *Gene Ther Mol Biol* 4:23-31.
- Lundstrom K, Schweitzer C, Rotmann D, Hermann D, Schneider EM, Ehrenguber MU.** 2001. Semliki Forest virus vectors: efficient vehicles for in vitro and in vivo gene delivery (minireview). *FEBS Lett* 504:99-103.
- McCormick CJ, Rowlands DJ, Harris M.** 2002. Efficient delivery and regulable expression of hepatitis C virus full-length and minigenome constructs in hepatocyte-derived cell lines using baculovirus vectors. *J Gen Virol* 83:383-394.
- McLauchlan J.** 2000. Properties of the hepatitis C virus Core protein: a structural protein that modulates cellular processes (review). *J Viral Hepat* 7:2-14.
- Okuda M, Li K, Beard MR, Showalter LA, Scholle F, Lemon SM, Weinman SA.** 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus Core protein. *Gastroenterology* 22:366-375.
- Ray RB, Ray R.** 2001. Hepatitis C virus Core protein: intriguing properties and functional relevance (review). *FEMS Microbiol Lett* 202:149-156.
- Reed LJ, Münch H.** 1938. A simple method of estimating fifty percent end points. *AMJH y g* 27:493-497.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T.** 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, USA.
- Schlesinger S, Dubensky TW.** 1999. Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. *Curr Opin Biotechnol* 10:434-439.
- Zhang J, Asselin-Paturel C, Bex F, Bernard J, Chehimi J, Willems F, Caignard A, Berglund P, Liljestrom P, Burny A, Chouaib S.** 1997. Cloning of human IL-12 p40 and p35 DNA into the Semliki Forest virus vector: expression of IL-12 in human tumor cells. *Gene Ther* 4:367-374.