

**GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**KRONİK HEPATİT C HASTALARINDAN İZOLE
EDİLEN HCV NS5A GENİNİN İNTERFERONA
DUYARLILIĞI BELİRLEYEN BÖLGESİ VE
PROTEİN KİNAZ BAĞLAMA BÖLGESİ
MUTASYON ANALİZİ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**MELTEM KORUK
ARALIK 2010**

**Kronik Hepatit C Hastalarından İzole edilen HCV NS5A
Geninin İnterferona Duyarlılığı Belirleyen Bölgesi ve
Protein Kinaz Bağlama Bölgesi Mutasyon Analizi**

**Gaziantep Üniversitesi
Biyoloji Bölümü
Yüksek Lisans Tezi**

**Danışman
Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN**

**Meltem KORUK
Aralık 2010**


T.C. GAZİANTEP ÜNİVERSİTESİ
FEN BİLİMLER ENSTİTÜSÜ
BİYOLOJİ ANA BİLİM DALI

Tezin Adı: Kronik Hepatit C Hastalarından İzole edilen HCV NS5A Geninin İnterferona Duyarlılığı Belirleyen Bölgesi ve Protein Kinaz Bağlama Bölgesi Mutasyon Analizi

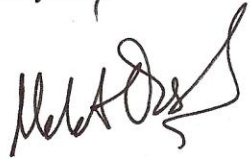
Öğrencinin, Adı Soyadı: Meltem KORUK

Tez Savunma Tarihi: 24.12.2010


Fen Bilimleri Enstitüsü onayı


Prof. Dr. Ramazan KOÇ
FBE Müdürü

Bu tezin Yüksek Lisans tezi olarak gerekli şartları sağladığını onaylarım.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Enstitü ABD Başkanı

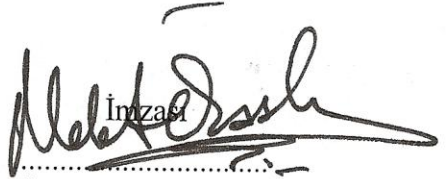




Bu tez tarafımca (tarafımızca) okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.


Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Tez Danışmanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsam ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans tezi olarak oy birliği/oy çokluğu ile kabul edilmiştir.

Jüri Üyeleri:

Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN
Prof. Dr. Hakan ABACIOĞLU
Prof. Dr. Mehmet KORUK
Doç. Dr. Filiz ÖZBAŞ GERÇEKER
Yard. Doç. Dr. İbrahim Halil KILIÇ


İmzası





ÖZET

KRONİK HEPATİT C HASTALARINDAN İZOLE EDİLEN HCV NS5A GENİNİN İNTERFERONA DUYARLILIĞI BELİRLEYEN BÖLGESİ VE PROTEİN KİNAZ BAĞLAMA BÖLGESİ MUTASYON ANALİZİ

KORUK Meltem

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Aralık 2010, 60 sayfa

Hepatit C virüsü enfeksiyonları, yaklaşık %80'inin kronikleşmesi ve buna bağlı olarak siroz ve hepatosellüler karsinom gibi önemli komplikasyonların gelişimi nedeniyle, tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunudur. HCV izolatlarının büyük çoğunluğu antiviral tedaviye dirençlidir. Direncin moleküler mekanizmaları gerek *in vivo* gerekse *in vitro* olarak birçok çalışmada araştırılmış ve oldukça önemli bulgular elde edilmiş olmasına rağmen sorun henüz çözülebilmemiş değildir. Bu çalışmanın amacı, Gaziantep'te HCV pozitif hastaların ISDR ve PKR-BD bölgesindeki mutasyonların saptanarak tedaviye yanıt ile ilişkisi araştırmaktır. Çalışmaya HCV RNA pozitif 34'ü kadın 25'i erkek olmak üzere toplam 59 hasta dahil edilmiştir. Kalıcı virolojik yanıt alınan hastalardan izole edilen HCV'nin NS5A geninin PKRBD bölgesinde, 25'i (%27,83) ISDR bölgesinde olan 97 aminoasit değişimi ve tedaviye yanıt vermeyen hastalarda PKR-BD bölgesinde 12'si (%15,38) ISDR bölgesinde olan 78 aminoasit değişimi saptanmıştır. Çalışmamızda, NS5A geninin interferona duyarlılığı belirleyen bölgesi (ISDR) ve Protein kinaz bağlama bölgesinde (PKR-BD) saptanan mutasyon sayıları ile interferon-alfa+ribavirin kombinasyon tedavisine verilen yanıt arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanmamıştır (sırasıyla; P=0,369, P=0,937).

Anahtar Kelimeler: HCV, ISDR, PKR-BD, mutasyon

ABSTRACT

MUTATION ANALYSIS OF INTERFERON SENSITIVITY DETERMINING REGION AND PROTEIN KINASE BINDING DOMAIN OF HCV NS5A GENE ISOLATED FROM CHRONIC HEPATITIS C PATIENTS

KORUK Meltem

M.Sc. In Department of Biology

Supervisor: Prof.Dr. Mehmet ÖZASLAN

December 2010,60 pages

Hepatitis C virus is major public health problem in our country like as in all over the world because of the being chronic infections of approximately 80% the hepatitis C virus infections and related complications such as cirrhosis and hepatocellular carcinoma. The majority of HCV isolates are resistant to antiviral therapy. Although the molecular mechanisms of resistance against to antiviral therapy were investigated in such studies in vivo and/or in vitro and the significant results were obtained, the resistance problem has not been solved yet. The aim of this study was to investigate the relationship between therapy and response by detecting the mutations in ISDR and PKR-BD site among HCV positive patients in Gaziantep. The total of 59 HCV RNA positive patients: 34 female and 25 male were included. In ISDR site in PKR-BD site, 25 of 97 aminoacid substitutions (27,83%) of the sustained virological responder patients; 12 of 78 aminoacid substitutions (15,38%) in the non-responder patients were determined. As a result of this study, the significant relation between the number of mutation in interferon sensitivity determining region-ISDR and protein kinase binding domain-PKR-BD of NS5A gene and the response to interferon-alpha + ribavirin combination therapy was not determined (respectively; $P=0,369$, $P=0,937$).

Keywords: HCV, ISDR, PKR-BD, mutation

TEŞEKKÜR

Öncelikle üniversite eğitimim boyunca ve tez çalışması süresince bilgilerinden yararlandığım, bana yol gösteren ve maddi manevi desteğini esirgemeyen danışmanım Sayın Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN'a,

Tez konumuzun belirlenmesinde katkılarından dolayı ve çalışmamızda yüksek bilgilerinden yararlandığımız Sayın Prof.Dr. Hakan ABACIOĞLU'na,

Gerek materyal toplamamızda desteğinden dolayı gerekse tez çalışmamız sırasında bilgi, görüş ve katkılarından dolayı Sayın Prof.Dr. Mehmet KORUK'a,

Tez başlama aşaması ve süresince bilgilerini paylaşan ve desteğini esirgemeyen Sayın Yrd.Doç.Dr.İbrahim Halil KILIÇ'a,

Tez çalışmamda katkı ve önerilerinden dolayı Dr. Işık Didem KARAGÖZ'e

Tez çalışmamın laboratuvar aşamasında tüm bilgi, görüş ve deneyimlerini benimle paylaşan Uzm.Bio. Özlem ESİN'e

Hayatım boyunca sevgilerini ve desteklerini esirgemeyen AİLEME teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	SAYFA
ÖZET.....	I
ABSTRACT.....	II
TEŞEKKÜR.....	III
İÇİNDEKİLER.....	IV
ŞEKİLLER LİSTESİ.....	VI
TABLOLAR LİSTESİ.....	VII
SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ.....	VIII
BÖLÜM 1: GİRİŞ.....	1
BÖLÜM 2: KAYNAK ÖZETLERİ.....	3
BÖLÜM 3: GENEL BİLGİLER.....	7
3.1. Hepatit C virüsü Sınıflandırılması.....	7
3.2. Hepatit C Virüsünün Moleküler ve Virolojik Özellikleri.....	9
3.3. HCV Replikasyonu.....	14
3.4. HCV Enfeksiyonunda Tanı.....	17
3.4.1. Serolojik Testler.....	18
3.4.2.HCV RNA (Viral Yük) Testleri.....	19
3.4.3.HCV Genotiplendirme.....	21
3.5. HCV İnfeksiyonunda Tedavi.....	22
3.5.1. İnterferonun etki mekanizması.....	23
3.6. HCV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi.....	25
BÖLÜM 4: MATERYAL ve YÖNTEM.....	28
4.1.Örnekleme.....	28
4.2. RNA Saflaştırma Aşaması.....	29
4.3. Saf RNA'dan cDNA elde edilmesi.....	31

4.4. İstenilen Bölgenin Çoğaltılması.....	31
4.5. Agaroz Jelde Görüntüleme.....	33
4.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	34
4.7. Dizi Analizi Reaksiyonu.....	35
4.8. Dizi Analizi Reaksiyon Ürünlerinin Sodyum Asetat İle Saflaştırılması.....	35
4.9. DNA dizi analizi.....	36
BÖLÜM 5: BULGULAR.....	37
BÖLÜM 6: SONUÇ ve TARTIŞMA.....	45
KAYNAKLAR.....	48

ŞEKİLLER LİSTESİ

SAYFA

Şekil 2.1. Hepatit C virüsü NS5A geninin PKR-BD ve ISDR bölgelerinin lokasyonu.....	6
Şekil 3.2.1. HCV genom organizasyonu, poliprotein işlenmesi ve protein topolojisi.....	9
Şekil 3.3.1. HCV replikasyonu.....	14
Şekil 3.5.1. IFN-alfa sinyal iletim yolu (Jak/STAT).....	24
Şekil 3.5.2. PKR aktivasyonu ve translasyon kontrolü mekanizması.....	25
Şekil 3.6.1. Ülkelere göre tahmini HCV prevalansı.....	26
Şekil 4.5. Marker, 1, 4, 5, 60, 58, 32, 25 ve 14 nolu hastalara ait PCR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı.....	34
Şekil 5.1.1. Filogenetik Ağaç.....	39
Şekil 5.1.2. 59 Hastaya ait HCV NS5A geninde bulunan ISDR (2209-2248) ve PKRBD (2209-2274) aminoasit dizilim ve referans dizilim NS5A-CR (GENBANK).....	40
Şekil 5.1.3. PKR-BD (2209-2274) bölgesi dizi analizi (Hasta no: 12).....	41
Şekil 5.1.4. L2270V mutasyonu (Hasta no: 1).....	42
Şekil 5.1.5. T2216A mutasyonu (Hasta no: 67).....	42
Şekil 5.1.6. A2223L, A2224A ve L2225P mutasyonları (Hasta no: 49).....	43
Şekil 5.1.7. V2251I ve L2253M mutasyonları (Hasta no: 49).....	43
Şekil 5.1.8. V2268M ve L2270V mutasyonları (Hasta no: 11).....	44

TABLULAR LİSTESİ

SAYFA

Tablo 3.1.1. Hepatit C virus veritabanı (www.hcvdb.org) ‘a göre HCV Genotipleri ve alttipleri.....	7
Tablo 3.1.2. Genotip, Alttip ve Alt grup arasında nükleotid benzerliği.....	8
Tablo 3.2.1. HCV genomunun kodladığı proteinler ve işlevleri.....	10
Tablo 3.4.2. Ticari olarak kullanılan bazı HCV RNA tanı testleri.....	21
Tablo 4.2.1. HCV RNA Ekstraksiyon kit içeriği.....	29
Tablo 5.1. ISDR bölgesindeki Mutasyon sayısı ile Tedaviye yanıt Karşılaştırması.....	38
Tablo 5.2. PKRBD bölgesindeki Mutasyon sayısı ile Tedaviye yanıt Karşılaştırması.....	38

SİMGELER VE KISALTMALAR LİSTESİ

a.a.: Aminoasit

ARFP: Alternatif okuma penceresi proteini

DEPC: Dietil dikarbonat

dsRNA: çift zincirli RNA

E2: Zarf Glikoproteini²

EVR: Erken virolojik yanıt

HCV: Hepatit C virüsü

HCVcc: Hücre kültüründe çoğalan Hepatit C virüsü

HVR: Yüksek değişkenlik gösteren bölge

IFN: İnterferon

IFNAR: İnterferon Alfa/Beta Reseptör

IFNGR: İnterferon Gama Reseptör

IRF-9: İnterferon regülâtör faktör 9

ISDR: İnterferona Hassaslığı Belirleyen Bölge

ISG: İnterferonu stimüle eden genler

IU: International Unit

Jak1: Janus kinaz 1

KVY: Kalıcı virolojik yanıt

NANBH: Non-A non-B Hepatit

NR: Yanıtsız

NS: Yapısal olmayan

NS5A: Yapısal olmayan 5A geni

OAS: Oligoadenilat Sentetaz

ORF: Açık okunur çerçeve

PCR: Polimeraz zincir reaksiyonu

PKR: Protein kinaz

PKR-BD: Protein Kinaz bağlama Domaini

rRNA: ribozomal RNA

RT-PCR: Reverse transkriptaz PCR

SREBP- 1c: Sterol Regülatör Element Bağlayıcı Protein 1c

STAT: Sinyal İletici ve Aktive edici Transkripsiyon Proteinleri

SVR: Kalıcı virolojik yanıt

TBE: Tris/Borate/EDTA

TMA: Transkripsiyon-aracılıklı Amplifikasyon

Tyk2: Tirozin kinaz 2

UTR: Kodlanmayan Bölge

WHO: Dünya Sağlık Örgütü

BÖLÜM 1

GİRİŞ

Hepatit C virüs infeksiyonları yaklaşık %80'inin kronikleşmesi ve buna bağlı olarak siroz ve hepatosellüler karsinom gibi önemli komplikasyonların gelişimi nedeniyle, HCV tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya'da HCV infeksiyonunun sıklığı ülkelere göre çok değişmekle birlikte ortalama %3 civarındadır. HCV ile enfekte kişilerin yaklaşık sayısı, Dünya'da 210 milyon, Türkiye'de ise yaklaşık 700 bin kişidir. Akut viral hepatit infeksiyonlarının %20'sinde, kronik viral hepatitlerin ise % 70 'inde etken HCV'dir. Akut hepatit C infeksiyonlarının %70-90 oranında kronikleşmesi ve çoğunlukla asemptomatik seyir göstermesi en önemli problemdir (Koff, 2002). Kronik hepatit C gelişen olgularda tedavi için interferon ve ribavirin kombinasyonu kullanılmaktadır. Bu olgularda tedaviye yanıt ve hastalığın ilerlemesi ile HCV genotipleri arasında doğrudan bir ilişki olduğunu belirten birçok çalışma mevcuttur (Thomas ve Lemon, 2000; Lee ve Abdo, 2003). Virüs 40-50 nm büyüklüğünde, lipid zarflı (organik çözücülere duyarlı zarf yapısı), tek iplikçikli, pozitif yönelimli bir RNA virüsüdür. Pek çok RNA virüsü gibi HCV'nin de genom düzeyinde değişkenliği fazladır. Bu RNA bağımlı RNA polimerazların "proofreading" (düzeltme) aktivitelerinin olmamasından kaynaklanır. HCV genomu, yapısal ve yapısal olmayan proteinleri kodlar. Yapısal proteinler; kor proteini (C), zarf proteini-1 (E1) ve zarf proteini-2 (E2)'den oluşur. Yapısal olmayan proteinler (nonstructural: NS); NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B virüsün replikasyonunda rol alırlar (Brass, 2006). Hepatit C virüsü, Flaviviridae ailesi içinde insan flavivirüsleri ve hayvan pesti-virüslerinden ayrı olarak Hepacivirüs cinsi adı altında yeni bir grupta yer almaktadır (Lindenbach ve Rice, 2001)

Nükleik asit dizi analizine göre HCV'nin en az 6 major genotipi ve 100'den fazla alttipi olduğu belirtilmektedir. Farklı genotipler arasında yaklaşık %35 varyasyon mevcuttur (Davis, 1999). Bunlardan 1a,1b,2a,2b,3a yaygın olarak görülürken diğerleri ise sadece bazı bölgelerde görülmektedir (Thomas, 2000). Türkiye'de

yapılan farklı çalışmalarda en sık olarak genotip 1b saptanmıştır (Abacıoğlu, 1995; Yıldız, 2002).

HCV izolatlarının büyük çoğunluğu antiviral tedaviye dirençlidir. Direncin moleküler mekanizmaları gerek *in vivo* gerekse *in vitro* olarak birçok çalışmada araştırılmış ve oldukça önemli bulgular elde edilmiş olmasına rağmen sorun henüz çözülebilmüş değildir (Pawlotsky, 2000). Genotip 1b tedaviye en fazla direnç gösteren ve tedaviye yanıt açısından en kötü olan grubu temsil etmektedir. HCV NS5A bölgesinde yer alan ISDR' nin mutasyonları ile ilgili olarak farklı sonuçlar içeren çalışmalar bulunmaktadır. Örneğin Japonya'da yapılan çalışmalar bu bölgedeki mutasyonların tedaviye yanıtla ilişkili olduğunu belirtirken Avrupa'da yapılan çalışmalarda ise ilişkinin olmadığı bildirilmiştir (Enomoto, 1995; Zeuzem, 1996). Ülkemizde ise Ankara Üniversitesi ve Dokuz Eylül Üniversitesinde yapılan çalışmalarda NS5A geninin ISDR bölgesindeki mutasyonların interferon tedavisine yanıt ile ilişkili olmadığını gösteren çalışmalar mevcuttur (Akgün, 2003; Aslan, 2004). NS5A geninin ISDR bölgesindeki mutasyonlarla ilişkili bu çelişkili sonuçlar bu konunun hala tartışmalı olduğunu göstergesidir. Bununla beraber ISDR nin yanı sıra aynı gen bölgesinde bulunan PKR-BD bölgesi ile ilgili dünyada yapılmış olan çalışmalar bu bölge mutasyonlarının tedavi ile ilişkisi olduğu yönündedir (Macquillan, 2004). İnterferon tedavi yalnız başına veya ribavirin ile birleşim şeklinde HCV enfeksiyonunun tedavisi için kullanılmaktadır. HCV genotip ve sub-tiplerinin tedaviye yanıtta farklılıklar gösterdiği birçok çalışma ile gösterilmiştir. Bununla beraber özellikle NS5A'nın ISDR bölgesindeki mutasyonların tedavi yanıt ile ilişkisi konusunda çelişkili çalışmalar bulunmaktadır.

Bölgemizde ve ilimizde, daha önce genotipleme çalışmaları yapılmıştır ancak genotiplerin tedaviye yanıtla ilişkilerine yönelik çalışma mevcut değildir. Bununla beraber ISDR bölgesinin mutasyonlarının tedavi ile ilişkisine yönelik ülkemizde yapılan çalışmalar mevcut olup PKR-BD bölgesinin mutasyonları ile ilgili çalışmaya rastlanmamıştır.

Tüm bu bilgilerin ışığında; çalışmanın amacı; Gaziantep'te Kronik Hepatit C Hastalarından İzole edilen HCV NS5A Geninin İnterferona Duyarlılığı Belirleyen Bölgesi ve Protein Kinaz Bağlama Bölgesindeki mutasyonların saptanarak tedavi yanıt ile ilişkilerinin ortaya konması olarak belirlenmiştir.

BÖLÜM 2

KAYNAK ÖZETLERİ

Virüsün varlığı ilk kez 1989 yılında non-A, non-B hepatitli insan kanları ile enfekte şempanzelerin plazmalarından klonlanarak ortaya konulmuştur (Choo vd, 1989). Hepatit C virüsü olarak adlandırılan bu virüs, pestivirüsler ve flavivirüsler ile ilişkili pozitif zincirli bir RNA virüsü olarak bulunmuştur (Miller, 1990).

HCV genomunun 5'NCR (5'Kodlanmayan Bölge), onu izleyen yaklaşık 3010 aminoasit kodlayan bir poliproteini kodlayan tek açık okunur çerçeve (ORF) ve kısa 3'NCR 'den oluştuğu ortaya konmuştur (Takamizava vd, 1991). Bazı spesifik HCV genotiplerinin kronik hepatitin histolojik önemi ve interferon tedavi ile ilişkili olduğu bulunmuştur. Bu bilgilerle bir hastaya bulaşan HCV genotipinin bilinmesi, HCV enfeksiyonunun teşhisi ve tedavisinde potansiyel olarak yararlı olabileceğini düşündürmüştür (Takada, 1992; Yoshioka,1992; Dusheiko,1994). Hepatit C virüsünün NS5 bölgesinin dizi analizi yapılmasından köken alan genotip sınıflandırılmasına göre HCV 6 major viral tip şeklinde sınıflandırılmıştır (Simmonds, 1993).

İlk kez Enomoto ve arkadaşları (1995) tarafından Hepatit C virüsünün NS5A geninin karboksi terminal bölgesi, 2209-2248 kodonlarını kapsayan İnterferona Duyarlılığı Belirleyen Bölgesinde (İnterferon Sensivity Determining Region-ISDR) mutasyon sayısı ile IFN tedavi arasında güçlü bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Enomoto ve arkadaşları ilk önce aynı bireylerde eşzamanlı olarak bulunan Hepatit C Virüs alt grupları (quasispecies) arasında interferona hassaslığın farklı olduğunu ve interferona dirençli HCV alt gruplarının tedavi sürecinde seçildiğini ispatlamışlardır. İnterferona dirençliliklerinin genetik temelini saptamak için, 3 hastada interferon tedavi öncesi ve sonrası serumlarından tüm genom nükleotit ve aminoasit dizilimleri belirlenildi. Birinci hastada 41 aminoasit farklılığının 36'sı, HCV genomunun 3 farklı bölgesinde yani E2, NS2 ve NS5A bölgelerinde, ikinci hastada yapısal bölgede aminoasit farklılığı özellikle E2 bölgesinde ve yapısal olmayan bölgede 11 aminoasit

farklılığından 5'i NS5A bölgesinde bulunmuştur. Üçüncü hastada, aminoasit farklılığı, daha dağınık olmasına rağmen, yapısal olmayan bölgeler arasında NS5A bölgesinde en sık bulunmuştur. E2 bölgesinin NH₂-terminali, çok değişken bölge olarak bilinmektedir. Son zamanlardaki çalışmalar, E2 (Hipervariable Region-HVR) heterojenitesinin, zayıf IFN yanıtla ilişkili olduğu ve bazı HVR alt gruplarının IFN tedavi sürecinde seçildiği tanımlanmıştır. Ancak, bu bölge o kadar çeşitlidir ki IFN etkisi ile ilişkili spesifik bir dizilim yoktur. Kendi bireylerinde interferon-dayanıklı ve interferona-duyarlı HCV izolatlarının dizilimlerini karşılaştırdılar ve NS5A gen bölgesinin COOH-terminal ucunda bir küme aminoasit farklılığı saptadılar. IFN-tedavi görmüş 15 hastanın dizi analizi sonucu; IFN-duyarlılığı ve NS5A bölgesinde 2218 kodonu etrafındaki (2209-2248 aminoasitleri-ISDR) aminoasit dizilimi arasında açıkça ilişki olduğu ortaya konmuştur. ISDR deki aminoasit değişimi, özellikle, 9 IFN ye yanıt veren hastada tedavi öncesi HCV de bulunmuştur. Ancak, 6 yanıt vermeyen hastada, proto-tip ISDRli (HCV-J) HCV ye sahiptir. İnterferon-dayanıklı 6 hasta ve interferona duyarlı 9 hastada, HCV den gözlemlenen NS5A bölgesinde 40 aminoasit uzunluğunda (2209-2248 kodonları arası) özel missense mutasyonlarının varlığını onayladı. Diğer taraftan, interferona dayanıklı HCV'nin bu bölgesi, prototip HCV genotip-1b ile aynıdır. Böylece, Enomoto ve arkadaşları, prototip ISDR li HCV genotip 1b'nin IFN ye hassas olduğunu sonucunu çıkardılar. Enomoto ve arkadaşları bu bölgeyi, İnterferona Hassaslığı Belirleyen Bölge (Interferon Sensitivity Determining Region-ISDR) olarak adlandırdılar. Böylece, Proto-tip interferona hassaslığı belirleyen bölgeye sahip HCV genotip 1b izolatları, interferona dayanıklı soylar olarak karşımıza çıkıyor. Bu mutasyonların spesifik doğası, interferon tedavi etkisinin tahmin edilmesini mümkün kılmaktadır.

Enomoto ve arkadaşları (1996) ; Kendi sonuçlarını geliştirmek için 6 ay interferon-alfa tedavisi gören 84 kronik Hepatit C li hastada çalışmışlardır. Çalışma sonucuna göre; yabancı tip HCV-J (wild tip) ile aynı NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ dizilime sahip 30 hasta tedaviye yanıt vermezken, ISDR bölgesinde 1-3 değişime sahip (intermediate tip) 38 hastadan 5'i tedaviye yanıt vermiştir. Bu bölgede 4-11 aminoasit değişime sahip (mutant tip) 16 hasta tedaviye tam yanıt vermiştir. Ek olarak, temelde HCV RNA konsantrasyonu ve ISDR deki mutasyon artışı arasında ters korelasyon olduğunu bildirmişlerdir.

Sonraki çalışmalarda, tedaviye yanıt ile ISDR mutasyonlarının ilişkisi, Japonya, Avrupa ve Amerika'da farklı gruplar tarafından araştırılmıştır. Japonya'da yapılan çalışmalar genel olarak tedaviye yanıt ve ISDR mutasyonları arasında güçlü ilişkiyi onaylamaktadır. Avrupa ve Amerika'dan gruplar başlangıçta IFN-alfa duyarlılığında ISDR mutasyonlarının önemini doğrulayamamıştır. Sonraki çalışmalarda ISDR içinde çoklu mutasyon gösteren HCV genotip 1b izolatlarının, Japonyadakilerle karşılaştırıldığında Avrupa ve Amerika'da nadir olarak bulunduğu rapor edilmektedir.

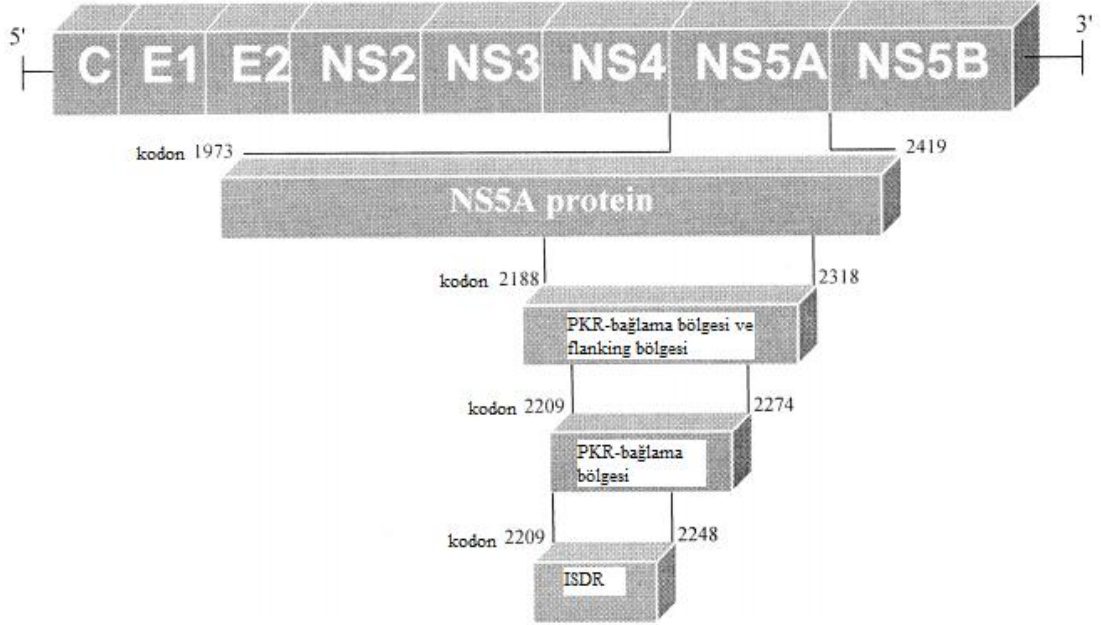
Zeuzem ve arkadaşları (1996) tarafından Avrupalı HCV'li hastalarda NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ ve interferon-alfa yanıt arasındaki ilişkiye dair yapılan çalışmada IFN-alfa ya başlangıç veya kalıcı yanıt HCV-1a veya HCV-1b alt tipli kronik olarak enfekte Avrupalı hastalarda, NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ bölgesinde aminoasit değişimlerinin sayısı ile ilişkili olmadığı ve ek olarak NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ de aminoasit değişimlerinin sayısı ile tedavi öncesi HCV RNA serum seviyesinin ilişkili olmadığı ortaya konmuştur. HCV'nin NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ bölgesinin Avrupa kökenli hastalarda ise genel bir interferona hassaslığı belirleyen bölge göstermediği rapor edilmiştir.

Ayrıca Enomoto ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışmada buldukları sonuçlar ISDR'deki mutasyonlar sıklıkla meydana gelmediğini göstermektedir. Bu da interferon hassaslığının, her bir hastada hastalığın doğal seyri boyunca çok fazla değişmediğini göstermektedir.

Coğrafi farklılıklara dayanan meta-analiz çalışmaya göre; ISDR dizilim tipleri ve kalıcı virolojik yanıt arasında açık pozitif ilişki Japonların yanı sıra Avrupalı hastalarda da gösterilmiştir. Ancak, mutant ISDR tip ile enfekte Japon hastalarda kalıcı virolojik yanıt oranı, Avrupalı hastalarla karşılaştırıldığında daha yüksektir. Kalıcı virolojik yanıt oranı, ISDR içinde mutasyon sayısı arttıkça artmaktadır. Ama bu ilişkinin, Japon hastalarda daha belirgin olduğunu öne sürülmüştür (Pascu vd, 2004)

Türkiye'de yapılan bir çalışmaya göre ise, Hepatit C genotip 1b ile enfekte Türk hastaların interferon tedavisine verdiği cevap NS5A geninin ISDR bölgesindeki mutasyonlarla ilişkili bulunmamıştır (Aslan D., 2004).

Fransa’da Brillet ve arkadaşları (2004) çalışmaları sonucunda HCV genotip 1 NS5A proteininde ISDR bölgesinin olmadığı ve NS5A diziliminin, IFN-alfa’nın viral replikasyonu engelleme yeteneğini etkilemediğini ileri sürmüşlerdir.



Şekil 2.1. Hepatit C virüsü NS5A geninin PKR-BD ve ISDR bölgelerinin lokasyonu (Kato N, 1990)

İspanya’da Rueda ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada; HCV Genotip 1’in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR ve NS5A-V3 bölgelerindeki mutasyonlar ile pegİnterferon+ribavirin tedavi yanıtı arasındaki ilişki araştırılmıştır. HCV NS5A içindeki dizilimler (PKR bağlama domaini (PKRBD), IFN-hassaslığı belirleyen bölge (ISDR) ve Değişken Bölge (V3) pegIFN+Ribavirin ile tedavi edilen 60 HCV genotip 1 ile enfekte hastaların tedavi öncesi serum örneklerinden analiz edilmiştir. Bu hastalardan 36’sında kalıcı virolojik yanıt (SVR) görülürken, 24’ü tedaviye yanıt vermemiştir (NR). Bu bulgulara göre; PKRBD bölgesinde 4 veya daha fazla mutasyon, kalıcı virolojik yanıt ve erken virolojik yanıt ile ilişkilidir, ancak hızlı virolojik yanıt ile ilişkili değildir. ISDR’deki farklılıkların istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur. V3 bölgesi, yüksek genetik çeşitliliğe sahiptir. Ancak, kalıcı virolojik yanıt ile ilişkili değildir. Sonuç olarak; pegIFN ve ribavirin ile tedavi edilen HCV genotip 1 hastalarında, kalıcı virolojik yanıt (SVR) ve erken virolojik yanıt (EVR) in tahmini faktörünün PKRBD (>4 mutasyon)’de genetik çeşitlilik olduğunu ortaya koymuşlardır.

BÖLÜM 3

GENEL BİLGİLER

3.1. Hepatit C virüsü Sınıflandırılması

Hepatit C virusu, Flaviviridae ailesinin *Hepacivirus* genusu içerisinde yer almaktadır.

Hemen hemen tüm genomun DNA veya protein dizilimi karşılaştırılarak yapılan çalışmalara göre 6 genotip ve bu genotipler içerisinde çok sayıda alttipin (80-100 arası) var olduğu ortaya konulmuştur. Genotipler Arap rakamları ile (1,2,3,..), alttipleri ise küçük Latin harfleri ile (a,b,c,..) gösterilmektedir.

Tablo 3.1.1. Hepatit C virus veritabanı (www.hcvdb.org) 'a göre HCV Genotipleri ve alttipleri

GENOTİP	ALTTİP
1	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m
2	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r
3	a, b, c, d, e, f, g, h, i, k, l
4	a, b, c, d, e, f, g, h, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t
5	a
6	a, b, c, d, e, f, g, h, i, j, k, l, m, n, o, p, q, r, s, t, u

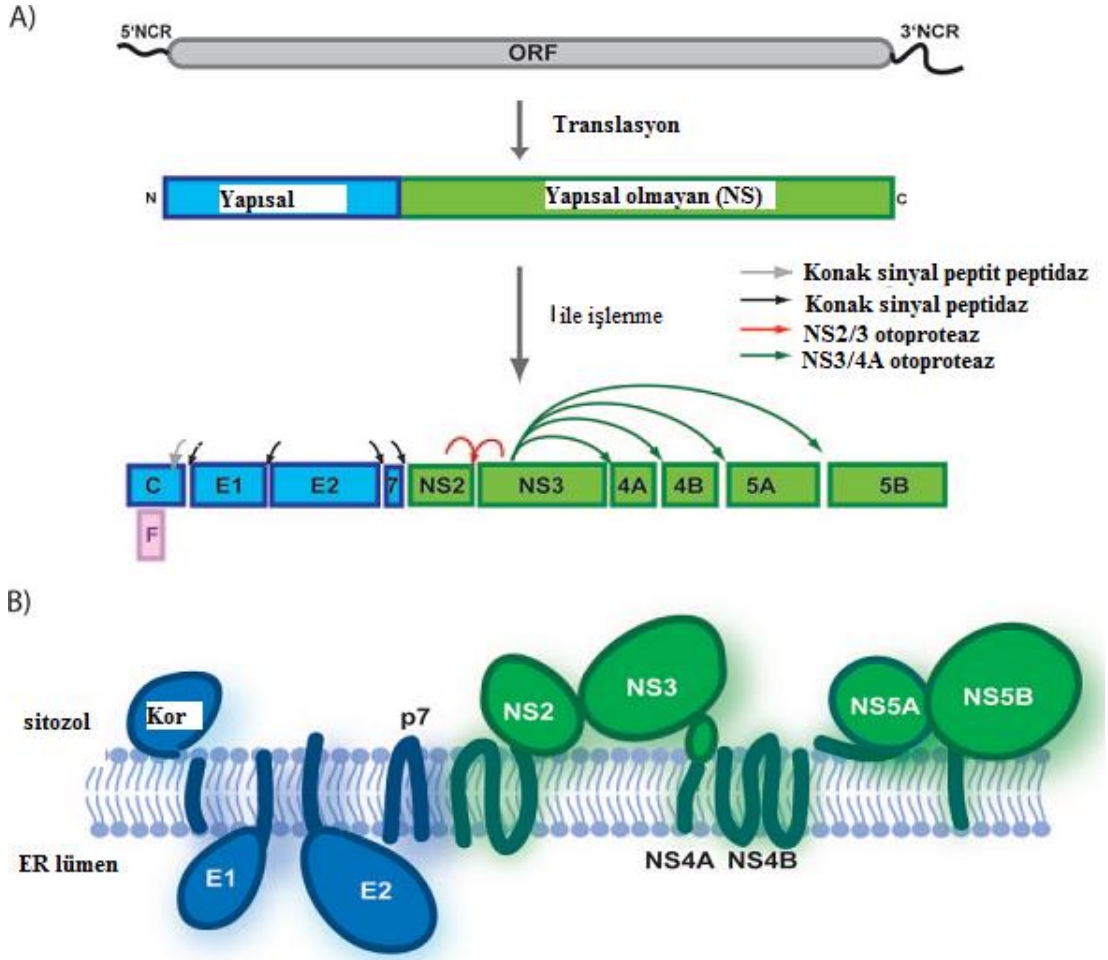
Hepatit C virüsünün yüksek orandaki replikasyonu ve virüsün RNA bağımlı RNA polimerazının hata yapma eğilimi nedeniyle, HCV soyları hastalar arasında geniş genetik çeşitlilik göstermektedir. Genomun kısalığı, mutasyon oranının fazlalığı ve virüs topluluğunun genişliği, enfekte kişideki virüs topluluğunun bir ya da daha fazla nükleotid farklılığından oluşan, birbirinden farklı virüslerin toplamı olmasına yol

açmaktadır. Bunlar ‘quasispecies’ (alt gruplar) olarak adlandırılmaktadır. (Bartenschlager, 2005).

Tablo 3.1.2. Genotip, Altıtip ve Alt grup arasında nükleotid benzerliği (Kanazawa, 1994)

TERİM	NÜKLEOTİD BENZERLİĞİ
GENOTİP	%55-72
ALTTİP	%75-86
QUASİSPECİES (ALT GRUP)	%91-99

3.2. Hepatit C Virüsünün Moleküler ve Virolojik Özellikleri



Şekil 3.2.1. HCV genom organizasyonu, poliprotein işlenmesi ve protein topolojisi (Tellinghuisen, 2007)

Non-A non-B Hepatitin (NANBH) başlıca etmeni olan Hepatit C virüsü (HCV), ilk kez 1989'da moleküler klonlama teknikleri kullanılarak tanımlanmıştır (Choo, 1989).

Hepatit C virüsü; 45-55 nm çapında, zarflı, pozitif yönelimli, tek iplikçikli RNA virüsüdür. Genomu 9,6 kb uzunluğundadır ve yaklaşık 3000 aminoasitlik bir poli proteini kodlayan tek bir açık okunur bölge (Open Reading Frame-ORF) içerir. Bu poli protein, konak ve viral proteazlar tarafından kesilerek üç yapısal (kor, E1, E2) ve 7 yapısal olmayan (p7, NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) proteinlere parçalanır (Anonymous).

Tablo 3.2.1. HCV genomunun kodladığı proteinler ve işlevleri

Protein	Aminoasit Aralığı	İşlevi
Yapısal Proteinler		
Kor	1-191	Nükleokapsid
E1	192-383	Zarf Glikoprotein
E2	384-746	Zarf Glikoprotein
P7	747-809	İyon kanal etkinliği
Yapısal olmayan Proteinler		
NS2	810-1026	NS2/3 otoproteaz
NS3	1027-1657	Serin proteaz, RNA helikaz ve NTPaz aktiviteleri
NS4A	1658-1711	NS3'ün serin proteaz aktivitesi için kofaktör
NS4B	1712-1972	İntraselüler membran vezikülleri
NS5A	1972-2420	ISDR, PKRBD (İnterferon direnci?)
NS5B	2421-3010	RNA bağlı RNA Polimeraz

Poli proteini kodlayan tek bir açık okunur bölge (ORF) nin 5' ve 3' uçlarında yerleşmiş olan kodlamayan bölgeleri (NCR), viral proteinlerin translasyonunda ve virüsün replikasyonunda görev alırlar. IRES (internal ribosomal entry site) olarak adlandırılan ve viral genomun ökaryotik ribozomun 40S alt ünitesine tutunduktan sonra başka bir translasyon başlatıcı sinyale gerek duymaksızın ribozom tarafından okunmasını sağlayan bölge 5'-NCR içinde yer alır. ORF nin bitiminden hemen sonra başlayan 3'-NCR içinde yer alan 99 bazlık çok iyi korunmuş bölge ise NS5B içindeki korunmuş bir kök-halka (stem-loop) yapısı ile etkileşerek RNA replikasyonunda görev alır. Virüsün 5'-NCR bölgesi ile 3'-NCR'nin ilk 99 nükleotitik kısmı en iyi korunmuş bölgelerdir (Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

Yapısal proteinler (kor, E1 ve E2) ve p7 proteini konak endoplazmik retikulumunda (ER) sinyal peptidazlarla kesilerek poli proteinden serbest kalırlar. Yapısal olmayan

proteinler (NS2, NS3, NS4A, NS4B, NS5A ve NS5B) ise viral proteazlar olan NS2-3 ve NS3-4A ile kesilirler (Sharma, 2010).

Çok işlevli özyapı (kor) proteini, 21 kilodalton (kd) ağırlığındadır. Poliprotein'in ilk 191 aminoasitlik bölümünü kodlar. Özyapı bölgesi genomda 5'-NCR'den sonra en iyi korunmuş bölgedir ve kodladığı protein yapısında birçok T ve B hücre epitopu içerir. Özyapı, HCV genomunu kapsayan viral kapsidi oluşturur. Ek olarak, özyapı proteini partikül birleşmesi, viral RNA yı bağlama ve RNA translasyonunun regülasyonunu içeren regülatör işlevleri vardır. Ayrıca, protein ekspresyon analizleri, kor proteinleri, hücre sinyalizasyonu, apoptozis, lipid metabolizması ve tümör oluşumu gibi diğer hücresel reaksiyonlarda da işlev gösterebileceği ileri sürülmüştür. Ancak bu ön buluşlar, ileri analizler gerektirmektedir (Kupfer, 2010 ; Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

Uzun HCV ORF'sinden türeyen 10 proteine ek olarak F (Frameshift) veya ARF (alternative reading frame protein) ya da kor+1 proteini rapor edilmiştir (Walewski, 2001) (Xu, 2001). *In vitro* çalışmalar, ARFP'nin esasen endoplazmik retikulum ile ilişkili olduğu (Xu, 2003), sitoplazmada bu lunan kısa süreli bir protein olduğu gösterilmiştir (Roussel, 2003). *In vivo*'da HCV pozitif kobayların serumunda anti-F protein antikorların bulunması, proteinin enfeksiyon boyunca eksprese edildiğini göstermiştir (Komurian-Pradel 2004). HCV replikasyonunda doğrudan gerekli olmayan ARFP proteinin işlevi henüz açıklığa kavuşmamıştır.

HCV genomunun özyapı kodlayan bölgesinden sonra iki zarf glikoproteini kodlanmaktadır. Bunlar, E1 ve E2'dir. E1 ve E2 proteinleri yoğun olarak glikozillenmişlerdir ve virüs partikülünün lipid kılıfı içine gömülüdürler. Büyük olasılıkla kılıf bölgeye tutunmada gerekmektedir. E1 ve E2 genleri gp35 ve gp70 olmak üzere iki zarf proteinini kodlarlar. HCV genomları arasında en çok genetik varyasyon gösteren bölge ise E2'nin aşırı değişken (hypervariable) bölgesidir. E2 proteinin amino ucunda yüksek oranda aminoasit değişiklikleri görülür. HVR1 adı verilen bu çok değişken bölge E2'nin 1-27. aminoasitleri arasında bulunur. HVR1 farklı genotipler ve alt grupları (quasispecies) arasında değişkenlik gösteren bir bölge olmasına karşın belirgin bir genotip ile ilişkisi yoktur ve bu nedenle de genotip veya alt grup ayırımında kullanılamaz. Çeşitli çalışmalarda HVR1 epitoplarına özgül antikorların, kronik enfeksiyonlar sırasında bağışık sistemin bu bölgeye baskısı ile

değişebildiği gözlenmiştir. HVR1'deki bu değişikliklerin, bağışık sistemden kaçış mutantların oluşumuna yol açtığı düşünülmektedir. E2 proteinlerinin virüsün konak hücreye girişinde reseptör veya reseptörlerle girdiği etkileşim sonucunda hücre yüzeyine tutunmada rol oynadığı düşünülmektedir. Yapılan çalışmalar E2'nin HCV'nin olası hücrel reseptörü olan CD81'e bağlandığını göstermektedir (Öktem ve Abacıoğlu, 2006; Aygen, 2006).

Virüs genomunun yapısal proteinleri kodlayan bölgesinin sonunda p7 proteini gelmektedir. Henüz p7 proteininin tüm yapısal ve işlevsel özellikleri aydınlatılabilmemiş değildir. Buna karşın yeni çalışmalar bu proteinin iyon kanal etkinliğine sahip olduğunu göstermektedir. Bu proteinin virüsün yapısına katılıp katılmadığı henüz net değildir. Ancak, virüsün hücre içinde bir araya gelme (assembly) aşamasında etkin olabileceği düşünülmektedir (Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

HCV Yapısal olmayan protein 2 (NS2), 23kDa ağırlığında hidrofobik transmembran proteindir. NS2, bir membran-ilişkili sistein proteaz'dır (Grakoui, 1993). Günümüze kadar NS2'nin tek bilinen işlevi, NS2/3 birleşiminin otoproteolitik aktivitesiydi. Yapılan bir çalışmada, Huh7 hücrelerinde NS2 ekspresyonunun, sterol regülasyon element bağlayıcı protein 1c (SREBP- 1c) ve yağ asidi sentezinin artışıyla sonuçlandığı öne sürülmüştür. Bu durumun da, steatoz oluşumunda NS2'nin bir rolü olabileceğini göstermektedir. Ayrıca, NS2 viral partiküllerin bir araya gelmesinde rol oynayabileceğine dair kanıtlar bulunmaktadır (Yi, 2009).

HCV Yapısal olmayan protein 3 (NS3), 67kDa ağırlığında üç işleve sahip bir proteindir. Bu işlevler; serin proteaz, RNA helikaz ve NTPaz aktiviteleridir. NS3 enzimi, kimotripsin-benzeri serin proteaz aktivitesine sahiptir. Kendi kofaktörü NS4A ile birlikte; NS3/4A, NS4A/4B, NS4B/5A ve NS5A/5B bağlantılarında kesimden sorumludur. Son yıllarda yapılan çalışmalarda NS3'ün serin proteaz aktivitesinin aynı zamanda NS3 RNA helikazın aktifleştirilmesinde de rol oynadığı gösterilmiştir (Hahn, 1995).

HCV Yapısal olmayan protein 4A (NS4A), NS3 serin proteaz aktivitesi için kofaktördür. 4A'nın N-ucu kısmı, NS3-4A kompleksinin membran ilişkisinden sorumludur. İlginç biçimde NS4A sadece Endoplazmik retikulumda değil aynı

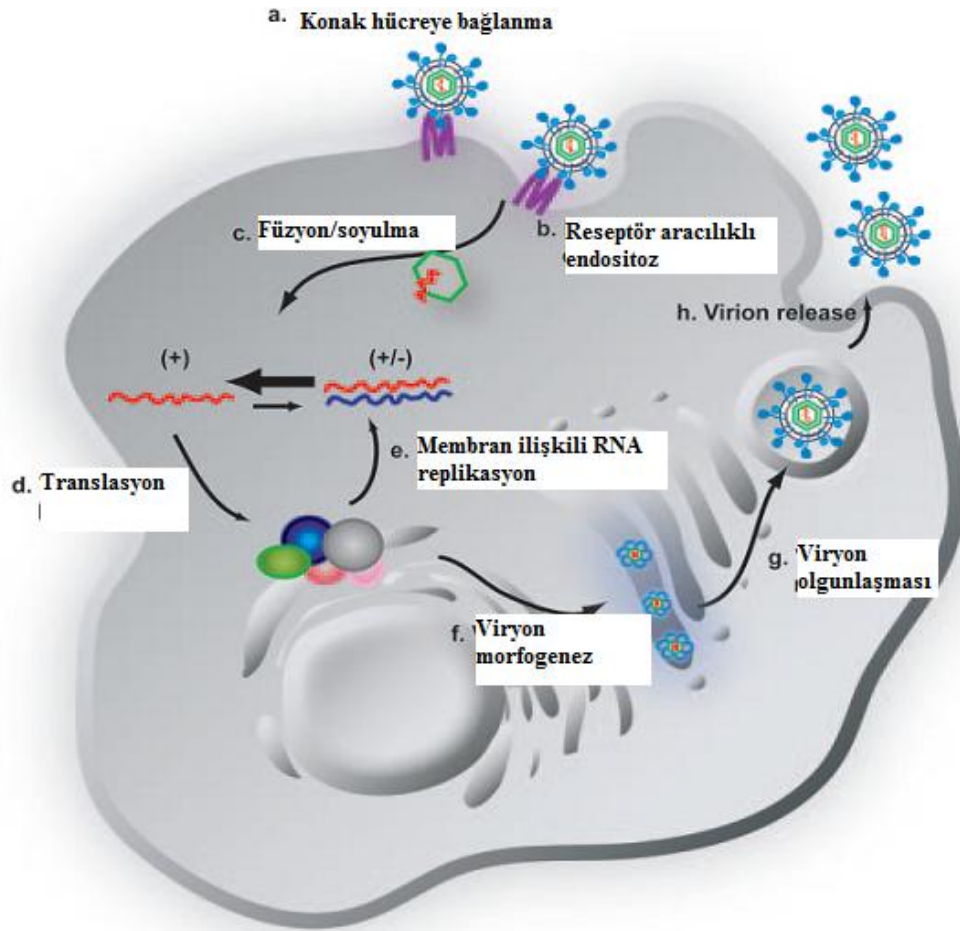
zamanda mitokondride de bulunmaktadır (Selimovic ve Hassan, 2008). Böylece HCV replikasyonunda önemli görevlere ek olarak hücresel işlevleri etkileyerek viral patogeneze de karışmış bulunmaktadır (Sharma, 2010).

HCV Yapısal olmayan protein 4B (NS4B), endoplazmik retikuluma integre membran proteindir. NS4B'nin N-ucu domaini, amfipatik karakterdedir. Bu domain, HCV replikasyonunda önemlidir (Elazar, 2004; Gretton, 2005).

HCV Yapısal olmayan protein 5A (NS5A), viral replikasyonda çok işleve sahip olduğu görülen membran-ilişkili fosfoproteindir. Farklı hücresel protein kinazlarla fosforile olması önemli olduğunu göstermektedir. Ancak HCV replikasyonu döngüsünde rolü hala anlaşılamamıştır (Macdonald, 2004). NS5A'nın önemli bir özelliği interferona duyarlılığı belirleyen bölge (ISDR) olduğu öne sürülen 20 aminoasitlik bir domain içermesidir. Japonya'da yapılan çalışmalar (Enomoto, 1995) bu bölgedeki mutasyonların tedaviye yanıtla ilişkili olduğunu belirtirken Avrupa'da yapılan çalışmalarda ise ilişkinin olmadığı (Zeuzem 1996) bildirilmiştir. Shiroto ve arkadaşları NS5A'nın endoplazmik retikulumun sitoplazmik yüzünde RNA ya bağımlı RNA polimeraz olan NS5B'ye tutunarak bir kompleks oluşturduğunu ve viral replikasyonu bu şekilde kontrol ettiğini bildirmişlerdir. Ayrıca NS5A'nın çok sayıda hücresel proteinle etkileşime girerek konak hücredeki sinyal ileti yollarının kontrolü, apoptozun baskılanması, hücre büyüme ve farklılaşmasının etkilenmesi, lipid metabolizmasının hasara uğratılması ve transkripsiyonun kontrol edilmesi suretiyle birçok konak hücre fonksiyonunu virüsün etkisi altına aldığı bildirilmiştir (Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

HCV Yapısal olmayan protein 5B (NS5B), RNA bağımlı RNA polimeraz işlevi göstermektedir (Behrens, 1996). NS5B, kalıp olarak genomik HCV RNA'yı kullanarak, negatif zincirli RNA'nın sentezini teşvik eder. Daha sonra, polimeraz ile genomik pozitif zincirli RNA'nın sentezi için kalıp olarak hizmet eder. Diğer RNA bağımlı polimerazlara benzer şekilde NS5B de hata eğilim olan bir enzimdir. Hücresel polimerazların aksine, hata okuma mekanizması bulunmamaktadır (Kupfer, 2010).

3.3. HCV Replikasyonu



Şekil 3.3.1. HCV replikasyonu (Tellinghuisen, 2007)

Hepatit C virüsünün, viral RNA'sı ile enfekte olmuş hastaların karaciğerinde bulunması ve deneysel olarak inoküle edilmiş şempanzelerle yapılan bir çalışmanın sonuçları bu virüsün replikasyonunun temel bölgesinin karaciğer olduğunu doğrulamıştır (Blight ve Gowans, 1995). HCV, karaciğerden farklı olarak periferik kan mononükleer hücrelerinde de replike olabilmektedir (Castillo vd., 2005). Ayrıca kemik iliği, lenf nodları, dalak, pankreas, tiroid ve adrenal bezler, primer biliyer epitelyum hücrelerde de HCV replikasyonunun meydana geldiği gösterilmiştir. (Ahmed ve Shaw, 1995; Quadri ve Rubbia-Brandt, 2001).

HCV replikasyon dinamiği, virüs çoğalmasının hız oranı ve mutantların ortaya çıkışından anlaşılabilir. IFN-alpha antiviral tedavisi alan hastalarla yapılan bir analiz, viryonun yarı ömrünün 3-5 saat olduğu ve klirens ve çoğalma oranının günde yaklaşık 10^{12} olduğunu ortaya koymuştur (Zeuzem vd., 1998; Neumann vd., 1998). Bu oranın yüksek oluşu, çoğalmanın tek bir hücrede olmayışından dolayıdır. şöyle ki, bir karaciğerin %10'unun enfekte olduğunu varsayarsak (bir karaciğer yaklaşık 2×10^{11} hepatosit içerir), viryon üretim oranı 50 viryon/her gün/her hepatositir (Neumann vd., 1998).

HCV replikasyonunun diğer özelliği, virüs varyantlarının hızlı üretimidir. NS5B'nin küçük bir bölgesindeki genomik çeşitlilikten köken olarak; HCV enaz 6 genotip ve çeşitli subtipler içinde sınıflandırılmıştır (Simmonds vd., 1993). HCV, bir hastada mikro değişiklik gösteren bir popülasyon olarak bulunur. Bu mikrodeğişiklik gösteren HCV topluluğu 'quasispecies' (alt grup) olarak adlandırılmaktadır (Holland vd., 1992). Böyle yüksek sayıda varyantların üretimi, temel olarak viral RdRp'nin (RNA bağımlı RNA polimeraz) yüksek hata yapma oranından dolayıdır. Bu oranın 10^{-4} aralığında olduğu tahmin edilmektedir. Bu yüksek hata yapma oranı, hastalarda ve deneysel olarak inoküle edilmiş şempanzelerde gözlenen yüksek mutasyon oranı ile anlaşılmaktadır (Ogata, 1991). Yıllarca Hepatit C virüsünün hücre kültüründe replike olma ve üretilmesindeki başarısızlıklar, yeni ve ucuz tedavi çalışmalarını için engel olarak kalmıştır. 2005'de HCV (JFH1) için in vitro hücre kültür sisteminin geliştirilmesi bu alanda büyük buluş olmuştur (Zhong vd., 2005). Fulminan hepatitli Japon hastalardan klonlanan JFH1 viral genom, hücre kültüründe etkili olarak replike olmasının yanı sıra viral partikülleri de üretebilmektedir. HCVcc (hücre kültüründe çoğalan HCV), araştırmacılara HCV'nin replikasyon döngüsünü çalışma olanağı vermiştir.

HCV replikasyon döngüsünün ilk basamağı HCV viryonlarının hücreye bağlanması ve hücreye girişidir. HCV'nin hücreye girişinin, hücrenin yüzeyinde bulunan bir reseptör ile virüsün E2 proteininin bağlanmasıyla endositoz yoluyla olduğu düşünölmektedir. Henüz hücreye giriş mekanizması tam olarak ortaya konulamamış olmasına karşın bu mekanizmada rol aldığı düşünölen birçok aday reseptör vardır.

HCV reseptörü olarak en olası aday, tetraspanin CD81'dir (Pileri, 1998). Birkaç hücre tipi dışında tüm hücrelerin yüzeyinde bulunan CD81 (TAPA-1), son

zamanlarda HUH-7,5 hattında yapılan in vitro bir çalışmada HCV'nin E2 proteinine bağlandığı ortaya konulmuştur.

Yapılan bir çalışmada, CD81 reseptörüne anti-CD81 antikorlarının deneysel olarak bağlandığında; HUH-7 hücrelerine ve insan hepatositlerine, HCV'nin girişinin engellendiği rapor edilmiştir (Cormier vd., 2004; McKeating vd., 2004; Zhang, 2004; Lindenbach vd., 2005). Ancak son zamanlarda yapılan bir çalışmada, CD81'in yalnız başına HCV viral girişi için yeterli olmadığı Scavenger reseptör B tip 1 (SR-B1) gibi bir ko faktöre ihtiyaç duyduğu gösterilmiştir (Kapadia, 2007).

Scavenger reseptör B tip 1 (SR-B1), HCV'nin diğer reseptörü olarak önerilmiştir. Hepatosit hücrelerinde yüksek seviyede eksprese edilen SR-B1, yüksek yoğunluklu lipoprotein (HDL)nin doğal ligandır.

HCV genotip 1a ve 1b rekombinant E2 zarf glikoproteinlerinin, SR-B1 molekülü ile HepG2 hücrelerine (CD81 eksprese etmeyen insan hepatoma hücre hattı) bağlandığı gösterilmiştir (Scarselli vd., 2002).

HCV partikülü ile etkileştiği gösterilen diğer bir aday, düşük yoğunluklu lipoprotein (LDL) reseptörleridir. Düşük yoğunluklu lipoprotein reseptörü (LDL-R), reseptör aracılıklı endositoz vasıtasıyla hücrelerde lipoprotein giriş çıkışını sağlar (Chung wason 2004). Dolaşımda bulunan HCV'lerin çeşitli oranlarda LDL ile kaplı olmaları nedeniyle LDLR'nin HCV'nin hücreye girişte kullandığı reseptör olabileceği ortaya atılmıştır (Öktem ve Abacıoğlu, 2006). Ayrıca HCV'nin hücreye girişinde reseptör olarak kullandığı öne sürülen olası diğer reseptörler; DC-SIGN ve L-SIGN, Asiloglikoprotein reseptörü, glikozaminoglikan, occludin ve claudin reseptörleridir.

Viral zarf ve endozomik membranın füzyonu sonucu, genomik HCV RNA hücrenin sitoplazmasında serbest kalır. HCV'nin 5'NTR bölgesinde bulunan IRES (Internal Ribosomal Entry Site), konak hücrenin ribozomunun 40S alt ünitesine bağlanır ve cap-bağımsız translasyon başlamış olur.

HCV RNA, bir poliprotein prekürsörünü kodlayan geniş bir ORF (open reading frame) içerir. Sentez sonucu elde edilen protein, posttranslasyonel olarak kesim ile 10 işlevsel viral proteine parçalanır (kor-E1-E2-P7-NS2-NS3-NS4A-NS4B-NS5A-NS5B) (Walewski vd., 2001).

Yapısal proteinler (kor, E1, E2) ve P7 proteini, konak endoplazmik retikulum sinyal peptidazlarıyla; yapısal olmayan proteinler (NS2,NS3, NS4A, NS4B, NS5A, NS5B) ise viral proteazlar NS2-3 ve NS3-4A tarafından kesilir.

HCV RNA replikasyonunun kompleks süreci hakkındaki bilgiler yetersizdir. Viral RNA replikasyonu için en önemli enzim, HCV'nin RNA bağımlı RNA polimerazı (RdRp) olan NS5B'dir (Behrens, 1996).

Diğer pozitif zincirli RNA virüslerinin aksine, HCV replikasyonunun, iki adımlı semi-konservatif ve asimetrik olduğu düşünülmektedir. Her iki adım da NS5B RNA bağımlı RNA polimeraz ile katalizlenir.

Pozitif zincirli genom RNA'sı, ilk adımda aracı negatif zincirin sentezi için kalıp olarak hizmet eder. İkinci adımda negatif zincirli RNA, poliprotein translasyonunda kullanılacak olan çok sayıda pozitif zincirin üretimi için kalıp olarak kullanılır (Bartenschlager ve MPietschmann 2004).

Viral proteinler, glikoproteinler ve genomik HCV RNA sentezlendikten sonra bu her bir bileşen, enfeksiyöz viryon üretmek için düzenlenmelidir.

HCV'nin bileşenlerinin bir araya gelmesi de (assembly) tüm diğer aşamalarda olduğu gibi, çoğu hücrenel faktörler ile birlikte birçok viral bileşeni içeren çok adımlı bir işlemdir. Bu konudaki çalışmalar in vitro HCV modellerdeki yeni gelişmeler nedeniyle henüz başlangıç aşamasındadır. Bir araya gelme aşamasından sonra HCV hücreden serbest kalmaktadır.

3.4. HCV Enfeksiyonunda Tanı

Hepatit C'nin belirtileri genellikle yorgunluk, kas ağrısı, iştah kesilmesi, mide bulantısı gibi spesifik olmayan belirtilerdir. Çoğu vaka ise asemptomatiktir yani belirti göstermemektedir. Hepatit C virüsü genellikle tesadüf sonucu farkedilmektedir. HCV ile enfekte bireylerin yalnızca dörtte birinin hastalıklarının farkında olduğu tahmin edilmektedir. Bu yüzden tedaviden yararlanamamakta ve virüsü yayma riskine sahip olmaktadır (McHutchison, 2004).

Tedavi edilmeyen Hepatit C, hastaların %80'inden fazlasında kronikleşmektedir. Kronik hepatit C ise karaciğer yetmezliği, karaciğer kanseri ve ölüme yol açan

karaciğer sirozuna neden olmaktadır (McHutchison, 2004). Hepatit C tanısı için iki yöntem kullanılmaktadır. Birincisi, serolojik testler ve ikincisi HCV RNA (viral yük) testleridir.

3.4.1. Serolojik Testler

Hepatit C virüsüne karşı immün sistem tarafından geliştirilen antikorların saptanmasından köken alan testlerdir. Tanıda serolojik olarak kullanılan yöntem kanda EIA (Enzyme Immunoassay) ile Anti-HCV antikorların saptanmasıdır (Lange ve Sarrazin, 2010).

HCV ile enfeksiyondan sonra immün sistem tarafından oluşturulan antikorlar, vücut virüsü elimine ettikten sonra kaybolmaz, fakat bu antikorlar tekrar HCV enfeksiyonuna karşı korumada etkisizdir (Franciscus, 2006)

HCV'ye özgül antikorların saptanması için ilk uygulanan EIA, NS3'nin bir kısmı ve NS4 bölgesinden türeyen epitoplardan köken alır (C-100). Bu 1. Kuşak EIA yöntemi %70-80 hassaslığa ve düşük spesifikliğe sahiptir. C-100'e karşı geliştirilen antikorlar, viral bulaşmadan sonra yaklaşık 16 hafta sonra meydana gelmektedir.

İkinci kuşak EIA; kor (C-22), NS3 bölgesi (C-33) ve NS4 bölgesinden (C-100) türeyen epitoplara karşı geliştirilen antikorları saptamaktadır. Böylece hassaslığı %95'e yükselmiştir ve daha az oranda yanlış pozitiflik göstermektedir. Antikorlar, HCV enfeksiyonundan yaklaşık 10 hafta sonra saptanabilmektedir (Pawlotsky, 2003). Günümüzde kullanılan ve antikor taramada geçerli kabul edilen 3. Kuşak EIA testi, 2. kuşaktaki bölgelere ek olarak NS5 bölgesinden türeyen epitoplara karşı geliştirilen antikorları da saptayabilmektedir. Bu yenilik, anti-HCV antikorların, %99'dan daha fazla hassaslığa sahip olmanın yanı sıra enfeksiyonundan 4-6 hafta sonra geliştirilen antikorları saptanabilmesine izin vermektedir (Colin, 2001).

Düşük risk gruplarında yapılan taramalarda (örneğin; kan donörleri), anti-HCV EIA testi pozitifliklerinin RIBA ile doğrulanması önerilmektedir. Bu amaçla "recombinant immunoblot assay" (RIBA, Chiron Corporation, Emeryville, CA, A.B.D.) ve "line immunoassay" (INNO-LIA Innogenetics, Belçika) yöntemleri genel olarak kullanılmaktadır. Bu testlerde, üzerine HCV'ye ait çeşitli rekombinant antijenlerin ve/veya peptitlerin yapılandırıldığı stripler kullanılmaktadır. Böylece

hastanın serumunda hangi HCV antijenine özgül antikorların var olduğu tanımlanabilmektedir ve bazı hatalı pozitif sonuçlar da böylelikle azaltılabilmektedir (Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

3.4.2. HCV RNA (Viral Yük) Testleri

Bu viral yük testi, kandaki HCV RNA miktarını ölçer. Bu test, aktif HCV enfeksiyonunu doğrulamakta kullanılır ve uygulanan tedavinin etkili olup olmadığını tahmin etmede yardımcı olmaktadır. İki tip viral yük testi vardır. Birincisi, kalitatif yani virüsün var olup olmadığını tespit eder. İkincisi ise kantitatif yani virüsün miktarını ölçer.

Yapılan tıbbi çalışmalarda, kandaki HCV RNA miktarı ile hastalık ilerleme durumu arasında ilişki bulunamamıştır.

Geçmişte, Hepatit C virüsü miktarı ölçümü, ‘kopya’ olarak rapor edilirdi. Ancak günümüzde, testlerin farklı dalları arasında ölçümleri standardize etmek için bir girişim ile ‘international unit’ (IU) olarak rapor edilmektedir.

Viral yük test sonuçları; 800.000 IU/mL altı düşük, 800.000 IU/mL üstü yüksek olarak ifade edilmektedir (Franciscus, 2006).

A) HCV RNA Saptamada Kullanılan Kalitatif Yöntemler

HCV RNA kalitatif testler, kantitatif HCV RNA testleri ile karşılaştırıldığında oldukça düşük saptama limitine sahiptir. Ayrıca, kalitatif testlerin maliyeti, kantitatif testlerle karşılaştırıldığında daha düşüktür. Bu nedenle, kalitatif HCV RNA testleri, HCV RNA konsantrasyonu artan ve düşen akut Hepatit C’nin ilk teşhisinde kullanılır ve HCV antikor pozitif insanlarda kronik hepatit C enfeksiyonu doğrulaması için de kullanılır. Ek olarak, antiviral tedavi sırasında, sonunda ve bittikten sonra virolojik yanıtın doğrulanmasında da kullanıldığı gibi, HCV’nin var olup olmadığını saptamak için kan ve organ bağışi görüntülenmesinde de kullanılır (Lange ve Sarrazin, 2010).

i) Kalitatif RT-PCR

Reverse transkriptaz PCR (RT-PCR) kökenli testlerde; HCV RNA, reverse transkriptaz ile tek zincirli komplementer cDNA'nın sentezi için kalıp olarak kullanılır. Daha sonra cDNA, çoklu çift zincirli DNA kopyaları sağlamak için DNA polimeraz ile çoğaltılır. Kalitatif RT-PCR testlerinin, tüm genotipler için eşit hassaslıkla 50 HCV RNA IU/mL veya daha azını saptayabildiği düşünülmektedir (Lange ve Sarrazin, 2010).

ii) Transkripsiyon-aracılıklı Amplifikasyon (TMA)

TMA kökenli kalitatif HCV RNA saptama, çok yüksek hassaslığa sahiptir. Örneği hazırlama, çoğaltma ve saptama olmak üzere üç adımda yapılmaktadır. İlk adımda HCV RNA ekstraksiyonu yapılır. İkinci adımda yani çoğaltma adımında 2 RNA polimeraz ve 2 primer kullanılır. Primerlerden biri RNA polimeraz için promoter içermektedir. Promoter-primer, belirlenen alanda hedef rRNA'yı hibridize eder. Reverse transkriptaz, promoter-primerin 3'ucundan uzama ile hedef rRNA'nın bir DNA kopyasını yapar. Meydana gelen RNA/DNA heterodubleks, reverse transkriptazın RNaz H aktivitesi ile denature edilir. Daha sonra ikinci primer, DNA kopyasına bağlanır. DNA'nın yeni bir zinciri, reverse transkriptaz ile primer sonundan sentezlenir ve iki zincirli DNA molekülü oluşturulur. RNA polimeraz, DNA kalıbında promoter dizilimi tanır ve transkripsiyonu başlatır. Her yeni sentezlenen RNA amplikonları, TMA işlemine tekrar başlar. RNA amplikonları gittikçe artarak replikasyonun yeni döngüsü için kalıp olarak hizmet eder. DNA kalıplarının her biri, 100-1000 kopya RNA yapabilir, bu artış bir saatten daha az sürede 10 milyar amplikon üretimiyle sonuçlanabilir. Tüm işlemler, otokataliktir ve tek bir sıcaklıkta yapılır. RNA amplikonları, DNA'ya göre daha labil olması nedeniyle kontaminasyon riski düşüktür. Son aşama olan saptama ise, acridinium ester-etiketli DNA problemlerinin eklenmesi ile yapılmaktadır (Sarrazin, 2002).

B) HCV RNA Saptama için Kantitatif Testler:

HCV RNA kantitasyon, hem hedef amplifikasyon teknikleri (kompetitif ve real time PCR) hem de sinyal amplifikasyon teknikleri (dallı DNA (bdNA) testi) ile yapılır.

Tablo 3.4.2. Ticari olarak kullanılan bazı HCV RNA tanı testleri

TEST	ÜRETİCİ	YÖNTEM
HCV RNA Saptamada kullanılan Kalitatif Testler		
Amplicor™ HCV 2.0	Roche Molecular Systems	PCR
Versant™ HCV	Siemens Medical Solutions Diagnostics	TMA
HCV RNA Saptamada kullanılan Kantitatif Testler		
Amplicor™ HCV Monitor 2.0	Roche Molecular Systems	PCR
HCV SuperQuant™	National Genetics Institute	PCR
Versant™ HCV RNA 3.0	Siemens Medical Solutions Diagnostics	bDNA
Cobas Ampliprep/ Cobas TaqMan	Roche Molecular Systems	Real-time PCR
Abbott RealTime™ HCV	Abbott Diagnostics	Real-time PCR

3.4.3. HCV Genotiplendirme

Günümüzde, Hepatit C virüsü tedavisinde tavsiye edilen tedavi süresi ve ribavirin dozu, HCV genotipine göre belirlemektedir. HCV genotiplendirme, antiviral tedavi düşünülen her hastada zorunludur (Bowden, 2006).

HCV, RNA bağımlı RNA polimerazın hata düzeltme mekanizmasının eksikliği ve her gün 10^{12} viryon üreten hızlı replikasyon döngüsü ile gelişmiş, büyük ölçüde genomik dizilim çeşitliliğine sahip olması nedeniyle heterojendir. HCV, 6 genotip ve 100'den fazla subtip'e sahiptir.

Direk dizi analizi ve ters hibridizasyon teknolojileri ile HCV genotiplendirmesi yapılmaktadır.

Önceki yıllarda analizler, 5'UTR bölgesine yönelik yapılmaktaydı. Ancak bu analizler alttıplerin sınıflandırılmasında yeteri kadar güvenilir değillerdi. Bu nedenle, son zamanlarda, NS5B ve kor proteini kodlayan genlerin de analizine başlanmıştır (Bowden, 2006).

3.5. HCV İnfeksiyonunda Tedavi

Akut HCV enfeksiyonlu hastaların yaklaşık %55-85'inde enfeksiyon kronikleşir. Kronikleşen HCV enfeksiyonu zemininde sirozu, karaciğer kanseri gelişme riski vardır (Di Bisceglie, 2000).

Akut enfeksiyondan kronik enfeksiyona geçiş mekanizması kısmen anlaşılmıştır. Ancak, kronik enfeksiyonu engellemek için pegylated interferon alpha (PEG-IFN) ile erken tedavi, akut hepatitli hastaların %95'inde etkili olduğu gözlenmiştir (Wiegand vd., 2006; Jaeckel vd., 2001).

Akut HCV'de genotip ve RNA serum seviyesi, tedavi sonucuna etkili değildir (Jaeckel vd., 2001).

Günümüzde kronik Hepatit C tedavisinde, pegylated interferon alpha (PEG-IFN) ve nükleozid analogu ribavirin kombinasyonu kullanılmaktadır. 24-48 hafta süren tedavi sonucunda vakaların %54-56'sında kalıcı virolojik yanıt (SVR-Sustained virological response) sağlanmaktadır (Fried vd., 2002; Manns vd., 2001).

Kalıcı virolojik yanıt (SVR), tedavi bittikten sonraki 24 haftayı izleyen sürecin sonunda hassas bir test ile HCV RNA'nın saptanamaması olarak tanımlanır.

Viral yanıt oranı; yaş, ağırlık, cinsiyet, ırk, karaciğer enzimleri, fibroz safhası, HCV genotipi ve temel HCV konsantrasyonu gibi çeşitli konak ve viral faktörlere bağlıdır (Berg vd., 2003; Hadziyannis vd., 2004; Myers vd., 2003). HCV genotip 1 ile enfekte hastalar %42-55 oranında SVR gösterirken, HCV genotip 2-3 ile enfekte hastalar %78-86 oranında SVR göstermektedir. (Fried vd., 2002; Hay vd., 1985).

PEG-IFN ile tedavinin en yaygın yan etkileri; yorgunluk, kas ağrısı ve psikolojik bozukluklardır. Ribavirinin en yaygın yan etkileri ise hemoliz ve anemi'dir (Manns vd., 2001; Fried vd., 2002).

3.5.1. İnterferon Etki Mekanizması

İnterferonlar, immün reaksiyonların modüle edilmesinde ve antiviral ve antiproliferatif yanıtların düzenlenmesinde önemli rol oynayan sitokindir. I ve II olmak üzere iki tip olarak sınıflandırılırlar. Tip I; IFN-alfa ve IFN-beta ve Tip II ise IFN-gama şeklindedir (Heim, 2000). Tüm Tip I IFN'ler aynı interferon alfa/beta reseptöre (IFNAR) bağlanırlar. IFN-gama, T lenfositleri ve doğal öldürücü (NK) hücreleri tarafından üretilir. IFN-gama, IFN gama reseptöre (IFNGR) bağlanır (Dorman ve Holland, 2000).

Bu reseptörlere bağlanarak, Tip I ve Tip II IFN'lerin her ikisi de Jak/STAT sinyal transdüksiyon yolunu aktive ederek kendi etkilerini kullanırlar.

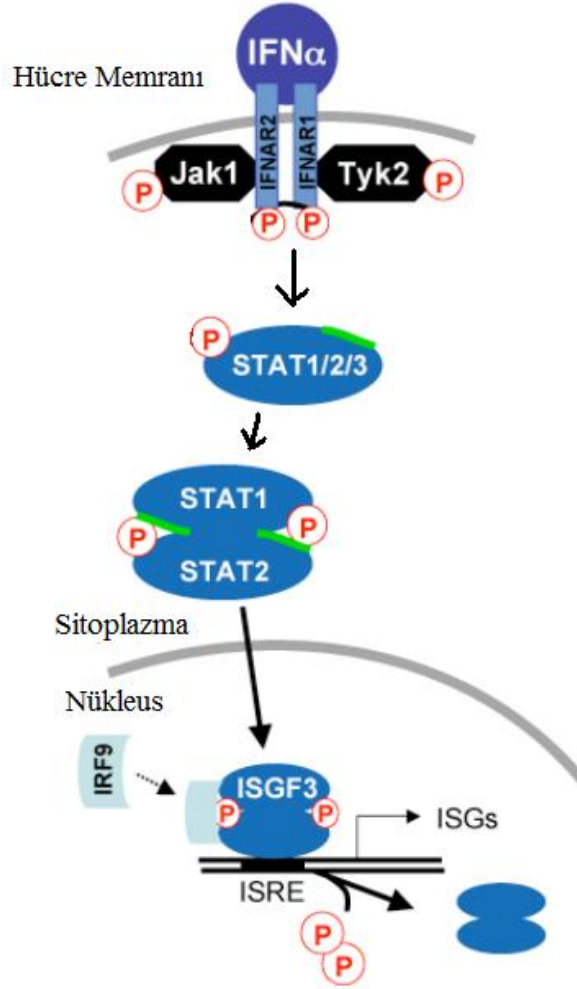
IFN-alfa, konak immün yanıtın modülasyonu ve direk antiviral eylemlerin her ikisinden köken alan, çoklu antiviral etkilere sahiptir.

IFN-alfa, güçlü antiviral aktiviteye sahiptir. Ancak virüse veya replikasyon kompleksine direk etkisi yoktur. IFN-stimüle eden genleri teşvik ederek etki eder (Bekisz vd., 2004; Sen, 2001).

Kısaca, IFN-alfa kendi reseptörü olan IFNAR'a bağlanır. Bağlanma sonucu dimerize olan IFNAR, Janus kinaz 1 (Jak1) ve Tirozin kinaz 2 (Tyk2)'nin aktivasyonunu sağlar. (Gilmour ve Reich, 1995; Gale, 2003).

Aktive olan kinazlar, sinyal iletilici ve aktivatör transkripsiyon proteinleri 1 ve 2 (STAT1 ve STAT2- signal transducer and activator of transcription proteins 1 and 2)'yi fosforilasyona uğratır. Aktive olmuş STAT1/2 kompleksi, hücre nükleusuna geçiş yapar. Burada hücresel DNA'da IFN-stimüle eden yanıt elementlerine bağlanan bir kompleks oluşturmak için IFN-regulatör faktör 9 (IRF-9) ile birleşir. Böylece, çok sayıda ISG (İnterferonu stimüle eden genler)'lerin ekspresyonuna yol açar. (Jordan ve Jay, 2005).

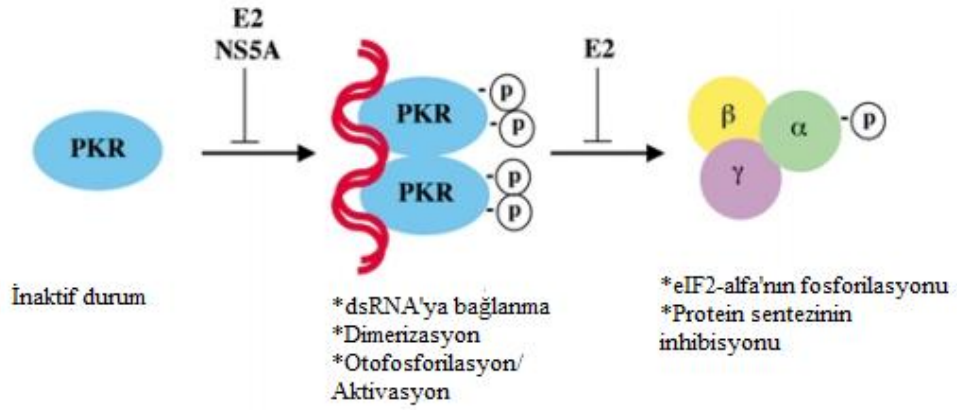
Antiviral mekanizmaların indüksiyonu; protein kinaz PKR'yi aktive eden çift zincirli RNA (dsRNA), 2'-5' oligoadenilat sentetaz (OAS) ve Mx proteinleri kodlayan interferonu stimüle eden genlerin (ISG)'nin transkripsiyonel aktivasyonundan meydana gelmektedir (Heim, 2000).



Şekil 3.5.1. IFN-alfa sinyal iletim yolu (Jak/STAT) (Magdalena, 2008)

Mikroarray analizleri; yüzlerce genin, birçok antiviral aktivitesinin yanı sıra lipid metabolizması, apoptoz, protein degradasyonu ve enflamatuar hücre yanıtlarıyla ilişkisi olan Tip I IFN ile indüklendiği gösterilmiştir (Veer, 2001).

İnterferonu stimüle eden genlerin (ISG)'nin transkripsiyonel aktivasyonundan meydana gelen antiviral mekanizmalardan en iyi bilinen şekli Protein kinaz (PKR)'dir. Protein kinaz normalde hücrelerde düşük seviyede ve inaktif durumdadır. PKR aktive olduğunda regüle olur ve daha sonra viral çift zincirli RNA'ya bağlanır ve otofosforlasyona uğrayarak aktive olur. PKR'nin en iyi karakterize edilmiş substratı, ökaryotik başlama faktörlerinin alfa altünitesi, eIF2-alfa'dır. PKR'nin fosforlasyonu, IFN'nin antiviral ve antiproliferatif etkisini açığa çıkararak viral ve hücre proteinlerinin her ikisinin translasyonunun inhibisyonuyla sonuçlanır. (Meurs vd., 1990).



Şekil 3.5.2. PKR aktivasyonu ve translayon kontrolü mekanizması (Deborah vd., 2000)

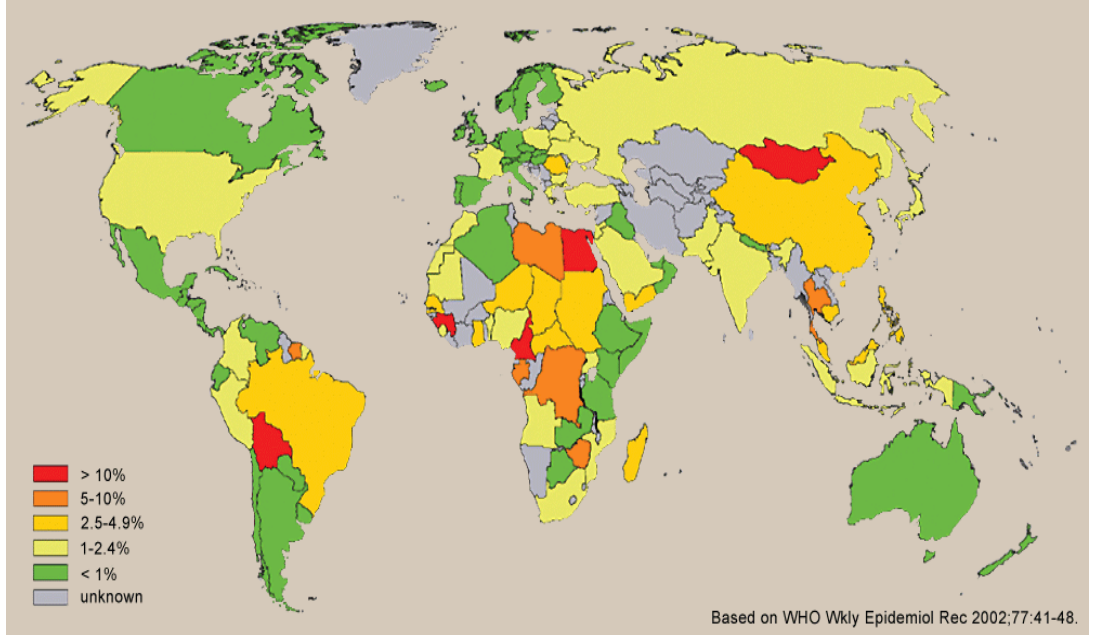
İki HCV proteininin PKR ile etkileştiği bilinmektedir. ISDR yoluyla NS5A ve eIF2-alfa fosforilasyon alanlarına benzer bir bölge yoluyla E2'dir.

3.6. HCV Enfeksiyonu Epidemiyolojisi

Hepatit C, tüm dünyayı etkileyen başlıca hastalıklardan biridir. Dünya Sağlık Örgütü (WHO)' nun tahminlerine göre dünyada HCV enfeksiyonu yaklaşık görülme sıklığı, ülkelere göre çok değişmekle birlikte ortalama %3 civarındadır (World Health Organization, 1997).

En düşük görülme sıklığı (0,1-0,01), İngiltere ve İskandinavya'dan, en yüksek görülme sıklığı (%15-20) ise Mısır'dan rapor edilmiştir. (Shepard vd., 2005; Frank vd., 2000).

Amerika, Avustralya, Türkiye, İspanya, İtalya ve Japonya gibi farklı ülkelerde, HCV'nin görülme sıklığı benzerdir (%1-1,9). (Dominguez vd., 2001; Sagnelli vd., 2005; Campel vd., 2002).



Şekil 3.6.1. Ülkelere göre tahmini HCV prevalansı (World Health Organization, 2002)

HCV infeksiyonu sıklığını belirlemek zordur. Çünkü çoğu akut infeksiyon, asemptomatiktir ve kullanılan testler, akut ve kronik infeksiyonu ayırt edememektedir (Miriam, 2007).

HCV'nin dünya çapında sonuçlarının tahmin edilmesi için, her ülkede HCV infeksiyonunun yaklaşık görülme sıklığının bilinmesine ihtiyaç vardır. Bu görülme sıklığı, toplum kökenli çalışmalar baz alınarak belirlenmelidir. Ancak, çoğu ülkelerde böyle araştırmalar eksiktir ve kan donörleri, ilaç kullanıcıları, hemodiyaliz hastaları gibi sadece spesifik gruplar çalışılmıştır (Lavanchy, 2009).

Yaşa göre infeksiyon sıklığı analizleri sonucunda HCV'nin üç ana şekilde yayılımı görülmektedir. Bunlardan ilki enfeksiyon saptanma yaşı 30-49 arası gruptur ve bu bireylerin enfeksiyonu alma yaşları genç erişkin dönem olmaktadır. Bu durum daha sık olarak Amerika Birleşik Devletleri ve İngiltere'de sık görülmekte ve HCV bulaşında primer risk faktörü olarak intravenöz ilaç kullanımı gelmektedir. Japonya gibi ikinci durumun görüldüğü ülkelerde infeksiyonların çoğunluğu ileri yaşlarda görülmektedir ve infeksiyon sıklığı yaşam süresinin uzaması ile doğrusal olarak artmaktadır. Üçüncüsü ise Mısır gibi infeksiyonun her yaş grubunda yüksek olarak görüldüğü durumdur. Bu durumlardan son ikisinde infeksiyonun taşınmasında genel

olarak risk faktörleri; aşılama çalışmalarında kullanılan donanımın enfekte olması ve güvenli olmayan sağlık girişimleridir (Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

HCV'nin temel bulaş yolu parenteraldir. HCV enfeksiyonunun temel risk faktörleri arasında, kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu, damar içi uyuşturucu kullanımı, hemodiyaliz, yüksek riskli cinsel davranışlar, cerrahi girişim öyküsü, kontamine iğne batması ve HCV pozitif olgulardan yapılan organ nakilleri sayılabilir (Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

Bazı HCV genotipleri tüm dünyada yaygın olarak bulunurken (1a, 1b, 2a, 2b, 3a) bazı tipler belirli coğrafi bölgelerde daha siktir. Yemen, Kuveyt, Irak, Suudi Arabistan, Zaire, Gabon ve Gambia'da tip 4 enfeksiyonları baskındır. Güney Afrika'da HCV genotip 5a çok yaygın iken, Hong Kong'da en sık tip 6a enfeksiyonlarına rastlanmaktadır. Güney ve Doğu Avrupa'da tip 1b enfeksiyonları daha sık görülmektedir. Türkiye'de HCV enfeksiyonlarının yaklaşık %90'ı tip 1 (büyük çoğunluğu tip 1b) olup, tip 2, 3 ve 4 HCV enfeksiyonlarına da rastlanmaktadır (Öktem ve Abacıoğlu, 2006).

BÖLÜM 4

MATERYAL ve YÖNTEM

4.1. Örneklenme

Gaziantep Üniversitesi Şahinbey Araştırma ve Uygulama Hastanesi Gastroenteroloji Bölümünde 2009–2010 yılları arasında kronik HCV enfeksiyonu tanısı konulan HCV RNA pozitif 34’ü kadın 25’i erkek olmak üzere toplam 59 hasta çalışmaya dahil edilmiştir. Hastalardan alınan serum örnekleri ODTU Teknokent REFGEN Araştırma Laboratuvarında çalışılmıştır. Çalışmamıza dahil edilen hastaların daha önceden anti-HCV antikorları ve HCV RNA bulgularının pozitif olması şartı aranmıştır. Ayrıca hastaların tedavi öncesi kantitatif HCV RNA değerleri ve biyokimyasal değerleri saptanmıştır. Çalışmamıza dahil edilen Kronik HCV tanısı konularak tedavi alması öngörülen hastalar, Gastroenteroloji bilim dalında 6-12 ay boyunca haftada birkez peg-interferon alfa 2a ya da peg-interferon alfa 2b ve hergün ribavirin kombinasyon tedavisi almışlardır.

Tedaviye alınan yanıtla göre sınıflandırma aşağıdaki şekilde yapılmıştır;

1.Kalıcı Viral Yanıt: Tedavi sonu viral cevap alınan hastaların tedavisiz 6 aylık izlem sonunda HCV RNA düzeylerinin negatif olarak saptanmasıdır.

2. Yanıtsız: Tedavi alan hastada 12. hafta sonunda HCV RNA’da 2 log’dan daha az düşme veya 6. ay sonunda PCR ile HCV RNA’nın pozitif saptanmasıdır.

PKRBD ve ISDR bölgelerinde bulunan mutasyon sayılarına göre sınıflandırma aşağıdaki şekilde yapılmıştır (Enomoto Kriterleri esas alınmıştır);

1. Doğal Tip: Gen bölgesinde herhangi mutasyon bulunmayan dizilime sahip hastalar

2. Orta Tip: Gen bölgesinde 1,2 veya 3 mutasyon bulunan dizilime sahip hastalar

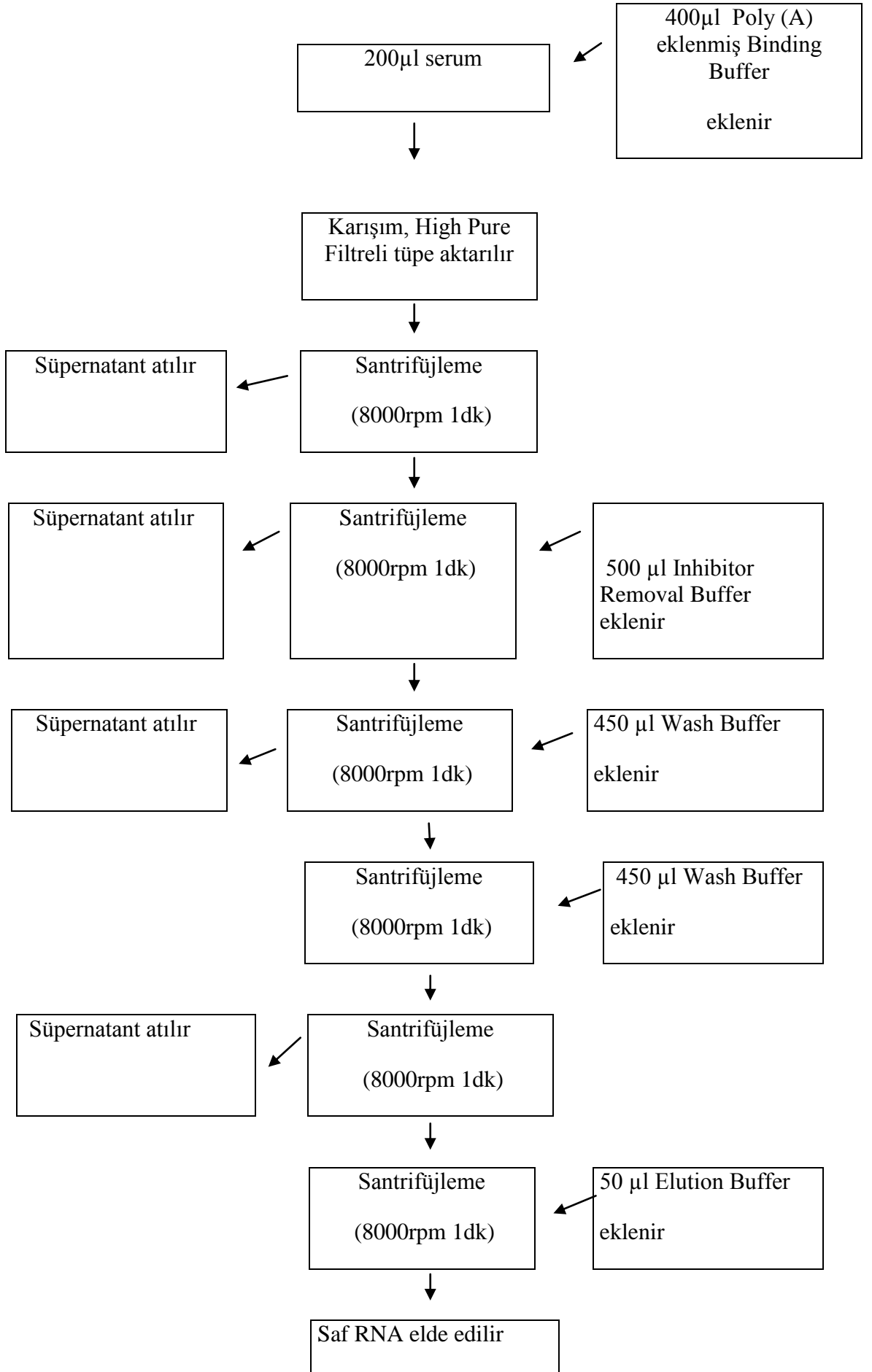
3. Mutant Tip: Gen bölgesinde 4 veya 4'ten fazla mutasyona sahip hastalar

4.2. RNA Saflaştırma Aşamaları

Her hastadan 10ml periferik venöz kan örneği alınmıştır. Çalışma grubuna dâhil edilen bireylerin RNA'ları HCV RNA Ekstraksiyon kiti (Roche High Pure Viral RNA Kit, Germany) ile ve üretici firma direktifleri doğrultusunda elde edilmiştir.

Tablo 4.2.1. HCV RNA Ekstraksiyon kit içeriği

	İçeriği
Bağlama Tamponu	<ul style="list-style-type: none">• 2x25ml• 4.5 M guanidin-HCl, 50 mM Tris-HCl, 30% Triton® X-100 (w/v), pH 6.6 (25°C)
Poli (A)	<ul style="list-style-type: none">• Liyofilizat• 2 mg poly (A) taşıyıcı RNA• RNA bağlama için kullanılmaktadır
İnhibitor Uzaklaştırıcı Tampon	<ul style="list-style-type: none">• 33 ml, 20 ml saf etanol eklenir• 5 M guanidin-HCl, Etanol eklendikten sonra final konsantrasyonu 20 mM Tris-HCl, pH 6.6 (25°C)
Yıkama Tamponu	<ul style="list-style-type: none">• 2 × 10 ml, her bir yıkama tamponu için 40ml etanol eklenir• 20 mM NaCl, Etanol eklendikten sonra final konsantrasyonu 2 mM Tris-HCl, pH 7.5 (25°C)
Elüsyon Tamponu	<ul style="list-style-type: none">• 30 ml• nükleazsız steril, çift distile su
High Pure Filtre Tüpler	700µl'lik veya üstü örnek kullanım içindir. 2kat cam elyaf kaplanmış 2 poşet 50 polipropilenli tüp
Toplama Tüpleri	8 poşet 50 polipropilen tüp (2 ml)



Şekil 4.2.1. : RNA saflaştırma aşaması

4.3. Saf RNA'dan cDNA elde edilmesi

Bu aşamada kullanılan karışım aşağıdaki gibidir;

- Buffer 4µl
- dNTP 5µl
- R₃ primer 2µl
- Enzim (AMV reverse transkriptaz) 0,05 µl
- Saf RNA 5 µl
- DEPC'li su 4 µl
- RNaz inhibitör 0,05 µl

Bu şekilde hazırlanan karışım, Minicycler MJ Research (United States of America) cihazına yerleştirildi. 42°C de 1 saat PCR işlemi gerçekleştirilmiş olur.

* dNTP Mix (Fermantas), 10mM'lik stoğu 2mM'a düşürmek için 200 µl distile su ile 50 µl dNTP konularak dilüsyon yapılmıştır.

* R₃ Primer (Metabion, Germany), 100pmol olan stok 10pmol'e düşürmek için 1/9 oranında dilüsyon yapılmıştır.

* Bu aşamada distile su yerine DEPC'li su (IUPAC) kullanılmıştır. DEPC'li su, dietil dikarbonattır. Histidin rezidülerinin kovalent modifikasyonu ile RNaz'ın inaktive edilmiştir.

4.4. İstenilen Bölgenin Çoğaltılması

1.Tur PCR

- Buffer 5 µl
- dNTP 5 µl
- MgCl₂ 3 µl
- Primer F₃ 2 µl
- Primer R₃ 2 µl
- Enzim (taq polimeraz) 0,25 µl
- cDNA 5 µl
- distile su 27,5 µl

1. turda kullanılan primerler (Metabion, Germany):

F3 5'-GGGCATGACCACTGACAACGT-3'

R3 5'-GCAATGGGCACCCGTGTACC-3'

Hazırlanan karışım Minicycler MJ Research (United States of America) cihazına yerleştirildi. Bu cihazda gerçekleşen işlemler şöyledir:

Denatürasyon (1döngü) 95°C 5dk

Bağlanma (30döngü) 95°C 1dk

55°C 1dk

72°C 2dk

Uzama (1döngü) 72°C 7dk

2.Tur PCR

- Buffer 5 µl
- dNTP 5 µl
- MgCl₂ 3 µl
- Primer F₄ 2 µl
- Primer R₄ 2 µl
- Enzim (taq polimeraz) 0,25 µl
- DNA 1 µl
- Distile su 31,75 µl

2.Tur PCR'da Kullanılan primerler (Metabion, Germany):

F4 5'-GCAGTGCTCACTTCCATGCTCAC-3'

R4 5'-GGACTCTAGCAGTGGAGGGTTGTA-3'

Hazırlanan örnekler tekrar Minicycler MJ Research (United States of America) cihazına yerleştirildi. Aynı işlemler yine tekrarlandı.

Denatürasyon (1döngü) 95°C 5dk

Bağlanma (30döngü) 95°C 1dk

55°C 1dk

72°C 2dk

Uzama (1döngü) 72°C 7dk

1. tur PCR da 2 primer ve bunun ürünlerinin kullanılarak yapıldığı 2 tur PCR da 1 çift primer kullanıldı. Bu şekilde nested PCR yapılmış oldu.

2. tur PCR dan sonra agoroz jel hazırlandı. PCR ürünlerimiz agoroz jelde yürütülüp elektroforezi ile ayrıştırılıp görüntüledi.

4.5. Agoroz Jelde Görüntüleme

Agaroz jel yükleme tamponu (6X):

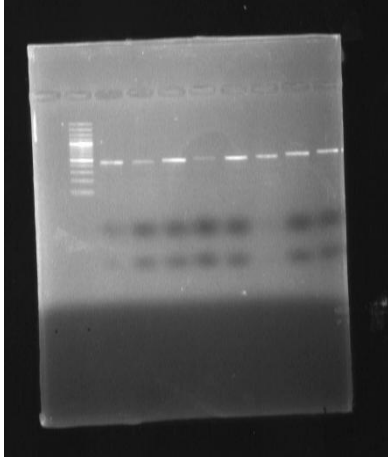
% 0,05 Bromofenol mavi,

% 15 Fikol,

% 0,05 Ksilen siyanol.

%2 lik agaroz jel kullanıldı. 0,25 g (% 1'lik agaroz jel için) agaroz hassas tartıda ölçüldü ve 25ml 0,5X TBE eklenerek ısı yardımıyla çözüldü. Üzerine 1 mg/ml Etidyum Bromür eklendi ve jel tankına döküldü. PCR ürünleri, jel yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi. Çalışmanın başlangıcında belirlenen primerlerin, bazı serum örneklerinde çalışıp bazı örneklerde çalışmaması gibi sebeplerden dolayı yeni primer dizayn edildi. Yeni dizayn edilen primerlerle elektroforez sonrasında istenilen bantların görüntülenmesi sağlandı.

Bundan sonraki aşamalarda ise silica ile PCR temizleme yapılip istenilmeyen maddelerin örneklerimizden uzaklaştırılması sağlanmıştır. DNA örneklerinin miktarı, Nanodrop spektrofotometre (NanoDrop® ND-1000) de ölçüldü. Ölçümlerde 230ng/uL civarı çıkan örneklerle çalışmaya devam edilmiştir.



Şekil 4.5. Marker (Fermantase GeneRuler 100 bp Plus DNA ladder), 1, 4, 5, 60, 58, 32, 25 ve 14 nolu hastalara ait PCR ürünlerinin agaroz jel fotoğrafı (gözlemlenen 473bp lik bantlar)

4.6. PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

(Silica İle Temizleme)

1. İçerisinde PCR ürünü olan her bir tüpe 90µl silicalı buffer eklenir. Amaç DNA'yı silica ile bağlayıp tüpün dip kısmına yapıştırmaktır
2. Kapağı kapatılan tüpler vorteksledikten sonra 5400rpm'de 1dk santrifüjlendi. DNA+silica tüpün dip kısmına yapışmıştır. Süpernatant, pipetle çekilerek atıldı.
3. Her bir tüpe 100 µl %70'lik etanol eklendi ve vorteksleme yapıldı. Amaç, DNA'yı tüpe sabitlemektir
4. Tüpler 5400rpm'de 1dk santrifüjlendikten sonra süpernatant kısım pipetle çekilerek atıldı.
5. Her bir tüpe 50 µl distile su eklendi ve vorteksleme yapıldı.
6. Tüpler 65°C'de 5dk etüve yerleştirilerek kalan alkolün uçması sağlandı.
7. Son olarak 5400rpm'de 1dk santrifüjleme işlemi yapıldı

Bundan sonraki aşamada, tüplerdeki örnekler Nanodrop spektrofotometre'de ng/uL cinsinden ölçüldü ve 5ng/uL altında çıkan örnekler iptal edildi. İptal edilen örnekler tekrar çalışıldı.

4.7. Dizi Analizi Reaksiyonu

Dizi analizi, BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kiti (Applied Biosystem, America) ile ve üretici firma direktifleri doğrultusunda gerçekleştirilmiştir.

DNA Dizi Analizi için yapılan PCR'ın koşulları aşağıdaki gibidir:

- Big Dye 8 µl
- PCR kalıp 1-100 nanogram
- Primer 3.2 pmol
- Deionize su Toplam hacim 20 µl'ye tamamlanır

Reaksiyon şartları: (Toplam 30 döngü olmak üzere)

96 °C 30 sn

96 °C 10 sn

50 °C 5 sn

60 °C 4 dakika

4 °C ∞

4.8. Dizi Analizi Reaksiyon Ürünlerinin Sodyum Asetat İle Saflaştırılması:

- Etanol (%95 alkol) 1050 µl
- Distile su 250 µl
- NaOAc (Sodyum Asetat) 200 µl

1. Bu şekilde hazırlanan karışımdan her bir sekans PCR ürünü üzerine 50 µl eklendi ve oda sıcaklığında 10dk bekletildi

2. 5400rpm de 10dk santrifüj yapılır. Tüp ters çevrilip içindeki sıvı boşaltıldı

3. Tüpün içerisine 50 µl %70'lik alkol eklendi

4. 5400rpm'de 5dk santrifüjleme işleminden sonra tüp ters çevrilip içerik döküldü

5. Tüpün içerisine 15 µl formamid eklendi

6. DNA dizi analiz cihazına yerleştirildi.

4.9. DNA dizi analizi

ABI 3130XL Genetic Analyzer cihazında gerçekleştirilmiştir

Elde edilen sekans sonuçları, FinchTV programı ile okunmuştur. Okunan her bir dizilim MEGA 4.1 programına yüklenmiştir. Hastalardan elde edilen dizilimlerin yanı sıra farklı genotiplere ait referans dizilimlerde programa yüklenmiştir. Buna göre filogenetik ağaç çıkarılmıştır. Filogenetik ağaç sonuçlarına göre 59 hastanın tümünün HCV genotip 1b'ye ait olduğu saptanmıştır. Daha sonra 59 hastanın DNA dizilimleri ve HCV genotip 1b dizilimi karşılaştırılıp mutasyon analizi yapılmıştır.

İstatiksel analizler, SPSS 17.0 programında parametrik olmayan ki-kare testine göre yapılmıştır.

BÖLÜM 5

BULGULAR

Genotiplendirme için HCV BLAST SEARCH programı kullanılmıştır. Ayrıca 59 örneğe ait dizilim ile GENBANK'tan alınan farklı genotiplere ait AB056525-1b, AB056524-1b, HM042084-3b, HM042083-3b, FJ896370-1a, FJ896369-1a, AB056550-1c, AB056546-1c, AB056569-2a, AB056564-2a ve AF339212-3a referans dizilimlerinin filogenetik ağacı çıkarılmıştır (Şekil 5.1.1.). HCV BLAST SEARCH ve filogenetik ağaca göre hastaların tümünde Hepatit C virüsünün 1b genotipine ait olduğu saptanmıştır.

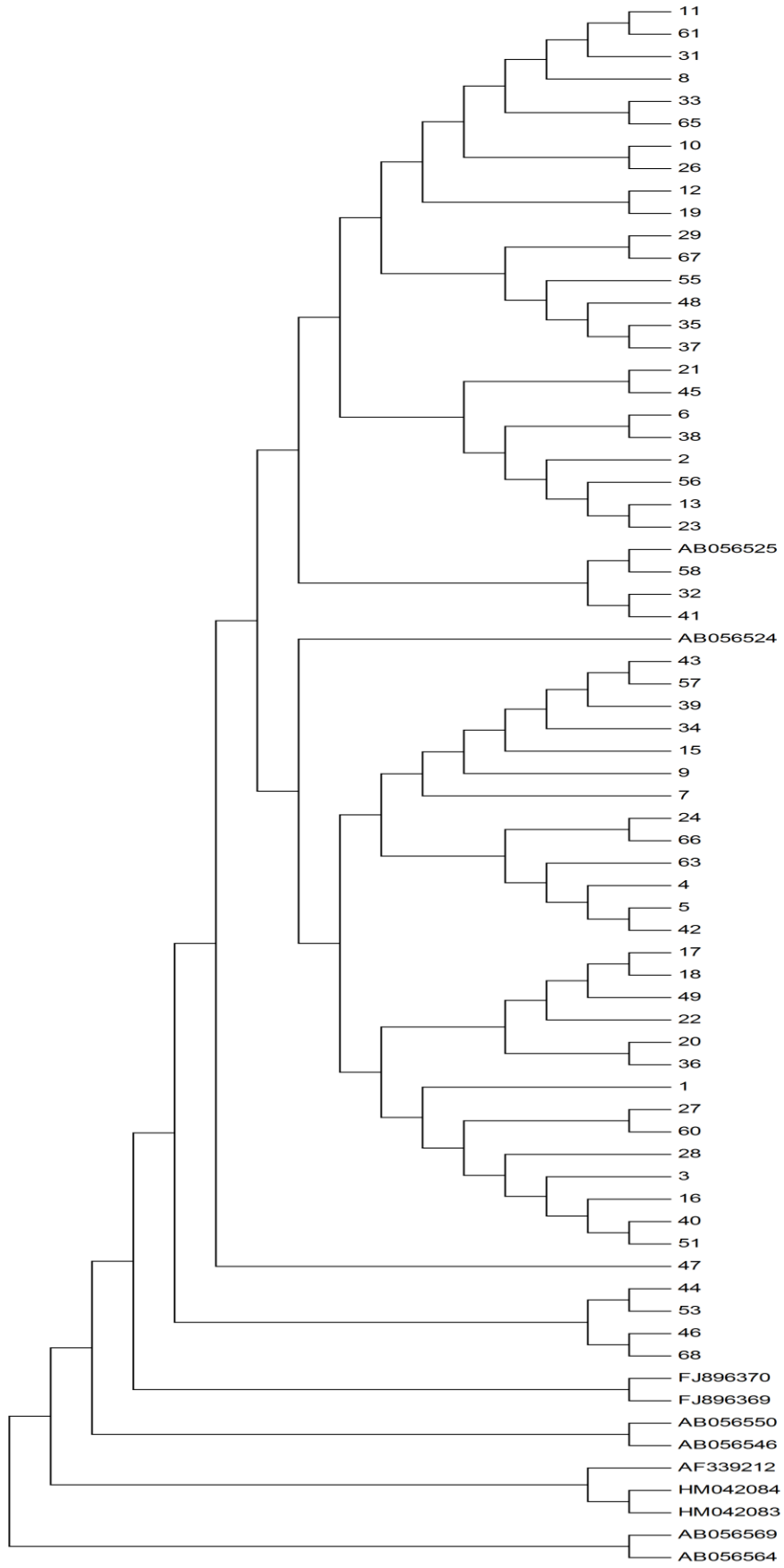
Hepatit C virüsü NS5A geninin PKR-bağlama bölgesi (2209-2274) ve ISDR bölgesinde (2209-2248) bulunan aminoasit değişiklikleri, şekil 5.1.2.'de verilmiştir. HCV Genotip 1b izolatları için NS5A-CR (GENBANK) Referans Dizilimi ile karşılaştırma yapılarak mutasyonlar belirlenmiştir. Şekil5.1.2.'ye bağlı kalınarak Tablo 5.1. ve Tablo 5.2. oluşturulmuştur. Ayrıca, Uluslararası onaylanan aminoasit üçlü kod dizileri esas alınarak, mutasyonların yol açtığı aminoasit değişimleri belirlenmiştir. Mutasyon ve aminoasit değişimlerine ait bulgular bir arada sunuldu (şekil 5.1.4. - şekil 5.1.8.). Takip edilen tedavi sonuçlarına göre 59 hastanın 29'u (%49,15) tedaviye kalıcı virolojik yanıt vermiş, 30'u (%50,85) tedaviye yanıtız kalmıştır. Tablo 5A'ya göre ISDR (2209-2248) bölgesinde mutasyon sayısına göre 59 hastanın 38'i (%64,4) doğal tip (mutasyonsuz), 20'si (%33,9) orta tip (1-3 mutasyonlu) ve 1'i (%1,7) mutant tip (4 ve üzeri mutasyonlu) olarak saptanmıştır. Tablo 5B'ye göre PKRBD (2209-2274) bölgesinde bulunan mutasyon sayısına göre 59 hastanın 43'ü (%72,88) orta tip ve 16'sı (%27,12) mutant tip olarak saptanmış olup bu bölge açısından doğal tip saptanmamıştır.

Tablo 5.1. ISDR bölgesindeki Mutasyon sayısı ile Tedaviye yanıt Karşılaştırması

			Mutasyon sayısı			Toplam
			Doğal tip	Orta tip	Mutant tip	
Yanıt tipi	Kalıcı Virolojik Yanıt	SAYISI	17	11	1	29
		% Yanıt tipi	58,6%	37,9%	3,4%	100,0%
		% Mutasyon sayısı	44,7%	55,0%	100,0%	49,2%
	Yanıtsız	SAYISI	21	9	0	30
		% Yanıt tipi	70,0%	30,0%	,0%	100,0%
		% Mutasyon sayısı	55,3%	45,0%	,0%	50,8%
Toplam		SAYISI	38	20	1	59
		% Yanıt tipi	64,4%	33,9%	1,7%	100,0%
		% Mutasyon sayısı	100,0%	100,0%	100,0%	100,0%

Tablo 5.2. PKRBD bölgesindeki Mutasyon sayısı ile Tedaviye yanıt Karşılaştırması

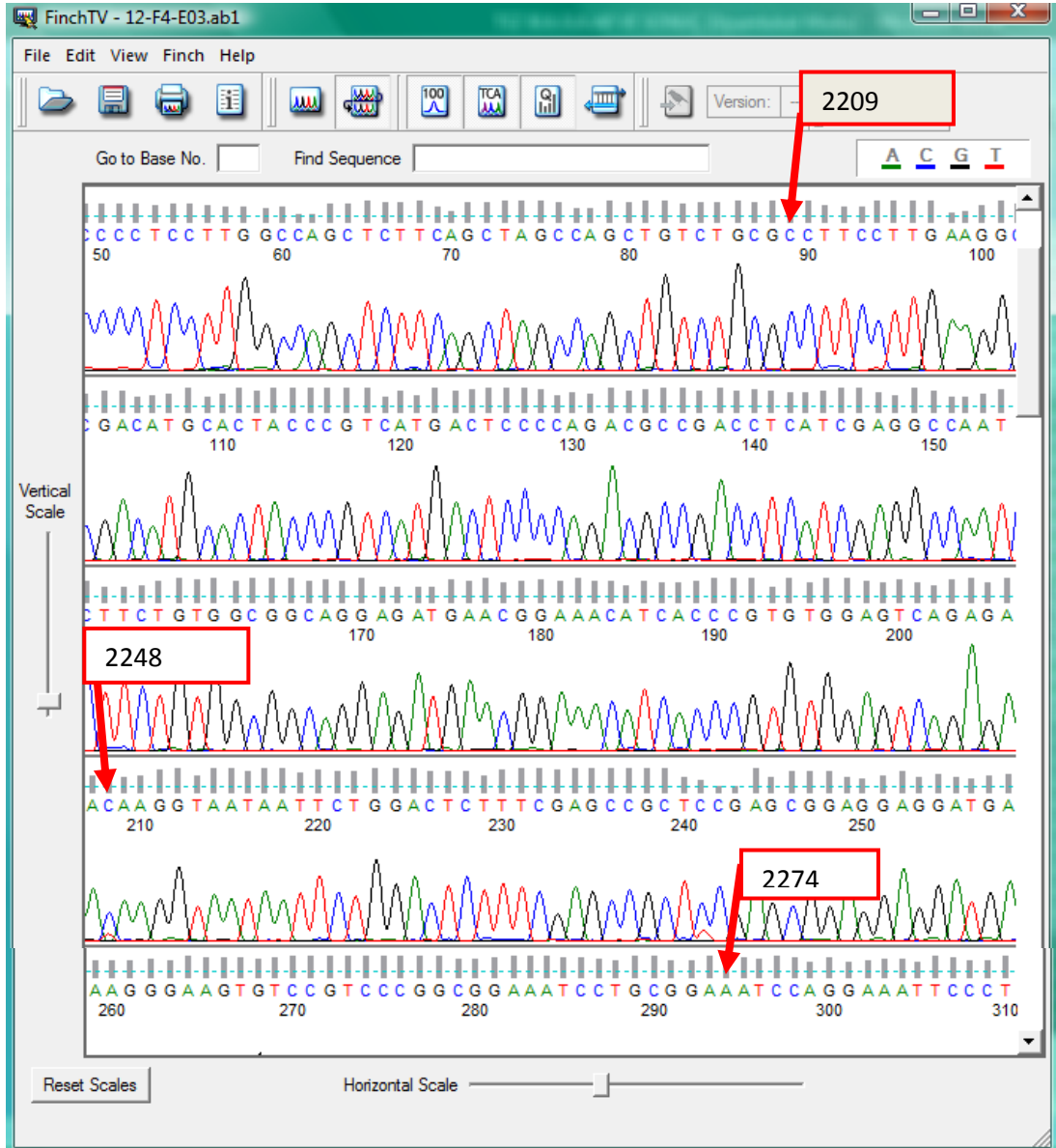
			Mutasyon sayısı		Toplam
			Orta tip	Mutant tip	
Yanıt tipi	Kalıcı Virolojik yanıt	SAYISI	21	8	29
		% Yanıt tipi	72,4%	27,6%	100,0%
		% Mutasyon sayısı	48,8%	50,0%	49,2%
	Yanıtsız	SAYISI	22	8	30
		% Yanıt tipi	73,3%	26,7%	100,0%
		% Mutasyon sayısı	51,2%	50,0%	50,8%
Toplam		SAYISI	43	16	59
		% Yanıt tipi	72,9%	27,1%	100,0%
		% Mutasyon sayısı	100,0%	100,0%	100,0%



Şekil 5.1.1. Filogenetik Ağaç

#REFERANS	Protein kinaz Bağlama Domaini (PKR-BD) (2209-2274)								TEDAVİYE ALINAN
	İnterferona Hassaslığı belirleyen bölge (ISDR) (2209-2248)								YANIT (mutasyon)
	P	SLKATCTTHH	DSPDADLIEA	NLLWRQEMGG	NITRVESENK	VVILDSFDPL	RAEEDEREVS	LPAEI	
#5	V....	KVY (1)
#7	V....	KVY (1)
#27	V....	KVY (1)
#63	V....	KVY (1)
#34	V....	KVY (1)
#43	V....	KVY (1)
#42	V....	KVY (1)
#32	I....	KVY (1)
#9	V....	KVY (1)
#36M. V....	KVY (2)
#20M. V....	KVY (2)
#21G. V....	KVY (2)
#67	.	.A.	V....	KVY (2)
#46	.	.A.E. V....	V....	KVY (3)
#2	.	.R.K. I....	I....	KVY (3)
#41	.R.	.	V.	I....	KVY (3)
#24	V.	.	I. A....	KVY (3)
#61	I.	.	.M. V....	KVY (3)
#33	I.	.	.M. V....	KVY (3)
#22	I.	.	.M. V....	KVY (3)
#8	.	.R.	.	.	.	I.	.	.M. V....	KVY (3)
#31	.	.R.	.	.	.	I.	.	.M. V....	KVY (4)
#37	.A.	E.	Q.	V....	KVY (4)
#12	.	R.	.	N.	.	I.	E.	V....	KVY (5)
#10	I.	P.	K.I. V....	KVY (5)
#3	.R.	G.	.	A.	.	V.	.	N.I. V....	KVY (7)
#51	.R.	G.	.	A.	.	V.	.	N.I. V....	KVY (7)
#40	.R.	G.	.	A.	.	V.	.	N.I. V....	KVY (7)
#49	.	N.	LAF.	W.K.	.	I.M.	.	V....	KVY (9)
#4	V....	YS (1)
#39	V....	YS (1)
#38	V....	YS (1)
#1	V....	YS (1)
#15	V....	YS (1)
#57	V....	YS (1)
#35	V....	YS (1)
#48	V....	YS (1)
#58	V....	YS (1)
#60	V....	YS (1)
#55	I....	YS (1)
#47	I. A....	YS (2)
#29	.	A.	V....	YS (2)
#53	E.	V....	YS (2)
#68	E.	V....	YS (2)
#44	P.	E.	V....	YS (3)
#28	.R.	I. V....	YS (3)
#66	.	R.	I.	V....	YS (3)
#45	IV.	.	V....	YS (3)
#26	I.	M.	V....	YS (3)
#11	I.	M.	V....	YS (3)
#65	I.	M.	V....	YS (3)
#17	.	R.	.	.	.	I.	M.	V....	YS (4)
#18	.	R.	.	.	.	I.	M.	V....	YS (4)
#6	.	E.	.	.	.	V.	M.	V....	YS (4)
#13	V.	E.	I. A....	YS (4)
#56	V.	E.	I. A....	YS (4)
#23	.	R.	.	.	.	V.	E.	I. A....	YS (5)
#19	.	R.	.	N.	.	I.	E.	Q. V....	YS (6)
#16	.R.	G.	.	A.	.	V.	.	N.I. V....	YS (7)

Şekil 5.1.2. 59 Hastaya ait HCV NS5A geninde bulunan ISDR (2209-2248) ve PKRBD (2209-2274) aminoasit dizilim ve referans dizilim NS5A-CR (GENBANK) (KVY: Kalıcı virolojik yanıt, YS: Yanıtsız)



Şekil 5.1.3. PKR-BD (2209-2274) bölgesi dizi analizi (Hasta no: 12)

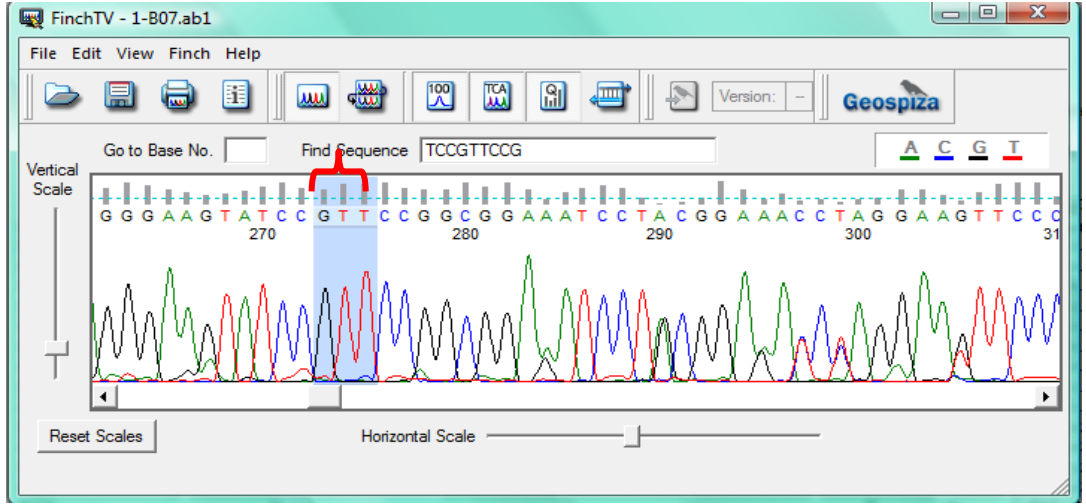
Kalıcı virolojik yanıt görülen hastaların PKRBD bölgesinde toplam 97 aminoasit değişimi gözlenmiştir. Bu değişimlerin 25'i (%27,83) ISDR bölgesinde görülmüştür.

Tedaviye yanıt vermeyen hastaların PKRBD bölgesinde toplam 78 aminoasit değişimi gözlenmiş olup bu değişimlerin 12'si (%15,38) ISDR bölgesinde saptanmıştır.

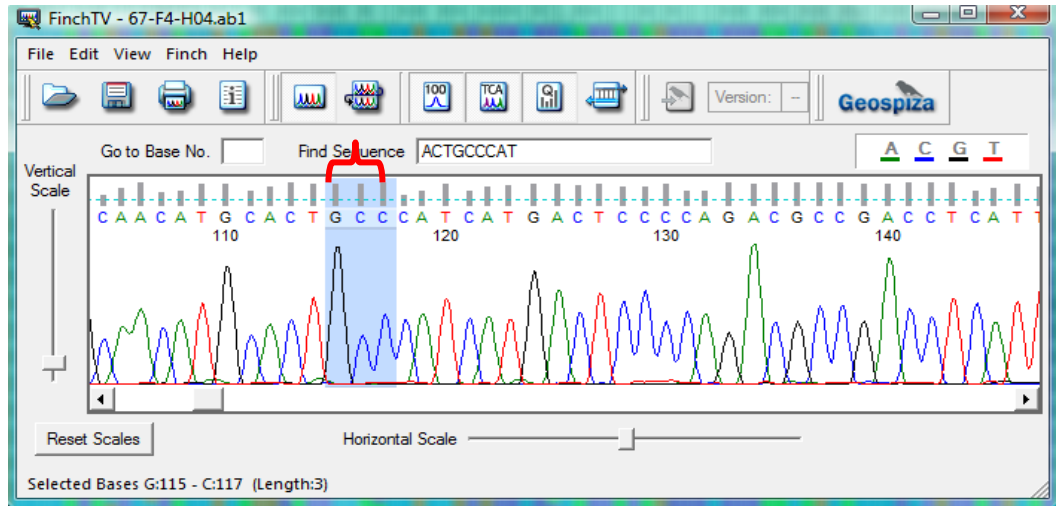
65 aminoasit genişliğinde olan PKRBD (2209-2274) bölgesinin 24 aminoasitinde değişiklik görülmüştür. Bu değişimler ; 2212., 2214., 2216., 2217., 2218., 2220., 2224., 2225., 2226., 2234., 2236., 2237., 2238., 2251., 2252., 2253., 2255., 2257., 2260., 2263., 2264., 2266., 2268. ve 2270. kodonlarda belirlenmiştir.

Toplam 39 aminoasit genişliğinde olan ISDR (2209-2248) bölgesinin ise 13 aminoasitinde değişim görülmüştür.

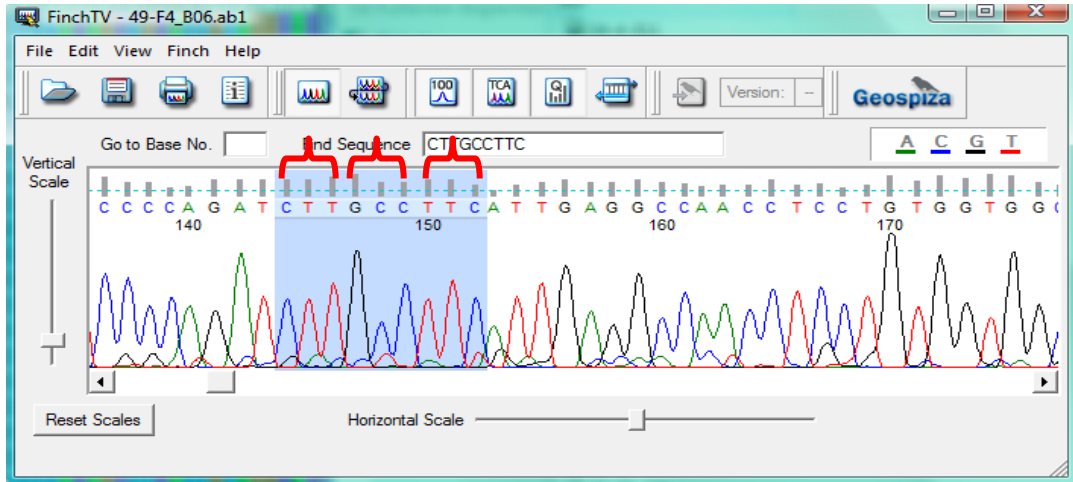
ISDR bölgesinde görülen en sık değişiklik 2218. aminoasitte CAT (His)'den CGT (Arg/R)'ye değişim şeklindedir. PKRBD bölgesinde görülen en sık değişiklik ise 2270. aminoasitte olup CTT (Leu)'den GTT (Val)'ye değişim şeklindedir.



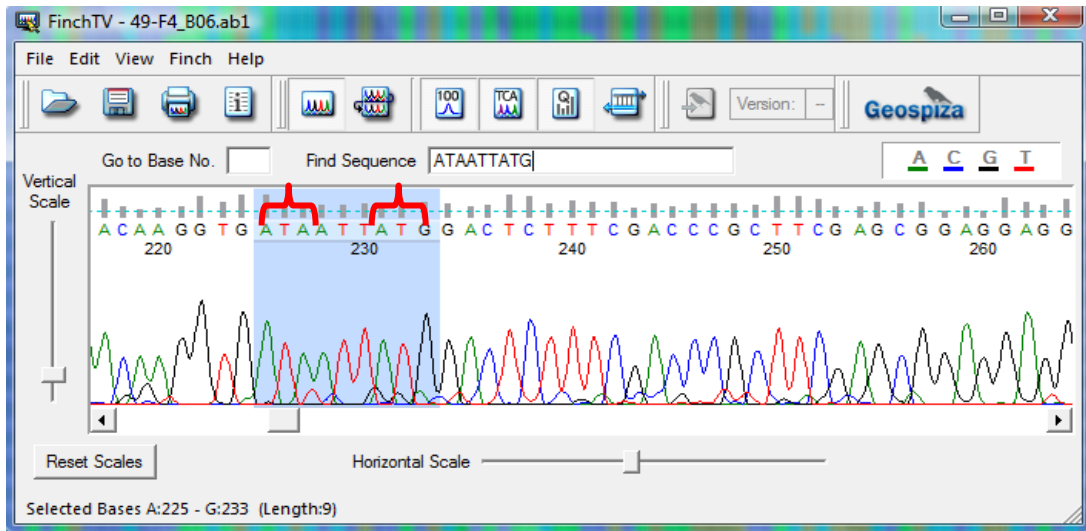
Şekil 5.1.4. L2270V mutasyonu (Hasta no: 1). CTT (Leu) → GTT (Val)



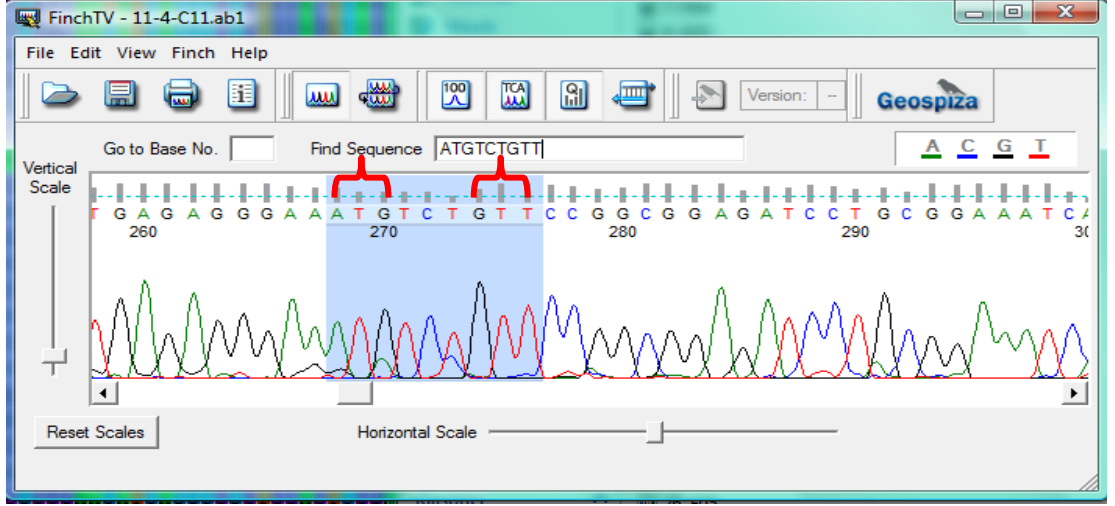
Şekil 5.1.5. T2216A mutasyonu (Hasta no: 67) ACC (Thr) → GCC (Ala)



Şekil 5.1.6. A2223L, A2224A ve L2225P mutasyonları (Hasta no: 49) Sırasıyla;
GCC (Ala)→ CTT (Leu), GAC (Asp) →GCC (Ala), CTC (Leu) → TTC (Phe)



Şekil 5.1.7. V2251I ve L2253M mutasyonları (Hasta no: 49)
GTA (Val)→ ATA (Ile), CTG (Leu) → ATG (Met)



Şekil 5.1.8. V2268M ve L2270V mutasyonları (Hasta no: 11).

GTA (Val) → ATG (Met), CTT (Leu) → GTT (Val)

Kodon 2212’de gözlemlenen 6 aminoasit değişiminin hepsi Lys (K)’den Arg (R)’a şeklindedir. Kodonda 2219’da gözlemlenen 9 aminoasitin değişiminin hepsi His (H)’den Arg (R)’ye şeklindedir. ISDR’nin karboksi terminal bölgesinde bulunan 2251. kodonda gözlenen 15 aminoasit değişimi Val (V)’den Ile (I)’ye şeklinde, 2252.kodonda görülen 10 aminoasit değişiminin hepsi Ile (I)’den Val (V)’e şeklindedir.

2270. kodonda meydana gelen değişim 59 hastanın 58’inde saptanmış olup bu değişim genellikle Leu (L)’dan Val (V)’e değişim şeklindedir.

BÖLÜM 6

SONUÇ ve TARTIŞMA

Bu çalışmada, Hepatit C virüsünün NS5A geninde bulunan PKR-BD (Protein Kinaz bağlama Domaini)'nin nükleotit diziliminin karşılaştırmalı analizleri ile bu bölgede meydana gelen yanlış anlamlı mutasyonlar (amino asit değişikliğine neden olan baz değişikliği) saptanmıştır. Hastaların İnterferon alfa+Ribavirin kombinasyon tedavisine verdikleri yanıtta göre sınıflandırılmış ve mutasyon sayıları ile karşılaştırılmıştır. Çalışmamızda 65 aminoasit genişliğinde olan PKR-BD (2209-2274) bölgesinin 24 aminoasitinde ve 39 aminoasit genişliğinde olan ISDR (2209-2248) bölgesinin 13 aminoasitinde değişim görülmüştür. ISDR bölgesinde görülen en sık değişiklik 2218. aminoasitte CAT (His)'den CGT (Arg/R)'ye değişim şeklindedir. Aynı bulgu, Enomoto ve arkadaşlarının (1995) yaptığı çalışmada da saptanmıştır. PKRBD bölgesinde görülen en sık değişiklik ise 2270. aminoasitte olup CTT (Leu)'den GTT (Val)'ye değişim şeklindedir. Çalışmada doğal tip (mutasyonsuz) ISDR dizilimli tedavi yanıtı olmayan hastaların oranının, tedaviye yanıt alınan hastaların oranından daha fazla olduğu saptanmıştır. Bu oran, orta tip (1-3 mutasyon) ISDR dizilimli yanıt alınamayan hastalarda yanıt alınanlara göre daha düşük oranda olduğu saptanmıştır. PKR-bağlama bölgesinde göre doğal tipe rastlanamamış olup orta tip ve mutant tipte tedaviye yanıt alınması ile ilişkili önemli bir farklılık saptanmamıştır (P=0,937).

ISDR bölgesi incelendiğinde ise, tedaviye yanıtı olmayan hastalarda mutant tip saptanamazken HCV'lerin %30 (9)'unun orta tip, %70 (21)'i doğal tip olduğu görülmektedir. Bu bölgeye göre kalıcı virolojik yanıt alınamayan hastalardaki HCV'nin %70'ini, kalıcı virolojik yanıt alınan hastalardaki HCV'nin ise %58,6'sını doğal tipin oluşturduğu saptanmıştır. Bulgularımıza göre orta tip 21 hastanın %57.15 (12)'inde kalıcı virolojik yanıt görülürken %42.85(9)'inde kalıcı virolojik yanıt görülmemiştir. Doğal tip 38 hastanın %44.7 (17)'sinde kalıcı virolojik yanıt görülürken %55.3 (21)'ünde kalıcı virolojik yanıt görülmediği saptanmıştır. Bu bölge

ile ilgili olarak orta tip ve doğal tip kalıcı virolojik yanıt açısından değerlendirildiğinde doğal tipe göre %12.45 oranında orta tip daha yüksek olduğu saptanmış olması mutasyon ile kalıcı virolojik yanıt arasındaki ilişkiyi pozitif olarak desteklediği söylenebilir.

Ülkemizde Aygün ve ark. İzmir de yapmış oldukları çalışmalarında orta ve mutant tip ISDR'ye sahip hastaların tedaviye biyokimyasal yanıt verme olasılıklarının daha yüksek olduğunu belirtmişlerdir. ISDR bölgesindeki mutasyon sayıları ile tedaviye yanıt şekli arasında ilk kez Enomoto ve arkadaşları (1995) tarafından güçlü bir ilişki olduğu ileri sürülmüştür. Yunanistan'da Stratidaki ve ark. yaptıkları araştırma sonuçlarına göre biyokimyasal yanıtı hasta grubunun yanıtsız hasta grubuna göre amino asit değişim sayısının daha yüksek olduğunu rapor etmişlerdir (Aygün, 2003; Stratidaki, 2001). Yine Japonya Yoshioka K. Ve ark.'larını yapmış oldukları çalışma sonuçlarına göre orta tip ISDR hastalarının biyokimyasal yanıtı %53'ü doğal tip hastaların ise %20 olduğunu rapor edilmiştir. Bu çalışmalar ile bizim bulgularımız uyumlu sonuçlar içermektedir.

Japonya'da yapılan çalışmalar genel olarak tedaviye yanıt ve ISDR mutasyonları arasında güçlü ilişkiyi onaylıyordu. Avrupa ve Amerika'dan gruplar başlangıçta IFN-alfa hassaslığında ISDR mutasyonlarının önemini doğrulayamamıştır. Sonraki çalışmalarda, tedaviye yanıt ile ISDR mutasyonlarının ilişkisi, Japonya, Avrupa ve Amerika'da farklı gruplar tarafından araştırılmıştır. Zeuzem ve arkadaşları (1996) tarafından Avrupalı HCV'li hastalarda NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ ve interferon-alfa yanıt arasındaki ilişkiye dair yapılan çalışmada IFN-alfa ya başlangıç veya kalıcı yanıt HCV-1a veya HCV-1b alt tipli kronik olarak enfekte Avrupalı hastalarda, NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ bölgesinde aminoasit değişimlerinin sayısı ile ilişkili olmadığı ve ek olarak NS5A₂₂₀₉₋₂₂₄₈ de aminoasit değişimlerinin sayısı ile tedavi öncesi HCV RNA serum seviyesinin ilişkili olmadığı ortaya konmuştur. Bu tez çalışmasında da, Zeuzem ve arkadaşlarının (1996) çalışma sonuçlarına benzer şekilde HCV NS5A geni ISDR bölgesindeki mutasyonların sayısı ile tedaviye yanıt arasında istatistiksel olarak anlamlı bir ilişki saptanamamıştır (P=0,369). Enomoto ve arkadaşlarının (2000) yaptıkları çalışmada buldukları sonuçlar gösteriyordu ki; ISDR deki mutasyonlar sıklıkla meydana gelmemektedir. Bu da İnterferon hassaslığının, her bir hastada hastalığın doğal seyri boyunca çok fazla değişmediğini göstermektedir. Coğrafi farklılıklara dayanan meta-analiz çalışmaya göre; ISDR dizilim tipleri ve kalıcı virolojik yanıt

arasında açık pozitif ilişki Japonların yanı sıra Avrupalı hastalar içinde de gösterilmiştir. Ancak, mutant ISDR tip ile enfekte olmuş Japon hastalarda kalıcı virolojik yanıt oranı, Avrupalı hastalarla karşılaştırıldığında daha yüksektir. Kalıcı virolojik yanıt oranı, ISDR içinde mutasyon sayısı arttıkça artmaktadır. Ama bu ilişkinin, Japon hastalarda daha belirgin olduğunu öne sürülmüştür (Pascu vd, 2004).

Türkiye’de Aslan ve ark. tarafından yapılan bir çalışmaya göre ise, Hepatitis C genotip 1b ile enfekte Türk hastaların interferon tedavisine verdiği cevap NS5A geninin ISDR bölgesindeki mutasyonlarla ilişkili bulunmamıştır (Aslan vd., 2004).

İspanya’da Rueda ve arkadaşları (2008) tarafından yapılan çalışmada; HCV Genotip 1’in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR ve NS5A-V3 deki mutasyonlar ve pegİnterferon+ribavirin tedavi yanıtı arasındaki ilişki araştırılmıştır. PKRBD bölgesinde 4 veya daha fazla mutasyon, kalıcı virolojik yanıt ve erken virolojik yanıt ile ilişkilidir. Ancak hızlı virolojik yanıt ile ilişkili değildir. ISDR’deki farklılıklar, istatistiksel olarak önemli olduğu bulunmuştur.

Çalışmamızda PKR-bağlama bölgesinde (PKR-BD) bulunan Tedaviye kalıcı virolojik yanıt alınan ve yanıt alınamayan hastalarda PKR-BD bölgesine göre doğal tip’e (mutasyonsuz) rastlanılmamıştır. Yine aynı bölgeye göre tedaviye yanıt tiplerinin her ikisinde orta tip (1-3 mutasyon), mutant tipe (4 ve üzeri mutasyon) göre daha fazla görülmüştür. Bu bölge açısından orta tip ve mutant tip kalıcı virolojik yanıt açısından değerlendirildiğinde istatiki olarak anlamlı bir ilişki saptanamıştır.

Bu çalışmanın sonuçlarının aksine kalıcı virolojik yanıt alınan hastalar ve yanıt alınamayan hastalar karşılaştırıldığında PKR-BD bölgesindeki mutasyon sayısı ile orta tip mutasyon sayısında istatistiki olarak anlamlı önemli farklılık bulduklarını rapor ederken (Gale M vd.,1998; Sarrazin , 2000) Melissa ve arkadaşları (2002) tarafından yapılan bir çalışmada; Kalıcı virolojik yanıt alınan hastalar ve yanıt alınamayan hastalar ile PKR-BD bölgesindeki mutasyon sayısı karşılaştırdıklarında orta tip mutasyon sayısında ortaya konulmuş bu ilişkiyi doğrulamadığını rapor etmiştir. Bu bölge ile ilgili bulgularımız Gale M (1998) ve Sarrazin C(2000) ‘nin çalışmaları ile paralellik göstermezken Melisa. D(2002) ‘nin çalışmaları ile uyumlu olduğu görülmektedir.

KAYNAKLAR

- Abacıoğlu, YH., Davidson, F., Tuncer S. (1995) The distrubition of hepatitis C virus genotype in Turkish patients. *J Viral Hepat* 2: 297-301.
- Ahmed, M.M., Shaw, J.C. (1995). Isolation and culture of biliary epithelial cells (BEC) from explanted Hepatitis c virus (HCV) infected liver *J.Hepatology*;23: 97A.
- Aslan, N., Bozdayı M., etinkaya, H., Sarıoğlu, M., Trkay, C., Bozkaya, H., Karayalın, S., Yurdaydın, C., Uzunalimoğlu, . (2004). The mutations in ISDR of NS5A gene are not associated with response to interferon treatment in Turkish patients with chronic hepatitis C virus genotype 1b infection. *Turk J Gastroenterol*; 15 (1): 21-26
- Aygen, B. (2006). Hepatit C In: Őentürk H. (eds) dahili tıp bilimleri gastroenterohepatoloji. *Türkiye klinikleri Journal of Medical Sciences*. Cilt/vol: 2 sayı/no: 16. Syf: 21-30.
- Aygün, N. (2003). İnterferon+Ribavirin tedavisinde Virolojik yanıtısız Kronik Hepatit C hastalarında genotip 1b virüs genomunun interferona hassasiyeti belirleyici (ISDR)dizisinde mutasyon analizi. *Yüksek lisans tezi*. Dokuz Eylül Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstits. 82syf. İzmir
- Bartenschlager, R. (2005). The Hepatitis C virus replication system: from basic research to clinical application. *J hepatol*. 43: 210-6
- Bartenschlager, R., Frese MPietschmann, T. (2004). Novel insights into hepatitis C virus replication and persistence. *Adv Virus Res* 63: 71-180.
- Behrens, SE., Tomei, L., DeFrancesco, R. (1996) Identification and properties of the RNA-dependent RNA polymerase of hepatitis C virus. *EMBO J* 15: 12-22.

- Bekisz, J., Schmeisser, H., Hernandez, J., Goldman, N. D. & Zoon, K. C. (2004). Human interferons alpha, beta and omega. *Growth Factors* 22, 243–251
- Berg, T., C. Sarrazin, E. Herrmann, H. Hinrichsen, T. Gerlach, R. Zachoval, B. Wiedenmann, U. Hopf, and S. Zeuzem. (2003). Prediction of treatment outcome in patients with chronic hepatitis C: significance of baseline parameters and viral dynamics during therapy. *Hepatology* 37: 600–609
- Blight, K. & Gowans, E. (1995). In situ hybridization and immuno-histochemical staining of hepatitis C virus products. *Viral Hepatitis Reviews* 1, 143-155
- Bowden, DS., Berzsényi, MD. (2006). Chronic hepatitis C virus infection: genotyping and its clinical role. *Future Microbiol* 1: 103-12.
- Brass, V., Moradpour, D., Blum, HE. (2006). Molecular Virology of Hepatitis C Virus (HCV) *Int J Med Sci* 2006;3: 29-34.
- Brillet, R., Penin, F., Hezode, C., Chouteau, P., Dhumeaux, D., Pawlotsky, J-M (2007). The Nonstructural 5A Protein of Hepatitis C Virus Genotype 1b Does Not Contain an Interferon Sensitivity–Determining Region. *JID*: 195 syf: 432-441
- Campel, C., Pol, A., Dal, M.G., Valentini, F. (2002) Seroprevalence, viremia and genotype distribution of hepatitis C virus: a community-based population study in northern Italy. *Infection* 30: 7-12
- Castillo, I., Rodríguez-Iñigo, E., Bartolomé, J., de Lucas, S., Ortíz-Movilla, N., López-Alcorocho, J.M., Pardo, M., Carreño, V. (2005). Hepatitis C virus replicates in peripheral blood mononuclear cells of patients with occult hepatitis C virus infection. *Gut*, May;54 (5): 682-5
- 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: 359–62.

- Colin, C., Lanoir, D., Touzet, S., Meyaud-Kraemer, L., et al. (2001). Sensitivity and specificity of third-generation hepatitis C virus antibody detection assays: an analysis of the literature. *J Viral Hepat* 8 (2): 87-95
- Cormier, E.G., Tsamis, F., Kajumo, F., Durso, R.J. (2004). CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 101: 7270-7274
- Davis, G.L. (1999); Hepatitis C genotypes and quasispecies. *Am J Med* 107: 21-6.,
- Di Bisceglie, A.M. (2000). Natural history of hepatitis C: its impact on clinical management. *Hepatology* 31: 1014-1018.
- Dominguez, A., Bruguera, M., Vidal, J., Plans, P., Salleras, L. (2001). Community-based seroepidemiological survey of HCV infection in Catalonia, Spain. *J Med Virol*; 65: 688-693.
- Dorman, S.E., Holland, S.M. (2000). Interferon-gamma and interleukin-12 pathway defects and human disease. *Cytokine Growth Factor Rev*;11: 321-333
- Dusheiko, G., Schmilovitz-Weiss, H., Brown, D., McOmish, F., Yap, P.L., Sherlock, S., McIntyre, N., Simmonds, P. (1994). Hepatitis C virus genotypes: an investigation of type-specific differences in geographic origin and disease. *Hepatology* 19: 13-18
- Elazar, M., Liu, P., Rice, C.M., et al. (2004). An N-terminal amphipathic helix in hepatitis C virus (HCV) NS4B mediates membrane association, correct localization of replication complex proteins, and HCV RNA replication. *J Virol*, 78: 11393-11400.
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (1995) Comparison of Full-length Sequences of Interferon-sensitive and Resistant Hepatitis C Virus 1b. *J Clin Invest.* 224-230
- Enomoto, N., Sakuma, I., Asahina, Y., Kurosaki, M., Murakami, T., Yamamoto, C., Ogura, Y., Izumi, N., Marumo, F., Sato, C. (1996) Mutations in the

nonstructural protein 5a gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis c virus 1b infection. *N Engl J Med.* Vol. 334 No. 2 syf: 77-81.

Forns, X., Bukh, J. (1999). The molecular biology of hepatitis C virus, genotypes and quasispecies. *Clinics in Liver Diseases*; 3: 693-716

Franciscus, A. (2006). Hepatitis C Diagnostic Tests. Hepatitis C Support Project. HCSP. Version 2.0. February

Frank, C., Mohamed, M.K., Strickland, G.T., Lavanchy, D., Arthur, R.R., Magder, L.S., El Khoby, T., Abdel-Wahab, Y., Aly Ohn, E.S., Anwar, W., Sallam, I. (2000). The role of parenteral antischistosomal therapy in the spread of hepatitis C virus in Egypt. *Lancet*; 355: 887-891

Fried, M.W. (2002). Side effects of therapy of hepatitis C and their management. *Hepatology*; 36: S237-S244

Fried, M.W., Shiffman, M.L., Reddy, K.R., Smith, C., Marinos, G., Goncales, 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

Gale, M., Blakely, C.M., Kwieciszewski, B., Tan, S.L., Dossett, M., Tang, N.M., Korth, M.J., Polyak, S.J., Gretch, D.R., Katze, M.G. (1998): Control of PKR protein kinase by hepatitis C virus nonstructural 5A protein: Molecular mechanisms of kinase regulation. *Mol Cell Biol* 18: 5208–5218.

Gale, M. Jr. (2003). Effector genes of interferon action against hepatitis C virus. *Hepatology* 37, 975–978

Gilmour, K. C. & Reich, N. C. (1995). Signal transduction and activation of gene transcription by interferons. *Gene Expr.* 5, 1–18

Grakoui, A., McCourt, D.W., Wychowski, C., Feinstone, S.M., Rice, C.M. (1993). Characterization of the hepatitis C virus-encoded serine proteinase:

- Determination of proteinase-dependent polyprotein cleavage sites. *J Virol* 67: 2832-43.
- Gretton, S.N., Taylor, A.I., McLauchlan, J. (2005). Mobility of the hepatitis C virus NS4B protein on the endoplasmic reticulum membrane and membrane-associated foci. *J Gen Virol*. 86: 1415-1421.
- Hadziyannis, S.J., Sette, H., Morgan, Jr.T.R., Balan, V., Diago, M., Marcellin, P., Ramadori, G., Bodenheimer, H.C., Bernstein, D., Rizzetto, M., Zeuzem, S., Pockros, P.J., Lin, A., Ackrill, A.M. (2004). Peginterferon-alfa2a and ribavirin combination therapy in chronic hepatitis C. A randomized study of treatment duration and ribavirin dose. *Ann. Intern. Med.* 140: 346–355
- Hahm B, Han DS, Back SH, Song OK, Cho MJ, Kim CJ, (1995). NS3-4A of hepatitis C virus is a chymotrypsin-like protease. *J Virol*; 69: 2534-9.
- Hay, A.J., Wolstenholme, A.J., Skehel, J.J., Smith, M.H. (1985). The molecular basis of the specific anti-influenza action of amantadine. *EMBO J.* 4: 3021–3024
- Heim MH. (2000). Intracellular signalling and antiviral effects of interferons. *Dig Liver Dis*;32: 257-263
- Holland, J.J., De La Torre, J.C., Steinhauer, D.A. (1992). RNA virus populations as quasispecies. *Current Topics in Microbiology and Immunology* 176, 1-20
- Jaeckel, E., Cornberg, M., Wedemeyer, H., Santantonio, T., Mayer, J., Zankel, M., Pastore, G., Dietrich, M., Trautwein, C., Manns, M.P. (2001) Treatment of acute hepatitis C with interferon alfa-2b. *N Engl J Med*; 345: 1452-1457
- Jordan J.F., Jay, H.H. (2005) Mechanism of action of interferon and ribavirin in treatment of hepatitis C. *NATURE*. Vol 436.18.

- Kanazawa, Y., Hayashi, N., Mita, E. (1994). Influence of viral quasispecies on effectiveness of interferon therapy in chronic hepatitis c patients. *Hepatology*; 20: 1121-1130
- Kapadia, S.B., Barth, H., Baumert, T. (2007). Initiation of hepatitis C virus infection is dependent on cholesterol and cooperativity between CD81 and scavenger receptor B type I. *J Virol* 81: 374-383
- Kato, N., Hijikata, M., Ootsuyama, Y., Nakagawa M, Ohkoshi S, Sugimura T, Shimotohno K. (1990). Molecular cloning of the human hepatitis C virus genome from Japanese patients with non-A, non-B hepatitis. *Proc Natl Acad Sci USA* 87:9524–8.
- Koff, RS. Hepatitis C. *In: Gorbach SL, Bartlett JG, Blacklow NR, eds. Infectious Diseases*. 3rd ed. Philadelphia: Lippincott Williams (2004): 779-84, Sherlock S, Dooley J. *Diseases of the Liver and Biliary System*. 11th ed. London. 305-19.
- Komurian-Pradel F., Rajoharison A., Berland, J.L., Khouri, V., Perret, M., Van Roosmalen, M., Pol, S., Negro, F., Paranhos-Baccalà, G. (2004) Antigenic relevance of F protein in chronic hepatitis C virus infection. *Hepatology*, 40: 900-909.
- Kupfer B. (2010) HCV-Virology. *In: Stefan Mauss, Thomas Berg, Jürgen Rockstroh, Christoph Sarrazin, Heiner Wedemeyer (eds). Hepatology*. Second edition. 487syf.
- Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B., Strauss, S.E., ed. (Philadelphia: Lippincott-Raven), pp. 991-1042.
- Lange, C., Sarrazin, C. (2010). Acute and Chronic Hepatitis C Diagnostic tests. Syf: 159-171. Mauss S., Berg T., Rockstroh J., Sarrazin C., Wedemeyer H. *Hepatology*. 487syf.
- Lavanchy, D. (2009); The global burden of hepatitis C. *Liver International* 29 (s1): 74–81

- Lee, S.S., Abdo, A.A. (2003) . Predicting antiviral treatment response in chronic hepatitis C: how accurate and how soon?. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*. 51, 487–491.
- Lindenbach BD, Evans MJ, Syder AJ, Wölk B, Tellinghuisen TL, Liu CC, Maruyama T, Hynes RO, Burton DR, McKeating JA, Rice CM. (2005). Complete replication of hepatitis C virus in cell culture. *Science* 309 pp. 623–626
- Lindenbach, B.D. and Rice, C.M. (2001). Flaviviridae: The viruses and their replication. In: *Fields Virology*, 4th ed., (D.M. Knipe, and P.M. Howley, eds), pp 991-1041. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia. Major, M.E., Rehmann, B. and Feinstone, S.M. (2001). Hepatitis C viruses. In: *Fields Virology*, 4th ed., (D.M. Knipe and P.M. Howley, eds), pp 1127-1161.
- Macdonald, A., Harris, M. (2004) Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. *Journal of General Virology*, 85, 2485–2502.
- Macquillan, G.C., Niu X., Speers D., Englihs S., Garas, G., Harnett, G. B., Reed, W. D., Allan, J.E., Jeffrey, G.P. (2004). Does sequencing the PKRBD of hepatitis C virus NS5A predict therapeutic response to combination therapy in an Australian population? *J. Gastroenterol. Hepatol.* 19: 551–557.
- Maekawa, S., Enomoto, N., Kurosaki, M., Nagayama, K., Marumo, F., Sato, C. (2000). Genetic Changes in the Interferon Sensitivity Determining Region of Hepatitis C Virus During the Natural Course of Chronic Hepatitis C. *Journal of Medical Virology* 61: 303–310
- Manns, M.P., McHutchison, J.G., Gordon, S.C., Rustgi, V.K., Shiffman, M., Reindollar, R., Goodman, Z.D., Koury, K., Ling, M., Albrecht, J.K. (2001). Peginterferon alfa-2b plus ribavirin compared with interferon alfa-2b plus ribavirin for initial treatment of chronic hepatitis C: a randomised trial. *Lancet*; 358: 958-96.

- McHutchison, J.G. (2004). Understanding hepatitis C. *Am J Manag Care* 10 (2 Suppl): S21-9.
- McKeating, J.A., Zhang, L.Q., Logvinoff, C., Flint, M., Zhang, J., Yu, J., Butera, D., Ho, D., Dustin, L.B., Rice, C.M., Balfe, P. (2004). Diverse hepatitis C virus glycoproteins mediate viral infection in a CD81-dependent manner. *J Virol*, 78: 8496-8505.
- Melissa, D., Murphy, M.D., Hugo, R., Rosen, M.D., Gail, I., Marousek, B.S., and Sunwen Chou, M.D. (2002). Analysis of Sequence Configurations of the ISDR, PKR-Binding Domain, and V3 Region as Predictors of Response to Induction Interferon alfa and Ribavirin Therapy in Chronic Hepatitis C Infection. *Digestive Diseases and Sciences*, Vol. 47, No. 6, pp. 1195–1205
- Meurs, E., Chong, K., Galabru, J., Thomas, N.S., Kerr, I.M., Williams, B.R., Hovanessian, A.G. (1990). Molecular cloning and characterization of the human double-stranded RNA-activated protein kinase induced by interferon. *Cell* ;62: 379-390
- Miller, R.H, Purchell, R.H. (1990). Hepatitis C virus shares amino acid sequence similarity with pestiviruses and flaviviruses as well as members of two plant virus supergroups. *Proceedings of the National Academy of Sciences, U.S.A.* 87, 2057-2061
- Miriam J.A. (2007). Epidemiology of hepatitis C virus infection. Francoise Lunel Fabiani (Series Editor) *World J Gastroenterol* May 7; 13 (17): 2436-2441
- Myers, R.P., Patel K., Pianko S., Poynard, T., McHutchison, J.G.. (2003). The rate of fibrosis progression is an independent predictor of the response to antiviral therapy in chronic hepatitis C. *J. Viral Hepat.* 10: 16–22
- Neumann, A.U., Lam, N.P., Dahari, H., Gretch, D.R., Wiley, T.E., Layden, T.J. & Perelson, A.S. (1998). Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alpha therapy. *Science* 282, 103-107

- Ogata, N., Alter, H.J., Miller, R.H. & Purcell, R.H. (1991). Nucleotide sequence and mutation rate of the H strain of hepatitis C virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 88, 3392-3396
- Öktem, M.A., Abacıoğlu, Y.H. (2006). Hepatit C Virus.In: Şemsettin Ustaçelebi, Selim Badur, Hakan Abacıoğlu (eds.) Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji.. sayfa 96-98
- P. Muñoz de Rueda, J. Casado, R. Pato'n, D. Quintero, A. Palacios, A. Gila, R. Quiles, J. Leo'n, A. Ruiz-Extremera, and J. Salmero'n. (2008). Mutations in E2-PePHD, NS5A-PKRBD, NS5A-ISDR, and NS5A-V3 of Hepatitis C Virus Genotype 1 and Their Relationships to Pegylated Interferon-Ribavirin Treatment Responses. *Journal of Virology*,p. 6644–6653
- Pascu, M., Martus, P., Hohne, M., Wiedenmann, B., Hopf, U.,Scherier, E.,Berg, T.. (2004). Sustained virological response in hepatitis C virus type 1b infected patients is predicted by the number of mutations within the NS5A-ISDR: a meta-analysis focused on geographical differences. *Gut* 53 (9): 1345-51.
- Pawlotsky, J-M. (2000) Hepatitis C virus resistance to antiviraltherapy. *Hepatology*; 32: 889-896
- Pawlotsky, J.M. (2003). Use and interpretation of hepatitis C virus diagnostic assays. *Clin Liver Dis* 7 (1): 127-37
- Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., Weiner, A.J., Houghton, M, Rosa, D., Grandi, G., Abrignani, S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282: 938-941
- Quadri, R., Rubbia-Brandt, L., Abid, K., Negro, F. (2001) Detection of the negative-strand hepatitis c virus RNA in tissues: implication for pathogenesis; *Antiviral Res.* 52: 161-171

- Roussel, J., Pillez, A., Montpellier, C., Duverlie, G., Cahour, A., Dubuission, J., Whchowski, C. (2003) Characterization of the expression of the hepatitis C virus F protein. *J.Gen Virol*, 84: 1751-1759.
- Sagnelli, E., Stroffolini, T., Mele, A., Almasio, P., Coppola, N., Ferrigno, L., Scolastico, C., Onofrio, M., Imperato, M., Filippini, P. (2005) The importance of HCV on the burden of chronic liver disease in Italy: a multicenter prevalence study of 9,997 cases. *J Med Virol*; 75: 522-527
- Sarasin-Filipowicz, M. (2008). Interferon signaling in chronic hepatitis C : mechanisms and implications for therapy. *PhD Tez.* University of Basel, Faculty of Science.
- Sarrazin, C., Berg, T., Lee, J-H, Ruster, B., Kronenberger, B., Roth, W.K., Zeuzem, S. (2000). Mutations in the protein kinase-binding domain of the NS5A protein in patients infected with hepatitis C virus type 1a are associated with treatment response. *J Infect Dis* 181: 432–441
- Sarrazin, C. (2002). Highly sensitive hepatitis C virus RNA detection methods: molecular backgrounds and clinical significance. *J Clin Virol* 25 Suppl 3: S23-9
- Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R.M., Acali, S., Filocamo, G., Traboni, C., Nicosia, A., Cortese, R., Vitelli, A. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *EMBO J*, 21: 5017-5025
- Selimovic, D., Hassan, M. (2008) Inhibition of hepatitis C virus (HCV) core protein-induced cell growth by non-structural protein 4A (ns4A) is mediated by mitochondrial dysregulation. *Bosn J Basic Med Sci*; 8: 4-11.
- Sen, G.C. (2001). Viruses and interferons. *Annu. Rev. Microbiol.* 55, 255–281
- Sharma, S.D. (2010) Hepatitis C virus: Molecular biology & current therapeutic options. *Indian J Med Res* 131, January, pp 17-34.

- Shepard, C.W., Finelli, L., Fiore, A.E., Bell, B.P. (2005) Epidemiology of hepatitis B and hepatitis C virus infection in United States children. *Pediatr Infect Dis J*; 24: 755-760
- Simmonds, P., Holmes, E.C., Cha, T.-A., Chan, S.-W., McOmish, F., Irvine, B., Beall, E., Yap, P.L., Kolberg, J., Urdea, M.S. (1993). Classification of hepatitis C virus into six major genotypes and a series of subtypes by phylogenetic analysis of the NS-5 region. *J. Gen. Virol.* 74: 2391-2399
- Stratidaki, I., Skoulika, E., Kelefiotis, D., Matrella, E., Alexandrakis, G., Economou, A., Kouroumalis, E. (2001) NS5A mutations predict biochemical but not virological response to interferon-alpha treatment of sporadic hepatitis C virus infection in European patients. *J Viral Hepat.* Jul;8 (4): 243-8
- Takada, N., Takase, S., Enomoto, N., Takada, A., Date, T. (1992). Clinical backgrounds of the patients having different types of hepatitis C virus genomes. *J. Hepatol.* 14: 35-40
- Takamizava, A., Mori, C., Fuke, I., Manabe, S., Murakami, S., Fujita, J., Onishi, E., Andoh, T., Yoshida, I., Okayama, H. (1991). Structure and organization of the hepatitis C virus genome isolated from human carriers. *Journal of Virology* 65, 1105-1113
- Taylor, D.R., Shi, S.T., Lai, M.M. (2000), Hepatitis C virus and interferon resistance. *Microbes and Infection*, 2, 1743–175.
- Tellinghuisen, T.L., Evans, M.J., von Hahn, T., You, S., Rice, C.M. (2007). Studying Hepatitis C Virus: Making the Best of a Bad Virus. *Journal Of Virology*, Sept. p. 8853–8867
- Thomas, D.L., Lemon, S.M. (2000) Hepatitis C. In: Mandell GL, Bennett JE, Dolin R, eds. *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 5th ed. Philadelphia: Churchill Livingstone,: 1736-60, Rueda p.
- Torres-Puente, M., Cuevas, J.M., Jiménez-Hernández, N., Bracho, M.A., García-Robles, I., Wrobel, B., Carnicer, F., Del Olmo, J., Ortega, E., Moya, A.,

- González-Candelas, F. (2008) Genetic variability in hepatitis C virus and its role in antiviral treatment response. *J Viral Hepat.* Mar;15 (3): 188-99
- Veer, M. J. Holko, M., Frevel, M., Walker, E., Der, Sandy., Paranjape, J.M., Silverman, R.H., Williams, B.R.G.. (2001) Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. *J. Leukocyte Biol.* 69, 912–920.
- Walewski, J.L., Keller, T.R., Stump, D.D., Branch, A.D. (2001) Evidence for a new hepatitis C virus antigen encoded in an overlapping reading frame. *RNA*, 7: 710-721.
- Wiegand, J., Buggisch, P., Boecher, W., Zeuzem, S., Gelbmann, C.M., Berg, T., Kauffmann, W., Kallinowski, B., Cornberg, M., Jaeckel, E., Wedemeyer, H., Manns, M.P. (2006) Early monotherapy with pegylated interferon alpha-2b for acute hepatitis C infection: the HEPNET acute-HCV- II study. *Hepatology*; 43: 250-256
- Wohnsland, A., Hofmann, W.P., Sarrazin, C. (2007) Viral determinants of resistance to treatment in patients with hepatitis C. *Clin Microbiol Rev.* Jan;20 (1): 23-38.
- World Health Organization. Hepatitis C. (1997) Weekly Epidemiological Record,, 72: 65-69
- Xu, Z., Choi, J., Lu, W., Ou, J.H. (2003) Hepatitis C virus F protein is a short-lived protein associated with the endoplasmic reticulum. *J Virol* 77: 1578-1583.
- 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.
- Yıldız, E., Öztan, A., Sar, F., Pinarbasi, E., Cetin-Atalay, R., Akkiz, H., Öztürk, M. (2002) Molecular characterization of a full genome Turkish hepatitis C

virus 1b isolate (HCV-TR1): A predominant viral form in Turkey. *Virus Gene*; 25: 169-77.

Yi, M., Ma, Y., Yates, J., Lemon, S.M. (2009). Trans-complementation of an NS2 defect in a late step in hepatitis C virus (HCV) particle assembly and maturation. *Pub Libr Sci Pathog* 5: e1000403

Yoshioka, K., Kakumu, S., Wakita, T., Ishikawa, T., Itoh, Y., Takayanagi, M., Higashi, Y., Shibata, M., Morishima, T. (1992). Detection of hepatitis C virus by polymerase chain reaction and response to interferon- α therapy: relationships to genotypes of hepatitis C virus. *Hepatology* 16: 293-299

Zeuzem, S., Jung-Hun, L., Roth, W.K., (1996). Mutations in the Nonstructural 5A Gene of European Hepatitis C Virus Isolates and Response to Interferon Alfa; *Hepatology* Vol. 25, No. 3 syf: 740-743

Zeuzem, S., Schmidt, J. M., Lee, J. H., von Wagner, M., Teuber, G. & Roth, W. K. (1998). Hepatitis C virus dynamics in vivo: effect of ribavirin and interferon alfa on viral turnover. *Hepatology* 28, 245-252

Zhang, L.Q., Randall, G., Higginbottom, A. (2004). CD81 is required for hepatitis C virus glycoprotein-mediated viral infection. *J Virol*, 78: 1448-1455

Zhong, J., Gastaminza, P., Cheng, G., Kapadia, S., Kato, T., Burton, D.R. (2005). Robust hepatitis C virus infection in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA*; 102: 9294-9