

T.C.

DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
TIP FAKÜLTESİ
MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

**HEPATİT C VİRUSU'NA AİT
REKOMBİNANT NS3 PROTEİNİNİN
SAFLAŞTIRILARAK OLUŞTURDUĞU IFN- γ , IL-
10 VE IL-4 YANITLARININ ARAŞTIRILMASI**

Dr. M HAKAN TAŞKIN

UZMANLIK TEZİ

Tez Danışmanları

Prof.Dr. Y HAKAN ABACIOĞLU

Doç.Dr. M ALİ ÖKTEM

İZMİR – 2010

Teşekkür

Asistanlığım süresince hem eğitimimde hem tez konumun belirlenmesinde hemde tez çalışmalarında bana her türlü desteği sağlayan danışman hocalarım Prof.Dr.Y.Hakan ABACIOĞLU ve Doç.Dr.M.Ali ÖKTEM'e, ayrıca eğitimime katkılarından dolayı tüm değerli hocalarıma, tüm asistanlığım döneminde bana arkadaşlığı ve bilgisiyle her zaman destek olmuş olan sevgili dostum Uzm.Dr.Hüseyin ÇOBAN'a çok teşekkür ederim.

Bu süreçte beraber çalıştığım uzman, asistan ve teknisyen arkadaşlarıma, deneyimlerinden faydalandığım Araştırma Görevlileri Ertan ÇAKMAK, Dilek GÖKTÜRK, Aslı TOYLU, Murat ÇOKAKLI'ya da teşekkürlerimi sunarım.

Ve hayatı boyunca ailesinin yanında olan, onları yaşayan ama bizim onu yaşayamadığımız, 63 yaşında kaybettiğim annem ÜLKÜ TAŞKIN'a sonsuz teşekkürler, canım annem.

İÇİNDEKİLER

TABLO LİSTESİ	iv
RESİM LİSTESİ	iv
ŞEKİL LİSTESİ	v
KISALTMALAR.....	vi
1. ÖZET.....	1
2. SUMMARY.....	2
3 GİRİŞ VE AMAÇ.....	3
4. GENEL BİLGİLER.....	5
4.1. HEPATİT C VİRUSU TARİHÇE VE GENOM YAPISI	5
4.2. VİRAL PROTEİNLERİN ÖZELLİKLERİ.....	7
4.2.1. Core(özyapı) proteini	7
4.2.2. E1 ve E2 zarf proteinleri.....	7
4.2.3. P7 protein	7
4.2.4. NS2 protein	8
4.2.5. NS3 protein	8
4.2.5.1. NS2/3 proteaz.....	8
4.2.5.2. NS3 serin tip proteaz ve onun kofaktörü NS4A	9
4.2.5.3. NS3 helikaz.....	9
4.2.6. NS4B protein.....	9
4.2.7. NS5A protein	9
4.2.8. NS5B protein.....	10
4.3. HEPATİT C VİRUS YAŞAM DÖNGÜSÜ	10
4.3.1. HCV'nin hücreye girişi.....	10
4.3.2. Hücresel döngü ve salınım.....	11
4.4. HCV PATOGENEZİ	12
4.4.1. Kuşbakışı Bağışık Yanıt.....	12
4.4.2. Hepatositin yanıtı	14
4.4.3. Dendritik hücrelerin yanıtı.....	15
4.4.4. Doğal Öldürücü (NK) ve NKT hücrelerinin yanıtı	16
4.5. AKUT HCV İNFEKSİYONU	16
4.5.1. Sıvısal bağışık yanıt.....	16
4.5.2. T hücre Yanıtları.....	18
4.6.KRONİK HCV İNFEKSİYONU	18
4.6.1. Sürekli antijenik uyarımla oluşan fonksiyon bozukluğu.....	19
4.6.2. Regülatör T hücre (Treg) indüksiyonu	19
4.6.3. IL-10 etkinliği	19
4.7. HCV TANISI	20
4.7.1. Serolojik testler.....	20
4.7.2. Nükleik asid testleri.....	20
4.7.3. Genotipleme testleri	21
4.8. HCV SAĞALTIMI.....	21
4.9. HCV NS3 PROTEİNİNİN EPİTOPLARI VE PATOGENEZDEKİ OLASI ROLLERİ	22
4.10. GEN KLONLAMA	24
4.10.1. Klonlama Yöntemleri.....	25
4.10.2. Restriksiyon enzimlerinin (RE) seçimi.....	25

4.10.3. DNA ligasyonu	27
4.10.4. Transformasyon	28
4.10.5. Kolonilerin seçimi.....	28
4.10.6. Rekombinant genin klonlandığı hücrelerin saptanması.....	28
4.10.7. Ekspresyon vektörleri.....	28
4.10.8. Protein ekspresyonu.....	29
4.10.9. Protein izolasyonu ve ekspresyonunun gösterilmesi.....	29
4.10.10. SDS-PAGE	30
4.10.11. Proteinlerin saflaştırılması	30
5.GEREÇ VE YÖNTEMLER.....	32
5.1. GEREÇ.....	32
5.1.1. Çalışma grubu ve Etik Kurul Onayı	32
5.1.2. Ayırıcılar ve Malzemeler	32
5.2. YÖNTEM.....	43
5.2.1. Hepatit C virusuna ait klonlanacak DNA'nın eldesi.....	43
5.2.2. cDNA sentezi.....	43
5.2.3. Protein kodlayan gen bölgesinin iç içe PZT ile çoğaltılması	44
5.2.4. pQE30 vektörünün saflaştırılması.....	45
5.2.5. PZT ürünlerinin saflaştırılması	45
5.2.6. Restriksiyon enzimleri ile kesim	46
5.2.7. Ligasyon	46
5.2.8. M15 kompetan Escherichia coli hücrelerinin hazırlanması.....	47
5.2.9. M15 kompetan Escherichia coli hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu	47
5.2.10. İnsert içeren kolonilerin seçimi.....	48
5.2.11. Dizileme primerleri kullanılarak elde edilen PZT ürünlerinin dizi analizi.....	48
5.2.12. Proteinlerin ifadesi ve saflaştırılması	48
5.2.13. SDS-PAGE için örneklerin ve jelin hazırlanması	50
5.2.14. SDS-PAGE	50
5.2.15. Western blotlama	51
5.2.16. Protein yoğunluğunun belirlenmesi.....	51
5.2.17. Protein preparatındaki endotoksin yoğunluğunun belirlenmesi	51
5.2.18. Saflaştırılan rekombinant proteinin hasta ve sağlıklı kontrol serumları ile denenmesi.....	52
5.2.19. Heparinize kan örneklerinin toplanması	52
5.2.20. Periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) ayrılması ve sayımı.....	52
5.2.21.Örneklerinin antijenle uyarılması ve hücre kültürü.....	53
5.2.22. IFN- γ , IL-10, IL-4 düzeylerinin plak ELISA yöntemi ile ölçülmesi.....	54
6. BULGULAR.....	55
6.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi	55
6.2. Restriksiyon Enzim Kesimi ve Ligasyona Girecek Ürün Seçimi.....	55
6.3. Transformasyon ürünleri	56
6.4. pQE30-NS3 DNA Dizilimi	57
6.5. Saflaştırılan Rekombinant NS3 Preparatının SDS PAGE ve Western Blot Analizi.....	58
6.6. Protein Yoğunluğu	58
6.7. Rekombinant NS3 Endotoksin Yoğunluğu	59
6.8.Hasta ve Sağlıklı Kontrol Serumları ile Doğrulama	59
6.9. Plak ELISA Yöntemi ile Ölçülen Sitokin Düzeyleri	60
7. TARTIŞMA	63
8. KAYNAKLAR.....	67

TABLO LİSTESİ

Tablo 1: İnsan CD4+ T hücre epitopları

Tablo 2: İnsan CD8+ T hücre epitopları

Tablo 3: Ekspresyon vektörlerinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları.

Tablo 4: En sık kullanılan promotörlerden bazılarının özellikleri

Tablo 5: Tam kan plazması ve PBMC'lerde ELISA yöntemi ile IFN- γ , IL-10 ve IL-4 ölçüm protokolü.

Tablo 6: Sağlıklı gruptaki sitokin yanıtlarına karşılık gelen OD (optik dansite) değerleri ve ortalamaları

Tablo 7: TK ve PBMC'lerde ölçülen sitokin değerleri

RESİM LİSTESİ

Resim 1: HCV'ne ait NS3 PZT ürünü

Resim 2: NS3 ve dilüsyonlu pQE30'un agaroz jel görüntüsü

Resim 3 -1: Transformasyon sondası üreyen kolonilerin agaroz jel görüntüsü

Resim 3 -2: Transformasyon sondası üreyen kolonilerin agaroz jel görüntüsü

Resim 4: NS3'e ait SDS-PAGE ve western blotlama görüntüsü

Resim 5: Ficoll dansite gradiyentine göre PBMC eldesinin şematik görüntüsü

Resim 6: Hasta ve sağlıklı kontrol ile western blotlama sonucu

ŞEKİL LİSTESİ

- Şekil 1: HCV araştırmalarında tarihsel gelişim basamakları
Şekil 2: HCV genom yapı ve organizasyonu
Şekil 3: NS2/3'ün genom yerleşimi
Şekil 4: HCV'nin hücreye girişi
Şekil 5: IFN ve IFN'la indüklenen gen ekspresyonu
Şekil 6: HCV'na immün yanıt
Şekil 7: HCV'nin hücre içi yolaklar üzerindeki olası etkileri
Şekil 8: HCV'de klinik, immunolojik ve virolojik süreç.
Şekil 9: Serolojik testler için kullanılan HCV antijenleri
Şekil 10: HCV tanı algoritmi
Şekil 11: Ribavirin etki mekanizması
Şekil 12: Rekombinant molekülün oluşturulması ve konak hücrelerle beraber çoğaltılması
Şekil 13: Katı faz, Ni-NTA ve Histidin moleküllerinin etkileşimi
Şekil 14: pQE30 ekspresyon vektörü
Şekil 15: NS3 içeren pQE30 vektörüne ait DNA dizi analizi ve karşılık gelen aminoasit dizileri
Şekil 16: NS3 proteinine ait moleküler büyüklük hesaplaması.
Şekil 17: NS3 protein preparatının yoğunluğu
Şekil 18-1: Erkeklerde IFN γ , IL-4 sitokin yanıtları ortalamalarının ve Standartların OD grafikleri.
Şekil 18-2: Erkeklerde IL-10 ve kadınlarda IFN γ sitokin yanıtları ortalamalarının ve Standartların OD grafikleri.
Şekil 18-3: Kadınlarda IL-4 ve IL-10 sitokin yanıtları ortalamalarının ve Standartların OD grafikleri.

KISALTMALAR

ASH	: Antijen sunan hücre
cDNA	: Komplementer DNA
CLDN	: Claudin
DC	: Dendritic Cell
DC-SIGN	: Dendritic Cell-Specific Intercellular-adhesion-molecule-Grabbing Nonintegrin
EIA	: Enzyme immunoassay
ELISA	: Enzyme Linked Immunosorbent Assay
ER	: Endoplasmic reticulum
HCV	: Hepatit C virusu (Hepatitis C virus)
HRP	: Yaban turpu peroksidazı (Horse-radish peroxidase)
HLA	: Human leukocyte antigen
HVR	: Hypervariable region , (Çokdegisken bölge)
IFN- γ	: İnterferon- γ
IL-10	: İnterlökin-10
IPTG	: Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranoside
IRES	: Internal Ribosomal Entry Site
KIR	: killer cell immunoglobulin-like receptors
LDL	: Düşük yoğunluklu lipoprotein, (Low density lipoprotein)
LPS	: Lipopolisakkarit
LVP	: Lipoviropartikül
MHC	: Major Histocompatibility Complex
NF- κ B	: Nuclear Factor-kappa B
Ni-NTA	: Nikel-nitritotriasetik asit
NK	: Naturel Killer
OCN	: Occludin
OD	: Optik dansite
ORF	: Open reading frame
PAMP	: Pathogen Associated Molecular Pattern
PBMC	: Peripheral blood mononuclear cell
pDC	: Plazmositoid DC
PKR	: Çift iplikli RNA'ya bağımlı protein kinaz
PRR	: Patogen recognition receptors
PVDF	: Poli vinyliden diflorit
PZT	: Polimeraz Zincir Tepkimesi
RNA	: Ribonükleik asit
RIG-I	: Retinoic acid-inducible gene I
SDS-PAGE	: Sodium Dodecyl Sulphate-Polycarylamide Gel Electrophoresis
SIA	: Strip immunoassay
SOCS	: Suppressor of cytokine signaling
SR-B1	: Çöpçü reseptörü sınıf B tip 1 (Scavenger receptor class B type 1)
TBR	: Toll benzeri reseptör
TEMED	: Tetrametiletildiamin
TGF- β	: Transforming Growth Factor-beta
TLR	: Toll Like Receptor
TNF	: Tümör nekroz faktör (Tumor necrosis factor)
TRIF	: Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β
UTR	: Proteine çevrilmeyen kısım, (Untranslated region)
VLDL	: Çok düşük yoğunluklu lipoprotein, (Very low density lipoprotein)

1. ÖZET

Dünya çapında yaygın bir infeksiyon etkeni olarak görülen hepatit C virus (HCV) önemli bir halk sağlığı sorunudur. Dünya üzerinde halen yaklaşık olarak 180 milyon insanın HCV ile infekte olduğu öngörülmektedir. İnfekte hastaların %80 kadarının kronikleşmesi ve bunun zemininde zamanla önce siroz daha sonra da hepatoselüler karsinom (HCC) gelişme oranlarının HCV ile infekte olmayan insanlara göre çok yüksek olması dikkat çekicidir. HCV 11 farklı protein ürünü oluşturan yaklaşık 3011 aa'lık tek bir poliproteini kodlar. Bu poli proteinin çeşitli proteazlar tarafından kesilerek işlenmesi sonucunda ortaya çıkan NS3 (non-structural protein 3) proteini serin proteaz, NTPaz/helikaz işlevlerine sahip 631aa'lık en büyük proteinlerinden biridir. HCV NS3 proteininin hücre içi yolakların inhibisyonuna katılması ve immun sistemden kaçışta oynadığı rolün araştırılması ile ilgili çok sayıda çalışma bulunmasına karşın NS3'e karşı oluşan immun yanıtlarla ilgili veriler yetersizdir.

Bu çalışmada Türkiye'de ilk kez yerel bir HCV kökenine ait NS3 proteininin saflaştırılması ve bu proteinin NS3'e karşı sitokin yanıtı çalışmalarında kullanılabilirliğinin gösterilmesi amaçlanmıştır. Bunun için Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan tanısal araştırma amacıyla elde edilmiş HCV genotip 1 taşıdığı bilinen hastadan izole edilen HCV RNA kalıp olarak kullanılmıştır. HCV-RNA'nın NS3 kodlayan bölgesi RT-PZT ile çoğaltıldıktan sonra bir ekspresyon vektörü aracılığı ile klonlanmış ve tam uzunlukta HCV NS3 proteini *Escherichia coli* M15 hücrelerinde eksprese edilmiştir. Ekspresyon vektörü olarak 6x His-tag dizisi içeren pQE30 plazmiti kullanılmıştır. Rekombinant protein nikel-nitritotriasetik asit (Ni-NTA) agaroz afinite kromatografisi ile denatüre edici şartlarda saflaştırılmıştır. Sitokin yanıtı çalışmaları için sağlıklı 4 erkek ve 3 kadından oluşan çalışma grubunun tam kan ve periferik kan mononükleer hücreleri rekombinant NS3 ile uyarılmıştır. Uyarılan hücrelerin ve kontrollerin bulunduğu ortam süpernatantlarında IFN γ , IL-4, IL-10 sitokin yanıtları kantitatif ELISA yöntemi ile değerlendirilmiştir. Rekombinant NS3 proteinine karşı uyarım sonrası yanıtlar değerlendirildiğinde özellikle uyarılan tam kan örneklerinde belirgin bir IL-10 yanıtı ortaya çıktığı gözlenirken IFN γ ve IL-4 için aynı durum gözlenmemiştir. Sonuç olarak şimdiye dek ülkemizde ve uluslararası literatürde yayınlanmış veriler üzerinde yaptığımız taramalarda ilk kez ülkemizden bir HCV genotip 1b kökenine ait NS3 proteini saflaştırılmış olup sitokin yanıtları ile ilgili optimizasyon ve standardizasyon çalışmaları devam etmektedir.

2. SUMMARY

Hepatitis-C virus (HCV) is a widespread agent in the world giving rise to public health problems. It is estimated that almost 180 million persons in the world are infected by HCV and it is noteworthy that these are much more eligible to develop first cirrhosis and then hepatocellular carcinoma (HCC) as compared to uninfected population by this virus. Positive sense HCV RNA translated as a single large poliprotein (3011 amino acid size) which constitutes 11 different proteins. Non-structural protein 3 (NS3), formed by cutting and processing of this poliprotein by various proteases is one of the largest protein of 631aa, having the serine-protease activity and NTPase/helicase function. Despite the fact that there are numerous studies on the participation of HCV NS3 protein in the inhibition of intercellular pathways and its role on the evading immune system, current data on the development of cytokine response against NS3 is insufficient.

In this study, purification of a local HCV-based NS3 protein and use of this protein in the studies of cytokine-response against the NS3, is aimed for the first time in Turkey. For his purpose, HCV RNA is used as a template, isolated from a patient carrying HCV genotype-1, in the Dokuz Eylul University Hospital Central Laboratories.

The region in HCV-RNA which coding the NS3 is amplified by RT-PCR and inserted by ligation reaction into expression vector and expressed in the full length HCV NS3 *Escherichia coli* protein M15 cells. pQE30 plasmid is utilized containing 6xHis-Tag as the expression vector. Recombinant NS3 is purified by agarose- nickel-nitrilotriacetic acid (Ni-NTA) chromatography under denatured conditions.

For the the cytokine response studies, whole blood and peripheral blood mononuclear cells of the study group, consisting of 4 men and 3 women with good health, stimulated by recombinant NS3. In the supernatants of the stimulated and non-stimulated cells, IFN γ , IL-4, IL-10 cytokine responses are evaluated by utilizing quantitative ELISA method.

The ELISA results of cytokine assays after stimulation whith NS3, indicate that significantly high IL-10 response occurs after the stimulation against the recombinant NS3 protein, whereas same response is not present for IFN γ and IL-4 especially with whole blood samles.

In summary, after scanning Turkish and in international literature, a HCV-genotype-1 based NS3 protein is purified for its first time, and optimization and standardization studies on the responses of cytokine are already in progress.

3 GİRİŞ VE AMAÇ

Hepatit C Virus (HCV) *Flaviviridae* ailesinin Hepacivirus genusuna ait, tek zincirli RNA virusudur. Tüm dünyada yaklaşık 180 milyon insanı infekte ettiği düşünülen HCV bu yönü ile önemli bir halk sağlığı sorunudur. HCV'nin en sık geçiş yolu infekte kan ile direk temasdır. HCV ile infekte olan hastaların % 20'sinde akut dönemde ateş, halsizlik, karın ağrısı, sarılık gibi klinik bulgular gözlemlendiği bildirilmiştir.¹ Semptomatik hastaların % 50'si virüsü elimine ederken semptomsuz akut HCV enfeksiyonunun % 80'inde enfeksiyonun kronikleştiği bildirilmektedir. HCV ile infekte bireylerin yaklaşık %20'sinde kendiliğinden iyileşme olduğu ve bu oranın yaşa, cinse göre değiştiği gözlenmektedir. HCV'ye karşı oluşan konak immün yanıtları hem virus kontrolünde hemde hastalığın patogeneğinde önemli rol oynar. Spontan iyileşme için birçok HCV epitopuna karşı HCV'ye özgül yaygın CD4+ ve CD8+ T hücre yanıtı gereklidir.

Kronik HCV'li hastaların %20 kadarında enfeksiyon sonrası 20 yıllık dönem boyunca siroz gelişmektedir. Sirozlularda ise ilerleyen dönemlerde % 0-3/yıl oranında hepatoselüler karsinom (HSK) geliştiği bildirilmektedir.^{2,3}

Konaktaki patojenlere karşı immün yanıtın ne yönde farklılaşacağını belirleyen faktörler arasında makrofajlar, dendritik hücreler (DH), sitokin yanıtı, kemokinler, genetik yapı sayılabilir. Patojenlerin başarılı şekilde ortadan kaldırılması için koruyucu bağışık yanıtların doğru yönde gelişmesi gerekir. Bunun için antijen sunan hücreler (ASH) özellikle de DH'ler önemli oynar. Antijeni alarak lenf nodlarına göç eden DH'ler bu arada olgunlaşır, antijeni işlemler ve MHC molekülleri ile naif T lenfositlerine sunarlar.⁴

Antijene karşı ortaya çıkan CD4+ T hücre yanıtlarının çeşitliliği sıvısal ve hücreyel bağışık yanıtın başarılı olup olmayacağını belirlemektedir. Naif yardımcı T (CD4+) hücreleri (Th) aktive olarak efektör yardımcı T hücrelerine farklılaşırlar. Th hücreleri farklı sitokin salınımı ve immunomodülatör etkilerine göre Th1 ve Th2 olmak üzere iki ana alt tipe ayrılır. Th1 hücreleri esas olarak hücre aracılı bağışık yanıt için gerekli olan INF γ , IL-2 ve TNF- β üretirler. Th2 hücreler ise B hücre aktivasyonu ve antikor üretimine aracılık eden IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 salgırlar. Naif CD4+ T hücrelerinin Th1 veya Th2 yönündeki farklılaşmasının immün yanıt ya da yanıtsızlığı belirlemede önemli sonuçları vardır. Antijene özgül CD4+ T hücre yanıtlarının antijene özgül CD8+ T hücre yanıtlarının sürdürülebilirliğinde de önemli rol oynayabildiği yayınlanmıştır.^{5,6}

Th1 hücreleri salgıladıkları sitokinlerle antiviral ve antiproliferatif etkilere sahip bir dizi hücreyel gen aktivasyonuna sebep olurlar. Hepatit C'deki antiviral mekanizmalardan biri protein kinaz R(PKR)'nin IFN- α ile aktivasyonudur. Tip I INF'lar tarafından aktive edildiği zaman, PKR, eIF-2 aracılığıyla protein sentezini bloke eder ve viral replikasyonun inhibisyonuna sebep olur. Th2 tipi sitokinlerden IL-4 ve IL-10 Th1 yanıtlarını baskılayıcı etkinliği ile HCV'nin bağışık yanıtı karşı direncine katkı verebilir.⁷

HCV enfeksiyonlu hastaların güncel standart sağaltımı peg-IFN + ribavirin ikili kullanımıdır. Bu sağaltımın hemolitik anemi, teratojenite, serebral hemoraji, depresyon, miyalji, artralji gibi birçok yan etkileri olup hasta açısından zor bir dönemdir. Bu sağaltım HCV genotip 1 ile infekte olan hastaların yaklaşık %40'ında, genotip 2 ve 3 ile infekte olanların %80'inde kalıcı virolojik yanıt (KVY) sağlamaktadır.

HCV'ye karşı oluşan konak yanıtları hem enfeksiyonun kontrolünde hemde hastalığın patogeneğinde önemli rol oynamaktadır. HCV ile infekte hastalarda HCV proteinlerine karşı

gelişen ve farklılaşan bağışık yanıtlar hastaların sağaltıma yanıtları hakkında fikir verebilir. Örneğin, çeşitli *Mycobacterium tuberculosis* antijenlerine (CFP-10, Esat-6 gibi) karşı oluşan IFN γ , IL-10 yanıtlarının sağaltımı değerlendirmedeki etkilerine benzer şekilde HCV proteinlerine karşı da immun yanıtların değerlendirilmesi önemli olabilir.^{8,9}

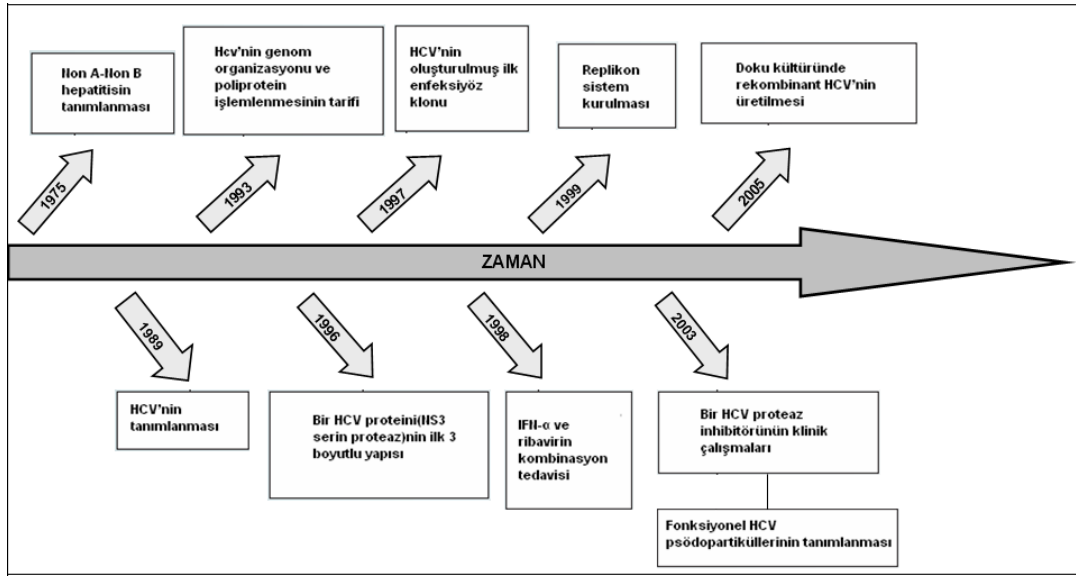
HCV'nin NS3 proteini 1893nt'lik, 69 kDa moleköl ağırlığında olup HCV'nin yapısal olmayan (NS) proteinlerinin işlemlenmesinde önemlidir. NS3, serin proteaz ve NTPaz/helikaz aktiviteleri ile viral replikasyona katılan önemli bir proteindir. NS3 proteini NS4A ile birlikte iken viral serin proteaz aktivitesi gösterir. Ayrıca NS3/4A interferon regulatory factor-3 (IRF-3) aktivasyonunu baskı altına alarak ISG ürünü antiviral etkili IFN- β üretimini engeller. NS3/4A, ayrıca TRIF adaptör molekülünü yıkarak TBR3(Toll benzeri reseptör 3) sinyal yolağını ve Cardif (IPS-1) adaptörünü inaktive ederek RIG-I ve MDA5 yolağı aracılı IRF-3/NF- κ B aktivasyonunu önler.¹⁰

HCV'nin immunodominant bir bölgesi olan özyapı (core) proteini ile ilgili birçok çalışma olmakla birlikte, HCV NS3 proteini de birçok epitop içermekte olup bunların etkinlikleri ile ilgili yeterince çalışma bulunmamaktadır. Bu proteinin konak immun yanıtlarını ve virüs yaşam döngüsünü nasıl etkilediği açık değildir. Konu ile ilgili daha çok veriye ihtiyaç vardır. Bu çalışmada tam uzunluktaki (full-length) HCV NS3 proteinini kodlayan genin klonarak çoğaltılmasını takiben proteinin ifadesi ve saflaştırılması gerçekleştirilmiştir. Elde edilen saf NS3 proteini kullanılarak yapılan deneylerde sağlıklı insanlara ait tam kan ve periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) ile bu protein karşılaştırılarak INF γ , IL-10 ve IL-4 yanıtları ELISA yöntemiyle belirlenmiş ve yöntem optimizasyonu yapılmıştır. Bu çalışmada Türkiye'de ilk kez yerel bir HCV kökenine ait NS3 proteininin saflaştırılması yapılmış olup, elde edilen veriler NS3 proteininin kullanıldığı hasta yanıtlarının araştırılması için bir ön çalışma niteliğindedir.

4. GENEL BİLGİLER

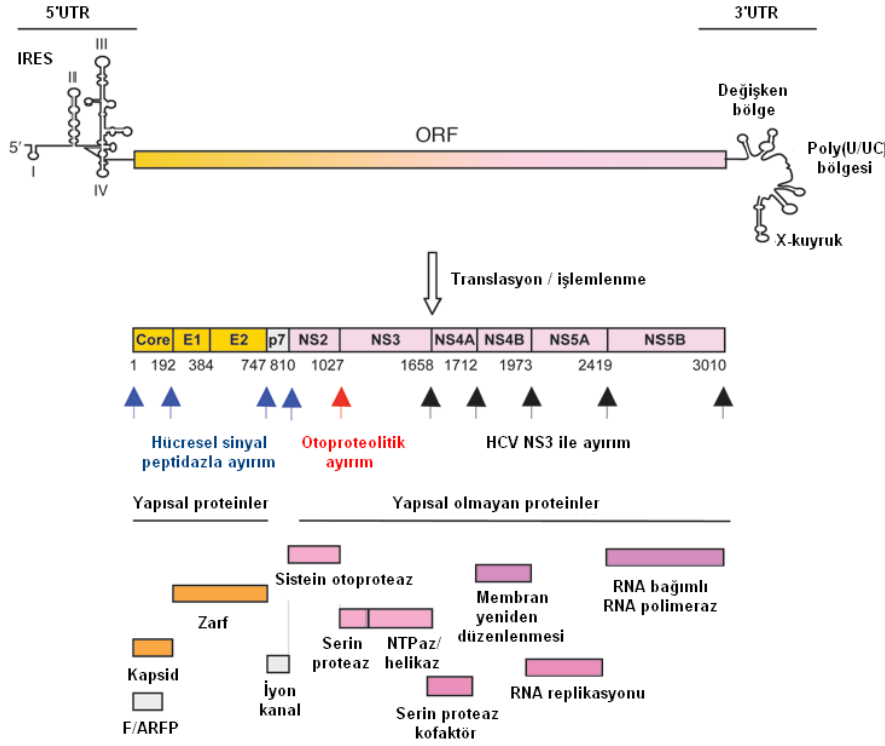
4.1. HEPATİT C VİRUSU TARİHÇE VE GENOM YAPISI

Hepatit C virus insanda ilk kez 1989'da kan transfüzyonu sonrası Non A-Non B hepatitli bir hastanın serumundan cDNA olarak izole edilmiştir.¹¹ Hepatitis C virus araştırmasındaki köşe taşları Şekil 1'de gösterilmiştir.¹²



Şekil 1: HCV araştırmalarında tarihsel gelişim basamakları

HCV genom boyutu 9,6 kb olan pozitif zincirli, zarflı bir RNA virusudur.¹³ Hepatitis C virusu Flaviviridae ailesinin Hepacivirus generisi içerisindeki tek tür olarak sınıflandırılır.¹⁴ Genom 3011 aminoasitlik tek bir poliproteini kodlar (Şekil 2)¹⁵. Bu protein sentezlendikten sonra çeşitli proteazlar aracılığı ile kesilerek yapısal ve yapısal olmayan en az 10 farklı proteine ayrılır. Bu işleme viral proteazlar ve konak proteazları katılır. Konak proteazları kapsid, E1 ve E2 viral zarf glikoproteinleri ve P7 proteinini ayırırken, viral proteazlar NS2/3 sistein proteaz ve NS3/NS4A serin proteaz aktiviteleri ile NS2 ile NS5B arasındaki yapısal olmayan proteinleri ayırır.¹⁶



Şekil 2: HCV genom yapı ve organizasyonu

HCV genomunun önemli bir özelliği yüksek oranda genetik çeşitliliğinin olmasıdır¹⁷.

5'UTR ve 3'UTR nin terminal segmenti çeşitli izolatlar arasında yüksek derecede korunmuş sekansa sahip olmasına rağmen E1 ve E2 bölgeleri en değişken kısımlardır. Yaklaşık 341 nükleotid uzunlukta olan 5'UTR viral RNA'nın cap bağımsız translasyonu için esas olan internal ribosomal entry site (IRES)'i de içeren 4 bölgeden oluşur (domain I-IV).^{18, 19}

HCV genomunun translasyonu IRES'in kontrolü altındadır. 5'UTR'nin domain I'i IRES'e ait değildir fakat IRES bağımlı translasyonun düzenlenmesinde önemli bir rol oynar.^{20, 21}

Ortalama 80nt uzunlukta kısa değişken bir bölge olan poly(u/c) ve hemen hemen değişmez olan 98nt'lik X-kuyruk bölgesinin katıldığı 3'UTR yaklaşık 200-235nt'lik bir bölgedir.

3'X bölgesi ve poly(u/c)'nin 52nt'lik kısmı RNA replikasyonu için gerekli olmakla birlikte 3'UTR'nin kalan kısmında replikasyonda rol oynar.

Günümüze kadar hepacivirus'lar amino asid dizilerinde yaklaşık %30, nükleotid dizilerinde %31-34 oranında farklılıklar olan 6 genotipe ayrılır ve 1,2,3... olarak numaralandırılırlar. Bunlar da 80'den fazla alt tipe ayrılır ve a,b,c,... olarak harflerle belirtilmektedirler. Genotip 1,2,3 genel olarak dünya çapında yaygındır. Tip 1a Kuzey Avrupa ve Kuzey Amerika'da, tip 1b Japonya, Güney ve Orta Avrupa'da en sık görülür. Türkiye'de ise yapılan çeşitli çalışmalarda bu dağılım şöyledir.²²

Genotip	1a	1b	2	3	4
Abacıoğlu ve arkadaşları(%)	19,1	75,3	3,4		2,2
Bozdayı ve arkadaşları (%)	11	84	3	1	1
Özacar ve arkadaşları(%)	9,9	87,2	0,9	1,4	0,6

23,24,25

HCV heterojenliği NS5B geni tarafından kodlanan RNA bağımlı RNA polimerazın yüksek hata oranından kaynaklanmaktadır. HCV geneomunun “türümsü” (quasispecies) olarak bilinen yakın ilişkili farklı varyantlarının varlığı virusun antivirallere ve konak bağışık yanıtına karşı direncine katkıda bulunmaktadır. Kronik HCV’li hastaların türümsü topluluğundaki genetik çeşitlilik spontan iyileşenlerden daha fazla olarak bildirilmiştir.²⁶

Kronik infeksiyon esnasındaki rastgele genetik “drift” ler E2 zarf proteininin çok değişken bölge 1 deki (hypervariable region 1) değişikliklerinden dolayı quasispecies gelişimini indükler.^{27,28, 29}

4.2. VİRAL PROTEİNLERİN ÖZELLİKLERİ

4.2.1. Core(özyapı) proteini

Poliprotein N-terminalinden kaynaklanan HCV core proteini viral nükleokapsidi oluşturur. Core proteininin aa dizisi diğer HCV proteinleri ile karşılaştırıldığında farklı HCV suşları arasında oldukça korunmuş bir bölgedir. HCV ile infekte bireyler arasında anti-core antikorları oldukça yaygın olduğundan bu protein birçok serolojik testte kullanılmaktadır.

Core proteini başlangıçta 23kDa ağırlığında 191aa’lık bir prekürsör olarak salınır ve daha sonraki işleme ile predominant şekli oluşur. Core proteininin N-terminal bölgesi çoğunlukla bazik, C-terminal bölgesi hidrofobiktir. Core proteini esasen sitoplazmada, ER, lipid damlacıkları ve mitokondri ile ilişki içinde tesbit edilir.^{30,31,22}

Core proteini birçok fonksiyona sahip olup özellikle viral replikasyon, olgunlaşma ve patogeneze için önemlidir. Hem HCV partikülünün oluşumuna hemde sinyal yollarının düzenlenmesi, hücresel ve viral gen ekspresyonu, hücre transformasyonu ve lipid metabolizması dahil birçok patogenetik süreçte etkindir.³²

4.2.2. E1 ve E2 zarf proteinleri

E1 ve E2 proteinleri virion zarfının esas komponentleridir ve virusun hücreye girişi için gereklidir. Bu glikozillenmiş proteinler poliproteinin E1 için 192-383.aa’ler ve E2 için 384-746.aa’ler arasında uzanırlar ve E1 33-35, E2 70-72 kDa ağırlığındadır.³³

E1 ve E2 tip I transmembran glikoproteinleri olup bu özelliklerini sırasıyla N-terminal 160. ve 334. aa’leri verir. Bu bölgeler membrana tutunma, endoplazmik retikulum (ER) yerleşimi ve virusun bir araya gelme sürecini de içeren çok çeşitli işlevlere sahiptir.^{34,35}

E2 en değişken viral zarf glikoproteinidir ve bu yüzden E2’nin CD81 gibi ligandları ile etkileşiminin suşa özgü olduğu bildirilmektedir.³⁶

E2 iki çok değişken bölge (Hypervariable region-HVR) içerir. HVR-1 glikoprotein N-terminal ucunda 27aa olarak ve HVR-2 bunun devamındaki 9aa’lık dizide yerleşmiştir. Çoğu mutasyonlar bu bölgelerde virüsü nötralize edici antikorlar ve HCV’ye özgül sitotoksik T lenfositlerin (CTL) baskısı sonucu oluşur.³⁷

HVR-1 HCV için tek olmamakla birlikte esas nötralize edici epitoptur.³⁸

E2 infeksiyonun başlangıcında önemli bir role sahiptir. Virusun hücreye tutunmasının bir veya birkaç hücresel reseptörle E2 etkileşimi aracılığıyla başlatıldığı düşünülmektedir.³⁹

4.2.3. P7 protein

P7 proteini 63aa’lık küçük hidrofobik bir peptittir. Viroporin ailesine ait olan bu proteinin membran geçirgenliğini arttırdığı bilinmektedir. Bu proteinin suni lipid bariyerlerinde bir iyon kanalı oluşturduğunun belirlenmesi bir viroporin olarak işlev görebileceğini desteklemektedir.

4.2.4. NS2 protein

21–23 kDa ağırlığında bir transmembran proteini olan NS2 ER membranına yerleşir. NS2'nin C-terminal kısmı olasılıkla NS3'ün N-terminali ile birlikte çinko tarafından stimüle edilen NS2/3 proteaz aktivitesine fırsat verecek şekilde sitoplazmada kalır. NS2/3 bölgesinden etkili bir ayırma için NS2'nin COOH ucundan 130 aminoasitlik bölgesi ve NS3'ün amino ucundan 180 aminoasitlik bölgesi gereklidir. Ayrıca bu protein in vivo ve in vitro viral replikasyon döngüsünün tamamlanmasında önemlidir.²²

4.2.5. NS3 protein

NS3 N-terminal serin tip proteaz bölgesi ve C-terminal RNA helikaz /NTPaz bölgesiyle çok fonksiyonlu bir proteindir. NS3 proteaz kısmı tipik “kimotripsin” benzeri katlanmaya sahiptir.⁴⁰

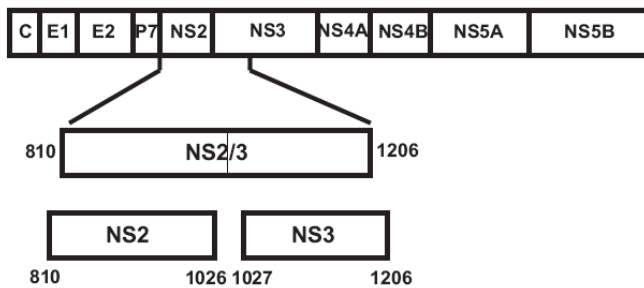
NS3 69 kDa ağırlığında oldukça hidrofobik bir proteindir. Bu protein NS4A kofaktörünü non-kovalent bağlayan N-terminal 1/3'lik bölgesi tarafından kodlanan bir serin proteaza sahiptir.⁴¹

NS3'ün kendisinin bir transmembran bölgesi olmamakla birlikte bir membran proteini olan NS4A'nın orta kısmıyla ilişkidir. NS4A ile birlikte eksprese edildiği zaman ER ve ER benzeri membranlarla ilişki içinde bulunur. Öte yandan tek başına eksprese edildiği zaman sitoplazma ve çekirdekte dağılık haldedir.⁴²

NS3'ün C-terminal son 442 aminoasiti 3'-5' yönünde RNA-RNA kalıbını açan 2DexH/D-box helikaz üst ailesinin bir üyesi olan helikaz-NTPaz kısmını oluşturur. Helikaz aktivitesine NS3 proteaz kısmı ve NS4A'da katkıda bulunur. Bu üst ailenin enzimleri ATP bağımlı bir durumda RNA-RNA yapılarını açma yeteneğindedir.⁴³

4.2.5.1. NS2/3 proteaz

NS2/3 proteaz virus tarafından kodlanan ve HCV poliproteininin işlenmesi için gerekli 2 proteazdan ilkidir. 810 ve 1206.aa'lar arasında olup translasyonu yapılan ilk NS (yapısal olmayan) proteindir (Şekil 3) ve NS2 ile NS3 arasındaki moleküller arası ayırmadan, NS3 bölgesindeki kimotripsin benzeri serin proteaz ise NS3-NS4A, NS4A-NS4B, NS4B-NS5A, NS5A-NS5B arası ayırmadan sorumludur. HCV NS2/3 proteini ise NS3 proteazdan farklı olarak otoproteaz özelliğindedir.⁴⁴



Şekil 3: NS2/3'ün genom yerleşimi

4.2.5.2. NS3 serin tip proteaz ve onun kofaktörü NS4A

NS4A-NS3 intrinsik proteolitik aktiviteye sahip olmasına rağmen poliprotein ayırma işlevi NS4A tarafından belirgin olarak arttırılır. 54 aa'den oluşan bu kısa polipeptid birçok amaca hizmet eder. Birincisi, NS4A'da mevcut olan N-terminal transmembran segmenti aracılığıyla proteazı intrasellüler membranlara yerleştirir. İkincisi, N-terminal proteaz bölgesine katılarak onun doğru katlanmasına katkıda bulunur. Üçüncüsü, proteolitik yıkıma karşı proteazı stabilize eder. Dördüncüsü, proteaz etkinliğini aktive eder.⁴⁵

4.2.5.3. NS3 helikaz

HCV NS3 helikazın kristal yapısı birbirine hemen hemen eşit 3 kısımdan oluşan 'Y' şekilli bir moleküldür.⁴⁶

Üç bölgeden (domain) oluşur. Domain I ve II arasındaki yarık nükleotid bağlama bölgesini oluşturur. Üç bölge arasındaki arayüz ise nükleik asit tanıma ve bağlama bölgesini içerir. Helikaz bölgesi her iki bölgenin birbirine göre dönüş hareketini kolaylaştıran esnek bir bağlantı aracılığı ile serin proteaz bölgesine bağlanır. Böylece sırayla enzimatik aktiviteler düzenlenebilir.⁴⁷

HCV NS3 helikaz, RNA helikazların DEAD-box ailesi üyesi olup bu grup DEAD, DEAH veya DExH aminoasit motifleri içermektedir. HCV NS3 helikaz DExH aminoasit motifi içerdiğinden bu alt aileye aittir. Bu tip RNA helikazlar içindeki korunmuş bölgeler ATP bağlanması ve hidroliz için gerekli motif I (GxGKS) ve motif II (DExH) ile ATP hidroliz ve RNA zincirinin açılmasını sağlayan motif VI (QRxGRxGR)'yı içerirler.⁴⁸

4.2.6. NS4B protein

NS4B en az dört transmembran bölgesi içerdiği tahmin edilen 27kDa'luk integral membran proteindir. ER membranları ile bağlantı halindedir. NS4B viral replikasyonun gerçekleşebildiği yer olan membranöz web olarak da adlandırılan özelleşmiş membran katlantılarının oluşumunu indüklemeye yeteneğine sahiptir.⁴⁹

4.2.7. NS5A protein

NS5A membran yerleşimli bir fosfoproteindir, basal miktarlarda fosforillenmiş (56kDa) ve hiperfosforile (58kDa) şekillerde görülür. Saflaştırılmış proteinin dizi analizlerine dayalı olarak, NS5A'nın 3 bölge içerdiği düşünülmektedir: bölge 1 (1-213.aa'ler), bölge 2 (250-342.aa'ler) ve bölge 3 (356-447.aa'ler).⁵⁰

1995'de, Enomoto ve arkadaşları genotip 1b ile infekte hastalarda interferon sağaltımına yanıt ve NS5A'nın 40 aa'lik bir bölgesindeki mutasyonların sayısı arasında bir ilişki tanımlamıştır. Daha sonra yapılan çalışmalarda bu doğrulanmış olan bu dizi ISDR (interferon sensitivity-determining region) olarak adlandırılmıştır.⁵¹

NS5A aynı zamanda, hücrel antiviral ve antiproliferatif immun yanıtların önemli bir bileşeni olan IFN tarafından indüklenen, çift zincirli RNA ile aktive edilmiş protein kinaz R (PKR)'yi bağlar ve inhibe eder.⁵²

4.2.8. NS5B protein

NS5B kodlayan bölge HCV suşları arasında önemli derecede heterojendir. Bu değişkenlik HCV suşlarının genotipler ve alttipler şeklindeki sınıflandırma sistemini oluşturmakta kullanılmıştır.⁵³

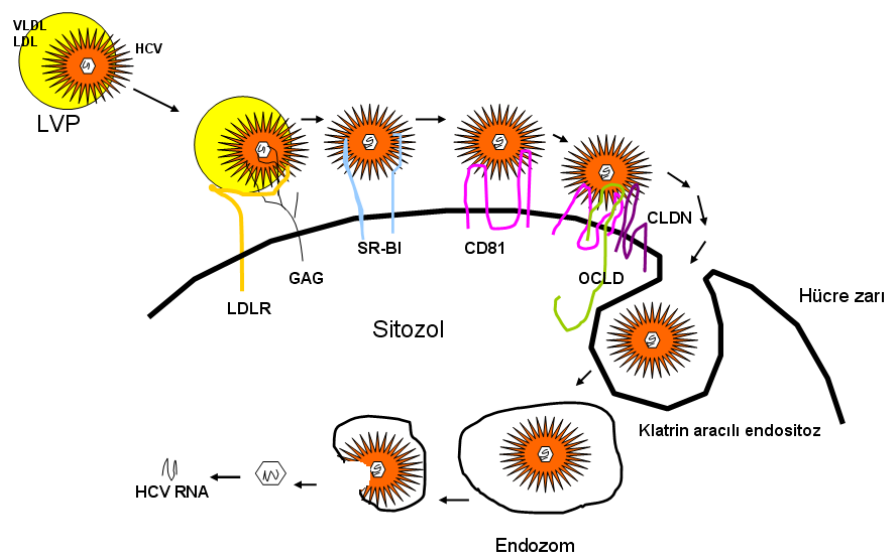
Yaklaşık 68kDa ağırlığında olan bu hidrofilik protein bütün RNA bağımlı RNA polimerazlarda (RdRp) yaygın olan GDD motifi içerir. Bu viral RNA bağımlı RNA polimerazın biyokimyasal aktivitesi divalent katyonlara (Mn^{2+} veya Mg^{2+}), nötrale yakın pH'ya ve çok düşük tuz konsantrasyonlarına bağlıdır. Tahmini HCV RNA kalıp uzama hızı dakikada 150 -200 nükleotid olup NS5B konsantrasyonuna bağlı değildir. Yukarıda bahsedildiği gibi Mn^{2+} veya Mg^{2+} katyonlarının varlığı optimum RdRp etkinliği için esastır.⁵⁴ Mn^{2+} varlığında RdRp etkinliği Mg^{2+} iyonlarının varlığından yaklaşık 20 kat daha yüksektir.⁵⁵

4.3. HEPATİT C VİRUS YAŞAM DÖNGÜSÜ

4.3.1. HCV'nin hücreye girişi

Poliprotein sentezi genomun en korunmuş bölgesi olan IRES (internal ribosomal entry site)'dan başlatılır. Ürün konak ve viral proteazlar tarafından parçalanarak yapısal ve yapısal olmayan proteinlere ayrılır.

HCV virionları E1/E2 proteinlerini içeren konak hücre kaynaklı bir membranla (zarf) çevrili Core (özyapı) ve genomik RNA kopleksinden oluşmaktadır. E1 ve E2 glikozillenmiş proteinler olup virüsün konak hücreye girişinde en önemli rolü oynarlar. Plazmada, HCV virionlarının yoğunluk aralığı 1.06-1.30g/mL arasındadır. Düşük yoğunlukta olan en infeksiyöz olanlardır. Bu virionların düşük ve çok düşük yoğunluklu lipoproteinlerle (LDL, VLDL, apoB100, apoE, apoCII ve apoCIII) kompleks partiküller oluşturduğu gösterilmiştir. Bu kompleksler lipoviropartiküller (LVP) olarak adlandırılır. İnfekte hastalarda, plazma kaynaklı HCV RNA'nın %40'ı trigliseridden zengin LVP'lerle ilişki içindedir (Şekil 4).⁵⁶



Şekil 4: HCV'nin hücreye girişi

Olasılıkla girişteki her adım bir sonraki için gerekli ve tam bir uyum içindedir. Konak hücre membranında HCV'yi yoğunlaştırmak için tutunma faktörü olarak glikozaminoglikanlar ve LDL reseptörünün (LDLR) katılımı önemlidir. Membrandaki ilk toplanma sonrası, HCV partikülleri sonraki adımlarda yüksek afiniteyle giriş faktörlerine bağlanmaktadır. Bu faktörler scavenger receptor BI (SR-BI), tetraspanin CD81 ve tight junction (TJ) proteinlerinden oluşmaktadır. SR-BI lipid taşıyıcıların CD36 ailesine aittir, lipid hemostazını düzenlerler ve önemli bir yüksek dansiteli lipoprotein (HDL) reseptörüdürler.^{57,58,59} SR-BI'in E2 proteiniyle yüksek afiniteyle etkileştiği ve HCV için önemli bir giriş faktörü olduğu gösterilmiştir.⁶⁰

Tetraspanin ailesinden olan CD81'de HCV için önemli bir hücresel giriş faktörü olarak tanımlanmıştır. E2 proteini bu moleküle de yüksek afinite göstermektedir.⁶¹

Yalancı HCV viral partiküllerinin geliştirilmesi sonrası yapılan çalışmalarda SR-BI'in en azından bir dengeleyici (modulator), CD81'inde HCV girişinde esas olduğu anlaşılmıştır. Son araştırmalar tight junctionlar (TJ) claudin (CLDN) ve occludin (OCLN)'in HCV girişinde rol oynadığını desteklemektedir.⁶²

Karaciğerde yoğun olarak eksprese edilen CLDN1 HCV girişi için esastır ve hepatik olmayan hücrelerde ektopik olarak eksprese edildiği zaman HCV'ye duyarlılık oluşturur. Huh-7.5 hepatoma hücre hatlarındaki çalışmalar CLDN1'in HCV'nin hücreden hücreye geçişini de kolaylaştırdığını göstermiştir.⁶³

CD81 ve CLDN1'e karşı antikorlarla yapılan karşılaştırmalı analizler CLDN1'in CD81 ile etkileşim sonrası süreçte rol oynadığını desteklemektedir. Bu iki molekül karaciğer dokusunda birlikte bulunmakta ve koreseptör kompleksleri oluşturmaktadırlar.⁶⁴ OCLN'inde HCV'nin hücre içine girişi sürecinde kritik rol oynadığı anlaşılmıştır.

Ayrıca, bu özgül giriş yollarına ilaveten özel bir inhibitörün yokluğunda HCV'nin karaciğer tropizmine katkıda bulunabilir. CD81'in yeni tanımlanan bir partneri, EWI-2wint, bazı hücre hatlarında eksprese edilmektedir. HCV enfeksiyonuna duyarlı hepatoma hücre hatlarında bu molekülün ektopik ekspresyonunun HCV zarf glikoproteinleri ve CD81 arasındaki etkileşimi inhibe ederek virusun girişini bloke ettiği bildirilmiştir.⁶⁵

HCV aynı zamanda glikozaminoglikanlar, DC-SIGN, L-SIGN gibi diğer molekülleri de bağlar fakat bunlar giriş için esas değildir.

4.3.2. Hücresel döngü ve salınım

HCV'nin nükleokapsidi konak hücrede tutunma ve penetrasyonu kolaylaştıran bir zarfla çevrilidir. HCV esas olarak hepatositler için tropik olmakla birlikte, viral genom ve antijenler diğer hücrelerde de örneğin periferik kan mononükleer hücrelerinde de saptanmıştır.⁶⁶

Giriş faktörlerine bağlandıktan sonra HCV'nin klatrin aracılı endositozla hücreye girdiği düşünülmektedir.⁶⁷

HCV IRES bölgesi 40S ribozomal alt üniteye doğrudan bağlanma özelliğine sahiptir. Bu HCV poliprotein translasyonunun ilk adımını oluşturur. HCV ORF'nin IRES aracılı translasyonu sonradan işlenecek olan poliprotein prekürsörünü oluşturur.⁶⁸

Daha önce bahsedildiği gibi konak ve viral proteazlarca yapısal ve yapısal olmayan proteinler sentezlenir. Genom replikasyonu ise ER membranı ile ilişkili kompleksler içinde gerçekleşir. NS4B tarafından ER membranında replikasyon kompleksi(muhtemelen viral genom, yapısal olmayan proteinler, hücresel kofaktörleri içerir) oluşturulur ve replikasyon burada intrasellüler membranlarda gerçekleşir. Replikasyon negatif zincirin RNA bağımlı RNA polimeraz aracılı sentezi ile başlar. Replikasyonla çift zincirli RNA(dsRNA) yapıları oluşmaktadır.^{69,70}

NS3, helicase/NTPase aktivitesi ile RNA sentezine doğrudan katılmaktadır. Helikaz aktivitesi çift zincirli replikasyon ürününü açar. NTPase aktivitesi de olasılıkla helicaz fonksiyonuyla birlikte hareket eder.⁷¹

Diğer viral RNA polimerazlar gibi NS5B de düzeltme yeteneğinden yoksundur ve yüksek hata oranına (baz bölgesi başına 10^{-4} - 10^{-5}) sahiptir. Bu yüzden yeni HCV genomlarında türümsüleri oluşturabilen mutasyonlar meydana gelir.⁷²

HCV montajının lipid damlacıkları üzerinde olduğu ve core proteininin bu organelin yüzeyini kapladığı düşünülmektedir.⁷³

Nükleokapsid oluşduktan sonra zarf proteinleri E1 ve E2 ile etkileşir ve membrandan tomurcuklanma ile hücreden salınır.⁷⁴

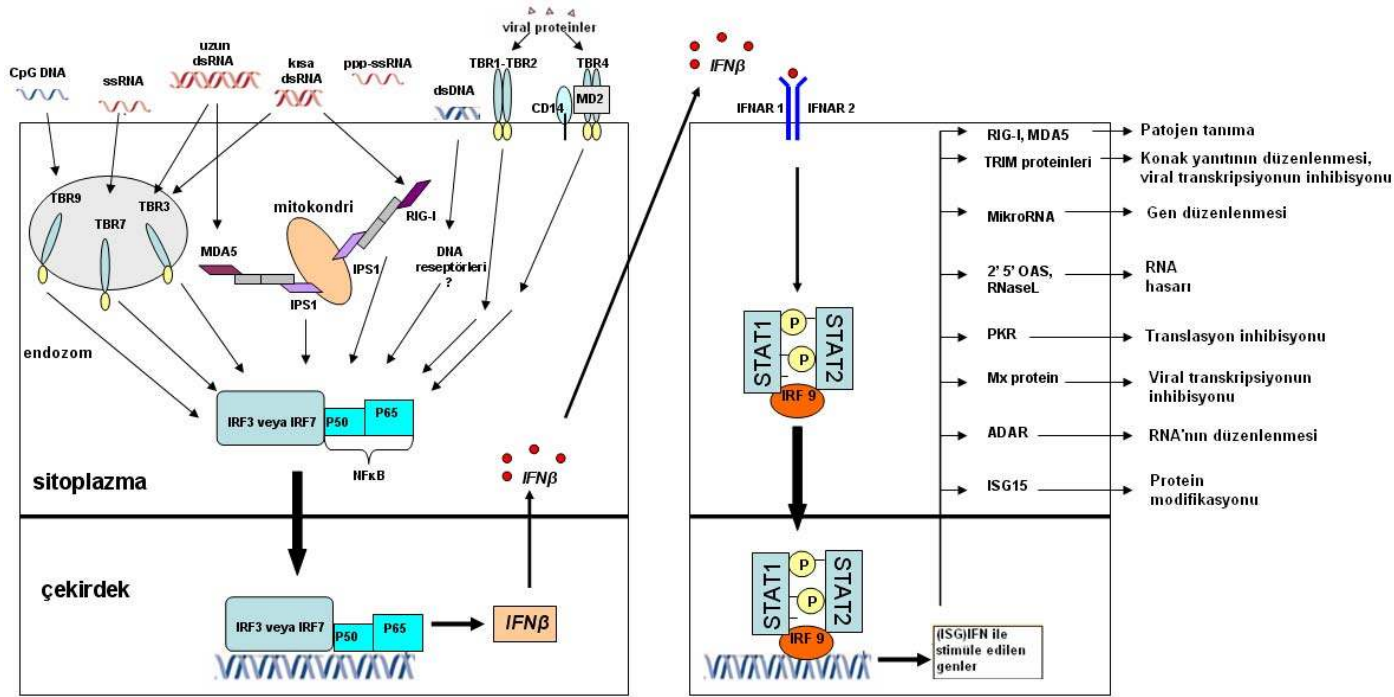
4.4. HCV PATOGENEZİ

HCV enfeksiyonunun bulaş sonrası ilk 6 ayına karşılık gelen akut fazı sırasında hastaların %10-25'i kendiliğinden iyileşir. Bu dönemde HCV'ye özgül güçlü CD8+ T hücre cevabı olasılıkla akut karaciğer hasarından sorumludur. HCV ile enfekte bireylerin çoğunluğu akut fazda virüsü temizleyemez ve enfeksiyon kronikleşmeye başlar. Kronik hepatit C, karaciğer inflamasyonu, fibrozis/siroz ve bazı hastalarda HCC (hepatocellular carcinoma) ile seyreden bir süreçtir.⁷⁵

Viral genom ve antijenler sinuzoidal endotelial hücreler, kupffer hücreleri, periferik kandaki lökositler, lenf nodlarındaki B lenfositler, barsağın epitel hücreleri ve beyinde tesbit edilmesine rağmen, hepatositler HCV enfeksiyonunun primer hedefidir. HCV virionunun yarılanma ömrü, gün başına yaklaşık 10^{12} partikülün temizlenme ve üretim oranıyla 3-5 saattir. Viral üretim günlük hepatosit başına yaklaşık olarak 50 viriondur.⁷⁶

4.4.1. Kuşbakışı Bağışık Yanıt

Patojenlerle ilişkili tanıma reseptörlerinin hepsi (TBR'ler, RNA helicazlar, NOD-Like reseptörler) IRF3, IRF7 ve/veya NFκB'nin aktivasyonunu sağlayan sinyal yollarını başlatırlar. Bu da IFNβ ekspresyonuna yol açar ve birçok ISG ekspresyonunun katıldığı enfekte ve komşu hücrelerde antiviral bir süreç başlatır (şekil 5).⁷⁷



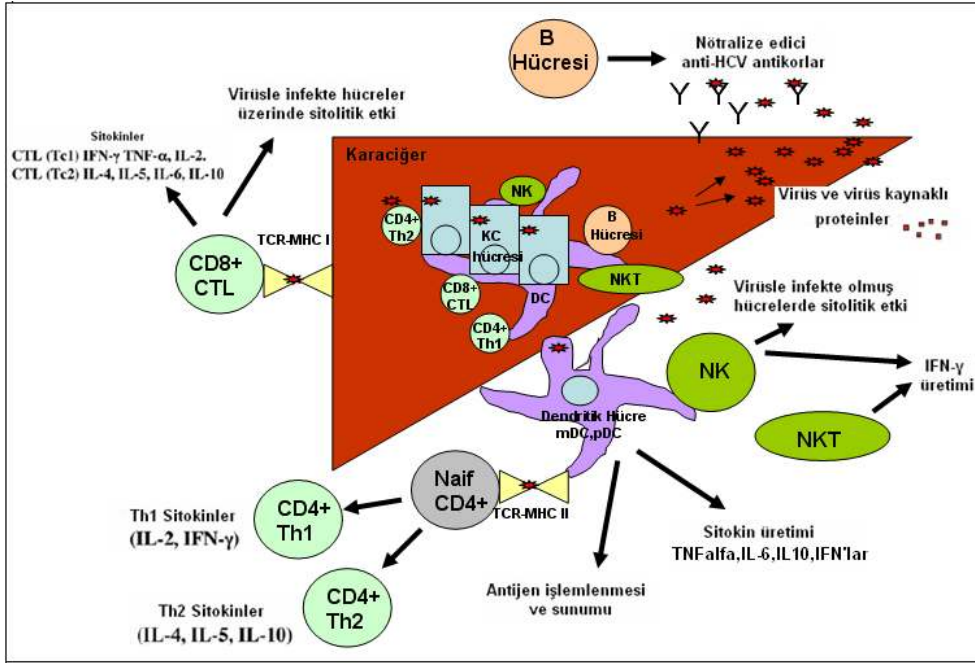
Şekil 5: IFN ve IFN'la indüklenen gen ekspresyonu

HCV karaciğeri infekte ettikten sonra virüs replike olur ve dolaşıma sürekli viral partiküller salınır. İnterferon ve interferon indükleyici gen ifadesi akut HCV infeksiyonundan hemen sonra tesbit edilebilir.⁷⁸

Viral hepatitdeki başlangıç immun cevaplara doğal öldürücü (NK) hücreler, NKT hücreleri, karaciğer makrofajları ve dendritik hücreler katılır. doğal öldürücü (NK) hücreler ve NKT hücrelerinin oranı periferik dolaşımla karşılaştırıldığında karaciğerde yüksektir ve bu hücreler HCV replikasyonunu inhibe eden IFN üretirler. Karaciğerdeki yüksek Tip I IFN cevabı akut İnfeksiyon sırasında görülür, bununla birlikte kaynağın immun hücreler veya parankimal hücreler olup olmadığı açık değildir.

İnfekte karaciğerdeki karaciğer makrofajları ve olgunlaşmamış dendritik hücreler viral antijenleri alma, işleme ve diğer immun hücrelere sunma yeteneğindedir. Bu dendritik hücreler bölgesel lenf nodlarına göç edebilir ve naif T lenfositleri aktive ederek yardımcı CD4+ T hücre alt tiplerinin oluşumunu etkileyebilirler.

CD4+ T hücreler salgıladıkları sitokinler aracılığı ile bağışık yanıtı düzenleyici etkinliğe sahiptirler. Bunun sonucunda yanıt Th1 ya da Th2 yönüne kayar. Th1 (sitotoksik T lenfosit) tipi bağışık yanıtlar sitotoksik T lenfositlerin çoğalmasını, sitokin salınımını (IL-2, IFN, TNF) içerirken Th2 tipi immun cevaplar B hücre aktivasyonu, antikor üretimi ve IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 sitokinlerinin salınımını içerir.⁷⁶



Şekil 6: HCV'na immün yanıt. Viral hepatitis C'ye immün cevaplara hem doğal (innate) hemde edinsel (adaptif) immün sistem katılır. Doğal immunitenin elemanları kalıcı karaciğer makrofajları, dendritik hücreler, NK hücreleri, NKT hücreleridir. Edinsel (adaptif) bağışık yanıtın elemanları ise CD4+ T hücreler, CD8+ Th hücreler ve B lenfositlerdir. CTL, sitotoksik T lenfosit; HCV, hepatitis c virüs; IFN, interferon; IL, interlökin; MHC, major histocompatibility complex; NK, natural killer; TNF, tümör nekroz faktör.

4.4.2. Hepatositin yanıtı

Bütün çekirdekli memeli hücreleri tip I IFN salabilmesine rağmen, ilk cevabın infekte hepatositlerden salınan IFN- β olduğu düşünülmektedir. Bu cevap 2 PRR (pattern recognition receptor), TBR3 ve retinoic acid-inducible gene I (RIG-I) tarafından başlatılır. TBR3 endozomlarda çift iplikli DNA'yı, RIG-I ise sitoplazmada HCV 3'UTR'nin poliüridin motifini tanıır. Aktivasyon sonrası TBR3 TRIF (Toll-IL-1 receptor domain-containing adaptor inducing IFN- β) adaptör molekülünü ve RIG-I ise IFN- β promoter stimulator protein 1 (IPS-1; CARD adaptor inducing IFN- β 'CARDIF', virus-induced signaling adapter 'VISA' ve mitochondrial antiviral signaling protein 'MAVS') adaptör molekülünün aktivasyonunu sağlar. Her iki süreç bir dizi reaksiyonla devam ederek IRF3 (IFN regulatory factor 3)'ün çekirdeğe taşınması ve IFN- β sentezi ile sonuçlanır. Salınan IFN- β 'nın hem salındığı hemde komşu hücrelerdeki IFN- α/β reseptörlerine bağlanır. Bu bağlanma JAK/STAT yolağını aktive ederek çeşitli ISG'lerin uyarılmasına neden olur. Bu ISG'lerin ürünleri arasında başlıcaları viral ve hücre RNA'yı yıkan OAS1/RNase L ve ds RNA zincirlerindeki adenosin residülerini inozin rezidülerine dönüştürüp viral RNA yapılarını mutasyona uğratan RNA özgül ADAR1 proteindir.

Bu genler aynı zamanda viral ve konak RNA'larının translasyonunu inhibe eden P56 ve PKR'yi de kapsar. ISG'lerin indüksiyonu IFN cevabını artırır. Bir ISG olan IRF7 IFN- α alt tipini stimüle eder.^{79,80,10}

HCV birçok seviyede IFN cevabını zayıflatır. Önemli bir faktör HCV NS3/4A proteindir. Hücre kültürlerinde eksprese edildiği zaman TRIF ve IPS-1 adaptör moleküllerini yıkar ve TBR3 ve RIG-I sinyalini engeller. Engellenen bu sinyal moleküllerinin ekspresyonu bu

apoptozunu da indüklemektedir. İkincisi, HCV'nin kendisi IFN- α üretimini inhibe etmektedir.

Dendritik hücrelerin ikinci grubu, konvansiyonel DC'ler (cDC), dokularda bulunur ve afferent lenfatikler üzerinden antijeni lenf nodlarına taşırlar. İşlevsel defekti olan cDC'ler olasılıkla yetersiz T hücre etkinleştirilmesi ve gecikmiş HCV'ye özgül T hücre yanıtlarına neden olurlar.

HCV enfeksiyonu sırasında cDC'lerin hem olgulaşma hemde farklılaşma işlevleri değişmiş, IL-12 üretimi azalmış, IL-10 üretimi artmıştır.

4.4.4. Doğal Öldürücü (NK) ve NKT hücrelerinin yanıtı

Bu hücreler normal karaciğerde intrahepatik lenfositlerin %20-30 kadarını oluşturabilir. İnfekte hücrelerin sitolizi, IFN γ gibi viral replikasyonu inhibe eden sitokinlerin üretimi ve hem DC hemde T hücre aktivasyonu ile viral replikasyonu kontrol edebilirler. NK hücreleri üzerinde eksprese edilen KIR (killer inhibitor receptor) ve hedef hücreler üzerinde eksprese edilen HLA (Human leukocyte antigen) arasındaki ilişki NK hücre aktivasyonunda önemli bir role sahiptir. Bu yüzden hastaya ait bireysel KIR/HLA ekspresyon düzeyleri NK hücrelerinin aktivasyon eşiğini belirlemede, NK hücre aracılı öldürmede ve IFN γ salınımında önemlidir.^{3,82}

HCV ile infekte hastalardan alınan NK hücrelerinin inhibitör reseptörleri (CD94/NKG2A) yoğun olarak eksprese ettiği TGF- β ve IL-10 gibi edinsel immun yanıtı azaltan sitokinler ürettiği bildirilmiştir.⁸³ Mevcut bazı çalışmalar HCV E2 proteininin CD81 aracılığıyla doğrudan NK hücrelerini inhibe ettiğini ileri sürmektedir.⁸⁴ Bununla birlikte HCV E2 NK hücreleri üzerindeki CD81'e etkili bağlanamaz ve hücre kültürlerinde in vitro yüksek maruziyet sonrası NK hücre fonksiyonları sağlam kalmaktadır.⁸⁵

4.5. AKUT HCV İNFEKSİYONU

HCV'nin en önemli bulaş yolu parenteraldir. İnkübasyon periyodu ortalama 7-8 hafta olmakla birlikte bu süre 2-26 hafta arasında değişmektedir. Prodromal semptomlar nadirdir ve vakaların sadece %20'sinde sarılık mevcuttur. Belirtilerin (bulantı, sarılık, idrarda koyulaşma, halsizlik) görülmesiyle ALT düzeyleri de yükselir. Bulaşı takiben 1-2 haftaya kadar HCV RNA saptanabilmekte ve viral yük 10^6 - 10^8 kopya/mL düzeylerine çıkabilmektedir.⁸⁶

HCV enfeksiyonunun önemli özelliklerinden biri HCV titrelerindeki artış ve ISG'lerin indüksiyonuna rağmen gecikmiş bağışık yanıtlardır. HCV'ye özgül T hücreleri enfeksiyon sonrası 5.-9. haftalarda ve HCV'ye özgül antikorlar yine enfeksiyon sonrası 8.-20. haftalarda saptanabilir seviyelere ulaşır.⁸⁷

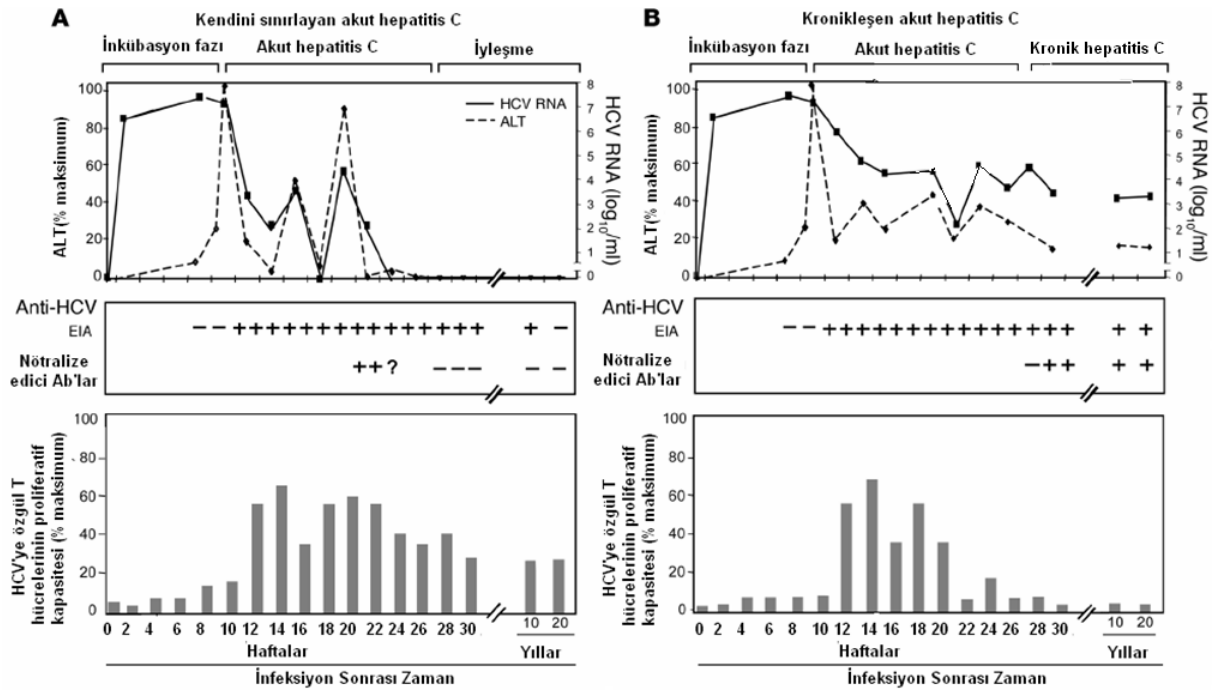
4.5.1. Sıvısal bağışık yanıt

Antikorlar, patojenlere karşı konak savunmasında nötralizasyon, kompleman aktivasyonu, opsonizasyon, antikor bağımlı hücre aracılı sitotoksiste gibi mekanizmalarda önemli rol oynarlar. Bazı çalışmalar, core (özyapı) proteini hariç, HCV enfeksiyonunda oluşan antikor yanıtlarının düşük titrelerde olduğunu göstermektedir. Bir diğer görüş ise, virusa karşı sıvısal

yanıtların olgunlaşması ile ortaya çıkan Ig (immunglobulin) alt sınıflarındaki dönüşümün yetersiz olması, HCV infeksiyonuna sıvısal yanıtın IgG 3 (veya IgG 4) alt sınıfına dönüşmeksizin IgG 1 alt sınıfı ile sınırlı kalmasıdır.

HCV infeksiyonu bağışıklığı baskılanmış hastalarda sıvısal yanıtlar ortaya çıkmaksızın iyileşebilmektedir. Bu tip hastalarda nötralize edici antikorlar geç ortaya çıkar ve izolata özgüdür. İzolata özgül nötralize edici antikor yanıtlarının HCV iyileşmesiyle ne kadar ilişkili olduğu henüz açıklık kazanmamıştır.⁸⁸

Bununla birlikte kronik HCV infeksiyonu gelişen durumlarda nötralize edici antikor titreri artmakta ve birçok HCV genotipine karşı çapraz reaksiyon vermekte fakat bu virüsleri temizlemekte başarısız olmaktadır.⁸⁹



Şekil 8: HCV'de klinik, immunolojik ve virolojik seyir. **A)** Kendini sınırlayan Akut hepatit C; inkübasyon fazı infeksiyonu takiben 2- 3 aydır. Çoğu hastada ALT seviyesi yükselir. HCV'ye özgül antikorlar bu dönemde "enzyme immunoassay" EIA ile saptanabilir. HCV antijenlerine cevap olarak HCV'ye özgül T hücreleri kanda tesbit edilebilir. **B)** Kronikleşen Akut hepatit C; HCV RNA seviyeleri nispeten stabildir veya 1 log₁₀'dan daha fazla değişmez. HCV'ye özgül T hücre reaktivitesi zamanla azalır. HCV antijenlerine cevap tesbit edilemeyecek kadar düşüktür.

Kronik hepatit C'de IgG ve IgG salgılayan B hücrelerinin sıklığı da artmıştır. Bununla birlikte bu Ig'ler ve onları salgılayan B hücreleri HCV'ye özgül değildir.⁹⁰

4.5.2. T hücre Yanıtları

Antikorların aksine HCV'ye özgül T hücreler infeksiyonun ortadan kaldırılması için kritik öneme sahiptir. Özellikle HCV'ye özgül CD4+ T hücreleri başarılı bir özgül bağışık yanıt için çok önemlidir. Bu hücreler hem sitokin salgılayarak hemde virüse özgül B ve CD8+ T hücrelerini aktive ederek yanıt oluşturulmasında farklı yollardan etkili işleve sahiptir. Özellikle iyileşen hastalarda klinik bulguların ortaya çıkışı ve ALT artışları ile aynı zamanda HCV'ye özgül CD4+ T hücrelerinin yoğun artışı ve IL-2 ve IFN- γ üretimi dikkat çekicidir. Aksine kronik infeksiyon gelişenlerde CD4+ T hücre cevabı yok veya çok azdır. Başlangıçta yüksek olan hücre yanıtı tekrar eden viremi ile kayba uğramaktadır.^{91,92}

Akut HCV infeksiyonunda CD8+ T hücreleri çoğalabilmelerine rağmen, IFN- γ üretiminde yetersiz kalmaları dolayısı ile sitotoksik aktivite bakımından sersemlemiş (stunned) durumdadırlar. Bu sersemlemiş sitotoksikite gösteren fenotipin viral bir faktör tarafından mı indüklendiği yoksa olgunlaşmanın bir adımındaki bozukluk mu olduğu henüz bilinmemektedir.⁹³

İnfeksiyonun bu aşamasındaki antiviral sağaltım CD8+ T hücre yanıtlarında hızlı bir düşüşe sebep olur. Bu da HCV'ye özgül CD8+ T hücrelerinin kısa yaşam ömürlü ve antijen bağımlı efektör hücreler olduğunu desteklemektedir. Öte yandan HCV'ye özgül CD8+ T hücre disfonksiyonu HCV'ye özgül CD4+ T hücre yanıtları gelişir gelişmez düzelir ve HCV titreleri düşer.

HCV'ye özgül T hücre yanıtları, periferik kan ve karaciğerde HCV RNA titreleri ile izlenebilir. Bu izlemlerde IFN- γ indüksiyonunun HCV RNA titrelerindeki azalma ile paralel gittiği bildirilmektedir. İyileşen bireylerde yapılan proliferatif deneylerde tanımlanmış 37 HCV epitopundan 10'una karşı immün yanıt olduğu gösterilmesine rağmen kronik infeksiyonu olanlarda bir epitopdan daha fazlasına karşı özgül yanıt saptanmamıştır.⁹⁴

Spontan iyileşen HCV ile infekte bireylerde özgül CD8+ T hücre yanıtları çok sayıda epitopu hedef alan yaygın ve kuvvetli bir nitelik gösterir. Buna karşın kronikleşen infeksiyona maruz bireylerdeki yanıtlar sıklıkla zayıftır ve sadece bir ya da birkaç epitopu hedef alır.^{95,96}

Eğer HCV'ye özgül CD4+ T hücre yanıtları yetersizse kronik infeksiyon gelişmektedir. CD4+ T hücre yanıtlarının HCV infeksiyonunun kontrolü için kritik olduğu ve bu yanıtlar olmaksızın HCV'ye özgül CD8+ T hücrelerinin ve nötralize edici antikorların gelişebildiği fakat vireminin kontrolünde başarısız kaldıkları gösterilmiştir.

CD8+ T hücreler hem sitotoksik hemde IFN- γ ve TNF α gibi sitokin üretimine aracılık eden etkilere sahiptir. İnvitro çalışmalar IFN α/β kadar IFN- γ 'nında HCV replikasyonunu inhibe edebildiğini göstermektedir.⁹⁷

4.6.KRONİK HCV İNFEKSİYONU

Kronik HCV infeksiyonu HCV'ye özgül T hücrelerinin sürekli aktivasyonu, bozulmuş işlevleri ve azalan miktarlarıyla ilişkilidir. Bu tür hastaların HCV titrelerinde önemli oynamalar (1 log₁₀ üzerinde) ve ALT iniş çıkışları gözlenirken spontan iyileşme çok nadirdir.⁹⁸

4.6.1. Sürekli antijenik uyarımla oluşan fonksiyon bozukluğu

Kronik olgularda HCV'ye özgül CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin bütün efektör fonksiyonları bozulmuş ve INF- γ üretimi azalmıştır.

CD4+ T hücrelerinin azalmış IL-2 üretimi ile CD8+ T hücrelerinin işlevsel bozukluğu arasında bir ilişki gözlenmiştir. Hepatit C enfeksiyonunun kronikleşmesinden önceki dönemde CD3+CD56+ T hücrelerinin IL-2 aktivasyonlu öldürme yeteneklerinde azalmanın oluştuğu gösterilmiştir.⁹⁹

HCV özyapı (core) proteini komplemanın komponenti C1q (Bakteri ve virüslerle ilk karşılaşmalarda önemli)'nin reseptörü olan, özellikle CD8+ T hücre yüzeylerinde ekspresse edilen, gC1qR reseptörüne de C1q'ya benzer bir afinite ile bağlanmakta ve T hücre uyarılmasında önemli olan Lck/Akt aktivasyonunu engellemektedir.¹⁰⁰

İşlev bozukluğu gösteren özgül T hücreleri kronik antijenik stimülasyonun bir sonucu olarak inhibitör reseptör PD-1'i ekspresse ederler. T hücreleri üzerindeki PD-1'in bunun kendi ligandı PD-1L (sinüzoidal endotelial hücreler, Kupffer hücreleri, stellate hücreler ve tip I INF'a maruz kalmış hepatositlerde ekspresse edilir) ile etkileşimi efektör hücrenin fonksiyonlarını inhibe eder ve T hücre apoptozunu indükler.¹⁰¹

4.6.2. Regülatör T hücre (Treg) indüksiyonu

Treg'ler doğal veya indüklenmiş T hücre topluluğundan kaynaklanır. Doğal CD4+ Treg'ler temel olarak "transcription factor forkhead box P3"(FoxP3), "IL-2R α chain"(CD25) ve "glucocorticoid-induced TNF receptor family-related gene"(GITR) ekspresse ederler. Bunlar timusdaki normal T hücre gelişimi sırasında üretilirler. Oysaki indüklenmiş Treg'ler olgun T hücrelerinden kaynaklanır.¹⁰²

CD4+CD25+ Treg'ler HCV'ye özgül T hücre yanıtını baskılayarak viral dirençte rol oynayabilir. CD4+CD25+ T hücrelerinin baskılanması HCV'ye özgül CD4+ ve CD8+ T hücre proliferasyonunu arttırmaktadır.¹⁰³

Kronik HCV enfeksiyonlu hastalar HCV'ye özgül CD4+CD25+ Treg'lere sahiptirler ve kronik HCV enfeksiyonlu hastalarda bu hücrelerin sıklığı iyileşen hastalardan çok daha yüksektir. HCVcore proteini tarafından Treg'lerin indüklendiği CD4+ T hücre yanıtını inceleyen bir çalışmada gösterilmiştir.^{104,105}

CD4+CD25+ Treg'ler HCV'ye özgül sitotoksik T hücrelerinin yanıtını baskılamaktadır. Buda HCV ile enfekte hastaların çoğunda, HCV'ye özgül antikorların ve T hücre yanıtının indüksiyonuna rağmen, neden dirençli enfeksiyona sahip olduğunu açıklayabilir.

HCV ile enfekte hastalarda CD4+CD25+FoxP3+Treg ve CD+8CD25+FoxP3+Treg hücreleri iyileşen ve sağlıklı kontrollerden daha yüksek olduğu tespit edilmiştir. Ayrıca bu hücreler IL-10 ve TGF- β salgılayarak HCV'ye özgül CD4+ ve CD8+ T hücrelerini inhibe ederler.^{106,107}

4.6.3. IL-10 etkinliği

Kronik HCV enfeksiyonunda IL-10 seviyeleri tipik olarak artmıştır. IL-10, HCV'nin core proteini aracılı TBR2 (Toll Benzeri Reseptör 2) stimülasyonuna cevap olarak monositler tarafından da salınır. IL-10, IFN- α üretimini inhibe ederken, pDC apoptozunu teşvik eder ve efektör T hücre yanıtını azaltır.

IL-10 makrofajlar, DC'ler, B hücreleri, CD4+ ve CD8+ T hücrelerinin çeşitli alt tipleri tarafından salınır. İlk kez Th1 hücrelerinde sitokin sentezini inhibe eden Th2 hücrelerinin bir

ürünü olarak tanımlanmıştır. IL-10'un T hücre ve NK fonksiyonları üzerindeki etkileri, IL-10'un monosit-makrofajlar üzerindeki direk etkisi aracılığıyla oluşturulur. IL-10 özellikle, MHC sınıf II ve yardımcı uyarıcı molekül B7-1/B7-2 ekspresyonunu monosit ve makrofajlarda inhibe eder. Proinflamatuvar sitokin ve kemokinlerin ekspresyonunu sınırlar. DC'lerde IL-10 sinyali kemokin üretimine ve lenf nodlarına DC göçünün inhibisyonuna neden olur. Dolayısıyla naif T hücre olgunlaşmasında yanıtın Th1 farklılaşmasına kaymasını engelleyebilir. Bununla birlikte doğrudan CD4+ T hücreler üzerine etki ederek IL-2, IFN γ , IL-4, IL-5 ve TNF- α üretimini de inhibe edebilir. Ayrıca DC'ler tarafından üretilen IL-10 Treg'leri uyatarak IL-10 yanıtının artırılmasına ve Th1 hücre aktivitesinin engellenmesine neden olabilir. IL-10 Lenf nodlarında da T hücre aktivasyon ve farklılaşmasını sınırlayarak doğal bağışık yanıt ve edinsel Th1/Th2 yanıtlarını doğrudan etkileyebilir.^{10,108,109}

4.7. HCV TANISI

4.7.1. Serolojik testler

-Antikor saptanması

EIA (enzyme immunoassay): Tarama amacıyla anti HCV antikor saptanması

RIBA (recombinant immunoblot assay): doğrulayıcı anti HCV testi

-Antijen tesbiti

HCV core antijeninin saptanması ve kantitasyonu için ELISA geliştirilmiştir. Doğruluğu ve özgüllüğü iyi fakat duyarlılığı düşüktür (20 000IU/mL).

Şekilde serolojik testlerde kullanılan HCV poliproteinine ait çeşitli epitoplar görülmektedir. Kullanılan epitoplar arttıkça duyarlılık da artmıştır.

HCV Poliprotein									
Testler	Core	E1	E2/NS1	NS2	NS3	NS4	NS5	Duyarlılık	Özgüllük
ELISA									
1. Kuşak						c100-3 (a.a.1569-1931)		%80	%30
2. Kuşak	c22-3 (a.a.2-120)				c200 (a.a.1182-1931)			%92.95	%88.95
3. Kuşak	c22-3 (a.a.2-120)				c200 (a.a.1182-1931)		NS5 (a.a.2054-2995)	%97.99	≥%99
SIA									
3. Kuşak	c22p (a.a.10-53)				c33c (a.a.1192-1457)	5-1-1p (a.a.1694-1735) c100p (a.a.1920-1935)	NS5 (a.a.2054-2995)	≥%99	≥%99
EIA									
2. Kuşak	HC-34 (a.a.1-150)				HC-31 (a.a.1192-1457 ve 1676-1931)			%92.95	%88.95
						c100-3 (a.a.1569-1931)			

Şekil 9: Serolojik testler için kullanılan HCV antijenleri

4.7.2. Nükleik asid testleri

Kantitatif HCV RNA saptanması:

-Polimerize zincir tepkimesi (PZT)

-Transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA)

-Sinyal amplifikasyon teknikleri (bDNA assay)

Kalitatif HCV RNA saptanması;

Saptama sınırı en az 50 IU/mL olmalıdır.

-Polimerize zincir tepkimesi (PZT)

- Transkripsiyon aracılı çoğaltma (TMA)

4.7.3. Genotipleme testleri

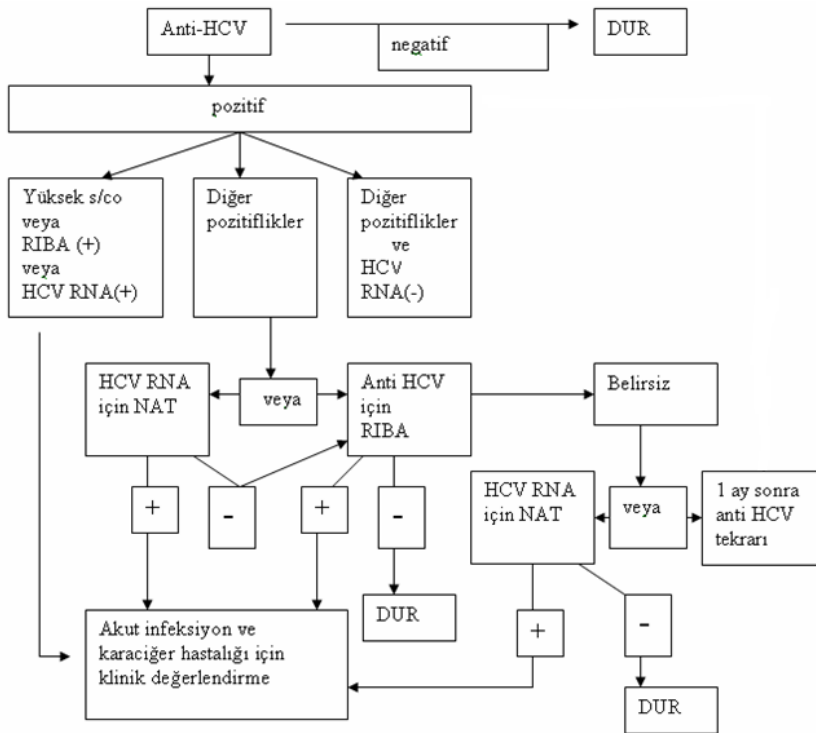
- Oligonükleotid prob hibridizasyonu

- Doğrudan DNA dizi analizi

Genotipler arasında önemli derecede korunmuş 5'UTR, NS5B ve core bölgelerindeki nükleotid farklılıklarına dayalı testlerdir.

- Serolojik genotipleme:

HCV core ve NS4'deki genotip özgül epitoplara karşı oluşan antikorları tesbit eden serolojik metodlardır. Düşük duyarlılık ve özgüllüğe sahiptir.¹¹⁰

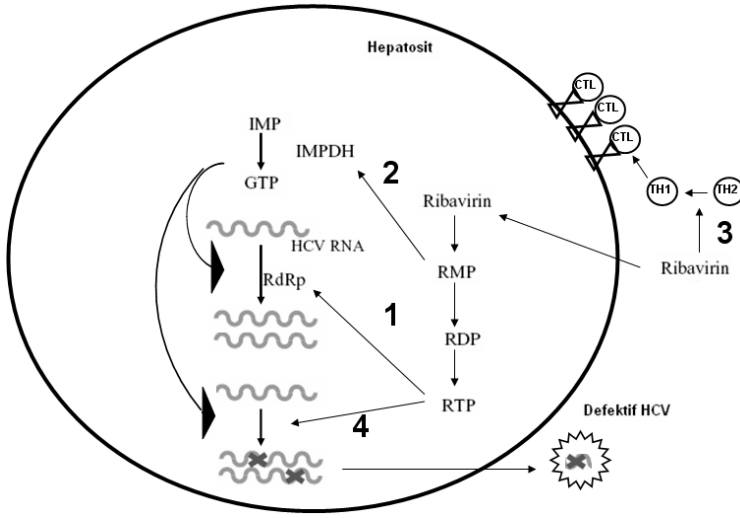


Şekil 10: HCV tanı algoritmi: NAT; Nükleik asid testi, RIBA; Recombinant immunoblot assay.¹¹¹

4.8. HCV SAĞALTIMI

Kronik HCV infeksiyonunun güncel sağaltımı halen pegillenmiş interferon ve ribavirin ikilisinden oluşmaktadır. İnterferon hem antiviral hem de hücre içi yolları üzerine etkileri aracılığıyla (Şekil 5) immun sistemi uyarıcı (naturel killer aktivasyonu, DC olgunlaşması, hafıza T hücrelerinin gelişimi, T hücre apoptozunun önlenmesi) özelliklere sahiptir.

Ribavirin bir nükleosid analogudur. Tam etki mekanizması bilinmemekle birlikte ileri sürülen mekanizmalar şekilde sunulmuştur.¹¹²



Şekil 11: Ribavirin etki mekanizması 1-HCV replikasyonunun direk inhibisyonu 2-IMPDH enzim inhibisyonu(inosine-monophosphate-dehydrogenase) 3-İmmunmodülasyon 4-defektif virionlara yol açacak mutasyonlar

Kalıcı Virolojik Yanıt (KVY): Sağaltım esnasında tesbit edilebilir HCV RNA kaybı veya sağaltım bitiminden sonraki en az 6 ay için devam eden HCV RNA yokluğu olarak tanımlanır.

Standart sağaltım ile genotip 2 ve 3’de %80, genotip 1’de %40-50 civarında başarı oranı vardır.¹¹³

4.9. HCV NS3 PROTEİNİNİN EPİTOPLARI VE PATOGENEZDEKİ OLASI ROLLERİ

631 aa’lık HCV NS3 proteini 5 bölgeden (Domain) oluşmaktadır. Amino ucundaki 2 bölge (ilk 180 aa) NS4A kofaktörü ile birlikte serin proteazı, karboksi ucundaki 3 bölge ise helikaz’ı oluşturur. Proteaz kısmı helikaz kısmına göre daha hidrofobiktir. Bu proteinin her ikisinin de işlevsel olması diğerinin etkinliği için gereklidir. NS3 proteininin elektrostatik analizleri proteaz ve helikazın domain 2’si arasında pozitif yüklü bir yarık bulunduğunu göstermiştir. Bu yarıkdaki aa’lar RNA’nın negatif yüklü omurgasına proteini bağlayabilmektedir.¹¹⁴

HCV poliprotein işlemlenmesinin ve replikasyonunun yanı sıra, indüklenabilir nitrik oksit sentaz (iNOS) genlerinin aktivasyonuna ve dsDNA kırıklarına sebep olan reaktif oksijen türlerinin üretimine katkıda bulunduğu gösterilmiştir.¹¹⁵

NS3’ün transforming growth factor- α /Smad3-aracılı apoptozu bloke ettiği, INF- β indüksiyonunu baskıladığı ve böylece dirençli HCV enfeksiyonunun oluşumuna yardım ettiği ayrıca tümör baskılayıcı p53’ün fonksiyonunu inhibe ettiğide bildirilmiştir. Bu yüzden NS3 proteininin HCV’nin çoğalması ve onkogeneizde önemli bir rolü olduğu görülmektedir.^{116,117,118}

HCV NS3 proteini işleme ve replikasyondaki fonksiyonlarından dolayı sağaltım açısından bu proteine karşı inhibitörlerin geliştirilmesi için önemli bir hedef molekül olmaktadır. İyileşen hastalardan izole edilen HCV'ye özgül sitotoksik T lenfositlerin NS3 bölgesindeki epitoplara tanıdığı gösterilmiştir.^{119,120}

HCV RNA genomu replikasyon sırasında mutasyonlara uğramaktadır. Fakat bazı epitoplara çok az mutasyon geçirmektedirler. Bunun en iyi örneklerinden biri NS3 proteazın 1073 -1081 residülerine denk gelen epitopu çok az değişkenliğe sahip ve immunodominant HLA-A2 sınırlı bir CTL epitopudur. Bu korunmuşluk HCV NS3 proteinin proteaz ve NTPaz/helikaz aktivitesi için önemlidir ve enzim bölgelerindeki mutasyonlar virüs için ölümcül olabilir.¹²¹

Gerlach JT ve arkadaşları geçici veya kalıcı viral kontrolü sağlayan hastalarda NS3'e ait immunodominant ve yüksek derecede korunmuş olan bir dizi CD4+ T hücre epitopunu tanımlamışlardır.¹²²

HCV enfeksiyonundan iyileşmiş 22 kişiyle tüm HCV NS proteinleri ile yapılan bir çalışmada CD4+ T hücreler tarafından en sıklıkla tanınan 6 peptidin 3'ü(PAAYAAQGYKVLVLNPSVAA-aa1241 -1260, TPAETTVRLRAYMNTPLPV-aa1531-1550, ENLPYLVAAYQATVCARAQAP- aa 1581-1600) HCV NS3 bölgesindedir. İyileşenlerin %50'sinden daha fazlasında en sık tespit edilen 2 tanesi NS3(aa1241 -1260) ve NS4(aa1771 -1790)'ya aittir. Bu kişilerin %30'undan fazlası tarafından tanınan peptitlerin 4'ünden 2'si (aa1531-1550), (aa 1581-1600) NS3 proteinine aittir.¹²³

HCV NS3 proteini gerek fonksiyonları gerekse içerdiği T hücre epitoplara açısından Tam Kan'da, PBMC'lerde veya soyutlanmış hücrelerde HCV'ye immun yanıtı değerlendirmede, sağaltımda ve aşı geliştirme çalışmalarında aday bir proteindir. NS3 proteininin CD4+ ve CD8+ T hücre epitoplarının bazıları Tablo 1 ve 2'de¹²⁴ özetlenmiştir.

GQGWRLAPITAYSQ	1020-1034	
YLVTRHADVPVRRRGDSRG	1131-1150	
LETTMRSPVFTDNSSPPVVP	1201-1220	
PAAYAAQGYKVLVLNPSVAA	1241-1260	
GKVLVLNPSVAAT	1248-1261	DRB1*1101, DRB1*1201, DRB1*0401, DRB1*1302, DRB1*1601
GKVLVLNPSVAATLGFG	1248-1265	
GKVLVLNPSVAATLGFAY	1248-1267	DQB1*0301
VLVLNPSVA	1251-1259	DRB1*1101, DRB1*1201, DRB1*0401, DRB1*1302, DRB1*1601
VLVLNPSVAA	1251-1260	DRB1*1101, DRB1*0401, DRB1*1201, DRB1*1302, DRB1*1601
ITYSTYGFADGGCSGGAY	1291-1310	
TDATSLIGITVLDQAETAG	1321-1340	
VIKGRHLIFCHSKKKCD	1384-1401	DR15, DRB1*15
VIKGRHLIFCHSHHCD	1384-1401	HLA-DRB1*15
GRHLIFCHSK	1388-1397	DRB1*1501/DRB5*0501
GRHLIFCHSKR	1388-1398	DRB1*1502/DRB1*1104
VAYYRGDVS	1415-1425	DRB1*1501
MPAETTVRLRAYMNTPG	1531-1547	HLA-DR
TPAETTVRLRAYMNTPLPV	1531-1550	
RAYMNTPLPV	1539-1550	DRB1*1502/DRB1*1104
RAYMNTPLPV	1540-1550	DRB1*0701
AYMNTPLPV	1541-1550	DRB1*0101/DRB1*0701
ESVFTGLTHIDAHFL	1559-1573	
ENLPYLVAAYQATVCARAQAP	1581-1600	
NLPYLVAAYQATVCA	1585-1594	DRB1*0101/DRB1*0701
YLVAAYQATVC	1585-1594	DRB1*0301/DRB1*1501
YLVAAYQATVCA	1585-1595	DRB1*1501
TAYQATVCARAQAPP	1587-1601	
DGMWLKCLIRLPTLH	1605-1619	
PTPLLYRLGAYQNEITLTHP	1621-1640	
PVTKYIMACSADLES	1640-1655	

Tablo 1: İnsan CD4+ T hücre epitoplara

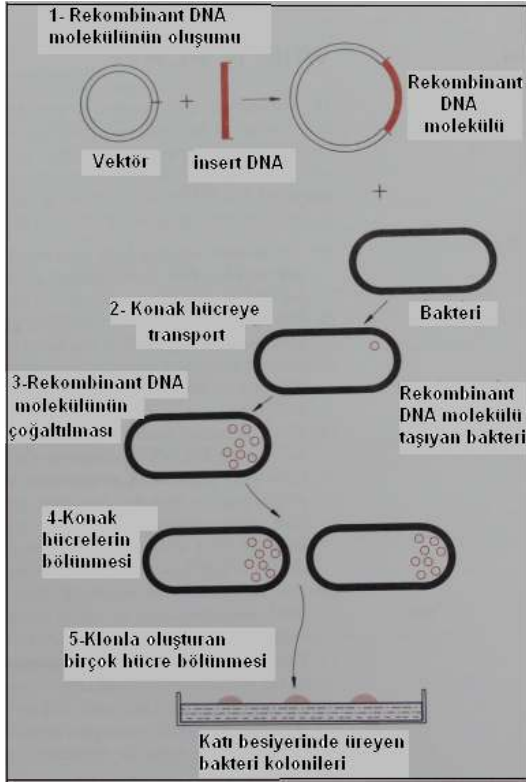
AYSQQRGL	1031-1039	A24
GLLGCITSL	1038-1047	A2.1
QTFLATCINGVCWTV	1067-1081	
ATCINGVCWTVYHGAGTRTI	1071-1090	
CINGVCWTV	1073-1081	
AGTRTIASPKGPVIQM	1085-1100	
RRRGDSRGSLLSPRP	1143-1157	
LLCPAGHAV	1169-1177	A2
CPAGHAVGIFRAAVCTRGVA	1171-1190	
HAVGLFRAA	1175-1183	A68
AYAAQGYKVL	1243-1252	Cw*0303,Cw*0304
TLGFGAYMSK	1261-1270	A11
LGFGAYMSK	1262-1270	A3
GAYMSKAHGV	1265-1274	A11
TITGAPVTYSTYK	1284-1298	A2
TGSPITYSTY	1287-1296	A2
TYSTYKFL	1292-1300	A*2402
CHAQDATTVL	1318-1327	B38
HPNIEEVAL	1359-1367	B*3501
GEIPFYGKAI	1371-1380	
LIFCHSKKK	1391-1399	A3
HSKKKCDEL	1395-1403	B8
ATDALMTGY	1395-1403	
ELAAKLVAL	1402-1410	B8
LAACLVALGINAVAY	1403-1417	
KLYALGINAV	1406-1415	A2
ATDALMTCY	1436-1444	A1
GFTGDFDSV	1443-1451	A*0206
MFDSSVLCECYDAGC	1511-1525	
VFTGLTHIDAHFLSQTKQSG	1561-1580	
CLIRLKPTLHGPTPLLYR	1610-1627	
LIRLKPTL	1611-1618	B8
EVLTHPITKYIMTCMSA	1634-1651	B8
TLTHPITK	1636-1643	A11

Tablo 2: İnsan CD8+ T hücre epitopları

4.10. GEN KLONLAMA

Gen klonlama işlemi bir genetik bilginin tam bir eşinin aseksüel üretilmesidir. PZT ile genetik bilginin çoğaltılmasını takiben gen klonlama deneyindeki temel adımlar şunlardır (Şekil 12).

1. Rekombinant DNA molekülü oluşturmak için klonlanacak geni içeren DNA'nın 'vektör' olarak adlandırılan sirküler DNA molekülünün içine yerleştirilmesi
2. Vektörün konak hücre içine aktarılması (Transfeksiyon veya transformasyon)
3. Konak hücrede rekombinant DNA molekülünün çoğaltılması (hem vektör hemde taşıdığı gen)
4. Hücre bölündükçe rekombinant DNA molekülü kopyalarını yeni hücrelere aktarılması
5. Konak hücrelerin büyük miktarlarda üretimi (koloni veya klon)¹²⁵



Şekil 12: Rekombinant molekülün oluşturulması ve konak hücrelerle beraber çoğaltılması

PZT ürünleri bir veya iki restriksiyon enzimi ile yapışkan ya da küt uçlar oluşturacak şekilde kesilir.

Kesilmiş PZT ürünleri ve vektör uygun şartlar ve oranlarda DNA ligaz enzimi aracılığıyla bir araya getirilerek rekombinant DNA molekülü oluşturulur.

İçinde bizim istediğimiz DNA molekülü olan vektör konak hücreye aktarılır ve seçici bir ortamda konak hücrelerle beraber çoğaltılır.

4.10.1. Klonlama Yöntemleri

1. T/A klonlama
2. Yapışkan uç oluşturarak klonlama
3. Küt uç oluşturarak klonlama

T/A klonlamada restriksiyon endonükleaz enzimlerine gerek yoktur. Bu klonlama 3'-A uzantısına sahip çift iplikli PZT ürünleri oluşturan ve 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip olmayan DNA polimeraz kullanılarak gerçekleştirilebilir. Yapışkan uç ve küt uç klonlamalar sırasında özgül DNA dizilerini tanıyan restriksiyon enzimleri kullanılır.

4.10.2. Restriksiyon enzimlerinin (RE) seçimi

Restriksiyon enzimleri; metilaz aktiviteleri, alt ünite yapıları, kesim özgüllükleri ve

kofaktör ihtiyaçlarına göre; tip I, tipII, tip III ve homing endonükleazlar olarak incelenirler, klonlama için en az bir restriksiyon enzimine ihtiyaç vardır.

a- Tip I enzimler:

Hem metilasyon hemde modifikasyon yapan enzimlerdir. Bu enzimler aktiviteleri için 5-adenozilmetionin, ATP ve Mg^{++} 'a gereksinim duyarlar. Hedef dizideki adenin rezidülerini metilasyona uğrattırır ve kesimleri rastgele olmaktadır. Kesim olayında belirleyici faktör enzimin metilasyon aktivitesidir.

b- Tip II enzimler:

Tam hedef nükleotidden kesim yapma özellikleri nedeni ile klonlama ve moleküler biyoloji araştırmaları için ideal enzimlerdir. Tip II RE Mg^{+2} iyonlarının varlığında çift iplikli DNA üzerindeki palindromik dizileri tanıyan ve bu diziyi içindeki özel bir bölgeden kesen enzimlerdir. Tip II RE'ler kesim sonucunda DNA'da oluşturdukları uçların motiflerine göre iki alt gruba ayrılmaktadır.

Yapışkan uç (sticky end): Bu enzimlerin oluşturduğu uçların ligasyon etkinlikleri yüksektir. Bu nedenle klonlama çalışmalarında tercih edilmektedirler.

EcoRI kesimi

GAATTC
CTTAAG

Bu kesim neticesinde oluşan parçalar;

5'-NNNNNNNG AATTCNNNN-3'
3'-NNNNNNNCTTAA GNNNN-5'

Küt uç (blunt end):

Bu tür uçların ligasyon etkinlikleri düşüktür. Bu tür uçlar genellikle klonlama çalışmalarında önerilmemektedir. Ancak, bunlar özellikle DNA parçalarının ucuna bir ya da birden fazla RE tanıma bölgesi bağlamak için kullanılmaktadırlar

Hae III kesimi

GGCC
CCGG

Bu kesim neticesinde oluşan parçalar ;

5'-NNNNNNNNGG CCNNNN-3'
3'-NNNNNNNCC GGNNNN-5'

Gerek yapışkan uç gerekse küt uç oluşturan RE'lerinden bazıları DNA üzerinde aynı dizileri tanıyabilmektedirler.

c-Tip III enzimler:

Tip I'ler gibi bunlar da metilasyon ve modifikasyon yapabilen çok fonksiyonlu enzimlerdir ve ATP'ye bağılı kesim gerçekleştirmektedirler. Bu enzimler DNA'ya tanıma bölgelerinden bağlanmalarına rağmen kesimi farklı bölgeden ve rastgele yapmaktadır. Kesim tanıma bölgesine yakın bir konumda gerçekleştirilmektedir. Bu nedenle tip III enzimler klonlamada kullanılmamaktadır.

d-Homing endonükleazlar:

Diğer restriksiyon enzimlere kıyasla iyi derecede korunmuş ve benzerlik gösteren protein yapılarına (LAGLIDADG, GIY-YIG, H-N-H, Ile-Cys) sahip, uzun (12-40 baz çifti) ve asimetrik bölgeleri tanıyıp kesen, aktivitesi için protein ve RNA'ya ihtiyaç duyan enzim grubudur. Tüm biyolojik sistemlerde (bakteri, ökaryot, alg) bulunmaktadır.

Restriksiyon enzimlerinin star aktivitesi:

Restriksiyon endonükleazların en dikkate değer özelliklerinden biri, bu enzimlerin optimal şartlarda özgül DNA'yı en yakın dizilimden ayırt edebilme başarılarının, optimal olmayan şartlarda oldukça değişmesidir. Örneğin, *EcoRI* enziminin tanıma bölgesi (5'-GAATTC-3')'ne bağlanma oranı en yakın tanıma bölgesi (5'-TAATTC)'ne kıyasla 10^5 kat daha fazladır. Ancak, enzim için optimal olmayan şartlar altında oran oldukça değişmekte ve pek çok enzim için bu durum söz konusu olmaktadır. Benzer bölgeleri kesme işlemine, bir enzimin **star aktivitesi** denilmektedir. Bu durum moleküler biyoloji çalışmalarında oldukça önemli olmaktadır. Bu nedenle kullanılan enzimlerin star aktiviteye sahip olup olmadıkları bilinmelidir.

Restriksiyon enzimlerinin içinde klonlanacak DNA dizisini istenmeyen bir noktadan kesen enzimler kullanılmamalıdır.

Çoğaltılacak gen bölgesi için kullanılacak primerlerin uçlarında restriksiyon enzimlerinin tanıma dizileri bulunmalıdır. Hem klonlama vektörü hem de klonlanacak gene ait PZT ürünleri restriksiyon enzimleriyle, uygun şartlarda kesilirler.

Ürünler jel ekstraksiyonu veya DNA'yı bağlayan kolonlar kullanılarak saflaştırılabilir.^{126,127,125}

4.10.3. DNA ligasyonu

Rekombinant DNA molekülünün oluşumundaki son adım kesilmiş vektör ve kopyalanacak DNA'nın uygun şartlarda bir araya getirilmesidir. Sonrasında ligaz enzimi nükleotidler arasında fosfodiester bağları (çift iplikli DNA'nın 5' ucunda yer alan fosfat grubunun ATP ile 3'-OH grubuna bağlanması) kurarak açık uçları kapatır. Yapışkan uçlar ligasyon etkinliğini arttırmaktadır.

Bağlamadaki sorunlardan biri vektörün yabancı DNA'ya bağlanması yerine kendi uçlarının birleşip halka şeklini kazanmasıdır, bunu engellemek için yapılan uygulamalardan biri,

vektörün 5' uçlarındaki fosfat gruplarının yok edilerek fosfodiester bağ oluşumunu önlemektir.

4.10.4. Transformasyon

Rekombinant DNA molekülünü içine alabilmesi için uygun hale getirilmiş konak hücrelere (Kompetan hücre) ligasyon ürününün aktarılmasıdır. Hücrelerin kompetan hale getirilmesi için temel olarak 2 yöntem vardır. Elektroporasyon (düşük voltajlı elektrik akımı) ve CaCl_2 . Ligasyon ürünü ve kompetan hücreler uygun şartlarda inkübe edilir.

4.10.5. Kolonilerin seçimi

Ligasyon ürününün aktarıldığı konak hücrelerinin seçilimi için bu hücreler uygun besiyeri ve inkübasyon şartlarında tutulur. Çoğu plazmid klonlama vektörü konak hücreye antibiyotik direnci veren en az bir gen taşımaktadır. Bu antibiyotikleri içeren seçici ortamlar da inkübe edilirler fakat bu konak hücreler zamanla antibiyotik etkisini önleyen enzimler salgılayabilir. Bu yüzden transformasyonu takiben seçici ortama alınmalıdırlar.

4.10.6. Rekombinant genin klonlandığı hücrelerin saptanması

Üretilen konak hücrelerde rekombinant plazmid içermeyen hücreler olabilir. Bunları tesbit etmenin çeşitli şekilleri vardır. Birincisi, bazı plazmidler beta-galaktozidaz (*lac Z*) geni içerir. Eğer araya sokulması istenen DNA (insert) bu plazmid içine doğru şekilde girmişse gen inaktive olmaktadır. X-gal ve IPTG içeren besiyerinde insert içeren plazmidler beyaz koloniler oluştururken, ligasyon basamağında hedef insert içermeyen plazmidleri içeren bakteriler mavi koloniler oluşturmaktadır.

İkincisi, insert'ün varlığı kolonilerde ekstraksiyon yapıldıktan sonra PZT yöntemiyle uygun büyüklükteki bandın görüntülenmesidir.

4.10.7. Ekspresyon vektörleri

Bu vektörler klonlanacak genin yerleşebileceği ve içinde pek çok restriksiyon enzimi için tanıma dizileri bulunan klonlama bölgeleri içerirler. Bu bölgeler '*lac Z*' gibi çeşitli promotör genlerin kontrolü altındadır. Şekilde çeşitli ekspresyon vektörleri ve özellikleri sunulmuştur.

Konakçı	Avantajları	Dezavantajları
<i>Bakteriler (E.coli)</i>	*Yüksek verim *Basit ve ucuz çoğalma *İyi mekan/zaman verimi *Kapsamlı bilinen organizma, basit kullanılabilir ve yönlendirilebilir *Çok sayıda transkripsiyon ve translasyon düzeyinde kontrol elemanları bilinmekte	*Ökaryotik hücrelerde olan posttranslasyonel modifikasyon ve sekresyon mekanizmalarına sahip değil *Ekspresyon ürünleri inclusion cisimleri adı verilen güç çözünür formda
<i>Böcek Hücreleri (Baculovirus sistem)</i>	*Yüksek ökaryotik hücrelerin birçok posttranslasyonel modifikasyonları, protein proses ve sekresyon mekanizmaları *Yüksek verim mümkün *Protein çoğunlukla çözünür formda *Baculovirüsler insanlar için enfeksiyöz değil *Büyük proteinlerin ekspresyonu için de uygun sistem	*Böcek hücrelerinin çoğaltması bakterilerden daha masraflı ve çok zaman alır *Rekombinant baculovirüslerin çıkış çözümlerinin kazanılması için daha uzun yöntemler gerekli *Memeli hücrelerinden farklı bazı posttranslasyonel glikozilasyon
<i>Mayalar</i>	*Organizma iyi tanınır, çoğalma ve işlem ayrıntılı tanımlanmış *Yüksek ökaryotik hücrelerin birçok posttranslasyonel modifikasyonları, protein proses ve sekresyon mekanizmaları	*Memeli hücrelerinden farklı bazı posttranslasyonel glikozilasyon *Bakterilerden daha düşük verim
<i>Memeli hücreleri</i>	*Yüksek ökaryotik hücrelerin bütün posttranslasyonel modifikasyonları, protein proses ve sekresyon mekanizmaları	*Nispeten zaman gerektiren ve pahalı çoğaltma *Kötü zaman/mezan verimi

Tablo 3: ekspresyon vektörlerinin birbirlerine göre avantaj ve dezavantajları.

Ekspresyon vektörlerinde promotör üzerinde bulunan represör (baskılayıcı) protein RNA polimerazın mRNA sentezini başlatmasını engeller. İndüksiyon sonrası represörün baskısı kalkarak sentez başlatılır.¹²⁸

En sık kullanılan promotörler		
Promotör	İndüksiyon	Sorunlar
lac	IPTG, ısı	Diğer sistemlere göre zayıf ekspresyon
trp	Triptofan	Zayıf ekspresyon
tac	IPTG, ısı	Zayıf ekspresyon
λpL	Isı	Düşük ısılarda indüksiyon olmayabilir
T7	IPTG, ısı	Zayıf ekspresyon
Ara	L-Arabinoz	Az sayıda vektörde var

Tablo 4: En sık kullanılan promotörlerden bazılarının özellikleri¹²⁹

Ekspresyon vektörleri afinite kromatografileri ile saflaştırılabilmelerini sağlayan peptit (6 histidin) veya protein (DHFR) kodlayan DNA dizileri de bulundurabilirler.

4.10.8. Protein ekspresyonu

Vektör IPTG, triptofan, L-Arabinoz gibi maddelerle uyarılabilen bir operatör gen içermektedir. Bu uyarılmanın zamanlaması proteinin elde edilmesini ve miktarını belirler. Konağın logaritmik faza hangi OD'de ulaştığı, uyarıcının miktarı ve süresi, sıcaklık optimizasyon sürecinde en iyi ürünü alabilmek için ayarlanması gereken faktörlerdir.

4.10.9. Protein izolasyonu ve ekspresyonunun gösterilmesi

Hücre içerisinde bulunan proteinler önce hücrenin dışına çıkarılmalıdırlar. Bu genellikle tampon özelliği taşıyan bir sıvı aracılığıyla olur. Proteinleri hücre içerisinde tutan hücre zarının parçalanmasından sonra ortaya çıkan protein ve nükleik asit çözeltisine hücreden arındırılmış lizat adı verilir.

Proteinler doğal veya denatüre edici şartlarda saflaştırılabilir. Bunu proteinin çözünürlüğü, hücre içi yerleşimi, biyolojik aktivitesi gibi şartlar belirler. İnklüzyon cisimleri içinde yoğunlaşan proteinlerin elde edilmesi için denatüre edici şartlar kullanılır.

Protein varlığının doğrulanması için çeşitli yöntemler vardır;

- 1) Sodyum dodesil sülfat- poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) sonrasında coomasie blue ile boyama.
- 2) SDS-PAGE sonrasında western blotlama: Islak (wet) ve yarı kuru (semi-dry) olmak üzere iki şekilde uygulanabilir. Daha sonra sırasıyla nitroselüloz membrana aktarma, bloklama, proteine özgül enzim işaretli Ab'la karşılaşma ve ışığa veren substrat eklenmesi sonrası fotoğraf filmi ile saptama gerçekleştirilir.

3) Direk koloni kopyalama: Transformasyon sonrası seçici ortamda üreyen kolonilerin üzerini kaplayacak şekilde nitroselüloz membran kapatılır ve daha sonra kaldırılarak IPTG'li seçici besiyerine aktarılır. Ekspresyon araştırması bu membran üzerinden çalışılır.

4) Dot blotting: burada hücre lizati ve rekombinant protein nitroselüloz membrana damlatılıp daha sonraki membran aşamaları western blot'a benzer şekilde uygulanır.

Proteinin varlığını gösterebilmek için uyarılma öncesi ve sonrası durum kıyaslanmalıdır. Bunun için SDS-PAGE ile doğru büyüklükteki bant varlığı araştırılır. Daha sonra Western blotlama yöntemi ile jeldeki proteinler bir membrana aktararak saptanır.

4.10.10. SDS-PAGE

Genellikle glisin veya trisin SDS-PAGE sistemleri kullanılmaktadır. Aralarındaki fark tamponların içindeki Trisin ya da Glisin varlığıdır. Başarılı bir elektroforez yapılabilmesi için analizi yapılacak örneğin onunla reaksiyon vermeyen bir ortama ihtiyacı vardır. Bunun için poliakrilamid kullanılır. Poliakrilamid yapabilmek için akrilamid, N,N'-metilen-bis akrilamid, tetrametiletilendiamin (TEMED) ve amonyum persülfata ihtiyaç vardır. Ammonyum persülfat suda çözüldüğünde serbest radikal iyonları oluşturur ($S_2O_8^{2-} \rightarrow 2SO_4^{\cdot -}$). Eğer bu radikal iyonları akrilamid ile biraraya getirilirse serbest radikal akrilamid molekülü üzerine taşınır. Aktive edilmiş bu akrilamid molekülü çevresindeki diğer akrilamid molekülleri ile etkileşerek uzunca bir polimer oluşturur. Bu polimerlerin oluşturduğu çözelti her ne kadar yoğun olsa da jeli oluşturmaz. Jel oluşumu bu polimer parçalarının çapraz bağlanmasını gerektirir. Bu işlem N,N'-metilen-bis akrilamid tarafından sağlanır. Polimerizasyonu bis akrilamid eşliğinde yapmak net bir poliakrilamid ağı oluşumuna neden olur. TEMED (Tetrametiletilendiamin), amonyum persülfatın serbest sülfat radikallerine ayrışmasını sağlar ($S_2O_8^{2-} + e^- \rightarrow (TEMED) \rightarrow SO_4^{2-} + SO_4^{\cdot -}$). Bu amaçla ortama TEMED ve taze hazırlanmış amonyumpersülfat da eklenmektedir.

Birbirlerine sıkı bir şekilde bağlanmış protein moleküllerini eğer protein çözeltisi bir ön işlemde geçirilmemişse jel üzerinde ayırmak mümkün değildir. Bu yüzden protein karışımları sodyum dodesil sülfatın varlığında jel üzerinde hareket ettirilirler. Sodyum dodesil sülfat (SDS) proteinlerin hidrofobik bölgelerini bağlayarak denatüre eder. SDS ayrıca denatüre olmuş proteinleri yüksek miktarda negatif yüklerle yükler. Bu yük normalde proteinler üzerinde bulunan yükleri maskeler ve proteinler jel üzerinde yüklerine göre değil molekül ağırlıklarına göre ayrılırlar.¹³⁰

4.10.11. Proteinlerin saflaştırılması

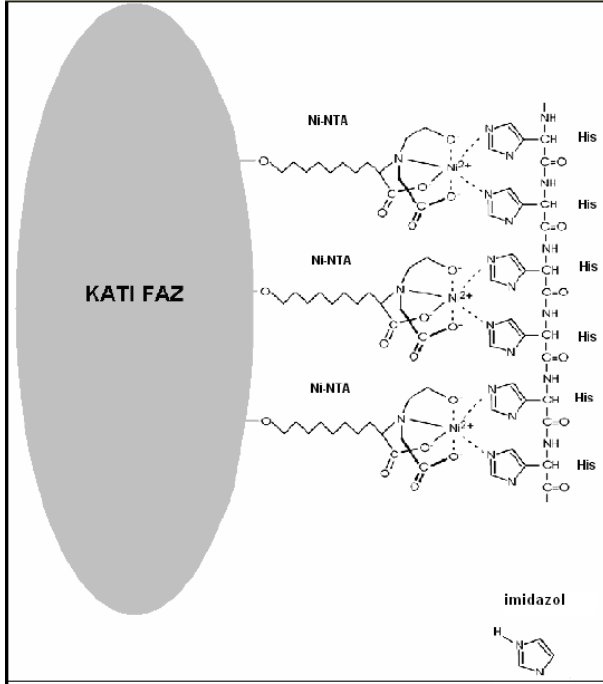
Proteinlerin uygun şekilde elde edilebilmesi için ekspresyon ve kültür şartlarının etkinliği kadar protein saflaştırma işlemlerindeki aşamaların şartları da önemlidir. Kültür miktarı, doğal veya denatüre şartlar altında çalışılması, inklüzyon cisimciklerinin oluşumu gibi aşamalar bunlar arasındadır.

Ni-NTA afinite kromatografi tekniği kullanılarak 6-histidinli uç taşıyan rekombinant proteinlerle doğal veya denatüre şartlar altında çalışılabilir. Inklüzyon cisimciklerindeki birçok protein deterjanlar, denatüre edici ajanlar (8M üre, 6M GuHCl gibi), diyaliz, ısı, pH gibi parametreler kullanılarak çözünür hale getirilebilirler. Ni-NTA afinite kromatografi tekniğinde rekombinant proteine bağlı 6-histidin molekülünden ikisi nikel-nitilotriasetik asit molekülleriyle kaplı katı faza tutunurlar (Şekil 13). Histidin moleküllerinin fazlalığı hem

afiniteyi artırmakta hemde protein molekülünde olabilecek sayıca daha az olan histidin molekülleriyle yarışarak kontaminant protein bağlanmasını önlemektedir.

Yüksek pH'da bağlanan rekombinant protein, yıkama ve elüsyon adımlarına doğru pH'sı giderek düşürülen tamponlarla, protein matriksi bırakarak elüe olur.

Kontaminant proteinlerin bağlanmasını engellemek için gerekirse belirli miktarlarda imidazol tamponlara ilave edilebilir. Histidin analogu olan bu molekül sondaki yıkama adımları ile kolayca uzaklaştırılabilir.



Şekil 13: Katı faz, Ni-NTA ve Histidin moleküllerinin etkileşimi

Saflaştırma işlemi sonunda elüatta kalan bakteriyel endotoksin düzeyi bazal sitokin sentezini arttıracak seviyenin altında olmalıdır (< 3 EU endotoksin / 1 µg protein yani < 300 pg endotoksin / 1 µg protein). Protein preparatının içindeki endotoksin düzeyini ölçmek amacıyla çeşitli yöntemler kullanılmaktadır. Bu yöntemlerden birisinde; LPS varlığında uyarılarak alkalen fosfataz sentezleyen hücre hattı (TLR4 ve koreseptörleri olan MD2 ve CD14 genleri ile NF-κB promotör kontrolündeki alkalen fosfataz geni ile transfekte edilmiş HEK293 hücreleri) kullanılmaktadır. Diğer bir yöntemde ise bir amip türü olan “*Limulus polyhemus of horseshoe crab*” özütü kullanılır. *Limulus polyhemus*’un özütü ortama endotoksin eklendiğinde pıhtılaşmaktadır.^{131,132}

5.GEREÇ VE YÖNTEMLER

5.1. GEREÇ

5.1.1. Çalışma grubu ve Etik Kurul Onayı

Çalışma grubuna yaş grupları olduğunca birbirine yakın, anti-HCV, anti-HIV, HBsAg negatif olan sağlıklı 4 erkek ve 3 kadın alınmıştır. Çalışma grubuna katılan erkeklerin yaş ortalaması 35 (28-42), kadınların ise 37,6 (35-40) dır.

Etik kurul onayı

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Etik kurulunun 17 Şubat 2009 tarih ve 3322 sayılı onayı ile çalışmanın uygulanmasında etik açıdan bir sakınca olmadığı belirlendi.

5.1.2. Ayıraçlar ve Malzemeler

Çözeltilerin hazırlanmasında 18.2MΩ ddH₂O ve besiyerlerinde dH₂O kullanıldı. Otoklavlamalar 121° C 1 Atm basınç altında, 15 dakika süreyle yapıldı.

0,5M Na₂ EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) stok solüsyonu

Na ₂ EDTA (Sigma E5134)	18,6 g
------------------------------------	--------

Distile su ile 80 ml'ye tamamlandı.

EDTA pH=8'de erir. pH'ı ayarlamak için 100 mM'lık NaOH kullanıldı. Daha sonra 100ml'ye tamamlandı ve otoklavlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Tris-EDTA (TE 1X) pH=8

Tris-HCL (Sigma T5941)	1,576 g
------------------------	---------

0,5M Na ₂ EDTA	2 ml
---------------------------	------

Bi-distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

Tris-Borik asit-EDTA (TBE 5X)

Trizma base (Sigma T1503)	54 g
---------------------------	------

Borik asit (Sigma B6768)	27,5 g
--------------------------	--------

0,5M Na ₂ EDTA	20 ml
---------------------------	-------

Distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

Otoklavlandı, oda sıcaklığında saklandı.

50x Tris Asetik EDTA- 1000ml

Tris (Sigma T8524)	0,2 M (242gr)
--------------------	---------------

0,5M Na ₂ EDTA, pH 8,0	100ml
-----------------------------------	-------

Asetik asid (Merck 100056)	57,1ml
----------------------------	--------

Distile su ile son hacim 1000ml'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

Etidyum bromit solüsyonu (10 mg/ml)

Etidyum bromit (Sigma E8751)	1g
------------------------------	----

Distile su	100 ml
------------	--------

Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı, oda sıcaklığında saklandı

Magnezyum sülfat çözeltisi (1M)

MgSO ₄ -H ₂ O (Applichem A1811,0500)	12,04 g
--	---------

Distile su	100 ml
------------	--------

Oda sıcaklığında saklandı.

Magnezyum klorit çözeltisi (1M)

MgCl ₂ -6H ₂ O (Applichem A4425,1000)	20,33 g
---	---------

Distile su	100 ml
------------	--------

Oda sıcaklığında saklandı.

Potasyum klorit çözeltisi (1M)

KCl (Scharlau PO0200)	3,728g
-----------------------	--------

Distile su 50 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Glikoz çözeltisi (1M)

D-Glikoz Monohidrat (Merck 108337) 9,90g

Distile su 50 ml

+4 °C’de saklandı.

Agaroz (Sigma A9539) Oda sıcaklığında saklandı.

Ampisilin stok solüsyonu (100 mg / ml)

Ampisilin (Applichem A0839,0010) 1 g

Distile su ile 10 ml’ye tamamlandı ve 0,22µm’lik filtre ile sterilize edilip 0,5ml’lik alikotlar halinde -20°C’da saklandı.

Kanamisin stok solüsyonu (50 mg / ml)

Kanamisin (Applichem A1493,0025) 0,5 g

Distile su ile 10 ml’ye tamamlandı ve 0,22µm’lik filtre ile sterilize edilip 0,5ml’lik alikotlar halinde -20°C’da saklandı.

Ampisilinli (100 µg/ml) ve Kanamisinli (25 µg/ml) LB agar hazırlanışı

20g LB agar distile su ile 500ml’ye tamamlandı, otoklavlandı.

100 mg/ml’lik ampisilin stok solüsyonundan 500µl’si ve 50 mg/ml’lik kanamisin stok solüsyonundan 250 µl’si 50-55°C’ye kadar soğutulan LB agar içerisine eklenerek karıştırıldı.

LB Agar plaklara dökülerek +4 derecede saklandı.

Ampisilinli (100 µg/ml) ve Kanamisinli (25 µg/ml) LB broth hazırlanışı

10g LB broth distile su ile 500ml’ye tamamlandı, otoklavlandı.

100 mg/ml’lik ampisilin stok solüsyonundan 500µl’si ve 50 mg/ml’lik kanamisin stok solüsyonundan 250 µl’si LB broth içerisine eklendi.

+4 °C’da saklandı.

Luria-Bertani (LB) agar (Applichem A0927,9010) Oda sıcaklığında saklandı.

LB Broth (Sigma L3022) Oda sıcaklığında saklandı.

SOB besiyeri

Trypton(LAB M)	20 g
Maya Özütü (Acumedia)	5 g
NaCl (Applichem A2942,0500)	0.5 g

Distile su ile 1000 ml’ye tamamlandı.

Otoklavlandı.

Daha sonra içerisine

0,22µm’lik filtre ile filtre edilen 1M MgCl₂ çözeltisinden 10 ml

0,22µm’lik filtre ile filtre edilen 1M MgSO₄ çözeltisinden 10 ml eklendi ve +4°C’de saklandı.

SOC besiyeri

Filtre edilmiş 2M’lik Glikoz stok çözeltisi	1 ml
SOB besiyeri	99 ml

SOC besiyeri taze hazırlanarak kullanılır.

Isopropanol (Applichem A3928, 0500PE) Oda sıcaklığında saklandı.

IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) stok çözeltisi (100 mM)

IPTG (Applichem A1008,0001)	0,238 g
-----------------------------	---------

Distile su 10 ml’ye tamamlandı ve 0.22µm’lik filtre ile steril edildi.

10 adet ependorfa, 1’er ml dağıtılarak -20 °C’de saklandı.

TFB1-500ml

MgCl ₂ ×6H ₂ O(Ridel-de Haën 13152)	0.1M (10.165g)
MnCl ₂ ×4H ₂ O(Applichem A2087)	0.05M (4.94g)
KOAsetat(Sigma P 1190)	0.03M (1.47g)
CaCl ₂ ×2H ₂ O(Merck 102381)	0.01M (0.74g)
Gliserol (Saf) (J.T.Baker M77809)	%15 (v/v) (75mL)

Asetik asid ile pH5.8'e ayarlandı (Gliserol pH ayarlandıktan sonra eklendi) ve distile su ile son hacim 500mL'ye tamamlanıp, 0.45µm'lik filtre ile sterilize edildi. 4°C'da saklandı.

TFB2-500ml

MgCl ₂ ×6H ₂ O(Ridel-de Haën 13152)	0.01M (1.02g)
CaCl ₂ ×2H ₂ O(Merck 102381)	0.1M (7.351g)
MOPS(Sigma M 1254)	0.01M (1.05g)
Gliserol (Saf) (J.T.Baker M77809)	%15 (v/v) (75mL)

KOH ile pH6.8'e ayarlandı (Gliserol pH ayarlandıktan sonra eklendi) ve distile su ile son hacim 500mL'ye tamamlanıp, 0.45µm'lik filtre ile sterilize edildi. 4°C'da saklandı.

10xSDS-PAGE Yürütme Tamponu – 1000mL

Sodyum dodesil sülfat(Sigma L 4390)	%1 (w/v) (10g)
Tris(Sigma T 8524)	0.25M (30.3g)
Glisin(Sigma G 7126)	1.92M (144.1g)

Distile su ile son hacim 1000mL'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

5xSDS-PAGE Protein Yükleme Tamponu – 100mL

1M Tris-Cl, pH6.8	0.225M (0.225mL)
-------------------	------------------

Gliserol (Saf) (J.T.Baker M77809)	%50 (v/v) (50mL)
Sodyum dodesil sülfat(Sigma L 4390)	%5 (w/v) (5g)
Bromfenol mavisi(Sigma B 5525)	%0.05 (w/v) (50mg)
DTT(Applichem A2948)	0.1M (3.85g)

Distile su ile son hacim 100mL'ye tamamlandı ve -20°C'da 0.5mL'lik alikotlar halinde saklandı.

DTT (Applichem A2948)

Yarı-Kuru Transfer Tamponu – 500mL

Tris (Sigma T 8524)	0.025M (1.52g)
Glisin(Sigma G 7126)	0.15M (5.63g)
Metanol (Merck 106008)	%10 (v/v) (50mL)

Distile su ile son hacim 500mL'ye tamamlandı ve oda ısısında saklandı.

10xTris Tamponlu Tuzlu Su (TTS) – 500mL

Tris(Sigma T 8524)	0.1M (6.057)g
NaCl(Merck 106400)	1.5M (43.83)g

HCl ile pH7.4'e ayarlandı ve distile su ile son hacim 500mL'ye tamamlanıp, oda ısısında saklandı.

TTS-Tween 20 (TTST) – 500mL

10x TTS	50mL
Tween20 (Applichem A1389)	2.5mL

Distile su ile son hacim 500mL'ye tamamlandı.

%3'lük Sığır Serum Albumini (SSA) bloklama tamponu – 50mL

SSA (Applichem A1391)	1.5g
-----------------------	------

TTST ile son hacim 50mL'ye tamamlandı.

SDS-PAGE jeli isopropanol fiksasyon çözeltisi

İsopropanol	25% (v/v)
Asetik asit	10% (v/v)
H ₂ O	65%

Oda ısısında saklandı.

SDS-PAGE jeli hızlı Coomassie blue boyama çözeltisi

Asetik asit	10% (v/v)
Coomassie brilliant blue G-250 (Bio-Rad)	0.006% (w/v)
H ₂ O	90%

Oda ısısında saklandı.

SDS-PAGE jeli Coomassie blue boyasından arındırma çözeltisi

Asetik asit	10% (v/v)
-------------	-----------

Diyaliz Membranı (Chemicon Tube-O-Dialyzer 2047) +4 °C’de saklandı.

Akrilamit, bis-akrilamit tamponu (AB-3)

Akrilamit (Applichem A3812, 0500)	29,0 g
Bis-Akrilamit (Applichem A3636, 0100)	1 g

Distile su ile 100 ml’ye tamamlandı 4 °C’de saklandı.

PBS

NaCl (Applichem A2942,1000)	8.03 g
KCl (Applichem A2939,1000)	0.20 g
Na ₂ HPO ₄ (Applichem A2943,1000)	1.42 g
KH ₂ PO ₄ (Applichem A2946,1000)	0.25 g

Distile su ile 10000 ml’ye tamamlandı ve oda sıcaklığında saklandı.

Ni-NTA kolon kromatografisinde kullanılan tamponlar;

Tampon B (pH=8,0)

Tris (Applichem A2264, 0500)	0,121 g
NaH ₂ PO ₄ (Applichem A2944, 1000)	1,56 g
Üre (Applichem A1049, 1000)	48,05 g
Non idet P-40 (Applichem A1694, 0250)	0,5 ml
İmidazol (Applichem A1378, 0050)	0,068g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı ve 10M NaOH ile pH8.0'e ayarlandı.

Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon C (pH=6,3)

Tris (Applichem A2264, 0500)	0,121 g
NaH ₂ PO ₄ (Applichem A2944, 1000)	1,56 g
Üre (Applichem A1049, 1000)	48,05 g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı ve HCl ile pH 6.3'e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon D (pH=8,0)

Tris (Applichem A2264, 0500)	0,121 g
------------------------------	---------

Distile su 100 ml'ye tamamlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon R (pH=8,0)

Tris (Applichem A2264, 0500)	0,121 g
2-propanol (Applichem A3465, 1000)	60 ml
Distile su	40 ml

Oda sıcaklığında saklandı.

Tampon E (pH=4,5)

Tris (Applichem A2264, 0500) 0,121 g

NaH₂PO₄ (Applichem A2944,1000) 1,56 g

Üre (Applichem A1049,1000) 48,05 g

Distile su 100 ml'ye tamamlandı ve HCl ile pH 6.3'e ayarlandı. Oda sıcaklığında saklandı.

Taq Polimeraz (5u/µL) (Fermentas #EP0406)

BamHI (10u/µL) (Fermentas #ER0051)

HindIII (10u/µL) (Fermentas #ER0501)

Ribonükleaz inhibitörü (20-50u/µL) (Applichem A3934)

RevertAid™ M-MuLV Reverse Transcriptase (Fermentas #EP0441)

RGS-His Antibody (Qiagen 34610)

Sheep Anti-Mouse (IgG) Horse Radish Peroxidase (Chemicon AP300P)

E-Toxate kit (ET0200) (Sigma –Aldrich)

Fitohemagglutinin (Biochrom ag M 5030)
-20 °C'de saklandı.

İnsan IL-10 ELISA kiti (invitrogen Immunoassay Kit KHC0101)

İnsan IL-4 ELISA kiti (invitrogen Immunoassay Kit KHC0042)

İnsan IFN-γ ELISA kiti (invitrogen Immunoassay Kit KHC4022)

INNO-LIA™* HCV Score Kit (INNOGENETICS N.V.)

Protein konsantrasyonu saptama kiti:

a) Bicinchoninic asit solüsyonu (Sigma B9643)
Oda sıcaklığında saklandı.

b) Bakır (II) sülfat solüsyonu (Sigma C2284)
Oda sıcaklığında saklandı.

c) Protein standart solüsyonları (Sigma 0914-SAMP)
+4 °C'de saklandı.

Bakteri suşları ve ekspresyon vektörleri:

M15 *E. coli* suşu hem klonlama hem de ekspresyon için konak hücre olarak kullanıldı. pQE30 ekspresyon vektörü JM109 *E. coli* suşu içerisinde çoğaltıldı.

Suş Genotip

JM109 *E. coli* F' *traD36 lacI_q (lacZ)M15 proA⁺ B⁺/e14 (McrA) (lac-proAB) thi*
gyrA96 (Nal^r) endA1 hsdR17 (r_k⁻ m_k⁺) relA1 supE44 recA1 (Promega)

M15 *E. coli* Nal^s Str^s Rif^s *lac ara gal mtl F recA⁺ uvr⁺ lon⁺* (Qiagen)

Vektör

pQE30 (Qiagen)

pREP4 (Qiagen)

Distile su cihazı:

Şimşek Labortechnik SS200

Jel görüntüleme cihazı:

VILBER LOURMAT 0519563

Santrifüj cihazı:

Heraeus Labofuge 400R

Kromatografi kolonu:

Polypropylene columns Qiagen 34964

Kromatografi matriksi:

Ni-NTA Agarose Qiagen 30250

Elektro-bloflama cihazı:

Elektro-blotter Sigma Semi-dry blotter Z340502

Dikey jel elektroforez cihazı:

Bio-Rad mini protean vertical jel electrophoresis system

Yatay jel elektroforez cihazı:

Thermo Minicell Submarine Gel System EC320

Etüv:

Heraeus 63450

PCR Isı Döngü Cihazı:

Techne TC-412

Sonikasyon cihazı:

Sonics Vibra-cell VC 100

Vorteks cihazı:

IKA NC 28405

Çalkalayıcı:

Labnet S 1000-A-220

ELISA plak yıkayıcı:

ASYS Atlantis G021101

ELISA plak okuyucu:

ORGANON TEKNIKA Microwell System OT 2305

Spektrofotometre:

Thermo Multiscan Spectrum 1500-457

Analizör:

AutoLipa Innogenetics

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Hepatit C virusuna ait klonlanacak DNA'nın eldesi

5.2.1.1. Çalışmada kalıp RNA olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan tanısal araştırma amacıyla elde edilmiş HCV genotipi 1 taşıdığı bilinen 60209418 UIN numaralı hasta örneğinden izole edilen total RNA kullanıldı.

5.2.1.2. “Nested” PZT için iki çift öncül belirlendi. Öncüllerin hangi bölgelerin arasını çoğaltacağını belirlemek amacıyla HCV veri bankasına (<http://hcv.lanl.gov>) kayıtlı tüm genotiplerin nükleotit dizileri indirildi ve BioEdit 7.0.9 sürümü ile hizalandı. Dış ileri öncül olarak yapısal olmayan NS2 proteini içerisinde bulunan ve tüm genotipler içerisinde korunmuş olan bir bölge ve dış geri öncül olarak yapısal olmayan NS4B proteini içerisinde bulunan ve yine tüm genotipler içerisinde korunmuş olan bir bölge seçildi. İç öncüller olarak yapısal olmayan NS3 proteininin 1. ve 1893.cü nükleotitleri arasında kalan bölgeyi çoğaltmak üzere öncüller tasarlandı. İç ileri öncülün 5' ucuna sırası ile kesim etkinliğini arttırmak için üç adet nükleotid ve heen ardından BamHI kesim bölgesi eklendi. İç geri öncülüne ise HindIII kesim bölgesi ve bu kesim bölgesi ile NS3 proteininin 1893. nükleotiti arasına bir timin eklendi. Bu şekilde TAA dur kodonu oluştu. Ayrıca HindIII restriksiyon enzimin kesim etkinliğini arttırmak için 3' ucuna üç adet nükleotit eklendi. Nükleotit farklılıkları dejenere primer olarak tasarlandı.

Primerler;

1) NS2 dış ileri öncül:

5'- ATG GAG ACC AAG VTC ATC ACC TG -3'

2) NS4B dış geri öncül:

5'- ATG AAY TTC CAC ATG TGC TTC GC -3'

3) NS3 iç ileri öncül:

5'- GCG GGA TCC GCG CCY ATC ACG GCB TAC -3'

4) NS3 iç geri öncül:

5'- GCG AAG CTT ATT ACG TGA CGA CCT CRA GGT -3'

Altı çizili ve koyu boyalı bölgeler sırasıyla BamHI ve HindIII restriksiyon enzimlerinin tanıma dizilerini içermektedirler. Sadece koyu boyalı yerler ise öncüllerin dejenere kısımlarıdır.

5.2.2. cDNA sentezi

HCV bir RNA virusu olduğu için öncelikle cDNA sentezi yapıldı.

1. 5 µL kalıp RNA 200 µL'lik tüpe kondu.
2. 1 µL 10 pmol Random Hexamer eklendi
3. Son hacim 11 µL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.

4. Tüp ısı döngü cihazında (Techne TC-412) 70°C’da 5 dakika inkübe edildi ve ardından buzda soğutuldu.
5. 5x reaksiyon tamponundan 4µL, 10mM dNTP’den 2µL, ribonükleaz inhibitöründen 1µL (20u) eklendi. Son hacim 19µL olacak şekilde distile su ile tamamlandı.
6. Karışım ısı döngü cihazında 37°C’da 5 dakika inkübe edildi.
7. Üzerine 1µL (200u) M-MuLV enzim eklendi ve ısı döngü cihazında 42°C’da 60 dakika inkübe edildi.
8. 70°C’da 10 dakika ısıtılarak reaksiyon durduruldu ve 4°C’da soğutuldu.
9. Sentezlenen cDNA -20°C’da saklandı.

5.2.3. Protein kodlayan gen bölgesinin iç içe PZT ile çoğaltılması

Klonlanacak proteine ait gen bölgesi cDNA’dan PZT ile çoğaltılarak elde edildi. Bu iki aşamada gerçekleştirildi. Önce dış ileri ve geri öncüllerle yapılan PZT, ardından bu PZT ürünü kalıp olarak kullanılarak iç ileri ve geri öncüllerle hedeflenen proteine ait gen bölgesi çoğaltıldı.

1.PZT: Dış ileri ve geri öncüllerle çoğaltma:

Karışım: 50 µL hacimde hazırlandı. Bu karışım 10 mM Tris HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,3 mM dış ileri NS2 öncül, 0,3 mM dış geri NS4B öncül ve 2,5 u *Taq* DNA polimeraz içermektedir.

Distile su	36,5µL
10x <i>Taq</i> Tampon (MgSO ₄ ’sız)	5µL
MgCl ₂ (25mM)	2µL
dNTP (10mM)	1µL
Dış ileri NS2 öncül (10pM)	1,5µL
Dış geri NS4B öncül (10 pM)	1,5µL
<i>Taq</i> Polimeraz (5u/µL)	0,5µL
cDNA	2µL

PZT karışımı hazırlanarak,
 95 °C’de 2 dakika ilk denatürasyon
 94 °C’de 45 saniye
 50 °C’de 1 dakika
 72 °C’de 2 dakika } 35 döngü
 72 °C’de 20 dakika son uzatma
 +4 °C’de bekleme programıyla çoğaltma gerçekleştirildi.

2.PZT: İç ileri ve geri öncüllerle çoğaltma:

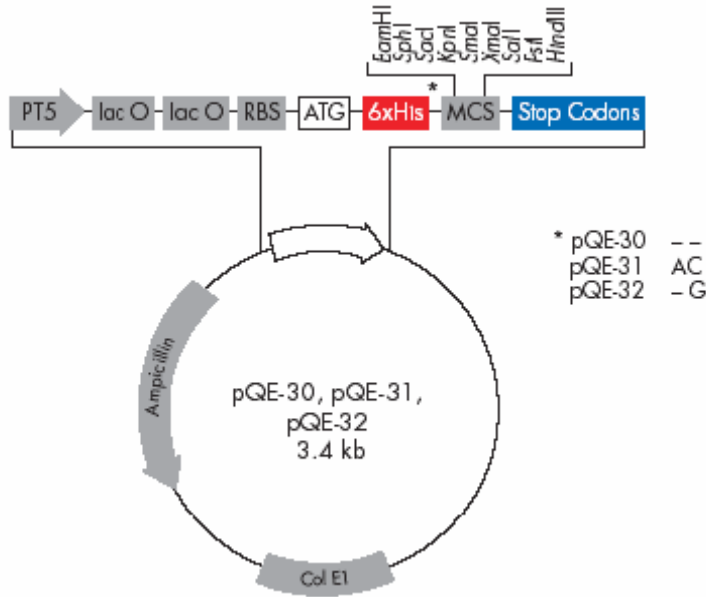
Karışım: 50 µL’lik hazırlandı. Bu karışım 10mM Tris HCl, 20mM (NH₄)₂SO₄, 1mM MgCl₂, 0.2mM dNTP, 0.3mM iç ileri NS3 öncül, 0.3mM iç geri NS3 öncül ve 2,5u *Taq* Polimeraz içermektedir.

Distile su	37,5µL
10x Taq Tampon (MgSO ₄ 'sız)	5µL
MgCl ₂ (25mM)	2µL
dNTP (10mM)	1µL
İç ileri NS3 öncül (10pM)	1,5µL
İç geri NS3 öncül (10pM)	1,5µL
Taq Polimeraz (5u/µL)	0,5µL
1. PZT ürünü	1µL

PZT karışımı hazırlanarak,
95 °C'de 2 dakika ilk denatürasyon
94 °C'de 45 saniye
60 °C'de 1 dakika } 35 döngü
72 °C'de 2 dakika
72 °C'de 20 dakika son uzatma
+4 °C'de bekleme programıyla 2. çoğaltma gerçekleştirildi.

5.2.4. pQE30 vektörünün saflaştırılması

-80 °C'de stoklanmış, pQE30 ekspresyon vektörünü içeren JM109 *E. coli* hücreleri 100 µg / ml Ampisilin içeren 10 ml LB broth içerisinde, 37°C'de bir gece inkübe edildi. Miniprep plazmit ekstraksiyon kiti ile izole edildi.



Şekil 14: pQE30 ekspresyon vektörü

5.2.5. PZT ürünlerinin saflaştırılması

1. 300 µl'lik iki PZT ürünü ayrı ayrı saflaştırılarak son iki ürün birleştirildi.
2. 300 µl PZT ürünü üzerine 300 µl bağlayıcı (binding) tampon eklendi ve hafifçe karıştırıldı.
3. Karışım saflaştırma kolonuna aktararak 11.000 g'de 1 dakika santrifüj edildi. Tüpteki sıvı atıldı ve kolon 250 µl yıkama tamponu ile iki kez yıkandı.

4. Yıkama sonrası 11.000 g'de 2 dakika çevrilerek etanol içerikli yıkama tamponu ortamdan uzaklaştırıldı.
5. Yeni ependorfa aktarılan kolon üzerine 30 µl elüsyon tamponu eklenerek oda ısısında 2 dakika bekletildi.
6. 11.000 g'de 1 dakika çevrilerek saf PZT ürünü elde edildi.

5.2.6. Restriksiyon enzimleri ile kesim

Saflaştırılmış PQE30 ve NS3 restriksiyon enzimleri ile kesildi. NS3 için 5 adet, PQE30 için 4 adet reaksiyon hazırlandı. Son ürünler PQE30 ve NS3 için ayrı ayrı birleştirilerek son hacimleri 60 µl olacak şekilde saflaştırıldı. PQE30 için 'NucleoSpin Plasmid' ekstraksiyon kiti, NS3 için 'GeneMark' PCR Clean-Up Kit protokolleri kullanıldı.

NS3 PZT ürünü	4 µl
BamHI	1 µl
HindIII	2 µl
10X Restriksiyon enzim tamponu	2 µl
Distile su	11 µl

Karışım 37 °C'de 240 dakika
80°C'de 10 dakika inkübe edildi.

Plazmit (PQE30)	0,8 µl
BamHI	1 µl
HindIII	2 µl
10X Restriksiyon enzim tamponu	2 µl
Distile su	14,2 µl

Karışım 37 °C'de 240 dakika
80°C'de 10 dakika inkübe edildi

Plazmit (PQE30) enzimlerin kesim etkinliğini denetleme açısından sadece BamHI ve sadece HindIII ile ayrı ayrı kesildi. Eksik enzim miktarı kadar su ilave edildi. PQE 30 ve NS3 5.2.5 başlığındaki kolon saflaştırma protokolü kullanılarak son ürünler PQE30 ve NS3 için ayrı ayrı birleştirilerek son hacimleri 60 µl olacak şekilde saflaştırıldı. Daha sonra ürünler %2'lik agaroz jelde yürütüldü. Agaroz jelde Ethidium Bromid ile 8 ng üzerindeki bantlar görülebilir.¹³³ Bu görüntüleme sonrası 1 ve 6 numaralardaki bantlar dikkate alınarak ligasyon basamağına geçildi.

5.2.7. Ligasyon

Görüntüleme sonrası kesilmiş pQE 30/NS3 oranları yaklaşık 1/1, 1/2, 1/3 olacak şekilde ligasyon reaksiyonu hazırlandı. Bütün işlemler buz üzerinde yapıldı. (tablo 5)

	1.ligasyon	2. ligasyon	3. ligasyon
Vektör(pQE30)	3 µl	3 µl	3 µl
PZT ürünü	3 µl	5 µl	10 µl
10X ligaz reaksiyon tamponu	2 µl	2 µl	2 µl
T4 Ligaz enzimi (1 U / µl)	1 µl	1 µl	1 µl
Distile su	11 µl	9 µl	4 µl

Tablo 5: Ligasyon tepkimeleri

Karışım 22 °C’de 1 saat inkübe edildi.

5.2.8. M15 kompetan *Escherichia coli* hücrelerinin hazırlanması

M15 stoğundan 25 µg/ml kanamisin içeren LB agara 37°C’de bir gecelik inkübasyonla canlandırma yapıldı. Daha sonra 10mL 25 µg/ml kanamisin içeren LB broth içine bir koloni ekilerek 37°C’de 200 rpm’de bir gece inkübe edildi. 1mL alınarak önceden etüvde 37°C’ye 100 mL kanamisin içeren LB broth içine konarak 37°C’de 200 rpm’de bir saat tutuldu. Bu süre sonunda 30 dakikada bir 600 nm’de OD ölçümü yapıldı. OD 0,4-0,5 arasında yaklaşık 1,5-2 saat buzda 5 dakika bekletildi. Buzda soğutulmuş 2 adet falkon tüpüne 50’şer mL dağıtıldı. 4°C’de 4000g’de 5 dakika çevrildi. Üst faz dikkatlice atıldı ve dipteki çökeltinin (hücreler) derhal buz üzerine alındı. Pelletin (çökeltinin) üzerine yavaşça 15 mL soğuk TFB 1 tampon eklendi. Buz üzerinde 90 dakika bekletildikten sonra 4°C’de 4000 g’de 5 dakika çevrildi ve üst faz atıldı, hemen buz üzerine alındı. Her bir tüpe 2mL buzda bekletilmiş TFB 2 tamponu eklendikten sonra steril mikrosantrifüj tüplerine 200’er µL olacak biçimde alikotlandı ve -80 °C’de saklandı.

5.2.9. M15 kompetan *Escherichia coli* hücrelerinin ligasyon ürünü ile transformasyonu

1/1, 1/2, 1/3 oranlarındaki 20 µl’lik ligasyon ürünleri 100 µl kompetan M15 *E. coli* hücrelerinin üzerine tek hamlede konuldu, pipetaj yapmadan hafifçe karıştırılarak bir kez masaya vuruldu. Buz üzerinde 30 dakika bekletildi. 42 °C’de 90 saniye bekletildi ve çalkalamadan tekrar buz üzerine alındı. 5 dakika bekletildikten sonra, üzerine 250 µl, daha önceden oda sıcaklığına getirilmiş SOC besiyeri eklenerek 200 rpm de 1 saat 37°C’de inkübe edildi. Daha sonra 100 µl hacimlerde 25 µg/ml kanamisin ve 100 µg/ ml ampisilin içeren LB agar yüzeyine, 3’er cm’lik kenarlı üçgen şeklindeki tel öze kullanılarak yayıldı.

12 saat sonra belirginleşen NS3 ile olası transforme kolonilerin sayısı şöyleydi:

1/1’lik orandaki plak: 42 koloni

1/2’lik orandaki plak: 79 koloni

1/3’lik orandaki plak: 59 koloni

Bu koloniler steril kürdanlar kullanılarak alt yüzü cama yazar kalem ile düzgün karelere bölünmüş antibiyotikli LB agar yüzeyine ve mikrosantrifüj tüplerindeki antibiyotikli LB sıvı besiyerine inoküle edilerek 37 °C’de bir gece inkübe edildi. LB agar yüzeyine alınan replikalar DNA dizileme sonuçları ortaya çıkana kadar +4°C’de saklandı.

5.2.10. İnsert içeren kolonilerin seçimi

Replikaların hazırlanması ile aynı anda steril kürdanlar kullanılarak pQE30 dizileme primerleri ile 160 koloniden PZT yapıldı. Koloni sayısı fazla olduğu için ilk 5 tüpde 6'şar, kalan 13 tüpün her birinde 10'ar koloninin PZT'si yapılmıştır.

95 °C'de 2 dakika	ilk denatürasyon
94 °C'de 1 dakika	
50 °C'de 1 dakika	35 döngü çoğaltma
72 °C'de 2 dakika	
72 °C'de 15 dakika	son uzatma
+4 °C'de	bekleme

Karışım toplam hacmi 50 µL olacak şekilde hazırlandı. Bu karışım 10 mM Tris HCl, 20 mM (NH₄)₂SO₄, 1 mM MgCl₂, 0,2 mM dNTP, 0,2 mM pQE30 ileri öncül, 0,2 mM pQE30 geri öncül ve 2,5 u Taq DNA polimeraz içermektedir.

Distile su	38,5µL
10x Taq Tampon (MgSO ₄ 'sız)	5µL
MgCl ₂ (25 mM)	2µL
dNTP (10 mM)	1µL
pQE30 ileri öncül (10 pM)	1µL
pQE30 geri öncül (10 pM)	1µL
Taq Polimeraz (5 u/µL)	0,5µL
Ürün	1µL

5.2.11. Dizileme primerleri kullanılarak elde edilen PZT ürünlerinin dizi analizi

PZT sonucu elde edilen vektörün doğru hedef diziyi (insert) taşıdığını anlamak için uygun kolonilerden bir tanesi dizi analizine gönderilmiştir. Bu seçim PZT görüntülerinde insert içerdiği düşünülen koloniler arasından rastgele olarak yapılmıştır. Uygun plazmitleri taşıyan M15 *E. coli* hücreleri +4 °C'deki replikaları kullanılarak 900 µl antibiyotikli LB sıvı besiyeri içeren mikrotüplere inoküle edildi. 8 saat 37°C'de inkübe edildi. Üzerine 100 µl %50 lik gliserol eklenerek -80 °C'de saklandı.

5.2.12. Proteinlerin ifadesi ve saflaştırılması

1. Transforme edilen hücreler, -80 °C'de saklanan %5 gliserollü stoktan, 100 µg/ml ampicilin, 25 µg/ml kanamisin içeren LB sıvı besiyeri içerisine alınarak bir gece inkübe edildi.
2. 50 katı hacmindeki 100 µg/ml ampicilin, 25 µg/ml kanamisin içeren yeni LB sıvı besiyerine aktarıldı.
3. 37 °C de 200 rpm de OD₆₀₀=1 oluncaya dek inkübe edildi.
4. 1 mM IPTG eklendi ve 37 °C'de 200 rpm de 7 saat daha inkübe edildi.
5. +4 °C'de, 4000 g'de 7 dakika santrifüj yapıldı, elde edilen hücre çökeltileri -70 °C'de saklandı.

6. 10 ml hacimdeki kültürden elde edilen çökelti üzerine 10mL lizis tampona 1 tablet olacak şekilde proteaz inhibitör kokteyli eklenmiş 1000 µl hacimde % 0,5 NP-40 içeren tampon B eklenerek köpürtmeden vortekslendi ve homojenizasyonu sağlandı.
7. Buz üzerinde 5-10 dakika erimesi beklendi.
8. Karışım buz üzerinde soğutulmuş mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı.
9. +4 °C'de , % 70 amplitütte, 1 saniye sonikasyon 1 saniye bekleme dönemleri ile 1 dakika süren sonikasyon işlemi 3 kez tekrarlandı.
10. Oda sıcaklığında 1 saat süre ile köpürtmeden vortekslenerek, inklüzyon cisimciklerinin açılması sağlandı.
11. 10.000 g'de, 25 dakika çevrildi.
12. Hücre lizatının süpernatant kısmı alınarak, buz üzerinde soğutulmuş yeni bir ependorfa aktarıldı.
13. 1000 µl süpernatana 75 µl kullanıma hazır (%50 lik) Ni-NTA agaroz eklenerek 200 rpm'de, 1 saat köpürtmeden vortekslendi ve karışım boş kromatografi kolonuna aktarıldı.
14. Karışımı içeren kolon, 700 g'de 2 dk çevrildi, süzülen kısım -20 °C'de saklandı.
15. 1200 µl tampon C eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, birinci yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
16. 1200 µl tampon C eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, ikinci yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
17. 1200 µl tampon C eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, üçüncü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
18. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 1. isopropanollü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
19. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 1. isopropanolsüz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
20. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 2. isopropanollü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
21. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 2. isopropanolsüz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
22. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 3. isopropanollü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
23. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 3. isopropanolsüz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
24. 1200 µl tampon R eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 4. isopropanollü yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
25. 1200 µl tampon D eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi, 4. isopropanolsüz yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı -20 °C'de saklandı.
26. 200 µl tampon E eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi ve protein elüe edildi.
27. 200 µl tampon E eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi ve önceki elüsyona ilave edildi.
28. 200 µl tampon E eklenerek, 700 g'de 2 dk. çevrildi ve önceki elüsyona ilave edildi.
29. Elüsyon karışımlarının 20 µl'si SDS-PAGE için -20 °C'de saklandı.
30. Saflaştırma işlemi 4 kere tekrar edildi ve elüsyon karışımları birleştirilerek, 50mL 6M, 4M, 2M, 1M, 0.5M üre'li ve 50 mL saf PBS'e karşı üreliler için 4'er saat, PBS için 16 saat diyaliz uygulandı.
31. Yaklaşık 600 µl olan protein preparatı, 60 µl hacimlerde alikotlanarak -20 °C'de saklandı.

5.2.13. SDS-PAGE için örneklerin ve jelin hazırlanması

%10 luk SDS poliakrilamit jelin hazırlanması

1 mm'lik aralayıcı ve 1 mm'lik aynı boyutlardaki iki cam levha yapışmaması için izopropanol ile silindi. Karşılıklı getirilerek çerçeveli ayırma standına (*frame casting stand*) yerleştirildi, klipsleri sıkıştırıldı ve altında sünger bulunan ayırma standına (*casting stand*) oturtuldu.

1- % 10 luk ayırma jelinin hazırlanışı;

Distile su	4mL
% 30 Akrlamit Bis-Akrlamit	3.3mL
1.5M Tris (pH: 8.8)	2.5mL
%10 SDS	100µL
%10 Amonyum persülfat	100µL
TEMED	4.5µL

Homojenize etmek için çalkalandı ve hemen bir enjektör yardımı ile döküldü. Üzerine yine bir enjektör ile camların üst hizasına kadar isopropanol eklendi. Kuruması için 45 dakika beklendi. Bu arada yığma jeli hazırlandı.

2- Yığma jelinin hazırlanışı;

Distile su	2.1mL
% 30 Akrlamit Bis-Akrlamit	0.5mL
1M Tris (pH:6.8)	0.380mL
%10 SDS	30µL
%10 Amonyum persülfat	30µL
TEMED	3.5µL

Kuruyan ayırma jelinin üzerindeki isopropanol dökülüp kenarından kurutma kâğıdı ile fazlası alındıktan sonra hemen yığma jeli döküldü ve taraklar yerleştirildi. 1 saat yığma jelinin polimerize olması için beklendi ve taraklar dikkatlice çıkartılarak 1X SDS PAGE yürütme tamponu (*running buffer*) ile doldurulmuş tanka yerleştirildi. 0.saat hücre lizatı, 7.saat hücre lizatı, lizatın matriksten süzüntüsü (FT-flowThrough), yıkama sonrası kolondan süzülen sıvı (C1, C2, C3) kısımlar ve edilen protein preparatlarının (E) üzerine kendilerinin 1/5'i kadar 5X SDS-PAGE örnek tamponu eklendi. Örnekler önceden 95 °C'ye ayarlanmış su banyosunda 7 dakika kaynatıldı ve 1.000 g'de 5 saniye çevrildi.

5.2.14. SDS-PAGE

1. Marker ve örneklerden 20'şer µl yüklendi.
2. Marker ayırma jeline gelene kadar 70 voltta, buradan sonra 90 voltta yürütülerek marker bantları yeterince açılınca elektroforez işlemi durduruldu.
3. Jel nazıkce çıkarılarak isopropanol fiksasyon çözeltisi içinde 45 dakika 100rpm'de çalkalandı.
4. İsoopropanol fiksasyon çözeltisi yavaşça boşaltılarak SDS-PAGE jeli hızlı Coomassie blue boyama çözeltisi eklendi ve 2 saat 100rpm'de çalkalandı.
5. Ardından SDS-PAGE jeli hızlı Coomassie blue boyama çözeltisi boşaltılarak Coomassie blue boyasından arındırma çözeltisinde yarım saatte bir değiştirilerek 2 saat 100rpm'de çalkalandı ve görüntülendi.

5.2.15. Western blotlama

1. Marker ve örneklerden 20'şer µl yüklendi.
2. Marker ayırma jeline gelene kadar 70 voltta, buradan sonra 90 voltta yürütülerek marker bantları yeterince açılınca elektroforez işlemi durduruldu.
3. Jel ile aynı boyutta iki adet watman kâğıdı yarı kuru transfer tamponu ile ıslatılarak elektrobloetter üzerine yerleştirildi.
4. Jel ile aynı boyutta kesilmiş PVDF membran, metanolde 5 dakika bekletildikten sonra yarı kuru transfer tamponu ile ıslatıldı ve transfer tamponu ile ıslatılmış watman kâğıtlarının üzerine yerleştirildi.
5. Jel, PVDF membranın üzerine yerleştirildi.
6. Jel ile aynı boyutta iki adet watman kâğıdı yine yarı kuru transfer tamponu ile ıslatılarak jelin üzerine yerleştirildi.
7. Daha sonra bir cam tüp bu tabakaların üzerinde yuvarlanarak, tabaka aralarındaki hava kabarcıkları giderildi.
8. Elektro-bloetter cihazının anot kutbuna bağlı kapağı kapatıldı.
9. 10 voltta 45 dakika boyunca elektrotransfer işlemi gerçekleştirildi.
10. Karıştırıcı üzerinde, TTTS-T içerisinde çözünmüş 30 ml % 3 SSA (w/v) bloklama solüsyonu içerisinde oda ısısında bir saat inkübe edildi.
11. Bloklama solüsyonu ile 1/2000 oranında seyreltilen birincil antikor (RGS His Antibody) içeren kaba alınan PVDF membran oda sıcaklığında 1 saat 100 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi.
12. PVDF membran TTST-T ile çalkalayıcıda 10 dakika boyunca 2 kez yıkandı.
13. Membranın yıkandığı TTTS-T tamponu döküldü ve bloklama solüsyonu ile 1/10000 oranında seyreltilen ikincil antikor [yaban turpu peroksidaz (horse-radish peroxidase) isaretili anti-fare IgG] içeren kaba alınan PVDF membran oda sıcaklığında 1 saat 100 rpm'de çalkalanarak inkübe edildi.
14. PVDF membran TTST-T ile çalkalayıcıda 10 dakika boyunca 6 kez yıkandı.
15. Temiz bir cam yüzeyine alınan PVDF membran üzerine yaban turpu peroksidaz ile tepkimeye giren ECL substratı membranın üzerini kaplayacak şekilde döküldü.
16. Beş dakika sonra karanlık odada arasında film kasetinde yerleştirilen PVDF membranın üzerine fotoğraf filmi konularak film kaseti kapatıldı.
17. Otuz saniye, bir dakika, üç dakika ve on dakikalık sürelerde aynı işlem tekrarlanarak en uygun pozlanma süresinde görüntü veren fotoğraf kâğıdı kullanıldı.

5.2.16. Protein yoğunluğunun belirlenmesi

Saflaştırılan protein preparatı ve BSA ile hazırlanan standartların üzerine eşit hacimde BCA protein konsantrasyon saptama indikatörü eklenerek 37 °C'de 2 saat inkübasyondan sonra spektrofotometre cihazında, 562 nm dalga boyunda ölçüldü.

5.2.17. Protein preparatındaki endotoksin yoğunluğunun belirlenmesi

Saflaştırılan protein preparatı PBS ile 1 µg / mL konsantrasyonda sulandırıldı. Daha sonra hem protein preparatları (1/1 – 1/2 - 1/4 - 1/8 – 1/16 – 1/32 – 1/64 – 1/128) ve hem de endotoksin standartları (400 – 40 – 4 - 0,5 – 0,25 – 0,125 – 0,06 – 0,03 – 0,015 EU / ml) ile hazırlanan dilusyonların üzerine eşit hacimde amebosit lizati çözeltisi eklendi. 37 °C'de 1 saat

inkübe edildi, sonra jelleşmenin olduğu tüpler kaydedildi. Üretici firmanın (E-Toxate kit(ET0200)) önerilerine göre katı jel oluşumu pozitif olarak, yumuşak jel, bulanıklık, vizkozitede artma negatif olarak değerlendirildi.

5.2.18. Saflaştırılan rekombinant proteinin hasta ve sağlıklı kontrol serumları ile denenmesi

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Merkez laboratuvarından sağlanan Anti-HCV (+) ve anti-HCV (-) serum örnekleri üretici firma INNOGENETICS N.V.'nin INNO-LIA HCV Skore kiti ile çalışıldı. SDS-PAGE jelinde yürütüldükten sonra önceden anlatıldığı şekilde (5.2.15 başlığında) PVDF membrana aktarılan 2 adet 1'er µg NS3 protein bandı ve marker bu membrandan jelde yürüme hizaları boyunca kesilerek çıkarıldı. Test AutoLipa Innogenetics analizör cihazında çalışıldı.

Test basamakları aşağıdaki şekildedir;

- Örnek dilüsyon solüsyonu 1mL + Örnek 20µl (+ ve – örnek için ayrı ayrı) 3 saat inkübasyon
- Yıkama solüsyonunun her seferinde 1mL'si ile 3 kez 6 dakika yıkama
- 1mL RTU konjugat ile 30 dakika inkübasyon
- Yıkama solüsyonunun her seferinde 1mL'si ile 3 kez 3 dakika yıkama
- 1mL RTU substrat ile 30 dakika inkübasyon
- 1mL durdurma solüsyonu ile 30 dakika inkübasyon

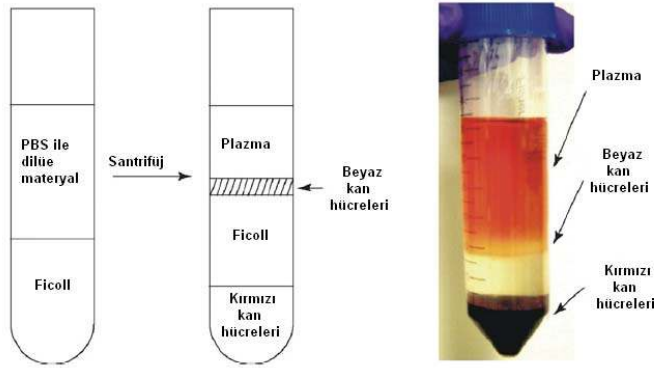
5.2.19. Heparinize kan örneklerinin toplanması

Çalışma grubundan toplam 40'ar mL heparinize kan örnekleri alındı. Bunun 20mL'si PBMC izolasyonu için kullanıldı

5.2.20. Periferik kan mononükleer hücrelerinin (PBMC) ayrılması ve sayımı

Her kontrol için kullanılan 2 tüp önce 800 rpm'de 10 dakika çevrildi. Daha sonra her bir tüp sarsmadan spor üzerine alındı. Plazma ve serumun birleşim yeri beyaz kan hücrelerini içerdiğinden iki tüpün herbirinde bu bölgeden 1,5 mL materyal (buffy coat) steril pastör pipeti ile alınarak 3 mL PBS üzerine ilave edildi. Fakat bu bölge aynı zamanda eritrositler, trombositler gibi diğer kan hücrelerini de içerdiğinden Ficoll ile tabakalandırılarak beyaz kan hücreleri saf olarak ayrıldı. Bunun için 3mL PBS ile dilüe edilen materyal 3mL Ficoll üzerine steril pastör pipeti ile yavaşça tabakalandırıldı. Bekletmeden 2300 rpm'de, +4°C'da 13 dakika çevrildi.

Resim 5 te de görüldüğü gibi beyaz kan hücrelerini içeren beyaz bulutsu tabaka steril pastör pipeti ile toplanarak yeni steril bir tüpe aktarıldı. Bekletmeden 4000 rpm'de, +4°C'da 1,5 dakika çevrildi.



Resim 5: Ficoll dansite gradiyentine göre PBMC eldesinin şematik görüntüsü

Üst faz dikkatlice döküldü ve üzerine 1mL PBS eklendi. 4000 rpm’de, +4°C’da 1,5 dakika çevrildi. Üst faz yine dikkatlice döküldü ve üzerine 300µl steril distile su eklendi (mevcut eritrositleri patlatmak için), 30 saniye sonra bunun üzerine 1mL PBS konarak 4000 rpm’de, +4°C’da 1,5 dakika çevrildi. Süpernatant dikkatlice döküldü ve üzerine %10 Fetal Bovin Serum, %1 streptomisin, %1 penisilin içeren RPMI 1640’dan 1mL eklendi. Hücre sayımı için Thoma lamı kullanıldı. Lamın üzerine lamel kapatılarak RPMI 1640 ile dilüe edilen 10 µl örnek lam-lamel arasına sızdırıldı. 16 büyük kare içerisindeki hücreler sayıldı. Bu alan 0,1mm³ olduğundan 1mL’deki hücre sayısı için 10000 ile çarpıldı. Daha sonra hücre sayısı 1.10⁶ olacak şekilde RPMI 1640 ile dilüe edildi. Hücre canlılıkları Acridin orange-Ethidium bromide boyama yöntemi ile floresans mikroskop altında kontrol edildi.

5.2.21.Örneklerinin antijenle uyarılması ve hücre kültürü

24-kuyucuklu steril hücre kültürü plaklarına, aşağıda gösterilen şekilde dağıtıldı. Tüm kuyucuklardaki hacimler eşit olacak şekilde PBS ile tamamlandı.

1. kuyucuğa 2mL Tam Kan + PBS
2. kuyucuğa 1mL PBMC + PBS
3. kuyucuğa 2mL Tam Kan + 10 µg/mL PHA + PBS
4. kuyucuğa 1mL PBMC + 10 µg/mL PHA + PBS
5. kuyucuğa 2mL Tam Kan + 0,5µg/mL NS3 + PBS
6. kuyucuğa 1mL PBMC + 0,5µg/mL NS3 + PBS
7. kuyucuğa 2mL Tam Kan + 1µg/mL NS3 + PBS
8. kuyucuğa 1mL PBMC + 1µg/mL NS3 + PBS
9. kuyucuğa 2mL Tam Kan + 2µg/mL NS3
10. kuyucuğa 1mL PBMC + 2µg/mL NS3

Hücre kültürleri hazırlandıktan sonra 24 saat 37°C’da inkübe edildi. PBMC’leri içeren kuyucukların tamamı, tam kan kültürlerinin plazma kısımları alınarak sitokin ELISA deneyleri için kullanıldı. Kullanım sonrası kalan kısımlar -80°C’da saklandı.

5.2.22. IFN- γ , IL-10, IL-4 düzeylerinin plak ELISA yöntemi ile ölçülmesi

Üreticinin önerdiği şekilde dilüe edilen insan IFN- γ , insan IL-10, insan IL-4 standartları insan IL-10 ve IL-10 için 50 μ l, IL-4 için 100 μ l hacimlerde ilk 8 kuyucuğa dağıtıldı. Örnekler üç'er kez çalışıldı. Sitokinler ve çalışma düzeni tablo 5 te gösterilmiştir.

	IFN- γ		IL -10		IL -4	
1)	50 μ l İnkübasyon Tampon + 50 μ l Standart ve kontroller + Biotin konjugat 50 μ l	90 dakika oda ısısı + *	Standart ve kontroller + 50 μ l İnkübasyon Tampon	2 saat oda ısısı + *	100 μ l Standart ve kontroller + Biotin konjugat 50 μ l	2 saat oda ısısı + *
2)	100 μ l Streptavidin HRP çalışma solüsyonu	45 dakika oda ısısı + *	100 μ l Biotin konjugat	2 saat oda ısısı + *	100 μ l Streptavidin HRP çalışma solüsyonu	30 dakika oda ısısı + *
3)	100 μ l Tetrametilbenzidin (stabilizd chromogen) sübratı	30 dakika oda ısısı	100 μ l Streptavidin HRP çalışma solüsyonu	30 dakika oda ısısı + *	100 μ l Tetrametilbenzidin (stabilized chromogen) sübratı	30 dakika oda ısısı
4)	100 μ l Durdurma çözeltisi	450nm' de okuma	100 μ l Tetrametilbenzidin (stabilizd chromogen)	30 dakika oda ısısı	100 μ l Durdurma çözeltisi	450nm' de okuma
5)			100 μ l Durdurma çözeltisi	450nm' de okuma		

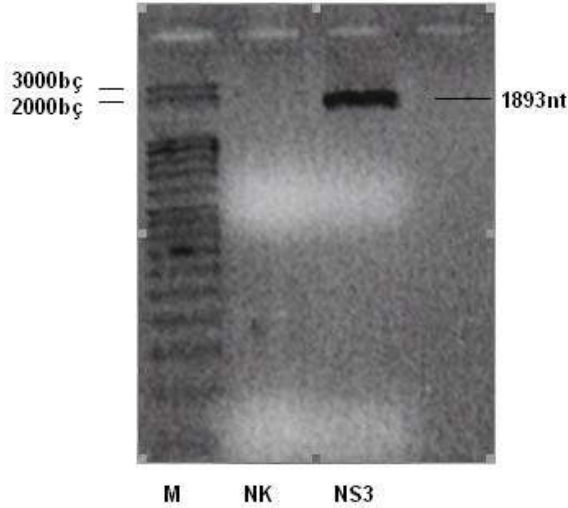
Tablo 5: Tam kan plazması ve PBMC'lerde ELISA yöntemi ile IFN- γ , IL-10 ve IL-4 ölçüm protokolü.

* Her bir kuyucuğu 4 kez 400 μ L yıkama çözeltisiyle yıkama. Örnek kuyucuklarında elde edilen OD değerleri kaydedildi.

6. BULGULAR

6.1. Polimeraz Zincir Tepkimesi

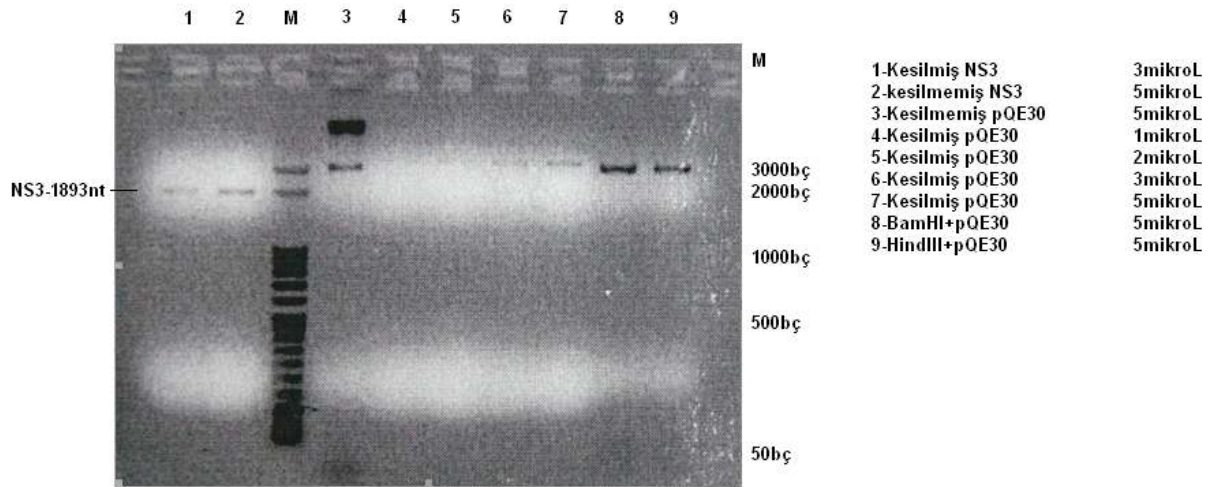
Kalıp RNA olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'ndan tanısal araştırma amacıyla elde edilmiş HCV genotipi 1 taşıdığı bilinen hasta örneğinden izole edilen total RNA'dan cDNA elde edilmiş, ardından 'Nested' PZT yapılmıştır. Ürünün %2'lik agaroz jeldeki görüntüsü Resim 1 de görülmektedir.



Resim 1: HCV'ne ait NS3 PZT ürünü; %2'lik agaroz jelde 115 Volt'da 35 dakika yürütülerek görüntülenmiştir. M: "Marker" (Fermentas #SM0371), NK: negatif kontrol, NS3

6.2. Restriksiyon Enzim Kesimi ve Ligasyona Girecek Ürün Seçimi

Ligasyon tepkimesine girecek ürünlerin büyüklüklerinin doğru ve konsantrasyonlarının birbirine yakın olması en uygun şekilde sokma (optimizasyon) çalışmaları için önemlidir. Çalışmamızda kesim sonrası ligasyonda kullanılacak vektör ve insert miktarları agaroz jel elektroforezi sonrasında görsel olarak değerlendirilmiş ve seçim buna göre yapılmıştır. Ürünlerin %2'lik agaroz jeldeki görüntüleri aşağıdadır (Resim 2).

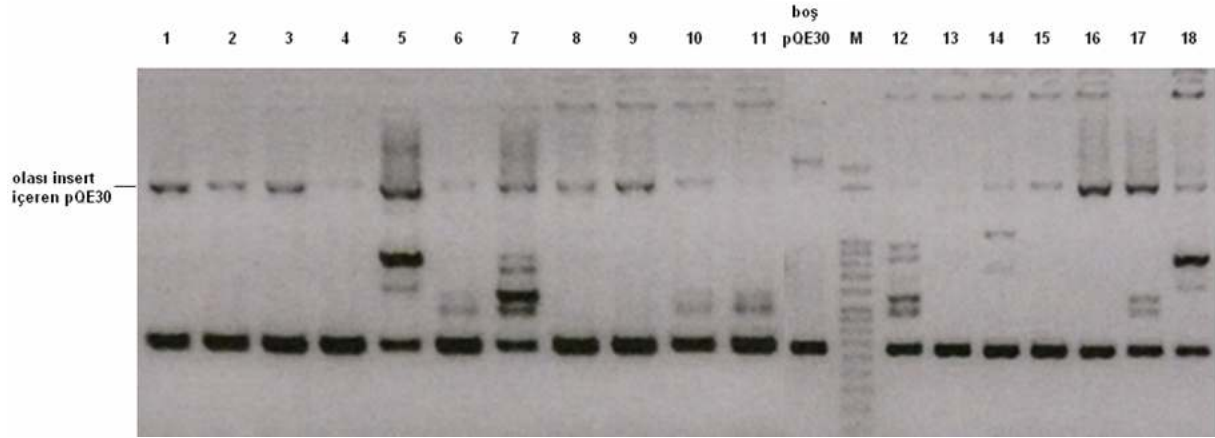


Resim 2: NS3 ve dilüsyonlu pQE30'un agaroz jel görüntüsü

Jelde 8 ng ve üzerindeki bantlar görülebilmektedir. Burada 1. ve 6. bantlar hem bu değerin üzerindedir hem de intensite açısından birbirlerine yakın bir görüntüye sahiptirler. Bu yüzden bu örnekler belirli oranlarda kullanılarak ligasyon reaksiyonuna alınmışlardır.

6.3. Transformasyon ürünleri

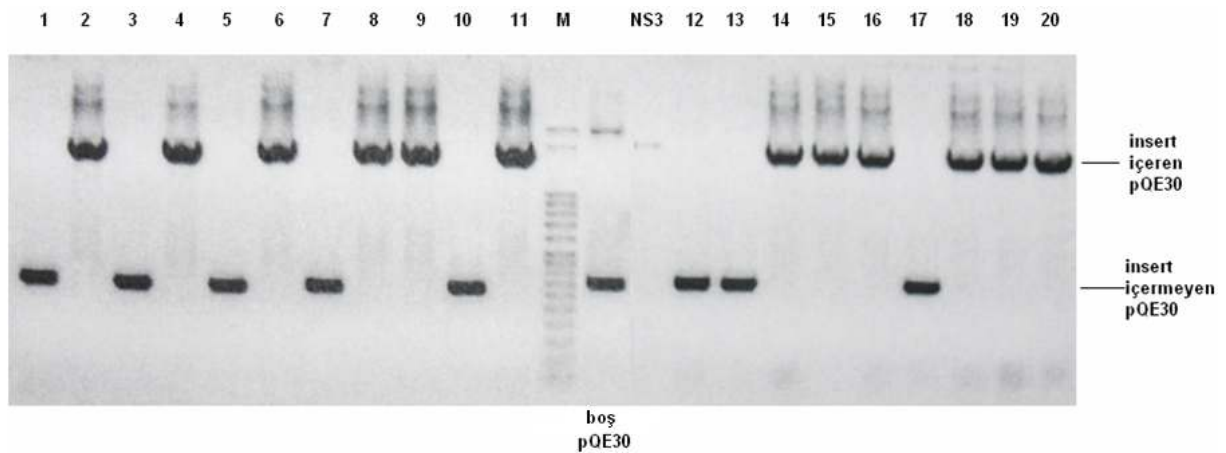
İç öncüller kullanılarak çoğaltılan ürün pQE30 vektörüne takıldı ve *E. Coli* M15 hücrelerine transformasyon sonrasında rekombinant vektörü içeren kolonileri saptamak için toplam 160 koloniden hazırlanan 18 havuz PZT ile tarandı (Resim 3-1) 1.-5. numaralı havuzlar 6 koloni, 6.-18. numaralı havuzlar ise 10 koloni içermektedir.



Resim 3 -1: Transformasyon sondası üreyen kolonilerin agaroz jel görüntüsü

Daha sonra görsel olarak uygun yoğunlukta bantlar içerdiği düşünülen 1. , 2. ve 17. tüpleri oluşturan kolonilerin ayrı ayrı PZT'si yapılarak NS3 içeren plazmid bulunduran kolonilerin seçilmesi sağlandı.

Buna göre 1 , 2 ve 17 numaralı havuzları oluşturan kolonilerden rastgele seçilen 20 tanesinin PZT ürünleri resim 3-2'de gösterilmiştir.



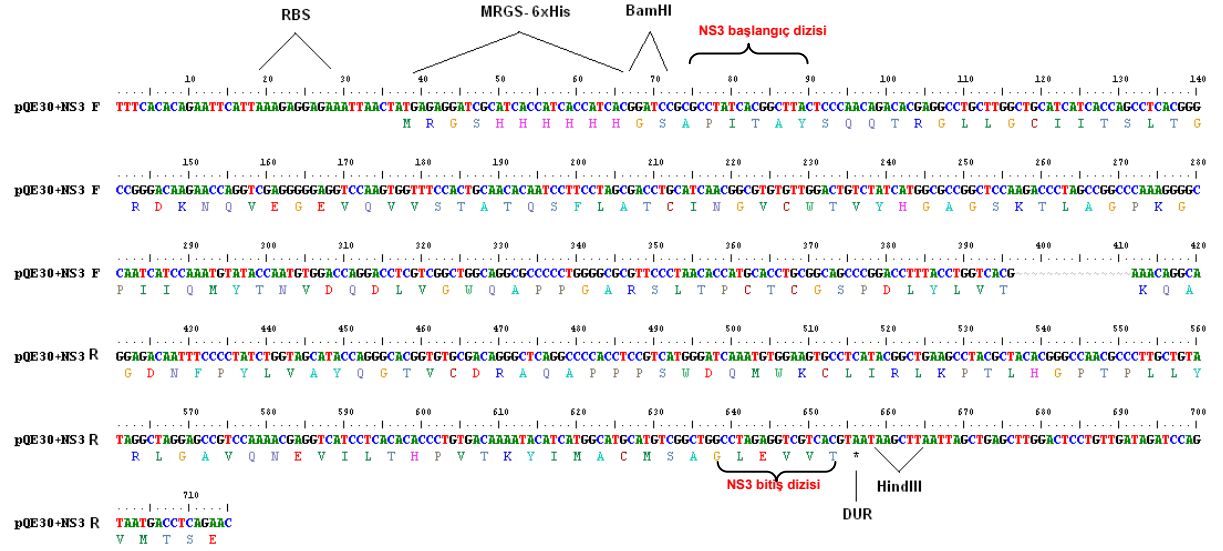
Resim 3 -2: Transformasyon sondası üreyen kolonilerin agaroz jel görüntüsü

NS3'e ait olası transforme kolonilerden elde edilen PZT ürünleri; sırasıyla; 2, 4, 6, 8, 9, 11 NS3 içeren batlar, 1, 3, 5, 7, 10, 12, 13, 17 NS3 içermeyen bantlar, M (marker), kesilmiş pQE30, NS3 (1893bp), 14, 15, 16, 18, 19, 20 yine NS3 içeren bantlar (insert içeren bantlar 2228bp, içermeyenler 335pb büyüklüğündedir)

Olası insert'li pQE30 bulunduran koloni 8 dizi analizi, ekspresyon ve saflaştırma için seçildi.

6.4. pQE30-NS3 DNA Dizilimi

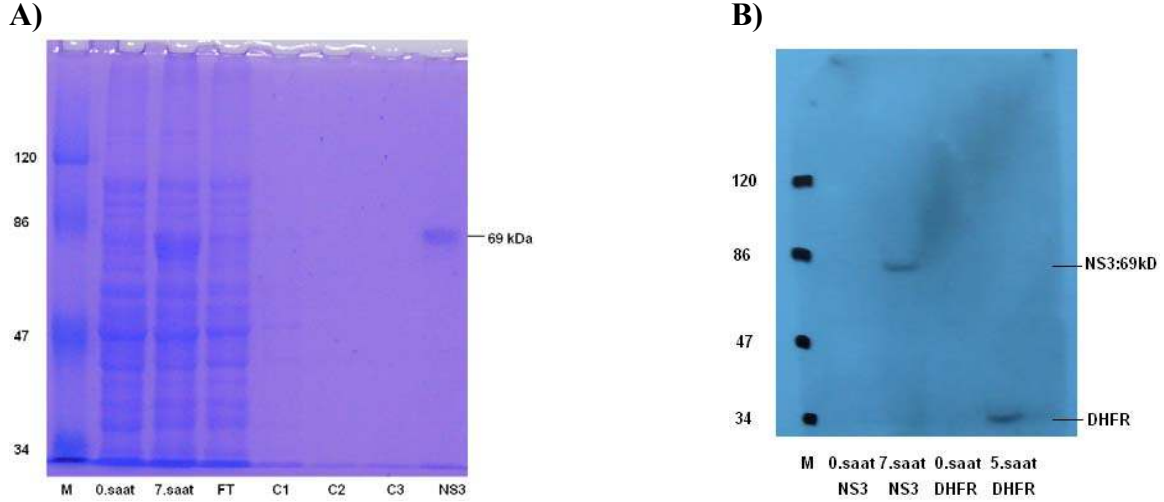
Protein üretimine geçmeden önce klonlanan dizinin, vektörün çerçevesine doğru oturduğunun doğrulanması gerekmektedir. Bu nedenle yapılan rekombinant ürünün DNA dizi analizi şekil 15'te gösterilmiştir. Insert'in doğru yönde ve çerçeve kayması olmadan yerleştiği aminoasit dizileri ile de doğrulanmıştır (Şekil 15).



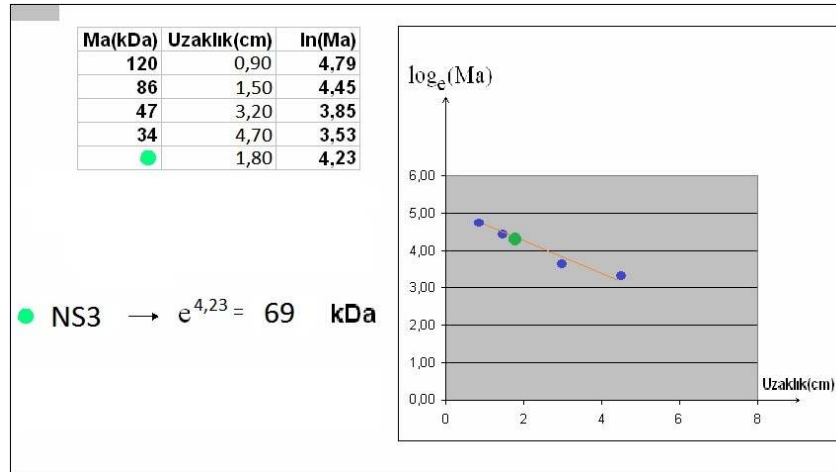
Şekil 15: NS3 içeren pQE30 vektörüne ait DNA dizi analizi ve karşılık gelen aminoasit dizileri (RBS: Ribozomal bağlanma sahası)

6.5. Saflaştırılan Rekombinant NS3 Preparatının SDS PAGE ve Western Blot Analizi

NS3 proteinlerini eksprese eden hücre lizatlarının yıkama ve elüsyon sonrası diyaliz ürünlerine ait SDS-PAGE jel ve RGS His antikorları ile yapılan Western blotlama fotoğrafı resim 4 te gösterilmiştir.



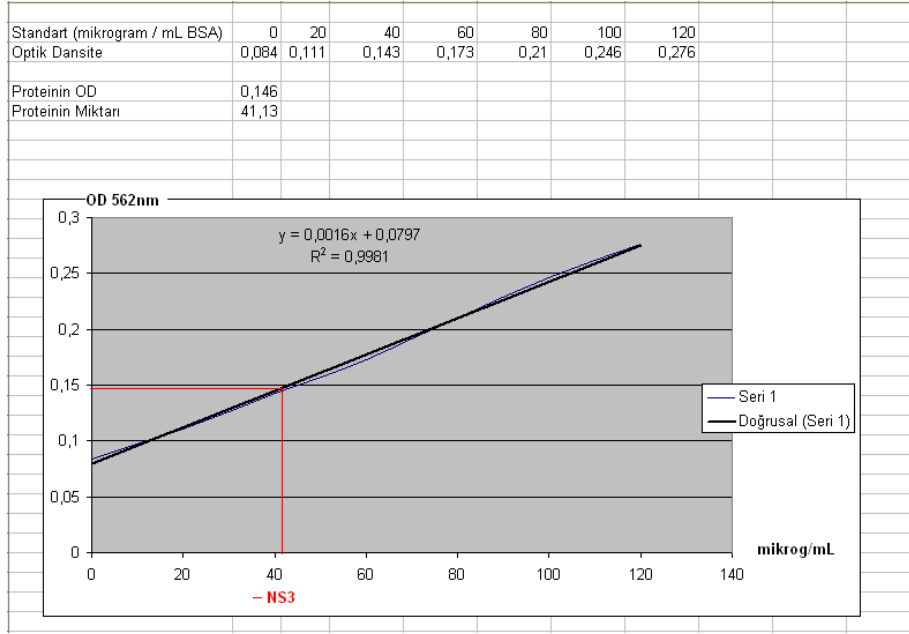
Resim 4: NS3'e ait SDS-PAGE ve western blot görüntüsü **A)**SDS-PAGE jel görüntüsü: M (marker), 0.saat; ekspresyonun 1 optik dansitede IPTG uyarımı öncesi lizat, 7.saat; ekspresyonun 1 optik dansitede IPTG uyarımı sonrası lizat, FT; Ni-NTA ile bağlanma sonrası matriks süzüntüsü, C1, C2, C3; yıkamalar, NS3; elüsyon sonrası diyaliz ürünü. **B)** NS3'ün ve kontrol olarak eksprese ettirilen dihidrofolat redüktaz'ın(26kD) western blotlama görüntüsü



Şekil 16: NS3 proteinine ait moleküler büyüklük hesaplaması.

6.6. Protein Yoğunluğu

BSA standartlarının OD değerlerine göre çizilen grafikde örneklerin OD değeri ve karşılık gelen protein konsantrasyonları belirlendi. BSA standartları ve protein preparatlarının OD değerleri Şekil 17'de gösterilmektedir. Bunun sonucunda mL'de 41,13 μ g protein elde edildiği saptandı.

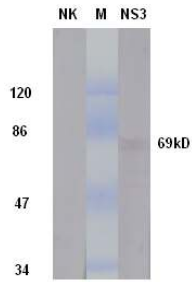


Şekil 17: NS3 protein preparatının yoğunluğu

6.7. Rekombinant NS3 Endotoksin Yoğunluğu

Kullanılan endotoksin saptama yönteminde kullanılan standartlara göre pozitif ve negatif olarak değerlendirme sınırları sırası ile 0,125 EU/mL ve 0,06 EU/mL dir. **NS3** için 1/8 dilüsyonda standart reaktiflere göre pozitif 1/16 dilüsyonda ise negatif olarak saptandı. Sonuç olarak 1 µg NS3 süspansiyonu içerisinde 1 EU = 0,1 ng endotoksin bulunduğu hesaplanmıştır. Bu değer 1 µg protein için kullanılabilir kabul edilen 0,3 ng'dan düşük olduğundan, hücre kültürü çalışmasına uygun olarak değerlendirildi .

6.8.Hasta ve Sağlıklı Kontrol Serumları ile Doğrulama



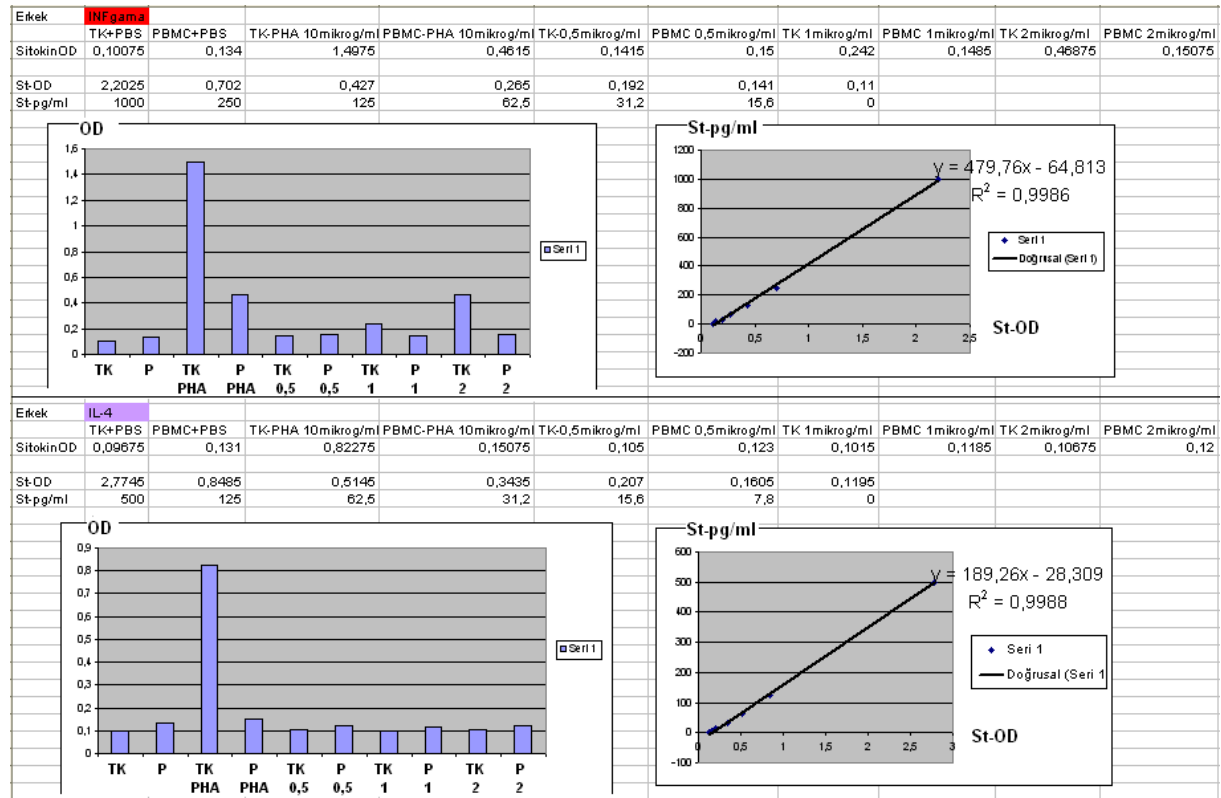
Resim 6: Hasta ve sağlıklı kontrol ile western blotlama sonucu

Anti-HCV pozitif ve negatif iki serum kullanılarak NS3 ürününün reaktivitesi western blot yöntemi ile kontrol edilmiştir. 69kDa'luk yaklaşık 1µg rekombinant protein içeren 2 PVDF membrandan birinde anti-HCV pozitif serum için doğru bant görüntülenmiş olup negatif serumla reaksiyon görülmemiştir. Bu sonuçla izole edilen proteinin rekombinant NS3 proteini olduğu hasta antikorları ile de gösterilmiştir.

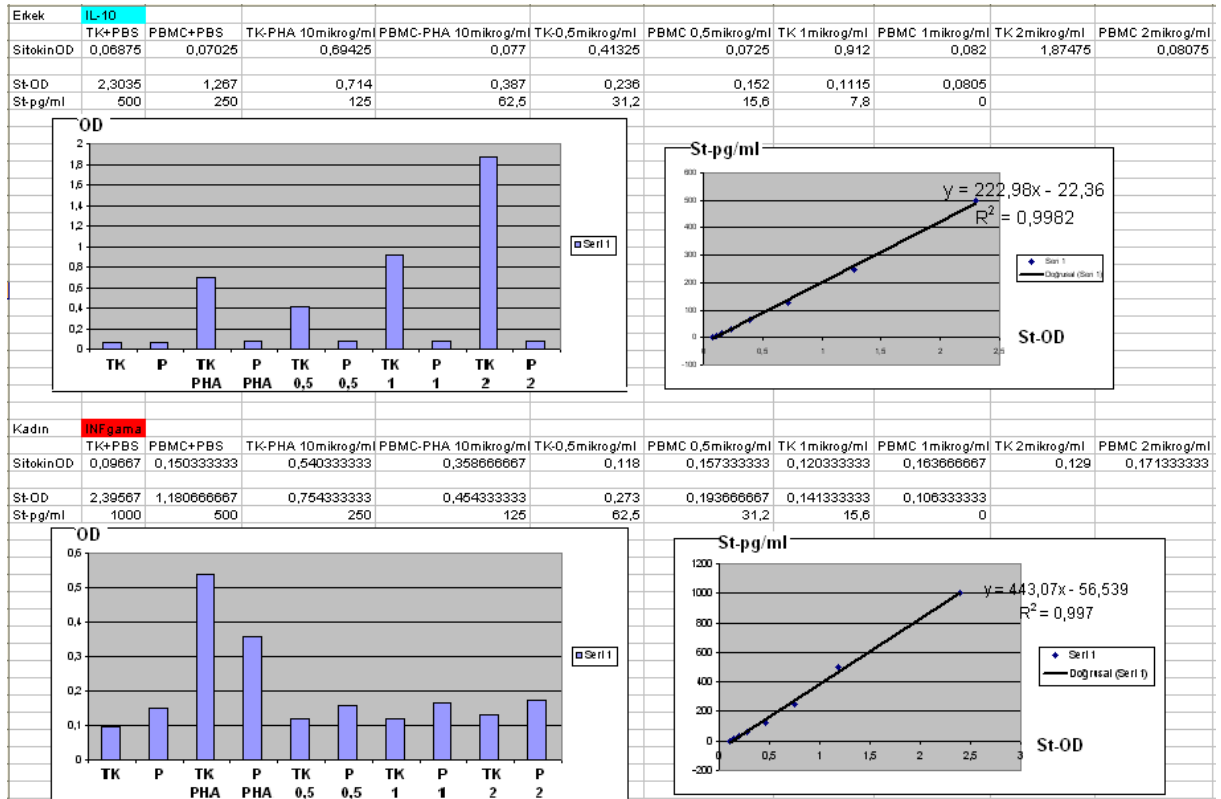
6.9. Plak ELISA Yöntemi ile Ölçülen Sitokin Düzeyleri

Tamamen sağlıklı dört erkek ve üç kadından oluşan grupta PHA ve rekombinant NS3 proteinine karşı IFN γ , IL-10 ve IL-4 sitokinlerinin yanıtları değerlendirilmiştir. Elde edilen sonuçlar şekil 18-1, şekil 18-2 ve şekil 18-3 te toplu halde gösterilmiştir.

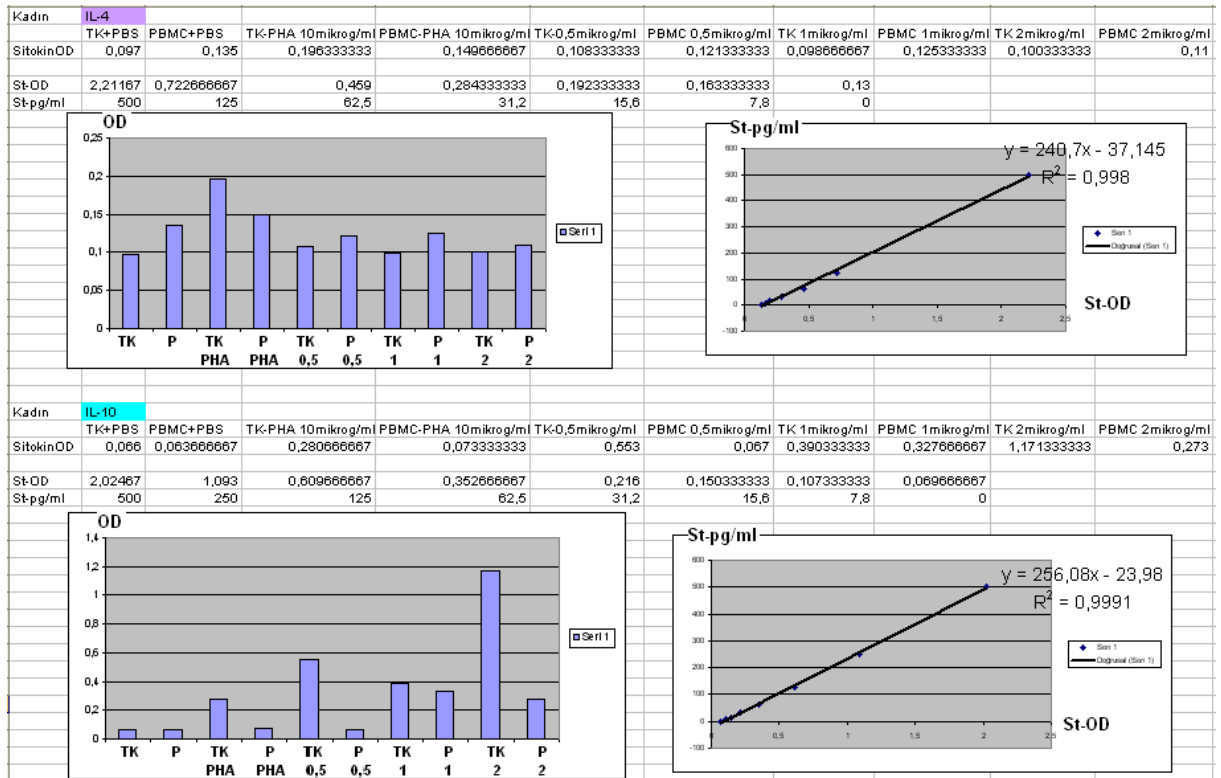
Şekil 18-1’de sağdaki grafiklerde o çalışmaya ait sitokin standartlarının OD’leri ve bu OD’ye karşılık gelen pg/ml cinsinden sitokin miktarları gösterilmiştir. Mavi sütunlar ise tam kan ve PBMC’lere ait erkek ve kadınlardaki ortalama OD değerlerini göstermektedir. Sütunlu grafiklerde mavi sütunlar sırasıyla **TK** (tam kan-uyarılmamış), **P**(PBMC-uyarılmamış), **TK-PHA**(10 μ g fitohemaglutinin ile uyarılmış TK), **P PHA** (10 μ g fitohemaglutinin ile uyarılmış PBMC), **TK 0,5** (0,5 μ g rekombinant NS3 ile uyarılmış TK), **P 0,5**(0,5 μ g rekombinant NS3 ile uyarılmış PBMC), **TK 1**(1 μ g rekombinant NS3 ile uyarılmış TK), **P 1**(1 μ g rekombinant NS3 ile uyarılmış PBMC), **TK 2** (2 μ g rekombinant NS3 ile uyarılmış TK), **P 2** (2 μ g rekombinant NS3 ile uyarılmış PBMC) OD yanıtlarını ifade etmektedir.



Şekil 18-1: Erkeklerde IFN γ , IL-4 sitokin yanıtları ortalamalarının ve Standartların OD grafikleri.



Şekil 18-2: Erkeklerde IL-10 ve kadınlarda IFN γ sitokin yanıtları ortalamalarının ve Standartların OD grafikleri.



Şekil 18-3: Kadınlarda IL-4 ve IL-10 sitokin yanıtları ortalamalarının ve Standartların OD grafikleri.

Her bireydeki sitokin yanıtlarının OD değerleri ve bu değerlerin ortalamaları gösterilmiştir.

1e/2(ö)	(SİLMEK/kadın/yaş)		TK+PBS	PBMC+PBS	TK-PHA 10mikrog/ml	PBMC-PHA 10mikrog/ml	TK-0,5mikrog/ml	PBMC 0,5mikrog/ml	TK 1mikrog/ml	PBMC 1mikrog/ml	TK 2mikrog/ml	PBMC 2mikrog/ml
ekkek1	Ae/40	INFgama	0,093	0,137	1,207	0,518	0,14	0,158	0,211	0,147	0,635	0,154
ekkek2	Se/28	INFgama	0,096	0,12	1,297	0,208	0,112	0,132	0,127	0,144	0,198	0,128
ekkek3	Ce/42	INFgama	0,108	0,128	2,851	0,759	0,188	0,149	0,469	0,141	0,9	0,162
ekkek4	Ue/30	INFgama	0,106	0,153	0,535	0,331	0,128	0,161	0,161	0,162	0,202	0,171
ortalamalar		INFgama	0,10075	0,134	1,4075	0,4615	0,1415	0,15	0,242	0,1485	0,48875	0,15075
ekkek1	Ae/40	IL-4	0,096	0,124	0,362	0,149	0,118	0,124	0,105	0,122	0,098	0,12
ekkek2	Se/28	IL-4	0,081	0,106	1,016	0,129	0,087	0,126	0,087	0,124	0,11	0,123
ekkek3	Ce/42	IL-4	0,101	0,119	0,399	0,131	0,115	0,132	0,1	0,114	0,117	0,11
ekkek4	Ue/30	IL-4	0,099	0,115	1,514	0,194	0,1	0,11	0,114	0,114	0,102	0,127
ortalamalar		IL-4	0,09675	0,131	0,82275	0,15075	0,105	0,123	0,1015	0,1185	0,10675	0,12
ekkek1	Ae/40	IL-10	0,068	0,068	0,258	0,075	0,476	0,073	1,21	0,084	2,211	0,081
ekkek2	Se/28	IL-10	0,07	0,074	0,856	0,081	0,188	0,074	0,586	0,079	1,573	0,075
ekkek3	Ce/42	IL-10	0,066	0,069	0,421	0,073	0,67	0,071	1,317	0,076	2,64	0,076
ekkek4	Ue/30	IL-10	0,071	0,07	1,242	0,079	0,319	0,072	0,535	0,09	1,075	0,091
ortalamalar		IL-10	0,06875	0,07025	0,69425	0,077	0,41325	0,0725	0,912	0,08225	1,87475	0,08075
kadin1	Ök/40	INFgama	0,098	0,148	0,518	0,508	0,082	0,149	0,081	0,151	0,104	0,173
kadin2	Ak/38	INFgama	0,077	0,153	0,413	0,385	0,091	0,176	0,111	0,177	0,108	0,187
kadin3	Gk/35	INFgama	0,115	0,14	0,69	0,185	0,181	0,147	0,169	0,163	0,175	0,154
ortalamalar		INFgama	0,096667	0,1503333	0,54033333	0,35866667	0,118	0,15733333	0,12033333	0,16366667	0,129	0,17133333
kadin1	Ök/40	IL-4	0,102	0,139	0,233	0,186	0,12	0,127	0,095	0,163	0,118	0,113
kadin2	Ak/38	IL-4	0,081	0,126	0,117	0,143	0,105	0,112	0,105	0,107	0,086	0,112
kadin3	Gk/35	IL-4	0,108	0,14	0,239	0,12	0,1	0,125	0,096	0,106	0,097	0,105
ortalamalar		IL-4	0,097	0,135	0,19633333	0,14966667	0,10833333	0,12133333	0,09866667	0,12533333	0,10033333	0,11
kadin1	Ök/40	IL-10	0,066	0,064	0,334	0,084	0,241	0,07	0,4	0,135	1,247	0,078
kadin2	Ak/38	IL-10	0,067	0,062	0,118	0,069	0,466	0,063	0,393	0,078	0,784	0,072
kadin3	Gk/35	IL-10	0,065	0,065	0,39	0,067	0,952	0,068	0,378	0,77	1,483	0,069
ortalamalar		IL-10	0,066	0,0636667	0,28066667	0,07333333	0,553	0,067	0,39033333	0,32766667	1,17133333	0,073

Tablo 6: Sağlıklı gruptaki sitokin yanıtlarına karşılık gelen OD (optik dansite) değerleri ve ortalamaları

Sırasıyla uyarılmamış, 10µg fitohemaglutinin (PHA) ile uyarılmış ve rekombinant NS3 proteininin 0.5µg, 1µg, 2µg/mL’lik dozları ile uyarılmış TK ve PBMC’lerde ölçülen sitokin yanıtları Tablo 8’de pg/mL cinsinden gösterilmiştir.

			TK+PBS	PBMC+PBS	TK-PHA 10mikrog/ml	PBMC-PHA 10mikrog/ml	TK-0,5mikrog/ml	PBMC 0,5mikrog/ml	TK 1mikrog/ml	PBMC 1mikrog/ml	TK 2mikrog/ml	PBMC 2mikrog/ml
INF gama	pg/ml	1.Erkek	0	4	513	185	5,7	14,2	39,5	9	296,2	12
	pg/ml	2.Erkek	0	0	604	38	0	1,9	0,4	7,6	4,7	0
	pg/ml	3.Erkek	0	0	1289	307	21,4	2,85	155	0,9	360	4,2
	pg/ml	4.Erkek	0	4,76	186,6	89,5	0	8,5	8,5	9	28	13,3
	pg/ml	1.Kadin	0	5	190	184	0	5,5	0	6,5	0	17,5
	pg/ml	2.Kadin	0	12,5	137,5	123,5	0	19	0	19,5	0	24,5
	pg/ml	3.Kadin	0	0,5	197	16,7	15,3	3,2	11	8,5	12,8	5,3
IL-4	pg/ml	1.Erkek	0	0	40,7	1,2	0	0	0	0	0	0
	pg/ml	2.Erkek	0	4,4	161,8	0	0	0	0	0	0	0
	pg/ml	3.Erkek	0	0	48	0	0	0	0	0	0	0
	pg/ml	4.Erkek	0	0	259	10	0	0	0	0	0	0
	pg/ml	1.Kadin	0	0	22,9	11,4	0	0	0	5,8	0	0
	pg/ml	2.Kadin	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0
	pg/ml	3.Kadin	0	2,3	25,3	0	0	0	0	0	0	0
IL-10	pg/ml	1.Erkek	0	0	37,7	0	87,2	0	254	0	481	0
	pg/ml	2.Erkek	0	0	173,6	0	21,8	0	112,2	0	336,5	0
	pg/ml	3.Erkek	0	0	74	0	129,3	0	273	0	567	0
	pg/ml	4.Erkek	0	0	256,4	0	51,3	0	99,3	0	218	0
	pg/ml	1.Kadin	0	0	62,3	0	38,4	0	79,2	11,2	296	0
	pg/ml	2.Kadin	0	0	7	0	96,1	0	77,4	0	177,6	0
	pg/ml	3.Kadin	0	0	73	0	214	0	70	0	346,7	0

Tablo 7: TK ve PBMC’lerdeki ölçülen sitokin değerleri

7. TARTIŞMA

Bu çalışmanın temel amacı, Türkiye kaynaklı bir HCV genotip 1b kökeninden elde edilmiş NS3 proteininin saflaştırılarak üretilmesi ve elde edilen bu proteinin sitokin yanıtlarının araştırılması amacı ile kullanılabilir olup olmadığının araştırılmasıdır.

Bunun için öncelikle 1893 nükleotidlik tam uzunluktaki HCV NS3 proteinini M15 *Escherichia coli* hücrelerinde ifade ettirilerek saflaştırılmıştır. Elde edilen NS3 ile sağlıklı bireylerde antijenik uyarıya karşı tam kan ve PBMC kültür süpernatantlarında sırası ile Th1 ve Th2 yanıtlarının belirleyicileri olarak kabul edilen IFN γ , IL-4 ve IL-10 sitokin seviyeleri incelenmiştir.

Klonlamada viral genomun kaynağı olarak Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi Merkez Laboratuvarı'nda tanısıl araştırma amacıyla elde edilmiş HCV genotip 1b kökeni ile enfekte 60209418 UIN numaralı hastanın kanından izole edilen HCV RNA kullanılmıştır. Bu hastanın seçilmesinin nedeni Türkiye'de en yaygın bulunduğu bildirilen genotip 1b kökenine ait NS3 proteininin henüz saflaştırılmamış olmasıdır.¹³⁴

Duyarlılığı arttırmak amacı ile PZT iki basamaklı “nested” olarak tasarlanmıştır. Daha önce de bu strateji başka araştırmacılar tarafından rekombinant NS3'ü saflaştırmada kullanılmıştır.¹³⁵

“Nested” PZT için kullanılan kullanılan primer setleri, “HCV Database” esas alınarak tasarlanmıştır. Bu işlemde proteinin özellikle korunmuş bölgeleri dikkate alınmış ve <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/> programı kullanılarak biyolojik olarak benzer farklı dizileri tanıyıp tanımadığı, “bioedit” programıyla da primerlerin rekombinant dizide başka bölgeleri tanıyıp tanımadığı kontrol edilmiştir.¹³⁶

Klonlama için ürünleri kullanılacak olan PZT işlemlerinde, 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip Pfu DNA polimeraz (hata oranı: 1.3×10^{-6} /bp/duplikasyon) ile bir sonuç alınamamış ve bu aktiviteye sahip olmayan, Taq DNA polimeraz (hata oranı: 8×10^{-6} /bp/duplikasyon) kullanılmıştır. Bunun olası sebeplerinden biri NS3 ileri öncülünün diziye tam olarak oturmaması olabilir. Böyle bir durumda 3'-5' ekzonükleaz aktivitesine sahip Pfu DNA polimeraz geriye dönerek primeri yerinden kaldırıyor olabilir. Bu Pfu DNA polimeraz ile hazırladığımız reaksiyonlarımızın gerçekleşmemesini açıklayabilir. Wardell AD ve arkadaşları da Taq DNA polimeraz ile tam uzunlukta HCV NS3 proteini ifade ettirdiklerini bildirmişler ancak çalışmalarında PFU ile ilgili bir veri bildirmemişlerdir.^{137,138}

İlk transformasyon optimizasyonu sırasında ilk aşamada istenilen rekombinant DNA ürünleri elde edilememiştir. Geriye dönük incelemelerde kullanılan restriksiyon enzimleri BamHI ve HindIII ile vektör plazmid pQE30 ayrı ayrı kesilip lineer hale getirilerek enzim etkinliği değerlendirilmiştir. Sonuçta BamHI enzimin etkin olmadığı tespit edilerek sipariş edilen yeni enzimle çalışılmıştır. Kullanılan malzemeler son kullanım tarihi ve üreticinin talimatlarına göre deneylerde kullanılmıştır.

Çalışmamızda daha önce yayınlanmış çeşitli araştırmalarda da bildirilen prokaryotik ekspresyon sistemi kullanılmıştır. Bunun için vektör olarak pQE30 plazmiti ile transformasyon için M15 *E.coli* suşu kullanılmıştır. Bu sistemin ökaryotik hücrelerde olan posttranslasyonel modifikasyonlarının olmaması, rekombinant proteinin inkilüzyon cisimcikleri içinde bulundurulması gibi dezavantajlarına rağmen önemli avantajları da vardır. Bunlardan en önemlisi rekombinant protein ekspresyonunun ökaryotik sistemlere göre çok

yüksek olmasıdır. Ayrıca uygulamasının kolay ve ucuz olması, *E.coli*'nin özelliklerinin çok iyi biliniyor olması diğer avantajlarıdır. Bu vektördeki protein ekspresyonu *lac operonu* tarafından düzenlenmektedir.

Eksprese edilen rekombinant NS3 amino ucunda 6X-His tag'lı protein şeklinde sentezlenmiştir. Düşük pH'da elüsyon ile Ni^{2+} -nitrilotriacetic acid (NTA) resin kullanarak metal afinite kromatografisi ile saflaştırılmıştır. Optimizasyon sırasında IPTG indüksiyonu sonrası en verimli protein ekspresyonu 0, 1, 2, 3, 4, 5, 7, 9, 11, 13'üncü saatlerdeki indüksiyona bakılarak 7. saatte tesbit edilmiştir.

Protein ekspresyonunda JM109 gibi başka *E.coli* suşlarında kullanılabilir. Fakat JM109'da her ne kadar kromozomal olarak bir *lac* süpresörü bulunsa da, uyarım öncesi başlangıç bazal protein ekspresyonunu yeterince baskılayabilir. Bu yüzden ekspresyon deneylerinde, içerisinde güçlü bir *lac* süpresörü bulunduran plazmite sahip M15 *E.coli* hücreleri yeğlenmiştir. Bu suş bazal protein ekspresyonunu yeterince baskılayabilmektedir. Bununla birlikte Wardell ve arkadaşları JM109 *E.coli* suşunda da çalışmamızla benzer şekilde, elde ettikleri pelletleri 8M üre'de süspanse edip sonikasyon ve diyaliz adımları uyguladıktan sonra tam uzunlukta NS3 proteinini saflaştırdıklarını bildirmişlerdir.^{132,139}

Saflaştırmalar esnasında kullanılan tamponların pH'larının kullanımdan hemen önce kontrol edilmesi ve pH metre kalibrasyonlarının mümkünse tek ve deneyimli bir kişi tarafından yapılması da optimizasyon açısından çok önemlidir. Ekspresyon sırasında proteinler tarafından sitoplazmada oluşturulan inklüzyon cisimciklerinin saflaştırılma aşamasına geçilmeden önce parçalanması gereklidir. Bunun için 8 M üre'li yıkım (Lizis) tamponu (pH 8.0) kullanılmıştır. *E. coli* süspanسیونlarının hazırlanan tampon içerisinde 1 saat 200 rpm'lik karıştırma ve sonikasyon işlemleri ile inklüzyon cisimlerinin açılması sağlanmıştır. Proteinin doğru katlanması için bütün adımlar +4°C'de ve ilaveten dializ aşamaları 36 saat uygulanmıştır.

Başlangıçta saflaştırma aşamalarında kontaminant proteinlerin elüsyon sıvısında ortaya çıkmasının ardından, bu proteilerin bağlanması ve elüe olmasının engellenmesi amacıyla lizis tampon (Tampon B) ile yıkama tamponuna (Tampon C) 10mM imidazol eklenmiştir. Dolayısıyla yabancı proteinlerde olabilecek histidin molekülleri Ni-NTA'ya zayıf afiniteli de olsa bağlanmaları engellenmiştir.

Franken ve arkadaşları %60'lık izopropanollü yıkama adımları ile bu kontaminantların çoğunun çıkarılabildiğini bildirmişlerdir. Bu nedenle çalışmamızın yıkama aşamalarında endotoksin ve kontaminantların uzaklaştırılması amacıyla ayrıca izopropanollü yıkama adımları eklenmiştir.¹⁴⁰

Elde ettiğimiz rekombinant NS3 proteinine karşı tam kan ve PBMC kültürlerinde sitokin yanıtları açısından önemli farklılıklar belirlenmiştir. Bu teknik, hem hücresel hemde hücresel olmayan bileşenleri içermesi bakımından farklıdır. Çünkü PBMC kültürleri plazma, plateletler, eritrositler ve granülositleri (nötrofil, eozinofil, bazofil) içermemektedir.¹⁴¹

Tam kanda sitokin yanıtının belirlenmesi PBMC kültürüne göre hem ucuz hem de çalışılması daha kolay bir tekniktir. Ficoll dansite gradientine göre daha çok kişi üzerinde daha kısa sürede uygulanabilir. Bu arada Ficoll'ün istenmeyen toksik etkilerinden de kaçınılır. Buna karşın tam kan örneğindeki hücre sayısının bilinmemesi ve standart olmaması bu yöntemi ilk göze çarpan zayıflığıdır. Bir diğer problem ise hücre popülasyonundaki ağırlık ve dağılımı

kontrol edilemez. Dolayısı ile bu iki yöntemi karşılaştırılması ile ilgili veri yeterli değildir. Ficoll dansite gradient yöntemi ile her ne kadar ayrımı yapılan hücrelere özgül immün yanıt ölçülmek istense de ayırma işleminin hücreler ve yanıtlar üzerindeki etkileri göz ardı edilmiş olabilir. İzole edilen hücrelerin sayı ve canlılığının değerlendirilmesi bu hücrelerin fonksiyonel özelliklerini değerlendirmede yeterli değildir.¹⁴²

Bu çalışmada IFN γ ölçülerek hücresel immün yanıtın, IL-4 ve IL-10 ölçümü ile de sıvısal ve regülatör immün yanıt hakkında fikir edinmeye çalışılmıştır.

Dört erkek ve üç kadın sağlıklı bireylerden oluşan grup ile yaptığımız çalışmalar istatistiksel anlam ifade edecek sayıya ulaşmamıştır. Bundan dolayı daha fazla sağlıklı ve hasta grupları ile çalışılması gerekmektedir. Ama eldeki veriler ve daha önceden basılmış yayınlardaki veriler tam kan ve PBMC'nin sitokin yanıtları açısından farklı olabileceğini göstermektedir. Bununla birlikte eldeki rekombinant proteine karşı var gibi gözükken özellikle IL-10 yanıtlarının rekombinant proteinden ya da *E.coli*'ye ait bir faktörden mi kaynaklandığı aynı suşda eksprese edilecek başka bir protein (örneğin dihidro folat redüktaz gibi) ile aynı şartlarda test edilmelidir. Bunun yanında tam kan ve PBMC bazal sitokin yanıtları birbirine benzer görünmektedir. Bu veri en azından elde edilen tam kandaki IL-10 yanıtının bizim ekspresyon ürünümüzden kaynaklandığını kanıtlamaktadır.

Rekombinant NS3 proteini içindeki epitoplar sağlıklı gönüllülerin daha önce karşılaştıkları patojenlerin antijenik epitopları ile benzerlik gösterebilir. Bu benzerlik sitokin yanıtına sebep olabilir ancak yine de tam kan ile PBMC yanıtlarının farklı olmasını açıklayamaz. PBMC kültürünün içermediği fakat tam kanda bulunan faktörlerden kaynaklanabilir.

Rekombinant NS3 ürünüde saptanan endotoksin miktarı 0,1 ng civarında olup bu hücre kültür çalışmaları için uygundur. Yine de mevcut endotoksinin ne oranda sitokin yanıtına sebep olduğu lipopolisakkarit dilüsyonları ile çalışılarak tespit edilebilir.

İnsanda IL-10'un ana kaynağı makrofajlar, Th2 hücreleri ve regülatör T hücreleridir ve etkilerini makrofajlar, DC'ler ve Th1 hücreleri üzerinde gösterirler. IL-10 özellikle dendritik hücreler üzerinde IL-12, kostimülatör molekül ve MHC sınıf II molekül ekspresyonlarının baskılanması yönünde etkilidir.¹⁴³

Silberer J ve arkadaşları tam kan ve mononükleer hücreler üzerinde alerjene özgül olan/özgül olmayan antijenik uyarana sitokin yanıtlarını değerlendirmişler ve INF γ ve IL-13 yanıtları açısından önemli fark olduğunu görmüşlerdir.¹⁴⁴ Yapılan farklı çalışmalarda da görüldüğü gibi sadece IL-10 değil farklı sitokinlere de farklı yanıtlar ortaya çıkabilmektedir.

Levings ve arkadaşları olgunlaşmamış ve stimüle edilmemiş DC'lerde IL-10 üretilebildiğini, bunların IL-10 üreten Treg'leri indükleyebildiğini göstermişlerdir. Dolayısıyla rekombinant HCV NS3 daha başlangıçta tam kan içinde bulunan faktörler yardımı ile IL-10 ekspresyonunu uyatarak hem IFN γ hemde IL-4 yanıtlarını baskılayabilir. Bu daha sonraki aşamalarda anti-IL-10 antikoru kullanılarak bu deneye ait hem IFN γ hemde IL-4 yanıtları üzerine olan etkileri değerlendirilebilir.¹⁴⁵

Pellegrini P ve arkadaşları antijenik uyaranlı ve uyarsız şartlar altında Th1 ve Th2 sitokin seviyelerini tam kan ve mononükleer hücrelerde araştırmışlardır. Bu çalışmalarda IL-10 hariç erkek ve kadınların sitokin yanıtlarında bir fark bulunmazken IL-10 da tam kanda fitohemaglutinin uyaranı ile erkeklerde daha yüksek yanıt oluştuğunu bildirmişlerdir.¹⁴⁶

Cacciarelli ve arkadaşları, infekte olmamış sağlıklı kontrollerle karşılaştırıldığında kronik HCV hastalarında IFN γ , IL-4 ve IL-10 serum seviyelerinin önemli oranda daha yüksek olduğunu, INF sağaltımına yanıt olarak da IL-4, IL-10 ve viral yükün düştüğünü bildirmişlerdir. Bizim çalışmamızın devamı olarak sağaltıma yanıt veren ve vermeyen gruplarda rekombinant NS3 proteinine olabilecek yanıtların incelenerek sağlıklı bireylerle aradaki farklar Tam Kan ve PBMC açısından karşılaştırılabilir.¹⁴⁷

Sonuç olarak şimdiye dek ülkemizde ve uluslar arası literatürde yayınlanmış veriler üzerinde yaptığımız taramalarda ilk kez ülkemizden bir HCV genotip 1b kökenine ait NS3 proteini saflaştırılmıştır. Saflaştırılan bu rekombinant NS3 proteinine karşı spesifik antikor yanıtı gösterilmiştir. Ayrıca rekombinant NS3 kullanılarak yapılan tam kan ve PBMC uyarım çalışmaları ve bu uyarım sonucu ortaya çıkabilecek sitokin yanıtları ile ilgili optimizasyon ve standardizasyon çalışmaları devam etmektedir.

8. KAYNAKLAR

1. Orland JR, Wright TL, Cooper S. Acute hepatitis C. *Hepatology* 2001; 33: 321 –7.
2. Gerlach JT, Diepolder HM, Zachoval R, Gruener NH, Jung MC, Ulsenheimer A, et al. Acute hepatitis C: high rate of both spontaneous and treatment-induced viral clearance. *Gastroenterology* 2003; 125:80–8.
3. Ishii S, Koziel MJ. Immune responses during acute and chronic infection with hepatitis C virus. *Clin Immunol.* 2008 Aug;128(2): 133 –47.
4. Thimme, R., Oldach, D., Chang, K.-M., Steiger, C., Ray, S. C. & Chisari, F. V. (2001). Determinants of viral clearance and persistence during acute hepatitis C virus infection. *J Exp Med* 194, 1395–1406.
5. O'Garra A, Murphy KM. From IL-10 to IL-12: how pathogens and their products stimulate APCs to induce T(H)1 development. *Nat Immunol.* 2009 Sep;10(9):929-32.
6. Diehl S, Rincón M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. *Mol Immunol.* 2002 Dec;39(9):531-6.
7. Jacobson Brown PM, Neuman MG. Immunopathogenesis of hepatitis C viral infection: Th1/Th2 responses and the role of cytokines. *Clin Biochem.* 2001 May;34(3):167-71.
8. Suzuki T, Aizaki H, Murakami K, Shoji I, Wakita T. Molecular biology of hepatitis C virus. *J Gastroenterol.* 2007 Jun;42(6):411-23.
9. Pai M, Joshi R, Dogra S, Mendiratta DK, Narang P, Dheda K, Kalantri S. Persistently elevated T cell interferon-gamma responses after treatment for latent tuberculosis infection among health care workers in India: a preliminary report. *J Occup Med Toxicol.* 2006 May 23;1:7.
10. Rehmann B. Hepatitis C virus versus innate and adaptive immune responses: a tale of coevolution and coexistence. *J Clin Invest.* 2009 Jul;119(7):1745-54.
11. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359–62.
12. Darius Moradpour, François Penin and Charles M. Rice. Replication of hepatitis C virus. *NATURE REVIEWS MICROBIOLOGY VOLUME 5 JUNE 2007* 453-463.
13. Alter MJ, Kruszon-Moran D, Nainan OV, et al. The prevalence of hepatitis C virus infection in the United States, 1988 through 1994. *N Engl J Med* 1999;341:556–62.
14. Poynard T, Yuen MF, Ratziu V, et al. Viral hepatitis C. *Lancet* 2003;362:2095–100.
15. Hepatitis C virus (HCV) employs multiple strategies to subvert the host innate antiviral response. *Biol. Chem.*, Vol. 389, pp. 1283–1298, October 2008.
16. Penin F, Dubuisson J, Rey FA, et al. Structural biology of hepatitis C virus. *Hepatology* 2004;39:5–19.
17. M. Martell, J.I. Esteban, J. Quer, J. Genesca, A. Weiner, R. Esteban, J. Guardia, J. Gomez, Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes: quasispecies nature of HCV genome distribution, *J. Virol.* 66 (1992) 3225–3229.
18. C. Wang, P. Sarnow, A. Siddiqui, Translation of human hepatitis C virus RNA in cultured cells is mediated by an internal ribosome-binding mechanism, *J. Virol.* 67 (1993) 3338–3344.
19. M. Honda, M.R. Beard, L.H. Ping, S.M. Lemon, A phylogenetically conserved stem-loop structure at the 5' border of the internal ribosome entry site of hepatitis C virus is required for cap-independent viral translation, *J. Virol.* 73 (2) (1999) 1165–1174.
20. Friebe P, Lohmann V, Krieger N, Bartenschlager R. Sequences in the 5' nontranslated region of hepatitis C virus required for RNA replication. *J Virol* 2001;75:12047–12057.
21. Luo G, Xin S, Cai Z. Role of the 5'-proximal stem-loop structure of the 5' untranslated region in replication and translation of hepatitis C virus RNA. *J Virol* 2003;77:3312–3318.
22. Suzuki T, Ishii K, Aizaki H, Wakita T. Hepatitis C viral life cycle. *Adv Drug Deliv Rev.* 2007 Oct 10;59(12):1200-12. Epub 2007 Aug 9. Review.
23. Abacioglu YH, Davidson F, Tuncer S, Yap PL, Ustacebi S, Yulug N, Simmonds P. The distribution of hepatitis C virus genotypes in Turkish patients. *J Viral Hepat.* 1995;2(6):297-301.
24. Altuglu I, Soyler I, Ozacar T, Erensoy S. Distribution of hepatitis C virus genotypes in patients with chronic hepatitis C infection in Western Turkey. *Int J Infect Dis.* 2008 May;12(3):239-44.
25. Bozdayi AM, Aslan N, Bozdayi G, Türkyilmaz AR, Sengezer T, Wend U, Erkan O, Aydemir F, Zakirhodjaev S, Orucov S, Bozkaya H, Gerlich W, Karayalçın S, Yurdaydin C, Uzunalimoğlu O. Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol.* 2004 Nov;149(11):2115-29.
26. J.M. Pawlotsky, Hepatitis C virus population dynamics during infection, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 299 (2006) 261–284.

27. M. Hijikata, N. Kato, Y. Ootsuyama, M. Nakagawa, S. Ohkoshi, K. Shimotohno, Hypervariable regions in the putative glycoprotein of hepatitis C virus, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 175 (1991) 220–228.
28. J. Weiner, M.J. Brauer, J. Rosenblatt, K.H. Richman, J. Tung, K. Crawford, F. Bonino, G. Saracco, Q.-L. Choo, M. Houghton, Variable and hypervariable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and the pestivirus envelope glycoproteins, *Virology* 180 (1991) 842–848.
29. N. Kato, Y. Ootsuyama, T. Tanaka, M. Nakagawa, T. Nakazawa, K. Muraio, S. Ohkoshi, M. Hijikata, K. Shimotohno, Marked sequence diversity in the putative envelope proteins of hepatitis C viruses, *Virus Res.* 22 (1992) 107–123.
30. S. Harada, Y. Watanabe, K. Takeuchi, T. Suzuki, T. Katayama, Y. Takebe, I. Saito, T. Miyamura, Expression of processed core protein of hepatitis C virus in mammalian cells, *J. Virol.* 65 (1991) 3015–3021.
31. K. Yasui, T. Wakita, K. Tsukiyama-Kohara, S.I. Funahashi, M. Ichikawa, T. Kajita, D. Moradpour, J.R. Wands, M. Kohara, The native form and maturation process of hepatitis C virus core protein, *J. Virol.* 72 (7) (1998) 6048–6055.
32. T. Suzuki, R. Suzuki, Maturation and assembly of hepatitis C virus core protein, in: M. Kalitzky, P. Borowski (Eds.), *Molecular Biology of the Flavivirus*, Horizon Bioscience, Norfolk, U.K., 2006, pp. 295–311.
33. A. Op De Beeck, L. Cocquerel, J. Dubuisson, Biogenesis of hepatitis C virus envelope glycoproteins, *J. Gen. Virol.* 82 (Pt 11) (2001) 2589–2595.
34. Cocquerel L, Meunier JC, Pillez A, Wychowski C, Dubuisson J. A retention signal necessary and sufficient for endoplasmic reticulum localization maps to the transmembrane domain of hepatitis C virus glycoprotein E2. *J Virol* 1998;72:2183–2191.
35. Cocquerel L, Wychowski C, Minner F, Penin F, Dubuisson J. Charged residues in the transmembrane domains of hepatitis C virus glycoproteins play a major role in the processing, subcellular localization, and assembly of these envelope proteins. *J Virol* 2000;74:3623–3633.
36. R. Roccasecca, H. Ansuini, A. Vitelli, A. Meola, E. Scarselli, S. Acali, M. Pezzanera, B.B. Ercole, J. McKeating, A. Yagnik, A. Lahm, A. Tramontano, R. Cortese, and A. Nicosia, Binding of the hepatitis C virus E2 glycoprotein to CD81 is strain-specific and is modulated by a complex interplay between hypervariable regions 1 and 2. *J. Virol.*, 77: 1856–1867, 2003.
37. L. Frasca, P. Del Porto, L. Tuosto, B. Marinari, C. Scotta, M. Carbonari, A. Nicosia, and E. Piccolella, Hypervariable region 1 variants act as TCR antagonists for hepatitis C virus-specific CD4+ T cells. *J. Immunol.*, 163: 650–658, 1999.
38. Zibert A, Kraas W, Meisel H, Jung G, Roggendorf M. Epitope mapping of antibodies directed against hypervariable region 1 in acute self-limiting and chronic infections due to hepatitis C virus. *J Virol* 1997;71:4123–4127.
39. Flint M, McKeating JA. The role of the hepatitis C virus glycoproteins in infection. *Rev Med Virol* 2000;10:101–117.
40. Love RA, Parge HE, Wickersham JA, Hostomsky Z, Habuka N, Moomaw EW, Adachi T, Hostomska Z. The crystal structure of hepatitis C virus NS3 proteinase reveals a trypsin-like fold and a structural zinc binding site. *Cell* 1996; 87: 331–342.
41. R. De Francesco, G. Migliaccio, Challenges and successes in developing new therapies for hepatitis C, *Nature* 436 (7053) (2005) 953–960.
42. Wolk B, Sansonno D, Krausslich HG, Dammacco F, Rice CM, Blum HE, Moradpour D. Subcellular localization, stability, and trans-cleavage competence of the hepatitis C virus NS3-NS4A complex expressed in tetracycline-regulated cell lines. *J Virol* 2000; 74: 2293–2304.
43. D.N. Frick, R.S. Rypma, A.M. Lam, B. Gu, The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently, *J. Biol. Chem.* 279 (2) (2004) 1269–1280.
44. Welbourn S, Pause A. The hepatitis C virus NS2/3 protease. *Curr Issues Mol Biol.* 2007 Jan;9(1):63–9.
45. Schaller T, Penin F, Bartenschlager R. From structure to function: new insights into hepatitis C virus RNA replication. Appel N, *J Biol Chem.* 2006 Apr 14;281(15):9833–6.
46. Kim JL, Morgenstern KA, Griffith JP, Dwyer MD, Thomson JA, Murcko MA, Lin C, Caron PR. Hepatitis C virus NS3 RNA helicase domain with a bound oligonucleotide: the crystal structure provides insights into the mode of unwinding. *Structure* 1998; 6: 89–100.
47. Frick, D. N., Rypma, R. S., Lam, A. M., and Gu, B. The nonstructural protein 3 protease/helicase requires an intact protease domain to unwind duplex RNA efficiently. (2004) *J. Biol. Chem.* 279, 1269–1280.
48. Koonin, E. V. (1991). Similarities in RNA helicases. *Nature* 352, 290.

49. M. Lundin, M. Monne, A. Widell, G. Von Heijne, M.A. Persson, Topology of the membrane-associated hepatitis C virus protein NS4B, *J. Virol.* 77 (9) (2003) 5428–5438.
50. T.L. Tellinghuisen, J. Marcotrigiano, A.E. Gorbalenya, C.M. Rice, The NS5A protein of hepatitis C virus is a zinc metalloprotein, *J. Biol. Chem.* 279 (47) (2004) 48576–48587.
51. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, Kurosaki M, Murakami T, Yamamoto C, Izumi N, Marumo F, Sato C. Comparison of fulllength sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NS5A region. *J Clin Invest* 1995; **96**: 224-230
52. Gale MJ Jr, Korth MJ, Tang NM *et al.* Evidence that hepatitis C virus resistance to interferon is mediated through repression of the PKR protein kinase by the nonstructural 5A protein. *Virology* 1997; **230**: 217–27.
53. Simmonds P, Holmes EC, Cha TA, Chan SW, McOmish F, Irvine B, Beall E, Yap PL, Kolberg J, Urdea MS. 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.* 1993 Nov;74 (Pt 11):2391-9.
54. Ferrari E, Wright-Minogue J, Fang JW, Baroudy BM, Lau JY, Hong Z. Characterization of soluble hepatitis C virus RNA-dependent RNA polymerase expressed in *Escherichia coli*. *J Virol.* 1999 Feb;73(2):1649-54.
55. Luo G, Hamatake RK, Mathis DM, Racela J, Rigat KL, Lemm J, Colonno RJ. De novo initiation of RNA synthesis by the RNA-dependent RNA polymerase (NS5B) of hepatitis C virus. *J Virol.* 2000 Jan;74(2):851-63.
56. Gondeau C, Pichard-Garcia L, Maurel P. Cellular models for the screening and development of anti-hepatitis C virus agents. *Pharmacol Ther.* 2009 Oct;124(1):1-22.
57. Morikawa, K., Zhao, Z., Date, T., Miyamoto, M., Murayama, A., Akazawa, D., et al. (2007). The roles of CD81 and glycosaminoglycans in the adsorption and uptake of infectious HCV particles. *J Med Virol* 79(6), 714–723.
58. Agnello, V., Abel, G., Elfahal, M., Knight, G. B., & Zhang, Q. X. (1999). Hepatitis C virus and other flaviviridae viruses enter cells via low density lipoprotein receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96(22), 12766–12771.
59. Krieger, M. (2001). Scavenger receptor class B type I is a multiligand HDL receptor that influences diverse physiologic systems. *J Clin Invest* 108(6), 793–797.
60. Scarselli, E., Ansuini, H., Cerino, R., Roccasecca, R. M., Acali, S., Filocamo, G., et al. (2002). The human scavenger receptor class B type I is a novel candidate receptor for the hepatitis C virus. *Embo J* 21(19), 5017–5025.
61. Pileri, P., Uematsu, Y., Campagnoli, S., Galli, G., Falugi, F., Petracca, R., et al. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science* 282(5390), 938–941.
62. Ploss, A., Evans, M. J., Gaysinskaya, V. A., Panis, M., You, H., de Jong, Y. P., et al. (2009). Human occludin is a hepatitis C virus entry factor required for infection of mouse cells. *Nature* 457(7231), 882–886.
63. Timpe JM, Stamatakis Z, Jennings A, et al. Hepatitis C virus cell-cell transmission in hepatoma cells in the presence of neutralizing antibodies. *Hepatology* 2008; **47**: 17–24.
64. Evans, M. J., von Hahn, T., Tschernie, D. M., Syder, A. J., Panis, M., Wolk, B., et al. (2007). Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. *Nature* 446(7137), 801–805.
65. Rocha-Perugini V, Montpellier C, Delgrange D, et al. The CD81 partner EWI-2wint inhibits hepatitis C virus entry. *PLoS ONE* 2008; **3**: e1866.
66. Blackard JT, Kemmer N, Sherman KE. Extrahepatic replication of HCV: insights into clinical manifestations and biological consequences. *Hepatology* 2006; **44**: 15–22.
67. Blanchard, E., Belouzard, S., Goueslain, L., Wakita, T., Dubuisson, J., Wychowski, C., et al. (2006). Hepatitis C virus entry depends on clathrin-mediated endocytosis. *J Virol* 80(14), 6964–6972.
68. Spahn CM, Kieft JS, Grassucci RA, Penczek PA, Zhou K, Doudna JA, Frank J. Hepatitis C virus IRES RNA-induced changes in the conformation of the 40s ribosomal subunit. *Science* 2001;291:1959–1962.
69. Irshad M, Khushboo I, Singh S, Singh S. Hepatitis C virus (HCV): a review of immunological aspects. *Int Rev Immunol.* 2008;27(6):497-517.
70. Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond).* 2009 Jun 15;117(2):49-65.
71. Egger D, Wolk B, Gosert R, Bianchi L, Blum HE, Moradpour D, et al. Expression of hepatitis C virus proteins induces distinct membrane alterations including a candidate viral replication complex. *J Virol* 2002;76:5974–84.
72. Pawlotsky, J. M. (2006). Hepatitis C virus population dynamics during infection. *Curr Top Microbiol Immunol* 299, 261–284.

73. Miyanari, Y., Atsuzawa, K., Usuda, N., Watashi, K., Hishiki, T., Zayas, M., Bartenschlager, R., Wakita, T., Hijikata, M. and Shimotohno, K. (2007) The lipid droplet is an important organelle for hepatitis C virus production. *Nat. Cell Biol.* **9**, 1089–1097
74. Tang H, Grisé H. Cellular and molecular biology of HCV infection and hepatitis. *Clin Sci (Lond)*. 2009 Jun 15;117(2):49-65.
75. Guidotti, L. G. and Chisari, F. V. (2006) Immunobiology and pathogenesis of viral hepatitis. *Annu. Rev. Pathol.* **1**, 23–61
76. Post J, Ratnarajah S, Lloyd AR. Immunological determinants of the outcomes from primary hepatitis C infection. *Cell Mol Life Sci*. 2009 Mar;66(5):733-56.
77. Ranjan P, Bowzard JB, Schwerzmann JW, Jeisy-Scott V, Fujita T, Sambhara S. Cytoplasmic nucleic acid sensors in antiviral immunity. *Trends Mol Med*. 2009 Aug;15(8):359-68.
78. Cerny A, Chisari F. Pathogenesis of chronic hepatitis C: immunological features of hepatic injury and viral persistence. *Hepatology* 1999;30:595–601.
79. Saito, T., Owen, D.M., Jiang, F., Marcotrigiano, J., and Gale, M., Jr. 2008. Innate immunity induced by composition-dependent RIG-I recognition of hepatitis C virus RNA. *Nature*. **454**:523–527.
80. Kawai, T., and Akira, S. 2008. Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1143**:1–20.
81. Taylor, D.R., Shi, S.T., Romano, P.R., Barber, G.N., and Lai, M.M. 1999. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science*. **285**:107–110
82. Ahlenstiel, G., Martin, M.P., Gao, X., Carrington, M., and Rehermann, B. 2008. Distinct KIR/HLA compound genotypes affect the kinetics of human antiviral natural killer cell responses. *J. Clin. Invest.* **118**:1017–1026.
83. Jinushi, M., et al. 2004. Negative regulation of NK cell activities by inhibitory receptor CD94/NKG2A leads to altered NK cell-induced modulation of dendritic cell functions in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* **173**:6072–6081.
84. Tseng, C.T., and Klimpel, G.R. 2002. Binding of the hepatitis C virus envelope protein E2 to CD81 inhibits natural killer cell functions. *J. Exp. Med.* **195**:43–49.
85. Yoon, J.C., Shiina, M., Ahlenstiel, G., and Rehermann, B. 2009. Natural killer cell function is intact after direct exposure to infectious hepatitis C virions. *Hepatology*. **49**:12–21.
86. Marcellin P. Hepatitis C: the clinical spectrum of the disease. *J Hepatol*. 1999;31 Suppl 1:9-16.
87. Logvinoff, C., et al. 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:10149–10154.
88. Pestka, J.M., et al. 2007. Rapid induction of virus neutralizing antibodies and viral clearance in a single-source outbreak of hepatitis C. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **104**:6025–6030.
89. Logvinoff, C., et al. 2004. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **101**:10149–10154.
90. Racanelli, V., et al. 2006. Antibody production and in vitro behavior of CD27-defined B-cell subsets: persistent hepatitis C virus infection changes the rules. *J. Virol.* **80**:3923–3934.
91. Kaplan, D.E., et al. 2007. Discordant role of CD4 T-cell response relative to neutralizing antibody and CD8 T-cell responses in acute hepatitis C. *Gastroenterology*. **132**:654–666.
92. Urbani, S., et al. 2006. Outcome of acute hepatitis C is related to virus-specific CD4 function and maturation of antiviral memory CD8 responses. *Hepatology*. **44**:126–139.
93. Urbani, S., et al. 2002. Virus-specific CD8+ lymphocytes share the same effector-memory phenotype but exhibit functional differences in acute hepatitis B and C. *J. Virol.* **76**:12423–12434.
94. C.L. Day, G.M. Lauer, G.K. Robbins, B. McGovern, A.G. Wurcel, R.T. Gandhi, R.T. Chung, B.D. Walker, Broad specificity of virus-specific CD4+ T-helper-cell responses in resolved hepatitis C virus infection, *J. Virol.* **76** (2002) 12584–12595.
95. N.H. Gruner, T.J. Gerlach, M.C. Jung, H.M. Diepolder, C.A. Schirren, W.W. Schraut, R. Hoffmann, R. Zachoval, T. Santantonio, M. Cucchiaroni, A. Cerny, G.R. Pape, Association of hepatitis C virus-specific CD8+ Tcells with viral clearance in acute hepatitis C, *J. Infect. Dis.* **181** (2000) 1528–1536.
96. H. Wedemeyer, X.S. He, M. Nascimbeni, A.R. Davis, H.B. Greenberg, J.H. Hoofnagle, T.J. Liang, H. Alter, B. Rehermann, Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ Tcells in chronic hepatitis C virus infection, *J. Immunol.* **169** (2002) 3447–3458.
97. M. Frese, V. Schwarzle, K. Barth, N. Krieger, V. Lohmann, S. Mihm, O. Haller, R. Bartenschlager, Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs, *Hepatology* **35** (2002) 694–703.
98. Wedemeyer, H., et al. 2002. Impaired effector function of hepatitis C virus-specific CD8+ T cells in chronic hepatitis C virus infection. *J. Immunol.* **169**:3447–3458.

99. Golden-Mason, L., Castelblanco, N., O'Farrelly, C., and Rosen, H.R. 2007. Phenotypic and functional changes of cytotoxic CD56pos natural T cells determine outcome of acute hepatitis C virus infection. *J. Virol.* **81**:9292–9298.
100. Yao, Z.Q., Eisen-Vandervelde, A., Waggoner, S.N., Cale, E.M., and Hahn, Y.S. 2004. Direct binding of hepatitis C virus core to gC1qR on CD4+ and CD8+ T cells leads to impaired activation of Lck and Akt. *J. Virol.* **78**:6409–6419.
101. Radziejewicz, H., et al. 2008. Impaired hepatitis C virus (HCV)-specific effector CD8+ T cells undergo massive apoptosis in the peripheral blood during acute HCV infection and in the liver during the chronic phase of infection. *J. Virol.* **82**:9808–9822.
102. Bluestone, J.A., and Abbas, A.K. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* **3**:253–257.
103. Cabrera, R., Tu, Z., Xu, Y., Firpi, R.J., Rosen, H.R., Liu, C., Nelson, D.R., 2004. An immunomodulatory role for CD4(+)CD25(+) regulatory T lymphocytes in hepatitis C virus infection. *Hepatology* 40, 1062–1071.
104. MacDonald, A.J., Duffy, M., Brady, M.T., McKiernan, S., Hall, W., Hegarty, J., Curry, M., Mills, K.H., 2002. CD4 T helper type 1 and regulatory T cells induced against the same epitopes on the core protein in hepatitis C virus-infected persons. *J. Infect. Dis.* 185, 720–727.
105. Sugimoto, K., Ikeda, F., Stadanlick, J., Nunes, F.A., Alter, H.J., Chang, K.M., 2003. Suppression of HCV-specific T cells without differential hierarchy demonstrated ex vivo in persistent HCV infection. *Hepatology* 38, 1437–1448.
106. Logvinoff C, Major ME, Oldach D, Heyward S, Talal A, Balfe P, Feinstone SM, Alter H, Rice CM, McKeating JA. Neutralizing antibody response during acute and chronic hepatitis C virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:10149–10154.
107. Zhang X, Dou J, Germann MW. Characterization of the cellular immune response in hepatitis C virus infection. *Med Res Rev.* 2009 Nov;29(6):843–66.
108. Moore KW, de Waal MR, Coffman RL, and O'Garra A: Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annu Rev Immunol* 2001;19:683–765.
109. Fiorentino DF, Bond MW, and Mosmann TR: Two types of mouse T helper cell. IV. Th2 clones secrete a factor that inhibits cytokine production by Th1 clones. *J Exp Med* 1989;170(6):2081–2095.
110. Richter SS. Laboratory assays for diagnosis and management of hepatitis C virus infection. *J Clin Microbiol.* 2002 Dec;40(12):4407–12.
111. http://www.cdc.gov/hepatitis/HCV/PDFs/hev_flow.pdf
112. Dixit NM, Perelson AS. The metabolism, pharmacokinetics and mechanisms of antiviral activity of ribavirin against hepatitis C virus. *Cell Mol Life Sci.* 2006 Apr;63(7-8):832–42.
113. Zeuzem S, Berg T, Moeller B, Hinrichsen H, Mauss S, Wedemeyer H, Sarrazin C, Huettppe D, Zehnter E, Manns MP. Expert opinion on the treatment of patients with chronic hepatitis C. *J Viral Hepat.* 2009 Feb;16(2):75–90.
114. Frick DN. The hepatitis C virus NS3 protein: a model RNA helicase and potential drug target. *Curr Issues Mol Biol.* 2007 Jan;9(1):1–20.
115. Machida K, Cheng KT, Lai CK, Jeng KS, Sung VM et al. Hepatitis C virus triggers mitochondrial permeability transition with production of reactive oxygen species, leading to DNA damage and STAT3 activation. *J Virol* 2006; 80: 7199–7207.
116. Cheng PL, Chang MH, Chao CH, Lee YH. Hepatitis C viral proteins interact with Smad3 and differentially regulate TGF-beta/Smad3-mediated transcriptional activation. *Oncogene* 2004; 23: 7821–7838.
117. Breiman A, Grandvaux N, Lin R, Ottone C, Akira S et al. Inhibition of RIG-I-dependent signaling to the interferon pathway during hepatitis C virus expression and restoration of signaling by IKKepsilon. *J Virol* 2005; 79: 3969–3978.
118. Deng L, Nagano-Fujii M, Tanaka M, Nomura-Takigawa Y, Ikeda M et al. NS3 protein of Hepatitis C virus associates with the tumour suppressor p53 and inhibits its function in an NS3 sequence-dependent manner. *J Gen Virol* 2006; 87: 1703–1713.
119. Cubero M, Esteban JI, Otero T, Sauleda S, Bes M et al. Naturally occurring NS3-protease-inhibitor resistant mutant A156T in the liver of an untreated chronic hepatitis C patient. *Virology* 2008; 370: 237–245.
120. Ito K, Shiraki K, Funatsuki K, Ishiko H, Sugimoto K et al. Identification of novel hepatitis C virus-specific cytotoxic T lymphocyte epitope in NS3 region. *Hepatol Res* 2006; 36: 294–300.
121. Seifert U, Liermann H, Racanelli V, et al. Hepatitis C virus mutation affects proteasomal epitope processing. *J Clin Invest* 2004;114:250–9.
122. Gerlach JT, Ulsenheimer A, Grüner NH, Jung MC, Schraut W, Schirren CA, Heeg M, Scholz S, Witter K, Zahn R, Vogler A, Zachoval R, Pape GR, Diepolder HM. Minimal T-cell-stimulatory sequences and

- spectrum of HLA restriction of immunodominant CD4⁺ T-cell epitopes within hepatitis C virus NS3 and NS4 proteins. *J Virol.* 2005 Oct;79(19):12425-33.
123. Schulze zur Wiesch J, Lauer GM, Day CL, Kim AY, Ouchi K, Duncan JE, Wurcel AG, Timm J, Jones AM, Mothe B, Allen TM, McGovern B, Lewis-Ximenez L, Sidney J, Sette A, Chung RT, Walker BD. Broad repertoire of the CD4⁺ Th cell response in spontaneously controlled hepatitis C virus infection includes dominant and highly promiscuous epitopes. *J Immunol.* 2005 Sep 15;175(6):3603-13.
 124. <http://hcv.lanl.gov/content/immuno/immuno-main.html>
 125. T.A. Brown. *Gene Cloning & DNA Analysis* 2006
 126. Joshi HK, Etzkorn C, Chatwell L, Bitinaite J, Horton NC. Alteration of sequence specificity of the type II restriction endonuclease HincII through an indirect readout mechanism. *J Biol Chem.* 2006 Aug 18;281(33):23852-69.
 127. <http://web.inonu.edu.tr/~iozerol/rdurmaz/UygMolMikr/109.pdf>
 128. Sørensen HP, Mortensen KK. Advanced genetic strategies for recombinant protein expression in *Escherichia coli*. *J Biotechnol.* 2005 Jan 26;115(2):113-28
 129. Jana S, Deb JK. Strategies for efficient production of heterologous proteins in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2005 May;67(3):289-98.
 130. <http://www.mikrobik.net/page.php?id=469>
 131. Brandt L, Elhay M, Rosenkrands I, Lindblad EB, Andersen P. ESAT-6 subunit vaccination against *Mycobacterium tuberculosis*. *Infect Immun.* 2000 Feb;68(2):791-5.
 132. The QIAexpressionist™. Qiagen 2003. S64
 133. Yang YI, Hong HY, Lee IS, Bai DG, Yoo GS, Choi JK. Detection of DNA using a visible dye, Nile blue, in electrophoresed gels. *Anal Biochem.* 2000 May 1;280(2):322-4.
 134. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>
 135. Poliakov A, Hubatsch I, Shuman CF, Stenberg G, Danielson UH. Expression and purification of recombinant full-length NS3 protease-helicase from a new variant of Hepatitis C virus. *Protein Expr Purif.* 2002 Aug;25(3):363-71.
 136. www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/BioEdit.html
 137. Wardell AD, Errington W, Ciaramella G, Merson J, McGarvey MJ. Characterization and mutational analysis of the helicase and NTPase activities of hepatitis C virus full-length NS3 protein. *J Gen Virol.* 1999 Mar;80 (Pt 3):701-9.
 138. J Cline, J C Braman, and H H Hogrefe. PCR fidelity of pfu DNA polymerase and other thermostable DNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* 1996 September 15; 24(18): 3546–3551.
 139. Wardell AD, Errington W, Ciaramella G, Merson J, McGarvey MJ. Characterization and mutational analysis of the helicase and NTPase activities of hepatitis C virus full-length NS3 protein. *J Gen Virol.* 1999 Mar;80 (Pt 3):701-9.
 140. Franken KL, Hiemstra HS, van Meijgaarden KE, Subronto Y, den Hartigh J, Ottenhoff TH, Drijfhout JW. Purification of his-tagged proteins by immobilized chelate affinity chromatography: the benefits from the use of organic solvent. *Protein Expr Purif.* 2000 Feb;18(1):95-9.
 141. Miles EA, Bakewell L, Calder PC. Production of lymphocyte-derived cytokines by whole umbilical cord blood cultures stimulated with mitogens and allergens. *Cytokine* 2003; 21: 74–83.
 142. Seeger FH, Tonn T, Krzossok N, Zeiher AM, Dimmeler S. Cell isolation procedures matter: a comparison of different isolation protocols of bone marrow mononuclear cells used for cell therapy in patients with acute myocardial infarction. *Eur Heart J.* 2007 Mar;28(6):766-72.
 143. Abbas et al. *Cellular & Molecular Immunology* 6E.
 144. Silberer J, Ihorst G, Kopp MV. Cytokine levels in supernatants of whole blood and mononuclear cell cultures in adults and neonates reveal significant differences with respect to interleukin-13 and interferon-gamma. *Pediatr Allergy Immunol.* 2008 Mar;19(2):140-7.
 145. Levings, M. K., Gregori, S., Tresoldi, E., Cazzaniga, S., Bonini, C. & Roncarolo, M. G. (2005). Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25⁺CD4⁺ Tr cells. *Blood* 105, 1162–1169.
 146. Pellegrini P, Contasta I, Berghella AM, Del Beato T, Casciani CU, Adorno D. The TH1 and TH2 cytokine network in healthy subjects: suggestions for experimental studies to create prognostic and diagnostic indices for biotherapeutic treatments. *Cancer Biother Radiopharm.* 2000 Jun;15(3):267-78
 147. Cacciarelli TV, Martinez OM, Gish RG, Villanueva JC, Krams SM: Immunoregulatory cytokines in chronic Hepatitis C Virus infection: pre- and posttreatment with interferon alpha. *Hepatology* 24:6 –9, 1996.

.