

# МОЛЕКУЛЯРНАЯ БИОЛОГИЯ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2005 г. А. В. ИВАНОВ<sup>1,2</sup>, А. О. КУЗЯКИН<sup>1</sup>,  
С. Н. КОЧЕТКОВ<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А.Энгельгардта РАН, Москва

<sup>2</sup>Центр медицинских исследований Университета Осло, Москва

I. Введение. II. Структура вириона. III. Структура генома ВГС.  
IV. Белки ВГС. V. Жизненный цикл ВГС. VI. Заключение.

## I. ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время по приведенным в литературе оценкам около 3% мирового населения (170 млн) инфицировано ВГС [1]. У 3–10% инфицированных в течение примерно 20 лет развивается цирроз печени с возможным последующим развитием гепатоцеллюлярной карциномы [2]. Кроме того, с данным вирусом ассоциировано большое количество проявлений, непосредственно не связанных с печенью и затрагивающих кровь (напр. криоглобулинемия), почки (напр., гломерулонефрит) и т.п. [3].

Терапия вируса основана на использовании интерферона  $\alpha$ , а также его комбинации с нуклеозидным аналогом рибавирином [4]. Следует отметить крайне низкую эффективность такой терапии, особенно в отношении вируса первого генотипа (чувствительными к тера-

---

*Принятые сокращения:* ВГС – вирус гепатита С; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ОТ – обратная транскрипция; ЭР – эндоплазматический ретикулум; UTR – нетранслируемый участок (untranslated region); IRES – внутренний сайт посадки рибосомы (internal ribosomal entry site); ISDR – участок, определяющий чувствительность к интерферону (interferon-sensitivity determining region).

Белки ВГС: а. *структурные:* С – белок кора (core); E1, E2 – гликопротеины оболочки (envelope) б. *неструктурные (NS):* NS2, NS3 – протеазы; NS4A, NS4B – кофакторы; NS5A – регуляторный фосфобелок; NS5B, RdRP – РНК-зависимая РНК-полимераза.

*Адрес для корреспонденции:* kochet@eimb.ru

Работа была поддержана грантами Программы Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология» и РФФИ 03-04-49154 и 04-04-49105.

пии оказывается менее 30% пациентов). Поиск новых противовирусных препаратов затруднен из-за отсутствия доступных экспериментальных систем (см. ниже).

В настоящее время в англоязычной литературе имеется значительное число обзоров по молекулярной биологии ВГС, например, работы [5, 6], а также обзор, посвященный известным ингибиторам основных ферментов вируса [7]. Настоящий обзор призван заполнить пробел, существующий в отечественной литературе. В нем рассматриваются структура вириона, проникновение в вирусную клетку, репликация, трансляция и протеолитический процессинг, сборка новых вирусных частиц, а также известные к настоящему времени функции вирусных белков.

## II. СТРУКТУРА ВИРИОНА

Вирионы ВГС были выделены из плазмы крови пациентов [8–12], кроме того, вирусподобные частицы были получены в результате экспрессии неструктурных белков вируса в различных клеточных культурах [13, 14]. Структура вириона (по данным электронной микроскопии) приведена на рис. 1. Размер вирусных частиц составляет от 30 до 80 нм [15–17], а их плотность лежит в широком интервале значений. Так, при анализе плазмы крови в градиенте плотности сахарозы или CsCl и детекции РНК ВГС методом ОТ-ПЦР были обнару-

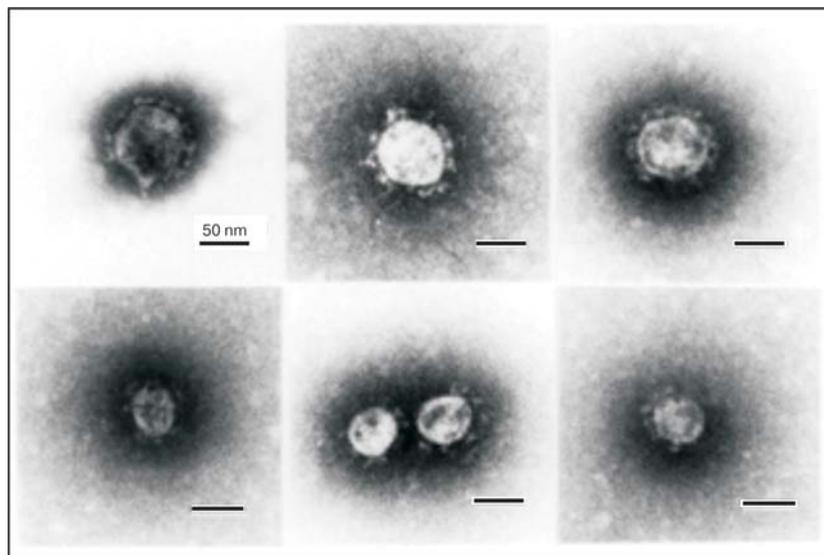


Рис. 1 Структура вирусной частицы ВГС.

жены и охарактеризованы две фракции вирусных частиц, а именно с низкой (1,08–1,11 г/мл) и высокой (1,22–1,25 г/мл) плотностью [9, 18, 19]. Первые из них являются вирионами, тогда как считается, что вторые представляют собой нуклеокапсиды вируса. Полный состав зрелых частиц ВГС неизвестен, однако было показано, что они содержат вирусную РНК, окруженную основным С-белком (core protein), а также гликопротеинами Е1 и Е2 [18, 20]. Обработка вирионов хлороформом или неионогенными детергентами (напр. нонидет Р-40) приводит к образованию неинфекционных частиц размером около 50 нм [21] и плотностью около 1,25 г/мл [8, 9], представляющих собой нуклеокапсиды ВГС.

Инфекционность вирусных частиц сильно зависит от ассоциации с клеточными белками, такими как иммуноглобулины [10] и липопротеины высокой [18, 20, 22] и низкой плотности. Так, высокоинфекционные вирионы размером 60–70 нм, характеризующиеся низкой плотностью (1,03–1,1 г/мл), были выделены из плазмы крови пациентов, у которых заболевание протекает в острой стадии [10, 18]. Примечательно, что такие вирионы не входят в состав иммунных комплексов. В то же время большие по размеру (>100 нм) комплексы вирионов с аполипопротеином В обладают низкой плотностью. Такие ассоциаты также обладают способностью связываться с клеточной мембраной и проникать в клетку [20].

Вирусные частицы высокой плотности являются менее инфекционными по сравнению с описанными выше. Они присутствуют в плазме крови при персистирующей инфекции у пациентов с изменениями уровня аланинаминотрансферазы (АЛТ) [9]. Кроме того, частицы с высокой плотностью (1,32–1,34) и размером 38–43 нм и 54–62 нм были выделены и из плазмы пациентов с нормальным уровнем АЛТ [23]. Следует отметить, что помимо нуклеокапсидов эту фракцию составляют и комплексы частиц с иммуноглобулинами.

## III. СТРУКТУРА ГЕНОМА ВГС

Геном ВГС (рис. 2А) представляет собой (+)-цепь РНК длиной около 9600 нуклеотидов, на 5'-конце которой не содержится кэпа [24]. РНК вируса содержит одну рамку считывания, ограниченную 5'- и 3'-нетранслируемыми участками (UTR) [25, 26]. Нуклеотидная последовательность 5'-UTR высококонсервативна, и ее длина составляет 341 нуклеотид [27]. Компьютерное моделирование структуры и последующее биохимическое картирование показали, что вторичная структура 5'-UTR состоит из четырех основных доменов и псевдоузла (рис. 3А) [28]. Главной особенностью данного участка РНК является

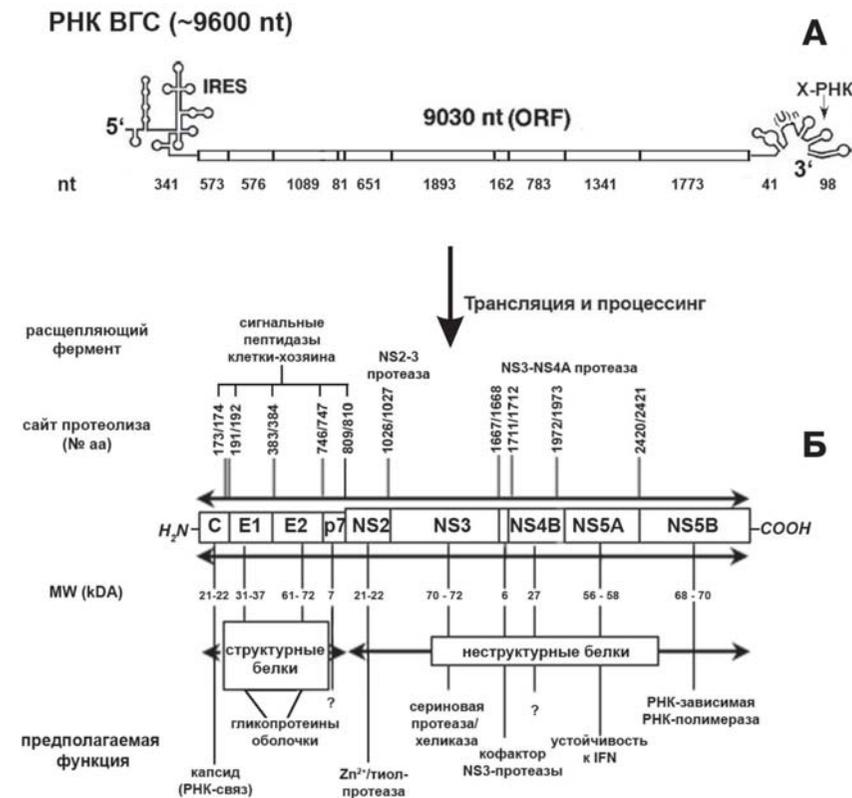


Рис. 2. Структура генома ВГС и процессинг полипротеина.

наличие внутреннего сайта посадки рибосомы (IRES) [29, 30], что позволяет трансляцию генома ВГС по экз-независимому механизму [30].

Структуру 3'-UTR можно разделить на 3 участка: короткий вариативный участок (около 40 нуклеотидов), поли(U)/полипиримидин-последовательность и высококонсервативный участок, получивший название X-РНК (98 нуклеотидов) [26, 25, 31, 32]. X-РНК по данным компьютерного моделирования [31], подтвержденных химическим и ферментативным картированием [33] состоит из трех «шпилек» (рис. 3Б). Роль 3'-UTR заключается в связывании вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразы и обеспечении инициации репликации вирусного генома [24, 35, 36]. Эксперименты *in vivo* (модель шимпанзе) продемонстрировали, что РНК ВГС сохраняет инфекционность только при наличии обоих элементов [37]. Однако *in vitro* синтез новой цепи по беспраймерному (*de novo*) механизму может начинаться как с X-РНК, так и с поли(U)/полипиримидинового участка [24].

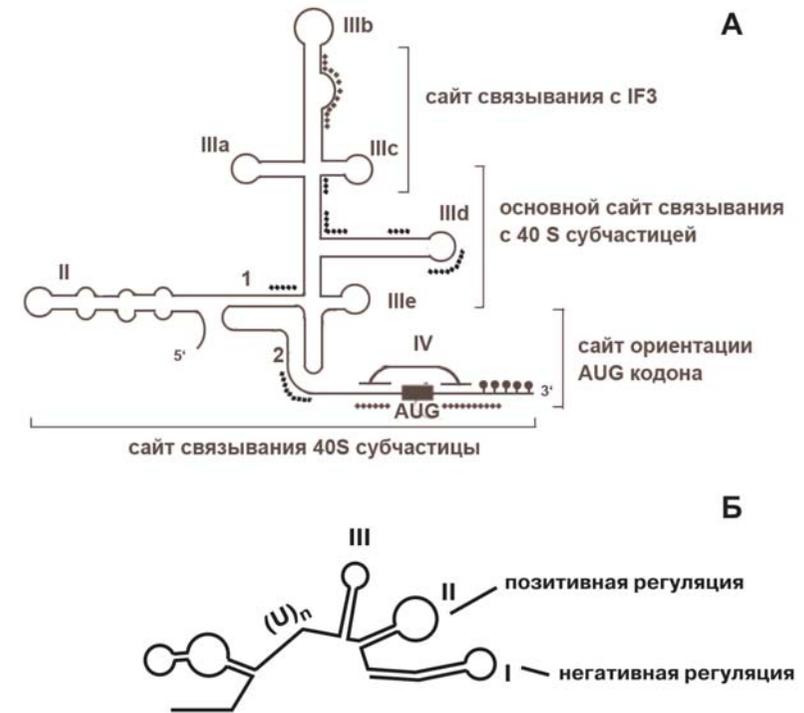


Рис. 3. Вторичные структуры 5'- (А) и 3'- (Б) нетранслируемых участков ВГС.

ВГС отличается существенной генетической вариабельностью. В настоящее время выделяются шесть генотипов ВГС, каждый из которых подразделяется на значительное число субтипов, обозначаемых строчными буквами (1a, 1b и т.д.). Геномы типов различаются на 31–34% (30% по аминокислотной последовательности), а субтипы – на 20–23% [39]. Существует достаточно четкое географическое распределение генотипов ВГС (см. табл.). В России наблюдается преимущественное распространение типа 1b.

#### IV. БЕЛКИ ВГС

Белковый состав ВГС представлен на рис. 2Б. Все вирусные белки образуются в результате посттрансляционного процессинга полипротеина, образующегося в результате трансляции с единственной рамки считывания (см. ниже). В полипротеине эти белки располагаются в последовательности C-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B. Ниже приведены основные данные об этих белках.

Таблица.  
Географическое распределение типов ВГС

Тип	Распространенность
Тип 1a	доминирует в Европе и Северной Америке
Тип 1b	значителен в Европе, Северной Америке и Японии
Тип 2	доминирует на Дальнем Востоке (Япония, Китай)
Тип 3	встречается в Европе и Северной Америке
Тип 4	преобладает на Ближнем Востоке и в Африке
Тип 5	значителен в Южной Африке
Тип 6	встречается изолированно в Гонконге

#### БЕЛОК КАПСИДА

Структурный белок капсида С (core protein) расположен на N-конце полипептида и образуется под воздействием клеточных пептидаз [40–42]. Первое разрезание происходит между остатками 191 и 192 (сайт С1) и приводит к образованию N-конца гликопротеина Е1 [40]. Второе место разрезания (С2) находится между 174 и 191 аминокислотами. Соответствующие продукты разрезания получили названия р21 и р23 [43], хотя в некоторых работах они именовются р21 и р19 соответственно [44–46] (рис. 2Б). Анализ экспрессии в ряде клеток млекопитающих показал, что р21 является основным продуктом, а р23 обнаруживается в минорных количествах. Возможно, что расщепление по сайтам С1 и С2 – взаимосвязанные процессы, поскольку р21 образуется в условиях, когда гидролиза по С2 не наблюдается [44]. Белок капсида ВГС, обнаруживаемый в сыворотке инфицированных пациентов, по молекулярному весу полностью соответствует р21, что утверждает данную форму С-белка в качестве основного белка капсида вируса [43].

Изучение трансляции различных генотипов корового белка *in vitro* показало, что формы р23 и р21 образуются в присутствии микросомальных мембран, что предполагает участие мембрано-ассоциированных протеаз в расщеплении полипротеина – предшественника в сайтах С1 и С2. С-концевой участок р23 сильно гидрофобен и служит сигнальной последовательностью для попадания Е1 в люмен эндоплазматического ретикула (ЭР) [44, 47]. Мутации в остатках –3 и –1 от аминокислоты 192 (аминокислоты 189 и 191) не препятствуют расщеплению по сайту С1, однако предотвращают разрезание в С2 [44], что соответствует условиям действия сигнальных пептидаз [48, 49]. Удаление гидрофобного сегмента между остатками 178 и 182 ликвидирует процессинг как в С2-, так и в С1-сайтах [44]. Показано также, что область, дистанцированная на 50 аминокислот от С1, важна

для эффективного разрезания [50]. Суммируя имеющиеся данные, можно полагать, что процессинг корового белка ВГС по сайтам С1 и С2 осуществляется в люмене ЭР комплексом клеточных сигнальных пептидаз [49], однако этот процесс требует дальнейшего изучения.

Третья форма корового белка (р16) была обнаружена только при процессинге ВГС первого генотипа [45, 46, 51]. При трансляции *in vitro* данного генотипа не требуется присутствие мембран. В отсутствие кодирующей последовательности Е1 р16 доминирует как *in vitro*, так и в инфицированных клетках [45, 46]. Однако при использовании конструкций, содержащих кодирующую последовательность Е1, основными продуктами являются р23 и р21. Критическую роль в синтезе формы р16 играет остаток лизина; при замене этого остатка на аргинин р16 не обнаруживается [45]. Характерно, что у других генотипов ВГС в данном положении присутствуют аминокислоты, отличные от лизина [52–57].

Аминокислотная последовательность С-белка у всех шести генотипов ВГС высококонсервативна [57]. Белок можно разделить на три домена (рис. 4). Домен 1 состоит из остатков с 1 до 122 и содержит большую часть основных остатков (23,4%). Домен 2 (аминокислоты

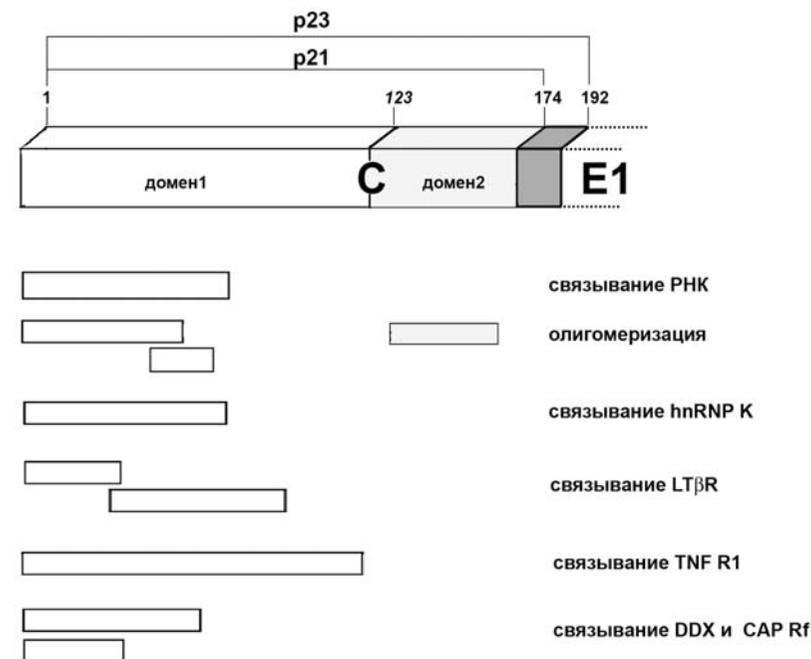


Рис. 4. Участки С-белка, вовлеченные в РНК-белковые и белок-белковые взаимодействия.

123–174, С-концевая часть формы р21) содержит значительно меньше основных остатков (5,8%) и значительно более гидрофобен, чем домен 1. Домен 3 (остатки 175–191) высокогидрофобен и представляет сигнальную последовательность для Е1.

Данные о распределении С-белка в клетках различных типов свидетельствуют о том, что он локализован в цитоплазме и ассоциирован с гранулярными структурами или ретикулярными сетями, предположительно в ЭР [42, 47, 58–61]. Электронномикроскопический и иммунофлюоресцентный анализ показали, что эти гранулярные структуры представляют собой липидные капельки (lipid droplets) [62, 63]. Аполипротеин АII колокализует с С-белком на поверхности липидных капелек [63], в то время как адипофилин [64, 65] (белок, ассоциированный с липидными капельками) вытесняется С-белком в искусственной клеточной системе [50]. Предполагается, что присоединение С-белка к капелькам может быть связано с патогенностью ВГС. «Укороченные» мутантные формы С-белка теряют способность к ассоциации с капельками, что приводит к их аккумуляции в ядрах или ядерных мембранах [42, 46, 62, 66, 67].

Авторами работы [47, 68] обнаружена способность С-белка к связыванию с РНК, синтезированной *in vitro*. РНК-связывающий участок охватывает примерно 75 аминокислотных остатков с N-конца белка, причем связывание неспецифично в отношении последовательности РНК ВГС. Вирусоподобные частицы, образующиеся в бакуловирусной системе, с одинаковой эффективностью заключают в «капсид» как полноразмерную РНК ВГС, так и ее фрагменты, однако встраивания чужеродной РНК не отмечалось [69].

Основной функцией С-белка является формирование вирусного капсида, что предполагает его олигомеризацию. Участки, ответственные за олигомеризацию, были найдены как в домене 1 (остатки 36–91), так и в домене 2 (остатки 82–102) [70–72]. В работе [73] было отмечено образование *in vitro* нуклеокапсид-подобных частиц размером 60 нм для бактериального продуцента С-белка.

Сведения о взаимодействии С-белка с другими белками ВГС достаточно ограничены, что связано, в первую очередь с его низкой растворимостью [47, 62, 70]. Имеются противоречивые данные о взаимодействии С-белка с гликопротеинами Е1 и Е2 [74, 75], белком NS5A, а также с С-концевой областью NS5B [76].

Имеется также ряд данных о взаимодействиях С-белка с белками клетки-хозяина. Среди таких белков – гетерогенный ядерный рибонуклеопротеид К (hnRNP K) [77], принимающий участие во внутриклеточной передаче сигнала. С использованием дрожжевой двугибридной системы были картированы участки взаимодействия – после-

довательности 25–91 в С-белке и 250–392 в hnRNP K (последний перекрывается с участком, отвечающим за ядерный транспорт) [78].

Рядом групп было показано взаимодействие между С-белком и рецепторами лимфотоксина β (LT-βR) [79, 80] и фактора некроза опухоли 1 (TNF-R1) [81], принадлежащих одному суперсемейству. У С-белка участки взаимодействия расположены в N-концевой области. В случае LT-βR участок взаимодействия расположен в цитоплазматическом домене в последовательности 338–390 [79, 80], у TNF-R1 этот участок расположен между 345–407 аминокислотными остатками, перекрывающимися с «доменом смерти» (DEAD box; остатки 326–413). С-белок способен к взаимодействию и с другими белками, содержащими этот элемент – DDX3, DBX, CAP-Rf [82–84], содержащими мотивы, характерные для РНК-хеликаз. Однако экспериментальных доказательств наличия хеликазной активности у этих белков продемонстрировать не удалось, несмотря на стимуляцию укороченной формой С-белка АТФазной активности. Для связывания DEAD box-белков со стороны необходимы 60 N-концевых аминокислотных остатков С-белка [82–84]. Наконец, имеются данные о взаимодействии С-белка с р53 [85] и рядом изоформ р53-связывающего белка р73. Было показано участие в связывании 321–353 аминокислотных остатков р73. Взаимодействие с α-формой р73 приводило к аресту клеточного роста по р53-зависимому механизму, в то время как для β-формы р73 данный факт не отмечался. Не исключено, что эти взаимодействия связаны с вирусной патогенностью [86]. Взаимодействие С-белка с различными лигандами суммировано на рис. 4.

Значительное количество работ описывает влияние С-белка на Fas- и TNF-β-инициируемый апоптоз, однако четкой роли этого белка не выяснено [67, 79, 81, 87, 88]. Такое влияние могут оказывать типы клеток, реализующие различные сигнальные пути, методы экспрессии белка, агенты, инициирующие апоптоз, а также ингибиторы синтеза белка или РНК [88–93]. По-видимому, С-белок взаимодействует с несколькими белками, участвующими в регуляции клеточной смерти. Так, усиливая активацию NF-κB [94, 95], взаимодействуя с р53 [85] и р73 [86], коровый белок подавляет апоптоз, а связываясь с цитоплазматическим доменом Fas и изменяя активность каспазы-3 [96], – активирует этот процесс. Известно также, что С-белок умеренно активирует менее изученную LT-βR-индуцируемую клеточную смерть в клетках HeLa, но данный эффект не наблюдается в других клеточных линиях [79, 97]. Таким образом, вопрос о механизме влияния С-белка на апоптоз остается открытым.

С-белок оказывает влияние на клеточную трансформацию. В стабильных линиях фибробластов его экспрессия индуцирует анкер-неза-

висимый рост, изменение морфологии и приводит к опухолям у мышей [98–100]. Этот факт подтверждает возможность участия С-белка в клеточной пролиферации и развитии гепатоцеллюлярной карциномы.

В ряде работ показано, что С-белок способен активировать транскрипцию с ряда вирусных и клеточных промоторов. Так, он участвует в подавлении экспрессии и репликации генов вируса гепатита В [101–105], при этом супрессирующая активность С-белка подавляется фосфорилированием остатков серина в позиции 99 и 116 [106]. Экспрессия с других промоторов, таких как *c-fos*, *p21WAF1*, *p53*, *HIV-1 LTR*, *(IL)-2*, также подавлялась С-белком [107–109]. В то же время при использовании конструкций с рядом вирусных промоторов (ранний промотор *SV40* и концевой повтор вируса саркомы Рауса (*RSV*)) уровень экспрессии повышался [60, 68]. В ряде работ отмечается также влияние С-белка на усиление эффектов таких клеточных факторов, как *FasL* [67], *TNF-α* [67, 110], *LT-α1v2* [110], *EGF* [100], РНК-хеликаза [84], *(IL)-2* [111], циклин *E* [112], а также ослабление действия *hnRNP K* [78]. Основной проблемой изучения влияния С-белка на транскрипцию являются разные результаты для разных клеточных культур. Так, например ДНК-связывающая активность *NF-κB* может усиливаться [110] или подавляться [113] в зависимости от типа используемых клеток. Таким образом, на данный момент сделать конкретные выводы о пути воздействия С-белка не представляется возможным [114].

Совсем недавно авторами работы [115] был описан новый белок ВГС, получивший название «F» (от «frameshifting»). F-белок (17 kDa) образуется в результате  $-2/+1$  сдвига рибосомальной рамки считывания. Антитела к этому белку обнаруживаются в процессе естественной ВГС-инфекции. F-белок, подобно другим белкам ВГС, локализован в ЭР и, как предполагается, играет роль в вирусном морфогенезе и/или репликации.

#### ГЛИКОПРОТЕИНЫ ОБОЛОЧКИ E1 И E2

Формирование белков E1 и E2 происходит в результате разрезания полипротеина ВГС в сайтах С/E1, E1/E2, E2/p7 и p7/NS2 клеточными сигнальными пептидазами, локализованными в ЭР [40, 116–120] (рис. 2Б). Разрезание в этих сайтах проходит с различной скоростью: сразу после трансляции в С/E1 и E1/E2, замедленно в p7/NS2 и не полностью в E2/p7. Вследствие этого E2 существует в двух формах: собственно E2 и гибрид E2-p7; значение этих форм в жизненном цикле ВГС пока не определено [121–125]. Вблизи N-конца E2 содержится наиболее вариабельный участок структуры ВГС длиной около 80 аминокислотных остатков.

Гликопротеины ВГС принадлежат к семейству трансмембранных белков первого типа с N-концевым внешним доменом и С-концевым

гидрофобным анкерным доменом. E1 и E2 содержат 5–6 и 9–10 сайтов гликозилирования соответственно [116, 118]. Гликозилирование происходит в люмене ЭР под действием олигосахаридтрансферазы, причем с белками взаимодействуют только олигосахариды с высоким содержанием маннозы [126, 127]. Эффективность гликозилирования E1 зависит от присутствия дальнейшей последовательности полипротеина ВГС [122].

E1 и E2 способны к олигомеризации. В присутствии неионогенных детергентов детектируются две формы E1-E2 комплексов: гетеродимер E1-E2, образующийся за счет нековалентных взаимодействий, и гетерогенные агрегаты, стабилизированные дисульфидными связями [121, 128, 129] (рис. 5). Предположительно именно комплекс первого типа принимает участие в связывании и проникновении вируса в клетку [126]. Агрегаты, стабилизированные дисульфидными связями, возможно, являются побочными продуктами [122]. Такие агрегаты впервые были получены при использовании вирусных векторов, индуцирующих высокий уровень вирусных белков [41, 121], а позже полу-

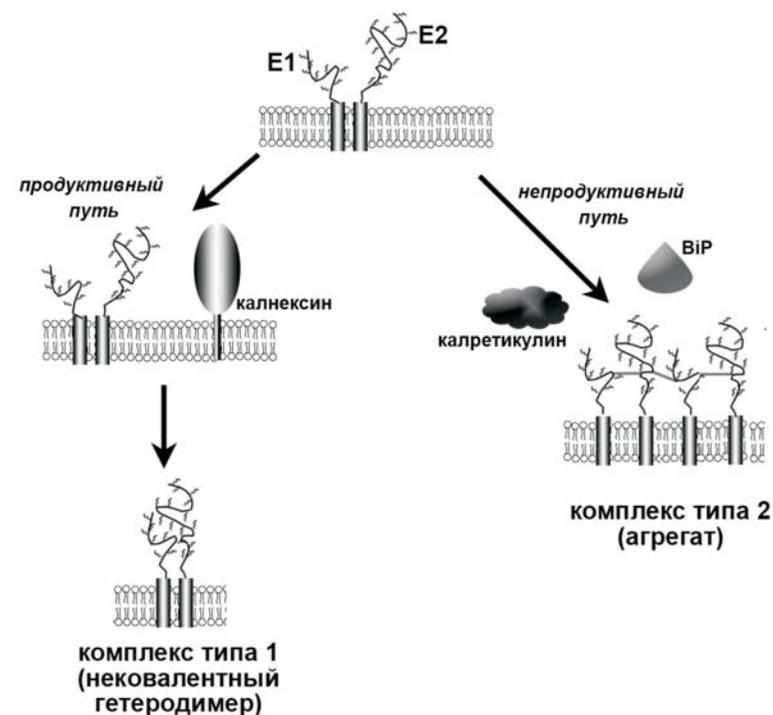


Рис. 5. Олигомеризация гликопротеинов ВГС.

чены в системах с низким уровнем экспрессии [130]. Тенденция к агрегации является характерным свойством поверхностных гликопротеинов ВГС и, возможно, играет роль в вирусном патогенезе [131]. На данный момент, однако, ввиду отсутствия клеточных культур, реплицирующих и поддерживающих ВГС, доказать образование агрегатов в процессе развития инфекции ВГС не представляется возможным.

Изучение формирования внутренних дисульфидных мостиков в гликопротеинах ВГС показало, что окисленная форма E1 образуется только при коэкспрессии с E2 [128, 132], что указывает на медленное сворачивание E1 и необходимость E2 для такого сворачивания. Напротив, в E2 образование дисульфидных связей наблюдается практически одновременно с протеолитическим расщеплением в сайте E2–NS2. Следует отметить, однако, что исследования кинетики формирования E2, проводимые, как правило, с использованием антител различных типов, зачастую дают противоречивые результаты [126, 127, 132, 133].

Сворачивание белков в ЭР происходит при помощи шаперонов. Было показано, что калнексин преимущественно взаимодействует с нековалентными комплексами E1-E2 первого типа, что, учитывая вышесказанное, подтверждает его основную роль в продуктивном пути формирования гликопротеинов ВГС [134]. С агрегатами второго типа взаимодействуют калретикулин и BiP [128, 134].

Показано, что E2 активирует промоторы двух внутрилюменарных шаперонов, GRP78 и GRP94, а также связывается с GPR78 [131]. Более того, экспрессия GPR78, являющегося сенсором стресса в ЭР, снижает восприимчивость клеток к апоптозу, индуцируемому цитотоксическими Т лимфоцитами (CTL); не исключено, что такая активность связана с патогенезом ВГС-индуцируемых заболеваний.

E2 взаимодействует с интерферон-индуцируемой протеинкиназой, активируемой двуцепочечной РНК (PKR), фосфорилирующей фактор инициации трансляции eIF2 $\alpha$  (см. ниже о NS5A), а также с другим ферментом, фосфорилирующим eIF2 $\alpha$  – PKR-подобной протеинкиназой ЭР (PERK). Таким образом, E2, наряду с NS5A, может участвовать в выработке устойчивости к интерферону [135–140].

При попытках получения бактериальных продуцентов белков E1 [141] и E2 было отмечено их токсичное действие на *E. coli*, связанное с изменениями проницаемости мембраны [142]. Для E1 показано, что наиболее критичны для данного процесса аминокислотные остатки Arg(339), Trp(368) и Lys(370) [143]. Дальнейшее изучение на клетках насекомых *Sy9* [144] и человека HepG2 [145] показало, что экспрессия E1 белка также приводит к клеточной гибели, в связи с чем в настоящее время обсуждается возможное участие E1 в процессе апоптоза.

## БЕЛОК P7

Анализ протеолитического процессинга полипептида, образующегося в результате трансляции генома ВГС, первоначально показал образование 9 полипептидов [41]. Спустя полтора года был обнаружен десятый короткий пептид молекулярной массы 7 кДа (p7), который в составе исходно образующегося полипептида располагается между E2 гликопротеином и NS2-протеазой [146]. p7 содержит два гидрофобных трансмембранных домена, соединенных одним гидрофильным участком [147]. На одной стороне данные трансмембранные домены содержат остатки фенилаланина или лейцина, которые часто играют роль во взаимодействиях  $\alpha$ -спиралей. Кроме того, оба домена содержат и остатки глицина, способные принимать участие в олигомеризации белка. Предшествует p7-белку гидрофобная последовательность E2-белка, которая может способствовать транслокации p7 через мембрану ЭР с последующим протеолизом сайта E2/p7 клеточной сигнальной пептидазой [41], узнаваемая последовательность для которой расположена в С-конце p7-белка [147]. Однако, как указывалось выше, расщепление в данном сайте в присутствии микросомальных мембран происходит не полностью, следствием чего является образование двух продуктов: p7 и E2-p7.

Авторами работы [148] было предположено, что полипептид p7 может регулировать способность структурных белков ВГС проникать внутрь клеток. На примере ВГС [149], а также родственного ему вируса бычьей диареи, было также показано, что он является фактором инфекционности его частиц [150].

В настоящее время считается, что белок p7 в виде гексамера образует кальциевые каналы в черные липидные мембраны [151–153]. Активность данных каналов может быть ингибирована амантадином [151, 153] – ингибитором аналогичных каналов вируса гриппа [154, 155] – и производными иминосакхаров, содержащими длинные алифатические заместители [152].

## БЕЛКИ NS2, NS3 И NS4A

Основной функцией белков NS2 и NS3 является протеолитический процессинг неструктурных белков ВГС. При этом эти белки образуют две функциональные протеазы (NS2-NS3 и NS3) (рис. 2Б) [40]. NS2 (810–1026 аминокислотные остатки полипротеина ВГС) образуется в результате автокатализа фрагментом NS2-NS3 в сайте 1026/1027 полипротеина. Протеазной активностью обладает последовательность, кодирующая NS2 и минимальный домен NS3, который фланкирует разрезаемую область (810–1206 аминокислотные остатки) [156–159]. Автокатализ существен для репликации *in vivo*, что было

подтверждено мутантной формой ВГС, лишенной NS2-NS3 протеазной активности, в инфицированных шимпанзе [37]. Минимальный участок, необходимый для автокатализа, расположен с 898 до 1027 аминокислотных остатков полипротеина [160–163]. Протеазная активность NS2-NS3 не зависит от активности NS3 (см. ниже) [160, 161], однако домен NS3 не может быть заменен другим неструктурным белком [163]. Данные сайт-специфического мутагенеза показали, что для автопротеолитической активности существенны аминокислотные остатки His952 и Cys993 [160, 161], однако какой-либо гомологии с известными протеазами не наблюдается. Авторы [164] предполагают, что NS2-NS3 – цистеиновая протеиназа. Однако наблюдаемая стимуляция активности NS2-NS3 в присутствии ионов металлов и ее ингибирование в присутствии ЭДТА позволяет определить NS2-NS3 как цинк-зависимую металлопротеазу [160, 161]. Изучение взаимодействия с широким кругом ингибиторов протеаз не позволило окончательно классифицировать NS2-NS3 [158]. Следует отметить, что структурно-функциональный анализ NS2-NS3 затруднен ввиду отсутствия эффективных продуцентов рекомбинантного белка.

Образующийся в результате автокатализа белок NS2 (217 аминокислотных остатков для ВГС-1b), по-видимому, не несет самостоятельной биологической функции (или эта функция еще не определена).

NS3 представляет собой полифункциональный белок, обладающий двумя каталитическими активностями. Его N-концевой домен представляет собой протеазу, осуществляющую процессинг С-концевых неструктурных белков ВГС [161, 165–167]. Каталитическая область NS3 протеиназы составляет 180 N-концевых аминокислот [168–173]. Расположение протеолитических сайтов NS3 соответствует N-концевым остаткам сформированных белков NS4A, NS4B, NS5A и NS5B. Основываясь на сравнительном анализе последовательностей, фланкирующих разрезаемые пептидные связи, была определена первичная структура сайта, расщепляемого NS3: Asp/GluXaa4Cys/Thr-Ser/Ala [161].

Хотя N-концевой домен NS3 обладает собственной каталитической активностью, на эффективность протеолитического процессинга влияет наличие NS4A – маленького белка размером 54 аминокислотных остатков, являющегося кофактором NS3 протеиназы [168, 169, 173–178]. NS4A формирует с NS3 стабильный комплекс, для образования которого необходимо наличие 22 N-концевых аминокислотных остатков [169, 179]. Степень активизации NS4A зависит от сайта разрезания [168, 174, 180, 181]. В настоящее время определены трехмерные кристаллографические структуры как изолированного NS3-протеазного домена, [182], так и его комплекса с производными NS4A [176, 183] (рис. 6).

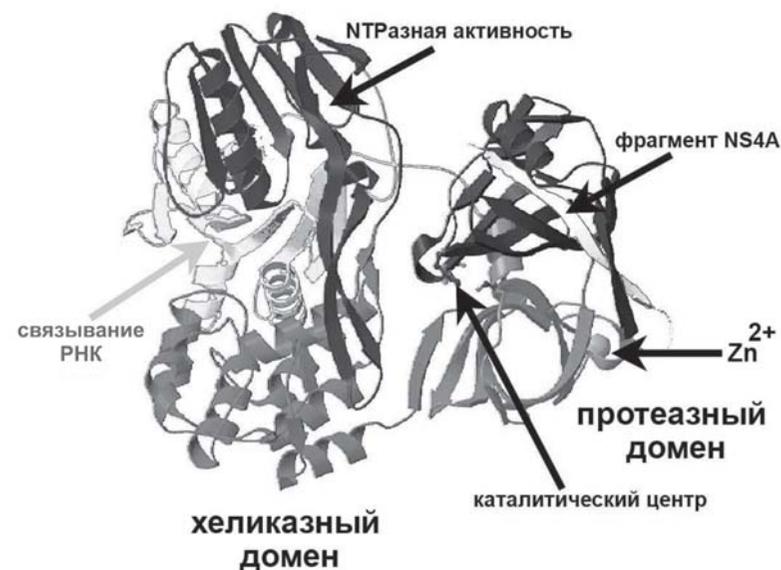


Рис. 6. Пространственная структура комплекса NS3-NS4A.

С-концевой домен NS3, охватывающий две трети белка, содержит структурные мотивы, характерные для РНК-хеликаз [184, 185]. Рекомбинантные белки NS3 обладают РНК-хеликазной и РНК-стимулируемой нуклеозидтрифосфатазной активностями [168, 186–191]. Для проявления этих активностей необходимы как минимум 465 С-концевых аминокислотных остатков NS3 [167]. NS3-хеликаза способна расплетать двуцепочечные РНК и ДНК, а также ДНК-РНК-гетеродуплексы в направлении 3'–5', используя в качестве субстратов как рибо- так и дезоксирибонуклеозидтрифосфаты [189, 191, 192], максимальная активность наблюдается в присутствии ионов  $Mg^{2+}$  при pH 7,0 [193]. Результаты большинства работ по сайт-специфическому мутагенезу указывают, что точечные мутации консервативных остатков в НТРАЗном и РНК-хеликазном мотивах приводят к потере обеих функций [194, 195], однако имеются и противоречащие данные [194]. Сравнение хеликазных активностей NS3 и комплекса NS3/NS4A показывает, что в случае свободного NS3 эта активность падает вследствие понижения процессивности расплетания РНК [196]. Кристаллическая структура хеликазного домена NS3 также определена (рис. 6) [197].

Помимо обсуждавшихся выше взаимодействий NS3 с NS2 и NS4A было также показано его взаимодействие с вирусной РНК-зависимой РНК-полимеразой (NS5B), приводящее к изменениям в узнавании матрицы и продуктов полимеразной реакции. Данный эффект зависел

от наличия НТФазной активности NS3. Отрицательным регулятором образования репликативного комплекса NS3-NS5B является белок NS4B (см. ниже) [198].

Белок NS3 влияет на некоторые клеточные функции. Так, сообщалось о его способности трансформировать клетки NIH 3T3 [199] и ингибировать сАМР-зависимую протеинкиназу [200–202]. Показано также образование комплекса NS3 с белком p53 [203], влияние NS3 на экспрессию последнего [204] и индуцируемое p53 накопление NS3 в ядре [205, 206]. Кроме того, в протеазном домене NS3 расположен участок, подавляющий промотор p21, однако протеазная активность для подавления не требуется. Возможно, подавление происходит в результате ингибирования регуляторной активности p53 [207].

Экспрессия NS3 белка в В-клетках или клетках печени индуцирует изоформы синтазы оксида азота (iNOS) и разрывы ДНК, которые блокируются ингибиторами NOS [208]. Однако механизм и биологические особенности этого феномена не выяснены.

Недавно было показано, что экспрессия в клетках млекопитающих NS3 белка, а также NS2-NS3 приводит к индукции апоптоза и активации каспаз. NS3-индуцируемый апоптоз блокировался ингибиторами каспазы-8, но не каспазы-9. Коэкспрессия NS3 и каспазы-8 показало образование агрегатов каспазы, локализованных с NS3 белком. По данным сайт-специфического мутагенеза, индукция апоптоза связана с хеликазной активностью NS3 [209].

Было показано, что NS3 взаимодействует с LMP7, компонентом иммунопротеасомы. Изучение *in vitro* и в системе минирепликаона данных взаимодействий показало, что они не оказывают влияния на протеазную активность NS3, но подавляют пептидазную активность LMP7-протеасомы. Понижение пептидазной активности может быть связано с процессингом вирусных антигенов для их последующей презентации основным комплексом гистосовместимости (МНС), что может защищать ВГС от иммунной системы хозяина.

#### БЕЛОК NS4B

NS4B представляет собой гидрофобный белок с молекулярной массой 27 кДа [173], локализованный в цитоплазме [210] и котрансляционно локализованный в ЭР [211, 212]. На основании компьютерного анализа предсказано наличие в структуре NS4B четырех трансмембранных сегментов [213]. Поскольку протеолиз сайтов 4A/4B и 4B/5A происходит под действием вирусной цитоплазматической протеазы NS3, то изначально С- и N-концы полипептидной цепи NS4B располагаются в цитоплазме, однако было показано, что N-конец после процессинга транслоцируется в люмен (рис. 7).

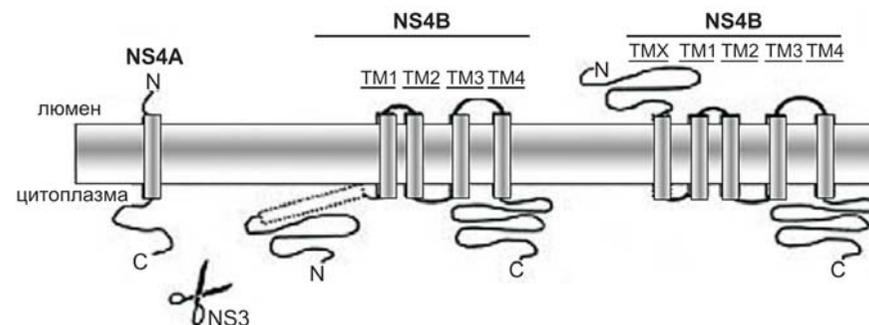


Рис. 7. Локализация NS4B в мембране ЭР.

NS4B способен взаимодействовать с другими неструктурными белками ВГС. Так, он связывается с NS3-протеазой [198] и кофактором последней — NS4A [214] (являющегося, как указывалось выше, интегральной частью NS3-протеазы [215]). Кроме того, отмечено слабое взаимодействие NS4B и с NS5B (РНК-зависимая РНК-полимераза) [198].

Функции NS4B крайне мало изучены. К настоящему времени показано, что он является одним из факторов, необходимых для гиперфосфорилирования NS5A (см. NS5A) [216, 217], вызывает ингибирование вирусной трансляции [218]. Кроме того, данный неструктурный белок является отрицательным регулятором комплекса NS5B-NS3 и, тем самым, оказывает влияние на репликацию ВГС [198]. Данный эффект может происходить и в клетке *in vivo*, что подтверждается присутствием NS4B в рибонуклеопротеиновом комплексе, выделенном из культуры клеток гепатоцитов, экспрессирующих минирепликон ВГС [219].

Данный белок также оказывает влияние на метаболизм клетки. В настоящее время обсуждается вопрос об онкогенности NS4B. Так, его экспрессия вместе с Ha-Ras, представителем Ras семейства мембрано-ассоциированных белков, способен передавать сигнал от трансмембранных рецепторов [220], приводит к трансформации клеток [210]. Кроме того, высказано предположение о том, что NS4B, как и NS4A, способен ингибировать экспрессию и ускорять деградацию клеточного активатора транскрипции p21/Waf1 [221].

Наконец, было показано, что NS4A-4B, в отличие от этих белков в индивидуальном состоянии, ингибирует транспорт из ЭР в аппарат Гольджи [222]. Это приводит к снижению количества на мембране основного комплекса гистосовместимости первого класса и уменьшению секреции цитокинов, что может влиять на иммунный ответ на инфекцию ВГС.

## БЕЛОК NS5A

Белок NS5A представляет собой цинк-содержащий [223] фосфопротеин. В случае генотипа ВГС 1a NS5A выделяется в из эукариотических клеток исключительно в фосфорилированной (p56) форме [224], в то время как в случае генотипа 1b представлен как фосфорилированной (p56), так и гиперфосфорилированной (p58) формами [224, 225]. Посттрансляционное фосфорилирование NS5A происходит [226] по остаткам серина и, в меньшей степени, треонина [225–227]. Основными сайтами фосфорилирования являются остатки в центральной и С-концевой областях белка [228]: Ser2321 [229] и Ser2194 [230], а гиперфосфорилирования – остатки серина 2197, 2201 и/или 2204 (номера аминокислотных остатков указаны как в исходном полипептиде ВГС) [228]. Следует отметить, что гиперфосфорилирование происходит при участии других неструктурных белков ВГС: NS4A [216, 217, 225], активной NS3 протеазы [217] и NS4B [216, 217], причем данные белки должны присутствовать в той же полипептидной цепи, что и NS5A [216, 217]. Важным для гиперфосфорилирования является участок, предшествующий 2140 аминокислотному остатку [231].

Данные о протеинкиназе, фосфорилирующей NS5A, показывают, что содержание последней в клетке не зависит от клеточного цикла [232], а ее субстратами являются также казеин [233] и, по некоторым данным, гистон H1 [233, 229]. Анализ фосфорилирования NS5A белка в присутствии различных ингибиторов протеинкиназ позволил предположить, что данная протеинкиназа скорее всего принадлежит к семейству CMGC, в которое входят казеинкиназа II, киназа гликогенсинтазы 3а также пролин-направляемые киназы, такие как киназа гликогенсинтазы 3, циклин-зависимые (CDK) и митоген-активируемые (MAPK) киназы [226, 227, 234]. В пользу последнего предположения свидетельствует тот факт, что сайт базового фосфорилирования по Ser2321 (PLPPRS<sup>2321</sup>PPVPPR) содержит большое количество остатков пролина [229]. Однако анализ NS5A-ассоциированной киназы при помощи анти-MAPK антител дал отрицательный результат [229]. Кроме того, в отличие от CDK, неизвестная киназа обладает большей активностью в присутствии  $Mn^{2+}$ , чем в присутствии  $Mg^{2+}$ . Киназа гликогенсинтазы 3 не столь специфична к наличию остатка пролина в +1 положении по отношению к фосфорилируемому серину, тогда как NS5A-ассоциированный фермент весьма специфичен в данном отношении [229].

В пользу кандидатуры казеинкиназы II в качестве NS5A-ассоциированной киназы служат совпадение их молекулярных весов и одинаковой кинетики их ингибирования. Кроме того, в экспериментах *in vitro* было доказано фосфорилирование NS5A казеинкиназой

II [232, 235] (а также каталитической субъединицей сАМР-зависимой протеинкиназы [233]).

NS5A является цитоплазматическим белком [236, 237], локализованным в ЭР [238]. В то же время в последовательности белка NS5A присутствует положительно заряженный домен, ограниченный остатками пролина и валина (PPRKKRTVV), который характерен для сигналов ядерной локализации (остатки 2326–2334) [228, 236]. В связи с этим локализация NS5A объясняется наличием у него на N-конце  $\alpha$ -спирального участка длиной 27 аминокислотных остатков, ответственного за удержание белка в цитоплазме [238–241]. Удаление данного фрагмента приводит к транспорту NS5A в ядро [239] (рис. 8).

Белок NS5A принимает участие в репликации ВГС, являясь компонентом репликационного комплекса [242]. В экспериментах *in vitro* NS5A связывался с вирусной РНК-полимеразой (NS5B), что приводило к ингибированию последней [243]. Кроме того, колокализация этих белков в клетке обеспечивается их взаимодействием с разными доменами белка hVAP-33 (human vesicle-associated protein) [244, 245]. Гиперфосфорилирование NS5A приводит к его высвобождению и, как следствие, ингибированию вирусной РНК-полимеразы [246].

NS5A оказывает влияние на транскрипцию [247–249]. Так, гибридный белок, состоящий из ДНК-связывающего домена (DBD), активатора транскрипции дрожжей GAL4 и NS5A с удаленными с N-конца 129 аминокислотными остатками (DBD-GAL4-NS5A), показал высокую активность в культурах клеток при транскрипции гена  $\beta$ -галактозидазы *E. coli* [247–249]. Показано также взаимодействие NS5A с такими клеточными транскрипционными факторами, как SRCAP [250].

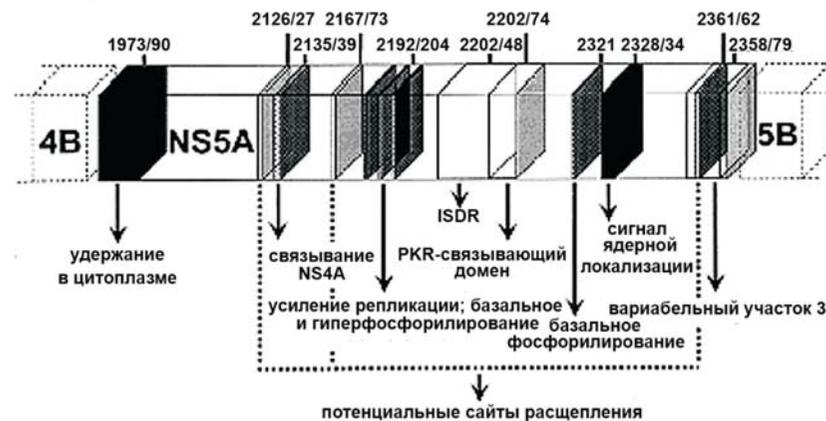


Рис. 8. Функциональная карта белка NS5A.

NS5A, по-видимому, играет ключевую роль в опосредовании эффектов интерферона  $\alpha$ . Известно, что у инфицированных ВГС полный ответ к терапии интерфероном  $\alpha$  возникает лишь у части пациентов, при этом наибольшей устойчивостью обладает вирус генотипа 1b [251]. В структуре NS5A была выделена пептидная последовательность 2209–2248, определяющая чувствительность к интерферону (interferon-sensitivity determining region, ISDR), мутации которой в случае генотипа 1b коррелируют с ответом ВГС на терапию интерфероном  $\alpha$  [252, 253]. Среди больных данной субформой гепатита С, первичная структура ISDR у которых идентична природной или содержит не более одной мутации, не наблюдается длительного ответа на терапию. Полный ответ возникает у большей части пациентов, ISDR которых содержал от 5 до 10 мутаций (для генотипа 1b), а также в случае ISDR дикого типа 1a и 2a генотипов. Интересно, что повышение количества мутаций в этом регионе у NS5A, укороченного с N-конца, приводит к существенному повышению транскрипционной активности [254]. В то же время в ряде сообщений говорится об отсутствии полной корреляции между последовательностью ISDR генотипа 1b и чувствительностью вируса к интерферону [255–260]. Авторы работы [261] предположили, что структура ISDR NS5A коррелирует с ранним, но не с продолжительным ответом вируса на терапию интерфероном.

Один из механизмов вирусной устойчивости к интерферону заключается в ингибировании интерферон-индуцируемой протеинкиназы PKR, являющейся медиатором вызванного интерфероном антивирусного действия [262]. Активация данного фермента достигается при связывании вирусных двуцепочечных РНК, следствием чего является активация интерферон-регулируемого фактора (IRF-1), стимулирующего образование антивирусных и антипролиферативных агентов [263]. Кроме того, PKR катализирует фосфорилирование  $\alpha$ -субъединицы фактора инициации трансляции eIF2, в результате чего блокируется трансляция. В случае ВГС обнаруживается корреляция между эффективностью его репликации и блокированием PKR-опосредованной активации IRF-1 [164]. Последнее наблюдается при взаимодействии NS5A с каталитическим доменом PKR киназы, следствием чего является подавление ее активности, причем для реализации данного взаимодействия необходимым, хотя и недостаточным, является наличие в структуре вирусного белка ISDR [165, 266–268]. В то же время было показано, что NS5A и PKR не колокализуются, и экспрессия NS5A не сказывается ни на экспрессии, ни на функциях PKR [269]. Авторы данной работы допускают возможность локального действия NS5A, приводящего к ингибированию PKR вблизи репликационного комплекса ВГС (рис. 9).

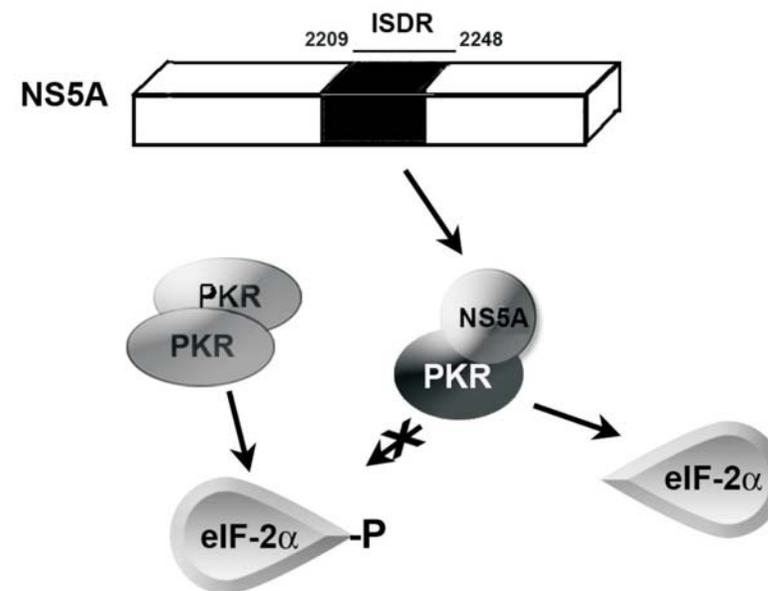


Рис. 9. Роль ISDR-последовательности в белке NS5A.

Описанный выше механизм устойчивости к терапии интерфероном, связанный с ингибированием PKR, по-видимому, объясняет быстрый, но не долгосрочный ответ [261]. По-видимому, должен существовать другой NS5A-опосредованный механизм противодействия антивирусному действию интерферона. Таким альтернативным механизмом является усиление экспрессии интерлейкина 8 (IL-8) [270, 271] — цитокина, ингибирующего антивирусное действие интерферона [272]. Увеличение количества IL-8 наблюдается как в культуре клеток, экспрессирующих NS5A [270], так и в сыворотке крови пациентов, инфицированных ВГС [271]. Ранее было показано, что активация промотора IL-8 под действием фактора некроза опухолей TNF- $\alpha$  происходит при участии таких факторов транскрипции, как NF $\kappa$ B, AP-1 и NF-IL-6 [273]. В случае экспрессии NS5A индукция IL-8 осуществляется с участием NF $\kappa$ B и, в меньшей степени, AP-1, а NF-IL-6 ингибирует данный процесс [270].

Все больше данных свидетельствует о способности NS5A к нарушению клеточных сигнальных путей. В составе NS5A содержатся пролин-богатые последовательности PXXP, высококонсервативные среди различных изолятов ВГС [274]. Они способны связываться с Src-гомологичными (SH)3 доменами, обнаруживаемыми у тирозинкиназ Src-семейства, а также таких сигнал-передающих молекул, как

Grb2, Crk2 и т.п. [275]. К настоящему времени показано, что NS5A способен селективно связываться с SH3 доменами тирозинкиназ Hck, Lck, Lyn (которые он ингибирует) и Fyn (активирует) [276] и Grb2 (growth factor binding protein) [274, 287]. Последний участвует в передаче сигнала от рецепторов, взаимодействующих с факторами роста и цитокинами, к GTPазе Ras с последующей активацией митоген-активируемых протеинкиназ (МАРК) [275]. МАРК участвуют в фосфорилировании факторов транскрипции, объединенных общим названием активаторных белков 1 (AP1) [278]. Таким образом, появление в клетке NS5A приводит к уменьшению активности AP1 и, как следствие, блокированию передачи сигнала цитокинов и факторов роста [278].

NS5A способен блокировать апоптоз, причем различными путями. Упомянутая выше протеинкиназа PKR является опухолевым супрессором [279], а также фактором, принимающим участие в регуляции транскрипции и ряде апоптотических программ делящихся клеток [280]. Показано, что взаимодействие NS5A с PKR приводит не только к обсуждавшемуся выше уменьшению антивирусного ответа, но и блокированию апоптоза, вызываемого аналогом двуцепочечной РНК – poly(I-C), и трансформации клеток, имплантация которых мышам приводит к возникновению опухолей [267]. Однако следует заметить, что, по другим данным, при экспрессии NS5A в мышцах под контролем гепатоцит-специфичного промотора возникновения опухолей не наблюдалось, что свидетельствует о различиях в клеточных и животных моделях [242].

NS5A способствует также блокированию апоптоза путем связывания с p85-субъединицей фосфатидилинозитол-3-киназы (PI3K), которая также является одним из звеньев пути передачи сигнала от рецепторов [281, 282, 275]. Подобное взаимодействие при одновременном действии эпидермального гормона роста приводит к фосфорилированию PI3K под действием треониновых протеинкиназ, активации АКТ серин/треонин протеинкиназы с последующим фосфорилированием серина BAD, относящегося к Bcl2 семейству проапоптотических белков.

Имеются данные о блокировании NS5A TNF-зависимого апоптоза посредством нарушения передачи сигнала от рецептора к фактору транскрипции NFκB [283]. NS5A взаимодействует с TRADD (TNF receptor-associated death domain), препятствуя ассоциации последнего с FADD (FAS-associated death domain) [283], и, кроме того, связывается с TRAF2 (TNF receptor-associated factor) [284]. Эти взаимодействия блокируют передачу сигнала от TNF-рецептора и ингибируют активацию фактора транскрипции NFκB под действием TNF. Показано также, что NS5A препятствует развитию TNF-α опосредованного апоптоза, блокируя активацию каспазы 3 [285].

Экспрессия NS5A также приводит к трансформации клеток вследствие понижения транскрипции p21/Waf1 [286, 287], способного ингибировать CDK и блокировать клеточный цикл, и трансактивации транскрипции PCNA – компонента репликационного аппарата эукариотических клеток [288]. Регуляция транскрипции p21/Waf1 может осуществляться с участием белка p53: последний способен повышать уровень p21 [289]. NS5A взаимодействует с N-концевым доменом p53, удерживает его на околоядерной мембране и, таким образом, способствует понижению транскрипции p21 [286, 290, 287]. Аналогично NS5A связывает в околоядерном пространстве hTAF(II)32-компонент TFIID, представляющий собой коактиватор p53 [290], и TATA-связывающий белок (ТБВ), который также способен связываться с p53 [287].

В заключении следует отметить, что влияние отдельно экспрессированного NS5A и репликона ВГС на метаболизм клетки и на ее чувствительность к интерферону различно. Так, при экспрессии NS5A происходит блокирование индукции четырнадцати интерферон-индуцируемых генов, в то время как в клетках, инфицированных репликоном, таких генов только два [291]. Таким образом, очевидно, что неструктурные белки вируса, и NS5A в частности, способны противодействовать антивирусному действию интерферона по независимому от PKR механизму, однако их роль при репликации вируса может быть иной.

#### РНК-ЗАВИСИМАЯ РНК-ПОЛИМЕРАЗА (NS5B)

Анализ генома ВГС показал, что неструктурный белок NS5B (м.в. 65 кДа) содержит структурный мотив GDD, характерный для всех ДНК- и РНК-полимераз. Впоследствии было показано, что NS5B, экспрессированный в *E. coli* или в клетках насекомых (при помощи рекомбинантного бакуловируса), обладает РНК-полимеразной активностью [292] и способен реплицировать полный геном ВГС.

Пространственная структура RdRP соответствует структуре «правой руки» [293–295], описанной впервые в случае фрагмента Кленова ДНК полимеразы I *Escherichia coli* [296] и характерной для большинства односубъединичных ДНК- и РНК-полимераз. В таких структурах принято выделять так называемые субдомены «ладонь», «пальцы» и «большой палец» (рис. 10) [296]. Активный центр RdRP расположен в основании «ладони», где находятся каталитические остатки аспарагиновой кислоты. Уникальным структурным элементом является β-петля, взаимодействующая с С-концевым фрагментом полипептидной цепи и «загораживающая» вход в активный центр фермента [297]. Характерной чертой полимеразы является также наличие особого сайта связывания GTP, расположенного на расстоянии 30 Å от активного центра, чья роль в настоящее время неясна [298].

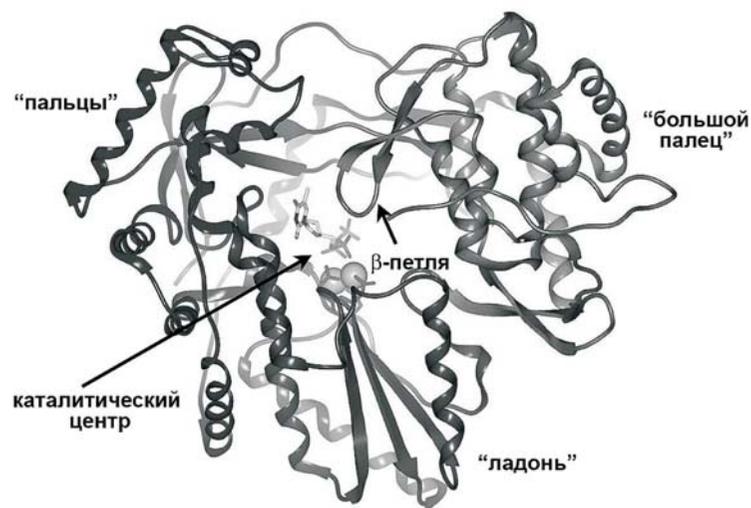


Рис. 10. Пространственная структура NS5B (РНК-зависимая РНК-полимеразы).

NS5B, подобно другим белкам ВГС, локализуется на мембране ЭР, что обеспечивается наличием на С-конце полипептидной цепи  $\alpha$ -спирального трансмембранного домена, состоящего из 21 гидрофобного аминокислотного остатка [299].

NS5B, экспрессированный в культурах эукариотических клеток, фосфорилируется protein kinase C related kinase 2 (PRK) [300], а также (*in vitro*) и PKR [235].

RdRP ВГС способна катализировать синтез РНК по праймер-зависимому и праймер-независимому (*de novo*) механизмам [294]. Праймер-зависимая полимеразная активность была показана на разнообразных гомо- и гетерополимерных праймер-матричных комплексах. Особенностью фермента является предпочтение коротких (2–3 нуклеотида) праймеров, что по-видимому обуславливается наличием  $\beta$ -петли в активном центре, понижающей эффективность связывания более длинных рибоолигонуклеотидов и служащей механизмом обеспечения селективной репликации вирусного генома [301]. Удаление данной петли или взаимодействующего с ней С-концевого домена приводит к повышению активности фермента [302].

Праймер-независимый синтез РНК наблюдается исключительно при репликации вирусной и сходных с ней по структуре РНК. Фермент способен селективно связываться с Х-РНК (+)-цепи и инициировать репликацию (не непосредственно с 3'-конца матрицы, но с нуклеотидов, входящих в состав шпильки SL-1) [303]. В то же время имеются данные о том, что инициация может происходить и с поли(U)-богатой

последовательности, также расположенной в 3'-UTR [304]. Репликация (-)-цепи вирусной РНК инициируется с последовательности, комплементарной (+)-IRES. Следует отметить корреляцию между большей эффективностью *de novo* синтеза (-)-IRES по сравнению с (+)-3'-UTR и большей концентрацией (+)-РНК по сравнению с (-)-цепью [304].

В литературе также было описано, что RdRP ВГС способна инициировать синтез РНК по механизму *de novo* и на коротких гетерогенных РНК различной длины, как правило, соответствующих 3'-концу описанной выше матрицы [305]. В данных системах синтез РНК начинается с формирования инициаторного динуклеотида, комплементарного непосредственно 3'-концевой последовательности. Однако эффективность данной реакции мала: элонгации образовавшегося динуклеотида не происходит и никаких продуктов, помимо динуклеотида, не образуется. Возможно, что для проведения эффективной элонгации праймера необходим конформационный переход фермента.

Поскольку RdRP способна катализировать как праймер-зависимый, так и праймер-независимый синтез РНК, особый вопрос вызывает механизм переключения между ними. Замена  $Mg^{2+}$  на  $Mn^{2+}$  приводит к понижению  $K_m$  для инициаторного NTP в синтезе *de novo* и, как следствие, повышению эффективности инициации [306]. При этом для инициации по данному механизму концентрация GTP должна быть на порядок выше концентрации остальных NTP. В таких условиях обеспечивается практически полное ингибирование праймер-зависимого синтеза. Следует отметить, что аллостерический сайт связывания GTP не играет роли в данном процессе. Для инициации синтеза важны С-концевой домен и  $\beta$ -петля фермента, которые участвуют в ингибировании реакции элонгации праймера [307].

На данный момент открытым является вопрос о наличии у RdRP безматричной терминальной трансферазной активности (TNT-активность). С одной стороны, рекомбинантная Р-РНКП, полученная в прокариотических и эукариотических системах экспрессии, обладала TNT-активностью, а замена высококонсервативного (каталитического) мотива GDD на GAA приводила к исчезновению как полимеразной, так и TNT-активностей [308]. Однако данная активность обнаруживалась и в эукариотических клетках, не содержащих гена NS5B. С другой стороны, описаны примеры выделения NS5B, экспрессированной как в прокариотических, так и в эукариотических системах, не обладающей TNT-активностью [309]. Совокупность полученных данных с большей вероятностью позволяют предположить, что RdRp ВГС скорее всего не обладает TNT-активностью.

RdRP ВГС обладает способностью к олигомеризации. Введение точечных мутаций, делающих ее невозможной, приводит к неактивной

форме фермента [310, 311]. Показано также ингибирование NS5B дикого типа высокими концентрациями неактивного мутанта NS5B-Δ51GAA. В связи с этим можно предположить, что низкая активность RdRP ВГС по сравнению с другими РНК полимеразми может объясняться олигомеризацией с неактивными молекулами фермента в препарате [311], приводящей к низкой доле каталитически компетентных молекул фермента [312]. Олигомеризация уменьшает термическую инактивацию RdRP [311, 313] и может быть связана с регуляцией праймер-зависимой и праймер-независимой (*de novo*) активностей.

NS5B является основным компонентом репликативного комплекса ВГС, полный состав которого пока не определен. К настоящему времени показано, что NS5B непосредственно взаимодействует с другими неструктурными белками ВГС, в частности хеликазой NS3 [198], кофактором NS4A [314] и NS5A. В отсутствие NS3 происходит образование РНК, соответствующей по размеру (-)-3'-UTR, тогда как в его присутствии наблюдается аккумуляция нового высокомолекулярного продукта, количество которого увеличивается пропорционально соотношению NS3:NS5B (также пропорционально происходит увеличение активности RdRP). Белок NS4B также влияет на активность RdRP, образуя комплекс с NS3 и при этом подавляя образование высокомолекулярного продукта. Взаимодействие NS4B с хеликазным доменом NS3 ингибирует НТРазную активность последнего и в итоге приводит к селективному образованию продукта, соответствующего по длине (-)-UTR' вирусной РНК. Таким образом, NS4B является отрицательным регулятором NS3, препятствующим его воздействию на полимеразную активность NS5B [198].

Нефосфорилированный белок NS5A (полученный в бактериальной системе экспрессии), в менее чем 0,1 эквимольном количестве слабо стимулирует РНК-полимеразную активность NS5B, а при дальнейшем увеличении его концентрации наблюдается концентрационная зависимость ингибирования полимеразной активности NS5B [143]. Как описано выше, подобный эффект может происходить в клетке при гиперфосфорилировании NS5A с последующей его диссоциацией от hVAP-33 и взаимодействии с закрепленной на этом же белке полимеразой [244, 245].

Показано также действие ряда белков клетки-хозяина на активность NS5B. Среди них — фактор инициации трансляции eIF4AII, обладающий хеликазной активностью [315]. Нуклеолин связывается с NS5B, в последовательности которого есть два участка связывания с RdRp, один из которых участвует в олигомеризации, необходимой для регулирования полимеразной активности. Связывание нуклеолина с С-концевым участком RdRP ингибирует полимеразную активность, что позволяет предположить участие данного клеточного белка

в репликации вируса [316]. Другим белком, взаимодействующим с NS5B, является α-актинин. Методом генного нокаута при помощи малых интерферирующих РНК показано, что он необходим для репликации вирусного генома и, возможно, является частью репликационного комплекса [316].

Деградация NS5B в клетке происходит посредством его связывания с убиквитин-подобным белком hPLIC1, следствием чего является убиквитинилирование и последующий протеолиз NS5B [317].

## V. ЖИЗНЕННЫЙ ЦИКЛ ВГС

Исследования жизненного цикла ВГС затрудняются отсутствием адекватных моделей. Так, при культивировании клеток, выделенных из тканей пациентов, а также в экспериментах по инфицированию ВГС клеточных линий был отмечен крайне низкий уровень репликации вируса [318]. Это приводило к необходимости применения ОТ-ПЦР для количественного измерения титра вируса как (-)-цепи вирусной РНК. Кроме того, эти клеточные культуры характеризуются низкой воспроизводимостью и малым периодом репликации вируса. Единственной распространенной клеточной системой является искусственный вирусный репликон, представляющий собой (+)-цепь вирусной РНК, у которой структурная область заменена на ген устойчивости к неомицину, и, кроме того, область внутренней посадки рибосомы (IRES) заменена на таковую вируса энцефаломиокардита [319].

Среди животных только шимпанзе представляют хорошую модель для изучения ВГС [320]. Кроме того, рядом научных групп в мире были созданы иммунодефицитные мыши с химерной печенью человека, у которых происходит репликация ВГС [321, 322]. Существует также сообщение о возможности инфицирования родственной приматам тупайи (*Tupaia belangeri chinensis*) [323]. Следует отметить, что в данном случае, как и в случае мышей, существенное повышение уровня вирусии достигается при полном облучении животного [321, 323]. В настоящее время данные модели не получили широкого распространения.

Современные представления о жизненном цикле ВГС суммированы на рис. 11.

### ПРОНИКНОВЕНИЕ ВИРУСНЫХ ЧАСТИЦ В КЛЕТКУ

Первым процессом, связанным с функционированием вируса в организме, является его связывание с соответствующим рецептором с последующим проникновением внутрь клетки. Специфичность рецепторов является одним из факторов, определяющих возможность инфицирования того или иного типа клеток. В настоящее время считается, что основным местом репликации ВГС является печень. Тем не

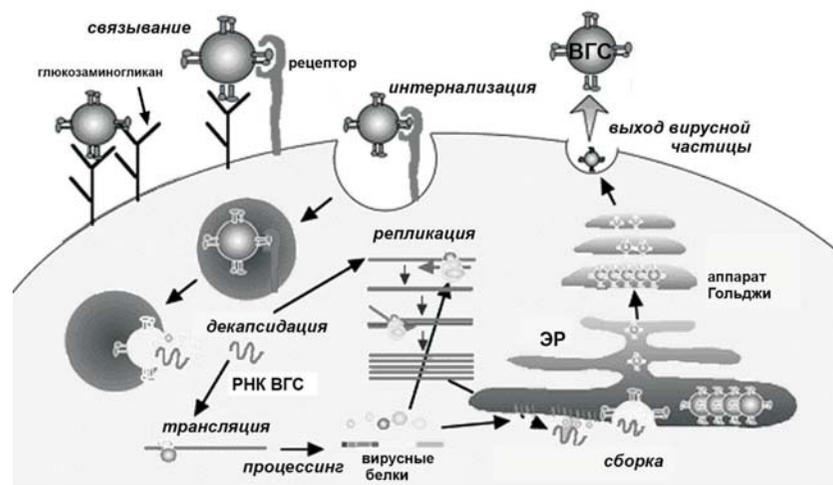


Рис. 11. Жизненный цикл ВГС.

менее, ряд авторов полагает, что вирус способен также поражать клетки других типов (В-клетки и моноциты/макрофаги).

Изучение взаимодействия ВГС с клеточными рецепторами представляет собой сложную задачу из-за отсутствия клеточной культуры, в которой репликация вируса происходит достаточно эффективно. Поэтому вместо выделенных вирионов в настоящее время используют выделенные гликопротеины ВГС, его белки, включенные в состав другого вируса, вирус-подобные частицы, а также фракции вирусных частиц, выделенные из плазмы крови пациентов.

Наиболее вероятными рецепторами, взаимодействующими с вирусом, являются рецептор CD81 и рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR). Кроме того, было показано, что вирусные частицы взаимодействуют и с гликозаминогликаном, что было косвенно подтверждено частичным ингибированием процесса в результате обработки вируса гепарином или клеток – гепаринлиазой [324, 325].

Белок CD81, являющийся рецептором, экспрессирующимся в клетках многих типов, способен связываться с гликопротеином ВГС E2 *in vitro*. Взаимодействие с гликопротеином осуществляется большой внеклеточной петлей рецептора (LEL). Примечательно, что удаление гипервариабельного участка E2 не сказывается на эффективности связывания [326].

Нерешенным к настоящему времени является вопрос о том, может ли вирусная частица взаимодействовать с данным рецептором, и если да, то приводит ли это к инфицированию клетки. Положительный ответ получен в серии работ по изучению инфекционности реком-

бинантного вируса иммунодефицита, содержащего гликопротеины ВГС. Так, к уменьшению проникновения вируса приводили добавление к культуре клеток растворимого CD81 белка [327] и ингибирование экспрессии рецептора при помощи siRNA. Кроме того, введение гена CD81 белка в гепатоциты HepG2 и HН29, не поражающиеся данным вирусом, приводит к их инфицированию. [328]. Таким образом, данный белок, по мнению авторов этих работ, является как минимум компонентом рецепторного комплекса.

В то же время в большом числе исследований был получен отрицательный ответ. Например, показано, что экспрессии CD81 на поверхности гепатоцитов мыши недостаточно для обеспечения проникновения в них вируса [329]. Кроме того, связывание данного рецептора происходит с E2-белком ВГС, а для слияния с эндосомальной мембраной после эндоцитоза необходимы оба гликопротеина: E1 и E2. Белок E2 способен взаимодействовать и с LEL CD81 примитивного примата тамарина (*Saguinus oedipus*), причем с большей эффективностью, чем с таковым человека [330, 331]. В то же время вирус не способен инфицировать клетки тамарина. Наконец, экспрессия CD81 человека в мышцах как с сохранением их CD81, так и с нокаутом этого гена, не приводит к поражению мыши ВГС [332]. Роль CD81 в качестве основного рецептора приписывается также в работах [333–339].

Другим вероятным рецептором, взаимодействующим с ВГС, является рецептор липопротеинов низкой плотности (LDLR). Предположение о его роли возникло из того факта, что вирусные частицы, выделенные из плазмы крови пациентов, ассоциированы с этими гликопротеинами. Изначально не поражаемые ВГС клетки COS-7 могут инфицироваться, если в них ввести ген LDLR человека [340]. Косвенно подтверждает роль LDLR во взаимодействии с вирусом и тот факт, что у пациентов уровень ВГС в крови был обратно пропорционален уровню свободных  $\beta$ -липопротеинов, конкурирующих с вирусными, что приводит к уменьшению инфицирования гепатоцитов [341].

К настоящему времени опубликовано большое число работ, посвященных разграничению возможности связывания вируса с этими двумя различными рецепторами. В подавляющем большинстве из них показано, что наиболее вероятным рецептором для ВГС является LDLR, а не CD81. Уровень проникновения вируса в клетку коррелирует с уровнем экспрессии LDLR на ее поверхности и не зависит от экспрессии CD81 [342]. Кроме того, связывание вирусных частиц низкой плотности с клетками, экспрессирующими LDLR, является неконкурентным по отношению к растворимому белку CD81 [342]. Репликация вируса возможна как в клетках Vero, так и в клетках насекомых AP61, хотя клетки Vero экспрессируют CD81, а AP61 – нет [343]. Следует также отметить отсутствие зависимости эффективности

взаимодействия LDLR-экспрессирующих клеток с вирусными частицами от генотипа вируса [344]. В то же время рекомбинантный E2 взаимодействует с CD81 штамм-специфично [345]. Отсутствие взаимодействия между частицами ВГС и рецептором CD81 подтверждает и отсутствие конкуренции инфекционности вируса с анти-CD81 антителами или растворимым CD81-LEL, свидетельствующее в пользу того, что проникновение вируса в клетку происходит с участием иных рецепторов, чем CD81 [346]. Для связывания вирусных частиц низкой плотности с клетками характерна концентрационная зависимость, причем данный процесс ингибируется и анти-E1, и анти-E2 антителами, что говорит об участии обоих гликопротеинов оболочки в проникновении данных вирусных частиц в клетку [347].

В последние годы в литературе сформировалась точка зрения, что связывание ВГС с клеткой с последующим проникновением происходит в результате взаимодействия вирусных частиц с рецепторным комплексом, составленным из нескольких разных рецепторов [328, 348–350]. В то же время ни CD81, ни LDLR недостаточно для обеспечения инфекционности ВГС [349], причем роль CD81 белка при этом может заключаться в обеспечении проникновения вируса, уже связавшегося с мембраной гепатоцита [350].

Наконец, недавно был найден новый рецептор гепатоцитов человека, взаимодействующий с вирусным гликопротеином E2, а именно человеческий рецептор — «мусорщик» (scavenger) класса В второго типа (SR-BI) — рецептор, интернализирующий липопротеины высокой плотности [344]. Следует отметить высокую селективность данного рецептора, выражающуюся в том, что ни его мышинный гомолог SR-BI, ни структурно близкий человеческий рецептор — «мусорщик» CD36 не взаимодействуют с E2. Другой особенностью SR-BI является тот факт, что он может выполнять свою роль исключительно в клетках, экспрессирующих также и CD81 [351].

Гликопротеины оболочки связываются также с лектином С-типа дендритных клеток (DC-SIGN) и его аналогом в клетках печени (L-SIGN/DC-SIGNR) [325, 352]. Частицы ВГС связываются как с L-SIGN, так и с DC-SIGN, но они не могут использовать эти рецепторы для проникновения в клетку. Тем не менее, вирус эффективно передается, когда перmissive клетки Huh-7 культивируются вместе с L-SIGN- или с DC-SIGN-клеточными линиями. Так, L-SIGN может выступать в качестве рецептора в клетках печени, связывающего вирус и передающего его на соседние гепатоциты [353, 354]. Как дендритные клетки, так и клетки эндотелия печени могут выступать в качестве резервуара для вируса [355], поскольку они связываются и с E1 и с E2 [353, 355]. Условием проникновения в клетку также является низкий уровень pH, необходимый для устойчивости комплекса E1-E2 [356].

Рассматриваемая выше роль рецепторов сводилась к созданию возможности проникновения ВГС в клетку. Другая задача взаимодействия с ними вирусных частиц может сводиться к изменению иммунного статуса организма с целью создания возможности персистирующей инфекции [357, 358]. Особая роль в этом процессе принадлежит CD81. Так, было показано, что связывание вируса с CD81 на поверхности клеток человека понижает уровень экспрессии интерлейкина-2, что в конечном итоге приводит к резкому увеличению пролиферации Т-клеток, вносящему вклад в развитие повреждений печени и различных аутоиммунных заболеваний [359]. В то же время связывание белка E2 на CD81 рецепторах NK клеток (natural killer) блокирует их пролиферацию [360], а также приводит к уменьшению продукции интерферона  $\gamma$  [361]. По-видимому, обе эти стратегии направлены на избежание хозяйской защиты и врожденного иммунитета и приводят к переходу заболевания в хроническую форму. Следует отметить более высокий уровень экспрессии CD81 у ВГС-инфицированных по сравнению с здоровыми людьми. Сопровождающий инфекцию рост числа CD5+ В-лимфоцитов сопровождается появлением ревматоидного фактора и криоглобулинов и коррелирует с количеством ВГС. Увеличение экспрессии CD81-рецепторов и количества CD5+ периферических В-клеток у ВГС-инфицированных пациентов может играть важную роль в развитии ассоциированных с вирусом аутоиммунных и лимфопролиферативных заболеваний [358, 362].

С другой стороны, взаимодействие между гликопротеином E2 и CD81-рецептором, приводящее к аутоиммунным заболеваниям, может служить мишенью для антивирусной терапии. К настоящему времени было показано, что основной анти-ВГС препарат — интерферон  $\alpha$  значительно уменьшает количество CD81 на поверхности клеток *in vitro* и *in vivo*. Экспрессия CD81 коррелирует с генотипом ВГС и, тем самым, с вирусным ответом пациентов с хроническим заболеванием [363]. Кроме того, существует прямая корреляция между эффективностью терапии интерфероном и эффективностью связывания гликопротеинов E2 различных изолятов с CD81 рецептором [364].

#### РЕПЛИКАЦИЯ ВГС

Синтез (+)-цепи вирусной РНК инициируется с участка, комплементарного (+)-5'-UTR, называемого также (-)-IRES, который в данном случае выполняет ту же роль, что и (+)-3'-UTR [34, 365] (рис. 3Б). Следует также отметить, что первая и вторая шпильки в его составе выполняют при репликации роль негативного и позитивного регуляторов соответственно [365]. Кроме того, было высказано предположение о том, что эти элементы необходимы и достаточны для репликации вирусной РНК и являются цис-действующими элементами [366].

Кроме вирусных белков, 3'-UTR взаимодействует также с рядом клеточных факторов, что может вносить вклад в эффективность и регуляцию репликации и трансляции. Так, гетерогенный ядерный рибонуклеопротеин hnRNP-I/PTB, способный связываться с полипиримидиновыми последовательностями, взаимодействует с 3'-UTR (+)-цепи вирусной РНК, причем для такого взаимодействия необходим не только полипиримидиновый участок, но и «шпильки» II и III X-РНК (рис. 3Б) [367–370]. Кроме того, было показано взаимодействие (+)-3'-UTR с глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой [371], а также рибосомными белками L22, L3 и S3 [372] и неизвестными белками молекулярной массы 38 [367], 58 [370], 87 и 130 кДа.

Другой нетранслируемый элемент – 5'-UTR, также способен взаимодействовать с некоторыми клеточными и вирусными белками. Так, связывание с ним С-белка ВГС является одной из стадий в сборке вирусной частицы. Кроме того, было показано, что 5'-UTR взаимодействует с аутоантигеном La [373], ядерным рибонуклеопротеином L (hnRNP L) [374], поли(С)-связывающим белком [375], а также белками молекулярной массы 25 [376] (впоследствии идентифицированным как один из белков рибосомы) [377], 87 и 120 кДа и рядом факторов инициации трансляции.

#### ТРАНСЛЯЦИЯ РНК ВГС

Как уже упомянуто выше, инициация трансляции у ВГС происходит с четвертого AUG кодона 5'-UTR, кодирующего IRES, то есть по кэп-независимому механизму [29, 30] (рис. 3А). В настоящий момент ведутся интенсивные исследования структуры 5'-UTR, необходимой и достаточной для инициации трансляции. Ряд авторов утверждает, что для трансляции необходимы и достаточны первые 125 нуклеотидов, хотя ее эффективность в данном случае является крайне невысокой [378]. По другим данным, удаление шпильки I (см. рис. 3А) приводит к повышению эффективности трансляции, а удаление нуклеотидов, предшествующих домену II, на ней не сказывается [379]. В то же время в ранних работах было предположено, что данный структурный элемент способствует стабилизации правильной вторичной структуры, необходимой для трансляции [24], и впоследствии показано, что изменение ее структуры путем введения мутаций или удаления некоторых нуклеотидов приводит к уменьшению эффективности трансляции [380]. Для эффективной трансляции необходимы домены II [24, 381] и III [381], псевдоузел, образованный «шпилькой» III с последовательностью, предшествующей шпильке IV [382], и участок, непосредственно предшествующий инициаторному AUG кодону [381]. Следует отметить, что мутации, повышающие стабильность

шпильки IV, приводят к ингибированию кэп-независимой трансляции, тогда как дестабилизирующие, напротив, восстанавливают ее эффективность [383]: таким образом, данный структурный элемент может принимать участие в регуляции трансляции. Кроме того, ряд авторов утверждает, что участок, следующий за инициаторным AUG кодоном (5'-концевая область С-белка), необходим для инициации трансляции [381, 384, 385].

Инициация трансляции клеточных мРНК начинается с взаимодействия eIF4E – кэп-связывающей субъединицы eIF4F с m<sup>7</sup>G кэпом, связыванием 43S комплекса (40S субъединица рибосомы/eIF2/GTP/Мет-тРНК и eIF3) с мРНК с участием дополнительных факторов – eIF4A (хеликазы) и eIF4B, и продвижением комплекса к AUG кодону с образованием 48S инициаторного комплекса. В случае кэп-независимой трансляции ВГС 43S комплекс взаимодействует с AUG-кодоном без участия eIF4A, eIF4B и eIF4F, и данный процесс не зависит от гидролиза АТФ [386–388]. 40S субъединица рибосомы прочно и специфично связывается с II и III доменами [389] IRES так, что Р-сайт располагается в непосредственной близости от AUG кодона. При этом добавления eIF2/GTP/Мет-тРНК оказывается достаточным для закрепления связанной 40S субъединицы с инициаторным кодоном [387, 390, 391], кроме того, γ-субъединицы eIF2 (eIF2γ и eIF2γ) взаимодействуют и с IRES [392]. Следует также отметить, что инициация трансляции в случае IRES ВГС не включает в себя поиск AUG кодона после первоначального прикрепления [393, 394]. Фактор eIF3 не является необходимым для образования 48S комплекса [395], тем не менее он связывается со свободной 40S субъединицей рибосомы в цитоплазме. Кроме того, eIF3 способен связываться и с IRES, и его сродство к двум разным компонентам инициаторного комплекса может вносить вклад в эффективность и селективность образования последнего [388, 391, 396, 397].

Инициация трансляции у прокариот включает независимое от дополнительных факторов связывание малой субъединицы рибосомы с мРНК как результат взаимодействия между последовательностью Шайн-Дальгарно у мРНК и комплементарными последовательностями 16S рРНК [386]. В случае ВГС взаимодействия между IRES и 16S рРНК к настоящему времени не выяснены [398].

Увеличение эффективности инициации трансляции было также показано при связывании IRES с клеточным фактором РТВ, принимающем, как предполагается, участие в кэп-независимой трансляции [399]. Антиген La [373, 400] связывается с 5'-UTR селективно в районе инициаторного AUG кодона, улучшает связывание IRES с рибосомальным белком S5 и, тем самым, способствует сборке рибосом и

увеличивает эффективность трансляции [401–403]. Вызываемое интерфероном  $\alpha$  уменьшение количества La белка приводит к ингибированию трансляции ВГС *in vivo* [404]. Кроме того, на эффективность трансляции, возможно, могут влиять и другие белки, взаимодействующие с IRES: ядерный рибонуклеопротеин L (hnRNP L) [374], поли(С)-связывающий белок [375], рибосомальный белок S9 [376, 377, 405], нуклеолин (ядерный РНК-связывающий белок) [406], а также неидентифицированные белки с молекулярной массой 87 и 120 кДа. К ингибированию трансляции приводит связывание с  $\alpha$ -субъединицей протеосомы PSMA7 [407]. Немногочисленные и противоречивые данные свидетельствуют о том, что и вирусные белки также способны стимулировать или ингибировать кэп-независимую трансляцию [218, 213]. Ряд данных [408, 409] свидетельствуют о том, что изменения в 3'-UTR, кроме того, влияют на эффективность трансляции.

Эффективность трансляции зависит и от генотипа ВГС. Так, эффективность IRES генотипа 2b (наиболее активного) превышает активность IRES генотипа 6a (наименее активного) в три раза [410]. Кроме того, различия в эффективности трансляции частиц, выделенных из разных органов, могут быть связаны с точечными мутациями 5'-UTR [411, 412]. В то же время следует отметить, что вариабельность первичной структуры IRES не сказывается на эффективности противовирусной терапии [413].

Наконец, показана зависимость эффективности трансляции от фазы клеточного цикла. Так, максимальная эффективность трансляции ВГС в гепатоцитах Huh7 достигается во время митоза (М-фазы), в то время как минимальная – во время фаз покоя G(0) [414]. В то же время имеются данные, согласно которым максимум и минимум трансляции ВГС в культуре клеток почек человека HEK293 достигается во время G1 и S и G2/M-фаз соответственно [415].

#### ПРОТЕОЛИТИЧЕСКИЙ ПРОЦЕССИНГ И СБОРКА ВИРУСНОЙ ЧАСТИЦЫ

Геном ВГС содержит одну открытую рамку считывания, кодирующую полипротеин длиной 3011 аминокислотных остатков, в результате ко- и посттрансляционного процессинга которого образуются 10 структурных и неструктурных белков (рис. 2) [416]. При этом протеолитическое расщепление в некоторых сайтах может быть неполным, что выражается, например, в присутствии двух форм E2-белка (E2 и E2-p7) [146] и трех форм С-белка (две p19-21 и одна p21-23, см. выше, а также [43, 44, 66, 143, 416]). Возможность образования нескольких форм белков в результате протеолиза может играть определенную роль в выполнении их разнообразных функций во время репликации и сборки ВГС [66]. Как указывалось выше [156, 157, 417], протеазной ак-

тивностью обладают два неструктурных белка ВГС: NS2/3 (цинк-зависимая металлопротеиназа [159, 161]) и NS3 (сериновая протеиназа [123, 418, 419]). Протеолиз в сайтах С/Е1, Е1/Е2, Е2/р7 и р7/NS2 происходит под действием клеточных сигнальных пептидаз, локализованных в ЭР [44, 420], NS2/NS3 – в результате автокатализа [156–159], а NS3/NS4A, NS4A/NS4B, NS4B/NS5A и NS5A/NS5B – посредством катализа комплекса вирусной сериновой протеазы NS3 с кофактором NS4A [41, 92, 168, 180, 181, 421]. Процессинг NS3/NS5B пептида происходит в следующей последовательности: на первой стадии происходит быстрое образование NS3 и NS5B, а также полипептида p89, который затем расщепляется на NS5A и p31; последний дает окончательные продукты NS4A (p7) и NS4B (p27) [173]. Следует отметить, что если расщепление сайта NS2/NS3 предшествует данным превращениям, скорость последних резко увеличивается [166]. Имеются также данные о протеолизе NS3 белка с образованием NS3A (p49) и NS3B (p23) под действием клеточных протеаз [422].

Процесс сборки вирусной частицы остается наименее изученным, в первую очередь в силу отмечавшегося выше отсутствия адекватных клеточных моделей. Опираясь на массив имеющихся (достаточно разрозненных) данных, можно предполагать, что формирование вирусных частиц, вероятно, начинается с взаимодействия С-белка ВГС с синтезированной вирусной РНК. В результате достигается не только упаковка РНК, но и репрессия трансляции с IRES, что указывает на наличие потенциального механизма переключения «программы» с репликации/трансляции на сборку. При этом в первую очередь молекулы С-белка взаимодействуют друг с другом своими N-концевыми участками [70]. В N-концевой последовательности выявлен участок 82–102, обогащенный остатками триптофана и, по-видимому, ответственный за это взаимодействие [71]. Следует отметить, однако, что соответствует ли образующаяся структура вирусному нуклеокапсиду или она представляет собой относительно неспецифичный рибонуклеопротеидный комплекс, остается невыясненным.

Типичной особенностью поверхностных гликопротеинов ВГС (Е1 и Е2) при гетерологичной экспрессии в клеточных культурах является их локализация в ЭР [121]. Эта локализация определяется сигнальными последовательностями в трансмембранных областях Е1 и Е2 [127, 423]. Эти данные указывают на то, что присоединение оболочки к нуклеокапсиду происходит при миграции через мембрану ЭР. В этом случае вирус может выходить из клетки по классическому секреторному пути. В соответствии с этим предположением, сложные N-гликаны обнаруживаются на поверхности частично очищенных вирусных частиц, что предполагает транзит вируса через аппарат Гольджи [8].

## VI. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Хотя со времени определения структуры генома ВГС прошло всего лишь немногим более десяти лет, за это время наши представления о функционировании этого вируса и вызываемого им опаснейшего заболевания существенно расширились, тем не менее многие детали протекающих процессов остаются по-прежнему невыясненными. Предстоят еще значительные усилия по выяснению структуры вириона, ранних и, в особенности, поздних стадий жизненного цикла ВГС, механизма и регуляции репликации вирусного генома и процессинга полипептида-предшественника. Такого рода исследования, безусловно, приведут к принципиально новым стратегиям предотвращения инфекции и терапии гепатита С. Уже сейчас проходят испытания или активно обсуждаются новые потенциальные антивирусные агенты. Среди них блокаторы связывания вируса с рецептором, ингибиторы трансляции, направленные на связывание с IRES (например рибозимы или антисмысловые нуклеотиды), ингибиторы протеазной и хеликазной активностей белка NS3 и, пожалуй в первую очередь, ингибиторы РНК-полимеразы. Продолжаются также попытки создания анти-ВГС вакцин разных типов. К сожалению, все эти исследования по-прежнему сдерживаются отсутствием адекватных систем тестирования. Система минирепликона, хотя и внесшая огромный вклад в прогресс этих исследований, все же не лишена недостатков, главным из которых является отсутствие образования вирусных или псевдовирусных частиц, что лишает исследователей возможности в деталях изучать процессы сборки вируса и его взаимодействия с клеткой-мишенью. Отсутствие дешевых животных моделей также сдерживает испытания новых антивирусных препаратов. Не вызывает сомнений, что создание эффективной стратегии борьбы с гепатитом С зависит прежде всего от решения этих задач.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium (1999) *J. Viral. Hepat.*, **6**, 35–47.
2. Seeff, L.B., Hoofnagle, J.H. (2003) *Clin. Liver Dis.*, **7**, 261–287.
3. Nocente, R., Ceccanti, M., Bertazzoni, G., Cammarota, G., Silveri, N.G., Gasbarrini, G. (2003) *Hepatogastroenterology*, **50**, 1149–1154.
4. Davis, G.L., Esteban-Mur, R., Rustgi, V., Hoefs, J., Gordon, S.C., Treppe, C., Shiffman, M.L., Zeuzem, S., Craxi, A., Ling, M.H., Albrecht, J. (1998) *N. Engl. J. Med.*, **339**, 1493–1499.
5. Rosenberg, S. (2001) *J. Mol. Biol.*, **313**, 451–64.
6. Lindenbach, B.D., Rice, C.M. (2001) *Fundamental virology*. / ed in chief Knipe, D.M., Howley, P.M. Philadelphia: SE Straus Lippincott Williams and Wilkins, 589–639.
7. De Francesco, R., Tomei, L., Altamura, S., Summa, V., Migliaccio, G. (2003) *Antiviral Res.*, **58**, 1–16.
8. Sato, K., Okamoto, H., Aihara, S., Hoshi, Y., Tanaka, T., Mishiro, S. (1993) *Virology*, **196**, 354–357.
9. Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Sahara, A., Fusamoto, H., Kamada, T. (1994) *Hepatology*, **19**, 296–302.
10. Kanto, T., Hayashi, N., Takehara, T., Hagiwara, H., Mita, E., Naito, M., Sahara, A., Fusamoto, H., Kamada, T. (1995) *J. Hepatol.*, **22**, 440–448.
11. Nagasaka, A., Hige, S., Tsunematsu, I., Yoshida, J., Sasaki, Y., Matsushima, T., Asaka, M. (1996) *J. Med. Virol.*, **50**, 214–220.
12. Sakai, A., Kaneko, S., Matsushita, E., Kobayashi, K. (1998) *J. Med. Virol.*, **55**, 12–17.
13. Mizuno, M., Yamada, G., Tanaka, T., Shimotohno, K., Takatani, M., Tsuji, T. (1995) *Gastroenterology*, **109**, 1933–1940.
14. Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T., Liang, T.J. (1998) *J. Virol.*, **72**, 3827–3836.
15. Bradley, D.W., McCaustland, K.A., Cook, E.H., Schable, C.A., Ebert, J.W., Maynard, J.E. (1985) *Gastroenterology*, **88**, 773–779.
16. He, L.F., Alling, D., Popkin, T., Shapiro, M., Alter, H.J., Purcell, R.H. (1987) *J. Infect. Dis.*, **156**, 636–640.
17. Yuasa, T., Ishikawa, G., Manabe, S., Sekiguchi, S., Takeuchi, K., Miyamura, T. (1991) *J. Gen. Virol.*, **72**, 2021–2024.
18. Prince, A.M., Huima-Byron, T., Parker, T.S., Levine, D.M. (1996) *J. Viral Hepat.*, **3**, 11–17.
19. Ishida, S., Kaito, M., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Fujita, N., Ikoma, J., Adachi, Y., Watanabe, S. (2001) *Hepatology*, **20**, 335–347.
20. Andre, P., Komurian-Pradel, F., Deforges, S., Perret, M., Berland, J.L., Sodyer, M., Pol, S., Brechot, C., Paranhos-Baccala, G., Lotteau, V. (2002) *J. Virol.*, **76**, 6919–6928.
21. Li, X., Jeffers, L.J., Shao, L., Reddy, K.R., de Medina, M., Scheffell, J., Moore, B., Schiff, E.R. (1995) *J. Viral Hepat.*, **2**, 227–234.
22. Pumeeshockchai, W., Beviit, D., Agarwal, K., Petropoulou, T., Langer, B.C., Belohradsky, B., Bassendine, M.F., Toms, G.L. (2002) *J. Med. Virol.*, **68**, 335–342.
23. Maillard, P., Krawczynski, K., Nitkiewicz, J., Bronnert, C., Sidorkiewicz, M., Gounon, P., Dubuisson, J., Faure, G., Crainic, R., Budkowska, A. (2001) *J. Virol.*, **75**, 8240–8250.
24. Fukushi, S., Katayama, K., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Ando, T., Oya, A. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **199**, 425–432.
25. Tanaka, T., Kato, N., Cho, M.J., Shimotohno, K. (1995) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **215**, 744–749.
26. Tanaka, T., Kato, N., Cho, M.J., Sugiyama, K., Shimotohno, K. (1996) *J. Virol.*, **70**, 3307–3312.
27. Bukh, J.R., Purcell, R.H., Miller, R.H. (1992) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 4942–4946.
28. Brown, E.A., Zhang, H., Ping, L.-H., Lemon, S.M. (1992) *Nucleic Acids Res.*, **20**, 5041–5045.
29. Tsukiyama-Kohara, K., Iizuka, N., Kohara, M., Nomoto, A. (1992) *J. Virol.*, **66**, 1476–1483.
30. Wang, C., Sarnow, P., Siddiqui, A. (1993) *J. Virol.*, **67**, 3338–3344.
31. Kolykhalov, A.A., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1996) *J. Virol.*, **70**, 3363–3371.
32. Yamada, N., Tanihara, K., Takada, A., Yoriyuzi, T., Tsutsumi, M., Shimomura, H., Tsuji, T., Date, T. (1996) *Virology*, **223**, 255–261.
33. Blight, K.J., Rice, C.M. (1997) *J. Virol.*, **71**, 7345–7352.
34. Reigadas, S., Ventura, M., Sarihcottin, L., Castroviejo, M., Litvak, S., Astier-Gin, T. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5857–5867.
35. Friebe, P., Bartenschlager, R. (2002) *J. Virol.*, **76**, 5326–5338.
36. Yi, M., Lemon, S.M. (2003) *RNA*, **9**, 331–345.
37. Kolykhalov, A.A., Mihalik, K., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (2000) *J. Virol.*, **74**, 2046–2051.
38. Laporte, J., Malet, I., Andrieu, T., Thibault, V., Toulme, J.J., Wychowski, C., Pawlotsky, J.M., Huraux, J.M., Agut, H., Cahour, A. (2000) *J. Virol.*, **74**, 10827–10833.
39. Pawlotsky, J.-M. (2003) *Clin. Liver Dis.*, **7**, 45–66.

40. Hijikita, M., Kato, N., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Shimotohno, K. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **88**, 5547–5551.
41. Grakoui, A., Wychowski, C., Lin, C., Feinstone, S.M., Rice C.M. (1993) J. Virol., **67**, 1385–1395.
42. Selby, M.J., Choo, Q.L., Berger, K., Kuo, G., Glazer, E., Eckart, M., Lee, C., Chien, D., Kuo, C., Houghton, M. (1993) J. Gen. Virol., **74**, 1103–1113.
43. Yasui, K., Wakita, T., Tsukiyama-Kohara, K., Funahashi, S.I., Ichikawa, M., Kajita, T., Moradpour, D., Wands, J.R., Kohara, M. (1998) J. Virol., **72**, 6048–6055.
44. Hussy, P., Langen, H., Mous, J., Jacobsen, H. (1996) Virology, **224**, 93–104.
45. Lo, S.-Y., Selby, M., Tong, M., Ou, J.-H. (1994) Virology, **199**, 124–131.
46. Lo, S.-Y., Masiarz, F., Hwang, S.B., Lai, M.M., Ou, J.-H. (1995) Virology, **213**, 455–461.
47. Santolini, E., Migliaccio, G., La Monica, N. (1994) J. Virol., **68**, 3631–3641.
48. Von Heijne, G. (1990) J. Membr. Biol., **115**, 195–201.
49. Martoglio, B., Dobberstein, B. (1998) Trends Cell. Biol., **8**, 410–415.
50. McLauchlan, J. (2000) J. Viral. Hepat., **7**, 2–14.
51. Robertson, B., Myers, G., Howard, C., Brettin, T., Bukh, J., Gaschen, B., Gojobori, T., Maertens, G., Mizokami, M., Nainan, O., Netesov, S., Nishioka, K., Shini, T., Simmonds, P., Smith, D., Stuyver, L., Weiner A. (1998) Arch. Virol., **143**, 2493–2503.
52. Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa, M., Ohkoshi, S., Sugimura, T., Shimotohno, K. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA., **87**, 9524–9528.
53. Takeuchi, K., Kubo, Y., Boonmar, S., Watanabe, Y., Katayama, T., Choo, Q.L., Kuo, G., Houghton, M., Saito, I., Miyamura, T. (1990) J. Gen. Virol., **71**, 3027–3033.
54. Fuchs, K., Motz, M., Schreier, E., Zachoval, R., Deinhardt, F., Roggendorf, M. (1991) Gene, **103**, 63–169.
55. Takamizawa, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., Okayama, H. (1991) J. Virol., **65**, 1105–1113.
56. Okamoto, H., Kurai, K., Okada, S., Yamamoto, K., Lizuka, H., Tanaka, T., Fukuda, S., Tsuda, F., Mishiro, S. (1992) Virology, **188**, 331–341.
57. Bukh, J., Purcell, R.H., Miller, R.H. (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **91**, 8239–8243.
58. Suzuki, R., Matsuura, Y., Suzuki, T., Ando, A., Chiba, J., Harada, S., Saito, I., Miyamura, T. (1995) J. Gen. Virol., **76**, 53–61.
59. Gonzalez-Peralta, R.P., Fang, J.W., Davis, G.L., Gish R., Tsukiyama-Kohara, K., Kohara, M., Mondelli, M.U., Lesniewski, R., Phillips M.I., Mizokami M. (1994) J. Hepatol., **20**, 143–147.
60. Yap, S.H., Willems, M., Van den Oord, J., Habets, W., Middeldorp, J.M., Helling, J.A., Nevens, F., Moshage, H., Desmet, V., Fevery, J. (1994) J. Hepatol., **20**, 275–281.
61. Harada, S., Watanabe, Y., Takeuchi, K., Suzuki, T., Katayama, T., Takebe, Y., Saito, I., Miyamura, T. (1991) J. Virol., **65**, 3015–3021.
62. Moradpour, D., Englert, C., Wakita, T., Wands, J.R. (1996) Virology, **222**, 51–63.
63. Barba, G., Harper, F., Harada, T., Kohara, M., Goulinet, S., Matsuura, Y., Eder, G., Schaff, Z., Chapman, M.J., Miyamura, T., Brechot, C. (1997) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **94**, 1200–1205.
64. Brasaemle, D.L., Barber, T., Wolins, N.E., Serrero, G., Blanchette-Mackie, E.J., Londos, C. (1997) J. Lipid. Res., **38**, 2249–2263.
65. Heid, H.W., Moll, R., Schwetlick, I., Rackwitz, H.-R., Keenan, T.W. (1998) Cell. Tissue. Res., **294**, 309–321.
66. Liu, Q., Tackney, C., Bhat, R.A., Prince, A.M., Zhang, P. (1997) J. Virol., **71**, 657–662.
67. Marusawa, H., Hijikita, M., Chiba, T., Shimotohno, K. (1999) J. Virol., **73**, 4713–4720.

68. Tanaka, Y., Shimoike, T., Ishii, K., Suzuki, R., Suzuki, T., Ushijima, H., Matsuura, Y., Miyamura, T. (2000) Virology, **270**, 229–236.
69. Baumert, T.F., Ito, S., Wong, D.T., Liang, T.J. (1998) J. Virol., **72**, 3827–3836.
70. Matsumoto, M., Hwang, S.B., Jeng, K.-S., Zhu, N., Lai, M.M. (1996) Virology, **218**, 43–51.
71. Nolandt, O., Kern, V., Muller, H., Pfaff, E., Theilmann, L., Welker, R., Krauslich, H.G. (1997) J. Gen. Virol., **78**, 1331–1340.
72. Yan, B.S., Tam, M.H., Syu, W.J. (1998) Eur. J. Biochem., **258**, 100–106.
73. Kunkel, M., Lorinczi, M., Rijnbrand, R., Lemon, S.M., Watowich, S.J. (2001) J. Virol., **75**, 2119–2129.
74. Ralston, R., Thudium, K., Berger, K., Kuo, C., Gervase, B., Hall, J., Selby, M., Kuo, G., Houghton, M., Choo, Q.L. (1993) J. Virol., **67**, 6753–6761.
75. Lo, S.Y., Selby, M.J., Ou, J.-H. (1996) J. Virol., **70**, 5177–5182.
76. Uchida, M., Hino, N., Yamanaka, T., Fukushima, H., Imanishi, T., Uchiyama, Y., Kodama, T., Doi, T. (2002) Hepatol. Res., **22**, 297–306.
77. Bomsztyk, K., Van Seuning, I., Suzuiki, H., Denisenko, O., Ostrowski, J. (1997) FEBS Lett., **403**, 113–115.
78. Hsieh, T.Y., Matsumoto, M., Chou, H.C., Schneider, R., Hwang, S.B., Lee, A.S., Lai, M.M. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 17651–17659.
79. Chen, C.-M., You, L.-R., Hwang, L.-H., Lee, Y.-H.W. (1997) J. Virol., **71**, 9417–9426.
80. Matsumoto, M., Hsieh, T.Y., Zhu, N., VanArsdale, T., Hwang, S.B., Jeng, K.S., Gorbalenya, A.E., Lo, S.Y., Ou, J.H., Ware, C.F., Lai M.M. (1997) J. Virol., **71**, 1301–1309.
81. Zhu, N., Khoshnan, A., Schneider, R., Matsumoto, M., Dennert, G., Ware, C., Lai, M.M. (1998) J. Virol., **72**, 3691–3697.
82. Mamiya, N., Worman, H.J. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 15751–15756.
83. Owsianka, A.M., Patel, A.H. (1999) Virology, **257**, 330–340.
84. You, L.R., Chen, C.M., Yeh, T.S., Tsai, T.Y., Mai, R.T., Lin, C.H., Lee, Y.H. (1999) J. Virol., **73**, 2841–2853.
85. Otsuka, M., Kato, N., Lan, K., Yoshida, H., Kato, J., Goto, T., Shiratori, Y., Omata, M. (2000) J. Biol. Chem., **275**, 34122–34130.
86. Alisi, A., Giambartolomei, S., Cupelli, F., Merlo, P., Fontemaggi, G., Spaziani, A., Balsano, C. (2003) Oncogene, **22**, 2573–2580.
87. Ruggieri, A., Harada, T., Matsuura, Y., Miyamura, T. (1997) Virology, **229**, 68–76.
88. Suzuki, A., Tsutomi, Y., Akahane, K., Araki, T., Miura, M. (1998) Oncogene, **17**, 931–940.
89. Hasegawa, J., Kamada, S., Kamiike, W., Shimizu, S., Imazu, T., Matsuda, H., Tsujimoto, Y. (1996) Cancer Res., **56**, 1713–1718.
90. Suzuki, A., Tsutomi, Y., Yamamoto, N., Shibutani, T., Akahane, K. (1999) Mol. Cell. Biol., **19**, 3842–3847.
91. Scaffidi, C., Fulda, S., Srinivasan, A., Friesen, C., Li, F., Tomaselli, K.J., Debatin, K.M., Krammer, P.H., Peter, M.E. (1998) EMBO J., **17**, 1675–1687.
92. Ray, R.B., Meyer, K., Steele, R., Shrivastava, A., Aggarwal, B.B., Ray, R. (1998) J. Biol. Chem., **273**, 2256–2259.
93. Beidler, D.R., Tewari, M., Friesen, P.D., Poirier, G., Dixit, V.M. (1995) J. Biol. Chem., **270**, 16526–16528.
94. Wallach, D., Varfolomeev, E.E., Malinin, N.L., Goltsev, Y.V., Kovalenko, A.V., Boldin, M.P. (1999) Annu. Rev. Immunol., **17**, 331–367.
95. Tai, D.I., Tsai, S.L., Chen, Y.M., Chuang, Y.L., Peng, C.Y., Sheen, I.S., Yeh, C.T., Chang, K.S., Huang, S.N., Kuo, G.C., Liaw, Y.F. (2000) Hepatology, **31**, 656–664.
96. Hahn, C.S., Cho, Y.G., Kang, B.S., Lester, I.M., Hahn, Y.S. (2000) Virology, **276**, 127–137.
97. Rathmell, J.C., Thompson, C.B. (1999) Annu. Rev. Immunol., **17**, 781–828.
98. Ray R.B., Lagging L.M., Meyer K., Ray R. (1996) J. Virol., **70**, 4438–4443.

99. Chang, J., Yang, S.-H., Cho, Y.-G., Hwang, S.B., Hahn, Y.S., Sung, Y.C. (1998) *J. Virol.*, **72**, 3060–3065.
100. Tsuchihara, K., Hijikata, M., Fukuda, K., Kuroki, T., Yamamoto, N., Shimotohno, K. (1999) *Virology*, **258**, 100–107.
101. Shih, C.-M., Lo, S.J., Miyamura, T., Chen, S.-Y., Lee, Y.-H.W. (1993) *J. Virol.*, **67**, 5823–5832.
102. Fong, T.L., DiBisceglie, A.M., Waggoner, J.G., Banks, S.M., Hoofnagle, J.H. (1991) *Hepatology*, **14**, 64–67.
103. Liaw, Y.-F., Lin, S.M., Sheen, I.-S., Chu, C.M. (1991) *Infection*, **250**, 54–55.
104. Sheen, I.-S., Liaw, Y.-F., Chu, C.-M., Pao, C.-C. (1992) *J. Infect. Dis.*, **165**, 831–834.
105. Kato, N., Yoshida, H., Kioko, O.-N. S., Kato, J., Goto, T., Otsuka, M., Lan, K., Matsushima, K., Shiratori, Y., Omata, M. (2000) *Hepatology*, **32**, 405–412.
106. Shih, C.-M., Chen, C.-M., Chen, S.-Y., Lee, Y.-H.W. (1995) *J. Virol.*, **69**, 1160–1171.
107. Ray, R.B., Lagging, L.M., Meyer, K., Steele, R., Ray, R. (1995) *Virus Res.*, **37**, 209–220.
108. Ray, R.B., Steele, R., Meyer, K., Ray, R. (1997) *J. Biol. Chem.*, **272**, 10983–10986.
109. Ray, R.B., Steele, R., Meyer, K., Ray, R. (1998) *Gene*, **208**, 331–336.
110. You, L.-R., Chen, C.-M., Lee, Y.-H.W. (1999) *J. Virol.* **73**, 1672–1681.
111. Bergqvist, A., Rice, C.M. (2001) *J. Virol.*, **75**, 772–781.
112. Cho, J.W., Baek, W.K., Suh, S.I., Yang, S.H., Chang, J., Sung, Y.C., Suh, M.H. (2001) *Liver*, **21**, 137–142.
113. Shrivastava, A., Manna, S.K., Ray, R., Aggarwal, B.B. (1998) *J. Virol.*, **72**, 9722–9728.
114. Lin, B., Williams-Skipp, C., Tao, Y., Schleicher, M.S., Cano, L.L., Duke, R.C., Scheinman, R.I. (1999) *Cell. Death. Differ.*, **6**, 570–582.
115. Choi, J., Xu, Z., Ou, J.-H. (2003) *Mol. Cell. Biol.*, **23**, 1489–1497.
116. Reed, K.E., Rice, C.M. (2000) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **242**, 55–84.
117. Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Maki, N., Asano, K., Yamaguchi, K., Miki, K., Tanaka, S., Hattori, N., Matsuura, Y., Saito, I., Miyamura, T., Nomoto, A. (1992) *J. Gen. Virol.*, **73**, 2313–2318.
118. Matsuura, Y., Harada, S., Suzuki, R., Watanabe, Y., Inoue, Y., Saito, I., Miyamura, T. (1992) *J. Virol.*, **66**, 1425–1431.
119. Spaete, R.R., Alexander, D., Rugroden, M.E., Choo, Q.L., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Leng, S., Lee, C., Ralston, R., Thudium, K., Tung, J.W., Kuo, G., Houghton, M. (1992) *Virology*, **188**, 819–830.
120. Lanford, R.E., Notvall, L., Chavez, D., White, R., Frenzel, G., Simonsen, C., Kim J. (1993) *Virology*, **197**, 225–235.
121. Dubuisson, J., Hsu, H.H., Cheung, R.C., Greenberg, H.B., Russell, D.G., Rice, C.M. (1994) *J. Virol.*, **68**, 6147–6160.
122. Dubuisson, J. (2000) *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, **242**, 135–148.
123. Tomei, L., Failla, C., Santolini, E., De Francesco, R., La Monica, N. (1993) *J. Virol.*, **67**, 4017–4026.
124. Mizushima, H., Hijikata, M., Asabe, S., Hirota, M., Kimura, K., Shimotohno, K. (1994) *J. Virol.*, **68**, 6215–6222.
125. Mizushima, H., Hijikata, M., Tanji, Y., Kimura, K., Shimotohno, K. (1994) *J. Virol.*, **68**, 2731–2734.
126. Deleersnyder, V., Pillez, A., Wychowski, C., Blight, K., Xu, J., Hahn, Y.S., Rice, C.M., Dubuisson, J. (1997) *J. Virol.*, **71**, 697–704.
127. Duvet, S., Cocquerel, L., Pillez, A., Cacan, R., Verbert, A., Moradpour, D., Wychowski, C., Dubuisson, J. (1998) *J. Biol. Chem.*, **273**, 32088–32095.
128. Dubuisson, J., Rice, C.M. (1996) *J. Virol.*, **70**, 778–786.
129. Matsuura, Y., Suzuki, T., Suzuki, R., Saito, M., Aizaki, H., Saito, I., Miyamura, T. (1994) *Virology*, **205**, 141–150.
130. Choukhi, A., Pillez, A., Drobecq, H., Sergheraert, C., Wychowski, C., Dubuisson, J. (1999) *J. Gen. Virol.*, **80**, 3099–3107.
131. Liberman, E., Fong, Y.L., Selby, M.J., Choo, Q.L., Cousens, L., Houghton M., Yen, T.S. (1999) *J. Virol.*, **73**, 3718–3722.
132. Michalak, J.-P., Wychowski, C., Choukhi, A., Meunier, J.-C., Ung, S., Rice, C.M., Dubuisson, J. (1997) *J. Gen. Virol.*, **78**, 2299–2306.
133. Habersetzer, F., Fournillier, A., Dubuisson, J., Rosa, D., Abrignani, S., Wychowski, C., Nakano, I., Trepo, C., Desgranges, C., Inchauspe, G. (1998) *Virology*, **249**, 32–41.
134. Choukhi, A., Ung, S., Wychowski, C., Dubuisson, J. (1998) *J. Virol.*, **72**, 3851–3858.
135. Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., Lai, M.M. (1999) *Science*, **285**, 107–110.
136. Chayama, K., Suzuki, F., Tsubota, A., Kobayashi, M., Arase, Y., Saitoh, S., Suzuki, Y., Murashima, N., Ikeda, K., Takahashi, N., Kinoshita, M., Kumada, M. (2000) *Hepatology*, **32**, 1138–1144.
137. Watanabe, H., Nagayama, K., Enomoto, N., Itakura, J., Tanabe, Y., Sato, C., Izumi, N., Watanabe, M. (2003) *Hepatol. Res.*, **26**, 268–274.
138. Taylor, D.R., Tian, B., Romano, P.R., Hinnebusch, A.G., Lai, M.M., Mathews, M.B. (2001) *J. Virol.*, **75**, 1265–1273.
139. Vyas, J., Elia, A., Clemens, M.J. (2003) *RNA*, **9**, 858–70.
140. Pavio, N., Romano, P.R., Graczyk, T.M., Feinstone, S.M., Taylor, D.R. (2003) *J. Virol.*, **77**, 3578–3585.
141. Ciccaglione, A.R., Marcantonio, C., Costantino, A., Equestre, M., Geraci, A., Rapicetta, M. (2000) *Virus Genes*, **21**, 223–226.
142. Montigny, C., Penin, F., Lethias, C., Falson, P. (2004) *Biochim. Biophys. Acta*, **1660**, 53–65.
143. Ciccaglione, A.R., Costantino, A., Marcantonio, C., Equestre, M., Geraci, A., Rapicetta, M. (2001) *J. Gen. Virol.*, **82**, 2243–2250.
144. Ciccaglione, A.R., Marcantonio, C., Costantino, A., Equestre, M., Rapicetta, M. (2003) *Intervirology*, **46**, 121–126.
145. Ciccaglione, A.R., Marcantonio, C., Tritarelli, E., Equestre, M., Magurano, F., Costantino, A., Nicoletti, L., Rapicetta, M. (2004) *Virus Res.*, **104**, 1–9.
146. Lin, C., Lindenbach, B.D., Pragai, B.M., McCourt, D.W., Rice, C.M. (1994) *J. Virol.*, **68**, 5063–73.
147. Carrere-Kremer, S., Montpellier-Pala, C., Cocquerel, L., Wychowski, C., Penin, F., Dubuisson, J. (2002) *J. Virol.*, **76**, 3720–30.
148. Saunier, B., Triyatni, M., Ulianich, L., Maruvada, P., Yen, P., Kohn, L.D. (2003) *J. Virol.*, **77**, 546–59.
149. Sakai, A., Claire, M.S., Faulk, K., Govindarajan, S., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Bukh, J. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 11646–11651.
150. Harada, T., Tautz, N., Thiel, H.J. (2000) *J. Virol.*, **74**, 9498–506.
151. Griffin, S.D., Beales, L.P., Clarke, D.S., Worsfold, O., Evans, S.D., Jaeger, J., Harris, M.P., Rowlands, D.J. (2003) *FEBS Lett.*, **535**, 34–38.
152. Pavlovic, D., Neville, D.C., Argaud, O., Blumberg, B., Dwek, R.A., Fischer, W.B., Zitzmann, N. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6104–6108.
153. Griffin, S.D., Harvey, R., Clarke, D.S., Barclay, W.S., Harris, M., Rowlands, D.J. (2004) *J. Gen. Virol.*, **85**, 451–461.
154. Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J., Smith, M.H. (1985) *EMBO J.*, **4**, 3021–3024.
155. Duff, K.C., Ashley, R.H. (1992) *Virology*, **190**, 485–489.
156. Hijikata, M., Mizushima, H., Akagi, T., Mori, S., Kakiuchi, N., Kato, N., Tanaka, T., Kimura, K., Shimotohno, K. (1993) *J. Virol.*, **67**, 4665–4675.
157. Hirowatari, Y., Hijikata, M., Tanji, Y., Nyunoya, H., Mizushima, H., Kimura, K., Tanaka, T., Kato, N., Shimotohno, K. (1993) *Arch. Virol.*, **133**, 349–356.
158. Pieroni, L., Santolini, E., Fipaldini, C., Pacini, L., Migliaccio, G., La Monica, N. (1997) *J. Virol.*, **71**, 6373–6380.
159. Reed K.E., Grakoui A., Rice C.M. (1995) *J. Virol.*, **69**, 4127–4136.
160. Hijikata, M., Mizushima, H., Tanji, Y., Komoda, Y., Hirowatari, Y., Akagi,

- T., Kato, N., Kimura, K., Shimotohno, K. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 10773–10777.
161. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **90**, 10583–10587.
162. Liu, Q., Bhat, R.A., Prince, A.M., Zhang, P. (1999) Biochem. Biophys. Res. Commun., **254**, 572–577.
163. Santolini, E., Pacini, L., Fipaldini, C., Migliaccio, G., La Monica, N. (1995) J. Virol., **69**, 7461–7471.
164. Gorbalenya, A.E., Snijder, E.J. (1996) Perspect. Drug Discovery Design, **6**, 64–86.
165. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H. (1993) J. Virol., **67**, 3835–3844.
166. D'Souza, E.D., O'Sullivan, E., Amphlett, E.M., Rowlands, D.J., Sangar, D.V., Clarke, B.E. (1994) J. Gen. Virol., **75**, 3469–3476.
167. Kim, D.W., Gwack, Y., Han, J.H., Choe, J. (1995) Biochem. Biophys. Res. Commun., **215**, 160–166.
168. Bartenschlager, R., Ahlborn-Laake, L., Mous, J., Jacobsen, H. (1994) J. Virol., **68**, 5045–5055.
169. Failla, C., Tomei, L., De Francesco, R. (1995) J. Virol., **69**, 1769–1777.
170. Han, D.S., Hahm, B., Rho H.M., Jang, S.K. (1995) J. Gen. Virol., **76**, 985–993.
171. Kolykhalov, A.A., Agapov, E.V., Rice, C.M. (1994) J. Virol., **68**, 7525–7533.
172. Steinkuhler, C., Urbani, A., Tomei, L., Biasiol, G., Sardana, M., Bianchi, E., Pessi, A., De Francesco, R. (1996) J. Virol., **70**, 6694–6700.
173. Tanji, Y., Hijikata, M., Hirowatari, Y., Shimotohno, K. (1994) J. Virol., **68**, 8418–8422.
174. Lin, C., Pragai, B.M., Grakoui, A., Xu, J., Rice, C.M. (1994) J. Virol., **68**, 8147–8157.
175. Lin, C., Rice, C.M. (1995) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **92**, 7622–7626.
176. Koch, J.O., Lohmann, V., Herian, U., Bartenschlager, R. (1996) Virology, **221**, 54–66.
177. Shimizu, Y., Yamaji, K., Masuho, Y., Yokota, T., Inoue, H., Sudo, K., Satoh, S., Shimotohno, K. (1996) J. Virol., **70**, 127–132.
178. Landro, J.A., Raybuck, S.A., Luong, Y.P.C., O'Malley, E.T., Harbeson, S.L., Morgenstern, K.A., Rao, G., Livingston, D.J. (1997) Biochemistry, **36**, 9340–9348.
179. Satoh, S., Tanji, Y., Hijikata, M., Kimura, K., Shimotohno, K. (1995) J. Virol., **69**, 4255–4260.
180. Failla, C., Tomei, L., De Francesco, R. (1994) J. Virol., **68**, 3753–3760.
181. Tanji, Y., Hijikata, M., Satoh, S., Kaneko, T., Shimotohno, K. (1995) J. Virol., **69**, 1575–1581.
182. Love, R.A., Parge, H.E., Wickersham, J.A., Hostomsky, Z., Habuka, N., Moomaw, E.W., Adachi, T., Hostomska, Z. (1996) Cell, **87**, 331–342.
183. Yan, Y., Li, Y., Munshi, S., Sardana, V., Cole, J.L., Sardana, M., Steinkuehler, C., Tomei, L., De Francesco, R., Kuo, L.C., Chen, Z. (1988) Protein Sci., **7**, 837–847.
184. Gorbalenya, A.E., Koonin, E.V. (1993) Curr. Opin. Struct. Biol., **3**, 419–429.
185. Kadare, G., and Haenni, A.-L. (1997) J. Virol., **71**, 2583–2590.
186. Gwack, Y., Wook, D., Han, J.H., Choe, J. (1995) Mol. Cells, **5**, 171–179.
187. Preugschat, F., Averett, D.R., Clarke, B.E., Porter, D.J.T. (1996) J. Biol. Chem., **271**, 24449–24457.
188. Suzich, J.A., Tamura, J.K., Palmer-Hill, F., Warren, P., Grakoui, A., Rice, C.M., Feinstone, S.M., Collett, M.S. (1993) J. Virol., **67**, 6152–6158.
189. Gwack, Y., Kim, D.W., Han, J.H., Choe, J. (1996) Biochem. Biophys. Res. Commun., **225**, 654–659.
190. Jin, L., Peterson, D.L. (1995) Arch. Biochem. Biophys., **323**, 47–53.
191. Tai, C.-L., Chi, W.-K., Chen, D.-S., Hwang, L.-H. (1996) J. Virol., **70**, 8477–8484.

192. Gwack, Y., Kim, D.W., Han, J.H., Choe, J. (1997) Eur. J. Biochem., **250**, 47–54.
193. Kyono, K., Miyashiro, M., Taguchi, I. (2003) J. Biochem. (Tokyo), **134**, 505–511.
194. Heilek, G.M., Peterson, M.G. (1997) J. Virol., **71**, 6264–6266.
195. Kim, D.W., Kim, J., Gwack, Y., Han, J.H., Choe, J. (1997) J. Virol., **71**, 9400–9409.
196. Kuang, W.F., Lin, Y.C., Jean, F., Huang, Y.W., Tai, C.L., Chen, D.S., Chen, P.J., Hwang, L.H. (2004) Biochem. Biophys. Res. Commun., **317**, 211–217.
197. Yao, N., Hesson, T., Cable, M., Hong, Z., Kwong, A.D., Le, H.V., Weber, P.C. (1997) Nat. Struct. Biol., **4**, 463–467.
198. Piccininni, S., Varaklioti, A., Nardelli, M., Dave, B., Raney, K.D., McCarthy, J.E. (2002) J. Biol. Chem., **277**, 45670–45679.
199. Sakamuro, D., Furukawa, T., Takegami, T. (1995) J. Virol., **69**, 3893–3896.
200. Borowski, P., Heiland, M., Oehlmann, K., Becker, B., Kornetzky, L., Feucht, H., Laufs, R. (1996) Eur. J. Biochem. **237**, 611–618.
201. Borowski, P., Oehlmann, K., Heiland, M., Laufs, R. (1997) J. Virol. **71**, 2838–2843.
202. Borowski, P., zur Wiesch, J.S., Resch, K., Feucht, H., Laufs, R., Schmitz, H. (1999) J. Biol. Chem., **274**, 30722–30728.
203. Ishido, S., Hotta, H. (1998) FEBS Lett., **438**, 258–262.
204. Siavoshian, S., Abraham, J.D., Kieny, M.P., Schuster, C. (2004) Arch. Virol., **149**, 323–336.
205. Ishido, S., Muramatsu, S., Fujita, T., Iwanaga, Y., Tong, W.Y., Katayama, Y., Itoh, M., Hotta, H. (1997) Biochem. Biophys. Res. Commun., **230**, 431–436.
206. Muramatsu, S., Ishido, S., Fujita, T., Itoh, M., Hotta, H. (1997) J. Virol., **71**, 4954–4961.
207. Kwun, H.J., Jung, E.Y., Ahn, J.Y., Lee, M.N., Jang, K.L. (2001) J. Gen. Virol., **82**, 2235–2241.
208. Machida, K., Cheng, K.T., Sung, V.M., Lee, K.J., Levine, A.M., Lai, M.M. (2004) J. Virol., **78**, 8835–8843.
209. Prikhod'ko, E.A., Prikhod'ko, G.G., Siegel, R.M., Thompson, P., Major, M.E., Cohen, J.I. (2004) Virology, **329**, 53–67.
210. Park, J.S., Yang, J.M., Min, M.K. (2000) Biochem. Biophys. Res. Commun., **267**, 581–587.
211. Hugle, T., Fehrmann, F., Bieck, E., Kohara, M., Krausslich, H.G., Rice, C.M., Blum, H.E., Moradpour, D. (2001) Virology, **284**, 70–81.
212. Egger, D., Wolk, B., Gosert, R., Bianchi, L., Blum, H.E., Moradpour, D., Bienz, K. (2002) J. Virol., **76**, 5974–5984.
213. He, Y., Yan, W., Coito, C., Li, Y., Gale, M. Jr., Katze, M.G. (2003) J. Gen. Virol., **84**, 535–543.
214. Lin, C., Wu, J.W., Hsiao, K., Su, M.S. (1997) J. Virol., **71**, 6465–6471.
215. Kim, J.L., Morgenstern, K.A., Lin, C., Fox, T., Dwyer, M.D., Landro, J.A., Chambers, S.P., Markland, W., Lepre, C.A., O'Malley, E.T., Harbeson, S.L., Rice, C.M., Murcko, M.A., Carron, P.R., Thomson, J.A. (1996) Cell, **87**, 343–355.
216. Koch, J.O., Bartenschlager, R. (1999) J. Virol., **73**, 7138–7146.
217. Neddermann, P., Clementi, A., De Francesco, R. (1999) J. Virol., **73**, 9984–9991.
218. Kato, J., Kato, N., Yoshida, H., Ono-Nita, S.K., Shiratori, Y., Omata, M. (2002) J. Med. Virol., **66**, 187–199.
219. Waris, G., Sarker, S., Siddiqui, A. (2004) RNA, **10**, 321–329.
220. Sugden, P.H. (2003) Circ. Res., **93**, 1179–1192.
221. Florese, R.H., Nagano-Fujii, M., Iwanaga, Y., Hidajat, R., Hotta, H. (2002) Virus Res., **90**, 119–131.
222. Konan, K.V., Giddings, T.H. Jr., Ikeda, M., Li, K., Lemon, S.M., Kirkegaard, K. (2003) J. Virol., **77**, 7843–7855.
223. Tellinghuisen, T.L., Marcotrigiano, J., Gorbalenya, A.E., Rice C.M. (2004) J. Biol. Chem., **279**, 48576–48587.

224. Hirota, M., Satoh, S., Asabe, S., Kohara, M., Tsukiyama-Kohara, K., Kato, N., Hijikata, M., Shimotohno, K. (1999) *Virology*, **257**, 130–137.
225. Kaneko, T., Tanji, Y., Satoh, S., Hijikata, M., Shinichi, S., Kimura, K., Shimotohno, K. (1994) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **205**, 320–326.
226. Reed, K.E., Xu, J., Rice, C.M. (1997) *J. Virol.*, **71**, 7187–7197.
227. Reed, K.E., Gorbalenya, A.E., Rice, C.M. (1998) *J. Virol.*, **72**, 6199–6206.
228. Tanji, Y., Kaneko, T., Satoh, S., Shimotohno, K. (1995) *J. Virol.*, **69**, 3980–3986.
229. Reed, K.E., Rice, C.M. (1999) *J. Biol. Chem.*, **274**, 28011–28018.
230. Katze, M.G., Kwiciszewski, B., Goodlett, D.R., Blakely, C.M., Neddermann, P., Tan, S.L., Aebbersold R. (2000) *Virology*, **278**, 501–513.
231. Asabe, S.I., Tanji, Y., Satoh, S., Kaneko, T., Kimura, K., Shimotohno, K. (1997) *J. Virol.*, **71**, 790–796.
232. Kim, J., Lee, D., Choe, J. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **257**, 777–781.
233. Ide, Y., Tanimoto, A., Sasaguri, Y., Padmanabhan, R. (1997) *Gene*, **201**, 151–158.
234. Гусев Н.Б. (2000) Соросовский образовательный журнал, **6**, 4–12.
235. Huang, L., Sineva, E.V., Hargittai, M.R., Sharma, S.D., Suthar, M., Raney, K.D., Cameron, C.E. (2004) *Protein Expr. Purif.*, **37**, 144–153.
236. Ide, Y., Zhang, L., Chen, M., Inchauspe, G., Bahl, C., Sasaguri, Y., Padmanabhan, R. (1996) *Gene*, **182**, 203–211.
237. Kim, J.E., Song, W.K., Chung, K.M., Back, S.H., Jang, S.K. (1999) *Arch. Virol.*, **144**, 329–343.
238. Brass, V., Bieck, E., Montserret, R., Wolk, B., Hellings, J.A., Blum, H.E., Penin, F., Moradpour, D. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 8130–8139.
239. Satoh, S., Hirota, M., Noguchi, T., Hijikata, M., Handa, H., Shimotohno, K. (2000) *Virology*, **270**, 476–487.
240. Elazar, M., Cheong, K.H., Liu, P., Greenberg, H.B., Rice, C.M., Glenn, J.S. (2003) *J. Virol.*, **77**, 6055–6061.
241. Penin, F., Brass, V., Appel, N., Ramboarina, S., Montserret, R., Ficheux, D., Blum, H.E., Bartenschlager, R., Moradpour, D. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 40835–40843.
242. Majumder, M., Steele, R., Ghosh, A.K., Zhou, X.Y., Thornburg, L., Ray, R., Phillips, N.J., Ray R.B. (2003) *FEBS Lett.*, **555**, 528–532.
243. Shirota, Y., Luo, H., Qin, W., Kaneko, S., Yamashita, T., Kobayashi, K., Murakami, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 11149–11155.
244. Tu, H., Gao, L., Shi, S.T., Taylor, D.R., Yang, T., Mircheff, A.K., Wen, Y., Gorbalenya, A.E., Hwang, S.B., Lai, M.M. (1999) *Virology*, **263**, 30–41.
245. Gao, L., Aizaki, H., He, J.W., Lai, M.M. (2004) *J. Virol.*, **78**, 3480–3488.
246. Evans, M.J., Rice, C.M., Goff, S.P. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 13038–13043.
247. Tanimoto, A., Ide, Y., Arima, N., Sasaguri, Y., Padmanabhan, R. (1997) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **236**, 360–364.
248. Kato, N., Lan, K.H., Ono-Nita, S.K., Shiratori, Y., Omata, M. (1997) *J. Virol.*, **71**, 8856–8859.
249. Chung, K.M., Song, O.K., Jang, S.K. (1997) *Mol. Cells*, **7**, 661–667.
250. Ghosh, A.K., Majumder, M., Steele, R., Yaciuk, P., Chrivia, J., Ray, R., Ray, R.B. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 7184–7188.
251. Rosen, H.R., Gretch, D.R. (1999) *Mol. Med. Today*, **5**, 393–399.
252. Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (1996) *N. Engl. J. Med.*, **334**, 77–81.
253. Kurosaki, M., Enomoto, N., Murakami, T., Sakuma, I., Asahina, Y., Yamamoto, C., Ikeda, T., Tozuka, S., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (1997) *Hepatology*, **25**, 750–753.

254. Fukuma, T., Enomoto, N., Marumo, F., Sato, C. (1998) *Hepatology*, **28**, 1147–1153.
255. Zeuzem, S., Lee, J.H., Roth, W.K. (1997) *Hepatology*, **25**, 740–744.
256. Khorsi, H., Castelain, S., Wyseur, A., Izopet, J., Canva, V., Rombout, A., Capron, D., Capron, J.P., Lunel, F., Stuyver, L., Duverlie G. (1997) *J. Hepatol.*, **27**, 72–77.
257. Komatsu, H., Fujisawa, T., Inui, A., Miyagawa, Y., Onoue, M. (1997) *J. Med. Virol.*, **53**, 361–365.
258. Pawlowsky, J.M., Germanidis, G., Neumann, A.U., Pellerin, M., Frainais, P.O., Dhumeaux, D. (1998) *J. Virol.*, **72**, 2795–2805.
259. Duverlie, G., Khorsi, H., Castelain, S., Jaillon, O., Izopet, J., Lunel, F., Eb, F., Penin, F., Wychowski, C. (1998) *J. Gen. Virol.*, **79**, 1373–1381.
260. Squadrito, G., Orlando, M.E., Cacciola, I., Rumi, M.G., Artini, M., Picciotto, A., Loiacono, O., Siciliano, R., Levrero, M., Raimondo, G. (1999) *J. Hepatol.*, **30**, 1023–1027.
261. Gerotto, M., Dal Pero, F., Pontisso, P., Noventa, F., Gatta, A., Alberti, A. (2000) *Gastroenterology*, **119**, 1649–1655.
262. Samuel, C.E. (2001) *Clin. Microbiol. Rev.*, **14**, 778–809.
263. Williams, B.R.G. (1999) *Oncogene*, **18**, 6112–6120.
264. Pflugheber, J., Fredericksen, B., Sumpter, R. Jr., Wang, C., Ware, F., Sodoro, D.L., Gale, M. Jr. (2002) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 4650–4655.
265. Gale, M.J. Jr., Korth, M.J., Tang, N.M., Tan, S.L., Hopkins, D.A., Dever, T.E., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Katze, M.G. (1997) *Virology*, **230**, 217–227.
266. Gale, M. Jr., Blakely, C.M., Kwiciszewski, B., Tan, S.L., Dossett, M., Tang, N.M., Korth, M.J., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Katze, M.G. (1998) *Mol. Cell Biol.*, **18**, 5208–5218.
267. Gale, M. Jr., Kwiciszewski, B., Dossett, M., Nakao, H., Katze, M.G. (1999) *J. Virol.*, **73**, 6506–6516.
268. He, Y., Tan, S.L., Tareen, S.U., Vijaysri, S., Langland, J.O., Jacobs, B.L., Katze, M.G. (2001) *J. Virol.*, **75**, 5090–5098.
269. Francois, C., Duverlie, G., Rebouillat, D., Khorsi, H., Castelain, S., Blum, H.E., Gatignol, A., Wychowski, C., Moradpour, D., Meurs, E.F. (2000) *J. Virol.*, **74**, 5587–5596.
270. Polyak, S.J., Khabar, K.S., Paschal, D.M., Ezelle, H.J., Duverlie, G., Barber, G.N., Levy, D.E., Mukaida, N., Gretch, D.R. (2001) *J. Virol.*, **75**, 6095–6106.
271. Polyak, S.J., Khabar, K.S., Rezeiq, M., Gretch, D.R. (2001) *J. Virol.*, **75**, 6209–6211.
272. Khabar, K.S.A., Al-Zoghaibi, F., Al-Ahdal, M. N., Murayama, T., Dhalla, M., Mukaida, N., Taha, M., Al-Sedairy, S.T., Siddiqui, Y., Kessie, G., Matsushima, K. (1997) *J. Exp. Med.*, **186**, 1077–1085.
273. Mukaida, N., Harada, A., Yasumoto, K., Matsushima, K. (1992) *Microbiol. Immunol.*, **36**, 773–789.
274. Tan, S.L., Nakao, H., He, Y., Vijaysri, S., Neddermann, P., Jacobs, B.L., Mayer, B.J., Katze, M.G. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 5533–5538.
275. Pawson, T. (1995) *Nature*, **373**, 573–580.
276. Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., Harris, M. (2004) *J. Gen. Virol.*, **85**, 721–729.
277. Georgopoulou, U., Caravokiri, K., Mavromara, P. (2003) *Arch. Virol.*, **148**, 237–251.
278. Macdonald, A., Crowder, K., Street, A., McCormick, C., Saksela, K., Harris, M. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 17775–17784.
279. Meurs, E.F., Galabru, J., Barber, G.N., Katze, M.G., Hovanessian, A.G. (1993) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **90**, 232–236.
280. Clemens, M.J., Elia, A. (1997) *J. Interferon Cytokine Res.*, **17**, 503–524.
281. He, Y., Nakao, H., Tan, S.L., Polyak, S.J., Neddermann, P., Vijaysri, S.,

- Jacobs, B.L., Katze, M.G. (2002) *J. Virol.*, **76**, 9207–9217.
282. Street, A., Macdonald, A., Crowder, K., Harris, M. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 12232–12241.
283. Majumder, M., Ghosh, A.K., Steele, R., Zhou, X.Y., Phillips, N.J., Ray, R., Ray, R.B. (2002) *Virology*, **294**, 94–105.
284. Park, K.-J., Choi, S.-H., Lee, S.Y., Hwang, S.B., Lai, M.M.C. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 13122–13128.
285. Ghosh, A.K., Majumder, M., Steele, R., Meyer, K., Ray, R., Ray, R.B. (2000) *Virus Res.*, **67**, 173–178.
286. Majumder, M., Ghosh, A.K., Steele, R., Ray, R., Ray, R.B. (2001) *J. Virol.*, **75**, 1401–1407.
287. Qadri, I., Iwahashi, M., Simon, F. (2002) *Biochim. Biophys. Acta*, **1592**, 193–204.
288. Ghosh, A.K., Steele, R., Meyer, K., Ray, R., Ray, R.B. (1999) *J. Gen. Virol.*, **80**, 1179–1183.
289. El-Deiry, W.S., Tokino, T., Velculescu, V.E., Levy, D.B., Parsons, R., Trent, J.M., Lin, D., Mercer, W.E., Kinzler, K.W., Vogelstein, B. (1993) *Cell*, **75**, 817–825.
290. Lan, K.H., Sheu, M.L., Hwang, S.J., Yen, S.H., Chen, S.Y., Wu, J.C., Wang, Y.J., Kato, N., Omata, M., Chang, F.Y., Lee, S.D. (2002) *Oncogene*, **21**, 4801–4811.
291. Geiss, G.K., Carter, V.S., He, Y., Kwieciszewski, B.K., Holzman, T., Korth, M.J., Lazaro, C.A., Fausto, N., Bumgarner, R.E., Katze, M.G. (2003) *J. Virol.*, **77**, 6367–6375.
292. Behrens, S.-E., Tomei, L., De Francesco, R. (1996) *EMBO J.*, **15**, 12–22.
293. Ollis, D.L., Brick, P., Hamlin, R., Xuong, N.G., Steitz, T.A. (1985) *Nature*, **313**, 762–766.
294. Bressanelli, S., Tomei, L., Rousset, A., Incitti, I., Vitale, R.L., Mathieu, M., De Francesco, R., Rey, F.A. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 13034–13039.
295. Ago, H., Adachi, T., Yoshida, A., Yamamoto, M., Habuka, N., Yatsunami, K., Miyano, M. (1999) *Structure Fold. Des.*, **7**, 1417–1426.
296. Lesburg, C.A., Cable, M.B., Ferrari, E., Hong, Z., Mannarino, A.F., Weber, P.C. (1999) *Nat. Struct. Biol.*, **6**, 937–943.
297. Hong, Z., Cameron, C.E., Walker, M.P., Castro, C., Yao, N., Lau, J.Y., Zhong, W. (2001) *Virology*, **285**, 6–11.
298. O'Farrell, D., Trowbridge, R., Rowlands, D., Jager, J. (2003) *J. Mol. Biol.*, **326**, 1025–1035.
299. Lee, K.J., Choi, J., Ou, J.H., Lai, M.M. (2004) *J. Virol.*, **78**, 3797–3802.
300. Kim, S.J., Kim, J.H., Kim, Y.G., Lim, H.S., Oh, J.W. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 50031–50041.
301. Zhong, W., Ferrari, E., Lesburg, C.A., Maag, D., Ghosh, S.K., Cameron, C.E., Lau, J.Y., Hong Z. (2000) *J. Virol.*, **74**, 9134–9143.
302. Leveque, V.J., Johnson, R.B., Parsons, S., Ren, J., Xie, C., Zhang, F., Wang, Q.M. (2003) *J. Virol.*, **77**, 9020–9028.
303. Oh, J.W., Sheu, G.T., Lai, M.M. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 17710–17717.
304. Reigadas, S., Ventura, M., Sarihcottin, L., Castroviejo, M., Litvak, S., Astier-Gin, T. (2001) *Eur. J. Biochem.*, **268**, 5857–5867.
305. Shim, J.H., Larson, G., Wu, J.Z., Hong, Z. (2002) *J. Virol.*, **76**, 7030–7039.
306. Ranjith-Kumar, C.T., Kim, Y.C., Gutshall, L., Silverman, C., Khandekar, S., Sarisky, R.T., Kao, C.C. (2002) *J. Virol.*, **76**, 12513–12525.
307. Ranjith-Kumar, C.T., Gutshall, L., Sarisky, R.T., Kao, C.C. (2003) *J. Mol. Biol.*, **330**, 675–685.
308. Lohmann, V., Korner, F., Herian, U., Bartenschlager, R. (1997) *J. Virol.*, **71**, 8416–8428.
309. Choi, H.B., Kim, Y.G., Oh, J.W. (2003) *Exp. Mol. Med.*, **35**, 475–485.
310. Qin, W., Luo, H., Nomura, T., Hayashi, N., Yamashita, T., Murakami, S. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 2132–2137.
311. Wang, Q.M., Hockman, M.A., Staschke, K., Johnson, R.B., Case, K.A., Lu, J., Parsons, S., Zhang, F., Rathnachalam, R., Kirkegaard, K., Colacino, J.M. (2002) *J. Virol.*, **76**, 3865–3872.
312. Carroll, S.S., Sardana, V., Yang, Z., Jacobs, A.R., Mizenko, C., Hall, D., Hill, L., Zugay-Murphy, J., Kuo, L.C. (2000) *Biochemistry*, **39**, 8243–8249.
313. Gu, B., Gutshall, L.L., Maley, D., Pruss, C.M., Nguyen, T.T., Silverman, C.L., Lin-Goerke, J., Khandekar, S., Liu, C., Baker, A.E., Casper, D.J., Sarisky, R.T. (2004) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **313**, 343–350.
314. Ishido, S., Fujita, T., Hotta, H. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **244**, 35–40.
315. Kyono, K., Miyashiro, M., Taguchi, I. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **292**, 659–666.
316. Hirano, M., Kaneko, S., Yamashita, T., Luo, H., Qin, W., Shiota, Y., Nomura, T., Kobayashi, K., Murakami, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 5109–5115.
317. Lan, S., Wang, H., Jiang, H., Mao, H., Liu, X., Zhang, X., Hu, Y., Xiang, L., Yuan, Z. (2003) *FEBS Lett.*, **554**, 289–294.
318. Gao, L., Tu, H., Shi, S.T., Lee, K.J., Asanaka, M., Hwang, S.B., Lai, M.M. (2003) *J. Virol.*, **77**, 4149–4159.
319. Bartenschlager, R., Lohmann, V. (2001) *Antiviral Research*, **52**, 1–17.
320. Lohmann, V., Korner, F., Koch, J., Herian, U., Theilmann, L., Bartenschlager, R. (1999) *Science*, **285**, 110–113.
321. Shimizu, Y.K., Igarashi, H., Kiyohara, T., Shapiro, M., Wong, D.C., Purcell, R.H., Yoshikura, H. (1998) *J. Gen. Virol.*, **79**, 1383–1386.
322. Mercer, D.F., Schiller, D.E., Elliott, J.F., Douglas, D.N., Hao, C., Rinfret, A., Addison, W.R., Fischer, K.P., Churchill, T.A., Lakey, J.R., Tyrrell, D.L., Kneteman, N.M. (2001) *Nat. Med.*, **7**, 927–933.
323. Xie, Z.C., Riezu-Boj, J.I., Lasarte, J.J., Guillen, J., Su, J.H., Civeira, M.P., Prieto, J. (1998) *Virology*, **1244**, 513–520.
324. Germe, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Lortat-Jacob, H., Ruigrok, R.W., Zarski, J.P., Drouet, E. (2002) *J. Med. Virol.*, **68**, 206–215.
325. Gardner, J.P., Durso, R.J., Arrigale, R.R., Donovan, G.P., Maddon, P.J., Dragic, T., Olson, W.C. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 4498–4503.
326. Forns, X., Allander, T., Rohwer-Nutter, P., Bukh, J. (2000) *Virology*, **274**, 75–85.
327. Hsu, M., Zhang, J., Flint, M., Logvinoff, C., Cheng-Mayer, C., Rice, C.M., McKeating, J.A. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 7271–7276.
328. Zhang, J., Randall, G., Higginbottom, A., Monk, P., Rice, C.M., McKeating, J.A. (2004) *J. Virol.*, **78**, 1448–1455.
329. Takikawa, S., Ishii, K., Aizaki, H., Suzuki, T., Asakura, H., Matsuura, Y., Miyamura, T. (2000) *J. Virol.*, **74**, 5066–5074.
330. Meola, A., Sbardellati, A., Bruni, Ercole, B., Cerretani, M., Pezzanera, M., Ceccacci, A., Vitelli, A., Levy, S., Nicosia, A., Traboni, C., McKeating, J., Scarselli, E. (2000) *J. Virol.*, **74**, 5933–5938.
331. Allander, T., Forns, X., Emerson, S.U., Purcell, R.H., Bukh, J. (2000) *Virology*, **277**, 358–367.
332. Masciopinto, F., Freer, G., Burgio, V.L., Levy, S., Galli-Stampino, L., Bendinelli, M., Houghton, M., Abrignani, S., Uematsu, Y. (2000) *Virology*, **304**, 187–196.
333. Chan-Fook, C., Jiang, W.R., Clarke, B.E., Zitzmann, N., Maidens, C., McKeating, J.A., Jones I.M. (2000) *Virology*, **273**, 60–66.
334. Drummer, H.E., Wilson, K.A., Pournourios, P. (2002) *J. Virol.*, **76**, 11143–11147.
335. Flint, M., Maidens, C., Loomis-Price, L.D., Shotton, C., Dubuisson, J., Monk, P., Higginbottom, A., Levy, S., McKeating, J.A. (1999) *J. Virol.*, **73**, 6235–6244.
336. Hadlock, K.G., Lanford, R.E., Perkins, S., Rowe, J., Yang, Q., Levy, S., Pileri, P., Abrignani, S., Fong, S.K. (2000) *J. Virol.*, **74**, 10407–10416.

337. Lambot, M., Fretier, S., Op De Beeck, A., Quatannens, B., Lestavel, S., Clavey, V., Dubuisson, J. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 20625–20630.
338. Owsianka, A., Clayton, R.F., Loomis-Price, L.D., McKeating, J.A., Patel, A.H. (2001) *J. Gen. Virol.*, **82**, 1877–1883.
339. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M., Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. (1998) *Science*, **282**, 938–941.
340. Monazahian, M., Bohme, I., Bonk, S., Koch, A., Scholz, C., Grethe, S., Thomssen, R. (1999) *J. Med. Virol.*, **57**, 223–229.
341. Enjoji, M., Nakamura, M., Kinukawa, N., Sugimoto, R., Noguchi, K., Tsuruta, S., Iwao, M., Kotoh, K., Iwamoto, H., Nawata, H. (2000) *Med. Sci. Monit.*, **6**, 841–844.
342. Wunschmann, S., Medh, J.D., Klinzmann, D., Schmidt, W.N., Stapleton, J.T. (2000) *J. Virol.*, **74**, 10055–10062.
343. Germi, R., Crance, J.M., Garin, D., Guimet, J., Thelu, M.A., Jouan, A., Zarski, J.P., Drouet, E. (2001) *J. Med. Virol.*, **64**, 6–12.
344. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A. (2002) *EMBO J.*, **21**, 5017–5025.
345. Roccasecca, R., Ansuini, H., Vitelli, A., Meola, A., Scarselli, E., Acali, S., Pezzanera, M., Ercole, B.B., McKeating, J., Yagnik, A., Lahm, A., Tramontano, A., Cortese, R., Nicosia, A. (2003) *J. Virol.*, **77**, 1856–1867.
346. Zhao, X., Tang, Z.Y., Klumpp, B., Wolff-Vorbeck, G., Barth, H., Levy, S., von Weizsacker, F., Blum, H.E., Baumert, T.F. (2002) *J. Clin. Invest.*, **109**, 221–232.
347. Triyatni, M., Saunier, B., Maruvada, P., Davis, A.R., Ulianich, L., Heller, T., Patel, A., Kohn, L.D., Liang, T.J. (2002) *J. Virol.*, **76**, 9335–9344.
348. Hamaia, S., Li, C., Allain, J.P. (2001) *Blood*, **98**, 2293–2300.
349. Castet, V., Moradpour, D. (2003) *Hepatology*, **38**, 771–774.
350. Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J., Gardner, J.P., Dragic, T. (2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 7270–7274.
351. Bartosch, B., Vitelli, A., Granier, C., Goujon, C., Dubuisson, J., Pascale, S., Scarselli, E., Cortese, R., Nicosia, A., Cosset, F.L. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 41624–41630.
352. Lozach, P.Y., Lortat-Jacob, H., de Lacroix de Lavalette, A., Staropoli, I., Foug, S., Amara, A., Houles, C., Fieschi, F., Schwartz, O., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Altmeyer, R. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 20358–20366.
353. Pohlmann, S., Zhang, J., Baribaud, F., Chen, Z., Leslie, G.J., Lin, G., Granelli-Piperno, A., Doms, R.W., Rice, C.M., McKeating, J.A. (2003) *J. Virol.*, **77**, 4070–4080.
354. Lozach, P.Y., Amara, A., Bartosch, B., Virelizier, J.L., Arenzana-Seisdedos, F., Cosset, F.L., Altmeyer, R. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 32035–32045.
355. Ludwig, I.S., Lekkerkerker, A.N., Depla, E., Bosman, F., Musters, R.J., Depraetere, S., van Kooyk, Y., Geijtenbeek, T.B. (2004) *J. Virol.*, **78**, 8322–8332.
356. Op De Beeck, A., Voisset, C., Bartosch, B., Ciczora, Y., Cocquerel, L., Keck, Z., Foug, S., Cosset, F.-L., Dubuisson, J. (2004) *J. Virol.*, **78**, 2994–3002.
357. Hennig, B.J., Hellier, S., Frodsham, A.J., Zhang, L., Klenerman, P., Knapp, S., Wright, M., Thomas, H.C., Thursz, M., Hill, A.V. (2002) *Genes Immun.*, **3**, 359–367.
358. Zuckerman, E., Kessel, A., Slobodin, G., Sabo, E., Yeshurun, D., Toubi, E. (2003) *J. Virol.*, **77**, 10432–10436.
359. Wack, A., Soldaini, E., Tseng, C., Nuti, S., Klimpel, G., Abrignani, S. (2001) *Eur. J. Immunol.*, **31**, 166–175.
360. Crotta, S., Stilla, A., Wack, A., D'Andrea, A., Nuti, S., D'Oro, U., Mosca, M., Filliponi, F., Brunetto, R.M., Bonino, F., Abrignani, S., Valiante, N.M. (2002) *J. Exp. Med.*, **195**, 35–41.

361. Tseng, C.T., Klimpel, G.R. (2002) *J. Exp. Med.*, **195**, 43–49.
362. Zuckerman, E., Slobodin, G., Kessel, A., Sabo, E., Yeshurun, D., Halas, K., Toubi, E. (2002) *Clin. Exp. Immunol.*, **128**, 353–358.
363. Kronenberger, B., Ruster, B., Elez, R., Weber, S., Piiper, A., Lee, J.H., Roth, W.K., Zeuzem, S. (2001) *Hepatology*, **33**, 1518–1526.
364. Shaw, M.L., McLauchlan, J., Mills, P.R., Patel, A.H., McCruden, E.A. (2003) *J. Med. Virol.*, **70**, 361–372.
365. Kashiwagi, T., Hara, K., Kohara, M., Iwahashi, J., Hamada, N., Honda-Yoshino, H., Toyoda, T. (2002) *J. Biol. Chem.*, **277**, 28700–28705.
366. Kim, Y.K., Kim, C.S., Lee, S.H., Jang, S.K. (2002) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **290**, 105–112.
367. Tsuchihara, K., Tanaka, T., Hijikata, M., Kuge, S., Toyoda, H., Nomoto, A., Yamamoto, N., Shimotohno, K. (1997) *J. Virol.*, **71**, 6720–6726.
368. Ito, T., Lai, M.M. (1997) *J. Virol.*, **71**, 8698–8706.
369. Chung, R.T., Kaplan, L.M. (1999) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **254**, 351–362.
370. Luo, G. (1999) *Virology*, **256**, 105–118.
371. Petrik, J., Parker, H., Alexander, G.J. (1999) *J. Gen. Virol.*, **80**, 3109–3113.
372. Wood, J., Frederickson, R.M., Fields, S., Patel, A.H. (2001) *J. Virol.*, **75**, 1348–1358.
373. Ali, N., Siddiqui, A. (1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 2249–2254.
374. Hahm, B., Kim, Y.K., Kim, J.H., Kim, T.Y., Jang, S.K. (1998) *J. Virol.*, **72**, 8782–8788.
375. Spangberg, K., Schwartz, S. (1999) *J. Gen. Virol.*, **80**, 1371–1376.
376. Fukushi, S., Kurihara, C., Ishiyama, N., Hoshino, F.B., Oya, A., Katayama, K. (1997) *J. Virol.*, **71**, 1662–1666.
377. Fukushi, S., Okada, M., Kagayama, T., Hoshino, F.B., Katayama, K. (1999) *Virus Genes*, **19**, 153–161.
378. Friebe, P., Lohmann, V., Krieger, N., Bartenschlager, R. (2001) *J. Virol.*, **75**, 12047–12057.
379. Varaklioti, A., Georgopoulou, U., Kakkanas, A., Psaridi, L., Serwe, M., Caselmann, W.H., Mavromara, P. (1998) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **253**, 678–685.
380. Luo, G., Xin, S., Cai, Z. (2003) *J. Virol.*, **77**, 3312–3318.
381. Honda, M., Ping, L.H., Rijnbrand, R.C., Amphlett, E., Clarke, B., Rowlands, D., Lemon, S.M. (1996) *Virology*, **222**, 31–42.
382. Wang, C., Le, S.Y., Ali, N., Siddiqui, A. (1995) *RNA*, **1**, 526–537.
383. Honda, M., Brown, E.A., Lemon, S.M. (1996) *RNA*, **2**, 955–968.
384. Klinck, R., Westhof, E., Walker, S., Afshar, M., Collier, A., Aboul-Ela, F. (2000) *RNA*, **6**, 1423–1431.
385. Kim, Y.K., Lee, S.H., Kim, C.S., Seol, S.K., Jang, S.K. (2003) *RNA*, **9**, 599–606.
386. Pestova, T.V., Kolupaeva, V.G., Lomakin, I.B., Pilipenko, E.V., Shatsky, I.N., Agol, V.I., Hellen, C.U.T. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 7029–7036.
387. Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Fletcher, S.P., Jackson, R.J., Hellen, C.U. (1998) *Genes Dev.*, **12**, 67–83.
388. Hellen, C.U., Pestova, T.V. (1999) *J. Viral Hepat.*, **6**, 79–87.
389. Lytle, J.R., Wu, L., Robertson, H.D. (2002) *RNA*, **8**, 1045–1055.
390. Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Hellen, C.U. (2000) *J. Virol.*, **74**, 6242–6250.
391. Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., Murray, M.G., Lau, J.Y., Doudna, J.A. (1999) *J. Mol. Biol.*, **292**, 513–529.
392. Kruger, M., Beger, C., Li, Q.X., Welch, P.J., Tritz, R., Leavitt, M., Barber, J.R., Wong-Staal, F. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **97**, 8566–8571.
393. Reynolds, J.E., Kaminski, A., Carroll, A.R., Clarke, B.E., Rowlands, D.J., Jackson, R.J. (1996) *RNA*, **2**, 867–878.

394. Rijnbrand, R., van der Straaten, T., van Rijn, P.A., Spaan, W.J.M., Bredenbeek, P. J. (1997) *J. Virol.*, **71**, 451–457.
395. Kieft, J.S., Zhou, K., Jubin, R., Doudna, J.A. (2001) *RNA*, **7**, 194–206.
396. Sizova, D.V., Kolupaeva, V.G., Pestova, T.V., Shatsky, I.N., Hellen, C.U.T. (1998) *J. Virol.*, **72**, 4775–4782.
397. Buratti, E., Tisminetzky, S., Zotti, M., Baralle, F.E. (1998) *Nucleic Acids Res.*, **26**, 3179–3187.
398. Otto, G.A., Lukavsky, P.J., Lancaster, A.M., Sarnow, P., Puglisi, J.D. (2002) *RNA*, **8**, 913–923.
399. Ito, T., Lai, M.M. (1999) *Virology*, **254**, 288–296.
400. Isoyama, T., Kamoshita, N., Yasui, K., Iwa, A., Shiroki, K., Toyoda, H., Yamada, A., Takasaki, Y., Nomoto, A. (1999) *J. Gen. Virol.*, **80**, 2319–2327.
401. Ali, N., Pruijn, G.J., Kenan, D.J., Keene, J.D., Siddiqui, A. (2000) *J. Biol. Chem.*, **275**, 27531–27540.
402. Pudi, R., Abhiman, S., Srinivasan, N., Das, S. (2003) *J. Biol. Chem.*, **278**, 12231–12240.
403. Pudi, R., Srinivasan, P., Das, S. (2004) *J. Biol. Chem.*, **279**, 29879–29888.
404. Shimazaki, T., Honda, M., Kaneko, S., Kobayashi, K. (2002) *Hepatology*, **35**, 199–208.
405. Beales, L.P., Rowlands, D.J., Holzenburg, A. (2001) *RNA*, **7**, 661–670.
406. Izumi, R.E., Valdez, B., Banerjee, R., Srivastava, M., Dasgupta, A. (2001) *Virus Res.*, **76**, 17–29.
407. Kruger, M., Beger, C., Welch, P.J., Barber, J.R., Manns, M.P., Wong-Staal, F. (2001) *Mol. Cell. Biol.*, **21**, 8357–8364.
408. Ito, T., Tahara, S.M., Lai, M.M. (1998) *J. Virol.*, **72**, 8789–8796.
409. Murakami, K., Abe, M., Kageyama, T., Kamoshita, N., Nomoto, A. (2001) *Arch. Virol.*, **146**, 29–41.
410. Collier, A.J., Tang, S., Elliott, R.M. (1998) *J. Gen. Virol.*, **79**, 2359–2366.
411. Lee, P.A., Blatt, L.M., Blanchard, K.S., Bouhana, K.S., Pavco, P.A., Belton, L., Sandberg, J.A. (2000) *Hepatology*, **32**, 640–646.
412. Laporte, J., Bain, C., Maurel, P., Inchauspe, G., Agut, H., Cahour, A. (2003) *Blood*, **101**, 52–57.
413. Thelu, M.A., Drouet, E., Hilleret, M.N., Zarski, J.P. (2004) *J. Med. Virol.*, **72**, 396–405.
414. Honda, M., Kaneko, S., Matsushita, E., Kobayashi, K., Abell, G.A., Lemon, S.M. (2000) *Gastroenterology*, **118**, 152–162.
415. Venkatesan, A., Sharma, R., Dasgupta, A. (2003) *Virus Res.*, **94**, 85–95.
416. Kato, T., Miyamoto, M., Furusaka, A., Date, T., Yasui, K., Kato, J., Matsushima, S., Komatsu, T., Wakita, T. (2003) *J. Med. Virol.*, **69**, 357–366.
417. Komoda, Y., Hijikata, M., Tanji, Y., Hirowatari, Y., Mizushima, H., Kimura, K., Shimotohno, K. (1994) *Gene*, **145**, 221–226.
418. Eckart, M.R., Selby, M., Masiarz, F., Lee, C., Berger, K., Crawford, K., Kuo, C., Kuo, G., Houghton, M., Choo, Q.L. (1993) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **192**, 399–406.
419. Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1993) *J. Virol.*, **67**, 2832–2843.
420. Lyko, F., Martoglio, B., Jungnickel, B., Rapoport, T.A., Dobberstein, B. (1995) *J. Biol. Chem.*, **270**, 19873–19878.
421. Manabe, S., Fuke, I., Tanishita, O., Kaji, C., Gomi, Y., Yoshida, S., Mori, C., Takamizawa, A., Yosida, I., Okayama, H. (1994) *Virology*, **198**, 636–644.
422. Shoji, I., Suzuki, T., Sato, M., Aizaki, H., Chiba, T., Matsuura, Y., Miyamura, T. (1999) *Virology*, **254**, 315–323.
423. Cocquerel, L., Duvet, S., Meunier, J.C., Pillez, A., Cacan, R., Wychowski, C., Dubuisson, J. (1999) *J. Virol.*, **73**, 2641–2649.