

FUNCIÓN DE LA PROTEASA NS3 DEL VIRUS DE LA HEPATITIS C*

Alejandro Daniel Bermúdez Aguirre

RESUMEN

El virus de Hepatitis C (VHC) es el principal agente causante de la Hepatitis tipo no-A no-B a nivel mundial. Actualmente existen 170 millones de personas portadoras del virus en riesgo de desarrollar cirrosis y cáncer hepático. La proteasa NS3 del VHC es esencial para la replicación viral y es por tanto uno de los principales objetivos para el desarrollo de terapias específicas contra la infección ya que además, es codificada por uno de los genes con menor variabilidad dentro del genoma del VHC.

PALABRAS CLAVE: VHC, Hepatitis, proteasas de serina, NS3.

ABSTRACT

Hepatitis C virus (HCV), is the major causative agent of non-A non-B hepatitis worldwide. There are 170 million chronic carriers at risk of developing liver cirrhosis and cancer. NS3 protease is essential for virus replication and is one of the most promising targets for specific anti-HCV therapy because the NS3 gene is considered one of the less variable genes in the HCV genome.

KEY WORDS: HCV, Hepatitis, Serin-protease, NS3.

INFECCIÓN POR EL VIRUS DE HEPATITIS C

El virus de hepatitis C (VHC) fue caracterizado molecularmente en 1989 por Choo y cols. cuando se logró clonar y secuenciar parte del genoma viral, lo cual permitió el desarrollo de pruebas específicas que identificaron a este virus como el agente causante de lo que hasta entonces era denominado como Hepatitis no A no B (Hepatitis NANB) (1).

La infección por VHC es la quinta causa de muerte por afecciones hepáticas en México y se calcula que existen 170 millones de personas infectadas en todo el mundo; este virus ocasiona aproximadamente 10,000 muertes al año, ya que en el 60 % de los pacientes la infección se vuelve crónica y en el 20% de estos casos degenera en cirrosis y finalmente en hepatocarcinoma (Fig. 1) (2, 3). Los procesos virales que causan estas le-

siones no han sido completamente establecidos, sin embargo parece ser que el virus por sí solo no es citopático ya que el daño hepático se debe principalmente a factores relacionados como la respuesta inmune inespecífica, el consumo de alcohol, obesidad, diabetes e infecciones virales asociadas (VHB, VIH) (2); asimismo, entre el 40 y el 74% de los casos se presenta una o varias manifestaciones extrahepáticas (MEH) como los tipos II y III de crioglobulinemia mixta (CM), MEHs de tipo endócrino: hipotiroidismo y diabetes mellitus, reumatológicas; artritis (que se presenta durante el proceso inmune asociado con la crioglobulinemia) y otros padecimientos como osteoesclerosis, cardiomiopatía hipertrófica, linfoma no Hodgkin y fibrosis pulmonar. Estas MEHs son importantes ya que pueden significar la primera señal de infección en pacientes de alto

riesgo que no presentan síntomas hepáticos, pues los tejidos relacionados con MEHs actúan como reservorios de partículas virales en algunos casos (4).

Las diferencias en los casos de infección no solo se deben a las variantes que existen del VHC de las cuales se hablará más adelante, sino también al polimorfismo del genoma humano que interviene en la respuesta inmune y puede explicar los casos en los que el virus es eliminado espontáneamente en la fase aguda de la infección, así como los reportes de inmunidad natural al VHC. Uno de los procesos principales de la respuesta inmune es la presentación del antígeno por parte de células especializadas, las cuales "presentan" en su superficie un fragmento de la partícula viral asociado con el antígeno leucocitario humano (ALH) para ser reconocido por receptores específicos de células T

*Recibido: 7 de enero de 2008 Aceptado: 19 de agosto de 2008

Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina, U.N.A.M., México D.F., México. Correo E: danielbermudezmx@yahoo.com.mx

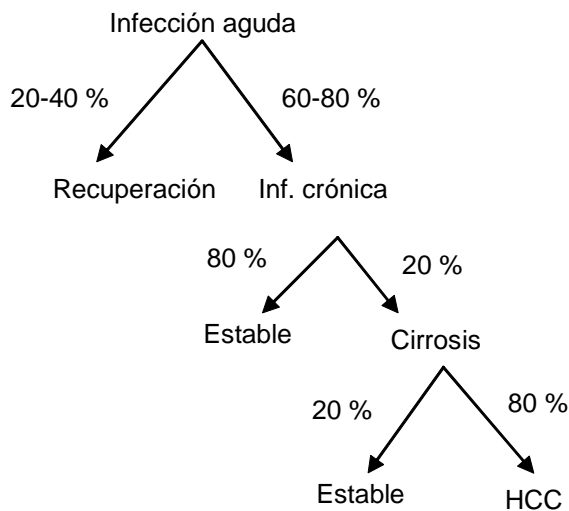


Figura 1. Proporción de los padecimientos desencadenados por la infección del VHC. (HCC, Hepatocarcinoma).

(CD4+ o CD8+); los ALH son glicoproteínas codificadas por al menos 1000 alelos diferentes del genoma humano, lo que permite diferencias en su secuencia de tan solo un aminoácido que condiciona su capacidad de unión al antígeno y provoca diferencias en la respuesta inmune, al afectar el proceso de presentación de antígeno (3, 5). Aunque existen escasas investigaciones sobre la relación del polimorfismo del ALH y la respuesta inmune durante la infección por el VHC, los estudios realizados en pacientes con hepatitis C coinciden en la relación específica que existe entre el alelo DQB1*0301 y la recuperación del individuo así como la presencia del alelo DQB1*0302 en individuos con progresión lenta de la infección y el predominio de ALH-Cw*04 o DQB1*0502 en pacientes con persistencia o progresión rápida de la infección respectivamente. Esta relación del polimorfismo humano con las características de la infección también ha sido hallada en infecciones causadas por otros virus, como la dependencia de la secuencia genética para el receptor CCR5 en células CD4+ y la entrada del virus de inmunodeficiencia humana (VIH) (3).

BIOLOGÍA MOLECULAR DEL VHC

El VHC está clasificado en la familia Flaviviridae por ser un virus envuelto, de aproximadamente 50 nm de diámetro, con una sola cadena de ARN en sentido positivo (5'-3') y en el género Hepacivirus que se creó para distinguir las características poco comunes de este virus, como lo es la enzima multifuncional NS3 (6). El ARN viral codifica una poliproteína de 3010 aminoácidos (C(F)-E1-E2-p7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) que genera al menos diez proteínas maduras al ser procesada por la señal peptidasa del retículo endoplásmico, la cual libera las proteínas C, E1, E2 y p7 que forman la cápside o núcleo viral (C), la envoltura de la partícula (E1 y E2) y p7 que se sugiere interviene en la liberación del genoma al formar canales iónicos en la envoltura viral (2); la región de las proteínas no estructurales (NS2-NS5B) que participan en la replicación son procesadas por 2 enzimas virales: NS2 y NS3 que generan un corte autocatalítico en las regiones NS2-NS3 y NS3-NS4A respectivamente y permiten la formación del complejo

proteasa de serina NS3/4A que procesa el resto de la poliproteína viral, provocando la maduración de las proteínas NS4B, NS5A y NS5B con función de polimerasa de ARN dependiente de ARN (NS5B) y de fosfoproteína (NS5A), mientras que la función de la proteína NS4B sigue siendo investigada, así como la existencia de un segundo marco de lectura (ORF +1) que provoca la síntesis de la proteína F y una variante de la proteína C (Fig. 2) (6, 7).

VARIANTES DEL VHC

Ya que este virus se transmite por contacto directo con sangre infectada, los grupos de alto riesgo de infección por VHC se deben a la falta de infraestructura adecuada (utilización de productos sanguíneos contaminados), riesgos relacionados (personal de salud como paramédicos), desinformación (contacto sexual entre jóvenes o con personas asintomáticas, uso de narcóticos intravenosos) y personas que fueron trasfundidas antes de haber sido estandarizada la determinación de hepatitis NANB en los bancos de sangre (personas hemofílicas), principalmente (5).

El análisis del genotipo viral aislado de pacientes infectados ha revelado que este virus posee un alta variabilidad genética ($\sim 1.4 \times 10^3 - 1.9 \times 10^3$ sustituciones/nucleótido/año) la cual se debe principalmente a la sustitución nucleotídica que ocurre durante el proceso replicativo y por la falta de actividad de exonucleasa de la polimerasa viral, que impide la corrección de errores en la secuencia replicada. Sin embargo, esta variabilidad no es uniforme, ya que existen regiones altamente conservadas como la secuencia que codifica para la proteína de la cápside viral (C), la región para la proteasa de serina NS3 y los extremos 5' y 3' no traducibles de la cadena de ARN, mientras que otras regiones como las que codifican las

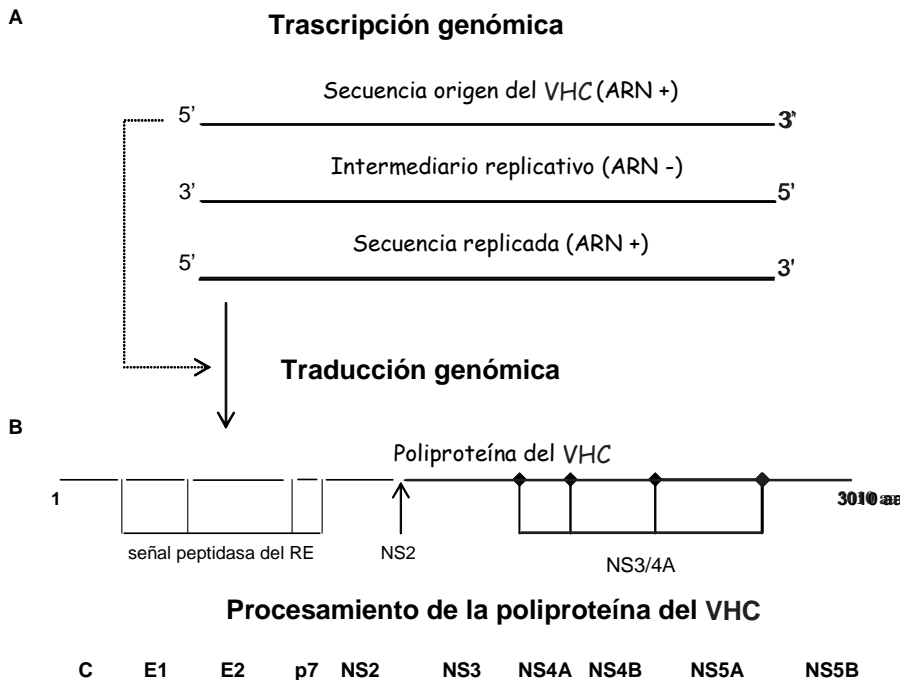


Figura 2. Proceso de transcripción - traducción del VHC. A. Tipos de ARN formados durante el proceso de replicación viral. B. Producción de las proteínas del VHC a partir del procesamiento de la poliproteína por enzimas de origen celular y viral. (VHC, virus de Hepatitis C; RE, retículo endoplásmico; aa, aminoácidos).

proteínas NS4B, NS5A y las regiones hipervariables 1 y 2 (RHV 1 y RHV 2) en la proteína de envoltura E2 difieren hasta en más de 50% (8). Estas diferencias en el genotipo del VHC dan origen a las variantes virales que se clasifican en grupos principales o Tipos (Tabla 1), cuando la secuencia nucleotídica difiere entre 31% - 34% y en Subtipos (a,b,c...) cuando la diferencia es de 20% - 30% (2, 6), así mismo existen bases de datos como DDJB (<http://www.ddbj.nig.ac.jp>) y euHCVDB (<http://hepatitis.ibcp.fr>) donde se recopilan las secuencias y han facilitado encontrar variantes del VHC características a determinada región del mundo (Tabla 1), también se ha determinado que el Tipo 1 de Hepatitis C Subtipo b (variante VHC 1b) es el que se presenta con más frecuencia en los pacientes que no responden al tratamiento antiviral (70% de los casos en Occidente). Otra característica del genotipo viral predictiva de la respuesta al

tratamiento es la secuencia de la región determinante de sensibilidad al Interferón (ISDR, por sus siglas en inglés) que comúnmente presenta cambios o mutaciones en los pacientes que responden favorablemente al tratamiento antiviral (8, 9).

La infección por VHC se trata principalmente administrando interferón- α (INF- α) pegilado, el cual limita la replicación viral a través de la desaminasa de adenosina de ARN de doble cadena (ADAR1) y causa la fosforilación del factor de inicio de la transcripción (eIF2) que impide la asociación eIF2-GTP-met-tARN, procesos que suprimen la transcripción y traducción de ARN; sin embargo, este tratamiento aún complementado con el análogo nucleotídico Ribavirina (INF- α 2b [1.5ug/Kg/semana] + Ribavirina [1 g/día]) no ha logrado una respuesta antiviral sostenida en casi la mitad de los pacientes infectados con VHC 1b (2, 5, 10). Esto se debe principalmente al tratamiento inespecífico con el que actualmente se cuenta, ya que el INF- α , aunque induce la transcripción de más de 200 genes, solo unos cuantos participan en la respuesta antiviral y la Ribavirina, al ser un análogo nucleotídico, también es inespecífica contra la infección; por lo que se están desarrollando diversos métodos de estudio del VHC enfocados a procesos fundamentales del ciclo replicativo así como a la caracterización de proteínas virales particulares que permitan desarrollar com-

TABLA 1

Variante viral	Genotipo	Región	
VHC	Tipo	Subtipo	
1b	1	b	América
1a	1	a	América
1	1	variable	Europa
2	2	variable	Europa
3	3	variable	Europa
2	2	c hasta m	África
4b	4	b	África
4c	4	c	África
4e	4	e	África
4m	4	m	África
2i	2	i	Asia
6p	6	p	Asia

Variantes del virus de Hepatitis C que predominan en las regiones indicadas.

puestos que interfirieran específicamente con el proceso infeccioso del VHC.

MODELOS DE ESTUDIO DEL VHC

El estudio del VHC ha sido lento, ya que la replicación de este virus es particularmente restrictiva a un tipo celular diferente de hepatocitos humanos, lo que ha impedido el desarrollo de un modelo animal o celular que genere una tasa replicativa experimentalmente útil. Se han realizado estudios inmunológicos en el modelo de chimpancé; sin embargo, recientemente se ha cuestionado su validez ya que parece ser que las características de la respuesta inmune que presenta son diferentes de la humana (2).

Por otra parte, se ha desarrollado el modelo de replicón subgenómico, que son moléculas de ARN de secuencias consenso del VHC 1b que codifican las proteínas NS3, NS4A, NS4B, NS5A y NS5B que permiten la autoreplicación de la molécula de ARN viral (1). Este modelo fue propuesto para realizar estudios del ciclo replicativo viral ya que se obtiene un alta tasa replicativa, aunque esta se debe principalmente a las mutaciones de tipo adaptativo del replicón a la línea celular (Huh-7) utilizada. Otro método también basado en la línea (Huh-7) de células hepáticas humanas fue desarrollado por Wakita y cols. (5) con la diferencia fundamental de que las secuencias utilizadas para el replicón subgenómico fueron obtenidas de un paciente con hepatitis C fulminante y se sugiere que este origen de la secuencia es la razón por la que se obtienen partículas virales que conservan su capacidad infecciosa en la línea celular; este avance permitió determinar que la capacidad infecciosa de las partículas virales puede ser neutralizada en cultivo celular por anticuerpos específicos

CD81 y muestra la importancia de este grupo de diferenciación en el proceso de entrada viral a la célula. Recientemente se ha desarrollado un replicón genómico, que codifica tanto las proteínas estructurales como las no estructurales del VHC (1).

Además de las aportaciones de estos experimentos, recientemente se reportó que la apolipoproteína B (apo B) y la transferasa de triacilgliceroles microsomales (MTP), que se ubican característicamente en las vesículas membranales de células hepáticas participando en la síntesis de lipoproteínas de muy baja densidad (VLDL, por sus siglas en inglés), también intervienen en la producción de partículas virales, ya que al inhibir la síntesis de apo B y MTP la producción de partículas virales disminuye y se propone como una de las causas del alta especificidad replicativa de este virus a células hepáticas (11). Este hallazgo coincide con los experimentos de ultracentrifugación de muestras sanguíneas de pacientes con VHC, en donde las partículas virales que conservan su

capacidad infecciosa se detectan en el gradiente ~ 1.06 g/ml, donde están asociadas mayoritariamente las VLDL (2, 12).

Así mismo, existen modelos de estudio sobre proteínas específicas de VHC que realizan procesos clave en el ciclo replicativo y pueden servir como puntos de control de la infección al inhibir o modificar su actividad (Fig. 3). Las proteínas virales más estudiadas molecularmente son NS3 y NS5B, ya que NS5B actúa como polimerasa viral y NS3 provoca la maduración de las proteínas que intervienen en el proceso replicativo incluyendo NS5B; así también el alto grado de conservación de la secuencia para la proteasa de serina NS3 hace que el desarrollo de compuestos inhibidores de esta actividad sea un importante campo de investigación antiviral (5, 6).

LA PROTEASA DE SERINA NS3 DEL VHC

La proteína NS3 del VHC es una enzima multifuncional ya que presenta, en el primer tercio (N-

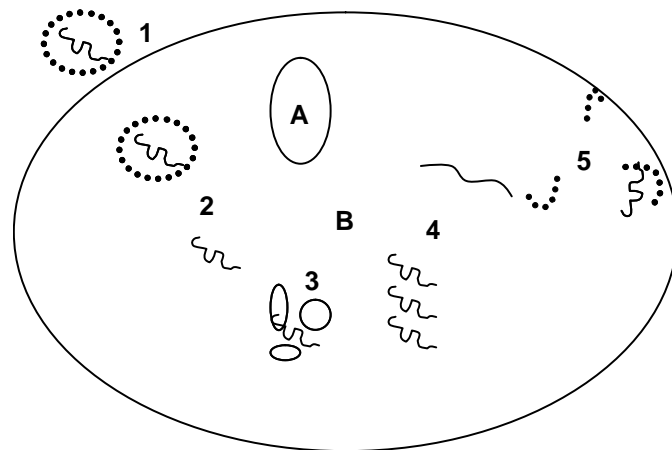


Figura 3. Representación esquemática de los principales procesos del ciclo replicativo viral que pueden servir como punto de control de la infección. (A, núcleo celular; B, citoplasma celular).

1. Unión de la partícula viral a la membrana celular. (proteína E2)
2. Liberación del material genético del HCV (proteína p7)
3. Replicación del ARN viral (polimerasa viral NS5B, fosfoproteína NS5A)
4. Procesamiento de la poliproteína viral (complejo serin-proteasa NS3/4A)
5. Localización / Ensamble de nuevas partículas virales (E1, E2)

terminal) de su estructura, actividad de proteasa de serina y en el resto, función de ARN helicasa DexH/D que revierte el enrollamiento de cadenas dobles de ARN formadas durante la replicación viral (Fig. 2 A) (6, 7).

El extremo N-terminal de NS3 presenta un plegamiento típico de la familia de las quimioproteasas, compuesto por dos dominios tipo beta-barril con actividad de proteasa de serina que es optimizada por la asociación de la proteína NS4A.

NS4A es una proteína anfipática de 54 aminoácidos, tipo beta-plegada, que se asocia no covalentemente con las cadenas A0 y A1 de NS3 y provoca una reorganización en su estructura al reorientar el aminoácido D 81 de la triada catalítica (H 57, D 81, S 139), optimizando así la actividad de proteasa de NS3; además NS4A promueve la localización del complejo NS3/4A a la membrana del retículo endoplásmico donde es procesada la poliproteína viral (6, 7). Aunque la región de proteasa de NS3 posee características similares a otras enzimas con plegamientos tipo quimioproteasas, los análisis de cristalización de NS3 han revelado que posee diferencias importantes con respecto a este tipo de enzimas y son la causa de que los inhibidores comunes de quimioproteasas no tengan efecto sobre la actividad de NS3. De hecho, una de las diferencias principales de esta proteína son las estructuras tipo asa que en las quimioproteasas se intercalan entre las hojas beta-plegadas que forman la estructura principal de la enzima y en NS3 estas asas no existen o son más cortas de lo normal, lo que impide el efecto de los inhibidores (6).

Aunque se han desarrollado una gran variedad de métodos para estudiar la actividad de proteasa de NS3 y compuestos inhibidores, por razones de espacio solo se hará referencia de algunos que han trascendido en el área

y al mismo tiempo representan una muestra de la variedad de estrategias y tipos de compuestos utilizados en el estudio de NS3.

La actividad de proteasa de NS3 se caracterizó en células *E. coli* transformadas simultáneamente con plásmidos de expresión para la proteasa y para proteínas con regiones de corte de la poliproteína viral que actúan como sustrato de la reacción. Este sistema permite determinar la eficiencia de NS3 en el procesamiento de la -proteína sustrato- la cual se expresa fusionada entre dos proteínas específicas (MBP - proteína sustrato - DHFR) que permiten su recuperación y análisis del extremo N-terminal; esta metodología también permite manipular la secuencia de la proteína sustrato y expresar diferentes regiones de corte de la poliproteína viral, analizar los requerimientos de la enzima NS3 para reconocerlo y/o procesarlo y determinar la eficiencia del proceso catalítico en presencia de compuestos antivirales (13).

Por otra parte, existen sistemas basados en células eucariotas en los que se utiliza el virus vaccinia con modificaciones genéticas que permiten expresar la proteína de estudio en el citoplasma de células de mamífero, fundamentos que se utilizan en el sistema de replicón-ELISA en el que además se expresa en una sola proteína tanto la región de proteasa de NS3 como varios sitios de corte de la poliproteína viral (NS3-NS4A-NS4B-NS5), lo cual representa un entorno más similar a lo que sucede *in vivo* durante el procesamiento de la poliproteína del VHC. Inicialmente, este sistema fue construido para analizar el efecto de compuestos previamente reportados como inhibidores de la actividad de proteasa de NS3 ya que permite estudiar la capacidad del compuesto para penetrar en la célula así como su actividad en el medio intracelular; sin

embargo, debido a su gran utilidad ha sido modificado y actualmente permite la determinación cuantitativa de los resultados en el formato ELISA y utiliza el sistema de replicón subgenómico de VHC en lugar de virus vaccinia, por lo que este sistema es uno de los más relevantes en la determinación de compuestos inhibidores de NS3 (14).

También se han desarrollado sistemas basados en estructuras secundarias de ARN que reconocen específicamente la proteasa NS3 (aptámeros de ARN), como el sistema de expresión del aptámero G9 en células HeLa en el que las células son transformadas con plásmidos de expresión para el complejo proteasa de serina NS3/4A, para una región de la poliproteína viral (sustrato) y para un conjugado aptámero-ribozima HDV (inhibidor) en el que la secuencia del aptámero se inserta en el brazo IV no funcional de la ribozima HDV, lo cual permite obtener estructuras de ARN estable de las que se seleccionan aquellas que interfieren específicamente la actividad enzimática de NS3 (15).

Actualmente existen algunos compuestos con propiedades inhibidoras de NS3 en diferentes fases de prueba, tanto *in vitro* como *in vivo* (BILN 2061, VX-950, SCH 503034, SCH 6) (8), que podrían funcionar como antivirales específicos. Sin embargo, en el desarrollo de nuevos tratamientos debe tomarse en cuenta la alta tasa de variabilidad genética que caracteriza a este virus y que recientemente se ha remarcado por las diferencias halladas en el dominio de proteasa de NS3 que hasta hace poco se consideraba invariable (16); este hecho es importante ya que la presencia de partículas virales genéticamente distintas pueden escapar al efecto del inhibidor y generar resistencia al tratamiento. La resistencia al tratamiento por variabilidad genética se ha observado en virus como el de

inmunodeficiencia humana y es de preverse en virus con mayor tasa de variabilidad como el VHC.

CONCLUSIÓN

A casi dos décadas de haber sido caracterizado el VHC, la variedad y complejidad de investigaciones realizadas sobre este virus han permitido conocer parte de su biología molecular, la persistencia que

establece y la amplia gama de procesos celulares que interfiere, limita o mimetiza en el individuo, pero no ha sido posible establecer un modelo experimental que permita desarrollar un tratamiento específico y menos tóxico que reemplace las costosas y prolongadas alternativas actuales. Las investigaciones realizadas sobre la proteasa de serina NS3 del VHC han permitido acumular información

importante sobre esta proteína a la que inicialmente se le atribuía la función única de procesar la poliproteína viral y que actualmente se sabe que también presenta actividad autoproteolítica (17), conocimientos que manifiestan la complejidad de esta proteína pero al mismo tiempo representan nuevas alternativas en el desarrollo de estrategias antivirales contra la infección por VHC.

REFERENCIAS

- Lohmann V, Körner F, Koch JO, Herian U, Thellmann L, Bartenschlager R (1999) Replication of subgenomic Hepatitis C virus RNAs in a hepatoma cell line. *Science* 285:110-113.
- Pawlotsky JM (2004) Pathophysiology of Hepatitis C virus infection and related liver disease. *Trends Microbiol* 12:96-101.
- Ramos de andrade junior D, Ramos de andrade D (2004) The influence on the human genome on chronic viral Hepatitis outcome. *Rev Inst Med tro S Paulo* 46:119-126.
- Galossi A, Guarisco R, Bellis L, Puoti C (2007) Extrahepatic manifestations of chronic HCV infection. *J Gastrointestin Liver Dis* 16:65-73.
- Houghton M, Abrignani S (2005) Prospects for a vaccine against the hepatitis C virus. *Nature* 436:961-965.
- Kim JL, Morgenstern KA, Lin C, Fox T, Dwyer MD, Landro JA, Chambers SP, Markland W, Lepre CA, O'Malley ET, Harbeson SL, Rice CM, Murcko MA, Caron PR, Thomson JA (1996) Crystal structure of the Hepatitis C virus NS3 protease domain complexed with a synthetic NS4A cofactor peptide. *Cell* 87:343-355.
- Dubuisson J (2007) Hepatitis C virus proteins. *World J Gastroenterol* 13:2406-2415.
- Guillou-Guillemette HL, Vallet S, Gaudy-Graffin C, Payan C, Pivert A, Goudeau A, Lunel-Fabiani F (2007) Genetic diversity of the Hepatitis C virus: Impact and issues in the antiviral therapy. *World J Gastroenterol* 13:2416-2426.
- Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, Okamoto K, Hashimoto M, Miyano Y, Koike H, Kobayashi M, Koida I, Arase Y, Saitoh S, Suzuki Y, Murashima N, Ikeda K, Kumada H (1997) Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C virus infection. *Hepatology* 25:745-749.
- Taylor DR, Puig M, Darnell MER, Mihalik K, Feinstone SM (2005) New antiviral pathway mediates Hepatitis C virus replicon interferon sensitivity through ADAR1. *J Virol* 79:6291-6298.
- Huang H, Sun F, Owen DM, Li W, Chen Y, Gale Jr. M, Ye J (2007) Hepatitis C virus production by human hepatocytes dependent on assembly and secretion of very low-density lipoproteins. *Proc Nat Acad Sci* 14:5848-5853.
- Wakita T, Pietschmann T, Kato T, Date T, Miyamoto M, Zhao Z, Murthy K, Habermann A, Kräusslich H, Mizokami M, Bartenschlager R, Liang TJ (2005) Production of infectious Hepatitis C virus in tissue culture from a cloned viral genome. *Nature med* 11:791-795.
- Komoda Y, Hijikata M, Sato S, Asabe S, Kimura K, Shimoto K (1994) Substrate requirements of Hepatitis C virus serine proteinase for intermolecular polypeptide cleavage in *Escherichia coli* *J Virol* 68:7351-7357.
- Chung V, Carroll AR, Gray NM, Parry NR, Thommes PA, Viner KC, D'Souza EA (2005) Development of cell-based assays for in vitro characterization of Hepatitis C virus NS3/4A protease inhibitors. *Antimicrob Ag and Chem* 49:1381-1390.
- Nishikawa F, Kakiuchi N, Funaji K, Fukuda K, Sekiya S, Nishikawa S (2003) Inhibition of HCV NS3 protease by RNA aptamers in cells. *Nucleic Acids Research* 31:1935-1943.
- Vallet S, Gouriou S, Noursbaum JB, Legrand-Quillien MC, Goudeau A, Picard B (2005) Genetic heterogeneity of the NS3 protease gene in Hepatitis C virus genotype 1 from untreated infected patients. *J Med Virol* 75:528-537.
- Kou YH, Chang MF, Wang YM, Hung ZM, Chang SC (2007) Differential requirements of NS4A for internal NS3 cleavage and polyprotein processing of Hepatitis C virus *J Virol* 81: 7999-8008.