

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

**LAMİVUDİNE, ADEFOVİR DİPİVOKSİL ve ENTECAVİR'E DİRENÇ
GÖSTEREN HBV VARYANTLARININ TANIMLANMASI ve BU
MUTANTLARIN DEĞİŞİK ANTİVİRALLERE KARŞI DİRENÇ
PROFİLLERİNİN *İN VİTRO* FENOTİPLEME YÖNTEMİ İLE
KARAKTERİZASYONU**

Ersin KARATAYLI

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI**

ANKARA

2011

Lamivudine, Adefovir Dipivoksil ve Entecavir'e Direnç Gösteren HBV Varyantlarının Tanımlanması ve Bu Mutantların Değişik Antivirallere Karşı Direnç Profillerinin *in vitro* Fenotipleme Yöntemi ile Karakterizasyonu

ÖZET

Dünya üzerinde 2 milyardan fazla insanın HBV ile enfekte olması ve 350 milyon insanın kronik HBV enfeksiyonu olması nedeniyle HBV enfeksiyonu ciddi bir küresel sağlık sorunudur. Kronik Hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma gibi senede 320000'den fazla ölüme neden olan karaciğer ile ilişkili birçok hastalığın temel sebebidir. HBV enfeksiyonu ile mücadelede son iki 10 yılda kayda değer gelişmeler kaydedilse de antiviral dirençli HBV varyantlarının ortaya çıkması nedeniyle kronik hepatitin tedavisi hala zorludur. Bu tezin amacı, lamivudine, adefovir ve entecavire direnç gösteren yeni HBV varyantlarının karakterizasyonu ve bu varyantların değişik antivirallere karşı direnç profillerinin *in vitro* fenotipleme deneyi ile ortaya çıkarılmasıdır.

Çalışmada HBV DNA ekstraksiyonu için kullanılan serum, tedavisinin ilk 7 yılında lamivudine kullanan bir hastadan alınmıştır. Virolojik ve biyokimyasal “breakthrough” gerçekleşmesinden sonra tedavide lamivudinden adefovire geçilmiştir. Fakat adefovir tedavisi altında geçen 2 yılın sonunda sürekli bir virolojik yanıt alınamamış ve bu yüzden hastanın tedavi rejiminde önce adefovir entecavir ile değiştirilmiş, daha sonra bu iki ilacın birlikte kullanılmasıyla devam edilmiştir. Hasta bu tedavi sürecinden fayda görmemiş ve hastadan elde edilen serumlardan ekstrakte edilen HBV DNA'da tanımlanmış hiçbir entecavir direnci olmamasına rağmen, hasta sonunda ölmüştür. Hastadan 6 farklı tarihte alınan serum örneklerinden elde edilen HBV DNA ile HBV genomlarının geriye dönük klonal analizi yapılmıştır. Bu 6 farklı serum örneğinden elde edilen toplam 434 adet klonun analizi yapılmıştır. Antiviral direnç açısından umut vadeden mutasyon paternlerini taşıyan HBV genomları *in vitro* fenotipleme deneyleri ile analiz edilmiştir. L80LV, L91I, M204I, S219A, N238D, Y245H mutasyonlarının hiçbiri daha önce entecavir mutasyonu ile ilişkilendirilmemiş olmasına rağmen bu mutasyon paternini taşıyan HBV genomlarının yabanıl tip ile karşılaştırıldıklarında entecavire 30,4 kat daha fazla direnç geliştirdikleri gösterilmiştir.

Key Words: Hepatitis B virus, lamivudine, adefovir dipivoksil, entecavir, *in vitro* phenotyping

Determination of novel HBV variants which show resistance to lamivudine, adefovir dipivoksil and entecavir and characterization of resistance profile of these mutants against different antivirals by *in vitro* phenotyping.

ABSTRACT

Hepatitis B Virus infection is a serious global health problem with the infection of more than 2 billion people worldwide and 350 million people suffering from chronic HBV infection. It is a major cause of liver related diseases such as chronic hepatitis, cirrhosis and hepatocellular carcinoma (HCC), all of which accounts for a total of more than 320.000 deaths per year. Although remarkable improvements have been achieved in antiviral combat of HBV infection in the last 2 decades, treatment of chronic hepatitis remains to be a serious challenge due to emergence of antiviral resistant HBV variants. The aim of this thesis is to characterise the novel HBV variants which show resistance to lamivudine, adefovir dipivoksil and entecavir and to elucidate the resistance profile of these variants against different antivirals using *in vitro* phenotyping assay.

The serum samples used in this study for HBV DNA extraction were obtained from a patient who had undergone a lamivudine treatment of 7 years initially. After the occurrence of virological and biochemical breakthrough, the antiviral therapy of the patient had been switched from lamivudine to adefovir. However, after 2 years under adefovir dipivoksil treatment, no sustained virological response had been obtained and thus, initially entecavir replaced adefovir dipivoksil in his treatment regime, which was followed by administration of these two drugs at the same time. The antiviral therapy did not prove to be useful and finally the patient died 1 year later even though no identified entecavir resistance was detected in the HBV DNA extracted from serum samples of the patient. A retrospective clonal analysis of the HBV genomes has been done with the HBV DNA extracted from different serum samples of the patient taken at 6 different dates. A total of 434 clones from 6 different serum samples were analysed. HBV genomes bearing mutation patterns promising antiviral resistance have been analysed by *in vitro* phenotyping assay. The mutation pattern consisting of L80LV, L91I, M204I, S219A, N238D, Y245H mutations was shown to be 30,4 fold resistant to entecavir when

compared with the wild type HBV, although none of these mutations has been previously related with entecavir resistance.

Key Words: Hepatitis B virus, lamivudine, adefovir dipivoksil, entecavir, *in vitro* phenotyping

TEŞEKKÜR

Kızım Esin ve eőim Senem'e

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xi
SİMGELER DİZİNİ	xii
1. GİRİŞ	1
2. KAYNAK ÖZETLERİ	2
2.1. Hepatit B Virüsünün Keşfi	2
2.2. HBV Genom Yapısı.....	3
2.3. HBV Genotipleri.....	5
2.4. HBV Hayat Döngüsü ve Replikasyonu	6
2.4.1 Hücre membranına tutunma	8
2.4.2 Viral penetrasyon.....	8
2.4.3 Viral genomun tamiri	9
2.4.4 Transkripsiyon ve translasyon	9
2.4.5 Replikasyon	9
2.4.6 Virionların salınımı ve sirkülasyonu	10
2.5. HBV Prevalansı	10
2.6. HBV Enfeksiyonu.....	11
2.7. HBV Enfeksiyonunun Antiviral Tedavisi	12

2.7.1. İnterferon- α (IFN- α) ve pegile interferon- α	12
2.7.2. Lamivudine	13
2.7.3. Adefovir Dipivoksil	14
2.7.4. Entecavir	15
2.7.5. Tenofovir	16
2.8. HBV Enfeksiyonu Tedavisinde Çapraz Direnç	17
2.9. Hepatit B Virüsü Araştırmalarında Kullanılan <i>in vitro</i> Sistemler	17
2.10. İlaç duyarlılık testleri	18
3. MATERYAL VE YÖNTEM	21
3.1. Materyal	21
3.1.1. Hasta serumu	21
3.1.2. Kimyasallar	23
3.1.3. Enzimler	24
3.1.4. Standart tampon ve çözeltiler	25
3.1.5. Primerler	26
3.2. Yöntem	27
3.2.1. Hasta serumundan viral DNA ekstraksiyonu	27
3.2.2. HBV polimeraz bölgesinin PZR ile çoğaltılması	27
3.2.3. HBV tüm genom amplifikasyonlarının Topo-XL vektörlerine klonlanması ..	28
3.2.3.1. PZR ürünlerinin pürifikasyonu	28
3.2.3.2. Jelin hazırlanması ve DNA'nın jele yüklenmesi	28
3.2.3.3. PZR ürününün jelden ekstraksiyonu	29
3.2.3.4. Topo klonlama reaksiyonunun hazırlanması	30
3.2.3.5. Transformasyon	30
3.2.3.6. Topo klonlaması sonrası klonların nalizi	30
3.2.3.7. Plazmid DNA ekstraksiyonu	31
3.2.3.8. Elde edilen plazmidlerin jelde görüntülenmesi ve analizi	31
3.2.3.9. Pozitif kolonilerin dondurulması ve saklanması	32
3.2.4. Tüm genomun PHY106 ekspresyon vektörüne klonlanması	32
3.2.4.1. SapI restriksiyon enzimi kesimi	32

3.2.4.2.	Vektör uçlarının alkalen fosfatazla muamelesi.....	33
3.2.4.3.	Kesim ürünlerinin jel ekstraksiyonu	33
3.2.4.4.	Ligasyon.....	33
3.2.4.5.	Transformasyon	34
3.2.5.	DNA dizi analizi.....	34
3.2.5.1.	DNA dizi analizi PZR'si	34
3.2.5.2.	DNA dizi analizi PZR ürünlerinin NaOAC-ETOH yöntemiyle temizlenmesi.....	35
3.2.6.	Ekspresyon vektörüne klonlanan HBV tüm genomunun in vitro sistemde analizi	35
3.2.6.1.	Huh7 hücre dizilerinin çözülmesi	35
3.2.6.2.	Huh7 hücre dizilerinin pasajlanması.....	36
3.2.6.3.	Huh7 hücre dizilerinin dondurulması	36
3.2.6.4.	Klonlama ürününün Huh7 hücrelerine transfeksiyonu	36
3.2.6.5.	HBV transfeksiyonu yapılmış hücrelere ilaç verilmesi	37
3.2.6.6.	Toplanan kültür ortamlarından viral DNA ekstraksiyonu	37
3.2.7.	In vitro ortamdaki HBV DNA replikasyonunun analizi.....	38
3.2.8.	IC50 değerlerinin hesaplanması	39
4.	ARAŞTIRMA BULGULARI	40
4.1.	Hasta Serumundan Elde Edilen HBV DNA'nın DNA Dizi Analizi	40
4.2.	TOPO-XL Vektörüne Klonlama Ürünleri.....	41
4.2.1	HBV tüm genom "long PCR" ürünleri.....	41
4.2.2	TOPO-HBV klonlamasından elde edilen klonların jel görüntüleri.....	41
4.2.3	Değişik mutasyon paterni taşıyan klonlar	42
4.2.3.1.	Patern A	43
4.2.3.2.	Patern B.....	45
4.2.3.3.	Patern C.....	47
4.2.3.4.	Patern E.....	47
4.2.3.5.	Patern F.....	48
4.2.3.6.	Patern G	49

4.2.3.7. Patern H	50
4.2.3.8. HBV polimeraz bölgesi dışındaki mutasyonlar	51
4.3. pHY106-HBV Tüm Genom Klonlama Ürünleri	53
4.4. PHY106-HBV Klonlarının Hücre Kültürlerinde Replikasyonu.....	55
4.5. <i>İn vitro</i> Fenotipleme Deneyleri.....	56
4.5.1 Patern A	57
4.5.2 Patern B	58
4.5.3 Patern C	59
4.5.4 Patern D	61
4.5.5 Patern E	62
4.5.6 Patern F.....	63
4.5.7 Patern G	65
4.5.8 Patern H	66
4.5.9 Yabancıl tip HBV	67
4.6. IC50 Değerlerinin Hesaplanması.....	68
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	70
KAYNAKLAR	75
ÖZGEÇMİŞ	93

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1. HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü.....	3
Şekil 2.2. HBV'nin genomik organizasyonu	4
Şekil 2.3 Hepatit B virüsünün virion yapısı.....	5
Şekil 2.4. HBV genotiplerinin dünya üzerindeki dağılımı.....	6
Şekil 2.5. HBV'nin yaşam siklusu.....	7
Şekil 2.6. HBV prevalansı.....	10
Şekil 2.7. Lamivudin yapısı	13
Şekil 2.8. Adefovir Dipivoksil yapısı.....	15
Şekil 2.9. Entecavir yapısı.....	16
Şekil 2.10. Tenofovir yapısı.....	16
Şekil 2.11. pHY106 ekspresyon vektörünün üretilmesi	19
Şekil 3.1. Hastanın biyokimyasal ve virolojik seyri	23
Şekil 4.1 HBV tüm genom PCR amplifikasyon ürünleri.....	41
Şekil 4.2. Topo-HBV tüm genom klonlar.....	42
Şekil 4.3A. Patern A DNA dizi analizi	44
Şekil 4.3B. Patern A DNA dizi analizi	45
Şekil 4.4A. Patern B DNA dizi analizi	46
Şekil 4.4B. Patern B DNA dizi analizi.....	46
Şekil 4.5. Patern C DNA dizi analizi	47
Şekil 4.6. Patern E DNA dizi analizi	48
Şekil 4.7. Patern F DNA dizi analizi.....	49
Şekil 4.8. Patern G DNA dizi analizi	50
Şekil 4.9. Patern H DNA dizi analizi	51
Şekil 4.10 Patern A'ya sahip HBV genomunun HBsAg dizi analizi.....	52
Şekil 4.11 Patern A'ya sahip HBV genomunun kor, prekor ve X bölgesi dizi analizi.....	53
Şekil 4.12. TOPO-HBV klonlarının sapI kesimi	54
Şekil 4.13. phy106-HBV tüm genom klonlama ürünü	54
Şekil 4.14. Huh7 Hücre kültürlerinde GFP ekspresyonu.....	55

Şekil 4.15. pHY106-HBV klonunun Huh7 hücre kültüründe ekspresyonu 56

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1. HBV enfeksiyonunun fazları	11
Çizelge 3.1. Hastanın Klinik Seyri.....	21
Çizelge 3.1 Devamı. Hastanın Klinik Seyri.....	22
Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılan çözelti ve tamponların içerikleri	25
Çizelge 3.3. Kullanılan primerler.....	26
Çizelge 4.1 Hasta Serumundan elde edilen HBV DNA'nın direkt DNA dizi analizi.	40
Çizelge 4.2. Topo-HBV klonlaması sonrası elde edilen değişik mutasyon paternleri	43
Çizelge 4.3. Patern A için fenotipleme deneyi sonuçları.....	57
Çizelge 4.4. Patern A için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi.....	57
Çizelge 4.5. Patern B için fenotipleme deneyi sonuçları	58
Çizelge 4.6. Patern B için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi	59
Çizelge 4.7. Patern C için fenotipleme deneyi sonuçları	59
Çizelge 4.8. Patern C için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi	60
Çizelge 4.9. Patern D için fenotipleme deneyi sonuçları.....	61
Çizelge 4.10. Patern D için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi.....	61
Çizelge 4.11. Patern E için fenotipleme deneyi sonuçları	62
Çizelge 4.12. Patern E için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi	63
Çizelge 4.13. Patern F için fenotipleme deneyi sonuçları.....	63
Çizelge 4.14. Patern F için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi.....	64
Çizelge 4.15. Patern G için fenotipleme deneyi sonuçları.....	65
Çizelge 4.16. Patern G için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi	65
Çizelge 4.17. Patern H için fenotipleme deneyi sonuçları.....	66
Çizelge 4.18. Patern H için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi.....	67
Çizelge 4.19. Yabancıl Tip için fenotipleme deneyi sonuçları.....	67
Çizelge 4.20. Yabancıl tip HBV fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi....	68
Çizelge 4.21. Hesaplanan IC50 değerleri.....	68
Çizelge 4.22. Hesaplanan misli direnç (FR) değerleri	69
Çizelge 5.1. Klonal analiz sırasında elde edilen klon sayıları	71

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
A	Alanin (Ala)
ADV	Adefovir Dipivoksil
ALT	Alanin amino transferaz
b.ç.	Baz çifti
cccDNA	Kovalent kapalı dairesel (covalently closed circular) DNA
CMV	Cyto Megalo Virüs
D	Aspartik acit (Asp)
ddH ₂ O	Çift distile su (double distilled water)
DHBV	Ördek Hepatit Virüsleri
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Direkt tekrar bölgesi (direct repeat)
EDTA	Etilen Diamin Tetra-Asetik asit
ENTE	Entecavir
FBS	Fetal Bovine Serum
FDA	Federal Drug Administration
FR	Misli Direnç (Fold Resistance)
FLLA	Fenilalanin-Lösin-Lösin-Alanin motifi
FLMA	Fenilalanin-Lösin-Metyonin-Alanin motifi
FR	Misli direnç (Fold Resistance)
FTC	Embtricitabine
g	Gram
GFP	Yeşil fuloresan protein (Green Flouresence Protein)
H	Histidine (His)
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBeAg	Hepatit B e antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü

HCC	Hepatoselüler karsinoma
HepG2	Hepatoblastoma hücre dizisi
Huh7	İnsan hepatoma 7 hücre hattı
I	İzolösin (Ile)
IFN- α	İnterferon alfa
IU	Enternasyonal ünite
kb	Kilo baz
kDa	Kilo dalton
L	Lösin (Leu)
LAM	L amivudine
M	Metiyonin (Met)
N	Asparagine (Asn)
mg	Miligram
MgCl ₂	Magnezyum klorür
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
N	Asparajin (Asn)
nm	Nano metre
ORF	Açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame)
PBS	Fosfat tuz tamponu
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki döngü sayısı (revolutions per minute)
RT-PCR	Real Time PCR
S	Serin (Ser)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
T	Treonin (Thr)
TAE	Tris asetik asit EDTA
TBE	Tris Borik asit EDTA

TDF	Tenofovir
TSR	“Template Suppression Reagent”
UV	Ultraviyole
V	Valin (Val)
YIDD	Tirozin-İzolösin-Aspartik Asit-Aspartik asit
YMDD	Tirozin-Metiyonin-Aspartat-Aspartat motifi
YSDD	Tirozin-Serin-Aspartik Asit-Aspartik asit
YVDD	Tirozin-Valin-Aspartik Asit-Aspartik asit
Y	Tirozin

1. GİRİŞ

Hepatit B Virüsü (HBV), karaciğeri enfekte eden çift zincirli bir DNA virüsüdür. HBV enfeksiyonları, siroz ve hepatoselüler karsinomaya (HCC) kadar giderek insan hayatını tehdit eden global bir sağlık problemidir. Dünya Sağlık Örgütü'nün (WHO) verilerine göre HBV, HIV virüsüne göre 50–100 kat daha bulaşıcıdır. Otuz yıldan fazla süredir HBV'ye karşı etkili bir aşının kullanılmasına rağmen, dünya üzerinde yaklaşık 2 milyar insan HBV ile enfekte olup yaklaşık 350 milyon insan kronik enfeksiyonla yaşamaktadır ve her yıl yaklaşık 600 bin insan Hepatit B enfeksiyonuna bağlı olarak gelişen akut/kronik hepatit, siroz ve karaciğer kanseri gibi hastalıklardan hayatını kaybetmektedir. (WHO, 2008).

HBV enfeksiyonlarının tedavisinde, immün düzenleyici özelliği olan İnterferon- α gibi sitokinler ve antiviral etkiye sahip Lamivudin, Adefovir Dipivoksil, Entecavir ve Tenofovir gibi nükleozit ve nükleotit analogları kullanılmaktadır. Kronik hepatit B tedavisinin uzun sürmesi nedeniyle tedavi sürecinde HBV genomunda seçilen antiviral direnç mutasyonları ise HBV enfeksiyon tedavisinin en temel problemidir. Bu yüzden direnç mutasyonu taşıyan mutant HBV'lerin tespiti ve bu mutantların günümüzde kullanılan antivallere karşı olan direnç profillerinin belirlenmesi, HBV enfeksiyonlu hastaların tedavisi açısından çok önemlidir.

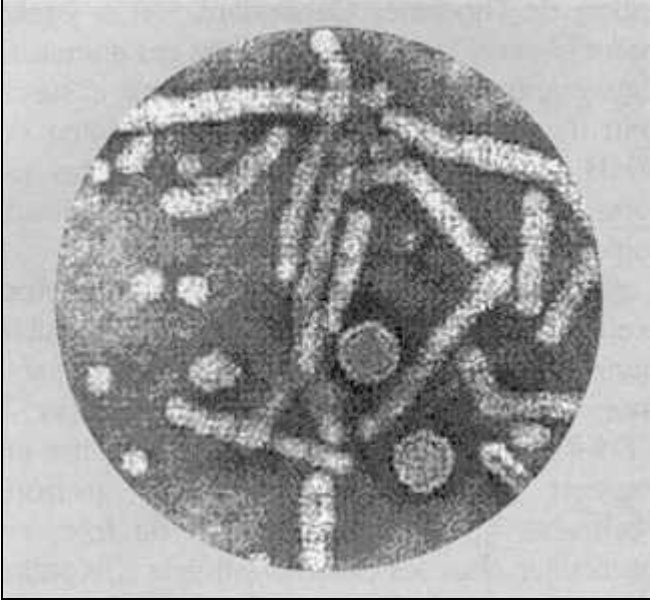
Bu tez ile 12 yıl boyunca tedavisinin çeşitli dönemlerde interferon- α , Lamivudin, Adefovir Dipivoksil ve Entecavir kullanmasına rağmen HBV enfeksiyonuna bağlı karaciğer yetmezliği ile hayatını kaybeden bir hastadan elde edilen dirençli HBV varyantlarının moleküler karakterizasyonu ve bu varyantların çeşitli antivirallere karşı olan direnç profillerinin çıkarılması amaçlanmıştır.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

2.1. Hepatit B Virüsünün Keşfi

Hepatit B virüsü, genomu ve kodladığı proteinleri tanımlanan ve karakterize edilen ilk insan hepatit virüsüdür. (Zuckerman and Thomas 1998). Birinci ve 2. dünya savaşları sırasında epidemiyolojik farklarına göre 2 çeşit hepatit tanımlanmıştır: Tip A, fekal-oral yol ile bulaş gösteren klasik enfeksiyöz hepatit idi (günümüzde viral hepatit A olarak isimlendirilmektedir) ve tip B ise serum hepatiti olarak adlandırılmıştı (günümüzde viral hepatit B olarak isimlendirilmiştir.) Daha sonraları 1967 yılındaki bir çalışmada bu iki tip hepatitin klinik, epidemiyolojik ve immünolojik olarak farkları ortaya konulmuştur (Krugman *et al.* 1967) ve 1973 yılında Hepatit A ve Hepatit B isimleri viral hepatitlerin sınıflandırılması açısından WHO tarafından kabul edilmiştir.

1964 yılında Blumberg ilk defa bilinmeyen bir antijeni, bir Avustralya Aborjini'nin kanında tespit etmiş (Blumberg 1964) ve daha sonraları yaptıkları çalışmalarda bu antijenin Hepatit B ile ilişkili olduğunu tanımlamış ve Avustralya Antijeni olarak isimlendirmişlerdir. (Blumberg *et al.* 1965, Blumberg *et al.* 1967). Takip eden yıllarda diğer araştırmacılar da Avustralya Antijeninin bir HBV serum belirteci olduğunu ve bu antijenin hastalarda uzun süreli bir persistansa sahip olduğunu göstermişlerdir. (Prince 1968; Gocke *et al.* 1969; Gocke and Kavey 1969; Zuckerman and Taylor 1969). 1970 yılında bir Hepatit B hastasının serumunda üzerinde Avustralya Antijenini taşıyan virüs benzeri partiküller ilk defa gösterildi ve Dane partikülleri adı verildi. (Dane *et al.* 1970). 1973 yılında ise Avustralya Antijeni'nin ismi Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak WHO tarafından değiştirildi. Aynı yıl HBsAg pozitif bir hasta serumundan elde edilen Dane partiküllerinde DNA polimeraz aktivitesi keşfedildi (Kaplan *et al.* 1973) ve takip eden yıllarda elektron mikroskopunun kullanılmasıyla birlikte Robinson, HBV'yi küçük, çift zincirli halkasal bir DNA virüsü olarak tanımladı. (Robinson *et al.* 1974; Robinson and Greenman 1974).



Şekil 2.1. HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü

Elektron mikroskop görüntüleri ile, HBV ile enfekte bir hastanın serumundan izole edilen örneklerde 42-47 nm çapında çift katmanlı “Dane partikülleri”nin yanı sıra, 20 nm çapında küre ve tübüler yapılarında bulunduğu 3 tip HBV partikülü gözlemlenmiştir (Şekil 2.1.). Bu partiküllerin hepsinin yüzeyinde Hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) olarak adlandırılan ortak bir antijenin dolaşımdaki yüksek titresinin HBV enfeksiyonlarının tanısında kullanılabileceği takip eden yıllarda keşfedilmiştir. (Hoofnagle 1981).

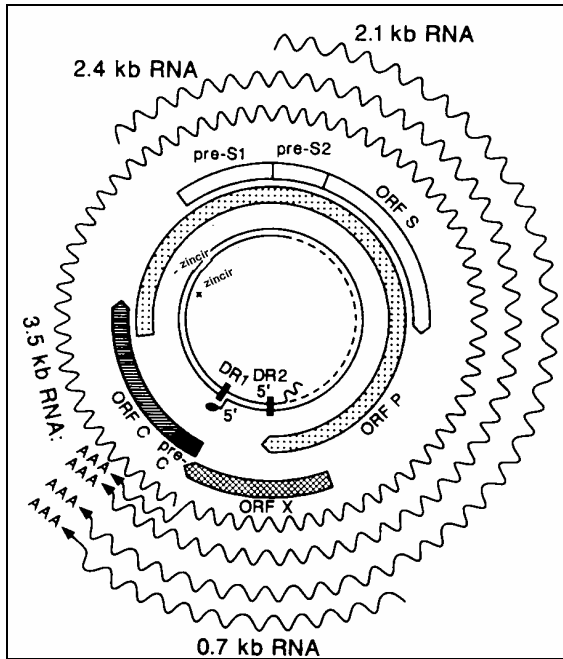
2.2. HBV Genom Yapısı

HBV yaklaşık 3.2 kb büyüklüğünde 1.6×10^4 büyüklüğünde bir moleküler ağırlığa sahip kısmi çift sarmallı sirküler bir DNA genomudur (Robinson and Clayton et al. 1974; Summers and O'Connell et al. 1975; Kidd-Ljunggren, Miyakawa et al. 2002). Virüsün en önemli özelliği tamamlanmamış eksikli bir yapıya sahip olmasıdır. Genomu, virüsün subtipine bağlı olarak 1700-2800 nükleotid uzunlukları arasında değişen pozitif zincirin yanı sıra, eksiksiz 3200 nükleotid uzunlukta bir negatif zincirden oluşmaktadır. Pozitif ve negatif zincirin 5' uçlarındaki komplementer baz eşleşmeleri genomun sirküler yapısının korunmasında rol oynar (Ganem 1991). Şekil 2.2'de gösterilen, her iki zincirin 5' uçlarında bulunan 11 nükleotit uzunluğundaki direkt tekrar (DR1 ve DR2) bölgeleri ise

ilgili DNA zincirinin sentezinde priming sırasında önemli role sahiptir (Seeger and Ganem 1986). Negatif zincirin 3' ucunda ise pozitif sarmalın kalıp değiştirme işlemi sırasında kısa zincirin tamamlanmasında ve süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklindeki DNA (cccDNA) molekülünün oluşumunda rol oynayan 9-10 nükleotitlik artık uç bulunur (Tiollais et al., 1985).

Genomunda kor (ORF C) , Polimeraz (ORF P), Yüzey (ORF S) ve X (ORF X) olmak üzere 4 adet açık okuma çerçevesi (ORF) içermektedir (Şekil 2.2.). Bu ORF'lerin genomda yerleşmesi ve düzenlenmesi oldukça karışık ve üst üste çakışmaktadır.

ORF P en uzun olan ORF olup ORF S'i tamamen kapsamaktadır. ORF S 3 farklı internal AUG başlangıç kodonu kullanarak farklı boylarda 3 adet proteini kodlar (Valenzuela et al. 1979). Küçük Hepatit B yüzey proteini HBV üzerinde en çok bulunan yüzey proteindir. Pre-S2 bölgesi orta büyüklükteki HBV yüzey proteinini üretirken, pre-S1 büyük HBV yüzey proteinini kodlar.

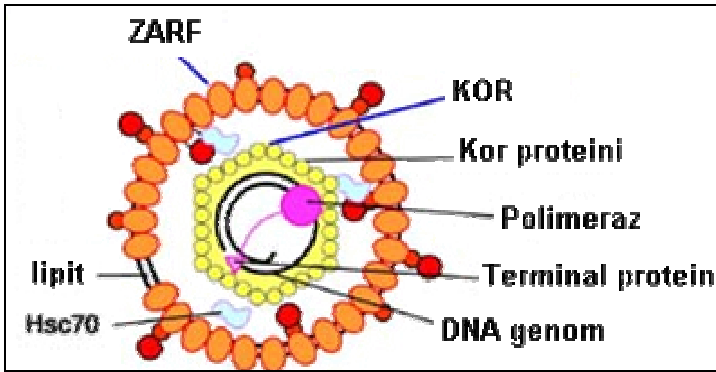


Şekil 2.2. HBV'nin genomik organizasyonu

ORF C, sırasıyla hepatit B e antijeni (HBeAg) ve hepatit B c antijenini (HBcAg) kodlayan prekor ve kor genlerini içerir. Prekor proteini 24 kD iken, internal bir AUG başlangıç kodonundan sentezi başlayan kor proteini 21 kD'dur. Prekor proteininin üzerinde daha sonra Golgi kompleksinde kesimlenip 16 kD büyüklüğündeki HBeAg proteininin kan

dolaşımına salımını sağlayan bir sinyal dizisi vardır (Takahashi et al. 1983). ORF P ters transkripsiyon aktivitesine sahip viral polimerazı üretirken, ORF X ise HBV'nin in vivo enfeksiyonunda gerekli HBV X proteinini (HBx) kodlar (Zoulim et al. 1994).

HBV enfeksiyonuna neden olan partiküller dane partikülleridir. HBV virion yapısını oluşturan dane partiküllerinin dış yüzeyi, viral yüzey proteinlerini de içeren lipoprotein bir zarftan oluşmaktadır (Şekil 2.3.). Bu kısım serolojik açıdan HBsAg olarak değerlendirilir. Zarfın hemen altında HBcAg olarak adlandırılan ve 20 kilo dalton'luk (kd) C proteininden meydana gelen kor partikülü bulunmaktadır (Argos and Fuller 1988; Budkowska et al. 1977). Korun iç kısmında ise viral genom yer almaktadır. Dane partiküllerinden daha küçük olan küresel (20 nm) ve tübüler yapılar ise nükleik asit içermedikleri için enfeksiyona neden olmazlar fakat yüzeylerinde HBsAg bulundurdukları için son derece immünojeniktirler (Argos and Fuller 1988; Gavilanes et al. 1982; Peterson 1981; Peterson 1987).

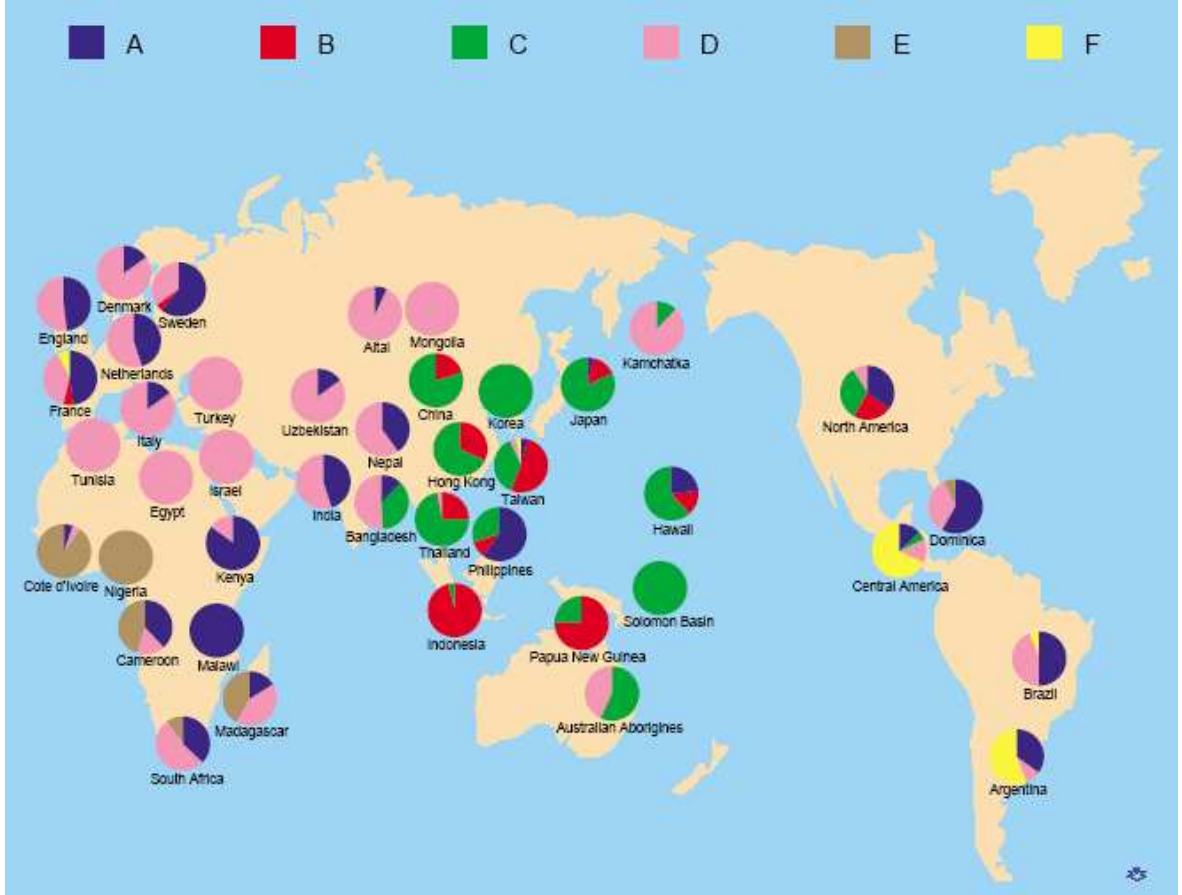


Şekil 2.3 Hepatit B virüsünün virion yapısı

2.3. HBV Genotipleri

Hepatit B virüsü genotipleri tüm genomda %8'den fazla dizi farklılıklarıyla karakterizedir ve ilk dört genotip, A-D ilk defa 1988 yılında izole edilmiş ve tanımlanmıştır (Okamoto et al. 1988). Genotip A sıklıkla kuzeybatı Avrupa, Afrika Sahara Çölü'nün güney kısımlarında, Hindistan'da ve Amerika'da görülmektedir. Genotip B ve C genellikle Güneydoğu Asya ve Okyanusya'da bulunurken, Genotip D Akdeniz bölgesinde, Orta Asyada ve Güney Amerikada pandemiktir (Miyakawa and Mizokami 2003) ve aynı zamanda ülkemizde de en sık rastlanan genotiptir. Başka bir araştırmacı 1994 yılında aynı kriterleri kullanarak E ve F olarak adlandırılan 2 farklı genotipi daha tanımlamıştır

(Norder et al. 1994). Genotip E batı Afrika ile sınırlıyken, genotip F'in en sık görüldüğü bölgeler orta ve güney Amerika'dır (Miyakawa and Mizokami 2003). İlk olarak 2002 yılında tanımlanan genotip G genellikle Fransa ve Amerika'da görülürken 2002 yılında tanımlanan genotip H orta Amerika'ya özgüdür (Stuyver et al. 2000; Arauz-Ruiz et al. 2002)

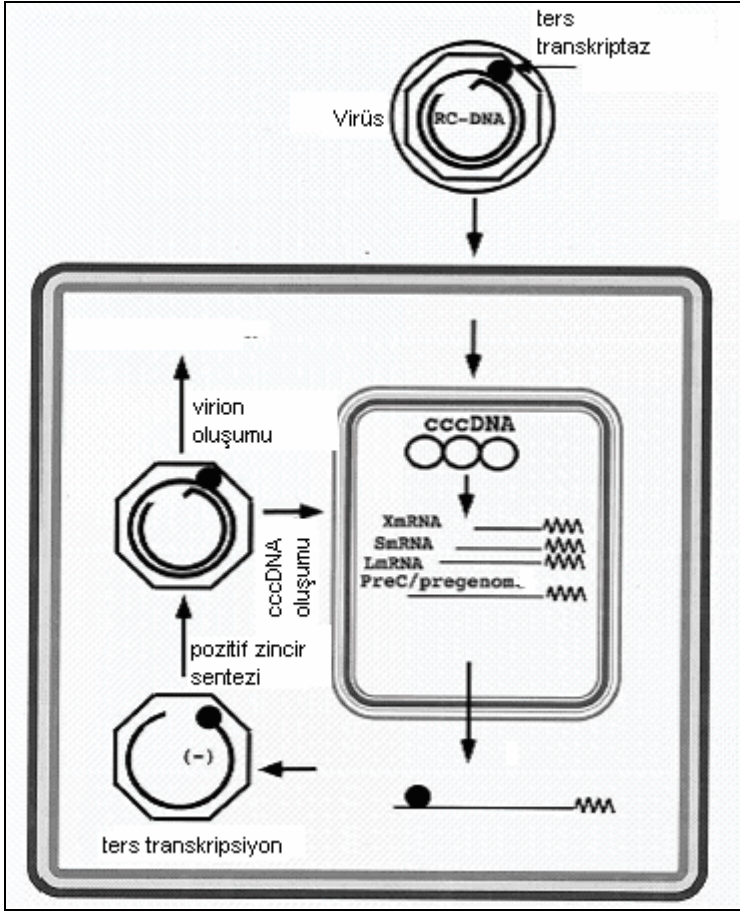


Şekil 2.4. HBV genotiplerinin dünya üzerindeki dağılımı.

Farklı HBV genotiplerinin orjinleri, dünyaya nasıl yayıldıkları ve evrilme mekanizmaları HBV enfeksiyonlarının anlaşılması ve tedaviye yön vermek açısından oldukça önemlidir (Jazayeri et al. 2010).

2.4. HBV Hayat Döngüsü ve Replikasyonu

Hepadnavirüslerin yaşam döngüsü, pregenom olarak adlandırılan ve bir ara (*intermediate*) RNA formunun ters transkripsiyonuyla yaklaşık 3 kb'lık bir kısmi çift zincirli sarmal (*relaxed circle*) rcDNA'nın sentezlenmesiyle karakterizedir (Şekil 2.5).



Şekil 2.5. HBV'nin yaşam siklusu

Konakçı hücrenin yüzey reseptörlerine bağlandıktan sonra viral partiküller zarftan kurtulur ve hücre membranından içeri girer (Machida et al. 1983; Franco et al. 1992; Hertogs et al. 1993; Mehdi et al. 1994). Sitoplazmik nükleokapsit partikülleri viral genomu hepatositlerin çekirdeğine iletir. Kısmi çift zincirli halkasal viral genom (rcDNA) hepatositlerin çekirdeğinde tamir edilerek 3.2 kb uzunlupunda kovalent olarak kapalı DNA (cccDNA) formuna ulaşır. cccDNA viral mRNA ve pregenomik RNA'nın (pgRNA) transkripsiyonunda kalıp olarak görev alır (Summers and Mason 1982). Viral mRNA'lar daha sonra sitoplazmaya transport edilir ve burada viral yüzey, kor, polimeraz ve X proteinlerine translasyonları gerçekleştirilir. pgRNA, viral DNA'nın negatif zincirini oluşturmak için, viral replikasyonun ilk basamağı olan ters transkripsiyon işlemi kalıp olarak görev alır (Summers and Mason 1982). Daha sonra negatif zinciri kalıp olarak kullanarak pozitif zincir sentezlenir ve oluşan çift iplikli sirküler genom ya çekirdekte bulunana cccDNA havuzuna geri döner ya da viral zarf proteinleriyle kaplanır. (Miller et

al 1994). Yeni oluşan viral partiküller daha sonra endoplazmik retikulum içerisine ve oradan da golgi cisimciğine gönderilerek kan dolaşımına tekrar salınır (Seeger et al. 1986, Will et al. 1987)

2.4.1 Hücre membranına tutunma

Virüs tarafından seçilen konakçı hücre tipinin tanımlanmasında virüslerin konakçı hücrelere bağlanması en kritik faktördür. HepG2 hücre kültür sistemleri kullanılarak, HBV Viral partiküllerinin konakçı hücreye preS1 aracılı bir bağlanma gerçekleştirdiği ve bu bağlanmanın preS1 antikorları ile bloke edilebildiği gösterilmiştir. (Neurath et al.1986; Pontisso et al. 1989). Buna ek olarak, preS1 bölgesi, mutagenез ve peptid haritalama çalışmalarında majör reseptör bağlanma bölgesi olarak tanımlanmıştır. (Paran et al. 2001; Barrera et al. 2005; Glebe et al. 2005). PreS1 bölgesinin bazı potansiyel reseptörleri glyceraldehye-3-phosphate-dehydrogenase (Petit et al. 1992), asialoglikoprotein reseptörü (Treichel et al.1994), ve heparan sülfat proteoglikan (Schulze, Gripon et al. 2007; Leistner et al. 2008) olarak rapor edilmiştir.

PreS2 de preS1 gibi HBV'nin konakçı hücreye bağlanmasında rol oynayabilir. PreS2'nin karaciğer plasma membranında bulunan polimerize insan serum albumini ile sıkı bir şekilde ilişkilendirildiği ve bu ilişkinin HBV'nin konakçı hücreye bağlanmasını artırdığı çalışmalar mevcuttur (Pontisso et al. 1989; Kondo, Shimomura et al. 2002).

PreS1 ve preS2'ye ek olarak, apolipoprotein H ve endoneksin II gibi proteinlerle kurdukları ilişkiler sayesinde küçük HBV yüzey proteinlerinin de bağlanmada rol oynayabileceğini gösteren bazı çalışmalar literatürde yerlerini almıştır (Hertogs, Leenders et al. 1993; Mehdi, Kaplan et al. 1994; Mehdi, Yang et al. 1996).

2.4.2 Viral penetrasyon

Hücre membranı ile direkt füzyon veya reseptör aracılı endositoz, hayvan virüslerinin viral penetrasyonda kullandığı iki temel mekanizmadır. İnsan asialoglikoprotein reseptörlerinin HBV'nin hepatik endositozunu (Treichel et al. 1997) ve HBV kor partiküllerinin kltrin aracılı endositoz ile hücre içine alınmasını gerçekleştirdiği gösterilmiştir (Cooper and Shaul 2006). Ayrıca HBV yüzey proteininde bulunan translokasyon motifinin reseptör aracılı endositoz ile gerçekleşen virüs internalizasyonu

ve viral enfektivite için gerekli olduğu çeşitli çalışmalarda rapor edilmiştir (Stoeckl et al. 2006; Blanchet and Sureau 2007; Lepere et al. 2007). Endositozdan sonra, viral partiküllerin zarfları uzaklaştırılır ve sitoplazmik viral kapsitler çekirdeğe transport edilir. HBV kor proteini HBV kapsitlerinin nükleusa transportunu karboksil ucunda bulunan nükleer lokalizasyon sinyali ile gerçekleştirir (Rabe et al. 2003).

2.4.3 Viral genomun tamiri

HBV replikasyonu pozitif zincirin tamir ile tamamlanmasını ve HBV cccDNA formunun oluşmasını gerektirir. Bu işlem için hücresel polimerazların görev yaptığı gösterilmiştir (Kock and Schlicht 1993). Viral genomun tamiri sırasında kovalent olarak bağlanmış viral polimeraz rcDNA'dan uzaklaştırılır (Gao and Hu 2007) ve proteinlerinden arındırılmış rcDNA cccDNA oluşumunda görev alır (Guo et al. 2007).

2.4.4 Transkripsiyon ve translasyon

cccDNA'nın viral mRNA'ye ve pgRNA'ya transkripsiyonu 4 adet bağımsız promotor ve 1 adet durdurma poliadenilasyon sinyali ile kontrol edilir. Transkripsiyon sonrasında birbirleriyle oldukça yüksek oranda çakışan 5 adet viral RNA ortaya çıkar (Şekil 2.2); 3.5 kb'lık pgRNA, 3.5 kb'lık prekor mRNA'sı, 2.4 kb'lık büyük yüzey proteini mRNA'sı, 2.1 kb'lık orta ve küçük yüzey proteini mRNA'sı ve 0.7 kb'lık X proteini mRNA'sı (Chisari 2000). Oluşan mRNA'ların sitoplazmaya transportundan sonra translasyon başlar.

2.4.5 Replikasyon

HBV kor proteinlerinin ve viral polimerazın translasyonundan sonra, bu proteinler pgRNA ve bazı protein kinazlar ile birleşerek viral kor partiküllerini oluşturur. HBV DNA polimerazın pgRNA ile birleşmesinden sonra viral genomun negatif zincirinin sentezi ters transkripsiyon ile gerçekleştirilir. Negatif zincirin uzaması sırasında oluşan DNA-RNA hibritindeki pgRNA, polimerazın RNaz H aktivitesi ile uzaklaştırılır (Radziwill et al. 1990). Fakat pgRNA'nın son kısmında bulunan nükleotitler RNaz H ile tamamen kesimlenemez ve 18 bazlık bir RNA kep oluşturulur. DR1 ve DR2'deki dizi homolojisi sayesinde DR1'in 5' ucundan DR2'ye bu RNA kepin translokasyonu

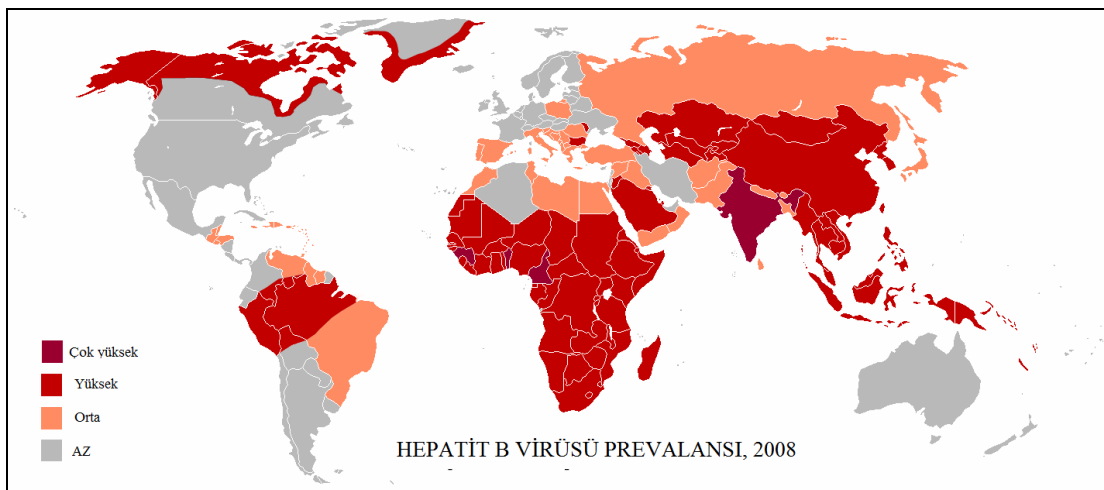
gerçekleştirilir ve bu kep pozitif zincirin sentezi için gerekli primeri meydana getirir (Seeger and Maragos 1990; Seeger and Maragos 1991). Pozitif zincirin sentezi erken sonlandırılır ve tamamen sentezlenmiş bir negatif zincir ile eksik bırakılmış bir pozitif zincirden meydana gelen rcDNA ortaya çıkar.

2.4.6 Virionların salınımı ve sirkülasyonu

Nükleokapsitler, ya yeni bir enfeksiyon döngüsü oluşturmak için konakçı hücrelerden dolaşıma salınır ya da çekirdeğe geri transport edilir (Şekil 2.5.). Sekresyon için nükleokapsitler HBV yüzey proteinleri ile kaplanır ve endoplazmik retikulumu, oradan da golgi kompleks aracılığıyla hücre membranına gönderilir (Ganem 1991, Bruss 2004). PreS1 bölgesinin karboksi ucu zarf oluşumu için gereklidir. (Bruss and Thomssen 1994, Gerelsaikhan et al. 1996). Geri dönüşüm yolağında ise nükleokapsitler çekirdeğe geri transport edilir ve rcDNA çekirdeki cccDNA havuzuna katkıda bulunmak üzere çekirdeğin içine bırakılır. İki yolak arasındaki denge sentezlenen HBV yüzey proteinlerinin verimli olarak kullanılması için büyük HBV yüzey proteini seviyesi ile kontrol edilir (Lenhoff and Summers 1994).

2.5. HBV Prevalansı

HBsAg taşıyıcılık düzeyleri göz önüne alınarak HBV'nin dünya üzerindeki prevalansı genel olarak 4 bölgeye ayrılabilir.



Şekil 2.6. HBV prevalansı

Dünya popülasyonu, prevalansı %2'den az olan bölgeler, %2-%8 arasında olan orta bölgeler, %8-%20 arasında olan yüksek prevalansa sahip bölgeler ve >%20'den büyük olan çok yüksek bölgeler olarak sınıflandırılabilir. Ülkemiz %7-8 civarındaki prevalansı ile orta endemik sınıfa girmektedir (Degertekin ve Kestellioglu 1986).

2.6. HBV Enfeksiyonu

Hepatit B virüsü enfeksiyonunun gidişi 4 faza ayrılabilir (Çizelge 2.1.). İlk faz genellikle çocuklarda ve genç yetişkinlerde görülen klinik semptomların olmayışı, minimal histolojik aktivite, yüksek HBV DNA ve normal ALT düzeyi ile karakterize immün toleran fazdır. Bu evrede herhangi bir tedavi önerilmemektedir.

Çizelge 2.1. HBV enfeksiyonunun fazları

Faz	ALT	Serum HBV DNA	HBeAg
İmmün tolerans	Normal	Yüksek	Pozitif
İmmün temizlenme	Yüksek	Yüksek-Düşük	Pozitif-negatif
İnaktif taşıyıcı	Normal	Düşük	Negatif
Reaktivasyon	Yüksek	Yüksek	Negatif

İkinci faz ise HBeAg'nin anti-HBe serokonversiyonuyla karakterize immün temizlenme fazıdır. Bu evrede HBV'nin immün temizlenmesi gerçekleşir ve enfekte hepatositlerin yıkılması serumda ALT seviyesinin yükselmesine neden olur. Bu evredeki hastaların yakından izlenmesi ve takip eden 3-6 ay içerisinde HBeAg serokonversiyonu gerçekleşmezse tedaviye başlanması gerekmektedir (Sheen et al. 1985). Üçüncü faz ise anti-HBe pozitifliği, normal ALT ve düşük HBV DNA düzeyleri ile karakterize inaktif taşıyıcılık durumudur. Bu durum viral replikasyonun konak immün sistemi tarafından zaten baskılanmış olması nedeniyle tedavi gerektirmez. Bazı hastalarda ise 4. faz olan, yüksek ALT ve HBV DNA düzeyleriyle karakterize HBV replikasyonunun reaktivasyonu gözlenir. HBeAg serumda saptanamaması nedeniyle bu faza HbeAg negatif kronik hepatit B de denilmektedir (Hadziyannis and Vassilopoulos 2001). Bu evredeki hastalara HBV replikasyonunun baskılanması için tedavi uygulanması gerekir. HBV replikasyonunun

tedavisi için günümüzde interferon alfa (IFN- α), lamivudin ve adefovir dipivoksil gibi 3 terapötik ajan kullanılmaktadır.

2.7. HBV Enfeksiyonunun Antiviral Tedavisi

Hepatit B virüsü enfeksiyonu dünyada yaklaşık 350 milyon insanı etkilemektedir (Lok et al. 2001). HBV enfeksiyonları tedavisinin temel hedefi ilaç direnç gelişimine neden olmadan viral replikasyonu viral maksimum seviyede baskılamak ve hastalığın karaciğer sirozuna ve HCC'ye ilerlemesini durdurmaktır (Lok and McMahon 2007, Ferri et al. 2010). Virüsün vücuttan tamamen eradikasyonu ise mümkün görünmemektedir. HBsAg serokonversiyonu ile HBV enfeksiyonundan kurtulan hastalarda bile, polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) gibi hassas yöntemlerle, kanda ve karaciğerde düşük seviyede HBV DNA tespit edilebilmektedir (Kuhns et al. 1992). Bu yüzden enfeksiyonların tedavisinde en son nokta HBsAg ve HbeAg antijenlerinin yok olması, serumdaki DNA miktarının ölçülemeyecek kadar düşük miktarlara baskılanması, alanin amino transferaz (ALT) düzeylerinin normalizasyonu ve karaciğer histolojisinde bir düzelme gösterilen HBV replikasyonunun baskılanmasıdır (Liang 2009).

Günümüzde kronik HBV enfeksiyonlarının tedavisinde 2 tip tedavi uygulanmaktadır. İnterferon- α (IFN- α) ve pegile interferon- α (peg IFN- α) antiviral, antiproliferatif ve immün düzenleyici görevi olan immünomodülatörlerdir. Lamivudine, adefovir dipivoksil, entecavir, telbuvidin, klevudin ve tenofovir gibi nükleoz(t)it analogları ise direkt olarak Viral polimerazı hedef alır ve replikasyonu inhibe eder (Lok and McMahon 2007, Ayoub and Keefe 2008).

2.7.1. İnterferon- α (IFN- α) ve pegile interferon- α

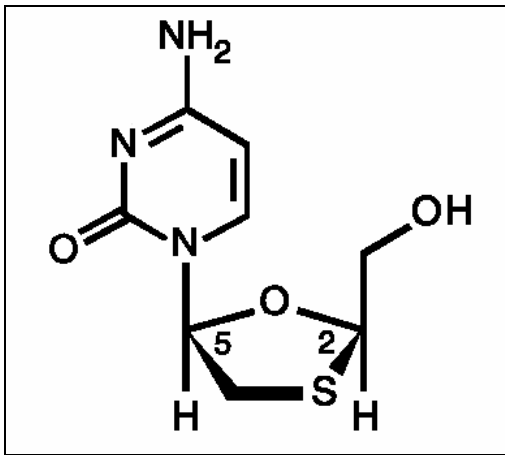
İnterferon- α , enfekte hepatositlerin hem CD8 sitotoksik T lenfositleri, hem de doğal öldürücü hücreler ile lizisini ve bu sayede HBV supresyonunu sağlayan kronik HBV enfeksiyonu tedavisinde kullanımı onaylanmış ilk ilaçtır (Davis and Hoofnagle 1986; Guidotti et al. 1996). IFN- α tedavisi alan hastalarda daha yüksek bir HBeAg serokonversiyonu (Korenman et al. 1991; Wong et al. 1993; Lau et al. 1997) ve daha düşük bir siroz ve HCC gelişimi riski rapor edilmiştir (Lin et al. 2007).

Interferon- α 'nın HBV replikasyonunu baskılayabilme özelliğine rağmen, interferonun uzun süreli yanıtı hastaların yalnızca %20-25'inde görülmektedir (Papatheodoridis et al. 2001). Bunun yanı sıra aynı çalışmada interferon- α 'nın tedavi alan hastalar üzerinde aynı oranda etkili olmadığı, hastaların yalnızca %30-40'ında HBV DNA ve HBeAg'nin kaybolduğu, tedavi edilebilen hastaların ancak %5-10'unda HBsAg kaybının olduğu daha önce rapor edilmiştir.

PegIFN- α ise IFN- α üzerinde lizin rezidülerine 20 kDa polyethylene glycol konjugasyonu ile pegilasyonu yoluyla üretilmiştir. (Lai et al. 2006). PegIFN- α 'nın yarı ömrü IFN- α 'ya göre daha uzundur bu yüzden daha uzun süreli virolojik yanıt elde edilmektedir (Hui and Lau 2005).

2.7.2. Lamivudine

Lamivudin 1998 yılında FDA tarafından onay alınan ilk sentetik L-nükleozit analogudur (Şekil 2.7.). Aktif trifosfatın uzayan zincire inkorporasyonu prematür zincir sonlanmasına neden olur ve bu sayede viral replikasyon baskılanır.



Şekil 2.7. Lamivudin yapısı

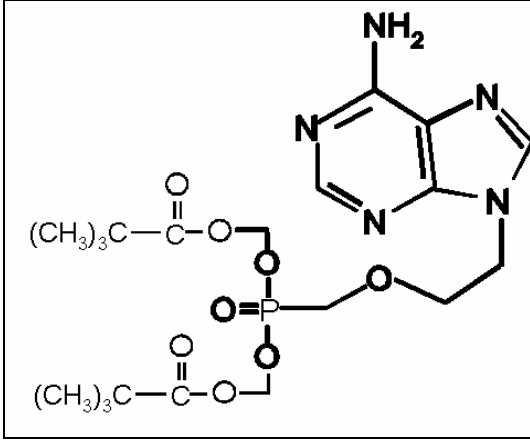
Lamivudine kullanımıyla kontrol grubuna göre daha yüksek oranda HBeAg serokonversiyonu ve ALT normalizasyonu, histolojik olarak daha iyi gelişmeler ve daha yüksek oranda HBV DNA baskılanması gözlenmiştir (Lai et al. 1998, Dienstag et al. 1999, Tassopoulos et al. 1999, Leung et al. 2001). Hızlı antiviral etkisine rağmen, viral genomda seçilen lamivudine direnç mutasyonları lamivudin tedavisinin en temel problemidir. antiviral tedavilerde hücre çekirdeğinde bulunan cccDNA HBV DNA'nın rezervi olarak görev yapar ve antiviral ajanlar cccDNA'yı elimine edemezler. Bu yüzden

tedavilerin uzun sürmesi kaçınılmazdır. Uzun süren tedavi sonucunda viral ters transkriptazın aktif bölgesinde mutasyonlar meydana gelebilir. Meydana gelen mutasyonlar sayesinde hastanın hepatositlerinde bulunan HBV virüs havuzunda genetik çeşitlilik (quasispecies) oluşmaktadır. Lamivudinin kullanılmasından sonra lamivudine dirençli mutasyonlara sahip virüsler seçilir ve bu yüzden hasta lamivudine yanıt vermeyebilir.

HBV viral ters transkriptazın katalitik olarak aktif olan bölgesinde evrimsel süreçte oldukça yüksek oranda korunmuş tirozin-metiyonin-aspartat-aspartat (YMDD) motifi bulunmaktadır. Daha önceki çalışmalarda, uzun süren lamivudin tedavisi sonrasında, ters transkriptazın YMDD motifi içerisinde bulunan 204. amino asiti olan metiyoninde mutasyon olduğu ve metiyoninin sırasıyla valin, izolösin ve serin ile yer değiştirdiği ve YVDD, YIDD, ve YSDD mutasyon paternlerinin ortaya çıktığı gösterilmiştir (Jardi et al. 1999; Melegari et al. 1998; Bozdayı et al. 2003). YMDD motifinin yanı sıra sıklıkla tespit edilen bir diğer mutasyon ise ters transkriptazın 180. amino asitinde ortaya çıkmaktadır. Ters transkriptazın FLLA motifi içerisinde 180. amino asit olan lösinin metiyonine dönüşmesiyle oluşan FLMA mutasyon paterninin de lamivudine direnç gösterdiği rapor edilmiştir. (Stuyver et al. 2000). Lamivudine direnç gösteren bir diğer mutasyon ise ters transkriptazın 173. amino asitinde rapor edilen V173L mutasyonudur (Delaney et al. 2002). Bir, 2, 3, 4 ve 5 yıllık lamivudin kullanımı sonrası lamivudin direnci insidansı sırasıyla %24, %42, %53, %67 ve %68 olarak belirtilmiştir (Lai et al. 2003; Lok et al. 2003).

2.7.3. Adefovir Dipivoksil

Adefovir FDA tarafından onay alınan ilk nükleotid analogudur. Asiklik deoksiadenozin monofosfat analogu olan adefovir, lamivudin gibi nükleozid analoglarının aksine, aktif formuna ulaşmak için gereken 3 fosforlanma basamağının ilkinde gerek duymaz (Şekil 2.8.).

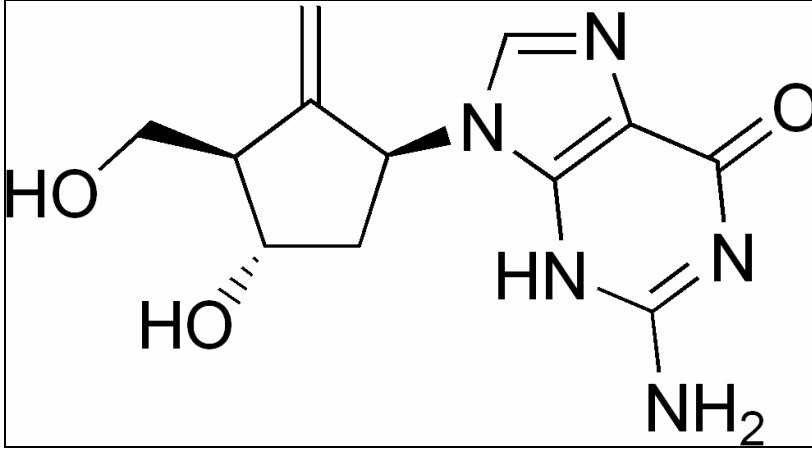


Şekil 2.8. Adefovir Dipivoksil yapısı

Adefovir tedavisinin HBV enfeksiyonu tedavisinde etkili bir şekilde kullanıldığı yapılan çalışmalarla da gösterilmiştir (Tsiang et al. 1999). Lamivudin dirençli virus varyantlarının rapor edilmesinden sonra adefovirin lamivudin dirençli virüs varyantları üzerinde de etkili bir antiviral olduğu gösterilmiştir (Xiong et al. 1998, Perillo et al. 2000, Benhamou et al. 2001, Lada et al. 2004). Fakat hepatit B virüsünde her geçen gün yeni mutant suşların oluşması, adefovire karşı dirençli mutant virüslerin ortaya çıkmasını sağlamıştır. Adefovir direnci lamivudine direncine göre çok daha yavaş ortaya çıkar. Adefovir için günümüze kadar tanımlanmış mutasyonlar ters transkriptazın 181. amino asitindeki A181V/T/S ve 236. amino asitindeki N236T mutasyonlarıdır (Angus et al. 2003, Qi et al. 2004, Hadziyannis et al. 2005, Karatayli et. al 2007).

2.7.4. Entecavir

Entecavir, HBV replikasyonunu başlangıç (priming), ters transkripsiyon ve HBV DNA pozitif zincir sentezi basamaklarında inhibe eden 2-deoxyguanosine'in karbosiklik analogudur (Şekil 2.9.) (Seifer et al. 1998).

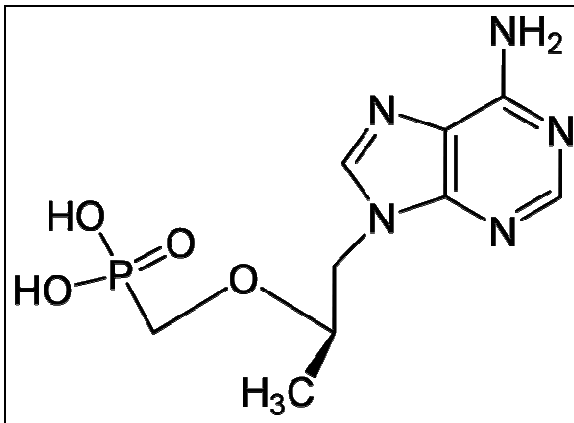


Şekil 2.9. Entecavir yapısı

Entecavir, adefovir dipivoksile göre daha potent bir antiviral aktiviteye sahiptir ve histolojik gelişme, ALT normalizasyonu ve viral yükteki azalma açısından lamivudine göre daha etkili olduğu gösterilmiştir (Chang et al. 2006, Lai et al. 2006). Entecavire direnç gelişimi adefovir ve lamivudine göre nispeten yavaştır (Tenney et al. 2009). Lamivudine ve entecavirin karşılaştırıldığı randomize bir çalışmada 48. hafta sonunda lamivudine direnci %64 iken, aynı haftada entecavir direncine rastlanmamıştır. (Park et al. 2009). Entecavir direncinin ortaya çıkması için L180M ve rtM204I/V lamivudine direnç mutasyonlarının üzerine rtI169, rtT184, rtS202, veya rtM250 mutasyonlarından en az birinin aynı HBV genomunda ortaya çıkması gerekmektedir (Tenney et al. 2004, Levine et al. 2004).

2.7.5. Tenofovir

Tenofovir yapısal olarak adefovire benzeyen bir nükleotit analogudur. (Şekil 2.10.)



Şekil 2.10. Tenofovir yapısı

rtA194T mutasyonu bir çalışmada tenofovir direnç mutasyonu olarak tanımlanmasına rağmen (Amini-Bavil-Olyaei et al. 2009), bu bulgu henüz diğer çalışmalar tarafından doğrulanmamıştır. Bu yüzden tenofovir, hastalarda adefovir ve lamivudine dirençli HBV varyantlarının ortaya çıkmasından sonra viral replikasyonunun baskılanması amacıyla kurtarma tedavisi olarak kullanılmaktadır (van Bommel et al. 2006). Ayrıca tenofovir monoterapi virolojik “breakthrough” geliştiren veya adefovire suboptimal cevap veren hastalarda etkili olarak kullanılmıştır (Tan et al. 2008).

2.8. HBV Enfeksiyonu Tedavisinde Çapraz Direnç

İlaç direnç gelişimi tamamen virüsün replikasyonuna bağlıdır. Bu yüzden konusunun uzmanları tarafından hazırlanan birçok sağlık kılavuzunda tedavinin ilk basamağı olarak en potent ve en hızlı etki eden ilacın tercih edilmesi önerilmektedir (EASL Guidelines, 2009, Beasley et al. 2010). Genotipik rezistans HBV ters transkriptaz bölgesinde meydana gelen bir amino asit değişiminin ilaç direncine neden olmasıdır. Bu mutasyonlar genellikle virolojik breakthrough yaşayan hastalarda saptandığı gibi virüs seviyeleri plato yapan yani sürekli yüksek virüs titresine sahip hastalarda da görülebilir (Ghany and Doo 2009). Hepatit B virüsünde sürekli meydana gelen mutasyonlar yeni antiviral bileşiklerinin geliştirilmesi çalışmalarını gündeme getirmektedir. Bunun yanı sıra tedavi sırasında birden çok antiviralin aynı anda veya kombinasyonlu olarak kullanılmaları da antiviral tedavide sıkça kullanılan bir yöntemdir. Fakat, hepatit B virüsünde sürekli ortaya çıkan mutasyonlar çapraz direnç olarak adlandırılan aynı anda birden çok antivirale direnç gösterebilen mutasyon paterni taşıyan virüslerin ortaya çıkmasını sağlamıştır (Delaney ve ark., 2001). Örneğin 2007 yılında yapılan bir çalışmada lamivudine dirençli bir hastada yeni bir direnç mutasyonu saptanmış ve bu mutasyonun hastada adefovir direncine de neden olan çapraz direnç mutasyonu olduğu belirlenmiştir (Karataylı et al. 2007).

2.9. Hepatit B Virüsü Araştırmalarında Kullanılan *in vitro* Sistemler

Hepatit B virüsü karaciğeri enfekte eden bir virüstür. Karaciğerdeki değişik hücre tipleri arasından hepatositler günümüze kadar hepadnavirüslerin viral replikasyonunun gerçekleştirildiğinin gösterildiği tek hücredir (Seeger and Mason 2000). Hepatit B virüs

enfeksiyonlarının araştırılmasında ve etkili antiviral ajanların keşfinde kullanılacak kullanışlı *in-vitro* sistemlerin bulunmayışı antiviral araştırmadaki en önemli sorundur. Bu nedenle, HBV enfeksiyonunda birincil hedef olmalarından dolayı hepatoblastoma hücre dizileri HepG2 (Bchini et al. 1990) ve Huh7 (Yaginuma et al. 1987) *in vitro* sistemlerin geliştirilmesinde kullanılmaktadır.

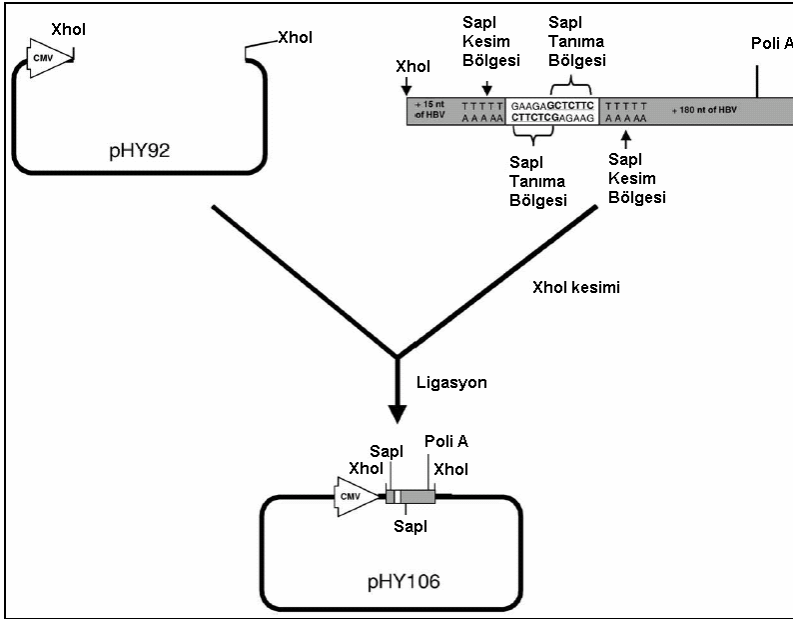
HepG2 hücre dizilerine plazmid HBV genomunu taşıyan tetrasiklin cevaplı bir plazmid ile neomisin direnç genini taşıyan düzenleyici bir plazmitin beraber stabil transfeksiyonu ile HepAD38 hücre dizileri oluşturulmuştur (Fallows and Goff 1995). Bu hücre dizilerinin en büyük avantajı HBV'nin *in vitro* replikasyonunun tetrasiklin kontrollü bir promotor tarafından düzenlenmesidir. Böylece araştırmacı, deney düzeneğine göre HBV replikasyonunu baskılayıp tetikleyebilir. İnsan hepatoblastoma hücrelerinden elde edilen ve *in vitro* ortamda sürekli HBV replikasyonu gerçekleştiren bir diğer hücre hattı Hep 2.2.15 hücre dizisidir. HBV genomu Hep 2.2.15 hücrelerinin genomuna entegre olduğundan replikasyonun kontrolü söz konusu değildir. HBV ile stabil transfeksiyonu yapılmış HepAD38 ve Hep 2.2.15 hücre dizileri HBV replikasyonunun *in vitro* çalışmalarında en çok kullanılan hücre dizileri olmasına rağmen taşıdıkları HBV DNA dizileri yeni gelişen ve gelişebilecek mutasyon paternlerini taşımadığı için yeni mutasyonların ilaç duyarlılık testlerinin (*drug susceptibility tests*) yapılmasında kullanılamazlar. İlaç duyarlılık testleri, Huh7 ve HepG2 gibi HBV enfeksiyonu taşımayan hücre hatlarına, direnç mutasyonunu taşıyan HBV genomunun geçici transfeksiyonu ile gerçekleştirilir.

2.10. İlaç duyarlılık testleri

İlaç duyarlılık testlerinin amacı gelişen yeni mutasyonların antiviral ajanlara karşı olası dirençlerini test etmektir. Direnç mutasyonlarını taşıyan HBV genomlarının insan hepatoblastoma hücrelerine geçici transfeksiyonu sağlanır ve takiben test edilecek antiviralin değişik konsantrasyonları kültür ortamına eklenir. Test edilen antiviral ajanın mutasyon paterni üzerine potansiyel etkisi, RT-PZR (Real Time PCR) gibi çeşitli metotlardan yararlanılarak HBV replikasyonundaki baskılanmanın izlenmesi sonucu belirlenir. Fenotipleme çalışmaları olarak bilinen bu yöntemle gelişmiş mutasyon paternleri test edilebileceği gibi yeni oluşan mutasyonların antivirallere olası etkileri de

araştırılabilir. İlaç duyarlılık testlerinin uygulanmasındaki en zor basamak mutasyon paternini taşıyan HBV'nin hepatoblastoma hücre dizilerine transfeksiyonlarından sonra HBV replikasyonunun gerçekleştirilmesidir. *In vitro*'daki ekspresyon çalışmalarında ekspresyonu yapılacak olan gen uygun bir ekspresyon vektörüne klonlanır. Hepatit B virüsünde diğer hayvan virüslerinden farklı olarak gen bölgelerinin çakışmış olmasından dolayı uygun açık okuma çerçevesine gelecek şekilde ekspresyon vektörlerine klonlamak kolay olmamaktadır. Literatürde, sadece HBV ekspresyonu için uygun ekspresyon vektörlerinin geliştirildiği çeşitli çalışmalar vardır (Durantel et al. 2004, Fu and Cheng 2000, Yang et al. 2004).

Bu çalışmalardan birinde, CMV promotorunun ve 1.1 X ünite-boyunda replikasyon kompetent bir HBV genomunun pBluscript K(+) vektörüne rekombinant DNA teknolojisi teknikleri kullanılarak klonlanmasıyla pHY92 vektörü oluşturulmuştur (Yang et al. 2004). Daha sonra bu vektörden, HBV ekspresyonu için uygun şekilde yerleştirilmiş hepatit B virüsü genom parçaları, poli A kuyruğu ve klonlama bölgesinde ard arda 2 SapI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi içeren pHY106 ekspresyon vektörü üretilmiştir (Şekil 2.11).



Şekil 2.11. pHY106 ekspresyon vektörünün üretilmesi

Yapılan bir çalışmada Hepatit B virüsünün 3,2 kb'lik tüm genomunun PZR ile çoğaltılması amacıyla P1 ve P2 isimli içlerinde SapI restriksiyon endonükleaz kesim

bölgesi bulunan primerler tasarlanmıştır (Gunther ve ark.,1995). Bu yöntemdeki SapI kesim bölgelerinin 2 önemi vardır. Birincisi, bu primerlerle çoğaltılan HBV tüm genom ürünlerinin SapI restriksiyon endonükleaz kesimi kullanılarak aynı kesim bölgelerini içeren pHY106 ekspresyon vektörüne klonlanmasına izin verir. İkincisi ise, HBV tüm genomunun içerisinde sapI restriksiyon endonükleaz kesim bölgesi bulunmadığı için enzim kesimi sonucunda HBV tüm genomuna zarar vermeden genomun uçlarında, takip eden klonlama çalışmalarında kullanılacak SapI kesim bölgeleri oluşturulabilir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3.1. Materyal

3.1.1. Hasta serumu

1997 Yılında IFN- α ile HBV enfeksiyonu tedavisine başlanılan hastada yaklaşık 1 yıllık IFN- α tedavisi sonrası viral yükte bir baskılanma olmayınca lamivudine tedavisine geçilmiş. Hastanın klinik seyri Çizelge 3.1 ve Şekil 3.1’de gösterilmiştir.

Çizelge 3.1. Hastanın Klinik Seyri

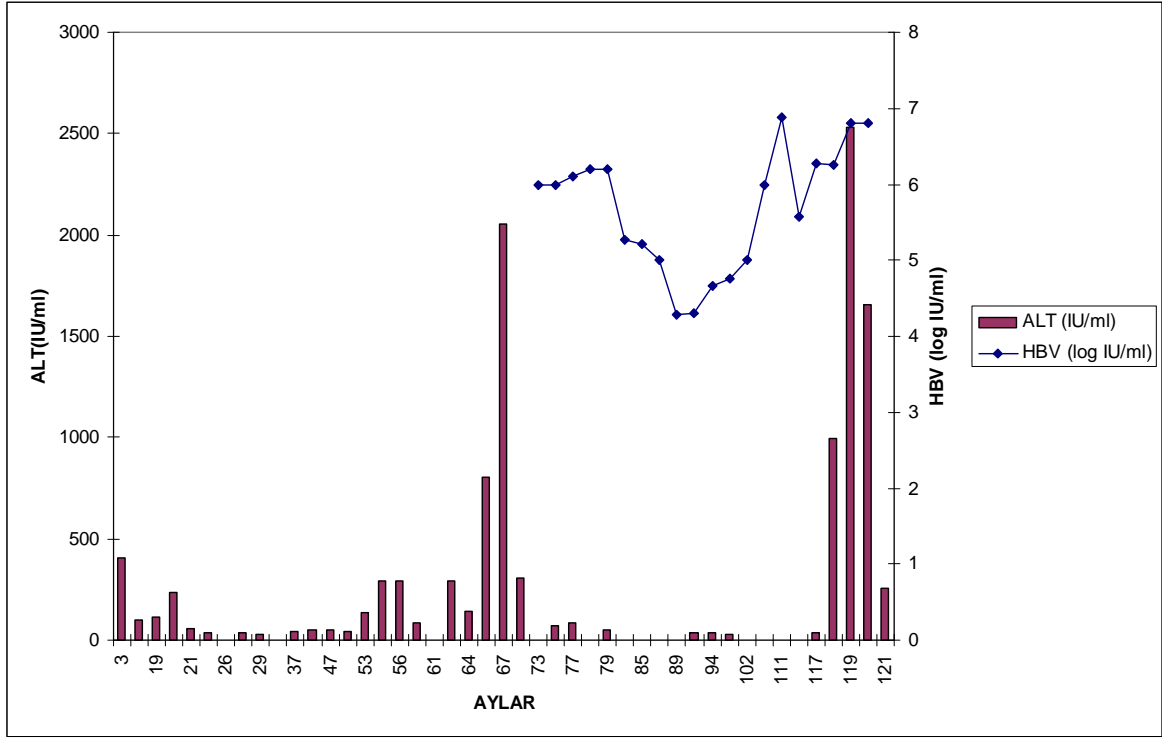
TARİH	AST/ALT	HBV DNA	TEDAVİ
1996		Negatif	
26.3.1997	145 / 402	7 pg/ml	IFN (haftada 3 gün 6 ay boyunca)
14.1.1998	74/103	-	IFN 9 milyon ünite
9.6.1998	61/114	284 pg/ml	IFN 9 milyon ünite
8.7.1998	116/232	-	IFN 9 milyon ünite
13.8.1998	47/60	-	Lamivudine 2X
16.11.1998	28/34	0	Lamivudine 2X
10.2.1999	27/35	-	Lamivudine 2X
6.4.1999	20/30	0	Lamivudine 2X
23.7.1999	-	0	Lamivudine 2X
12.7.2000	28/47		Lamivudine 2X
1.10.2001	25/51	-	Lamivudine 3. yıl sonunda kesilmiş
1.11.2001	21/43	-	İlaçsız takip
5.4.2002	52/134	0 (SIFIR)	İlaçsız takip
10.6.2002	115/290	630 pg/mL	İlaçsız takip
22.7.2002	103/295	-	Lamivudine 2X
12.08.2002	43/87	0 (SIFIR)	Lamivudine 2X
16.12.2002	-	1006 pg/mL	Lamivudine 2X
16.1.2003	104/295	0 (SIFIR)	Lamivudine 2X

Cizelge 3.1 Devamı. Hastanın Klinik Seyri

TARİH	AST/ALT	HBV DNA	TEDAVİ
24.3.2003	49/143	7,5 pg/mL	Lamivudine 2X
1.5.2003	897/800	-	Lamivudine 2X
9.6.2003	-/2058	800 pg/mL	Lamivudine 2X
24.9.2003	206/309	9367 pg/mL	Lamivudine 2X
6.07.2004	82/88	-	Adefovir tedavisi başlangıcı
29.09.2004	46/50	1,6 x 10 ⁶ kopya /ml	Adefovir
30.12.2004	-	1,8 x 10 ⁵ kopya /ml	Adefovir
3.3.2005		1,6 x 10 ⁵ kopya /ml	Adefovir*
2.6.2005	35/35	1.9 x 10 ⁴ kopya /ml	Adefovir*
30.11.2005	35/33	4.6 x 10 ⁴ kopya /ml	Adefovir*
28.07.2006		1 x 10 ⁵ kopya /ml	Adefovir*
06/04/2007	-	7,6 x 10 ⁶ kopya /ml	Entecavir 1X1 başlıyor
6.11.2007	23 /32	1.9 x 10 ⁶ kopya /ml	Entecavir*
3.12.2007	-	1.8 x 10 ⁶ kopya /ml	Entecavir
25.12.2007	756/995	-	Entecavir
31 .12.2007	2066/2531	-	Entecavir 1x1 + Adefovir 1x1
03.01.2008	2530 /2620	-	Adefovir + Entekavir.
04.01.2008	1122 / 1658	6.3 x 10 ⁶ kopya /ml	Adefovir + Entekavir.*

* Hastanın sadece Gri ile işaretlenmiş tarihlerdeki serumlarına ulaşılabilmektedir.

Uzun süren lamivudine tedavisi sonrasında 2003 yılında bir biyokimyasal ve virolojik “breakthrough” meydana gelmiş (Şekil 3.1’de 67. Ay) ve lamivudine tedavisi kesilip defovir dipivoksil tedavisine başlanmıştır. Bu tarihten sonra biyokimyasal açıdan ALT normal seyirlerine inmesine rağmen HBV viral yük hiçbir zaman tam olarak baskılanamamıştır. Sensitivitesi yüksek Real-Time PCR sistemleri geliştirilmeden önce HBV DNA viral yük miktarı sıvı hibridizasyon testleri ile pg/ml birimiyle ölçülüyordu ve bu testlerin en düşük tespit değeri 10⁶ kopya/ml’ye karşılık gelmekteydi. Bu yüzden Şekil 3.1.’de hastalığın ilk yıllarındaki viral yük gösterilmemiştir.



Şekil 3.1. Hastanın biyokimyasal ve virolojik seyri

3.1.2. Kimyasallar

Agaroz	Quantum Biotechnologies, ABD
Borik Asit	Merck, Frankfurt, Almanya
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Mutlak Etanol	Dateks, Türkiye
Proteinaz K	Sigma, Almanya
SDS	Sigma, Almanya
Tris HCl	Sigma, Almanya
Ksilen Siyanol	Sigma, Almanya
dNTP'ler	Dateks, Türkiye
Fikol	Biochrom, Almanya
DMEM	İnvitrogen, ABD

PBS	Biochrom, Almanya
Tripsin-EDTA	İnvitrogen, ABD
Opti-MEM	İnvitrogen, ABD
DMSO	Applichem, Almanya
Penisilin-streptomisin	İnvitrogen, ABD
L-glutamin	İnvitrogen, ABD
FBS	İnvitrogen, ABD
Gliserol	Sigma, ABD
Ampisilin	Dateks, Türkiye
Kanamisin	Dateks, Türkiye

3.1.3. Enzimler

SapI restriksiyon endonükleaz	New England Biolaps, Beverly, ABD
Alkalin Fosfataz (CIP)	New England Biolaps, Beverly, ABD
Hızlı Ligaz (Quick Ligase)	New England Biolaps, Beverly, ABD
“High Fidelity”Taq DNA polimeraz	Roche, Mannheim, Almanya
Taq DNA polimeraz	Fermantaz, Türkiye

3.1.4. Standart tampon ve çözeltiler

Çalışmada kullanılan tampon ve çözeltiler Çizelge 3.2.'de gösterilmiştir.

Çizelge 3.2. Çalışmamızda kullanılan çözelti ve tamponların içerikleri

Standart Tampon ve Çözelti	İçerik
TBE tamponu (10X) (1l)	108 g Tris HCl (0,9 M), 55 g borik asit (0,9 M), 20 ml 0,5 M EDTA pH 8), ddH ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlandı.
TAE tamponu (5X) (1l)	24,2 g Tris-Baz, 5,7 ml Asetik asit, 10 ml 0,5M EDTA (pH 8), ddH ₂ O ile 1000 ml'ye tamamlandı.
Agaroz Jel Yükleme Tamponu (6X)	%15 fikol, %0,05 bromofenol mavisi, %0,05 ksilen siyanol
Huh7 büyütme ortamı	500 ml DMEM, 50 ml FBS, 10 ml penisilin-streptomisin (5000 ünite/ml) ve 5 ml L-glutamin (200mM)
Antibiyotikli sıvı bakteri büyütme besiyeri	1 l ddH ₂ O içerisinde 25 g LB tozu çözüldü, antibiyotik (kanamisin veya ampisilin 50µg/ml olacak şekilde eklendi.
Antibiyotikli katı bakteri büyütme besiyeri	1 l ddH ₂ O içerisinde 25 g LB tozu çözüldü, 15g/ml agar-noble eklendi, otoklavlandı, tabaklara 15'er ml dökülüp oda sıcaklığına kadar soğutuldu.

3.1.5. Primerler

Çalışmada kullanılan primerler Çizelge 3.3.'te gösterilmiştir.

Çizelge 3.3. Kullanılan primerler

Primerler	DNA Dizisi (5' → 3')	Referans
HBVP1	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA	Günther et al. 1995
HBVP2	CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG	Günther et al. 1995
HBV (676-699):	TTT ACT AGT GCC ATT TGT TCA GTG	Günther et al. 1995
HBV (66-90):	GCT CCA GTT CAG GAA CAG TAAACC C	Günther et al. 1995
HBV (2796-2826):	CAC CTG CAG CCT CAT TTT GTG GGT CACCATA	Günther et al. 1995
HBV (2357-2380)	GGC AGG TCC CCT AGA AGA AGA ACT	Günther et al. 1995
HBV (2432-2408):	ATT GAG ATC TTC TGC GAC GCG GCG A	Günther et al. 1995
HBVCP11	GAC CTT GAG GCA TAT TTC AAA GAC	Kendi tasarımıımız
HBVCP13	CTG AGT GCT GTA TGG TGA GGT GA	Kendi tasarımıımız
M13 revers primer	CAG GAA ACA GCT ATG AC	-

3.2. Yöntem

3.2.1. Hasta serumundan viral DNA ekstraksiyonu

Serumdan HBV DNA izolasyonu üretici firmanın “High Pure Viral Nucleic Acid” (Roche, Indianapolis, USA) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek yapıldı:

- 200 µl serum örneği, 200 µl poli A içeren bağlama tamponu (binding buffer) ve 50 µl proteinaz K bir ependorf tüpüne koyulur.
- İyiye karıştırılır ve 10 dakika 72°C’de inkübasyona bırakılır
- İnkübasyon sonrası 100 µl bağlama tamponu daha eklenir.
- Karışım karıştırılarak toplama tüpüne (high pure collection tube) aktarılır.
- 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (inhibitor removal buffer) eklenir.
- 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve 450 µl yıkama tamponu eklenir.
- 7 ve 8. basamaklar 2 kez tekrarlanır.
- 10 saniye maksimum hızda santrifüj edilir.
- Kolon 1,5 ml’lik steril bir ependorf tüpüne aktarılır ve 50 µl elüsyon tamponu eklenir.
- 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elüe edilir.

3.2.2. HBV polimeraz bölgesinin PZR ile çoğaltılması

Serumdan elde edilen HBV DNA’nın tüm genomunun PZR ile çoğaltılması, reaksiyon karışımı 0,2 ml’lik tüplerde (Greiner Bioone, Avusturya) hazırlanmasıyla, “Eppendorf Mastercycler Personal” cihazında yapıldı.

Reaksiyon Karışımı

P1	0,3 µM
P2	0,3 µM

KCl	50 mM
Tris-HCl (pH 8.3)	0.350 mM
MgCl ₂	1.5 mM
dNTP	200 µM
Taq DNA polimeraz	5 U
ddH ₂ O	X* µl

* X: Toplam hacmi 50 µl'ye tamamlayacak kadar.

Reaksiyon Şartları:

94°C	5 dk	} 40 siklus
94°C	40 sn	
60°C	1.5 dk.	
68°C	3 dk. *	

* Uzama (*extension*) bölümünde her 10 siklustan sonra süre 2 dakika artırılarak yapıldı.

3.2.3. HBV tüm genom amplifikasyonlarının Topo-XL vektörlerine klonlanması

PZR sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri Topo-XL vektörüne, üretici firmanın “Topo-XL PCR Cloning” (Invitrogen, California, USA) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek klonlandı.

3.2.3.1. PZR ürünlerinin pürifikasyonu

Elde edilen PZR ürünleri %0.8'lik agaroz jele yüklenerek, jelin yürütülmesinden sonra jel ekstaksiyonu yapıldı

3.2.3.2. Jelin hazırlanması ve DNA'nın jele yüklenmesi

- 0,4 g agaroz 50 ml 1X TAE tamponuyla karıştırılır.
- Mikrodalga fırında agaroz eriyene kadar ısıtılır.
- Fırından çıkarılır ve 3 dakika soğuması için beklenir
- 30 µl kristal violet boyası eklenir ve karıştırılır.
- Tarak jel tabağına yerleştirilir ve jel dökülür.

- Jel donduğunda tarak çıkarılır ve üzerini kaplayacak kadar 1X TAE tamponu eklenir.
- 40 µl PZR amplifikasyon ürününü 8 µl 6X kristal violet yükleme tamponu ile karıştırılır ve jeldeki kuyucuklara yüklenir.
- 80 voltta 1-2 saat kadar yürütülür.
- Beyaz ışık altında jelde bulunan DNA bantları görüntülenir

3.2.3.3. *PZR ürününün jelden ekstraksiyonu*

- İstenilen bant bistürü yardımıyla jelden kesilip çıkarılır.
- Çıkarılan parça küçük parçacıklara bölünerek 1,5 ml'lik bir ependorf tüpüne konulur.
- Üzerine jelin hacminin (1mg yaklaşık 1 µl gelmektedir.) 2,5 katı kadar 6,6 M Sodyum iyodür solüsyonu eklenir ve vortekslenir.
- 50°C'de jel tamamen eriyene kadar inkübasyona bırakılır.
- Oda sıcaklığında toplam hacmin 1,5 katı kadar bağlama tamponu (binding buffer) eklenir ve vortekslenir.
- Elde edilen karışım SNAP pürifikasyon kolonuna yüklenir.
- Oda sıcaklığında 2000-3000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir.
- Altta kalan sıvı atılır ve SNAP pürifikasyon kolonuna 400 µl 1X yıkama solüsyonu eklenir.
- Oda sıcaklığında 2000-3000 rpm'de 30 saniye santrifüj edilir.
- Altta kalan sıvı atılır ve SNAP pürifikasyon kolonuna 800 µl 1X yıkama solüsyonu eklenir.
- Altta kalan sıvı atılır ve SNAP pürifikasyon kolonu boş olarak maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilir.
- 40 µl Tris-EDTA (TE) tamponu filtrenin tam ortasına gelecek şekilde pipetlenir ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- Oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj yapılarak DNA elüe edilir.

3.2.3.4. *Topo klonlama reaksiyonunun hazırlanması*

- Jelden pürifikasyonu yapılan PZR ürününden 4 µl ve kanamisin direnç geni taşıyan pCR-XL-TOPO vektöründen 1 µl, 1,5 ml'lik steril bir ependorf tüpünde karıştırılır.
- 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası 1 µl 6X TOPO Cloning Stop solüsyonu eklenir ve oda sıcaklığında karıştırılır.
- Tüpün çeperlerindeki sıvının aşağı çökmesi için hafifçe santrifüj edilir ve tüp buz üzerine koyulur.

3.2.3.5. *Transformasyon*

- Klonlama reaksiyon ürününden 2 µl'yi "One Shot Competent" hücrelere eklenir ve dikkatlice karıştırılır.
- Buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası 42°C'de 30 saniye ısı şoku yapılır.
- 30 saniye sonrasında tüp hemen buz üzerine konulur ve 2 dakika inkübasyona bırakılır.
- Hücrelerin üzerine 250 µl S.O.C medyumunu eklenir.
- 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakılır.
- Daha önceden hazırlanmış 50 µg/ml kanamisin içeren katı LB besiyerine 50-150 µl hücre yayılır.
- 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakılır.

3.2.3.6. *Topo klonlaması sonrası klonların nalizi*

- Büyüyen koloniler steril bir kürdan yardımıyla kanamisin içeren 2 ml sıvı LB besiyerine aktarılır.
- 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılır.

3.2.3.7. *Plazmid DNA ekstraksiyonu*

Topo klonlaması sonucu elde edilen kolonilerin plazmid DNA ekstraksiyonu, üretici firmanın “Plazmid DNA Purification” (MACHEREY-NAGEL, Almanya) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek yapıldı.

- 37°C’de bir gece büyütülen kolonilerin 50 µl’si, pozitif klonların tekrar büyütülüp sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi amacıyla dondurularak saklanmak üzere ayrı ayrı tüplere üzere ayrılır.
- Kalan hücreler 30 saniye 11000 rpm’de santrifüj edilerek çöktürülür ve üstte kalan besiyeri atılır.
- Hücreler 250 µl RNaz içeren A1 tamponu ile tekrar süspanse edilir.
- 250 µl A2 tamponu eklenir iyice karıştırılır ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- 300 µl A3 tamponu eklenir, karıştırılır ve 11000 rpm’de 10 dakika santrifüj edilir.
- Santrifüj sonrası pellet atılır ve süpernatant NucleoSpin kolonuna aktarılır.
- 11000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve 600 µl A4 yıkama tamponu eklenir.
- 11000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve 11000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir.
- Kolon 1,5 ml’lik steril bir ependorf tüpüne konulur ve üzerine 50 µl AE elüsyon tamponu eklenir.
- Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılır ve 11000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek plazmid DNA elüsyonu yapılır.

3.2.3.8. *Elde edilen plazmidlerin jelde görüntülenmesi ve analizi*

- 5 g agaroz 50 ml 1X TBE tamponuyla karıştırılır.
- Mikrodalga fırında agaroz eriyene kadar ısıtılır.
- Fırından çıkarılır ve 3 dakika soğuması için beklenir
- 1 damla etidyum bromür boyası eklenir ve karıştırılır.
- Tarak jel tabağına yerleştirilir ve jel dökülür.

- Jel donduğunda tarak çıkarılır ve üzerini kaplayacak kadar 1X TBE tamponu eklenir.
- 5µl plazmid DNA 1µl 6X kristal violet yükleme tamponu ile karıştırılır ve jeldeki kuyucuklara yüklenir.
- 100 voltta 1 saat kadar yürütülür.
- UV ışığı altında DNA bantı görüntülenir.
- Uygun boydaki (vector+HBV genomu, yaklaşık 7 kb) plazmid DNA'sına sahip pozitif koloniler jelde tespit edilir.

3.2.3.9. Pozitif kolonilerin dondurulması ve saklanması

- Jelde uygun boyda plazmid DNA'sı tespit edilen kolonilerden daha önce ayrılan 50 µl hücre süspansiyonu 1,75 ml kanamisin içeren LB medyumunda 37°C'de 1 gece büyütülür.
- Hücrelerin üzerine %10 gliserol (200 µl) eklenir ve -80°C'de saklanır.

3.2.4. Tüm genomun PHY106 ekspresyon vektörüne klonlanması

Topo XL vektörüne klonlama sonucu elde edilen Topo XL-HBV klonlama ürünü ve ampicilin rezistans geni taşıyan pPHY 106 ekspresyon vektörü SapI restriksiyon enzimi ile kesilerek klonlama gerçekleştirilir.

3.2.4.1. SapI restriksiyon enzimi kesimi

SapI restriksiyon enzimi kesimi aşağıdaki reaksiyon hazırlanarak 37°C'de bir gece inkübasyona bırakılarak yapıldı. Reaksiyon içeriği aşağıdaki gibidir;

DNA	5 µg
SapI enzimi (5U/ µl)	2 µl
10 X NEB4 tamponu	2 µl
ddH ₂ O	X µl*

* X: Toplam hacmi 20 µl'ye tamamlayacak kadar.

3.2.4.2. Vektör uçlarının alkalen fosfatazla muamelesi

SapI kesiminden sonra vektörün kendi kendine tekrar kapanmasını (*self-ligation*) önlemek amacıyla kesilmiş vektör Alkalen Fosfataz ile 37°C’de bir saat inkübasyona bırakıldı. Reaksiyonun içeriği aşağıdaki gibidir;

Kesilmiş DNA	20 µl
CIP Alkalen Fosfataz	2 µl
10X CIP Tamponu	2,4 µl

3.2.4.3. Kesim ürünlerinin jel ekstraksiyonu

Kesim ürünleri % 0,8’lik agaroz jelde yürütüldükten sonra jel ekstraksiyonu “QIAquick Gel Extraction kit” (QIAGEN, Basel Switzerland) kiti üretici firmanın protokolüne uyularak yapıldı:

- DNA bandı jelden bistürü yardımıyla kesilip çıkartılır.
- Jelin ağırlığı tartılır ve ağırlığının 3 katı hacminde QG tamponu eklenir.
- 50°C’de jel tamamen eriyene kadar inkübasyona bırakılır.
- Jel tamamen eridikten sonra QIAquick kolonuna aktarılır.
- 17000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir ve filtreden geçen sıvı atılır.
- Filtrenin üzerine 750 µl PE tamponu eklenir.
- 17000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir ve filtreden geçen sıvı atılır.
- Boş kolon maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilir.
- Kolon 1,5 ml’lik steril bir ependorf tüpüne aktarılır ve 50 µl EB tamponu eklenir.
- 17000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek elüsyon yapılır.

3.2.4.4. Ligasyon

Uygun boydaki DNA bantları (HBV için yaklaşık 3,2 kb ve pHY106 için yaklaşık 3,8 kb) jelden izole edildikten sonra vektör ve HBV oda sıcaklığında 30 dakika Hızlı Ligaz enzimi (*Quick ligase*) ile inkübasyona bırakılarak ligasyonları yapıldı. Reaksiyonun içeriği şu şekildedir;

pHY106 vektörü	1,5 µl
HBV	6,5 µl
2X Hızlı Ligaz tamponu	10 µl
Hızlı Ligaz	2 µl

3.2.4.5. *Transformasyon*

- Ligasyon ürünlerinin DH5α kompetent hücrelerine ısı şokuyla transformasyonları gerçekleştirildi:
- -80°C’de dondurulmuş DH5α hücreleri buz üzerinde çözülür.
- Ligasyon ürününden 5 µl hücrelerle karıştırılır ve 30 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon sonrası 42°C su banyosunda 30 saniye bekletilir.
- Zaman geçirmeden tekrar buza koyulur ve 2 dakika bekletilir.
- Hücrelerin üzerine oda sıcaklığındaki sıvı LB besiyeri eklenir.
- 1 saat 37°C’de çalkalayarak inkübasyona bırakılır.
- 50 µg/ml ampisilin içeren katı LB besiyerine hücrelerin ekimleri yapılır.

3.2.5. *DNA dizi analizi*

Hastanın serumundan ekstraksiyonu yapılan HBV DNA’sının dizi analizi direkt olarak, TOPO-XL vektörüne ve pHY106 vektörüne klonlama yapıldıktan sonra üretici firmanın “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, Fostercity, USA) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek yapıldı.

3.2.5.1. *DNA dizi analizi PZR’si*

DNA dizi analizinin PZR reaksiyonunun içeriği ve şartları aşağıda gösterildiği gibidir:

Reaksiyon içeriği:

Big Dye Karışımı	8 µl
Primer (Bkz. Çizelge 3.3)	4 µl
DNA	1-8 µl
ddH ₂ O	X*µl

* X: Toplam Hacmi 20 µl'ye tamamlayacak kadar.

Reaksiyon Şartları:

96°C	30 sn	
96°C	10 sn	} 30 siklus
50°C	5 sn	
60°C	4 dk	

3.2.5.2. DNA dizi analizi PZR ürünlerinin NaOAC-ETOH yöntemiyle temizlenmesi

- DNA dizi analizi PZR ürününün üzerine 6 µl TSR (Template Suppression Reagent) eklenir ve vortekslenir.
- Örneği denatüre etmek için 96°C'de 1 dakika inkübe edilir.
- DNA dizi analizinin yapılacağı tüpün içine 10 µl TSR ve 2 µl örnek koyulur ve iyice vortekslenir.
- Karışım 2 dakika 96°C'de inkübasyona bırakılır.
- DNA dizi analizi "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" (Perkin Emler, Foster City, USA) cihazı ile yapılır.

3.2.6. Ekspresyon vektörüne klonlanan HBV tüm genomunun *in vitro* sistemde analizi

pHY106 ekspresyon vektörüne klonlanmış HBV tüm genomunun *in vitro* analizlerini yapmak üzere insan hepatoblastoma hücre dizisi olan Huh7 hücre kültür sistemi kullanıldı.

3.2.6.1. Huh7 hücre dizilerinin çözülmesi

- Sıvı nitrojende dondurularak saklanmış Huh7 hücreleri 37°C su banyosunda çözülür.

- Hücreler zaman kaybedilmeden 15 ml'lik falkon tüplere aktarılır.
- Üzerlerine 2 ml'lik oda sıcaklığındaki Huh7 büyüme ortamı (Çizelge 3.2.) damla damla eklenir.
- 1300 rpm'de 5 dakika sentrifüj yapılarak çöktürülür.
- Pelet 2 ml Huh7 büyüme ortamı ile nazikçe çözülür.
- 25 ml'lik flaslara aktarılır ve üzerlerine 8 ml Huh7 büyüme ortamı eklenerek inkübatöre (37°C , %5 CO₂) kaldırılır.

3.2.6.2. Huh7 hücre dizilerinin pasajlanması

- HBV tüm genomun “Long-PCR 25 ml'lik flaslara tabanını kaplayan Huh7 hücrelerinin büyüme ortamı çekilir ve atılır.
- 3 ml PBS ile hücreler yıkanır.
- 1 ml Tripsin-EDTA hücrelerin üzerinde 15-20 saniye gezdirilir.
- Tripsin-EDTA hücrelerin üzerinden uzaklaştırılır ve flask inkübatörde (37°C, %5 CO₂) 1 dakika kadar bekletilir.
- Hücreler flaskın tabanından 3,8 ml Huh7 büyüme ortamı ile ayrılır.
- Hücrelerin içinde bulunduğu ortamın 1,8 ml dondurmak ve saklamak üzere ayrılır 2 ml'si yeni flaska aktarılır ve üzerlerine 8 ml yeni Huh7 hücre ortamı eklenir.
- Pasajlanan hücreler İnkübatörde (37°C, %5 CO₂) büyütülür.

3.2.6.3. Huh7 hücre dizilerinin dondurulması

- 1,8 ml hücre süspansiyonunun üzerine 200 µl DMSO (%10) eklenir.
- Sırasıyla -20°C'de 2 saat ve -80°C'de bir gece dondurulur.
- Sıvı nitrojen içerisinde saklanır.

3.2.6.4. Klonlama ürününün Huh7 hücrelerine transfeksiyonu

Klonlanmış HBV tüm genomunun Huh7 hücrelerine transfeksiyonu “Fugene 6 Transfection Reagent” (Roche Applied Sciences, Indianapolis USA) transfeksiyon solüsyonu üretici firmanın tavsiye ettiği protokole uyularak gerçekleştirildi:

- 94 µl serumdan bağımsız ortam (serum free medium) olan OPTIMEM ile 6 µl Fugene 6 transfeksiyon solüsyonu 1,5 ml'lik bir ependorf tüpünde iyice karıştırılır.
- Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılır.
- 1 µg DNA karışımın içerisine eklenir ve iyice karıştırılır.
- Karışım 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- İnkübasyon süresi başladığında 24 kuyucuklu tabaklardaki Huh7 hücrelerinin büyüme ortamı, 500 µl OPTIMEM ile değiştirilir.
- Hücreler inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilir.
- İnkübasyon sonrası karışım her kuyuya 20 µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtılır.
- inkübatörde (37°C, %5 CO₂) 6-8 saat inkübasyona bırakılır.
- 8 saatin sonunda kuyucuklardaki OPTIMEM çekilir.
- Kuyucuklar 3 defa 1 ml PBS (Phosphate Buffer Saline) ile iyice yıkanır.
- Kuyucuklara Huh7 hücrelerinin büyüme ortamı eklenir ve inkübatörde inkübasyona bırakılır.

3.2.6.5. HBV transfeksiyonu yapılmış hücrelere ilaç verilmesi

- Antiviral etkinlikleri test edilecek olan ilaçlar 40 mM stoklar halinde saklanır.
- Antiviral ilaç stoğu Huh7 büyüme besiyeri ile 1/400 oranında dilüe edilir ve büyüme besiyeri içerisinde 100 µM'lık ilaç konsantrasyonu elde edilir.
- Huh7 besiyeri ile yapılan 1/10'luk seri dilüsyonlar ile önce 10 sonra 1 µM'lık ilaç konsantrasyonlarına ulaşılır.
- 24 kuyucuklu plâtelere bulunan hücrelerin üzerine her kuyuya 0.5 ml olacak şekilde istenilen konsantrasyonda ilaç dağıtılır.

3.2.6.6. Toplanan kültür ortamlarından viral DNA ekstraksiyonu

Huh7 hücrelerine pHY106-HBV klonlama ürünlerinin transfeksiyonundan sonra toplanan kültür ortamından, viral DNA ekstraksiyonu "QIAamp DNA Mini Kit" (QIAGEN, Basel Switzerland) kiti kullanılarak üretici firmanın kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek yapıldı:

- 20 µl QIAGEN proteaz 1,5 ml'lik ependorf tüplerine dağıtılır.

- Üzerlerine kuyucuklardan toplanan 200 µl süpernatant eklenir.
- 200 µl AL tamponu eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
- Kapak içindeki damlaların dibeye çökmesi için 15 saniye 8000 rpm’de döndürülür.
- Üzerlerine 200 µl mutlak etanol eklenir ve 15 saniye vortekslenir.
- Karışım toplama tüplerinin içine yerleştirilmiş döndürme kolonlarına transfer edilir ve 8000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir.
- Döndürme kolonları temiz toplama tüplerinin içine transfer edilir ve üzerlerine 500 µl AW1 tamponu eklenerek 8000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilir.
- Kolonlar temiz toplama tüplerine transfer edilir ve üzerlerine 500 µl AW2 tamponu eklenerek 8000 rpm’de 2 dakika döndürülür.
- Kolonlar temiz toplama tüplerine aktarılır ve 2 dakika 14000 rpm’de santrifüj edilir.
- Kolonlar 1,5 ml’lik steril ependorf tüplerine transfer edilir ve üzerlerine 200 µl AE tamponu eklenir.
- Kolonlar oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılır ve 8000 rpm’de 2 dakika santrifüj edilerek elüe edilir.

3.2.7. *In vitro ortamdaki HBV DNA replikasyonunun analizi*

Real-time PZR: Fast Start DNA hibridizasyon kiti (Roche Diagnostics, GmbH, Indianapolis, ABD) kullanılarak toplam 20 µl içerisinde amplifikasyon yapıldı:

Reaksiyon içeriği;

MgCl ₂ (3mM)	3µl
Primer 1 (0.5 pmol)	1µl
Primer 2 (0.5 pmol)	1µl
Prob1 (0.3 pmol)	1µl
Prob2 (0.3 pmol)	1µl
Enzim (Master mix)	2 µl
ddH ₂ O	5 µl
Template	5µl

Reaksiyon;

95°C	10 dakika	}	45 döngü
95°C	5 sn		
58°C*	8 sn		
72°C	11 sn		

* Her siklusta 1°C düşerek 50 °C'ye kadar inilir.

3.2.8. IC50 değerlerinin hesaplanması

IC50, herhangi bir antiviralin viral replikasyonun %50'sini baskılamak için gereken ilaç dozu anlamına gelmektedir. İlaçların farklı dozlarda transfeksiyon sonrası viral replikasyonu gerçekleştiren Huh7 hücrelerine verilmesinden 5 gün sonra hücre süpernatantından ekstrakte edilen HBV DNA miktarının Real Time PCR ile belirlenmesinden sonra elde edilen değerler kullanılarak IC50 değerleri daha önce rapor edilen hesaplama yöntemine göre hesaplanmıştır (Delaney et al. 2001).

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1. Hasta Serumundan Elde Edilen HBV DNA'nın DNA Dizi Analizi

Hastanın serumundan ekstrakte edilen HBV DNA'nın klonlama yapılmadan önce direkt DNA dizi analizi ile elde edilen mutasyonlar Çizelge 4.1'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.1 Hasta Serumundan elde edilen HBV DNA'nın direkt DNA dizi analizi.

Serum	Antiviral	Viral Yük (kopya/ml)	Bulunan Mutasyonlar
24.09.2004	Adefovir	1.6×10^6	L80L/V, H124Y
03.03.2005	Adefovir	1.6×10^5	L80L/V, H124Y
28.07.2006	Adefovir	1.0×10^5	L80L/V, V112I, N118T, H124H/Y, A181A/V
28.03.2007	Adefovir	1.0×10^6	L80L/V, A181V, N236N/T, N238D
06.11.2007	Adefovir Entecavir	1.9×10^6	L80L/V, L91L/I, A181V, N236N/T, N238D
04.01.2008	Adefovir Entecavir	6.3×10^6	L80L/V, L91I, M204I, S219S/A, N238D, Y245H

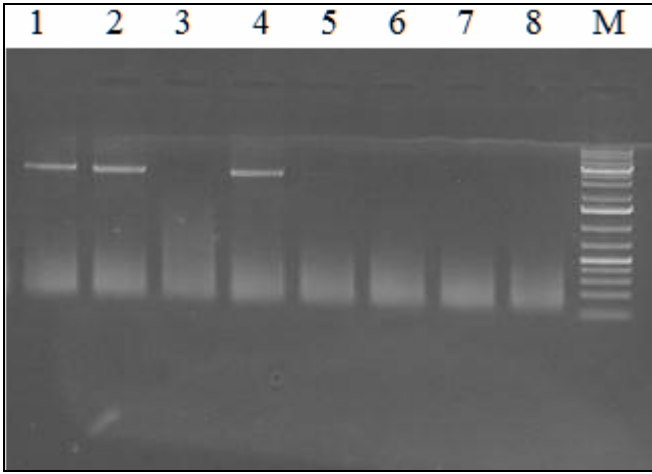
Bu aşamada henüz klonlama yapılmamıştır. Dolayısıyla hasta serumundan elde edilen HBV DNA, içerisinde değişik viral varyantları içinde barındıran bir viral havuzu temsil eder. Havuzda bulunan bu genetik çeşitlilik (quasispecies) direkt DNA dizi analizi sırasında bazı bölgelerde 2 farklı nükleotitin aynı anda görülmesine neden olmaktadır. Örneğin Çizelge 4.1.'de görülen L80L/V mutasyonu, aslında havuzun içinde bu nokta için hem yabancı tip virüslerin L80L hem de Lösinden Valin'e değişim gösteren virüslerin (L80V) olduğunu göstermektedir.

4.2. TOPO-XL Vektörüne Klonlama Ürünleri

Hasta serumundan elde edilen HBV DNA'dan elde edilen HBV tüm genom PZR ürünleri TOPO-XL klonlama vektörlerine klonlanmıştır.

4.2.1 HBV tüm genom "long PCR" ürünleri

TOPO-XL HBV klonlaması yapılabilmesi için gereken ilk basamak uygun PZR ürünlerini elde edebilmektir. Biz çalışmamızda daha sonra hücre kültürlerinde ekspresyonlarının uygun olabilmesi açısından HBV'nin tüm genomunu PZR ile çoğaltmayı amaçladık

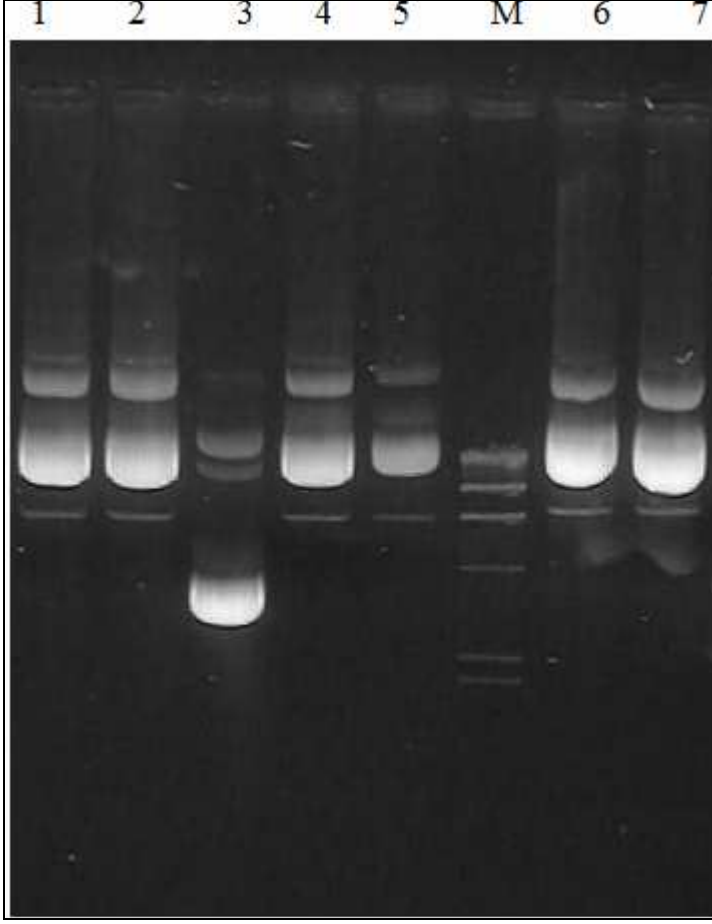


Şekil 4.1 HBV tüm genom PCR amplifikasyon ürünleri.

Hastadan elde edilen HBV DNA'nın HBV tüm genom olacak şekilde PZR ile çoğaltılması Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. %1'lik agaroz jel görüntüsünde M, 1 kb'lik GeneRuler DNA belirtecini gösterirken 1, 2 ve 4. kuyulardaki numunelerden yapılan PZR pozitif iken 3, 5, 6, 7 ve 8 numaralı kuyulardaki örneklerde amplifikasyon görülmemiştir.

4.2.2 TOPO-HBV klonlamasından elde edilen klonların jel görüntüleri

HBV'nin "long PCR" ile tüm genom şeklinde çoğaltılmasından sonra elde edilen amplifikasyon ürünleri TOPO XL vektörlerine klonlandı. Toplanan kolonilerin plazmid ekstaksiyonlarından sonra elde edilen plazmidler %0.8'lik agaroz jele yüklendi.



Şekil 4.2. Topo-HBV tüm genom klonlar.

Şekil 4.2.'de toplanan kolonilerden elde edilen plazmidlerde 1, 2, 4, 5, 6 ve 7. kuyulardaki klonlarda HBV tüm genomunun başarılı bir şekilde gerçekleştigi görülmektedir. 3. kuyudaki örnek ise negatif bir klonlama sonucunu göstermektedir. M, ϕ X174 HinFI DNA belirtecini göstermektedir. Klonlama sırasında vektörün içerisine HBV tüm genomu girmediği için 3 nolu kuyudaki plazmid diğerlerine göre daha küçük olduğu için daha hızlı yürümektedir.

4.2.3 Değişik mutasyon paterni taşıyan klonlar

Klonlamalar sonrasında pozitif kolonilerden elde edilen plazmidlerin DNA dizi analizi sonrası tespit edilen mutasyonlar Çizelge 4.2.'de gösterilmiştir. Hasta serumundan elde edilen HBV DNA'nın direkt DNA dizi analizinde hastada bulunan tüm viral varyantların DNA dizisi çıkarılırken, Klonlama sonrası her vektöre tek bir HBV genomu girebildiği

için plazmidlerden elde edilen sekanslarda viral havuzdaki genetik çeşitlilik görülmez. Elde edilen sekans tek bir HBV genomuna aittir.

Çizelge 4.2. Topo-HBV klonlaması sonrası elde edilen değişik mutasyon paternleri

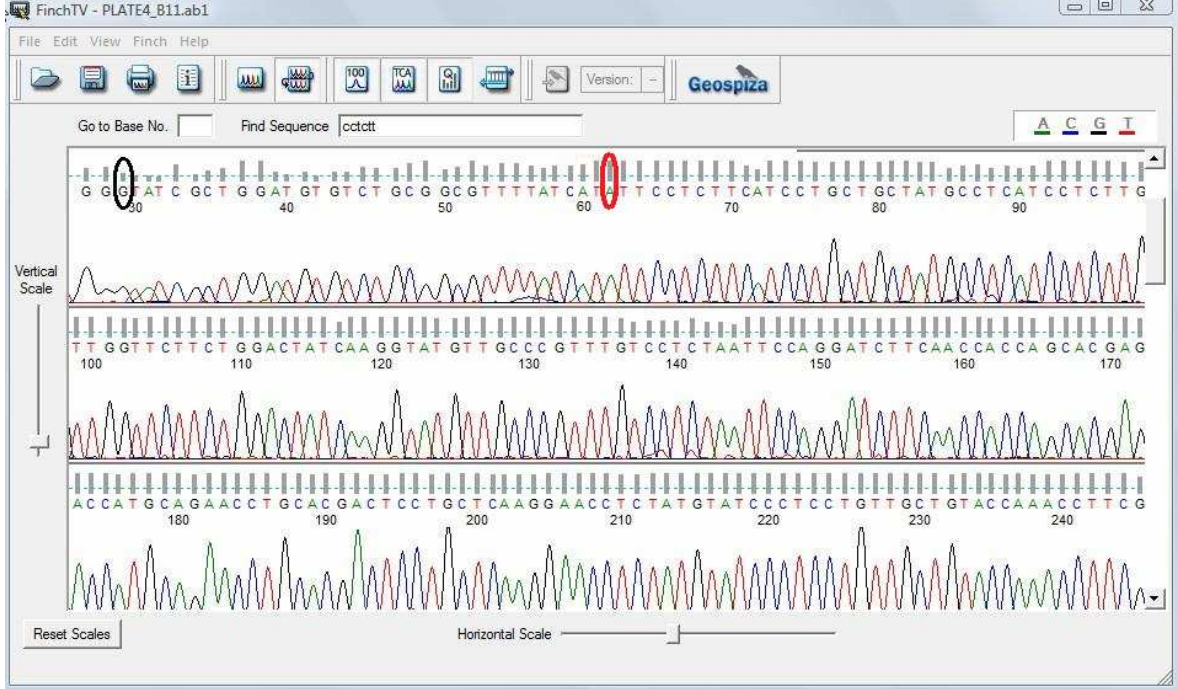
Mutasyon paterni ismi	Toplam Klon sayısı	Paterni taşıyan klon sayısı (%)	Serum tarihi	Mutasyonlar
Patern A	92	57 (%62)	04.01.2008	L80V + L91I + M204I + A219S + N238D + Y245H
Patern B	85	70 (%82.4)	28.03.2007	L80V + A181V + N236T + N238D
Patern C	72	27 (%37.5)	28.07.2006	L80V+ V112I + N118T + H124Y + A181V
Patern D	72	9 (%12.5)	28.07.2006	L80V + A181V
Patern E	72	7 (%9.7)	28.07.2006	V112I + N118T + A181V
Patern F	60	27 (%45)	24.09.2004	Yalnız H124Y
Patern G	60	27 (%45)	24.09.2004	L80V+H124Y
Patern H	60	4 (%6.7)	24.09.2004	L80V + L91I+H124Y

Çalışmada, hastadan elde edilen değişik tarihlerdeki serum örneklerinden elde edilen HBV tüm genomlarının klonlanması sonrasında mümkün olduğunca çok koloni toplamaya çalışıldı. Bu sayede hastanın viral havuzunda bulunan genetik çeşitliliğe katkıda bulunan HBV varyantların viral havuz içerisinde yüzde dağılımları tespit edilebildi. Çizelge 4.2’de viral havuzda en dominant şekilde tespit edilen viral varyantlar ve bu varyantların taşıdıkları mutasyon paternleri gösterilmiştir. Daha sonra bu paternleri taşıyan HBV genomları hücre kültür sistemlerinde test edilmek üzere *in vitro* fenotipleme deneyleri yapılmıştır.

4.2.3.1. Patern A

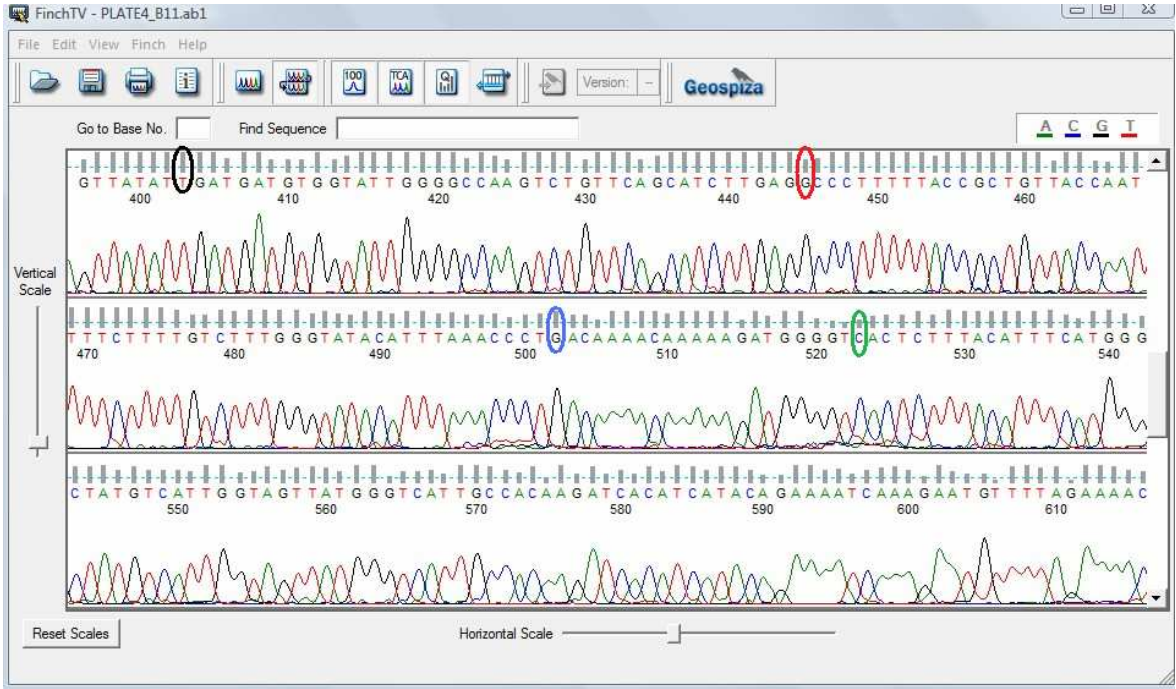
Çalışmada elde edilen HBV genomlarından bir tanesi aynı genom üzerinde L80V, L91I, M204I, A219S, N238D ve Y245H mutasyonlarının hepsini aynı anda taşımaktadır. Patern

A olarak adlandırılan bu mutasyon paternini taşıyan HBV genomunun DNA dizi analizi, L80V ve Y245H mutasyonları arasındaki dizi çok uzun olduğu için arasındaki Şekil 4.3.A ve Şekil 4.3.B. üzerinde gösterilmiştir.



Şekil 4.3A. Patern A DNA dizi analizi

Lösinden Valin değişimine neden olan 80. amino asit pozisyonundaki tta→gta (L80V) değişimi Şekil 4.3.A'da siyah, 91. amino asit pozisyonunda lösinden izolösin değişimine neden olan ctt→att (L91I) mutasyonu kırmızı çember ile gösterilmiştir.



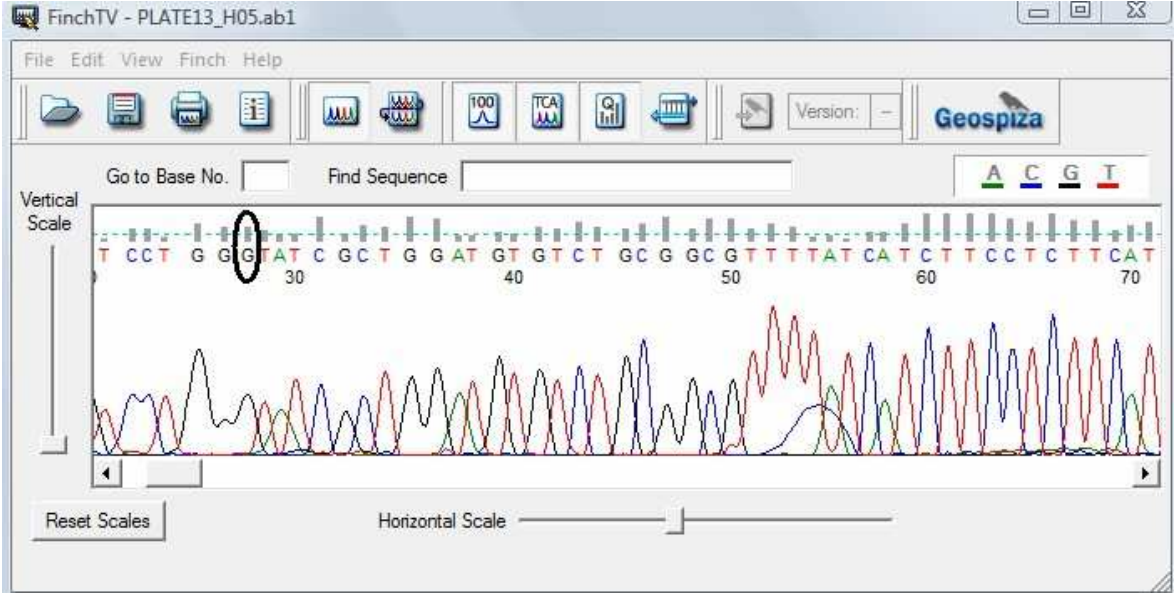
Şekil 4.3B. Patern A DNA dizi analizi

Şekil 4.3.B’de, YMDD motifi içerisinde metiyoninden izolösin değişimine neden olan 204. amino asit pozisyonundaki atg→att (M204I) değişimi siyah, 219. amino asit pozisyonunda alaninden serin değişimine neden olan tcc→gcc (A219S) mutasyonu kırmızı, 238. amino asit pozisyonunda asparajinden aspartik asit değişimine neden olan aac→gac (N238D) mutasyonu mavi ve 245. amino asit pozisyonunda tirozinden histidin değişimine neden olan tac→cac (Y245H) mutasyonu yeşil çember ile gösterilmiştir.

4.2.3.2. Patern B

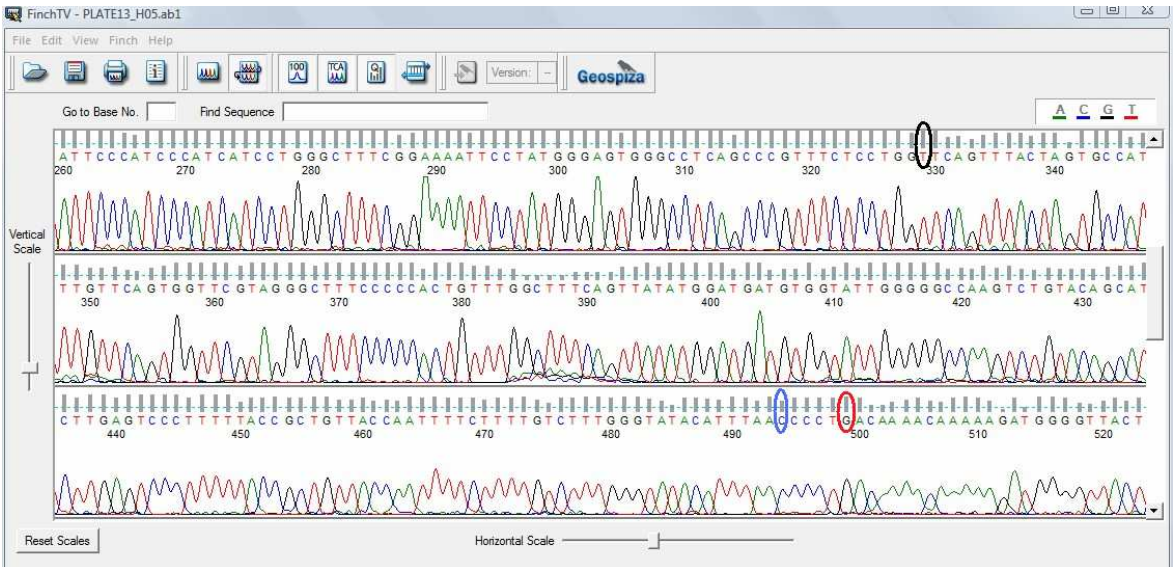
Çalışmada aynı genom üzerinde L80V, A181V, N236T, N238D mutasyonlarının hepsini taşıyan HBV genomları Patern B olarak isimlendirilmiştir. Bu mutasyon paternini taşıyan HBV genomunun DNA dizi analizi, L80V ve N238D mutasyonları arasındaki dizi çok uzun olduğu için arasındaki Şekil 4.4A ve Şekil 4.4.B. üzerinde gösterilmiştir.

Lösinden valin değişimine neden olan 80. amino asit pozisyonundaki tta→gta (L80V) değişimi Şekil 4.4.A’da siyah çember ile gösterilmiştir.



Şekil 4.4A. Patern B DNA dizi analizi

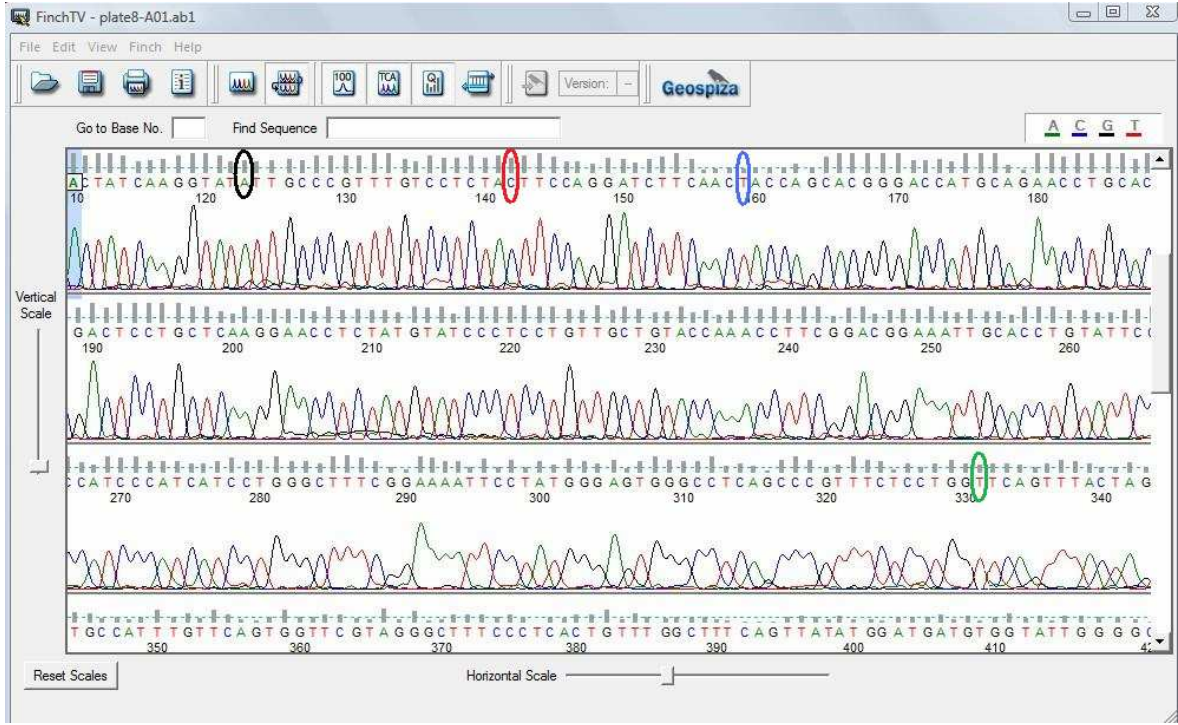
Şekil 4.4.B’de, alaninden valine değişimine neden olan 181. amino asit pozisyonundaki gct→gtt (A181V) değişimi siyah, 236. amino asit pozisyonunda asparjinden threonin değişimine neden olan aac→acc (N236T) mutasyonu mavi ve 238. amino asit pozisyonunda asparajinden aspartik asit değişimine neden olan aac→gac (N238D) mutasyonu kırmızı çember ile gösterilmiştir.



Şekil 4.4B. Patern B DNA dizi analizi

4.2.3.3. Patern C

Çalışmada aynı genom üzerinde L80V, V112I, N118T, H124Y ve A181V mutasyonlarının hepsini taşıyan HBV genomları Patern C olarak isimlendirilmiştir. Gösterimde kolaylık olması açısından Şekil 4.5'te V112I, N118T, H124Y ve A181V mutasyonu gösterilirken L80V mutasyonu gösterilmemiştir.

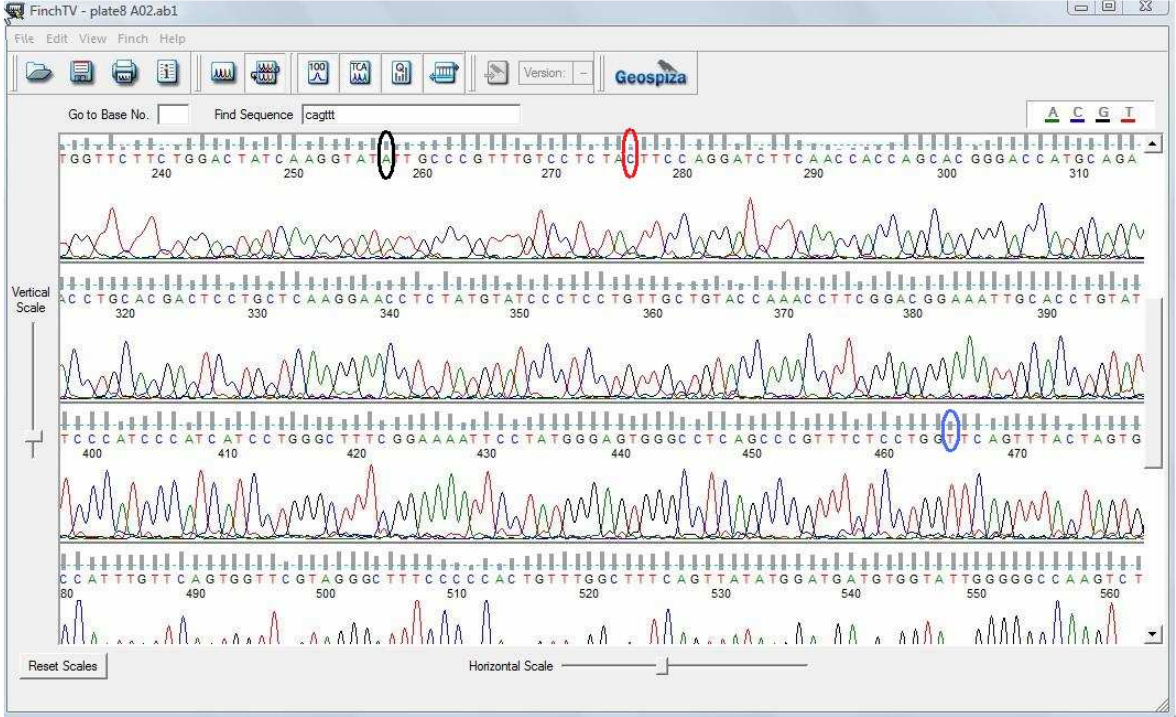


Şekil 4.5. Patern C DNA dizi analizi

Şekil 4.5.'te, 112. amino asit pozisyonunda valinden izolösün değişimine neden olan gtt→att (V112I) değişimi siyah, 118. amino asit pozisyonunda asparjinden threonin değişimine neden olan aat→act (N118T) mutasyonu kırmızı, 124. amino asit pozisyonunda histidinden tirozin değişimine neden olan cac→tac (H124Y) mutasyonu mavi ve alaninden valine değişimine neden olan 181. amino asit pozisyonundaki get→gtt (A181V) değişimi yeşil çember ile gösterilmiştir.

4.2.3.4. Patern E

Çalışmada aynı genom üzerinde V112I, N118T ve A181V mutasyonlarının hepsini taşıyan HBV genomları Patern E olarak isimlendirilmiştir.

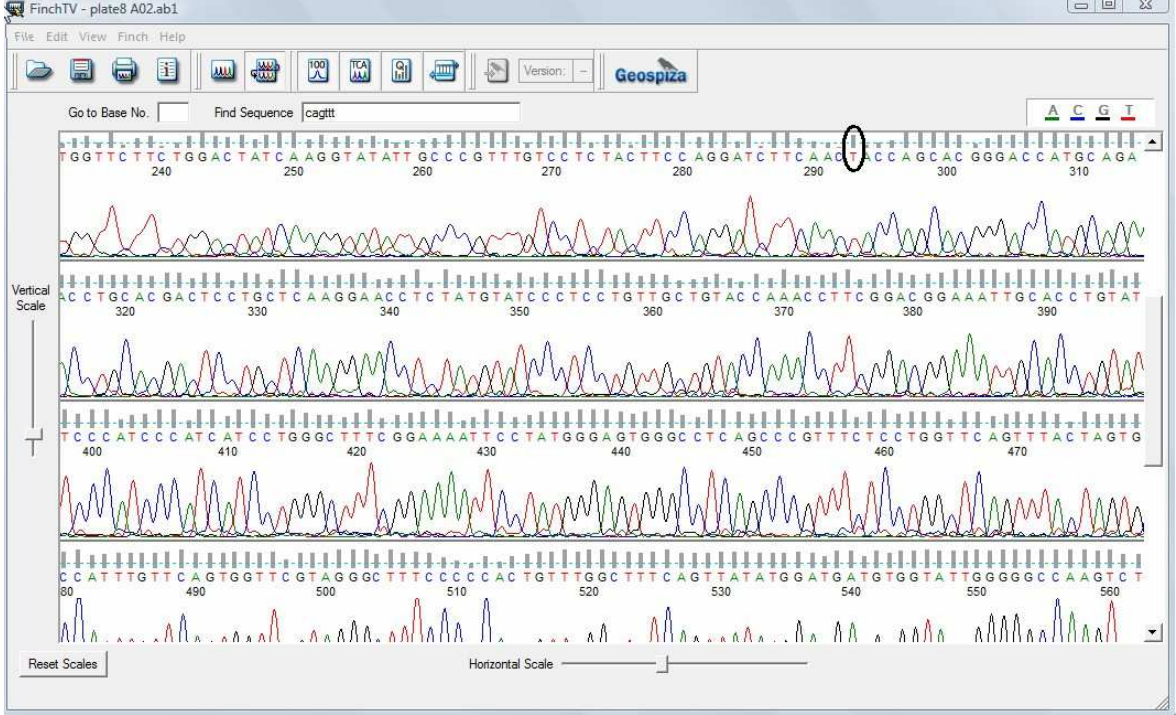


Şekil 4.6. Patern E DNA dizi analizi

Şekil 4.6.'da, 112. amino asit pozisyonunda valinden izolösin değişimine neden olan gtt→att (V112I) değişimi siyah, 118. amino asit pozisyonunda asparjinden threonin değişimine neden olan aat→act (N118T) mutasyonu kırmızı ve alaninden valine değişimine neden olan 181. amino asit pozisyonundaki gct→gtt (A181V) değişimi mavi çember ile gösterilmiştir. Diğer pozisyonlardaki nükleotitlerde herhangi bir değişiklik saptanmamıştır.

4.2.3.5. Patern F

Çalışmada sadece H124Y mutasyonunu taşıyan HBV genomları Patern F olarak isimlendirilmiştir.

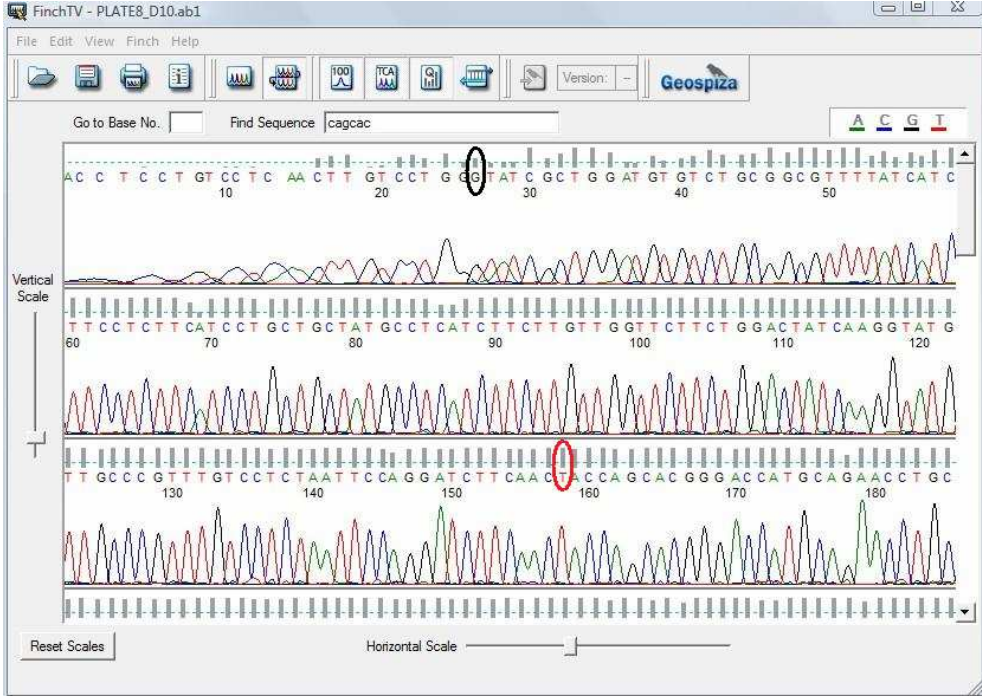


Şekil 4.7. Patern F DNA dizi analizi

Şekil 4.7.'de, 124. amino asit pozisyonunda histidinden tirozin değişimine neden olan cac→tac (H124Y) mutasyonu siyah çember ile gösterilmiştir.

4.2.3.6. Patern G

Çalışmada aynı genom üzerinde L80V ve H124Y mutasyonlarının ikisini de taşıyan HBV genomları Patern G olarak isimlendirilmiştir.

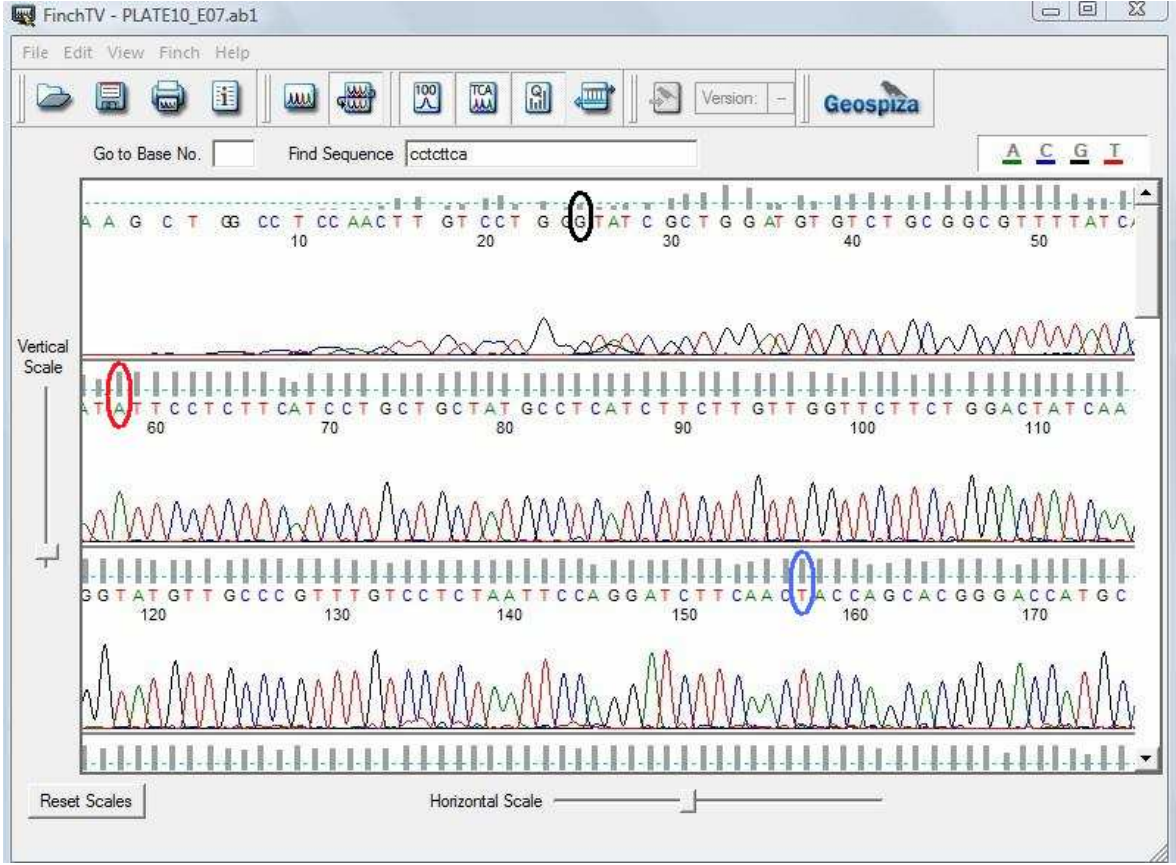


Şekil 4.8. Patern G DNA dizi analizi

Şekil 4.8.'de lösinden valin değişimine neden olan 80. amino asit pozisyonundaki tta→gta (L80V) değişimi siyah ve 124. amino asit pozisyonunda histidinden tirozin değişimine neden olan cac→tac (H124Y) mutasyonu kırmızı çember ile gösterilmiştir.

4.2.3.7. Patern H

Çalışmada aynı genom üzerinde L80V, L91I ve H124Y mutasyonlarının hepsini taşıyan HBV genomları Patern H olarak isimlendirilmiştir.

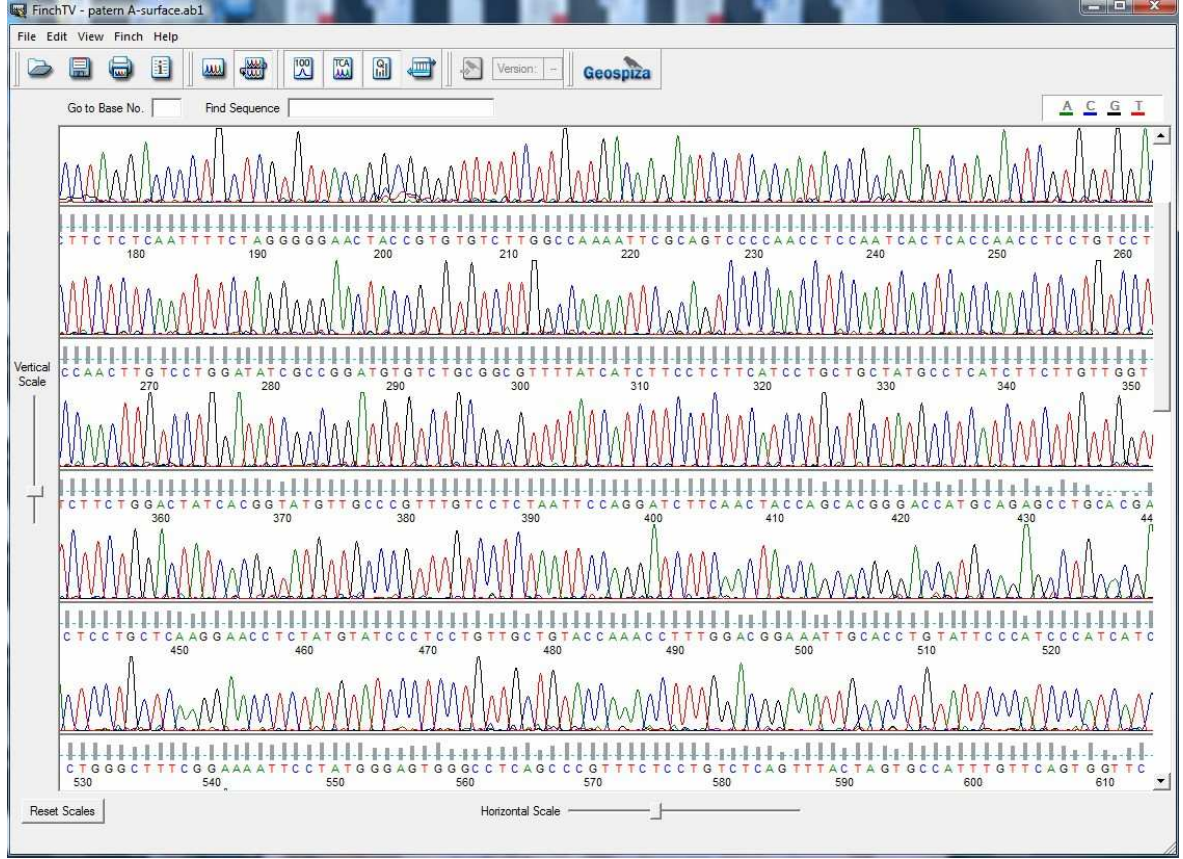


Şekil 4.9. Patern H DNA dizi analizi

Şekil 4.9.'da lösinden valin değişimine neden olan 80. amino asit pozisyonundaki tta→gta (L80V) değişimi siyah, 91. amino asit pozisyonunda lösinden izolösün değişimine neden olan ctt→att (L91I) mutasyonu kırmızı ve ve 124. amino asit pozisyonunda histidinden tirozin değişimine neden olan cac→tac (H124Y) mutasyonu mavi çember ile gösterilmiştir.

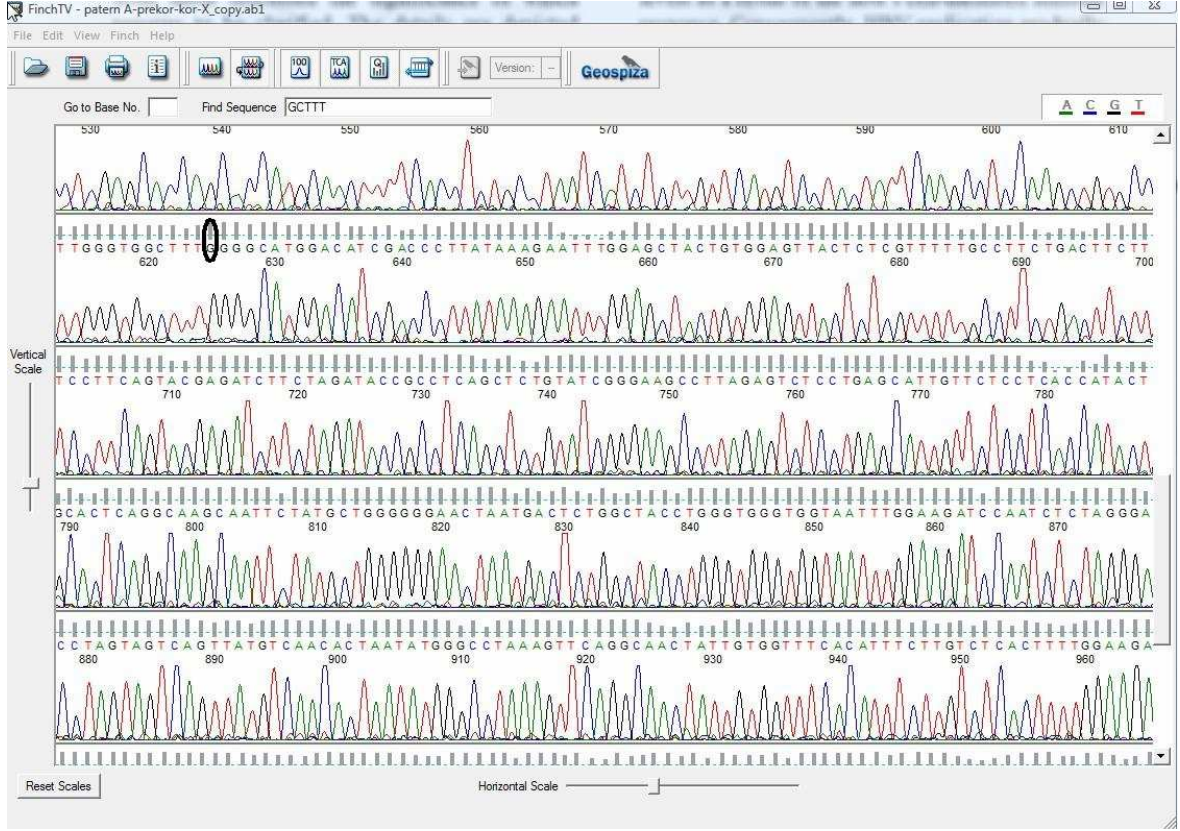
4.2.3.8. HBV polimeraz bölgesi dışındaki mutasyonlar

Hücre kültüründe test edilen tüm klonlarda HBV genomunun polimeraz bölgesinin dışında kalan bölgeler de mutasyon açısından DNA dizi analizi yöntemi ile analiz edildi. HBV yüzey proteini, kor, pre-kor ve X proteinin kodlayan HBV genom bölgelerinde literatürde tanımlanmış herhangi bir nokta mutasyonu, insersiyon veya delesyon gibi mutasyonlar tespit edilemedi.



Şekil 4.10 Patern A'ya sahip HBV genomunun HBsAg dizi analizi

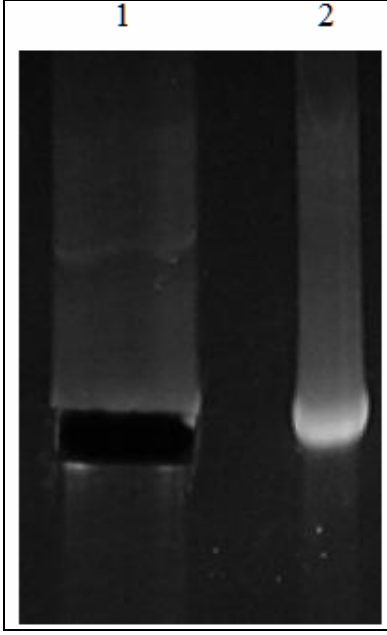
Şekil 4.10'da A paternini taşıyan HBV tüm genomunun HBV yüzey antijenini kodlayan bölgesinin DNA dizi analizi gösterilmiştir. Bu analiz sonucuna göre HBV yüzey antijenini kodlayan bölgede herhangi bir mutasyon görülmektedir. Şekil 4.11'de aynı genomun kor, prekor ve X proteinini kodlayan bölgelerin DNA dizi analizi görülmektedir. En sık rastlanan prekor bölgesi mutasyonu olan G1896A mutasyonunun yeri şekilde siyah çember ile gösterilmiştir (Carman et. al 1989). Yine bu analiz sonucuna göre bu bölgelerde herhangi bir mutasyon görülmektedir.



Şekil 4.11 Patern A'ya sahip HBV genomunun kor, prekor ve X bölgesi dizi analizi

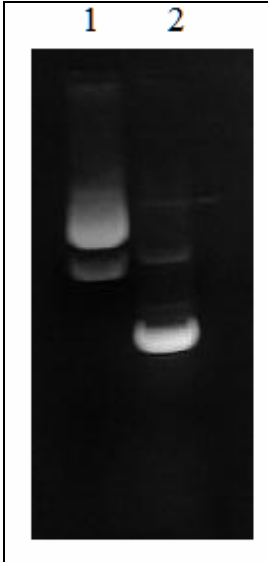
4.3. pPHY106-HBV Tüm Genom Klonlama Ürünleri

Mutasyon paternleri tespit edilen HBV tüm genomlarının pPHY106 vektörüne klonlanması için TOPO-HBV klonlama ürünlerinin sapI restriksiyon enzimi ile kesilmesi ve HBV tüm genomlarının sapI yapışkan uçları ile beraber jelden geri alınması gerekmektedir.



Şekil 4.12. TOPO-HBV klonlarının sapI kesimi

Şekil4.12.'de 2 nolu kuyucukta kesimlenme sonrası referans olması amacıyla HBV tüm genom PZR ürünü ve 1 nolu kuyucukta ise SapI restriksiyon enzimi ile kesilmiş TOPO-HBV klon plazmitinin içerisinde % 1'lik agaroz jelden kesilerek geri alınan HBV tüm genom PZR ürünü görülmektedir. Aynı kesimleme işlemi PHY106 vektörü için de gerçekleştirilir ve ligasyon sonrası elde edilen PHY106-HBV klonlama ürünü plazmiti % 0.8'lik agaroz jelde görüntülenir.

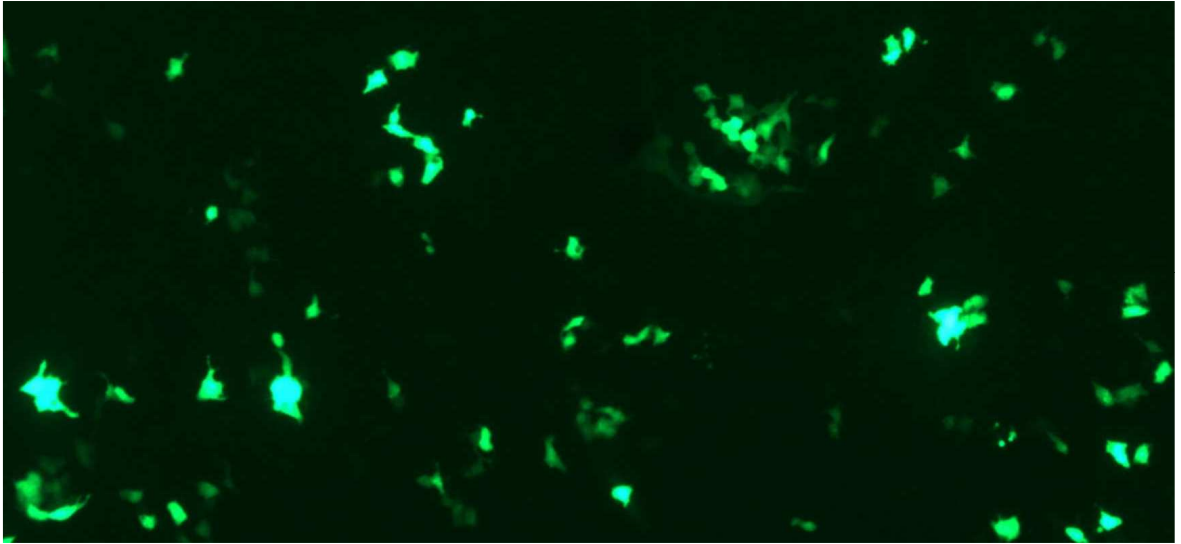


Şekil 4.13. phy106-HBV tüm genom klonlama ürünü

Şekil 4.13’de 1 nolu kuyucukta klonlama sonrası elde edilen pozitif bir koloniden elde edilen plazmid ürünü, 2. kuyucukta ise negatif bir koloniden elde edilen plazmid ürününün % 0.8 lik jelde yürütülmesi gösterilmektedir. Negatif koloniden elde edilen plazmidin içerisinde HBV tüm genomu olmadığı için pozitif koloniye göre jelde daha hızlı yürümüştür.

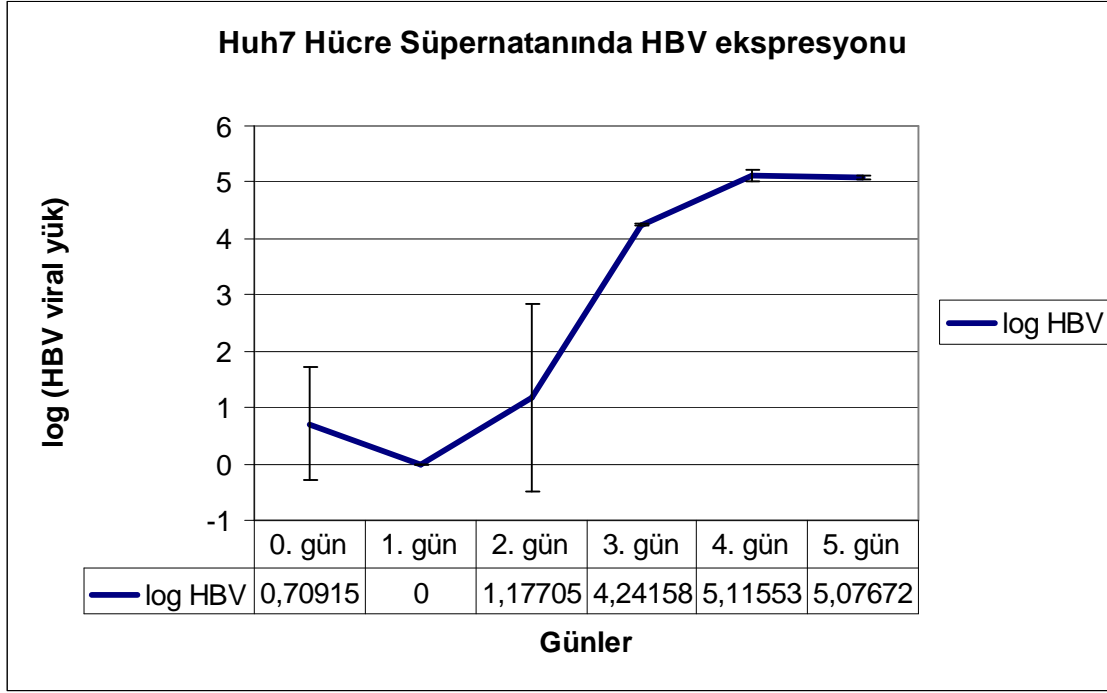
4.4. PHY106-HBV Klonlarının Hücre Kültürlerinde Replikasyonu

PHY106-HBV tüm genom klonları Huh7 hücrelerine transfeksiyonu takip edebilmek amacıyla GFP plazmidi ile beraber transfekte (ko-transfeksiyon) edilmiştir.



Şekil 4.14. Huh7 Hücre kültürlerinde GFP ekspresyonu

Transfeksiyondan 3 gün sonra Huh7 hücrelerinde gerçekleşen GFP ekspresyonunun floresan mikroskobu ile görüntülenmesi Şekil 4.14.’te gösterilmiştir. Huh7 hücrelerinde GFP ekspresyonunun gözlemlenmesi transfeksiyonun başarı ile gerçekleştiğini gösterir. Aynı hücrelerde HBV replikasyonunu da gösterebilmek amacıyla hücre kültür ortamından her günün sonunda hücre süpernatanı toplanmış ve bu süpernatatlardan ekstrakte edilen HBV DNA değerleri Real time PCR ile ölçülmüştür. Şekil 4.15.’de Huh7 hücrelerinde HBV ekspresyonunun her gün arttığı ve 5. gün sonunda bir plato değerine ulaştığı görülmektedir.



Şekil 4.15. pHY106-HBV klonunun Huh7 hücre kültüründe ekspresyonu

4.5. *In vitro* Fenotipleme Deneyleri

Hücre kültürlerinde herhangi bir viral varyantın herhangi bir ilaca ne kadar duyarlı olduğunu ölçmek için yapılan deneylere *in vitro* fenotipleme adı verilmektedir. Bu deneyler için hücre kültür ortamlarında ekspresyonu gerçekleştirilen viral genomlar (Şekil 4.14.) üzerine değişik dozlarda ilaçla verilir ve 5. gün sonunda toplanılan hücre süpernatantlarında elde edilen HBV DNA değerleri ile ilacın mutant HBV üzerindeki etkisi araştırılır.

4.5.1 Patern A

Çizelge 4.3. Patern A için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (μ M)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	1,83 X10 ⁵	1,83 X10 ⁵	1,83 X10 ⁵	1,83 X10 ⁵	1,83 X10 ⁵
İlaçsız	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵
1	1,34 X10 ⁵	1,19X10 ⁵	3,46 X10 ³	1,09 X10 ⁵	1,48 X10 ⁵
1	1,67 X10 ⁵	1,30 X10 ⁵	1,59 X10 ²	1,93 X10 ⁵	1,79 X10 ⁵
10	1,56 X10 ⁵	9,89 X10 ⁴	NEGATIF	2,35 X10 ⁴	1,32 X10 ⁵
10	1,89 X10 ⁵	6,87 X10 ⁴	NEGATIF	4,13 X10 ⁴	1,39 X10 ⁵
100	1,53 X10 ⁵	NEGATIF	NEGATIF	3,64 X10 ⁴	1,51 X10 ⁵
100	1,55 X10 ⁵	NEGATIF	NEGATIF	1,54 X10 ⁴	1,13 X10 ⁵

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

A paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 μ M'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.3.'te gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.4. Patern A için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (μ M)	LAM Log (Viral Yük) \pm SS	ADV Log (Viral Yük) \pm SS	TDF Log (Viral Yük) \pm SS	ENTE Log (Viral Yük) \pm SS	FTC Log (Viral Yük) \pm SS
İlaçsız	5,28 \pm 0,02	5,28 \pm 0,02	5,28 \pm 0,02	5,28 \pm 0,02	5,28 \pm 0,02
1	5,17 \pm 0,07	5,09 \pm 0,03	2,87 \pm 0,95	5,16 \pm 0,18	5,21 \pm 0,06
10	5,23 \pm 0,06	4,91 \pm 0,11	NEGATIF	4,49 \pm 0,17	5,13 \pm 0,02
100	5,19 \pm 0,00	NEGATIF	NEGATIF	4,37 \pm 0,26	5,12 \pm 0,09

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine; SS, standart sapma

A paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4.4.'te gösterilmiştir.

4.5.2 Patern B

Çizelge 4.5. Patern B için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (μM)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	$2,13 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5$	$2,13 \times 10^5$
İlaçsız	$1,77 \times 10^5$	$1,77 \times 10^5$	$1,77 \times 10^5$	$1,77 \times 10^5$	$1,77 \times 10^5$
1	$1,44 \times 10^5$	$4,88 \times 10^5$	$2,50 \times 10^2$	$5,76 \times 10^4$	$1,06 \times 10^5$
1	$1,59 \times 10^5$	$1,36 \times 10^5$	NEGATİF	$1,33 \times 10^5$	$1,77 \times 10^5$
10	NEGATİF	$5,64 \times 10^4$	NEGATİF	NEGATİF	$4,09 \times 10^4$
10	$3,63 \times 10^4$	$1,61 \times 10^5$	NEGATİF	NEGATİF	$3,57 \times 10^4$
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	$3,50 \times 10^3$
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	$3,09 \times 10^3$

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

B paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 μM 'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.5.'te gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.6. Patern B için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (μ M)	LAM Log (Viral Yük) \pm SS	ADV Log (Viral Yük) \pm SS	TDF Log (Viral Yük) \pm SS	ENTE Log (Viral Yük) \pm SS	FTC Log (Viral Yük) \pm SS
İlaçsız	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06
1	5,18 \pm 0,03	5,41 \pm 0,39	1,20 \pm 1,70	4,94 \pm 0,26	5,14 \pm 0,16
10	2,28 \pm 3,22	4,98 \pm 0,32	NEGATİF	NEGATİF	4,58 \pm 0,04
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	3,52 \pm 0,04

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine; SS, standart sapma

B paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 6.'da gösterilmiştir.

4.5.3 Patern C

Çizelge 4.7. Patern C için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (μ M)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	2,44 X10 ⁵	2,44 X10 ⁵	2,44 X10 ⁵	2,44 X10 ⁵	2,44 X10 ⁵
İlaçsız	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵	1,98 X10 ⁵
1	1,06 X10 ⁵	1,66 X10 ⁵	5,78 X 10 ¹	1,97 X 10 ²	1,08 X10 ⁵
1	1,87X10 ⁵	1,63 X10 ⁵	4,32 X 10 ³	1,31 X 10 ²	1,09 X10 ⁵
10	3,61 X 10 ⁴	5,78 X 10 ⁴	NEGATİF	NEGATİF	1,30 X 10 ⁴
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	2,11 X 10 ³	9,46 X10 ¹	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

C paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 μ M'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve

embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.7.'de gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.8. Patern C için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (μ M)	LAM Log (Viral Yük) \pm SS	ADV Log (Viral Yük) \pm SS	TDF Log (Viral Yük) \pm SS	ENTE Log (Viral Yük) \pm SS	FTC Log (Viral Yük) \pm SS
İlaçsız	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06	5,29 \pm 0,06
1	5,15 \pm 0,17	5,22 \pm 0,01	2,20 \pm 2,03	2,20 \pm 0,13	5,04 \pm 0,01
10	2,28 \pm 3,22	2,38 \pm 3,37	NEGATİF	NEGATİF	2,06 \pm 2,91
100	1,66 \pm 2,35	0,49 \pm 0,69	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine; SS, standart sapma

C paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 8.'de gösterilmiştir.

4.5.4 Patern D

Çizelge 4.9. Patern D için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (µM)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	2,01 X10 ⁵	2,01 X10 ⁵	2,01 X10 ⁵	2,01 X10 ⁵	2,01 X10 ⁵
İlaçsız	1,55X10 ⁵	1,55X10 ⁵	1,55X10 ⁵	1,55X10 ⁵	1,55X10 ⁵
1	1,31 X10 ⁵	1,28 X10 ⁵	4,61 X10 ³	9,79 X10 ²	2,61 X 10 ⁵
1	1,02 X10 ⁵	9,95 X10 ⁴	NEGATİF	8,53 X10 ²	1,15 X 10 ⁵
10	NEGATİF	3,40 X10 ⁴	NEGATİF	NEGATİF	2,62 X10 ⁴
10	1,66 X 10 ⁴	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	3,99 X10 ³
100	2,14 X10 ²	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	1,32 X10 ²
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

D paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 µM'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.9.'da gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.10. Patern D için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (µM)	LAM Log (Viral Yük) ± SS	ADV Log (Viral Yük) ± SS	TDF Log (Viral Yük) ± SS	ENTE Log (Viral Yük) ± SS	FTC Log (Viral Yük) ± SS
İlaçsız	5,25± 0,08	5,25± 0,08	5,25± 0,08	5,25± 0,08	5,25± 0,08
1	5,06± 0,08	5,05± 0,08	1,83± 2,59	2,96± 0,04	5,24± 0,25
10	2,11± 2,98	2,27± 3,20	NEGATİF	NEGATİF	4,01± 0,58
100	1,17± 1,65	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	1,06± 1,50

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine; SS, standart sapma

D paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 10.'da gösterilmiştir.

4.5.5 Patern E

Çizelge 4.11. Patern E için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (μM)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	$3,05 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$	$3,05 \times 10^5$
İlaçsız	$1,13 \times 10^5$	$1,13 \times 10^5$	$1,13 \times 10^5$	$1,13 \times 10^5$	$1,13 \times 10^5$
1	$1,31 \times 10^5$	$1,64 \times 10^5$	$1,96 \times 10^3$	$9,73 \times 10^3$	$1,44 \times 10^5$
1	$1,27 \times 10^5$	$1,07 \times 10^5$	$2,36 \times 10^2$	$1,11 \times 10^4$	$1,02 \times 10^5$
10	$1,43 \times 10^4$	$4,99 \times 10^4$	NEGATİF	NEGATİF	$3,78 \times 10^4$
10	NEGATİF	$5,27 \times 10^3$	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	$1,19 \times 10^2$	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	$9,76 \times 10^2$

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

E paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 μM 'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.11.'de gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.12. Patern E için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (μ M)	LAM Log (Viral Yük) \pm SS	ADV Log (Viral Yük) \pm SS	TDF Log (Viral Yük) \pm SS	ENTE Log (Viral Yük) \pm SS	FTC Log (Viral Yük) \pm SS
İlaçsız	5,27 \pm 0,30	5,27 \pm 0,30	5,27 \pm 0,30	5,27 \pm 0,30	5,27 \pm 0,30
1	5,11 \pm 0,01	5,12 \pm 0,13	2,83 \pm 0,65	4,02 \pm 0,04	5,08 \pm 0,11
10	2,08 \pm 2,94	4,21 \pm 0,69	NEGATİF	NEGATİF	2,29 \pm 3,24
100	1,04 \pm 1,47	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	1,49 \pm 2,11

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, emtricitabine; SS, standart sapma

E paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 12.'de gösterilmiştir.

4.5.6 Patern F

Çizelge 4.13. Patern F için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (μ M)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	2,66 X10 ⁵	2,66 X10 ⁵	2,66 X10 ⁵	2,66 X10 ⁵	2,66 X10 ⁵
İlaçsız	1,17 X10 ⁵	1,17 X10 ⁵	1,17 X10 ⁵	1,17 X10 ⁵	1,17 X10 ⁵
1	2,98 X10 ²	2,37 X10 ⁵	1,06 X 10 ³	1,06 X 10 ⁴	8,00 X 10 ³
1	NEGATİF	4,66 X 10 ⁴	7,30 X 10 ³	7,37 X 10 ³	NEGATİF
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, emtricitabine

F paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 µM'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.13.'de gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.14. Patern F için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (µM)	LAM Log (Viral Yük) ± SS	ADV Log (Viral Yük) ± SS	TDF Log (Viral Yük) ± SS	ENTE Log (Viral Yük) ± SS	FTC Log (Viral Yük) ± SS
İlaçsız	5,25± 0,25	5,25± 0,25	5,25± 0,25	5,25± 0,25	5,25± 0,25
1	1,24± 1,75	5,02± 0,50	3,44± 0,59	3,95± 0,11	1,95± 2,76
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	1,49± 2,11	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine; SS, standart sapma

F paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 14.'de gösterilmiştir.

4.5.7 Patern G

Çizelge 4.15. Patern G için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (µM)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	9,98 X10 ⁴	9,98 X10 ⁴	9,98 X10 ⁴	9,98 X10 ⁴	9,98 X10 ⁴
İlaçsız	2,22 X10 ⁵	2,22 X10 ⁵	2,22 X10 ⁵	2,22 X10 ⁵	2,22 X10 ⁵
1	6,45 X10 ³	1,49 X10 ⁵	3,57 X10 ⁴	9,13 X10 ³	7,75 X10 ³
1	5,83 X 10 ⁴	9,75 X10 ⁴	5,52 X10 ³	3,29 X10 ³	1,23 X10 ⁴
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

G paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 µM'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.15.'de gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.16. Patern G için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (µM)	LAM Log (Viral Yük) ± SS	ADV Log (Viral Yük) ± SS	TDF Log (Viral Yük) ± SS	ENTE Log (Viral Yük) ± SS	FTC Log (Viral Yük) ± SS
İlaçsız	5,17± 0,25	5,17± 0,25	5,17± 0,25	5,17± 0,25	5,17± 0,25
1	4,29± 0,68	5,08± 0,13	4,15± 0,57	3,74± 0,31	3,99± 0,14
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine; SS, standart sapma

G paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 16.'da gösterilmiştir.

4.5.8 Patern H

Çizelge 4.17. Patern H için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (μM)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	$3,64 \times 10^5$	$3,64 \times 10^5$	$3,64 \times 10^5$	$3,64 \times 10^5$	$3,64 \times 10^5$
İlaçsız	$3,10 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5$	$3,10 \times 10^5$
1	$1,74 \times 10^5$	$1,38 \times 10^5$	$6,02 \times 10^3$	$1,51 \times 10^4$	$1,21 \times 10^5$
1	$4,50 \times 10^4$	$9,97 \times 10^4$	NEGATİF	$8,81 \times 10^4$	$3,50 \times 10^4$
10	$3,61 \times 10^3$	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
10	$2,12 \times 10^3$	$1,10 \times 10^3$	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

H paternini taşıyan HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 μM 'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.17.'de gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.18. Patern H için fenotipleme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

İlaç Konsantrasyonu (µM)	LAM Viral Yük (IU/ml) ± SS	ADV Viral Yük (IU/ml) ± SS	TDF Viral Yük (IU/ml) ± SS	ENTE Viral Yük (IU/ml) ± SS	FTC Viral Yük (IU/ml) ± SS
İlaçsız	5,53 ± 0,05	5,53 ± 0,05	5,53 ± 0,05	5,53 ± 0,05	5,53 ± 0,05
1	4,95 ± 0,42	5,07 ± 0,10	1,89 ± 2,67	4,56 ± 0,54	4,81 ± 0,38
10	3,44 ± 0,16	1,52 ± 2,15	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine; SS, standart sapma

H paternini taşıyan HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 18.'de gösterilmiştir.

4.5.9 Yabani tip HBV

Çizelge 4.19. Yabani Tip için fenotipleme deneyi sonuçları

İlaç Konsantrasyonu* (µM)	LAM Viral Yük (IU/ml)	ADV Viral Yük (IU/ml)	TDF Viral Yük (IU/ml)	ENTE Viral Yük (IU/ml)	FTC Viral Yük (IU/ml)
İlaçsız	3,09 X10 ⁵	3,09 X10 ⁵	3,09 X10 ⁵	3,09 X10 ⁵	3,09 X10 ⁵
İlaçsız	2,06 X10 ⁵	2,06 X10 ⁵	2,06 X10 ⁵	2,06 X10 ⁵	2,06 X10 ⁵
1	1,13 X10 ⁴	1,48 X10 ⁴	6,03 X10 ³	2,73 X10 ⁴	7,76 X10 ³
1	7,74 X10 ⁴	6,03 X10 ⁴	7,40 X10 ²	NEGATİF	1,02 X10 ⁴
10	NEGATİF	3,29 X10 ³	NEGATİF	NEGATİF	1,22 X10 ³
10	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	2,82 X10 ²
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

*Her doz için çift çalışma yapılmıştır. Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

Yabani tip HBV genomlarının hücre kültürlerinde ekspresyonu sırasında hücrelere 1, 10 ve 100 µM'lık lamivudine, adefovir dipivoksil, tenofovir, entecavir ve embtricitabine ilaçları verilmiştir. Beşinci gün sonunda hücre süpernatantında elde edilen HBV DNA değerleri Çizelge 4.19.'de gösterilmiştir. Her ilaç dozu için çalışma 2 kere tekrarlanmıştır.

Çizelge 4.20. Yabani tip HBV fenotiplenme deneyi sonuçlarının logaritmik gösterimi

Yabani tip	LAM Viral yük/ ss	ADV	TDF	ENTE	FTC
İlaçsız	5,40 ± 0,12	5,40 ± 0,12	5,40 ± 0,12	5,40 ± 0,12	5,40 ± 0,12
1	4,47 ± 0,59	4,48 ± 0,43	3,32 ± 0,64	2,22± 3,14	3,95± 0,08
10	NEGATİF	1,76± 2,49	NEGATİF	NEGATİF	2,77± 0,45
100	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF	NEGATİF

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

4.6. IC50 Değerlerinin Hesaplanması

Çizelge 4.21. Hesaplanan IC50 değerleri

HBV	LAM (µM)	ADV (µM)	TDF (µM)	ENTE (µM)	FTC (µM)
Yabani tip	0,24	0,63	0,04	0,12	0,26
Patern A	>1000	13,04	0,03	3,65	>1000
Patern B	2,21	17,62	0,01	0,40	2,54
Patern C	1,64	2,24	0,03	0,01	1,38
Patern D	1,55	1,88	0,04	0,01	2,80
Patern E	1,41	1,99	0,01	0,11	1,47
Patern F	0,01	0,67	0,06	0,10	0,06
Patern G	0,26	0,70	0,19	0,09	0,12
Patern H	0,97	0,82	0,01	0,23	0,29

Lam, Lamivudine; ADV, adefovir dipivoksil; TDF, tenofovir; ENTE, entecavir; FTC, embtricitabine

Yabancıl tip HBV genomlarının in vitro fenotipleme deneylerinde beşinci gün sonunda ölçülen HBV DNA değerleri ve çiftli çalışılan bu değerlerin standart sapmaları ise logaritmik olarak Çizelge 4. 21.'de gösterilmiştir.

Çizelge 4.22. Hesaplanan misli direnç (FR) değerleri

HBV	LAM		ADV		TDF		ENTE		FTC	
	FR	IC50	FR	IC50	FR	IC50	FR	IC50	FR	IC50
Yabancıl tip	1,00	0,24	1,00	0,63	1,00	0,04	1,00	0,12	1,00	0,26
Patern A	>1000	>1000	20,70	13,04	0,75	0,03	30,4	3,65	>1000	>1000
Patern B	9,21	2,21	27,97	17,62	0,25	0,01	3,3	0,40	9,77	2,54
Patern C	6,83	1,64	3,56	2,24	0,75	0,03	0,08	0,01	5,31	1,38
Patern D	6,45	1,55	2,98	1,88	1,00	0,04	0,08	0,01	10,77	2,80
Patern E	5,90	1,41	3,16	1,99	0,25	0,01	0,92	0,11	5,65	1,47
Patern F	0,04	0,01	1,06	0,67	1,50	0,06	0,83	0,10	0,23	0,06
Patern G	1,08	0,26	1,11	0,70	0,48	0,19	0,75	0,09	0,46	0,12
Patern H	4,04	0,97	1,30	0,82	0,25	0,01	1,92	0,23	1,11	0,29

IC50 değerlerinin hesaplanmasından sonra elde edilen değerler ile bir mutantın herhangi bir ilaca yabancıl tipe göre kaç misli dirençli olduğu “misli direnç” (FR; Fold Resistance) ile hesaplanabilir. Bu hesaplama mutant IC50 değerinin yabancıl tip IC50 değerine bölünmesi ile yapılır. Çizelge 4.22.'de hesaplanan FR değerleri görülmektedir.

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Günümüzde Hepatit B virüsü enfeksiyonlarının antiviral tedavisinde kullanılan oldukça etkili antiviraller mevcuttur. Bu tedavilerdeki en büyük sorun ise HBV’de meydana gelen mutasyonların kullanılan antiviral ilaçlara karşı direnç oluşumuna neden olmasıdır. HBV ile enfekte bir hastanın hepatositlerinde, genomlarının değişik yerlerinde değişik mutasyonlara sahip HBV varyantları bir arada bulunur. Hepatositlerde bulunan bu viral genetik heterojenite “quasispecies” ya da türümsü olarak adlandırılır. Antiviral ajanların temel hedefi aktif replikasyon basmağının yani uzayan zincirin sonlandırılmasıdır. Antiviral ajanların varlığında HBV replikasyonunun baskılanabilmesine rağmen, enfekte hepatositlerin çekirdeğinde bulunan ve HBV replikasyonu sırasında viral mRNA’nın transkripsiyonunda kalıp görevi gören cccDNA havuzunun temizlenmesi söz konusu değildir. Teknoloji ve bilim ilerledikçe cccDNA hakkında toplanılan bilgiler yeni ilaç ve tedavi yöntemlerinin ortaya çıkmasında faydalı olacaktır (Sohn et. al 2009, Levrero et al. 2009, Belloni et al. 2009, Dropulic and Cohen 2010, Sato and Mori 2010). HBV cccDNA havuzunun hepatositlerin çekirdeğinde sürekli var olmasından dolayı kronik HBV’li hastalarda HBV replikasyonunun sürekli baskılanabilmesi için uzun süreli antiviral tedavilere ihtiyaç vardır. Uzun süreli tedavinin en büyük dezavantajı, viral polimerazın hata yapma sıklığından dolayı ortaya çıkan ilaç dirençli mutantların seçilmesidir (Zoulim 2004). Bu seçim sonucunda dirençli HBV varyantları var olan “quasispecies” içerisinde majör hale geçer. Bu yüzden HBV enfeksiyonlarının antiviral tedavisinde tedavi öncesinde ve sürecinde tedavi rejiminin değişmesiyle birlikte viral havuzda seçilebilecek ve majör HBV varyantı konumuna geçebilecek olası direnç mutasyonlu minör HBV varyantların tespiti çok önemlidir.

HBV replikasyonunun dinamik yapısından dolayı tedavi sürecinde virüse uygulanan selektif baskıdan dolayı zamanla yeni dirençli virüs varyantlarının ortaya çıkması oldukça olası görünmektedir. Bu yüzden araştırmacılar sürekli HBV enfeksiyonunun tedavisinde yeni yöntemler araştırmaktadır. Bunlardan bir tanesi olan RNA interferans HBV’nin birbiri üzerine çakışan genom yapısından dolayı direnç mutasyon sorunu olmadan HBV enfeksiyonlarının tedavisinde kullanmak açısından oldukça ümit vericidir. (Kayhan et al. 2007, Wilson et al 2009).

Direnç mutasyonlarının belirleme yöntemlerinin başında DNA dizi analizi yöntemi gelir. Fakat DNA dizi analizi yöntemi ile viral havuzda bulunan bir varyant toplam popülasyonun %20'sinden az ise DNA dizileme yöntemi ile tespit edilemez. Teknolojinin ilerlemesiyle viral havuzda bulunan tüm varyantları daha duyarlı bir şekilde tespit etmeye yarayan yöntemler de geliştirilmektedir (Fang et al. 2009, Ntziora et al. 2010).

Bu çalışmada hasta serumundan elde edilen HBV DNA'nın klonal analizi yapıldı. Bu işlem için hastanın 8 farklı tarihteki 8 farklı serumundan elde edilen HBV DNA'lar "long PCR" yöntemi ile HBV tüm genom olarak çoğaltılmaya çalışıldı fakat 2 serumdan elde edilen örneklerde amplifikasyon gerçekleşmedi ve çalışma dışında bırakıldı (Çizelge 5.1.) Yapılan klonlamalarda mümkün olduğunca çok sayıda klon elde ederek, viral havuzda bulunan minör varyantlar da bu yöntemle klonlanmaya çalışıldı. Çizelge 5.1.'de klonal analiz sırasında elde edilen 434 adet klonun serum tarihlerine göre dağılımı görülmektedir.

Çizelge 5.1. Klonal analiz sırasında elde edilen klon sayıları

Serum Tarihi	Antiviral ilaç	Toplam Klon sayısı
29.09.2004	Adefovir	60
23.03.2005	Adefovir	46
02.06.2005	Adefovir	Amplifikasyon gerçekleşmedi.
30.11.2005	Adefovir	Amplifikasyon gerçekleşmedi.
28.07.2006	Adefovir	72
28.03.2007	Adefovir	85
06.11.2007	Adefovir Entecavir	79
04.01.2008	Adefovir Entecavir	92

Yeterli sayıda klon elde edilerek viral havuzda bulunan minör varyantların tespit edilebilmesi olasıdır. Klonal analizin bir başka avantajı ise saptanan mutasyonların aynı genom üzerinde yerleşip yerleşmediğinin tespit edilmesini sağlar. Serumdan elde edilen HBV DNA'nın direkt DNA dizi analizi ile tespit edilen mutasyonlar, amplifikasyon

sırasında havuzda bulunan tüm varyantlar çoğaltıldığı için, farklı HBV genomları üzerinde olabilir. Klonal analizde ise her bir vektöre tek bir HBV genomu girebileceği için elde edilen klonların DNA dizi analizi yapıldığı zaman, bulunan mutasyonlar aynı genom üzerinde yerleşmekte anlamına gelmektedir. Örneğin Çizelge 4.2.'de özetlenen mutasyon paternlerinden patern F, G ve H aynı serumdan elde edilen farklı viral varyantlardır. Serumdan direkt DNA dizi analizi yapıldığı zaman L80V, L91I ve H124Y mutasyonları tespit edilebilirken, patern F'nin L80V ve L91I mutasyonlarını, patern G'nin ise L91I mutasyonunu taşımadığı klonal analiz ile tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen ve hücre kültüründe test edilen tüm klonların taşıdığı HBV tüm genomların viral polimeraz bölgesi dışında herhangi bir bölgede mutasyon taşıyıp taşımadığı DNA dizi analizi yöntemi ile belirlendi (Şekil 4.10 ve Şekil 4.11).

Tespit edilen farklı mutasyon paternlerinin ilaç duyarlılık testleri hücre kültürlerinde *in vitro* fenotipleme adı verilen deneylerle yapılmaktadır (Zhu et al. 2007). Bu deney düzeneği kısaca HBV tüm genomlarının uygun ekspresyon vektörlerine klonlanmasından sonra HBV ekspresyonlarına izin veren hücre kültür sistemlerine transfekte edilmesi ve ardından da test edilecek ilaçların verilmesi olarak özetlenebilir. Bu çalışma, daha önce HBV ekspresyonunu gerçekleştirebildiği kanıtlanmış (Yang et al. 2004) PHY106 ekspresyon vektörü ile Huh7 hücre kültür sisteminde gerçekleştirildi. Huh7 hücrelerinde yapılan ekspresyon deneylerinde HBV ekspresyonunun transfeksiyondan 5 gün sonra plato yaptığı Şekil 4.15.'te gösterilmiştir. Dolayısıyla verilen antiviraller HBV DNA ekstraksiyonu yapmak için hücre süpernatantının toplanması açısından en uygun günün 5. gün olduğuna karar verildi ve HBV DNA'nın kantitatif olarak Real Time PCR ile tespit edilmesi açısından 5. günün sonunda hücre süpernatantları toplandı.

In vitro fenotipleme deneyi sonuçları incelendiğinde bu çalışmada çıkan en çarpıcı sonuç olarak A Paternini taşıyan HBV genomlarının yabancı tip HBV genomlarına göre entecavire 30,4 kat daha direçli olduğu Çizelge 4.22.'de gösterilmiştir. IC50 hesaplamalarına göre yabancı tip virüsün replikasyonunu baskılamak için 0.12 μ M'lık entecavir yeterli olurken A paternini taşıyan HBV genomunda aynı baskılama 3,65 μ M ile yapılabilmektedir. İlginç olan A paterni içerisinde daha önce tanımlanmış olan rtI169, rtT184, rtS202, veya rtM250 entecavir mutasyonlarından hiç birinin bulunmamasıdır. Bu patern içerisinde bulunan L80V ve L91I mutasyonları kompensatuar mutasyonlar olarak

tanımlanmışken M204I lamivudine, N238D ise adefovir için direnç mutasyonu olarak belirtilmiştir (Melegari et al. 1998, Angus et al 2003, Warner et al. 2007). S219A ve Y145H mutasyonları için ise herhangi bir direnç daha önce belirtilmemiştir. Aynı mutasyon paterni lamivudine, adefovir ve embtricitabine için yabancı tipe göre sırasıyla >1000, 20.70 ve >1000 kat daha dirençli olarak bulunmuştur. Patern içerisinde bulunan M204I ve N238D mutasyonları göz önüne alındığında bu beklenen bir sonuçtur.

In vitro fenotipleme deneyinin sonuçlarına göre test edilen mutasyon paternlerinin hiç birisi tenofovire dirençli değildir. Çizelge 4.22.'de sadece F paternini taşıyan HBV genomlarının yabancı tip virüse göre tenofovire 1,5 kat dirençli olduğu görülmektedir fakat bu paterni taşıyan HBV varyantlarının replikasyonunun %50'sini baskılamak için gereken tenofovir dozunun 0,60 olduğu göz önüne alındığında dirençten söz etmek mümkün değildir.

Patern B üzerinde L80V kompensatuar mutasyonun yanı sıra, rtN236T, rtN238D adefovir direnç mutasyonları ve hem adefovir hem de lamivudine direnç gösterebilen rtA181V çapraz direnç mutasyonu bulunmaktadır. Bu patern üzerindeki rtN236T ve rtN238D mutasyonlardan dolayı en yüksek direnci adefovire karşı göstermiş ve yabancı tipe göre 27,97 kat dirençli olduğu Çizelge 4.22.'de gösterilmiştir. Üzerindeki A181V çapraz direnç mutasyonundan dolayı lamivudine ve embtricitabine yabancı tipe göre sırasıyla 9,21 ve 9,77 kat direnç belirlenmiştir (Çizelge 4.22.). Aynı patern entecavire yabancı tipe göre 3, kat daha dirençli görünürken IC50 değerinin 0,40 µM olarak saptanması bu paterni taşıyan HBV varyantlarının replikasyonunun düşük entecavir dozlarıyla baskılanabileceği göstermektedir (Çizelge 4.22.).

Patern C, D ve E beraber incelendiğinde Çizelge 4.22'de IC50 değerleri ve FR (fold resistance) değerleri arasında bu 3 patern için de benzer değerler elde edilmiştir. Bu 3 patern için saptanılan lamivudine, adefovir ve embtricitabine direnç değerleri muhtemelen A181V çapraz direnç mutasyonundan kaynaklanmaktadır. A181V'nin dışındaki L80V, V112I, N118T ve H124Y gibi diğer mutasyonlar paternler arasında anlamlı bir direnç profili farkı yaratmamıştır.

Yine benzer şekilde patern F, G ve H beraber incelendiğinde, bu 3 patern için de hesaplanan IC50 ve FR değerleri birbirine çok yakındır. Ayrıca bu 3 patern için hesaplanan IC50 değerlerinin düşük olması da bu paternler içerisinde bulunan L80V, L91I

ve H124Y mutasyonlarının tek başlarına test edilen antiviraller için bir direnç oluşturmadıklarını göstermektedir (Çizelge 4.22.)

Bu çalışma ile genomlarında L80V, L91I, M204I, A219S, N238D ve Y245H mutasyonlarını bir arada bulunduran HBV varyantlarının, günümüze kadar tanımlanmış rt169, rt184, rt202 ve rt 250 gibi entecavir mutasyonlarından hiç birine sahip olmamasına rağmen yabancıl tip HBV'ye göre entecavire karşı 30 kat daha dirençli olabileceği gösterilmiştir. Bu mutasyon paterni içerisinde bulunan A219S ve Y245H mutasyonları için literatürde henüz tanımlanmış bir direnç yoktur. Bu 2 mutasyonun tek başlarına direnç profillerinin çıkarılması için, yönlendirilmiş mutagenез ile yabancıl tip HBV'nin üzerine bu mutasyonlar tek başlarına yerleştirilmeli ve *in vitro* fenotipleme yöntemi ile direnç profilleri çıkarılmalıdır.

KAYNAKLAR

Amini-Bavil-Olyaei, S., Herbers, U., Sheldon, J., Luedde, T., Trautwein, C., Tacke, F. 2009. The rtA194T polymerase mutation impacts viral replication and susceptibility to tenofovir in hepatitis B e antigen-positive and hepatitis B e antigen-negative hepatitis B virus strains. *Hepatology*, 49; 1158–1165.

Angus, P., Vaughan, R., Xiong, S., Yang, H., Delaney, W., Gibbs, C., Brosgart, C., Colledge, D., Edwards, R., Ayres, A., Bartholomeusz, A., Locarnini, S. 2003. Resistance to adefovir dipivoxil therapy associated with the selection of a novel mutation in the HBV polymerase. *Gastroenterology*, 125; 292-7.

Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Robertson, B. H., Magnius, L. O. 2002. Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. *J Gen Virol*, 83(Pt 8); 2059-73.

Argos, P., Fuller, S. D. 1988. A model for the hepatitis B virus core protein: prediction of antigenic sites and relationship to RNA virus capsid proteins. *EMBO J*, 7; 819-24.

Ayoub, W. S., Keeffe, E. B. 2008. Review article: current antiviral therapy of chronic hepatitis B. *Aliment Pharmacol Ther*, 28(2); 167-77.

Barrera, A., Guerra, B., Notvall, L., Lanford, R. E. 2005. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol*, 79(15); 9786-98.

Bchini, R., Capel, F., Dauguet, C., Dubanchet, S., Petit, M. A. 1990. In vitro infection of human hepatoma (HepG2) cells with hepatitis B virus. *J. Virol.*, 64; 3025-32.

Beasley RP, Alter HJ, Brandeau ML. Institute of Medicine: Hepatitis and Liver Cancer: A National Strategy for Prevention and Control of Hepatitis B and . In: Colvin HM, Mitchell AE, editors. Washington, DC: National Academies Press; 2010. p. 1–232.

Belloni, L., Pollicino, T., De Nicola, F., Guerrieri, F., Raffa, G., Fanciulli, M., Raimondo, G., Levrero, M. 2009. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 106; 19975–9.

Benhamou, Y., Bochet, M., Thibault, V., Calvez, V., Fievet, M. H., Vig, P., Gibbs, C. S., Brosgart, C., Fry, J., Namini, H., Katlama, C., Poynard, T. 2001. Safety and efficacy of adefovir dipivoxil in patients co-infected with HIV-1 and lamivudine-resistant hepatitis B virus: an open-label pilot study. *Lancet*, 358(9283); 718-23.

Blanchet, M., Sureau, C. 2007. Infectivity determinants of the hepatitis B virus pre-S domain are confined to the N-terminal 75 amino acid residues. *J Virol*, **81**(11); 5841-9.

Blumberg, B. S. 1964. Polymorphisms of the Serum Proteins and the Development of Iso-Precipitins in Transfused Patients. *Bull N Y Acad Med*, 40: 377-386.

Blumberg, B. S., Alter H.J., Visnich S. 1965. A "New" Antigen in Leukemia Sera. *Jama*, 191: 541-6.

Blumberg, B. S., Gerstley, B. J., Hungerford, D.A., London, W. T., Sutnick, A.I. 1967. A serum antigen (Australia antigen) in Down's syndrome, leukemia, and hepatitis. *Ann Intern Med*, 66(5); 924-931.

Bozdayi, A. M., Uzunalimoğlu, O., Türkyilmaz, A. R., Aslan, N., Sezgin, O., Sahin, T., Bozdayi, G., Cinar, K., Pai, S. B., Pai, R., Bozkaya, H., Karayalçin, S., Yurdaydin, C., Schinazi, R. F. 2003. YSDD: a novel mutation in HBV DNA polymerase confers clinical resistance to lamivudine. *J. Viral Hepat.*, 10; 256-65.

Bruss, V. 2004. Envelopment of the hepatitis B virus nucleocapsid. *Virus Res*, **106**(2); 199-209.

Bruss, V., Thomssen, R. 1994. Mapping a region of the large envelope protein required for hepatitis B virion maturation. *J Virol*, **68**(3); 1643-50.

Budkowska, A., Shih, J. W., Gerin, J. L. 1977. Immunochemistry and polypeptide composition of hepatitis B core antigen (HBcAg). *J Immunol*, **118**; 1300-5.

Carman WF, Jacyna MR, Hadziyannis S, Karayiannis P, McGarvey MJ, Makris A, Thomas HC. Mutation preventing formation of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B infection. *Lancet* 1989;**2**:588-91.

Chang, T. T., Chang, T. T., Gish, R. G., de Man, R., Gadano, A., Sollano, J., Chao, Y. C., Lok, A. S., Han, K. H., Goodman, Z., Zhu, J., Cross, A., DeHertogh, D., Wilber, R., Colonna, R., Apelian, D.; BEHoLD AI463022 Study Group. 2006. A comparison of entecavir and lamivudine for HBeAg-positive chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, **354**(10); 1001-10.

Chisari, F. V. 2000. Rous-Whipple Award Lecture. Viruses, immunity, and cancer: lessons from hepatitis B. *Am J Pathol*, **156**(4); 1117-32.

Cooper, A., Shaul, Y. 2006. Clathrin-mediated endocytosis and lysosomal cleavage of hepatitis B virus capsid-like core particles. *J Biol Chem*, **281**(24); 16563-9.

Dane, D. S., Cameron, C. H., Briggs, M. 1970. Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*, **1**(7649); 695-8.

Davis, G. L., Hoofnagle, J. H. 1986. Interferon in viral hepatitis: role in pathogenesis and treatment. *Hepatology*, **6**(5); 1038-41.

Değertekin, H., Kestellioğlu, F. 1986. The prevalence of HbsAg in healthy people and several diseases in Turkey. *Asian Med J*, **29**: 125.

Delaney, W. E. 4th, Edwards, R., Colledge, D., Shaw, T., Torresi, J., Miller, T. G., Isom, H. C., Bock, C. T., Manns, M. P., Trautwein, C., Locarnini, S. 2001. Cross-resistance testing of antihepadnaviral compounds using novel recombinant baculoviruses which encode drug-resistant strains of hepatitis B virus. *Antimicrob Agents Chemother*, 45(6); 1705-13.

Delaney, W., Yang, H., Westland, C., Das, K., Arnold, E., Miller, M. 2002. Functional analysis of rtV173L, an HBV polymerase mutation frequently observed in lamivudine-resistant chronic hepatitis B patients [Abstract]. *Hepatology*, 36; 373A.

Delaney, WE 4th., Edwards, R., Colledge, D., Shaw, T., Torresi, J., Miller, T. G., Isom, H. C., Bock, C. T., Manns, M. P., Trautwein, C., Locarnini, S. 2001. Cross-resistance testing of antihepadnaviral compounds using novel recombinant baculoviruses which encode drug-resistant strains of hepatitis B virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 45; 1705-13.

Dienstag, J. L., Leung, N. W., Chang, T. T., Guan, R., Tai, D. I., Ng, K.Y., Wu, P.C., Dent, J. C., Barber, J., Stephenson, S. L., Gray, D. F. 2003. Histological outcome during long-term lamivudine therapy. *Gastroenterology*, 124(1); 105-17.

Dropulic, L. K., Cohen, J. I. 2010. Update on new antivirals under development for the treatment of double-stranded DNA virus infections. *Clin Pharmacol Ther.*, 88(5);610-9.

Durantel, D., Carrouée-Durantel, S., Werle-Lapostolle, B., Brunelle, M. N., Pichoud, C., Trépo, C., Zoulim, F. 2004. A new strategy for studying in vitro the drug susceptibility of clinical isolates of human hepatitis B virus. *Hepatology*, 40; 855-64.

European Association for the Study of the Liver: EASL Clinical Practice Guidelines. 2009. Management of chronic hepatitis B. *J Hepatol*, 50; 227–242.

Fallows, D. A., Goff, S. P. 1995. Mutations in the epsilon sequences of human hepatitis B virus affect both RNA encapsidation and reverse transcription. *J. Virol.*, 69; 3067-73.

Ferri, C., Govoni, M., Calabrese, L. 2010. The A, B, Cs of viral hepatitis in the biologic era. *Curr Opin Rheumatol.* 22(4); 443-50.

Fang J, Wichroski MJ, Levine SM, Baldick CJ, Mazzucco CE, Walsh AW, Kienzle BK, Rose RE, Pokornowski KA, Colonno RJ, Tenney DJ. Ultrasensitive genotypic detection of antiviral resistance in hepatitis B virus clinical isolates. *Antimicrob Agents Chemother.* 2009 Jul;53(7):2762-72

Franco, A., Paroli, M., Testa, U., Benvenuto, R., Peschle, C., Balsano, F., Barnaba, V. 1992. Transferrin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J Exp Med*, 175(5); 1195-205.

Fu, L., Cheng, Y. C. 2000. Characterization of novel human hepatoma cell lines with stable hepatitis B virus secretion for evaluating new compounds against lamivudine- and penciclovir-resistant virus. *Antimicrob. Agents Chemother.*, 44; 3402-7.

Ganem, D. 1991. Assembly of hepadnaviral virions and subviral particles. *Curr Top Microbiol Immunol*, 168; 61-83.

Gao, W., Hu, J. 2007. Formation of hepatitis B virus covalently closed circular DNA: removal of genome-linked protein. *J Virol*, **81**(12); 6164-74.

Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J. M., Peterson, D. L. 1982. Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins. *J. Biol. Chem.*, 257; 7770-7.

Gerelsaikhan, T., Tavis, J. E., Bruss, V. 1996. Hepatitis B virus nucleocapsid envelopment does not occur without genomic DNA synthesis. *J Virol*, **70**(7); 4269-74.

Ghany, M. G., Doo, E. C. 2009. Antiviral resistance and hepatitis B therapy. *Hepatology*, 49; S174–S184.

Glebe, D., Urban, S., Knoop, E. V., Cag, N., Krass, P., Grün, S., Bulavaite, A., Sasnauskas, K., Gerlich, W. H. 2005. Mapping of the hepatitis B virus attachment site by use of infection-inhibiting preS1 lipopeptides and tupaia hepatocytes. *Gastroenterology*, 129(1); 234-45.

Gocke, D. J., Greenberg, H. B., Kavey, N. B. 1969. Hepatitis antigen. Detection of infectious blood donors. *Lancet*, 2(7614); 248-9.

Gocke, D. J., Kavey, N. B. 1969. "Hepatitis antigen. Correlation with disease and infectivity of blood-donors." *Lancet*, 1(7605); 1055-9.

Guidotti, L. G., Ishikawa, T., Hobbs, M. V., Matzke, B., Schreiber, R., Chisari, F. V. 1996. Intracellular inactivation of the hepatitis B virus by cytotoxic T lymphocytes. *Immunity*, 4(1); 25-36.

Guo, H., Jiang, D., Zhou, T., Cuconati, A., Block, T. M., Guo, J. T. 2007. Characterization of the intracellular deproteinized relaxed circular DNA of hepatitis B virus: an intermediate of covalently closed circular DNA formation. *J Virol*, **81**(22); 12472-84.

Günther, S., Li, B. C., Miska, S., Krüger, D. H., Meisel, H., Will, H. 1995. A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J. Virol.*, 69; 5437-44.

Hadziyannis, S. J., Tassopoulos, N. C., Heathcote, E. J., Chang, T. T., Kitis, G., Rizzetto, M., Marcellin, P., Lim, S. G., Goodman, Z., Ma, J., Arterburn, S., Xiong, S., Currie, G., Brosgart, C. L.; Adefovir Dipivoxil 438 Study Group. 2005. Long-term therapy with

adefovir dipivoxil for HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 352(26); 2673-81.

Hadziyannis, S. J., Vassilopoulos, D. 2001. Hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B. *Hepatology*, 34; 617-24.

Hertogs, K., Leenders, W. P., Depla, E., De Bruin, W. C., Meheus, L., Raymackers, J., Moshage, H., Yap, S. H. 1993. Endonexin II, present on human liver plasma membranes, is a specific binding protein of small hepatitis B virus (HBV) envelope protein. *Virology* 197(2); 549-57.

Hoofnagle, J. H. 1981. Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Annu Rev Med*, 32; 1-11.

Hui, C. K., Lau G. K. 2005. Peginterferon-alpha2a (40 kDa) (Pegasys) for hepatitis B. *Expert Rev Anti Infect Ther*, 3(4); 495-504.

Jardi, R., Buti, M., Rodriguez-Frias, F., Cotrina, M., Costa, X., Pascual, C., Esteban, R., Guardia, J. 1999. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J. Virol Methods.*, 83; 181-7.

Jazayeri, S. M., Alavian, S. M., Carman, W. F. 2010. Hepatitis B virus: origin and evolution. *Journal of Viral Hepatitis*, 17; 229–235.

Kayhan H, Karatayli E, Turkyilmaz AR, Sahin F, Yurdaydin C, Bozdayi AM. 2007. Inhibition of hepatitis B virus replication by shRNAs in stably HBV expressed HEPG2 2.2.15 cell lines. *Arch Virol.*;152(5):871-9.

Kaplan, P. M., Greenman, R. L., Gerin, J. L., Purcell, R. H., Robinson, W.S. 1973. DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J Virol*, 12(5); 995-1005.

- Karatayli, E., Karayalçin, S., Karaaslan, H., Kayhan, H., Türkyilmaz, A. R., Sahin, F., Yurdaydin, C., Bozdayi, A. M. 2007. A novel mutation pattern emerging during lamivudine treatment shows cross-resistance to adefovir dipivoxil treatment. *Antivir Ther.*, 12(5);761-8.
- Kidd-Ljunggren, K., Miyakawa, Y., Kidd, A. H. 2002. Genetic variability in hepatitis B viruses. *J Gen Virol*, 83(Pt 6); 1267-80.
- Kock, J., Schlicht, H. J. 1993. Analysis of the earliest steps of hepadnavirus replication: genome repair after infectious entry into hepatocytes does not depend on viral polymerase activity. *J Virol*, 67(8); 4867-74.
- Kondo, J., Shimomura, H., Fujioka, S., Iwasaki, Y., Takagi, S., Ohnishi, Y., Tsuji, H., Sakaguchi, K., Yamamoto, K., Tsuji, T. 2002. Mutations in the hepatitis B virus preS2 region and abrogated receptor activity for polymerized human albumin. *Acta Med Okayama*, 56(4); 193-8.
- Korenman, J., Baker, B., Waggoner, J., Everhart, J. E., Di Bisceglie, A. M., Hoofnagle, J. H. 1991. Long-term remission of chronic hepatitis B after alpha-interferon therapy. *Ann Intern Med*, 114(8); 629-34.
- Krugman, S., Giles J. P., Hammond J. 1967. Infectious hepatitis. Evidence for two distinctive clinical, epidemiological, and immunological types of infection. *Jama*, 200(5); 365-373.
- Kuhns, M., Mcnamara, A., Mason, A., Campbell, C., Perrillo, R. 1992. Serum and liver hepatitis B virus DNA in chronic hepatitis B after sustained loss of surface antigen. *Gastroenterology*, 103; 1649-56.

Lada, O., Benhamou, Y., Cahour, A., Katlama, C., Poynard, T., Thibault, V. 2004. In vitro susceptibility of lamivudine-resistant hepatitis B virus to adefovir and tenofovir. *Antivir. Ther.*, 9; 353-63.

Lai, C. L., Dienstag, J., Schiff, E., Leung, N. W., Atkins, M., Hunt, C., Brown, N., Woessner, M., Boehme, R., Condey, L. 2003. Prevalence and clinical correlates of YMDD variants during lamivudine therapy for patients with chronic hepatitis B. *Clin Infect Dis*, 36(6); 687-96.

Lai, C. L., R. N. Chien, et al. (1998). "A one-year trial of lamivudine for chronic hepatitis B. Asia Hepatitis Lamivudine Study Group." *N Engl J Med* **339**(2): 61-8.

Lai, C. L., Shouval, D., Lok, A. S., Chang, T. T., Cheinquer, H., Goodman, Z., DeHertogh, D., Wilber, R., Zink, R. C., Cross, A., Colonna, R., Fernandes, L.; BEHoLD AI463027 Study Group. 2006. Entecavir versus lamivudine for patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *N Engl J Med*, 354(10); 1011-20.

Lai, L., Hui, C. K., Leung, N., Lau, G. K. 2006. Pegylated interferon alpha-2a (40 kDa) in the treatment of chronic hepatitis B. *Int J Nanomedicine*, 1(3); 255-62.

Lau, D. T., Everhart, J., Kleiner, D. E., Park, Y., Vergalla, J., Schmid, P., Hoofnagle, J. H. 1997. Long-term follow-up of patients with chronic hepatitis B treated with interferon alfa. *Gastroenterology*, 113(5); 1660-7.

Leistner, C. M., Gruen-Bernhard, S., Glebe, D. 2008. Role of glycosaminoglycans for binding and infection of hepatitis B virus. *Cell Microbiol*, 10(1); 122-33.

Lenhoff, R. J., Summers, J. 1994. Coordinate regulation of replication and virus assembly by the large envelope protein of an avian hepadnavirus. *J Virol*, **68**(7); 4565-71.

Lepere, C., Regeard, M., Le Seyec, J., Gripon, P. 2007. The translocation motif of hepatitis B virus envelope proteins is dispensable for infectivity. *J Virol*, **81**(14); 7816-8.

Leung, N. W., Lai, C. L., Chang, T. T., Guan, R., Lee, C. M., Ng, K. Y., Lim, S. G., Wu, P. C., Dent, J. C., Edmundson, S., Condeay, L. D., Chien, R. N.; Asia Hepatitis Lamivudine Study Group. 2001. Extended lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B enhances hepatitis B e antigen seroconversion rates: results after 3 years of therapy. *Hepatology*, **33**(6); 1527-32.

Levrero, M., Pollicino, T., Petersen, J., Belloni, L., Raimondo, G., Dandri, M. 2009. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol*, **51**; 581-92.

Liang, T. J. 2009. Hepatitis B: the virus and disease. *Hepatology*, **49** (5 Suppl); S13-S21.

Lin, S. M., Yu, M. L., Lee, C. M., Chien, R. N., Sheen, I. S., Chu, C. M., Liaw, Y. F. 2007. Interferon therapy in HBeAg positive chronic hepatitis reduces progression to cirrhosis and hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*, **46**(1); 45-52.

Lok, A. S., Heathcote, E. J., Hoofnagle, J. H. 2001. Management of hepatitis, B 2000, summary of a workshop. *Gastroenterology*, **120**; 1828-53.

Lok, A. S., Lai, C. L., Leung, N., Yao, G. B., Cui, Z. Y., Schiff, E. R., Dienstag, J. L., Heathcote, E. J., Little, N. R., Griffiths, D. A., Gardner, S. D., Castiglia, M. 2003. Long-term safety of lamivudine treatment in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, **125**(6); 1714-22.

Lok, A. S., McMahon, B. J. 2007. Chronic hepatitis B. *Hepatology*, **45**(2); 507-39.

Machida, A., Kishimoto, S., Ohnuma, H., Miyamoto, H., Baba, K., Oda, K., Nakamura, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M. 1983. A hepatitis B surface antigen polypeptide (P31) with the receptor for polymerized human as well as chimpanzee albumins. *Gastroenterology*, **85**(2); 268-74.

Mason, W. S., Halpern, M. S., England, J. M., Seal, G., Egan, J., Coates, L., Aldrich, C., Summers, J. 1983. Experimental transmission of duck hepatitis B virus. *Virology*, 131(2); 375-84.

Mehdi, H., Kaplan, M. J., Anlar, F. Y., Yang, X., Bayer, R., Sutherland, K., Peeples, M. E. 1994. Hepatitis B virus surface antigen binds to apolipoprotein H. *J Virol*, 68(4); 2415-24.

Mehdi, H., Yang, X., Peeples, M. E. 1996. An altered form of apolipoprotein H binds hepatitis B virus surface antigen most efficiently. *Virology*, 217(1); 58-66.

Melegari, M., Scaglioni, P. P., Wands, J. R. 1998. Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology*, 27; 628-33.

Miller, R. H., Marion, P. L., Robinson, W. S. 1984. Hepatitis B viral DNA-RNA hybrid molecules in particles from infected liver are converted to viral DNA molecules during an endogenous DNA polymerase reaction. *Virology*, 139(1); 64-72.

Miyakawa, Y., Mizokami, M. 2003. Classifying hepatitis B virus genotypes. *Intervirology*, 46; 329-338.

Neurath, A. R., Kent, S. B., Strick, N., Parker, K. 1986. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell*, 46(3); 429-36.

Norder, H., Courouce, A. M., Magnius, L. O. 1994. Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology*, 198(2); 489-503.

Ntziora F, Paraskevis D, Haida C, Magiorkinis E, Manesis E, Papatheodoridis G, Manolakopoulos S, Beloukas A, Chrysosoy S, Magiorkinis G, Sypsa V, Hatzakis A. Quantitative detection of the M204V hepatitis B virus minor variants by amplification refractory mutation system real-time PCR combined with molecular beacon technology. *J Clin Microbiol*. 2009 Aug;47(8):2544-50.

Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R. I., Imai, M., Miyakawa, Y., Mayumi, M. 1988. Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J Gen Virol*, 69; 2575-83.

Papatheodoridis, G. V., Manesis, E., Hadziyannis, S. J. 2001. The long-term outcome of interferon-alpha treated and untreated patients with HBeAg-negative chronic hepatitis B. *J Hepatol.*, 34; 306-13.

Paran, N., Geiger, B., Shaul, Y. 2001. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. *Embo J*, 20(16); 4443-53.

Park, J. Y., Ahn, S. H., Kim, D. Y., Cho, M., Han, K. H., Lee, H. J., Tak, Y. Y., Um, S. H., Heo, J. 2009. Randomized, open-labelled study evaluating the antiviral efficacy, safety, and tolerability of continuing lamivudine therapy or switching to entecavir in subjects with chronic hepatitis B with detectable HBV DNA (HBV DNA $\geq 10^6$ IU/ml by PCR) while on lamivudine for at least 6 months: interim analysis at 48 weeks. *Kor J Hepatol*, 15;S44.

Perrillo, R., Schiff, E., Yoshida, E., Statler, A., Hirsch, K., Wright, T., Gutfreund, K., Lamy, P., Murray, A. 2000. Adefovir dipivoxil for the treatment of lamivudine-resistant hepatitis B mutants. *Hepatology*, 32(1); 129-34.

Peterson D. L. 1987. The structure of hepatitis B surface antigen and its antigenic sites. *Bioessays*, 6; 258-62.

Peterson, D. L. 1981. Isolation and characterization of the major protein and glycoprotein of hepatitis B surface antigen. *J. Biol. Chem.*, 256; 6975-83.

Petit, M. A., Capel, F., Dubanchet, S., Mabit, H. 1992. PreS1-specific binding proteins as potential receptors for hepatitis B virus in human hepatocytes. *Virology*, 187(1); 211-22.

Pontisso, P., Ruvoletto, M. G., Gerlich, W. H., Heermann, K. H., Bardini, R., Alberti, A. 1989. Identification of an attachment site for human liver plasma membranes on hepatitis B virus particles. *Virology*, 173(2); 522-30.

Prince, A. M. 1968. An antigen detected in the blood during the incubation period of serum hepatitis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 60(3); 814-821.

Qi, X., Snow, A., Thibault, V., Zhu, Y., Curtis, M., Hadziyannis, S. J., Brosgart, C. L., Currie, G., Arterburn, S., Gibbs, C. S., Miller, M. D., Xiong, S. 2004. Long-term incidence of adefovir dipivoxil (adv) resistance in chronic hepatitis b (chb) patients after 144 weeks of therapy, EASL. Abstract.

Rabe, B., Vlachou, A., Panté, N., Helenius, A., Kann, M. 2003. Nuclear import of hepatitis B virus capsids and release of the viral genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100(17); 9849-54.

Radziwill, G., Tucker, W., Schaller, H. 1990. Mutational analysis of the hepatitis B virus P gene product: domain structure and RNase H activity. *J Virol*, 64(2); 613-20.

Robinson, W. S., Clayton, D. A., Greenman, R. L. 1974. DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, 14(2); 384-91.

Robinson, W. S., Greenman, R. L. 1974. DNA polymerase in the core of the human hepatitis B virus candidate. *J Virol*, 13(6); 1231-6.

Sato, K., Mori, M. 2010. Current and novel therapies for hepatitis B virus infection. *Mini Rev Med Chem.*, 10(1); 20-31.

Schulze, A., Gripon, P., Urban, S. 2007. Hepatitis B virus infection initiates with a large surface protein-dependent binding to heparan sulfate proteoglycans. *Hepatology*, 46(6); 1759-68.

Seeger, C., Ganem, D., Varmus, H. E. 1986. Biochemical and genetic evidence for the hepatitis B virus replication strategy. *Science*, 232(4749); 477-84.

Seeger, C., Maragos, J. 1990. Identification and characterization of the woodchuck hepatitis virus origin of DNA replication. *J Virol*, 64(1); 16-23.

Seeger, C., Maragos, J. 1991. Identification of a signal necessary for initiation of reverse transcription of the hepadnavirus genome. *J Virol*, 65(10); 5190-5.

Seeger, C., Mason, W. S. 2000. Hepatitis B Virus Biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, p. 51-68.

Seifer, M., Hamatake, R. K., Colonno, R. J., Standring, D. N. 1998. In vitro inhibition of hepadnavirus polymerases by the triphosphates of BMS-200475 and lobucavir. *Antimicrob Agents Chemother*, 42(12); 3200-8.

Sheen, I. S., Liaw, Y. F., Tai, D. I., Chu, C. M. 1985. Hepatic decompensation associated with hepatitis B e antigen clearance in chronic type B hepatitis. *Gastroenterology*, 89; 732-5.

Sohn, J. A., Litwin, S., Seeger, C. 2009. Mechanism for CCC DNA synthesis in hepadnaviruses. *PLoS One*, 4; e8093.

Stoeckl, L., Funk, A., Kopitzki, A., Brandenburg, B., Oess, S., Will, H., Sirma, H., Hildt, E. 2006. Identification of a structural motif crucial for infectivity of hepatitis B viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(17); 6730-4.

Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Fried, M., Schinazi, R. F., Rossau, R. 2000. A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *J Gen Virol*, 81(Pt 1); 67-74.

Stuyver, L., Van Geyt, C., De Gendt, S., Van Reybroeck, G., Zoulim, F., Leroux-Roels, G., Rossau, R. 2000. Line probe assay for monitoring drug resistance in hepatitis B virus-infected patients during antiviral therapy. *J. Clin. Microbiol.*, 38; 702-7.

Summers, J., Mason, W. S. 1982. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*, 29(2); 403-15.

Summers, J., O'Connell, A., Millman, I. 1975. Genome of hepatitis B virus: restriction enzyme cleavage and structure of DNA extracted from Dane particles. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 72(11); 4597-601.

Takahashi, K., Machida, A., Funatsu, G., Nomura, M., Usuda, S., Aoyagi, S., Tachibana, K., Miyamoto, H., Imai, M., Nakamura, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M. 1983. Immunochemical structure of hepatitis B e antigen in the serum. *J Immunol*, 130(6); 2903-7.

Tan, J., Degertekin, B., Wong, S. N., Husain, M., Oberhelman, K., Lok, A. S. 2008. Tenofovir monotherapy is effective in hepatitis B patients with antiviral treatment failure to adefovir in the absence of adefovir-resistant mutations. *J Hepatol*, 48(3); 391-8.

Tassopoulos, N. C., Volpes, R., Pastore, G., Heathcote, J., Buti, M., Goldin, R. D., Hawley, S., Barber, J., Condreay, L., Gray, D. F. 1999. Efficacy of lamivudine in patients

with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology*, 29(3); 889-96.

Tenney, D. J., Levine, S. M., Rose, R. E., Walsh, A. W., Weinheimer, S. P., Discotto, L., Plym, M., Pokornowski, K., Yu, C. F., Angus, P., Ayres, A., Bartholomeusz, A., Sievert, W., Thompson, G., Warner, N., Locarnini, S., Colonno, R. J. 2004. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother*, 48(9); 3498-507.

Tenney, D. J., Rose, R. E., Baldick, C. J., Pokornowski, K. A., Eggers, B. J., Fang, J., Wichroski, M. J., Xu, D., Yang, J., Wilber, R. B., Colonno, R. J. 2009. Longterm monitoring shows hepatitis B virus resistance to entecavir in nucleoside-naïve patients is rare through 5 years of therapy. *Hepatology*, 49; 1503–1514.

Tiollais, P., Pourcel, C., Dejean, A. 1985. The hepatitis B virus. *Nature*, 317; 489-95.

Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Dienes, H. P., Gerken, G. 1997. Receptor-mediated entry of hepatitis B virus particles into liver cells. *Arch Virol*, 142(3); 493-8.

Treichel, U., Meyer zum Buschenfelde, K. H., Stockert, R. J., Poralla, T., Gerken, G. 1994. The asialoglycoprotein receptor mediates hepatic binding and uptake of natural hepatitis B virus particles derived from viraemic carriers. *J Gen Virol*, 75; 3021-9.

Tsiang, M., Rooney, J. F., Toole, J. J., Gibbs, C. S. 1999. Biphasic clearance kinetics of hepatitis B virus from patients during adefovir dipivoxil therapy. *Hepatology*, 29; 1863–1869.

Tuttleman, J. S., Pourcel C., Summers, J. 1986. Formation of the pool of covalently closed circular viral DNA in hepadnavirus-infected cells. *Cell*, 47(3); 451-60.

Valenzuela, P., Gray, P., Quiroga, M., Zaldivar, J., Goodman, H. M., Rutter, W. J. 1979. Nucleotide sequence of the gene coding for the major protein of hepatitis B virus surface antigen. *Nature*, 280(5725); 815-9.

van Bommel, F., Zöllner, B., Sarrazin, C., Spengler, U., Hüppe, D., Möller, B., Feucht, H. H., Wiedenmann, B., Berg, T. 2006. Tenofovir for patients with lamivudine-resistant hepatitis B virus (HBV) infection and high HBV DNA level during adefovir therapy. *Hepatology*, 44(2); 318-25.

Warner N, Locarnini S, Kuiper M, Bartholomeusz A, Ayres A, Yuen L, Shaw T. The L80I substitution in the reverse transcriptase domain of the hepatitis B virus polymerase is associated with lamivudine resistance and enhanced viral replication in vitro. *Antimicrob Agents Chemother*. 2007 Jul;51(7):2285-92.

Will, H., Reiser, W., Weimer, T., Pfaff, E., Büscher, M., Sprengel, R., Cattaneo, R., Schaller, H. 1987. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol*, 61(3); 904-11.

Wilson R, Purcell D, Netter HJ, Revill PA. 2009. Does RNA interference provide new hope for control of chronic hepatitis B infection? *Antivir Ther*;14:879–89.

Wong, D. K., Cheung, A. M., Waggoner, J., Everhart, J. E., Di Bisceglie, A. M., Hoofnagle, J. H. 1993. Effect of alpha-interferon treatment in patients with hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B. A meta-analysis. *Ann Intern Med*, 119(4); 312-23.

World Health organisation 2008, <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>.

Xiong, X., Flores, C., Yang, H., Toole, J. J., Gibbs, C. S. 1998. Mutations in hepatitis B DNA polymerase associated with resistance to lamivudine do not confer resistance to adefovir in vitro. *Hepatology*, 28; 1669–1673.

Yaginuma, K., Shirakata, Y., Kobayashi, M., Koike, K. 1987. Hepatitis B virus (HBV) particles are produced in a cell culture system by transient expression of transfected HBV DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 84; 2678-82.

Yang, H., Westland, C., Xiong, S., Delaney, W. E. 4th. 2004. In vitro antiviral susceptibility of full-length clinical hepatitis B virus isolates cloned with a novel expression vector. *Antiviral Res.*, 61; 27-36.

Zhu Y, Curtis M, Snow-Lampart A, Yang H, Delaney W, Miller MD, Borroto-Esoda K. In vitro drug susceptibility analysis of hepatitis B virus clinical quasispecies populations. *J Clin Microbiol.* 2007 Oct;45(10):3335-41.

Zoulim, F., Saputelli, J., Seeger, C. 1994. Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection in vivo. *J Virol*, 68(3); 2026-30.

Zoulim F. (2004). Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Research*, 64: 1–15.

Zuckerman, A. J., Taylor, P. E. 1969. Persistence of the serum hepatitis (SH-Australia) antigen for many years. *Nature*, 223(5201): 81-2.

Zuckerman, A. J., Thomas H. C. 1998. *Viral hepatitis*. London, Churchill Livingstone.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı: Ersin KARATAYLI

Doğum Yeri: İskenderun

Doğum Tarihi: 15.03.1978

Medeni Hali: Evli

Yabancı Dil: Almanca, İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise: İçel Anadolu lisesi, 1993-1996

Lisans: ODTÜ- Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümü, 1996-2000

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, 2003-2005

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü 2010-

Yayınlar (SCI ve diğer):

Antimicrobial and antiviral screening of novel indole carboxamide and propanamide derivatives. Olgen S, Altanlar N, Karatayli E, Bozdayi M. *Z Naturforsch C*. 2008 Mar-Apr;63(3-4):189-95.

Genetic control of lipids in the mouse cross DU6i x DBA/2. Brockmann GA, Karatayli E, Neuschl C, Stylianou IM, Aksu S, Ludwig A, Renne U, Haley CS, Knott S. *Mamm Genome*. 2007 Nov;18(11):757-66.

A novel mutation pattern emerging during lamivudine treatment shows cross-resistance to adefovir dipivoxil treatment. Karatayli E, Karayalçin S, Karaaslan H, Kayhan H, Türkyılmaz AR, Sahin F, Yurdaydin C, Bozdayi AM. *Antivir Ther*. 2007;12(5):761-8.

Inhibition of hepatitis B virus replication by shRNAs in stably HBV expressed HEPG2 2.2.15 cell lines. Kayhan H, **Karatayli E**, Turkyilmaz AR, Sahin F, Yurdaydin C, Bozdayi AM. Arch Virol. 2007;152(5):871-9. Epub 2007 Jan 25.

The first identified hepatitis B virus vaccine escape mutation in Turkey. Kutlu T, Soycan LY, **Karatayli E**, Turkyilmaz AR, Yurdaydin C, Bozdayi AM. J Clin Virol. 2006 Feb;35(2):201-2.

Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from turkish patients with chronic HBV infection. Bozdayi G, Turkyilmaz AR, Idilman R, **Karatayli E**, Rota S, Yurdaydin C, Bozdayi AM. *J Med Virol.* 2005 Jun 23;76(4):476-481

QTLs for pre- and postweaning body weight and body composition in selected mice. Brockmann GA, **Karatayli E**, Haley CS, Renne U, Rottmann OJ, Karle S. *Mamm Genome.* 2004 Aug;15(8):593-609.15-16