

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ И ПРИКЛАДНЫЕ  
АСПЕКТЫ ВИРУСОЛОГИИ

УДК 578.23

КЛЕТочНЫЕ СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА  
И СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА: МЕХАНИЗМЫ  
РЕГУЛЯЦИИ И ВЛИЯНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

© 2011 г. О. А. Смирнова, А. В. Иванов\*, О. Н. Иванова,  
В. Т. Валуев-Эллистон, С. Н. Кочетков

*Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта Российской академии наук, Москва, 119991*

Поступила в редакцию и принята к печати 01.09.2010 г.

Вирус гепатита С (ВГС) – один из наиболее распространенных и опасных патогенов человека. Вызываемое им заболевание в большинстве случаев переходит в хроническую форму, трудно поддающуюся лечению и приводящую к развитию поражений различных органов и систем человека: это фиброз, стеатоз и рак печени. Появление этих нарушений в настоящее время связывают с окислительным стрессом и стрессом эндоплазматического ретикулума (ЭР), которые развиваются в клетках, зараженных ВГС. При этом ВГС нарушает и системы защиты клетки от этих видов стресса, тем самым препятствуя восстановлению процессов жизненного цикла клетки. Настоящий обзор посвящен анализу литературных данных по функционированию клеточных систем защиты от окислительного стресса и стресса ЭР в клетках, находящихся в условиях биологической нормы, и в инфицированных ВГС клетках. Кроме того, в обзоре приведена краткая информация о структуре генома и основных функциях белков ВГС.

**Ключевые слова:** вирус гепатита С, окислительный стресс, стресс эндоплазматического ретикулума, фактор транскрипции, регуляция.

CELLULAR DEFENSE SYSTEMS AGAINST OXIDATIVE AND ER STRESSES: MECHANISMS OF REGULATION AND INFLUENCE OF HEPATITIS C VIRUS, by O. A. Smirnova, A. V. Ivanov\*, O. N. Ivanova, V. T. Valuev-Elliston, S. N. Kochetkov (Engelhardt Institute of Molecular Biology, Russian Academy of Sciences, Moscow, 119991 Russia, \*e-mail: aivanov@yandex.ru). Hepatitis C virus is one of the most spread and dangerous human pathogens. In most cases hepatitis C develops into chronic diseases which in many cases escape antiviral therapy and is associated with contributed to progression of various virus-associated organ damage and disorders including liver fibrosis, steatosis and hepatocellular carcinoma. Many of these diseases are currently linked to oxidative and ER stresses induced by the viral proteins. At the same time, hepatitis C virus disturbs systems protecting cells from these stresses, thus avoiding their effect on processes of the virus life cycle. Here, we have analyzed recent data on mechanisms of the cellular defense system functioning in infected and uninfected cells. In addition, major data on the hepatitis C virus genome structure and main functions of the virus proteins have been summarized briefly.

**Keywords:** hepatitis C virus, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress, transcription factor, regulation.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гепатита С (ВГС) вызывает одно из наиболее распространенных и опасных заболеваний человека. По оценкам ВОЗ примерно 2.2% населения Земли или каждый 45-й житель планеты – носители

вируса [1]. Вирус чрезвычайно изменчив: у больного, инфицированного ВГС, одновременно выявляют миллионы квазивидов вируса [2]. Такая высокая вариабельность генома ВГС обусловлена низкой точностью репликации, что позволяет вирусу избе-

Принятые сокращения: ARE (antioxidant response elements) – элемент, активируемый антиоксидантами; ATF (activating transcription factor) – транскрипционный фактор; bZIP (basic region and leucine zipper) – домен типа основной мотив и лейциновой молния; ERAD (ER-associated protein degradation) – деградация неправильно свернутых белков; IRE1 (inositol-requiring enzyme 1) – фермент, регулируемый инозитолом; Keap1 (Kelch-associating protein 1) – ассоциированный с ECH Kelch-подобный белок 1; MAPK (mitogen-activated protein kinase) – митоген-активируемая протеинкиназа; Nf-kB (nuclear factor kB) – ядерный фактор каппа В; ORF (open reading frame) – открытая рамка считывания; PERK – PKR-подобная киназа, связанная с эндоплазматическим ретикулумом; PI3K (phosphatidylinositol 3-kinase) – фосфатидилинозитол-3-киназа; PKC (protein kinase C) – протеинкиназа С; PKR – (protein kinase R) протеинкиназа R; STAT-3 (signal transducer and activator of transcription 3) – передатчик сигнала и активатор транскрипции 3; UPR (unfolded protein response) – ответ на неправильно свернутые белки; АФК – активные формы кислорода; ВГС – вирус гепатита С; ЭР – эндоплазматический ретикулум.

\* Эл. почта: aivanov@yandex.ru

гать подавления со стороны иммунной системы [3]. Как следствие, у 80% инфицированных заболевание переходит в хроническую стадию, при которой велик риск развития различных, весьма опасных, заболеваний печени, таких как цирроз (вероятность 3–10% в течение 20 лет) и гепатоцеллюлярная карцинома (примерно у 1% инфицированных) [4, 5]. Кроме того, с ВГС-инфекцией связывают появление и развитие других различных заболеваний, непосредственно не связанных с печенью, но затрагивающих кроветворение (криоглобулинемия, неходжкинская лимфома), функции почек (гломерулонефрит) и другие системы организма человека [6].

Заболевание гепатитом С трудно поддается лечению. В настоящее время противовирусная терапия основана на применении интерферона  $\alpha$  пролонгированного действия, индивидуально или в комбинации с нуклеозидным аналогом рибавирином. Стоит отметить, что стоимость такой терапии высока, а эффективность, напротив, крайне низка: ответ наблюдается примерно у 40% инфицированных генотипом 1 ВГС, наиболее распространенным в России, и в 80% случаев заболевания другими генотипами [5, 7]. Кроме того, подобная противовирусная терапия имеет ряд побочных эффектов, таких как гриппозное состояние, депрессия, когнитивная дисфункция, повышенная утомляемость, цитопения, ретинопатия и др. [8]. За последние десять лет охарактеризован большой набор соединений, подавляющих репликацию вируса в клеточных системах. Среди них можно выделить ингибиторы протеиназы; нуклеозидные и нуклеозидные ингибиторы РНК-зависимой РНК-полимеразы [9]. Тем не менее, ни одно из предложенных соединений до сих пор не прошло даже предклинических испытаний, что связано с крайне высокой изменчивостью вируса – именно этим фактором обусловлено быстрое появление вариантов ВГС, устойчивых к любому, совершенно новому, только что разработанному, противовирусному препарату. Как следствие – применение таких соединений в ходе монотерапии позволяет достичь лишь кратковременного вирусологического ответа (снижения титра вирусной РНК в крови). Современная концепция терапии заключается в сочетании новых препаратов – ингибиторов вирусной репликации – с уже испытанными: рибавирином и интерфероном. Оправданность такого подхода подтверждена в ходе клинических испытаний нескольких новых кандидатных препаратов. Так, применение теларпревира (Telaprevir) в сочетании с двумя другими препаратами позволяет не только добиваться стойкого вирусологического ответа у большинства пациентов, но и существенно сократить длительность терапии [10].

Наиболее опасное последствие ВГС-инфекции – развитие карциномы печени. В настоящее время считается, что онкогенность ВГС обусловлена несколькими факторами. Во-первых, хроническая инфекция печени сопровождается воспалительным процессом, который может являться причиной трансформации гепатоцитов [11]. Во-вторых, показано, что экспрессия ряда индивидуальных белков ВГС, вследствие различных причин, приводит к появлению раковых клеток в клеточных линиях и/или у лабораторных животных [12, 13]. Ученые объясняют этот экспериментальный факт тем, что некоторые белки, к которым, по-видимому, относятся и белки (или какой-то из белков) ВГС, могут вызывать окислительный стресс [14] и стресс эндоплазматического ретикулума (ЭР) [15], а также нарушать соответствующие системы защиты клетки.

Данный обзор посвящен анализу механизмов защиты клетки от стресса ЭР и окислительного стресса. Кроме того, в обзоре приведена краткая информация о структуре генома и функциях белков ВГС, а также о влиянии вируса на рассматриваемые системы защиты клетки.

## ГЕНОМ И ПРОТЕОМ ВИРУСА ГЕПАТИТА С

Геном ВГС представляет собой (+)-цепь РНК длиной примерно 9600 н., а единственная открытая рамка считывания (ORF) кодирует полипротеин, состоящий примерно из 3000 аминокислотных остатков (рис. 1) [4]. Рамка считывания ограничена с 5'- и 3'-концов нетранслируемыми участками (UTR). 5'-UTR содержит участок внутреннего связывания рибосомы (IRES), обеспечивающий трансляцию генома ВГС по кеп-независимому механизму. 3'-UTR содержит высококонсервативную нуклеотидную последовательность, роль которой состоит в связывании вирусной полимеразы и обеспечении инициации репликации генома [16].

Трансляция ORF и посттрансляционный процессинг образующегося полипротеина приводят к появлению четырех структурных и шести неструктурных белков [4]. Структурные белки локализованы в N-концевом фрагменте полипептида-предшественника. К ним относят белки капсида (С), гликопротеины оболочки Е1 и Е2, а также небольшой белок р7. Неструктурные белки NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A и NS5B (ферменты и регуляторы вирусных и клеточных процессов) образуются из С-концевой части полипептида. Кроме того, несколько лет назад показано существование еще одного белка – F-белка, образующегося в результате сдвига рамки считывания в процессе трансляции участка, кодирующего белок С [17].

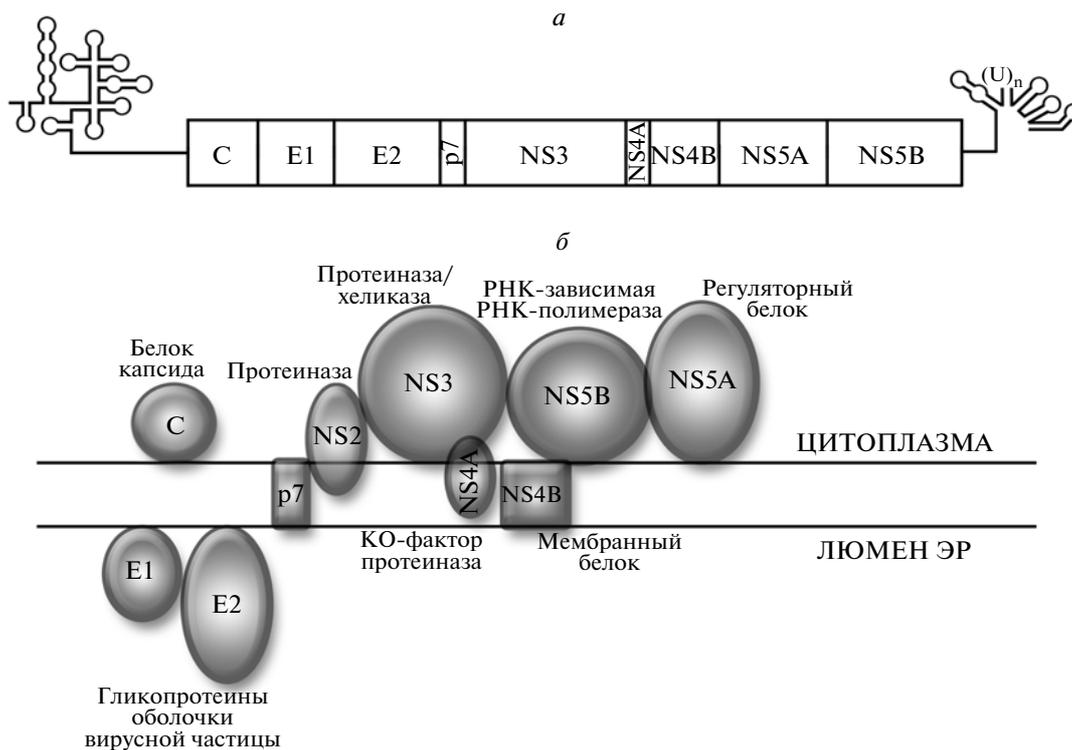


Рис. 1. Вирус гепатита С: а – структура генома, б – белки и их основные функции.

Структурный белок С (core protein) представляет собой основной белок вирусного капсида, который склонен к олигомеризации и обладает РНК-связывающей активностью [18]. Несмотря на способность связывать любую РНК (например, рРНК), С белок взаимодействует преимущественно с вирусной РНК [19]. Кроме того, этот белок может взаимодействовать с белками клетки-хозяина [20, 21], регулировать транскрипцию некоторых генов [22], а также вызывать окислительный стресс (подробнее см. ниже) [23].

Белки E1 и E2 – гликопротеины оболочки вириона [24]. Комплекс E1–E2 отвечает за связывание вируса с рецепторами клетки, обеспечивая проникновение вирусной частицы в клетку [25]. Гликопротеины E1 и E2 нарушают метаболизм клетки. Белок E1 при экспрессии в гепатоцитах приводит к гибели клеток в результате апоптоза [26]. Гликопротеины E1 и E2 способны также вызывать стресс ЭР (подробнее см. ниже) [27].

Белок p7 – короткий полипептид, состоящий из 63 аминокислотных остатков (7 кДа), склонен к олигомеризации в виде гексамера и образует кальциевые каналы в мембране ЭР [4, 28]. Белок p7 необходим при сборке вирусных частиц, хотя его роль в этом процессе до сих пор неясна [29].

Неструктурные белки NS2 и NS3 формируют две протеиназы – NS2/3 и NS3, – обеспечивающие процессинг неструктурных белков ВГС [4]. С-кон-

цевой домен белка NS3 выполняет роль АТФ-зависимой хеликазы – фермента, расплетающего РНК- или ДНК-дуплексы [30]. Короткий белок NS4A, будучи кофактором протеиназы NS3, образует с ней стабильный комплекс, тем самым заметно увеличивая протеиназную активность [31].

Белок NS4B представляет собой гидрофобный полипротеин массой 27 кДа, содержащий в своей структуре 4–5 трансмембранных доменов [32]. Функции NS4B изучены мало, однако достоверно известно, что экспрессия белка NS4B, как и экспрессия гликопротеинов, вызывает стресс ЭР и нарушает функционирование системы защиты клетки от данного вида стресса [33].

Белок NS5A – это регуляторный цинк-связывающий фосфополипротеин [34, 35], входящий в состав репликационного комплекса ВГС [36]. NS5A взаимодействует со многими белками клетки-хозяина, что приводит к блокированию апоптоза и трансформации клеток [37], вызывает окислительный стресс [38], а также ингибирует действие противовирусного цитокина – интерферона  $\alpha$  [39].

Белок NS5B представляет собой РНК-зависимую РНК-полимеразу ВГС [4], которая катализирует синтез РНК по праймер-зависимому и по праймер-независимому (*de novo*) механизмам [40]. К настоящему времени установлено, что РНК-полимераза ВГС непосредственно взаимодействует

с другими белками вируса, а именно: NS3, NS4A, NS4B и белком С [36, 41]. Вместе с этими белками РНК-полимераза NS5B образует мембрано-ассоциированный репликативный комплекс ВГС, в состав которого входят также и некоторые клеточные белки [42]. Особую роль в регуляции репликации ВГС играют белки NS3 и NS5A. Первый усиливает ферментативную активность вирусной РНК-полимеразы [43], второй в нефосфорилированном состоянии ингибирует праймер-зависимую активность фермента, а в фосфорилированном – праймер-независимую [44].

### КЛЕТОЧНЫЕ И ЖИВОТНЫЕ МОДЕЛИ РЕПЛИКАЦИИ ВИРУСА ГЕПАТИТА

На протяжении нескольких десятилетий разработка новых противовирусных агентов осложнялась отсутствием животных и клеточных моделей для размножения ВГС. Это связано с тем, что ВГС инфицирует только человека и шимпанзе [45]. Помимо того, что использование шимпанзе в качестве лабораторного животного ограничено рядом этических норм, это еще и чрезвычайно дорогостоящий эксперимент. В последнее время в качестве животной модели используют лабораторных мышей с ослабленным иммунитетом (Alb-uPA mice). Эти мыши несут ген активатора уроплазминогена, что позволяет инфицировать до 85% животных путем трансплантации им гепатоцитов человека [46]. Более подробно эта система рассмотрена в обзоре [47].

Хотя открытие ВГС относится к 1989 г. [48], первые клеточные модели для его размножения появились только в конце 90-х–начале 2000-х годов [49, 50]. Эти модели представляли собой определенные линии гепатоцитов, содержащие фрагмент вирусной РНК, в которой, как правило, отсутствовали области, кодирующие структурные белки, и имелась одна или несколько адаптивных мутаций. Кроме того, для удобства работы с такими моделями в отдельные варианты РНК вводили дополнительную рамку считывания, кодирующую неомицинфосфотрансферазу и/или люциферазу. Подобные конструкторы создали практически для всех генотипов ВГС. Однако их использование позволяло получать лишь автономно реплицирующиеся псевдовиральные РНК (репликоны), но не инфекционные вирусные частицы [51].

В 2005 г. получена инфекционная система ВГС (НСVcc), представляющая собой полноразмерную геномную вирусную РНК, при трансфекции которой в линии гепатоцитов Huh7 человека происходила не только репликация РНК и синтез белков ВГС (как в случае репликонов), но образовывались и инфекционные вирусные частицы [52, 53]. Эти частицы инфицировали как гепатоциты в культуре клеток,

так и шимпанзе, и иммунодефицитных мышей. Создание такой системы стало возможным благодаря открытию уникального изолята ВГС генотипа 2a – JFH (Japanese fulminant hepatitis), который обладает аномально высокой репликативной активностью и патогенностью [54, 55].

### ОКИСЛИТЕЛЬНЫЙ СТРЕСС

Окислительным стрессом называют процесс накопления в клетке значительных количеств токсичных активных форм кислорода (АФК), например, пероксидов и свободных радикалов [56]. Большинство АФК образуется в клетке постоянно, однако на столь низком уровне, что клетка либо инактивирует их с помощью антиоксидантов, либо заменяет или репарирует поврежденные ими молекулы. Так что при небольших нарушениях, вызванных окислительным стрессом, клетка, справившись с ними, возвращается в исходное состояние; однако сильный стресс вызывает апоптоз [57, 58].

### СИСТЕМА ЗАЩИТЫ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА

В клетке существует несколько специальных защитных механизмов, направленных на блокирование негативного воздействия АФК на различные процессы. Основной способ защиты заключается в восстановлении АФК с помощью низкомолекулярных антиоксидантов и так называемых “ферментов II фазы защиты от окислительного стресса и токсичных веществ” (далее: “ферменты фазы II”) [59]. К антиоксидантам относятся растворенные в цитоплазме гидрофильные соединения (восстановленный глутатион, аскорбиновая кислота и карнозин), а также локализованные в биологических мембранах гидрофобные вещества (токоферол – витамин Е, ретинол и каротин) [56]. К ферментам фазы II относят супероксиддисмутазу, каталазу, селеновую (глутатион-зависимую) пероксидазу, глутатионредуктазу, хиноноксидоредуктазу 1 (NQO1), глутатион-S-трансферазу (GST), альдо-кеторедуктазу гем-оксигеназу и многие другие [59, 60]. Все эти белки играют важнейшую роль в защите клетки от окислительного стресса, о чем кратко изложено в обзоре [60].

Регуляция биосинтеза ферментов фазы II находится в полной зависимости от состояния клетки. Так, при возрастании концентрации АФК (окислительном стрессе) или токсичных соединений (токсическом стрессе) происходит резкое усиление экспрессии генов этих белков [60]. Важную роль в регуляции их транскрипции играют определенные цис-элементы, представляющие собой последовательности ДНК, расположенные в соответствующих промоторных областях и взаимодействующие

со специфическими факторами транскрипции [61]. Такие последовательности в англоязычной литературе получили название AREs (antioxidant response elements), EpREs (electrophile response elements) или StREs (stress response elements).

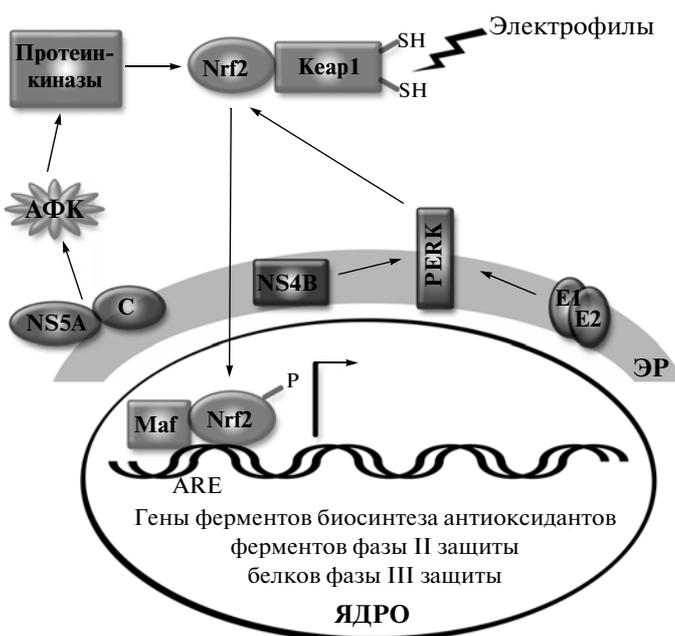
**Факторы транскрипции, регулирующие экспрессию ARE-зависимых генов**

Активность ARE-зависимых генов регулируют белки Nrf1 и Nrf2, принадлежащие к классу транскрипционных факторов с основным доменом типа “лейциновая молния” (bZIP). Они получили название от английского “NF-E2-related factors”, исходя из высокой гомологии с белком NF-E2 (Nuclear factor Erythroid 2), регулирующим экспрессию глобиновых генов.

В отсутствие стресса в клетке фактор транскрипции Nrf1 N-концевым гидрофобным трансмембранным доменом закорен на мембране ЭР [62]. При окислительном стрессе и, возможно, стрессе ЭР происходит отщепление трансмембранного домена, что приводит к активации Nrf1 [63, 64].

В нормальных условиях фактор транскрипции Nrf2 находится в основном в цитоплазме – в комплексе с белком-репрессором Keap1 [60] (рис. 2). В современной модели клеточного ответа на окислительный стресс белку Keap1 отводится роль своеобразного “рубильника” для Nrf2. В нормальных условиях, благодаря постоянной Keap1- и убиквитин-зависимой деградации Nrf2 протеасомами, состояние фактора Nrf2 находится в положении “выключено” [65]; при этом Keap1 выступает в качестве адаптора для убиквитин-лигазного комплекса. В то же время диссоциация Keap1-Nrf2 при стрессе ЭР комплекса приводит в повышению времени полужизни фактора транскрипции.

В литературе существуют различные оценки вклада каждого из этих транскрипционных факторов в активацию генов ответа на окислительный стресс. С одной стороны, показано, что основной вклад принадлежит белку Nrf2 [66]. С другой стороны, известны гены, активируемые только фактором Nrf1 (металлотейонины 1 и 2, MT1 и MT2). Кроме того, при исследовании эмбрионов нокаутных мышей показано, что удаление гена *nrf1* приводит к тяжелым поражениям печени и гибели эмбриона до рождения – к 17–18 дню от оплодотворения [67]. В то же время мыши, у которых отсутствовал ген *nrf2*, рождались жизнеспособными, но с нарушенной функцией регенерации печени [68]. По-видимому, несмотря на структурную схожесть этих двух транскрипционных факторов, их функции и пути активации отличаются друг от друга.

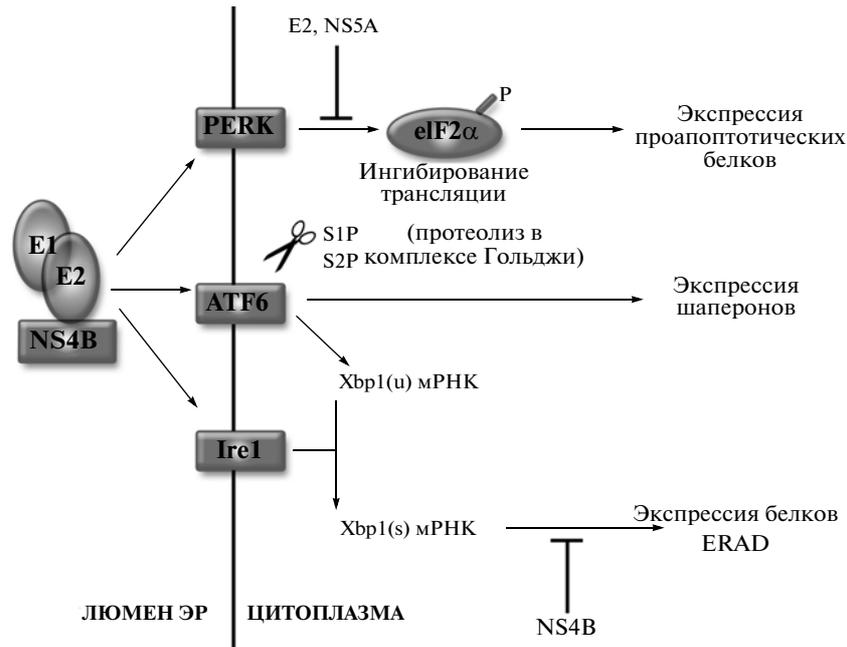


**Рис. 2.** Механизм активации системы защиты клетки от окислительного стресса и влияние на нее белков ВГС. В отсутствие стресса транскрипционный фактор Nrf2 удерживается белком-партнером Keap1 в цитоплазме. При окислительном стрессе, а так же при инфицировании ВГС Nrf2 фосфорилируется и перемещается в ядро, где активирует транскрипцию ARE-зависимых генов.

Фактор транскрипции Nrf2 активен не в виде мономера, а в виде гетеродимера. в состав которого входят белки семейства Maf (Muscle atoneurotic fibroblastoma) [69, 70]. Взаимодействие некоторых из них с Nrf2 приводит к усилению экспрессии ARE-зависимых генов, в то время как связывание с другими, напротив, блокирует транскрипцию. Активация фактора транскрипции Nrf2 происходит при нарушении его взаимодействия с Keap1 вследствие либо модификации Keap1, либо фосфорилирования самого Nrf2 [71, 72]. Кроме того, недавно открыт новый механизм регуляции активности Nrf2 – ацетилирование нескольких аминокислотных остатков Nrf2 снижает его сродство к ARE-содержащим промоторам [73]. Эти способы регуляции подробно рассмотрены в обзоре [74].

**СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА**

Эндоплазматический ретикулум – одна из самых больших клеточных органелл. Мембрана ЭР составляет около половины всех клеточных мембран, и занимает примерно 10% объема клетки. В ЭР происходят биосинтез и транспорт белков, липидов и стероидов, а также хранятся клеточные “запасы” ионов кальция [75]. Кроме того, в люмене ЭР проходит



**Рис. 3.** Механизм активации системы защиты клетки от стресса ЭР в нормальной и в инфицированной ВГС клетке. При активации UPR в клетке реализуются три стратегии: блокирование кеп-зависимой трансляции; усиление экспрессии шаперонов, участвующих в фолдинге; и активация ERAD — специфической для ЭР системы деградации неправильно свернутых белков. В клетке, инфицированной ВГС, не происходит ни блокирования трансляции, ни усиления экспрессии белков ERAD.

фолдинг белков и осуществляется его контроль, в чем принимают участие специфические системы гликозилирования/дегликозилирования, а также деградации неправильно свернутых белков. Правильное функционирование ЭР чрезвычайно важно для клетки, а нарушение его функционирования, называемое стрессом ЭР, ведет к изменению работы всех клеточных систем. Причиной стресса ЭР может быть усиленный синтез секреторных и иных белков, нарушение системы гликозилирования при контроле фолдинга или баланса ионов кальция между цитоплазмой и ЭР, сдвиг окислительно-восстановительного потенциала, избыток холестерина или недостаток глюкозы [76–78]. Все это ведет к накоплению в ЭР несвернутых или неправильно свернутых белков [79].

В середине 70-х годов идентифицированы два глюкозозависимых белка — шаперона ЭР, GRP78/BiP и GRP94, которые связываются в ЭР со множеством различных несвернутых белков, предотвращают их транспорт из ЭР и способствуют их фолдингу [80]. Впоследствии показано, что накопление несвернутых белков в ЭР может быть сигналом к активации экспрессии BiP, GRP94 и родственных им белков [81]. Такой процесс назван “ответом на неправильно свернутые белки”, или Unfolded Protein Response (UPR) [79]. В настоящее время показано, что это естественный процесс во всех типах клеток, кото-

рый играет важную роль в устранении негативных последствий стресса ЭР и восстановлении его функционирования.

### UPR – КЛЕТочный ОТВЕТ НА СТРЕСС ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

В клетке при активации ответа на неправильно свернутые белки (UPR) реализуются три стратегии (рис. 3): блокирование кеп-зависимой трансляции, усиление экспрессии шаперонов, участвующих в фолдинге, и активация ЭР-специфической системы деградации неправильно свернутых белков (ERAD). Каждый из этих процессов активируется соответствующей сигнальной системой, причем ключевые компоненты каждой из них — это белки IRE1, PERK, ATF6 [82].

Помимо UPR в клетке существует и другой механизм ответа на стресс ЭР — он запускается при крайне интенсивном биосинтезе белков различных вирусов [83, 84]. Хотя многие вирусы напрямую не нарушают фолдинг белков в ЭР, крайне интенсивный биосинтез их компонентов увеличивает нагрузку на эту органеллу. Как следствие, клетка сама запускает некоторые из описанных выше сигнальных путей с целью активации фактора транскрипции NF-κB и последующей экспрессии генов воспаления и иммунного ответа. Кроме того, в ответ на бактериаль-

ные и, возможно, вирусные инфекции происходит активация продукции ряда противоинфекционных цитокинов (интерферон  $\beta$ , интерлейкин-6, фактор некроза опухолей и пр.) при участии Toll-подобных рецепторов [85].

Ниже будут рассмотрены схемы сигнальных путей UPR, механизмы их активации и репрессии.

### *Сигнальный путь PERK*

В ответ на стресс ЭР в эукариотических клетках, прежде всего, происходит временное понижение или полное прекращение трансляции белка, ключевую роль в этом процессе играет протеинкиназа PERK [86, 87]. Эта киназа представляет собой трансмембранный белок, в нормальном состоянии клетки связанный с шапероном GRP78 и не проявляющий ферментативной активности [88]. При накоплении неправильно свернутых белков и стрессе ЭР комплекс диссоциирует с образованием гомодимера протеинкиназы, после чего происходит трансфосфорилирование обеих субъединиц [87]. Активированная киназа PERK фосфорилирует фактор инициации трансляции eIF2 $\alpha$ , в результате чего eIF2 $\alpha$ , находясь в составе инициаторного комплекса, начинает преимущественно связывать GDP вместо GTP. При фосфорилировании всего 15–25% eIF2 $\alpha$  в клетке происходит практически полное блокирование кеп-зависимой трансляции [86].

Сигнальный путь PERK обеспечивает экспрессию генов различных белков (таких как транспортеры аминокислот, белки клеточного редокс-контроля, шапероны и ряд других), необходимых для ослабления стресса ЭР [89]. Возможность их образования в условиях блока кеп-зависимой трансляции обеспечивает фактор транскрипции ATF4, который в свою очередь экспрессируется при фосфорилировании eIF2 $\alpha$  [90]. Возможность избирательной трансляции мРНК *atf4* может быть связана с наличием в проксимальной области этой мРНК дополнительных открытых рамок считывания (uORF, upstream open reading frame), которые в условиях нормы предотвращают трансляцию основной рамки считывания [91].

Активация протеинкиназы PERK приводит также к активации фактора транскрипции Nrf2, регулирующего защиту клетки от окислительного и токсического стрессов [92]. Кроме того, сигнальный путь PERK/ATF4 приводит также к биосинтезу транскрипционного фактора CHOP, который запускает проапоптотический каскад [93]. Возобновлению трансляции препятствуют ингибиторы дефосфорилирования фактора eIF2 $\alpha$ . что в некоторых случаях препятствует апоптозу, индуцируемому при стрессе ЭР. Так что прекращение трансляции может быть

важным процессом, направленным на выживание клетки в стрессовой ситуации.

### *Сигнальный каскад ATF6*

Сигнальный путь ATF6 играет важнейшую роль в защите клетки от стресса ЭР. При его активации происходит резкое усиление экспрессии генов шаперонов, участвующих в фолдинге, в том числе Grp78/BiP и Grp94 [89]. Кроме того, ATF6 участвует в транскрипции калретикулина [94], CHOP (совместно с киназой PERK) и фактора транскрипции Xbp1 (см. раздел “Сигнальный путь IRE1”) [95, 96]. Помимо проапоптотического фактора CHOP, продукты экспрессии ATF6-зависимых генов участвуют в устранении причин стресса ЭР, поэтому считается, что данный каскад имеет антиапоптотическую функцию и направлен на выживание клетки.

Активация каскада ATF6, как и в случае PERK, происходит при диссоциации белкового комплекса GRP78:ATF6, в нормальных условиях локализуемого в ЭР. Далее свободный ATF6 транспортируется в комплекс Гольджи, где подвергается ограниченному протеолизу при участии сайт-1 и сайт-2-протеиназ (S1P и S2P) [97]. В результате высвобождается N-концевой домен белка (ATF6<sub>n</sub>) массой 50 кДа, который представляет собой транскрипционный фактор с доменом типа “лейциновая молния” [95]. ATF6<sub>n</sub> и фактор транскрипции NF- $\Upsilon$  образуют гетеродимер, способный взаимодействовать с промоторами генов шаперонов и других белков, имеющих в своем составе последовательность ERSE (ER stress response element) [96, 98, 99].

### *Сигнальный путь IRE1*

IRE1 представляет собой трансмембранный белок ЭР, обладающий серин-треонинкиназной и эндорибонуклеазной ферментативными активностями [100]. Как и в случае PERK, активация IRE1 происходит при формировании его гомодимера и транс-фосфорилировании обеих субъединиц [101]. В литературе предложено два альтернативных механизма активации димеризации/фосфорилирования IRE1 при стрессе ЭР. Согласно первой гипотезе, димеризация белка происходит при участии шаперона Grp78 по механизму, аналогичному для протеинкиназы PERK и фактора ATF6 [88]. Другой возможный механизм основан на данных по кристаллической структуре люминального домена белка IRE1. В этом домене выявлена полость, похожая на полость в молекулах главного комплекса гистосовместимости, которая, как предполагают, непосредственно взаимодействует с неправильно свернутыми белками [102].

Основная функция эндонуклеазы IRE1 – процессинг мРНК фактора Xbp1 (X-box binding protein), которая образуется при транскрипции его гена по ATF6-сигнальному пути (см. выше) [95, 96, 103]. Как и другие факторы транскрипции класса bZIP, активный Xbp1 содержит в своей структуре два домена: ДНК-связывающий и активаторный [100]. У нессплайсированной мРНК области, которые кодируют эти два домена белка Xbp1, расположены в отдельных, перекрывающихся ORFs, и, следовательно, трансляция этой мРНК приводит к образованию белка, который не может выполнять функцию фактора транскрипции, но выступает в качестве отрицательного регулятора IRE1/Xbp1-сигнального каскада. Эндонуклеаза IRE1 вырезает из Xbp1-мРНК короткую последовательность длиной 26 н., в результате чего последовательности, кодирующие оба домена белка Xbp1, укладываются в одну и ту же ORF и при трансляции такой сплайсированной мРНК образуется активный фактор транскрипции Xbp1 [104].

После трансляции мРНК Xbp1 поступает в ядро, где связывается с промоторами ряда генов, содержащими последовательность UPRE (Unfolded protein response element) [105]. Эти гены кодируют шапероны ЭР, а также компоненты системы дегликозилирования и экспорта из ЭР неправильно свернутых белков с последующей их деградацией (например, EDEM, Sec61 и др.) [105, 106]. Таким образом, активация экспрессии вышеперечисленных генов “включает” программу деградации белков ЭР, называемую ERAD (ER-associated protein degradation), а также синтез дополнительных шаперонов ЭР, что играет важную роль в защите клетки от стресса ЭР [107, 108].

Фактор транскрипции Xbp1 также активирует экспрессию белка P58<sup>IPK</sup> и таким образом участвует в отрицательной ветви регуляции каскада PERK. Транскрипция гена P58<sup>IPK</sup> активируется через несколько часов после фосфорилирования PERK и eIF $\alpha$  [109]. Таким образом, если в результате UPR происходит существенное ослабление стресса, то запускается процесс трансляции, что возвращает клетку в нормальное состояние. Однако, если стресс ЭР продолжается, то активация белка P58<sup>IPK</sup> приводит к апоптозу.

Суммируя вышесказанное, можно сделать вывод, что активация в клетке ответа на стресс ЭР может носить как про-, так и анти-апоптогический характер – в зависимости от уровня стресса и статуса системы защиты.

### ВЛИЯНИЕ ВИРУСА ГЕПАТИТА С НА СИСТЕМЫ ЗАЩИТЫ КЛЕТКИ ОТ ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И СТРЕССА ЭНДОПЛАЗМАТИЧЕСКОГО РЕТИКУЛУМА

Как отмечено выше, репликация ВГС происходит на поверхности ЭР [4]. Именно на поверхности ЭР находится репликационный комплекс ВГС и другие белки, напрямую не участвующие в репликации вируса (например, белок капсида, гликопротеины оболочки). Подобная локализация белков ВГС нарушает функции ЭР, вызывая окислительный стресс и стресс ЭР (рис. 2, 3). Исследования взаимодействия белков ВГС с системами защиты клетки от этих видов стресса показали, что вирус может блокировать или, наоборот, активировать отдельные компоненты защитных систем инфицированной клетки. Ниже будут рассмотрены механизмы индукции вирусом рассматриваемых здесь видов стресса и влияние компонентов ВГС на соответствующие системы защиты.

В ряде исследований показано, что гликопротеины E1 и E2, находящиеся в люмене ЭР, а также трансмембранный белок NS4B нарушают функции ЭР, вызывая стресс и, соответственно, UPR [15, 27, 33]. Действительно, в инфицированной клетке и в клетках, экспрессирующих эти вирусные белки, наблюдается усиление биосинтеза шаперонов и белков, способствующих правильному фолдингу полипротеинов. И во всех случаях это достигается за счет активации ATF6 – в соответствии с принципами, изложенными выше. В то же время в инфицированной клетке остаются не реализованными две другие стратегии UPR, а именно: блокирование кеп-зависимой трансляции при участии протеинкиназы PERK [15] и активация системы ERAD [33]. Кроме того, в недавно опубликованной работе [110] показано, что стресс ЭР в ВГС-инфицированных клетках сопровождается активацией всех трех ветвей UPR, при которых, однако, не происходит усиления биосинтеза ATF6-, PERK- и Xbp1-регулируемых белков.

Многие вирусы способны влиять на трансляционный аппарат клетки таким образом, что происходит усиление синтеза вирусных белков. Обычно, в ответ на обнаружение двуцепочечной вирусной РНК или чужеродных вирусных белков происходит активация соответствующих протеинкиназ (PKR или PERK), которые фосфорилируют фактор трансляции eIF2 $\alpha$ , тем самым блокируя трансляцию. Однако в клетке, инфицированной ВГС, уровень трансляции не только не подавлен, а, наоборот, повышен [15]. Хотя до сих пор нет достоверных сведений о точном механизме влияния вируса на эту ветвь UPR, определенную роль здесь отводят белкам E2 и NS5A, которые обладают способностью связываться

и ингибировать ферментативную активность PKR [111, 112]. Предполагается, что эти вирусные белки могут взаимодействовать и с протеинкиназой PERK, которая обладает значительной степенью гомологии с PKR. Отчасти эта гипотеза подтверждена в работе [113]. Учитывая тот факт, что данная ветвь UPR участвует в биосинтезе ряда проапоптотических белков (см. выше), можно предположить, что ее инактивация белками вируса способствует выживанию инфицированной клетки.

Белки ВГС способны блокировать и ветвь IRE1-Xbp1 [33, 114], тем самым препятствуя экспрессии генов белков, принимающих участие в фолдинге и деградации [115]. Показано, что в клетке, несущей репликон ВГС, активируются эндонуклеаза Ire1, транскрипция, сплайсинг мРНК и происходит накопление фактора транскрипции Xbp1. Однако аккумуляция Xbp1 не сопровождается активацией экспрессии Xbp1-зависимых генов и ключевую роль в этом играет белок NS4B, экспрессия которого вызывает экспрессию *xbp1*-гена, но препятствует функционированию Xbp1-белка. Точный механизм процесса не известен. Возможно, белок NS4B может изменять локализацию фактора Xbp1, удерживая его вне ядра, предположительно, на внешней мембране ЭР.

С одной стороны считается, что результатом подобного “дефекта” пути IRE1-Xbp1, приводящего к ингибированию направленной деградации белков, будет неправильное сворачивание большей части белков главного комплекса гистосовместимости класса I, что благоприятствует развитию хронической инфекции вследствие пониженной способности представлять вирусные пептиды цитотоксическим Т-лимфоцитам [116]. С другой стороны, транскрипционный фактор Xbp1 необходим для роста гепатоцитов, а постоянная активация его экспрессии может индуцировать трансформацию клеток и развитие опухоли [117]. Кроме того, в опухолях (например, в гепатоцеллюлярной карциноме) человека и крысы выявлена гиперэкспрессия этого фактора [118]. До сих пор остается неясным, зависит ли онкогенность фактора Xbp1 от общего количества его мРНК в клетке или же трансформация клеток имеет место при увеличении количества сплайсированной мРНК. Во многих опухолях обнаружено лишь незначительное количество сплайсированной мРНК гена *xbp1* [119], но не исключено, что и этого количества может быть достаточно для запуска ветви Xbp1 в ответ на стресс ЭР [27]. Таким образом, на основании имеющихся в литературе данных нельзя сделать однозначного вывода о вкладе этой ветви UPR в репродукцию ВГС и связанную с ним раковую трансформацию клеток.

Кроме стресса ЭР белки ВГС вызывают в инфицированной клетке окислительный стресс по не-

скольким независимым механизмам. Во-первых, экспрессия белков капсида и NS5A ВГС приводит к высвобождению ионов  $Ca^{2+}$  из ЭР в цитоплазму, нарушению транспорта электронов в дыхательной цепи митохондрий и высвобождению из них цитохрома С [23, 120–122]. Во-вторых, в клетках, несущих репликон ВГС, происходит индукция NADPH-оксидазы 4 (Nox4) – белка, локализованного преимущественно в ЭР и частично на ядерной мембране и образующего супероксид-анион при переносе электрона с NADPH на кислород [123, 124]. Наконец, в клетке, инфицированной ВГС, окислительный стресс, отчасти, может быть следствием стресса ЭР, так как при UPR индуцируются оксидоредуктазы ЭР, которые, как известно, участвуют в образовании АФК [125].

Считается, что АФК играют важную роль в патогенезе хронического гепатита С, и в настоящее время именно с ними связывают различные заболевания и нарушения, сопровождающие ВГС-инфекцию. Группой Койке (Koike) показано, что экспрессия белка С у трансгенных мышей в отсутствие воспаления приводит к появлению рака печени – и связано это именно с окислительным стрессом [14]. АФК способствуют появлению и развитию фиброза печени [126], устойчивости инфицированных клеток к инсулину [127] и интерферону  $\alpha$  [128], нарушению метаболизма железа [129, 130]. Накопление АФК в инфицированных клетках приводит к активации фактора Nf- $\kappa$ B и экспрессии белка Sox-2 [131], т.е. биохимических процессов, связанных с воспалением, клеточным ростом, дифференциацией, ангиогенезом и канцерогенезом, в частности, с появлением гепатоцеллюлярной карциномы. Помимо активации экспрессии белка Sox-2 транскрипционный фактор Nf- $\kappa$ B может активировать и различные серин/треониновые и тирозиновые протеинкиназы, которые участвуют в сигнальных каскадах (MAPK, JNK, SRC, PI3K), и регулировать транскрипцию генов, вовлеченных в механизмы защиты клетки от апоптоза и воспаления [132]. Кроме того, АФК активируют транскрипционный фактор STAT-3, регулирующий экспрессию генов, необходимых для пролиферации и дифференциации клетки [133]. Многие исследователи связывают развитие различных патологических состояний печени, характерных для ВГС-инфекции, именно с продолжительной активацией транскрипционных факторов Nf- $\kappa$ B и STAT-3, хотя механизмы этой взаимосвязи не установлены [38, 134].

Несмотря на то, что о связи между гепатитом С и окислительным стрессом клетки говорят уже около десяти лет, по-прежнему крайне мало известно о статусе клеточной системы защиты от стресса при ВГС-инфекции. Недавно Бурдетте (Burdette) и

соавт., впервые показали, что инфицирование ВГС гепатоцитов Huh7.5 приводит к активации защитного пути Nrf2/ARE при участии митоген-активируемых протеинкиназ [135]. В исследовании, проводимом в это же время в нашей лаборатории, обнаружено, что активация того же пути, Nrf2/ARE, происходит не только в ответ на окислительный стресс, но и по АФК-независимым механизмам, причем при участии другого набора протеинкиназ: PKC, PI3K, CK2 и, возможно, PERK (Иванов и соавт., неопубликованные данные). В активации защитного механизма принимают участие не только белки ВГС, вызывающие окислительный стресс (С и NS5A), но и те, которые индуцируют стресс ЭР (E1, E2 и NS4B). Несомненно, активация системы защиты способствует нейтрализации АФК в инфицированной клетке и способствует выживанию клетки при острой стадии инфекции.

К сожалению, в литературе отсутствуют данные о состоянии системы защиты клетки от окислительного стресса у пациентов с острым гепатитом С, что не позволяет оценить верность обсуждаемых выше результатов, полученных в экспериментальных системах. В то же время известно, что у больных хронической формой ВГС, как правило, не наблюдается повышения уровня антиоксидантов (например, восстановленного глутатиона), ферментов фазы II защиты [136–138], а также транспортеров – белков, обуславливающих устойчивость ко многим лекарственным препаратам (Multidrug resistance proteins, MRPs) [139]. По-видимому, длительный окислительный стресс приводит к истощению системы защиты и инактивации фактора Nrf2. Однако механизм этого явления не выяснен.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Репликация ВГС на ЭР приводит к нарушению функции этой органеллы, тем самым способствуя развитию окислительного стресса и стресса ЭР. В свою очередь, ВГС активно влияет на соответствующие клеточные системы защиты. Накопленные в литературе данные свидетельствуют о том, что эти процессы тесно связаны с различными клиническими проявлениями ВГС-инфекции. В настоящее время для неинфицированных клеток достаточно детально описаны механизмы развития окислительного стресса и стресса ЭР. Что же касается инфицированных клеток, то для них стали понятны некоторые основные принципы взаимодействия клеточных систем защиты с вирусными компонентами. Тем не менее, важнейшими задачами молекулярной биологии ВГС в ближайшие годы станет детальное выяснение механизмов воздействия вируса на клеточные процессы и взаимосвязи этих явлений с па-

тогенезом заболевания. А их решение позволит не только объяснить возникновение таких тяжелых патологий печени как стеатоз, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома, но и разработать новые подходы к терапии ВГС-инфекции.

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и образования Российской Федерации (Государственный контракт №02.740.11.5134), Российского Фонда Фундаментальных Исследований (проект №10-04-00047а), Программы Президиума РАН (Молекулярная и клеточная биология), гранта Президента РФ (договор №02.120.11.3392-МК), а также частично финансировалась Государственным контрактом с Федеральным агентством по науке и инновациям № 02.522.11.2019 от 10 марта 2009 г.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1999. Global surveillance and control of hepatitis C. Report of a WHO Consultation organized in collaboration with the Viral Hepatitis Prevention Board, Antwerp, Belgium. *J. Viral. Hepat.* **6**, 35–47.
- Martell M., Esteban J.I., Quer J., Genesca J., Weiner A., Esteban R., Guardia J., Gomez J. 1992. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution. *J. Virol.* **66**, 3225–3229.
- Bostan N., Mahmood T. 2010. An overview about hepatitis C: a devastating virus. *Crit. Rev. Microbiol.* **36**, 91–133.
- Lemon S.A., Walker C.M., Alter M.J., Yi M.-K. 2007. Hepatitis C virus. In: *Fields Virology*, vol. 1. Eds Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia, PA.: Lippencott Williams & Wilkins, 1253–1304.
- Rosen H.R., Gretch D.R. 1999. Hepatitis C virus: current understanding and prospects for future therapies. *Mol. Med. Today.* **5**, 393–399.
- Nocente R., Ceccanti M., Bertazzoni G., Cammarota G., Silveri N.G., Gasbarrini G. 2003. HCV infection and extrahepatic manifestations. *Hepatogastroenterology.* **50**, 1149–1154.
- Fried M.W., Shiffman M.L., Reddy K.R., Smith C., Marinos G., Goncalves F.L., Jr., Haussinger D., Diago M., Carosi G., Dhumeaux D., Craxi A., Lin A., Hoffman J., Yu J. 2002. Peginterferon alfa-2a plus ribavirin for chronic hepatitis C virus infection. *N. Engl. J. Med.* **347**, 975–982.
- Manns M.P., Wedemeyer H., Cornberg M. 2006. Treating viral hepatitis C: efficacy, side effects, and complications. *Gut.* **55**, 1350–1359.
- Ronn R., Sandstrom A. 2008. New developments in the discovery of agents to treat hepatitis C. *Curr. Top. Med. Chem.* **8**, 533–562.
- McHutchison J.G., Everson G.T., Gordon S.C., Jacobson I.M., Sulkowski M., Kauffman R., McNair L., Alam J., Muir A.J. 2009. Telaprevir with peginterferon and ribavirin for chronic HCV genotype 1 infection. *N. Engl. J. Med.* **360**, 1827–1838.

11. Tillmann H.L., Manns M.P., Rudolph K.L. 2005. Merging models of hepatitis C virus pathogenesis. *Semin. Liver Dis.* **25**, 84–92.
12. Smirnova I.S., Aksenov N.D., Vonsky M.S., Isagulians M.G. 2006. Different transformation pathways of murine fibroblast NIH 3T3 cells by hepatitis C virus core and NS3 proteins. *Cell Biol. Int.* **30**, 915–919.
13. Park J.S., Yang J.M., Min M.K. 2000. Hepatitis C virus nonstructural protein NS4B transforms NIH3T3 cells in cooperation with the Ha-ras oncogene. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **267**, 581–587.
14. Moriya K., Nakagawa K., Santa T., Shintani Y., Fujie H., Miyoshi H., Tsutsumi T., Miyazawa T., Ishibashi K., Horie T., Imai K., Todoroki T., Kimura S., Koike K. 2001. Oxidative stress in the absence of inflammation in a mouse model for hepatitis C virus-associated hepatocarcinogenesis. *Cancer Res.* **61**, 4365–4370.
15. Tardif K.D., Mori K., Siddiqui A. 2002. Hepatitis C virus subgenomic replicons induce endoplasmic reticulum stress activating an intracellular signaling pathway. *J. Virol.* **76**, 7453–7459.
16. Oh J.W., Sheu G.T., Lai M.M. 2000. Template requirement and initiation site selection by hepatitis C virus polymerase on a minimal viral RNA template. *J. Biol. Chem.* **275**, 17710–17717.
17. Xu Z., Choi J., Yen T.S., Lu W., Strohecker A., Govindarajan S., Chien D., Selby M.J., Ou J. 2001. Synthesis of a novel hepatitis C virus protein by ribosomal frameshift. *EMBO J.* **20**, 3840–3848.
18. Acosta-Rivero N., Rodriguez A., Musacchio A., Falcon V., Suarez V.M., Chavez L., Morales-Grillo J., Duenas-Carrera S. 2004. Nucleic acid binding properties and intermediates of HCV core protein multimerization in *Pichia pastoris*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **323**, 926–931.
19. Tanaka Y., Shimoike T., Ishii K., Suzuki R., Suzuki T., Ushijima H., Matsuura Y., Miyamura T. 2000. Selective binding of hepatitis C virus core protein to synthetic oligonucleotides corresponding to the 5' untranslated region of the viral genome. *Virology.* **270**, 229–236.
20. Kao C.F., Chen S.Y., Chen J.Y., Wu Lee Y.H. 2004. Modulation of p53 transcription regulatory activity and post-translational modification by hepatitis C virus core protein. *Oncogene.* **23**, 2472–2483.
21. Mamiya N., Worman H.J. 1999. Hepatitis C virus core protein binds to a DEAD box RNA helicase. *J. Biol. Chem.* **274**, 15751–15756.
22. Dansako H., Naganuma A., Nakamura T., Ikeda F., Nozaki A., Kato N. 2003. Differential activation of interferon-inducible genes by hepatitis C virus core protein mediated by the interferon stimulated response element. *Virus Res.* **97**, 17–30.
23. Korenaga M., Wang T., Li Y., Showalter L.A., Chan T., Sun J., Weinman S.A. 2005. Hepatitis C virus core protein inhibits mitochondrial electron transport and increases reactive oxygen species (ROS) production. *J. Biol. Chem.* **280**, 37481–37488.
24. Deleersnyder V., Pillez A., Wychowski C., Blight K., Xu J., Hahn Y.S., Rice C.M., Dubuisson J. 1997. Formation of native hepatitis C virus glycoprotein complexes. *J. Virol.* **71**, 697–704.
25. Lavillette D., Pecheur E.I., Donot P., Fresquet J., Molle J., Corbau R., Dreux M., Penin F., Cosset F.L. 2007. Characterization of fusion determinants points to the involvement of three discrete regions of both E1 and E2 glycoproteins in the membrane fusion process of hepatitis C virus. *J. Virol.* **81**, 8752–8765.
26. Ciccaglione A.R., Marcantonio C., Tritarelli E., Equestre M., Magurano F., Costantino A., Nicoletti L., Rapicetta M. 2004. The transmembrane domain of hepatitis C virus E1 glycoprotein induces cell death. *Virus Res.* **104**, 1–9.
27. Chan S.W., Egan P.A. 2005. Hepatitis C virus envelope proteins regulate CHOP via induction of the unfolded protein response. *FASEB J.* **19**, 1510–1512.
28. Griffin S.D., Beales L.P., Clarke D.S., Worsfold O., Evans S.D., Jaeger J., Harris M.P., Rowlands D.J. 2003. The p7 protein of hepatitis C virus forms an ion channel that is blocked by the antiviral drug, Amantadine. *FEBS Lett.* **535**, 34–38.
29. Steinmann E., Penin F., Kallis S., Patel A.H., Bartenschlager R., Pietschmann T. 2007. Hepatitis C virus p7 protein is crucial for assembly and release of infectious virions. *PLoS Pathog.* **3**, e103.
30. Tai C.L., Chi W.K., Chen D.S., Hwang L.H. 1996. The helicase activity associated with hepatitis C virus nonstructural protein 3 (NS3). *J. Virol.* **70**, 8477–8484.
31. Sali D.L., Ingram R., Wendel M., Gupta D., McNemar C., Tsarbopoulos A., Chen J.W., Hong Z., Chase R., Risano C., Zhang R., Yao N., Kwong A.D., Ramanathan L., Le H.V., Weber P.C. 1998. Serine protease of hepatitis C virus expressed in insect cells as the NS3/4A complex. *Biochemistry.* **37**, 3392–3401.
32. Lundin M., Monne M., Widell A., Von Heijne G., Persson M.A. 2003. Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B. *J. Virol.* **77**, 5428–38.
33. Zheng Y., Gao B., Ye L., Kong L., Jing W., Yang X., Wu Z. 2005. Hepatitis C virus non-structural protein NS4B can modulate an unfolded protein response. *J. Microbiol.* **43**, 529–536.
34. Macdonald A., Harris M. 2004. Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *J. Gen. Virol.* **85**, 2485–2502.
35. Tellinghuisen T.L., Marcotrigiano J., Gorbalenya A.E., Rice C.M. 2004. The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein. *J. Biol. Chem.* **279**, 48576–48587.
36. Waris G., Sarker S., Siddiqui A. 2004. Two-step affinity purification of the hepatitis C virus ribonucleoprotein complex. *RNA.* **10**, 321–329.
37. Arima N., Kao C.Y., Licht T., Padmanabhan R., Sasaguri Y., Padmanabhan R. 2001. Modulation of cell growth by the hepatitis C virus nonstructural protein NS5A. *J. Biol. Chem.* **276**, 12675–12684.
38. Gong G., Waris G., Tanveer R., Siddiqui A. 2001. Human hepatitis C virus NS5A protein alters intracellular calcium levels, induces oxidative stress, and activates STAT-3 and NF-kappa B. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 9599–5604.
39. Francois C., Duverlie G., Rebouillat D., Khorsi H., Castelain S., Blum H.E., Gatignol A., Wychowski C.,

- Moradpour D., Meurs E.F. 2000. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated control of protein synthesis. *J. Virol.* **74**, 5587–5596.
40. Lohmann V., Korner F., Herian U., Bartenschlager R. 1997. Biochemical properties of hepatitis C virus NS5B RNA-dependent RNA polymerase and identification of amino acid sequence motifs essential for enzymatic activity. *J. Virol.* **71**, 8416–8428.
41. Uchida M., Hino N., Yamanaka T., Fukushima H., Imanishi T., Uchiyama Y., Kodama T., Doi T. 2002. Hepatitis C virus core protein binds to a C-terminal region of NS5B RNA polymerase. *Hepatol. Res.* **22**, 297–306.
42. Berger K.L., Randall G. 2009. Potential roles for cellular cofactors in hepatitis C virus replication complex formation. *Commun. Integr. Biol.* **2**, 471–473.
43. Piccininni S., Varaklioti A., Nardelli M., Dave B., Raney K.D., McCarthy J.E. 2002. Modulation of the hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase activity by the non-structural (NS) 3 helicase and the NS4B membrane protein. *J. Biol. Chem.* **277**, 45670–45679.
44. Ivanov A.V., Tunitskaya V.L., Ivanova O.N., Mitkevich V.A., Prassolov V.S., Makarov A.A., Kukhanova M.K., Kochetkov S.N. 2009. Hepatitis C virus NS5A protein modulates template selection by the RNA polymerase in *in vitro* system. *FEBS Lett.* **583**, 277–280.
45. Koike K., Moriya K., Matsuura Y. 2010. Animal models for hepatitis C and related liver disease. *Hepatol. Res.* **40**, 69–82.
46. 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. Hepatitis C virus replication in mice with chimeric human livers. *Nat. Med.* **7**, 927–933.
47. Barth H., Robinet E., Liang T.J., Baumert T.F. 2008. Mouse models for the study of HCV infection and virus-host interactions. *J. Hepatol.* **49**, 134–142.
48. Choo Q.L., Kuo G., Weiner A.J., Overby L.R., Bradley D.W., Houghton M. 1989. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science.* **244**, 359–362.
49. Lohmann V., Korner F., Koch J., Herian U., Theilmann L., Bartenschlager R. 1999. Replication of subgenomic hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science.* **285**, 110–113.
50. Blight K.J., McKeating J.A., Marcotrigiano J., Rice C.M. 2003. Efficient replication of hepatitis C virus genotype 1a RNAs in cell culture. *J. Virol.* **77**, 3181–3190.
51. Bartenschlager R., Kaul A., Sparacio S. 2003. Replication of the hepatitis C virus in cell culture. *Antiviral Res.* **60**, 91–102.
52. Lindenbach B.D., Evans M.J., Syder A.J., Wolk B., Tellinghuisen T.L., Liu C.C., Maruyama T., Hynes R.O., Burton D.R., McKeating J.A., Rice C.M. 2005. Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science.* **309**, 623–626.
53. Wakita T., Pietschmann T., Kato T., Date T., Miyamoto M., Zhao Z., Murthy K., Habermann A., Krausslich H.G., Mizokami M., Bartenschlager R., Liang T.J. 2005. Production of infectious hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nat. Med.* **11**, 791–796.
54. Kato T., Furusaka A., Miyamoto M., Date T., Yasui K., Hiramoto J., Nagayama K., Tanaka T., Wakita T. 2001. Sequence analysis of hepatitis C virus isolated from a fulminant hepatitis patient. *J. Med. Virol.* **64**, 334–339.
55. Kato T., Date T., Miyamoto M., Furusaka A., Tokushige K., Mizokami M., Wakita T. 2003. Efficient replication of the genotype 2a hepatitis C virus subgenomic replicon. *Gastroenterology.* **125**, 1808–1817.
56. Salganik R.I. 2001. The benefits and hazards of antioxidants: controlling apoptosis and other protective mechanisms in cancer patients and the human population. *J. Am. Coll. Nutr.* **20**, 464S–472S.
57. Chernyak B.V., Izyumov D.S., Lyamzaev K.G., Pashkovskaya A.A., Pletjushkina O.Y., Antonenko Y.N., Sakharov D.V., Wirtz K.W., Skulachev V.P. 2006. Production of reactive oxygen species in mitochondria of HeLa cells under oxidative stress. *Biochim. Biophys. Acta.* **1757**, 525–534.
58. Papa S., Skulachev V.P. 1997. Reactive oxygen species, mitochondria, apoptosis and aging. *Mol. Cell. Biochem.* **174**, 305–319.
59. Lee J.M., Johnson J.A. 2004. An important role of Nrf2-ARE pathway in the cellular defense mechanism. *J. Biochem. Mol. Biol.* **37**, 139–143.
60. Aleksunes L.M., Manautou J.E. 2007. Emerging role of Nrf2 in protecting against hepatic and gastrointestinal disease. *Toxicol. Pathol.* **35**, 459–473.
61. Nguyen T., Huang H.C., Pickett C.B. 2000. Transcriptional regulation of the antioxidant response element. Activation by Nrf2 and repression by MafK. *J. Biol. Chem.* **275**, 15466–15473.
62. Zhang Y., Lucocq J.M., Yamamoto M., Hayes J.D. 2007. The NHB1 (N-terminal homology box 1) sequence in transcription factor Nrf1 is required to anchor it to the endoplasmic reticulum and also to enable its asparagine-glycosylation. *Biochem. J.* **408**, 161–172.
63. Wang W., Chan J.Y. 2006. Nrf1 is targeted to the endoplasmic reticulum membrane by an N-terminal transmembrane domain. Inhibition of nuclear translocation and transacting function. *J. Biol. Chem.* **281**, 19676–19687.
64. Zhang Y., Lucocq J.M., Hayes J.D. 2009. The Nrf1 CNC/bZIP protein is a nuclear envelope-bound transcription factor that is activated by t-butyl hydroquinone but not by endoplasmic reticulum stressors. *Biochem. J.* **418**, 293–310.
65. Villeneuve N.F., Lau A., Zhang D.D. 2010. Regulation of the Nrf2-Keap1 Antioxidant Response by the Ubiquitin Proteasome System: An Insight into Cullin-Ring Ubiquitin Ligases. *Antioxid. Redox Signal.* doi: 10.1089/ars.2010.3211.
66. Ohtsuji M., Katsuoka F., Kobayashi A., Aburatani H., Hayes J.D., Yamamoto M. 2008. Nrf1 and Nrf2 play distinct roles in activation of antioxidant response element-dependent genes. *J. Biol. Chem.* **283**, 33554–33562.
67. Chan J.Y., Kwong M., Lu R., Chang J., Wang B., Yen T.S., Kan Y.W. 1998. Targeted disruption of the ubiquitous CNC-bZIP transcription factor, Nrf-1,

- results in anemia and embryonic lethality in mice. *EMBO J.* **17**, 1779–1787.
68. Beyer T.A., Xu W., Teupser D., auf dem Keller U., Bugnon P., Hildt E., Thiery J., Kan Y.W., Werner S. 2008. Impaired liver regeneration in Nrf2 knockout mice: role of ROS-mediated insulin/IGF-1 resistance. *EMBO J.* **27**, 212–223.
69. Dhakshinamoorthy S., Jaiswal A.K. 2000. Small maf (MafG and MafK) proteins negatively regulate antioxidant response element-mediated expression and antioxidant induction of the NAD(P)H:Quinone oxidoreductase1 gene. *J. Biol. Chem.* **275**, 40134–40141.
70. Motohashi H., Katsuoka F., Engel J.D., Yamamoto M. 2004. Small Maf proteins serve as transcriptional cofactors for keratinocyte differentiation in the Keap1-Nrf2 regulatory pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 6379–6384.
71. Levenon A.L., Landar A., Ramachandran A., Ceaser E.K., Dickinson D.A., Zanoni G., Morrow J.D., Darley-Usmar V.M. 2004. Cellular mechanisms of redox cell signalling: role of cysteine modification in controlling antioxidant defences in response to electrophilic lipid oxidation products. *Biochem. J.* **378**, 373–382.
72. Jaiswal A.K. 2004. Nrf2 signaling in coordinated activation of antioxidant gene expression. *Free Radic. Biol. Med.* **36**, 1199–1207.
73. Sun Z., Chin Y.E., Zhang D.D. 2009. Acetylation of Nrf2 by p300/CBP augments promoter-specific DNA binding of Nrf2 during the antioxidant response. *Mol. Cell Biol.* **29**, 2658–2672.
74. Меньшикова Е.Б., Ткачев В.О., Зенков Н.К. 2010. Редокс-чувствительная сигнальная система Nrf2/ARE и ее роль при воспалении. *Молекуляр. биология.* **44**, 389–404.
75. Reddy P.S., Corley R.B. 1998. Assembly, sorting, and exit of oligomeric proteins from the endoplasmic reticulum. *BioEssays.* **20**, 546–554.
76. Malhotra J.D., Kaufman R.J. 2007. Endoplasmic reticulum stress and oxidative stress: a vicious cycle or a double-edged sword? *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2277–2293.
77. Boelens J., Lust S., Offner F., Bracke M.E., Vanhooche B.W. 2007. Review. The endoplasmic reticulum: a target for new anticancer drugs. *In Vivo.* **21**, 215–226.
78. Zhang K., Kaufman R.J. 2003. Unfolding the toxicity of cholesterol. *Nat. Cell Biol.* **5**, 769–770.
79. Ma Y., Hendershot L.M. 2001. The unfolding tale of the unfolded protein response. *Cell.* **107**, 827–830.
80. Shiu R.P., Pouyssegur J., Pastan I. 1977. Glucose depletion accounts for the induction of two transformation-sensitive membrane proteins in Rous sarcoma virus-transformed chick embryo fibroblasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 3840–3844.
81. Gething M.J., Sambrook J. 1992. Protein folding in the cell. *Nature.* **355**, 33–45.
82. Schroder M., Kaufman R.J. 2005. ER stress and the unfolded protein response. *Mutat. Res.* **569**, 29–63.
83. Pahl H.L., Sester M., Burgert H.G., Baeuerle P.A. 1996. Activation of transcription factor NF-kappaB by the adenovirus E3/19K protein requires its ER retention. *J. Cell Biol.* **132**, 511–522.
84. Pahl H.L., Baeuerle P.A. 1995. A novel signal transduction pathway from the endoplasmic reticulum to the nucleus is mediated by transcription factor NF-kappa B. *EMBO J.* **14**, 2580–2588.
85. Martinon F., Chen X., Lee A.H., Glimcher L.H. 2010. TLR activation of the transcription factor XBP1 regulates innate immune responses in macrophages. *Nat. Immunol.* **11**, 411–418.
86. Harding H.P., Zhang Y., Ron D. 1999. Protein translation and folding are coupled by an endoplasmic-reticulum-resident kinase. *Nature.* **397**, 271–274.
87. Shi Y., Vattem K.M., Sood R., An J., Liang J., Stramm L., Wek R. C. 1998. Identification and characterization of pancreatic eukaryotic initiation factor 2 alpha-subunit kinase, PEK, involved in translational control. *Mol. Cell Biol.* **18**, 7499–7509.
88. Bertolotti A., Zhang Y., Hendershot L.M., Harding H.P., Ron D. 2000. Dynamic interaction of BiP and ER stress transducers in the unfolded-protein response. *Nat. Cell Biol.* **2**, 326–332.
89. Okada T., Yoshida H., Akazawa R., Negishi M., Mori K. 2002. Distinct roles of activating transcription factor 6 (ATF6) and double-stranded RNA-activated protein kinase-like endoplasmic reticulum kinase (PERK) in transcription during the mammalian unfolded protein response. *Biochem. J.* **366**, 585–594.
90. Harding H.P., Novoa I., Zhang Y., Zeng H., Wek R., Schapira M., Ron D. 2000. Regulated translation initiation controls stress-induced gene expression in mammalian cells. *Mol. Cell.* **6**, 1099–1108.
91. Vattem K.M., Wek R.C. 2004. Reinitiation involving upstream ORFs regulates ATF4 mRNA translation in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **101**, 11269–11274.
92. Cullinan S.B., Diehl J.A. 2004. PERK-dependent activation of Nrf2 contributes to redox homeostasis and cell survival following endoplasmic reticulum stress. *J. Biol. Chem.* **279**, 20108–20117.
93. Ma Y., Brewer J.W., Diehl J.A., Hendershot L.M. 2002. Two distinct stress signaling pathways converge upon the CHOP promoter during the mammalian unfolded protein response. *J. Mol. Biol.* **318**, 1351–1365.
94. Hong M., Luo S., Baumeister P., Huang J.M., Gogia R.K., Li M., Lee A.S. 2004. Underglycosylation of ATF6 as a novel sensing mechanism for activation of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **279**, 11354–11363.
95. Yoshida H., Okada T., Haze K., Yanagi H., Yura T., Negishi M., Mori K. 2000. ATF6 activated by proteolysis binds in the presence of NF-Y (CBF) directly to the cis-acting element responsible for the mammalian unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **20**, 6755–6767.
96. Yoshida H., Matsui T., Yamamoto A., Okada T., Mori K. 2001. XBP1 mRNA is induced by ATF6 and spliced by IRE1 in response to ER stress to produce a highly active transcription factor. *Cell.* **107**, 881–891.
97. Ye J., Rawson R.B., Komuro R., Chen X., Dave U.P., Prywes R., Brown M.S., Goldstein J.L. 2000. ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol. Cell.* **6**, 1355–1364.

98. Yoshida H., Haze K., Yanagi H., Yura T., Mori K. 1998. Identification of the cis-acting endoplasmic reticulum stress response element responsible for transcriptional induction of mammalian glucose-regulated proteins. Involvement of basic leucine zipper transcription factors. *J. Biol. Chem.* **273**, 33741–33749.
99. Kokame K., Kato H., Miyata T. 2001. Identification of ERSE-II, a new cis-acting element responsible for the ATF6-dependent mammalian unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **276**, 9199–9205.
100. Kohno K. 2007. How transmembrane proteins sense endoplasmic reticulum stress. *Antioxid. Redox Signal.* **9**, 2295–2303.
101. Liu C.Y., Schroder M., Kaufman R.J. 2000. Ligand-independent dimerization activates the stress response kinases IRE1 and PERK in the lumen of the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* **275**, 24881–24885.
102. Credle J.J., Finer-Moore J.S., Papa F.R., Stroud R.M., Walter P. 2005. On the mechanism of sensing unfolded protein in the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **102**, 18773–18784.
103. Calfon M., Zeng H., Urano F., Till J.H., Hubbard S.R., Harding H.P., Clark S.G., Ron D. 2002. IRE1 couples endoplasmic reticulum load to secretory capacity by processing the XBP-1 mRNA. *Nature.* **415**, 92–96.
104. Lee K., Tirasophon W., Shen X., Michalak M., Prywes R., Okada T., Yoshida H., Mori K., Kaufman R.J. 2002. IRE1-mediated unconventional mRNA splicing and S2P-mediated ATF6 cleavage merge to regulate XBP1 in signaling the unfolded protein response. *Genes Dev.* **16**, 452–466.
105. Yamamoto K., Yoshida H., Kokame K., Kaufman R.J., Mori K. 2004. Differential contributions of ATF6 and XBP1 to the activation of endoplasmic reticulum stress-responsive cis-acting elements ERSE, UPRE and ERSE-II. *J. Biochem.* **136**, 343–350.
106. Lee A.H., Iwakoshi N.N., Glimcher L.H. 2003. XBP-1 regulates a subset of endoplasmic reticulum resident chaperone genes in the unfolded protein response. *Mol. Cell Biol.* **23**, 7448–7459.
107. Ng D.T., Spear E.D., Walter P. 2000. The unfolded protein response regulates multiple aspects of secretory and membrane protein biogenesis and endoplasmic reticulum quality control. *J. Cell Biol.* **150**, 77–88.
108. Yoshida H., Matsui T., Hosokawa N., Kaufman R.J., Nagata K., Mori K. 2003. A time-dependent phase shift in the mammalian unfolded protein response. *Dev. Cell.* **4**, 265–271.
109. Yan W., Frank C.L., Korth M.J., Sopher B.L., Novoa I., Ron D., Katze M.G. 2002. Control of PERK eIF2alpha kinase activity by the endoplasmic reticulum stress-induced molecular chaperone P58IPK. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **99**, 15920–15925.
110. Asselah T., Bieche I., Mansouri A., Laurendeau I., Cazals-Hatem D., Feldmann G., Bedossa P., Paradis V., Martinot-Peignoux M., Lebecq D., Guichard C., Ogier-Denis E., Vidaud M., Tellier Z., Soumelis V., Marcellin P., Moreau R. 2010. In vivo hepatic endoplasmic reticulum stress in patients with chronic hepatitis C. *J. Pathol.* **221**, 264–274.
111. 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. Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology.* **230**, 217–227.
112. Taylor D.R., Shi S.T., Romano P.R., Barber G.N., Lai M.M. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science.* **285**, 107–110.
113. Pavio N., Romano P.R., Graczyk T.M., Feinstone S.M., Taylor D.R. 2003. Protein synthesis and endoplasmic reticulum stress can be modulated by the hepatitis C virus envelope protein E2 through the eukaryotic initiation factor 2alpha kinase PERK. *J. Virol.* **77**, 3578–3585.
114. Tardif K.D., Mori K., Kaufman R.J., Siddiqui A. 2004. Hepatitis C virus suppresses the IRE1-XBP1 pathway of the unfolded protein response. *J. Biol. Chem.* **279**, 17158–17164.
115. Kaufman R.J. 1999. Stress signaling from the lumen of the endoplasmic reticulum: coordination of gene transcriptional and translational controls. *Genes Dev.* **13**, 1211–1233.
116. Tardif K.D., Siddiqui A. 2003. Cell surface expression of major histocompatibility complex class I molecules is reduced in hepatitis C virus subgenomic replicon-expressing cells. *J. Virol.* **77**, 11644–11650.
117. Reimold A.M., Etkin A., Clauss I., Perkins A., Friend D.S., Zhang J., Horton H.F., Scott A., Orkin S.H., Byrne M.C., Grusby M.J., Glimcher L.H. 2000. An essential role in liver development for transcription factor XBP-1. *Genes Dev.* **14**, 152–157.
118. Kishimoto T., Kokura K., Ohkawa N., Makino Y., Yoshida M., Hirohashi S., Niwa S., Muramatsu M., Tamura T. 1998. Enhanced expression of a new class of liver-enriched b-Zip transcription factors, hepatocarcinogenesis-related transcription factor, in hepatocellular carcinomas of rats and humans. *Cell Growth Differ.* **9**, 337–344.
119. Shuda M., Kondoh N., Imazeki N., Tanaka K., Okada T., Mori K., Hada A., Arai M., Wakatsuki T., Matsubara O., Yamamoto N., Yamamoto M. 2003. Activation of the ATF6, XBP1 and grp78 genes in human hepatocellular carcinoma: a possible involvement of the ER stress pathway in hepatocarcinogenesis. *J. Hepatol.* **38**, 605–614.
120. Dionisio N., Garcia-Mediavilla M.V., Sanchez-Campos S., Majano P.L., Benedicto I., Rosado J.A., Salido G.M., Gonzalez-Gallego J. 2009. Hepatitis C virus NS5A and core proteins induce oxidative stress-mediated calcium signalling alterations in hepatocytes. *J. Hepatol.* **50**, 872–882.
121. Korenaga M., Okuda M., Otani K., Wang T., Li Y., Weinman S.A. 2005. Mitochondrial dysfunction in hepatitis C. *J. Clin. Gastroenterol.* **39**, S162–S166.
122. Okuda M., Li K., Beard M.R., Showalter L.A., Scholle F., Lemon S.M., Weinman S.A. 2002. Mitochondrial injury, oxidative stress, and antioxidant gene expression are induced by hepatitis C virus core protein. *Gastroenterology.* **122**, 366–375.

123. de Mochel N.S., Seronello S., Wang S.H., Ito C., Zheng J.X., Liang T.J., Lambeth J.D., Choi J. 2010. Hepatocyte NAD(P)H oxidases as an endogenous source of reactive oxygen species during hepatitis C virus infection. *Hepatology*. **52**, 47–59.
124. Boudreau H.E., Emerson S.U., Korzeniowska A., Jendrysik M.A., Leto T.L. 2009. Hepatitis C virus (HCV) proteins induce NADPH oxidase 4 expression in a transforming growth factor beta-dependent manner: a new contributor to HCV-induced oxidative stress. *J. Virol.* **83**, 12934–12946.
125. Santos C.X., Tanaka L.Y., Wosniak J.J., Laurindo F.R. 2009. Mechanisms and Implications of Reactive Oxygen Species Generation During the Unfolded Protein Response: Roles of Endoplasmic Reticulum Oxidoreductases, Mitochondrial Electron Transport and NADPH Oxidase. *Antioxid. Redox Signal.* **11**, 2409–2427.
126. Mahmood S., Kawanaka M., Kamei A., Izumi A., Nakata K., Niiyama G., Ikeda H., Hanano S., Suehiro M., Togawa K., Yamada G. 2004. Immunohistochemical evaluation of oxidative stress markers in chronic hepatitis C. *Antioxid. Redox Signal.* **6**, 19–24.
127. Mitsuyoshi H., Itoh Y., Sumida Y., Minami M., Yasui K., Nakashima T., Okanoue T. 2008. Evidence of oxidative stress as a cofactor in the development of insulin resistance in patients with chronic hepatitis C. *Hepatol. Res.* **38**, 348–353.
128. Di Bona D., Cippitelli M., Fionda C., Camma C., Licata A., Santoni A., Craxi A. 2006. Oxidative stress inhibits IFN-alpha-induced antiviral gene expression by blocking the JAK-STAT pathway. *J. Hepatol.* **45**, 271–279.
129. Nishina S., Hino K., Korenaga M., Vecchi C., Pietrangelo A., Mizukami Y., Furutani T., Sakai A., Okuda M., Hidaka I., Okita K., Sakaida I. 2008. Hepatitis C virus-induced reactive oxygen species raise hepatic iron level in mice by reducing hepcidin transcription. *Gastroenterology*. **134**, 226–238.
130. Fujita N., Horiike S., Sugimoto R., Tanaka H., Iwasa M., Kobayashi Y., Hasegawa K., Ma N., Kawanishi S., Adachi Y., Kaito M. 2007. Hepatic oxidative DNA damage correlates with iron overload in chronic hepatitis C patients. *Free Radic. Biol. Med.* **42**, 353–362.
131. Waris G., Siddiqui A. 2005. Hepatitis C virus stimulates the expression of cyclooxygenase-2 via oxidative stress: role of prostaglandin E2 in RNA replication. *J. Virol.* **79**, 9725–9734.
132. Okamoto T., Sanda T., Asamitsu K. 2007. NF-kappa B signaling and carcinogenesis. *Curr. Pharm. Des.* **13**, 447–462.
133. Bowman T., Garcia R., Turkson J., Jove R. 2000. STATs in oncogenesis. *Oncogene*. **19**, 2474–2488.
134. Waris G., Livolsi A., Imbert V., Peyron J.F., Siddiqui A. 2003. Hepatitis C virus NS5A and subgenomic replicon activate NF-kappaB via tyrosine phosphorylation of IkkappaBalpha and its degradation by calpain protease. *J. Biol. Chem.* **278**, 40778–40787.
135. Burdette D., Olivarez M., Waris G. 2010. Activation of transcription factor Nrf2 by hepatitis C virus induces the cell-survival pathway. *J. Gen. Virol.* **91**, 681–690.
136. Levent G., Ali A., Ahmet A., Polat E.C., Aytac C., Ayse E., Ahmet S. 2006. Oxidative stress and antioxidant defense in patients with chronic hepatitis C patients before and after pegylated interferon alfa-2b plus ribavirin therapy. *J. Transl. Med.* **4**, 25. doi: 10.1186/1479-5876-4-25.
137. Swietek K., Juszczak J. 1997. Reduced glutathione concentration in erythrocytes of patients with acute and chronic viral hepatitis. *J. Viral Hepat.* **4**, 139–141.
138. Barbaro G., Di Lorenzo G., Soldini M., Parrotto S., Bellomo G., Belloni G., Grisorio B., Barbarini G. 1996. Hepatic glutathione deficiency in chronic hepatitis C: quantitative evaluation in patients who are HIV positive and HIV negative and correlations with plasmatic and lymphocytic concentrations and with the activity of the liver disease. *Am. J. Gastroenterol.* **91**, 2569–2573.
139. Hinoshita E., Taguchi K., Inokuchi A., Uchiumi T., Kinukawa N., Shimada M., Tsuneyoshi M., Sugimachi K., Kuwano M. 2001. Decreased expression of an ATP-binding cassette transporter, MRP2, in human livers with hepatitis C virus infection. *J. Hepatol.* **35**, 765–773.