

# Kronik hepatit C enfeksiyonunda hepatit C virüs genomu amino asit polimorfizmi ve kalıcı virolojik yanıt ilişkisi

Dr. Hikmet AKKIZ, Dr. Fatih Y. IŞIKSAL

Çukurova Üniversitesi Tıp Fakültesi, Gastroenteroloji Bilim Dalı, Adana



Dr. Fatih Y. IŞIKSAL

**H**epatit C virüs enfeksiyonu ülkemizin en önemli sağlık sorunlarından biridir. Akut enfeksiyonunun kronikleşme riski oldukça yüksek olup kronik hepatite, karaciğer sirozuna ve hepatosellüler karsinoma (HCC)'ya neden olmaktadır (1).

Kronik hepatit C enfeksiyonlu hastaların tedavisinde temel sorun virüsün antiviral tedaviye direnç göstermesidir. Kalıcı virolojik yanıt oranı

IFN-alfa monoterapisi ile %16-%20 oranında, IFN-alfa ve ribavirin kombinasyon tedavisi ile %38-%43 oranında ve pegylated IFN monoterapisi ile %36-%39 oranlarında bildirilmektedir (2,3,4). Kısacası, HCV izolatlarının büyük çoğunluğu antiviral tedaviye dirençlidir. Direncin moleküler mekanizmaları gerek in vivo gerekse in vitro olarak birçok çalışmada araştırılmış ve oldukça önemli bulgular elde edilmiş olmasına rağmen sorun henüz çözülebilmemiş değildir (5).

HCV genomu, pozitif – sarmallı RNA molekülü olup genom boyu yaklaşık 9400 nükleotid'tir. Viral genom oldukça geniş bir Open Reading Frame'e sahiptir (6). Başlangıçta tek bir prekürsör poliprotein kodlanır. Poliprotein viral ve hücrel proteazlarla yapısal ve yapısal olmayan proteinlere klevaj olmaktadır (7). 5' Non Coding Region (NCR) genomun en iyi korunan bölgesi, E2 yüzey geni ise en değişken bölgesidir. Özellikle E2 geni hypervariable region 1 (HVR1) de quasispecies'ler yoğun olarak gelişmektedir (8). E2 yüzey proteini virüsün hedef hücreye tutunmasında, girişinde ve antiviral yanıtta dirençte rol oynamaktadır (9).

HCV genellikle karaciğerde hepatositlerde, çok seyrek olarak da ekstrahepatik hücrelerde, örneğin periferik kanda mononükleer hücrelerde replike olmaktadır (10). Virionların çok azı de novo enfeksiyonda rol oynarken büyük çoğunluğu sistemik dolaşımda bulunmaktadır (10,11). Kronik enfeksiyon döneminde virüsün replikasyon kinetikleri oldukça statik bir durumdadır (12). Enfekte hücrede virüsün replikasyonu periferde virion degradasyonu ile kompanse edilmektedir. Bu süreçte immün yanıt temel rolü oynamaktadır (13). Minimum günlük HCV yapım-klirens oranı  $10^{12}$  virion/gündür (14). Serumda virionların maksimum yanılma ömrü 3 saatten daha azdır (12).

HCV genomik organizasyonu bakımından oldukça heterojen bir özellik göstermektedir. Günümüzde 6 genotipi, 40 dan fazla subtipi, pek çok izolatu ve quasispecies'i tanımlanmıştır (7). HCV diğer RNA virüsleri gibi enfekte hastanın dolaşımında aynı viral partiküllerden oluşan homojen bir popülasyon olarak bulunmaz, ancak genetik olarak farklı fakat birbirlerine oldukça yakın varyantlardan oluşan bir havuz meydana getirmektedir. Bu varyant havuzu "Quasispecies" olarak tanımlanmaktadır (15). HCV quasispecies'leri virüse önemli derecede sağkalım avantajı sağlamaktadır. Eş zamanlı olarak multiple varyant genomun gelişmesi ve yeni mutantların çok hızlı bir biçimde oluşması virüsün yeni çevre koşullarına uyumunu kolaylaştırmaktadır (14). Viral heterojenite primer olarak NS5B geni tarafından kodlanan RNA-bağımlı RNA polimeraz enziminin yüksek hata (error) oranına bağlıdır (14). Yanlış eşleşme (mismatching) sıklığı her baz bölgesinde ortalama  $10^{10}$ 'dur. RNA bağımlı-RNA polimeraz enziminin doğrulama (proof reading) mekanizması yoktur. Mutant viral partiküllerin büyük çoğunluğunda replikasyon defekti vardır. Ancak bazıları etkili olarak replike olabilirler. Replikasyon kapasitelerine göre ve immün yanıtın selektif baskısı sonucu "fittest" enfeksiyöz partiküller sürekli olarak gelişmektedir (14). Kronik enfeksiyon döneminde her zaman viral quasispecies'ler eşit dağılımdadırlar. Ancak, quasispecies kompozisyonları çevre koşullarına göre hafif ya da belirgin değişiklik gösterebilir. Bu değişiklikler spontan veya araya giren enfeksiyonlar, ilaç alımı veya antiviral tedavi gibi eksternal faktörler sonucu olabilirler (14).

HCV genomunu quasispecies dağılımı virüsün kalıcılığında (persistence) önemli rol oynamaktadır (15). Kalıcı viremili hastalar spontan klirens

gelişen hastalara göre daha erken ve geniş quasispecies sekans repertuarına sahiptirler (16). Ayrıca, replikasyon sırasında immün yanıtın kaçabilen yeni varyantlar sürekli olarak gelişmektedir (17). HVR1, E2 geninde lokalizedir ve nötralizan antikorların temel hedeflerinden biridir. Akut enfeksiyon sırasında yüksek replikasyon hızı, birlikte bu bölgenin amino asit polimorfizminin büyük çoğunluğunu tolere edebilmesi sürekli olarak yeni HVR1 varyantların gelişmesine neden olmaktadır (17). Major varyantlar nötralizan antikorlar tarafından sürekli olarak elemine edilirler ve minör varyantlar tarafından replase olurlar. Minör varyantlar daha sonra major varyant haline gelmektedir (18,19). Bugün viral persistens yeni HVR1 mutantların sürekli gelişmesi ve nötralizan antikorlardan kaçan mutantların devamlı seleksiyonu ile sağlanmaktadır (20). HCV genomunun diğer nötralizan epitoplara spesifik antikor yanıtından benzer biçimde kaçmaktadırlar. Farklı genomik region'larla ilgili epitop varyantların sitotoksik T lenfosit (CTL) seleksiyonu viral persistensta önemli rol oynamaktadır. Konak ve viral proteinler arasındaki spesifik etkileşimler immün yanıtı güçlendirebilir (20).

HCV genellikle karaciğerde replike olmaktadır. Bununla birlikte, negatif-sarmallı HCV RNA'nın ekstrahepatik hücrelerde saptanması virüsün karaciğer dışı replikasyonunun bir göstergesidir. HCV'nün periferik kanda mononükleer hücrelerde replike olduğu açıktır. Farklı vücut kompartmanlarından, karaciğer, sistemik dolaşım periferik kan mononükleer hücreleri gibi, izole edilen quasispecies varyantlar birbirlerine çok yakın olmalarına ve aynı inokulum olmasına rağmen farklı sekansa sahiptirler (21-23). Quasispecies varyantların kompartmentalizasyonu farklı kompartmanlarda varyant turnover kinetiklerinde farklılık ve/veya farklı doku tropizmi sonucu olabilir (24). Yapım oranı, sistemik dolaşıma salınımı ve periferik kanda klirensi bir varyant popülasyonundan diğerine farklılık göstermektedir. HCV quasispeciesleri ile karaciğer hastalığının derecesi, siroz ve hepatosellüler karsinoma (HCC) gelişmesi ve HCV-iliği ekstrahepatik immünolojik hastalıkların sıklığı ve ağırlığı arasında ilişki bildirilmektedir (24). Tedavi öncesi geniş quasispecies sekans repertuarının kalıcı virolojik yanıtta bağımsız prediktif faktör olduğu kabul edilmektedir. Sadece dar quasispecies sekans repertuarlı hastalarda kalıcı HCV klirensi gerçekleşmektedir. Oysa, geniş quasispecies sekans repertuarlı hasta-

larda kalıcı virolojik yanıt çok daha düşük oranlardadır (24).

Kronik hepatit C enfeksiyonunun tedavisinde kullanılan temel ilaç interferon alfa (IFN-alfa)'dır. IFN-alfa hem immünomodülatör hem de direkt antiviral etkiye sahiptir (24). IFN üç önemli antiviral geni aktive etmektedir; 2'-5' Oligoadenilat Sentetaz, Mx genleri ve çift sarmallı RNA-bağımlı Protein Kinaz (PKR) (26,27). Bu antiviral efektör proteinler içinde en önemlisi PKR'dır (28). Aktif PKR eukaryotik başlatıcı faktör 2 alfa (eIF2alfa)'yı fosforilize ederek virüsün protein sentezini inhibe etmektedir. IFN-alfa immün hücrelerin yüzeylerinde bulunan reseptörlere bağlanarak immünomodülatör etkisini göstermektedir. HLA klass I antijenlerin sentezlenmesini indüklemektedir (29,30). Ayrıca makrofajlar, doğal öldürücü hücreler (NK) ve CTL gibi efektör hücreleri aktive etmektedir (30,31). Son olarak IFN-alfa sitokin sistemi ile oldukça karmaşık bir biçimde etkileşmektedir. T - helper 1 hücrelerinde sitokin sentezini indüklemektedir (30). Bu hücrelerde temel olarak interferon - gamma ve interlökin-2 (IL-2) sentezlenmektedir. IFN-alfa, T-helper 2 hücrelerin sentezini azaltmaktadır. Bu hücreler başlıca IL-4 ve IL-5 sentezlemektedirler. IFN-alfa aynı zamanda, IL-1, IL-8 ve tümör nekroz faktör alfanın periferik yapımını inhibe ederek ve IL-10 yapımını stimüle ederek antienflamatuvar etki göstermektedir (29,30,31).

Kronik hepatit C enfeksiyonunda antiviral tedaviye yanıtızlık birçok faktörle ilgilidir. Bu faktörler tedavi rejimi ile, konakla ve karaciğer hastalığının derecesi ile ilgili olabilir (32). Kronik enfeksiyon döneminde HCV replikasyon kinetikleri oldukça statik bir durumdadır (12). Enfekte hücrede virüsün replikasyonu periferde virion degradasyonu ile kompanse edilirken nonenfekte hücrede de novo enfeksiyon enfekte hücrenin ölümü ile kompanse edilmektedir (12,13). Bu statik süreç serbest HCV virionunun yaklaşık yanlanma ömrünün 3 saat ve günlük virion yapım - klirens oranında 1012 viral partikül /gün olması ile karakterizedir (13).

Klasik doz IFN-alfa uygulaması ( haftada 3 kez 3 m.ü subkutan ) tedavinin indüksiyon fazında bu denli hızlı viral kinetikler nedeniyle uygun değildir (33,34). Yüksek doz IFN-alfa ilk dozdan sonra 24 saat içinde viral yükte dramatik bir düşme sağlamaktadır (34). Ayrıca, IFN-alfanın intermitent uygulanması 2. günde viral replikasyon reboundu ile birlikte dir. Ribavirinin eklenmesi bu

reboundu önlemekte ve viral yükün oldukça yavaş ancak, belirgin düşmesini (slope) sağlamaktadır (34). HCV klirensi hastaların yaklaşık yansında gözlenmektedir. Günlük IFN-alfa ve haftalık pegylated IFN - alfa uygulaması ile hastaların büyük çoğunluğunda viral replikasyonda tipik bifazik düşme gözlenmektedir. İlk hızlı düşme 1. günde olmaktadır ve IFN-alfanın virüs yapımını direkt inhibe edici etkisi ile ilgilidir. İkinci slope 2. günde başlamaktadır ve virüs yapımının inhibisyonu ile birlikte enfekte hücrenin ölümü ile ilgilidir ve hastaların büyük bölümünde HCV RNA klirensi gerçekleşmektedir (34). Gelecekte uygulanacak tedaviler, özellikle spesifik anti - HCV ilaçlar ( HCV proteaz, helikaz veya polimeraz inhibitörleri, ribozimler veya antisense oligonükleotidler ... ) HCV RNA klirens oranını daha da yükselteceklerdir (35).

Tedavi süresi kalıcı virolojik yanıt oranlarını önemli derecede etkilemektedir. Tedavi sırasında HCV RNA klirensi gerçekleşen hastalarda tedavi süresinin uzun olması durumunda nüks oranı belirgin olarak azalmaktadır (33). Bildirilen çalışmaların büyük çoğunluğunda tedavinin indüksiyon fazında ve idame fazında aynı rejim uygulanmaktadır (2-4). İndüksiyon fazı, tedavi başlangıcı ile serumda HCV RNA klirensinin gerçekleşmesi arasındaki süre olarak tanımlanmaktadır. İdame fazı, indüksiyon fazına bağlı olarak oldukça uzun olabilir. İdame faz tedavisini iyileştirecek olan tedavi stratejileri geliştirilmelidir. Yeni ilaçlar ve terapötik rejimler, özellikle immünolojik orjinli, yararlı olabilir. Tedavi süresinin uzatılması nüks riskini azaltabilir (33).

Konakla ilgili faktörler arasında yaşlı popülasyon, erkek cinsiyet ve bazı etnik gruplarda, kalıcı virolojik yanıt oranı düşüktür (36). Vücut ağırlığı antiviral tedaviye duyarlılığı etkilemektedir. Breakthrough gelişen hastaların yaklaşık %50'sinde bu fenomenen nötralizan anti-IFN antikörlerin sorumludur (37). Tedavinin sonlandırılması veya diğer bir IFN-alfa molekülü ile değiştirilmesi hayat kurtarıcı olabilir. Aktif alkol veya intravenöz ilaç alımı yanıtı olumsuz etkilemektedir (37,38). Yoğun fibrosis ve kompanse siroz düşük yanıt oranları ile birlikte dir. Ayrıca HCV - HIV koenfeksiyonlu hastalar, özellikle düşük CD4-pozitif hücre sayılı hastalarda kalıcı virolojik yanıt oranı düşüktür (38). Bu durum, HIV nedenli immünoşüpresyon, viral etkileşimler veya ilaç etkileşimleri sonucu olabilir. HCV enfeksiyonunun ekstrahepatik manifestasyonları olan hastalarda kalıcı virolojik yanıt

oranın düşük olduğu bildirilmektedir (39). Önceki tedaviye yanıtı olmayan hastalarda ikinci tedavi modalitesine karşı da yanıt oranı düşük bulunmaktadır. Normal ALT seviyeli ve histolojik olarak hafif hepatitli hastaların tedavi edilip edilmemesi konusu tartışmalıdır (38). Bu hastalarda kalıcı virolojik yanıt oranı yüksek ALT seviyeli hastalarda sağlanan orandan farksızdır. Ancak, bu hastalarda doğal seyrin oldukça iyi olması tedavi konusunu tartışmalı bir noktaya taşımaktadır (38).

Kuşkusuz kronik hepatit C enfeksiyonlu hastalarda kalıcı virolojik yanıtta virolojik faktörler konakla ilgili faktörlere kıyasla daha belirleyici parametrelerdir. İntrinsik olarak IFN'a dirençli HCV izolatlarının bulunması pek olası değildir. Çünkü, başlangıçta yeterli yüksek doz IFN uygulanan hastaların hemen hepsinde en azından tedavinin ilk saatlerinde IFN'un nonspesifik antiviral etkisi ile viral replikasyonda önemli bir azalma olmaktadır (5). Ayrıca, HCV izolatlarında IFN'a dirence neden olabilecek spesifik genom mutasyonları tartışmalı bir konudur. Direnç büyük olasılıkla HCV quasispecies kompozisyonunda kalitatif değişikliklerle ilgili olabilir (40). Yapılan çalışmalarda HCV quasispecies varyantlarının gelişmesi intrinsik olarak IFN'a dirence neden olmamaktadır, ancak konak yanıtının oluşturduğu çevreye uyumlu hale gelmektedir (40,41). İlk IFN-alfa uygulamasına yanıtı olmayan veya kısmi yanıtı olan hastalarda ve daha sıklıkla yanıtı olmayan hastalarda aynı tedavi modalitesinin ikinci kez uygulanması ile kalıcı yanıt sağlanabilmektedir (5). Bu hastalarda, ilk kür IFN tedavisinden sonra önemli kalitatif HCV quasispecies değişiklikleri olmaktadır. HCV varyantları IFN-alfaya intrinsik olarak dirençli değildir, çünkü ikinci kür tedaviden sonra bu varyantların kesin olarak klirensi gerçekleşmektedir. Bu varyantlar IFN-alfanın uygulanması ve daha sonra kesilmesi sonucu oluşan çevreye uyumlu hale gelmektedir. Quasispecies varyantları ikinci kür sırasında uygunsuz hale gelebilirler ve klirensleri gerçekleşebilir, ilk kürden birkaç ay sonra konak - virüs etkileşimi farklılaşabilir ve o zaman kalıcı virolojik klirens eğilimi olmaktadır (5,40-42).

HCV PKR'ın antiviral etkisinden 2 mekanizma ile kaçmaktadır. Bu mekanizmalardan ilki; E2 yüzey proteini ile ilgilidir, ikincisi ise ; NS5A proteini ile ilgilidir (43,44). E2 proteininde 12 amino asitlik bir domain (PKR-eIF2alfa Fosforilasyon Homoloji Domain)'in PKR'ı bağladığı ve onun antiviral etkisini bloke ettiği in vitro çalışmalarda gösterilmiştir

(43). Bu nedenle E2 proteini - PKR etkileşimi direnç mekanizmalarından biri olabilir (43). HCV-1a ve HCV-1b izolatlarında NS5A geninde kodon 2209 ve kodon 2248 arasındaki bölge İnterferona Duyarlılığı Belirleyen Bölge (ISDR), kodon 2209 ve kodon 2248 arasındaki bölge ise PKR- bağlayan bölge (PKR-BD) olarak tanımlanmıştır (44,45). NS5A proteini ISDR veya PKR-BD aracılığı ile PKR'ı bağlamakta ve onun kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. Bu nedenle HCV-1a ve HCV-1b izolatları ile enfekte hastalarda NS5A geninde wild tip veya seyrek sekans varyasyonlu ISDR ile wild tip veya seyrek mutasyonlu PKR-BD kalıcı virolojik yanıtı etkilemektedir (44-46).

HCV-1b izolatları ile enfekte hastalarda ISDR mutasyonu ve kalıcı virolojik yanıt ilişkisi ilk kez Enomoto ve arkadaşları tarafından 84 Japon hastada çalışıldı (44). Kalıcı virolojik yanıt wild tip HCV ile enfekte hastalarda %0, intermediate tip virüsle enfekte hastalarda %13 ve mutant tip virüsle enfekte hastalarda ise %100 oranında bildirildi. Enomoto ve arkadaşlarının bu bulguları diğer Japon araştırmacılar tarafından da doğrulanmıştır. Çalışmaların tümü dikkate alındığında HCV-1b izolatları ile enfekte hastalarda kalıcı virolojik yanıt wild tipli hastalarda %7, intermediate tipli hastalarda %15 ve mutant tipli hastalarda ise %84 oranlarında bulunmuştur (44).

HCV-1b izolatları ile enfekte Avrupalı hastalarda ise kalıcı virolojik yanıt oranı wild tipli enfekte hastalarda %0, intermediate tipli enfekte hastalarda %22 ve mutant tipli enfekte hastalarda %12 oranında bildirilmektedir (47,48).

Acaba HCV-1b izolatları ile enfekte Avrupalı hastalarla Japon hastalar arasında belirlenen kalıcı virolojik yanıt farklılığının nedenleri nelerdir? Avrupalı hastalar arasında mutant tipten daha çok intermediate tip bulunmaktadır. Intermediate tipli enfekte Avrupalı hastalarda kalıcı virolojik yanıt oranı daha yüksektir. Avrupalı hastalarda ISDR'nin dışında PKR-BD mutasyonlarının yanıtla ilişkisi ortaya konulmuştur (47,48). Ülkemizde HCV-1b izolatları ile enfekte hastalarda yapılan çalışmada intermediate tip HCV enfeksiyonu ile kalıcı virolojik yanıt arasında ilişki belirlenmiştir (49). Sonuç olarak NS5A proteinin PKR'ı bağlamasında ISDR gerekli, ancak yeterli değildir. Bu nedenle ISDR amino asit sekansının yanı sıra PKR-BD'nin tümünün sekans analizinin yapılması gerekmektedir.

Yakın zamanda E2 yüzey proteininde 12 amino

asitlik bir domain'in PKR ve eIF2 alfanın fosforilazasyon bölgesi ile aynı sekans homolojisi gösterdiği bildirilmiştir (43,50,51). Bu domain "PKR-eIF2alfa Fosforilazasyon Homoloji Domain" (PePHD) olarak tanımlandı (43). HCV-1a ve HCV-1b izolatlarında bu domain PKR'ı bağlamakta ve onun kinaz aktivitesini inhibe etmektedir. PePHD'in amino asit sekansının önemini belirlemek amacıyla iki yeni çalışma yapılmıştır. İlk çalışmaya HCV-1b izolatı ile enfekte 82 hasta katılmış. 11 hastada kalıcı virolojik yanıt alınmış. 71 hastada yanıt alınamamış. Kalıcı virolojik yanıtla PePHD'de belirlenen mutasyon arasında ilişki bulunamamış (52). Ancak, ISDR'de gelişen mutasyonlarla kalıcı virolojik yanıt arasında ilişki belirlenmiştir (51). İkinci çalışmada da benzer bulgular elde edilmiş; PePHD'de belirlenen mutasyonlarla kalıcı virolojik yanıt arasında ilişki bulunamazken ISDR mutasyonu ile yanıt arasında ilişki tespit edilmiştir (53).

Özetle kronik hepatit C enfeksiyonunda kalıcı virolojik yanıtta virolojik faktörler daha belirleyici

parametrelerdir. Genotip kalıcı virolojik yanıt ilişkisi her tedavi modalitesinde bildirilmektedir. Ayrıca tedavi öncesi yüksek viral yükün ve geniş quasispecies sekans repertuarının tedaviye yanıtta olumsuz prediktif faktörler olduğunu biliyoruz. Günümüzde HCV-1a ve HCV-1b izolatlarının NS5A geninde gelişen amino asit polimorfizmi ve kalıcı virolojik yanıt ilişkisi yoğun olarak araştırılmakta olup önemli gelişmeler kaydedilmiştir. HCV-1a ve HCV-1b izolatlarında NS5A geninde belirlenen mutasyonların yanıtta etkisi Avrupalı hastalarda da gözlenmektedir. Ancak, NS5A mutasyonlarının kalıcı virolojik yanıtta prediktif bir faktör olup olmadığını söyleyebilmek için henüz çalışmaların sayısı yeterli değildir. İlk çalışmalardan elde edilen bulgular E2 yüzey geni mutasyonları ve kalıcı virolojik yanıt arasında bir ilişkinin olmadığı noktasındadır. Ülkemizde de HCV genomunda dedekte edilen mutasyonlarla kalıcı virolojik yanıt ilişkisinin kapsamlı bir biçimde belirlenmesinde yarar vardır.

## KAYNAKLAR

1. Di Bisceglie AM. Naturel History of Hepatitis C : Its Impact on Clinical Management. *Hepatology* 2000;31:1014-1016.
2. McHutchison JG, Gordon SC, Schiff ER, et al. Interferon- $\alpha$ -2b alone or in combination with ribavirin as initial treatment for chronic hepatitis C. *N Eng J Med* 1998;339:1485-1492.
3. Poynard T, Marcellin P, Lee SS, et al. Randomised trial of interferon-alpha-2b plus ribavirin for 48 weeks or for 24 weeks versus interferon-alpha-2b plus placebo for 48 weeks for treatment of chronic infection with hepatitis C virus. *Lancet* 1998;352:1426-1492.
4. Poynard T, Leroy V, Cohard M. et al. Meta-analysis of interferon randomised trials in the treatment of viral hepatitis C. *Hepatology* 1996;24:778-789.
5. Pawlotsky J-M. Hepatitis C virus resistance to antiviral therapy. *Hepatology* 2000;32:889-896.
6. Choo QL, Kuo G, Weiner AJ, Overby CR, et al. Isolation of a cDNA clone derived from a blood-borne non-A, non-B viral hepatitis genome. *Science* 1989;244:359-362.
7. Simmonds P. Variability of hepatitis C virus. *Hepatology* 1995;21:570-583.
8. Weiner AJ, Brauer MJ, Rosenblot et al. Variable and hyper-variable domains are found in the regions of HCV corresponding to the flavivirus envelope and NS1 proteins and pestivirus envelope glycoproteins. *Virology* 1991;180:842-848.
9. Martell M, Esteban JI, Quer J et al. Hepatitis C virus (HCV) circulates as a population of different but closely related genomes : quasispecies nature of HCV genome distribution. *J Virol* 1992;66:3225-3229.
10. Scimizu YK, Igarashi H, Kanemoto T, et al. Sequence analysis of the hepatitis c virus genome recovered from serum, liver, and peripheral blood mononuclear cells of infected chimpanzees. *J Virol* 1997;71:5769-5773.
11. Lerat H, Rumin s, Habersetzer F, et al. In vivo tropism of hepatitis c virus genomic sequences in hematopoietic cells :influence of viral load, viral genotype, and cell phenotype. *Blood* 1998;91:3841-3849.
12. N'guyen T, Sedghi-Vaziri A, Wilkes L, et al. Fluctuations in viral load (HCV RNA) are relatively insignificant in untreated patients with chronic HCV infection. *J Viral Hepatitis* 1996;3:75-78.
13. Zeuzem S, Schmidt JM, Lee JH, Rüster B, et al. Effect of interferon alfa on the dynamics of hepatitis C virus turnover in vivo. *Hepatology* 1996;23:366-371.
14. Domingo E, Holland JJ. RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu Rev Microbiol* 1997;51:151-178.
15. Doming E. Biological significance of viral quasispecies. *Viral Hepatitis Rev.* 1996;2:247-261.
16. Weiner AJ, Geysen HM, Christopherson et al. Evidence for immun selection of hepatitis C virus (HCV) putative envelope glycoprotein variants:potential role in chronic HCV infections. *Proc Natl Sci USA* 1992;89:3468-3472.
17. Villona SA, Vlahov D, Nelson KE, Cohn S, et al. Persistence of viremia and after importance of long-term follow-up after acute hepatitis C infection. *Hepatology* 1999;29:908-914.
18. Farci P, Alter HJ, Wang DC, et al. Prevention of hepatitis c virus infection in vitro neutralisation. *Proct Natl Acad Sci USA* 1994;91:7792-7796.
19. Kato N, Sekiya H, Ootsuyama Y, et al. Humoral immune response to hypervariable region of the putative envelope glycoprotein (gp70) of hepatitis C virus. *J Virol* 1993;67:3923-3930.
20. Kojima M, Osuga T, Tsuda F, Tonoka T, et al. Influence of antibodies to the hypervariable region of E2/NS1 glycoprotein on the selective replication of hepatitis c virus in chimpanzees. *Virology* 1994;204:665-672.
21. Cobat B, Esteban JI, Martell M, et al. Structure of replicating hepatitis C virus (HCV) quasispecies in the liver may

- not be reflected by analysis of circulating HCV virions. *J Virol* 1997;71:1732-1734.
22. Nakojima N, Hijikata M, Yoshihura H, Shimizu YK. Characterisation of long-term culture of hepatitis C virus. *J Virol* 1996;70:3325-3329.
  23. Naito M, Hayashi N, Moribi T, et al. Hepatitis C viral quasispecies in hepatitis C virus carriers with normal liver enzymes and patients with type C chronic liver disease. *Hepatology* 1995;22:407-412.
  24. Toyoda H, Kumada T, Nahona S. Quasispecies nature of hepatitis C virus and response to alpha interferon significance as a predictor of direct response to interferon. *J Hepatol* 1997;26:6-13.
  25. Levy DE. Interferon induction of gene expression through the Jak-Stat pathway. *Semin Virol* 1995;6:181-189.
  26. Hovanessian AG. Interferon-induced and double-stranded RNA-activated enzymes: a specific protein kinase and 2', 5'-oligoadenylate synthetases. *J Interferon Res* 1991;11:199-205.
  27. Meurs E. Mechanisms of antiviral action of interferon. *Virologie* 1997;1:481-498.
  28. Williams BRG. The role of the dsRNA-activated protein kinase, PKR in signal transduction. *Semin Virol* 1995;6:191-192.
  29. Peters M. Action of cytokines on the immune response and viral interactions: an overview. *Hepatology* 1996;23:909-916.
  30. Aman MJ, Rudolf G, Goldschmitt G, Aulitzky W, Huber C, et al. Type 1 interferons are potent inhibitors of interleukin-8 production in hematopoietic and bone marrow stromal cells. *Blood* 1993;82:2371-2382.
  31. Larrea E, Garcia N, Qian C, Civeria MP, Prieto J. Tumor necrosis factor alpha gene expression and the response to in chronic hepatitis C. *Hepatology* 1996;23:210-217.
  32. Lam NP, Neumann AU, Gretch DR, Wiley TE, et al. Dose-dependent acute clearance of hepatitis C virus genotype 1 virus with interferon alfa. *Hepatology* 1997;26:226-231.
  33. Neuman AU, Lam NP, Dahari H, Gretch DR. Hepatitis C viral dynamics in vivo and the antiviral efficacy of interferon-alfa therapy. *Science* 1998;282:103-107.
  34. Pawlotsky JM, Neuman AU, Dahari H, Conrad A, et al. Hepatitis C virus (HCV) dynamics during induction therapy with interferon (IFN)alpha and/or ribavirin. *Antiviral Ther* 2000;5(suppl. 1):71.
  35. Zeuzem S, Herrman E, Lee JH, Fricke J, et al. Hepatitis C virus kinetics in chronically infected patients treated with pegylated interferon-alfa. *Hepatology* 1999;30:309A.
  36. McHutchison JG, Poynard T, Gordon SC, Dienstag J, et al. The impact of race on response to antiviral therapy in patients with chronic hepatitis C. *Hepatology* 1999;30:302A.
  37. National Institutes of Health Consensus Development Conference Panel statement. Management of hepatitis C. *Hepatology* 1997;26(suppl.1):2S-10S.
  38. EASL International Consensus Conference on Hepatitis C. Consensus statement. *J Hepatol* 1999;30:956-961.
  39. Lunel F, Cacoub P. Treatment of autoimmune and extrahepatic manifestations of hepatitis C virus infection. *J Hepatol* 1999;31(Suppl.1):210-216.
  40. Shindo M, Hamada K, Koya S, Arai K, et al. The clinical significance of changes in genetic heterogeneity of the hyper-variable region 1 in chronic hepatitis C with interferon therapy. *Hepatology* 1996;24:1018-1023.
  41. Enomoto N, Kurosaki M, Tanaka Y, Marumo F, et al. Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-stranded conformation polymorphism analysis. *J Gen Virol* 1994;75:1361-1369.
  42. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Comparison of full-length sequences of interferon-sensitive and resistant hepatitis C virus 1b. Sensitivity to interferon is conferred by amino acid substitutions in the NSSA region. *J Clin Invest* 1995;96:224-230.
  43. Taylor DR, Shi ST, Romano PR, Barber GN, et al. Inhibition of the interferon-inducible protein kinase PKR by HCV E2 protein. *Science* 1999;285:107-110.
  44. Enomoto N, Sakuma I, Asahina Y, et al. Mutations in the nonstructural protein 5A gene and response to interferon in patients with chronic hepatitis C virus 1b infection. *N Engl J Med* 1996;334:77-81.
  45. Chayama K, Tsubota A, Kobayashi M, et al. Pretreatment virus load and multiple amino acid substitutions in the interferon sensitivity-determining region predict the outcome of interferon treatment in patients with chronic genotype 1b hepatitis C infection. *Hepatology* 1997;25:745-749.
  46. Murakami T, Enomoto N, Kurosaki M, Izumi N, et al. Mutations in nonstructural protein 5A and response to interferon in hepatitis C genotype 2 infection. *Hepatology* 1999;30:1045-1053.
  47. Sarrazin C, Berg T, Teuber G, et al. Improved correlation between multiple mutations within the NSSA region and virological response in the European patients chronically infected with hepatitis C virus type 1b undergoing combination therapy. *J Hepatol* 1999; 30:1004-1013.
  48. Polyak SJ, Paschal DM, McArdle S, Gale MJ Jr, et al. Characterisation of the effects of hepatitis C virus nonstructural 5A protein expression in human cell line and on interferon-sensitive virus replication. *Hepatology* 1999;29:1262-1271.
  49. Akkiz H, Çolakoğlu S, Ergün Y, et al. Mutations in the nonstructural 5A gene and virological response to interferon in Turkish patients chronically infected with HCV-type 1b. *EASL* 2001.
  50. 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;230:217-227.
  51. François C, Duverlie G, Rebouillat et al. Expression of hepatitis C virus proteins interferes with the antiviral action of interferon independently of PKR-mediated controls of protein synthesis. *J Virol* 2000;74:5587-5596.
  52. Chayama K, Suzuki F, Tsubota A, et al. Association of amino acid sequence in the PKR-eIF2 phosphorylation homology domain and response to interferon therapy. *Hepatology* 2000;32:1138-1144.
  53. Sarrazin C, Kornetzky I, Rüster B, et al. Mutations within the E2 and NSSA protein in patients infected hepatitis C virus type 3a and correlation with treatment response. *Hepatology* 2000; 31: 1360-1370.