

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**DİRENÇ MUTASYONLARI GÖSTEREN HBV MUTANTLARININ
BELİRLENMESİ VE BU MUTANTLARIN ÇEŞİTLİ ANTİVİRALLERE
KARŞI DİRENÇ PROFİLLERİNİN *İN VİTRO* FENOTİPLEME YÖNTEMİ
İLE KARAKTERİZASYONU**

Esra ÇELİK

YÜKSEK LİSANS TEZİ

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

**ANKARA
2011**

Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI danışmanlığında Esra ÇELİK tarafından hazırlanan bu çalışma 25/01/2011 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı'nda yüksek lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Profesör Doktor A. Mithat BOZDAYI

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı

İmza:



Üye: Profesör Doktor Cihan YURDAYDIN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Anabilim Dalı

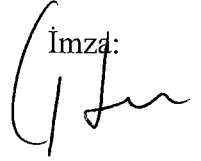
İmza:



Üye: Doçent Doktor Fikret ŞAHİN

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

İmza:



Yukarıdaki sonucu onaylarım

Prof. Dr. Mustafa AKÇELİK

Enstitü MÜDÜRÜ

ÖZET

Direnç mutasyonları gösteren HBV mutantlarının belirlenmesi ve bu mutantların çeşitli antivirallere karşı direnç profillerinin *in vitro* fenotipleme yöntemi ile karakterizasyonu

Dünya popülasyonunun üçte biri hepatit B virüsüne maruz kalmıştır. HBV enfeksiyonu tüm dünyada ve Türkiye’de epidemiyolojik bir problemdir. İlaç direncinin gelişimi antivirallerin uzun vadeli etkinliğini önemli ölçüde sınırlamaktadır. Sıklıkla oluşan ilaca dirençli hepatit B virüsü mutantları, tedavi başarısızlığına ve karaciğer hastalığında ilerlemeye sebep olur.

Çalışmamızda kliniğe başvurmuş serumlarında HBV virüsü tespit edilmiş hastaların, hepatit B virüsü polimeraz gen bölgesinin dizi analizi yapıldı ve mutasyon çeşitlerine göre listelendi. Hasta serumlarından elde edilen HBV DNA, HBV tüm genom olacak şekilde çoğaltıldı ve bir TA vektörüne klonlandı. Elde edilen klonların viral polimeraz bölgesindeki mutasyonlar DNA dizi analizi yöntemiyle tanımlandı. Bulunan mutasyonların ilaç direnç profilleri hücre kültüründe *in vitro* fenotipleme deneyleriyle belirlendi. *In vitro* fenotipleme deneyi ile elde edilen klonlardaki test edilecek mutasyonları taşıyan HBV genomlarının Huh7 hücre kültürlerinde ekspresyonları yapıldı. Bu HBV varyantlarına karşı değişik antivirallerin ekspresyonu baskılama aktiviteleri test edildi ve tespit edilen mutasyon paternlerinin antiviral direnç profilleri ortaya çıkarıldı.

Anahtar kelime: Hepatit B virüsü, *in vitro* fenotipleme

ABSTRACT

Determination of novel HBV mutants and characterization of their resistance profiles against different antivirals using *in vitro* phenotyping method

One third of the world's population has been exposed to hepatitis B virus (HBV). HBV infection is an epidemiological problem throughout the world, including Turkey. Development of drug resistance is a major limitation to the effectiveness of antivirals. Drug resistant hepatitis B virus mutants frequently arise, leading to treatment failure and progression to liver disease.

In this study, sequencing analysis of the polymerase gene region of HBV extracted from serum samples of the patients who had been admitted to our clinics has been done. HBV DNA extracted from serum samples of the patients has been amplified as HBV full genome and cloned into a TA vector. Mutations in the HBV polymerase region of the clones have been identified by DNA sequencing method. Resistance profiles of the identified mutations have been clarified in cell culture using *in vitro* phenotyping assay. Expression of HBV genomes bearing mutations to be tested in *in vitro* phenotyping assays have been done in Huh7 cell cultures. The suppression activity of different antivirals on these HBV variants has been tested and antiviral resistance profile of these mutation patterns has been clarified.

Key Words: Hepatitis B virus, *in vitro* phenotyping

TEŞEKKÜR

Veri elde etmeme ve çalışmalarımı sürdürmeme olanak sağlayan Hocam Prof.Dr. A.Mithat BOZDAYI'ya,

Çalışmalarım boyunca değerli yardım ve katkılarıyla beni yönlendiren Uzm. Ersin KARATAYLI'ya,

Tez çalışmaları ve tezin hazırlanması sırasında desteklerinden dolayı laboratuvar arkadaşarımdan S. Gökçe KABAKCI, Miray AKGÜÇ, S. Ceren Özen KARATAYLI'ya ve Duygu KOYUNCU'ya

Manevi destekleriyle beni hiçbir zaman yalnız bırakmayan sevgili hayat arkadaşım Mehmet Akif ÇELİK'e teşekkürü bir borç bilirim.

Esra Çelik

Ankara, 2011

TEŞEKKÜR

AİLEM'e

İÇİNDEKİLER**Sayfa**

ÖZET.....	i
ABSTRACT.....	ii
TEŞEKKÜR.....	iii
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİLLERİN LİSTESİ.....	viii
ÇİZELGELERİN LİSTESİ.....	ix
KISALTMALAR.....	x
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hepatit B virüsü.....	1
1.2. HBV Virion Yapısı.....	3
1.3. HBV Yaşam Döngüsü.....	7
1.4. HBV Replikasyonu.....	7
1.4.1. Virüsün Hücre İçine Girmesi.....	7
1.4.2. Nukleusda Çift Zincirli DNA Oluşumu.....	8
1.4.3. Pregenomik ve Subgenomik RNA'ların Sentezi.....	9
1.4.4. Viral Kapsidin Sentezi ve HBV Genom Replikasyonu.....	11
1.4.1. Zarfla Çevrilme ve Hücreden Çıkış.....	11
1.5. HBV Mutantları.....	13
1.5.1. P Geni Mutasyonları.....	14
1.5.2. Yüzey Mutasyonları.....	16
1.5.3. Pre-kor/kor Bölgesi Mutasyonları.....	16
1.5.4. X Mutantları.....	17
1.6. Bulaşma Yolları ve Belirtileri.....	17

1.7. HBV Enfeksiyonu Tedavisi.....	18
1.8. Fenotipleme ve Direnç Profilleri	19
1.9. Amaç.....	21
2. Gereçler ve Yöntemler	22
2.1. Gereçler.....	22
2.1.1. Hasta	22
2.1.2. Primerler	22
2.1.3. Kimyasallar.....	23
2.1.4. Enzimler.....	24
2.1.5. Tampon ve Çözeltiler	24
2.1.6. Kullanılan Cihazlar	25
2.1.7. Kullanılan Kitler	25
2.2. Yöntemler	26
2.2.1. Hasta Serumundan Viral DNA İzolasyonu.....	26
2.2.2. Real Time PZR ile HBV DNA'nın Kantitatif Tayini.....	27
2.2.3. HBV DNA'nın Tüm Genomunun PZR ile Çoğaltılması.....	28
2.2.4. PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu.....	30
2.2.4.1. Jelin Hazırlanması ve DNA'nın Jele Yüklenmesi.....	30
2.2.4.2. PZR Ürününün Jelden Ekstraksiyonu	30
2.2.5. HBV Tüm Genom Amplifikasyonlarının Topo-XL Vektörlerine Klonlanması.....	31
2.2.5.1. Kompetent Hücre Hazırlanması.....	31
2.2.5.2. Klonlama Reaksiyonunun Hazırlanması	32
2.2.5.3. Transformasyon.....	32
2.2.5.4. Klonlaması Sonrası Klonların Analizi	33
2.2.6. Büyüyen Kolonilerin PZR ile Kontrolü.....	33

2.2.7. Plazmid DNA ekstraksiyonu	33
2.2.7.1. Plazmidlerin Jelde Görüntülenmesi ve Analizi	34
2.2.8. Pozitif Kolonilerin Dondurulması ve Saklanması	35
2.2.9. DNA Dizi Analizi	35
2.2.9.1. DNA Dizi Analizi PZR'si	35
2.2.9.2. Sekansı yapılan plazmidler içerisindeki tüm HBV genomunun çoğaltılması	36
2.2.9.3. Çoğaltılan HBV tüm genomunun SapI restriksiyon enzimi ile kesilmesi	37
2.2.10. HBV Tüm Genomunun <i>in vitro</i> Sistemde Analizi	38
2.2.10.1. Huh7 Hücre Dizilerinin Çözülmesi	38
2.2.10.2. Huh7 Hücre Dizilerinin Pasajlanması	38
2.2.10.3. Huh7 Hücre Dizilerinin Dondurulması	39
2.2.10.4. Klonlama Ürününün Huh7 Hücrelerine Transfeksiyonu	39
2.2.10.5. Hücre kültüründe test edilen örnekler	40
2.2.10.6. Toplanan Kültür Ortamlarından Viral DNA Ekstraksiyonu	41
2.2.11. <i>In vitro</i> Ortamdaki HBV DNA Replikasyonunun Analizi	41
3. Bulgular	43
3.1. Hastalar	43
3.2. Klonlanan HBV Tüm Genomların Jelde Gösterimi	44
3.3. Plazmidlerin Dizi Analizi	46
3.4. HBV Tüm Genom Klonlama Ürününün <i>in vitro</i> HBV DNA Ekspresyonunun Analizi	49
3.5. Örneklerin <i>in vitro</i> fenotipleme sonuçları	50
4. Tartışma ve Sonuç	55
5. Kaynaklar	58
Ek-1 ÖZGEÇMİŞ	65

ŞEKİLLERİN LİSTESİ

Şekil	Sayfa
Şekil 1.1. HBV elektron mikroskobu görüntüsü.....	1
Şekil 1.2. HBV parikülleri	2
Şekil 1.3. HBV virion yapısı.....	3
Şekil 1.4. HBV genom organizasyonu.....	4
Şekil 1.5. HBV genom yapısı	6
Şekil 1.6. ccc DNA oluşum mekanizması	9
Şekil 1.7. cccDNA'dan transkript ve translasyon ürünleri.....	10
Şekil 1.8. HBV replikasyon döngüsü.....	12
Şekil 1.9. HBV Polimeraz Direnç Mutasyonları	15
Şekil 3.1. PZR amplifikasyon çalışmaları	44
Şekil 3.2. Kanamisin dirençli suşlar.....	45
Şekil 3.3. 440-891 ile hücre PZR jel görüntüsü.....	45
Şekil 3.4. Plazmid ekstraksiyonu jel görüntüsü	46
Şekil 3.5. Mutasyonların dizi analizi görüntüsü	47
Şekil 3.6. GFP ile transfeksiyon	49
Şekil 3.7. Huh 7 hücre kültüründe HBV ekspresyonu.....	50

ÇİZELGELERİN LİSTESİ

Çizelge	Sayfa
Çizelge 1.1. Direnç mutasyonlarında in vitro fenotipleme çalışmaları	20
Çizelge 2.1. Primerler	22
Çizelge 2.2. Kimyasallar	23
Çizelge 2.3. Enzimler	24
Çizelge 2.4. Çözelti ve tamponların içerikleri	24
Çizelge 2.5. Cihazlar	25
Çizelge 2.6. Kitler	25
Çizelge 2.7. RT-PZR reaksiyon içeriği	27
Çizelge 2.8. HBV tüm genom PZR içeriği	28
Çizelge 2.9. En uygun HBV tüm genom PZR içeriği	29
Çizelge 2.10. DNA dizi analizi reaksiyon içeriği	36
Çizelge 2.11. Tüm genom amplifikasyon içeriği	37
Çizelge 2.12. SapI kesim reaksiyon içeriği	37
Çizelge 2.13. Test edilen mutasyonlar ve antiviraller	40
Çizelge 2.14. RT PZR içeriği	41
Çizelge 3.1. Mutasyonlar	46
Çizelge 3.2. Örnek A (2-11) fenotipleme sonuçları	51
Çizelge 3.3. Örnek B (18-5) fenotipleme sonuçları	51
Çizelge 3.4. Örnek C (10-10) fenotipleme sonuçları	52
Çizelge 3.5. Örnek D (3A-41) fenotipleme sonuçları	52
Çizelge 3.6. Örnek E (3A-13) fenotipleme sonuçları	53
Çizelge 3.7. Yabancıl tip HBV'nin fenotipleme sonuçları	53
Çizelge 3.8. IC 50 ve FR değerleri	54

SİMGELER ve KISALTMALAR

Bu çalışmada kullanılmış bazı simgeler ve kısaltmalar, açıklamaları ile birlikte aşağıda sunulmuştur.

Kısaltmalar	Açıklama
µl	Mikrolitre
b.ç.	Baz çift
cccDNA	Kovalent kapalı dairesel (covalently closed circular)
ddH₂O	Çift distile su (double distilled water)
dk	dakika
DMEM	Dulbecco Modified Eagle's Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Direkt tekrar bölgesi (direct repeat)
EDTA	Etilen Diamin Tetra-Asetik asit
Enh	Enhancer
ER	Endoplazmik retikulum
g	Gram
GFP	Yeşil floresan proteini
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBeAg	Hepatit B e antijeni

HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HBV-DNA	Hepatit B virusu DNA'sı
HCV	Hepatit C virusu
HCC	Hepatoselüler karsinoma
HepG2	Hepatoblastoma hücre dizisi
Huh7	İnsan hepatoma 7 hücre hattı
HepaRG:	İnsan hepatoma hücre hattı
kb	Kilo baz
L	Lösin (Leu)
LMV	Lamivudin
L-HBsAg	Geniş Hepatit B yüzey antijeni
M	Metiyonin (Met)
mg	Miligram
MgCl₂	Magnezyum klorür
M-HBsAg	Orta Hepatit B yüzey antijeni
ml	Mililitre
mM	Milimolar
mRNA	Mesajcı RNA
N	Asparajin (Asn)
nm	Nano metre
ORF	Açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame)
PBS	Fosfat tuz tamponu (Phosphate Buffer Saline)
pg:	Pregenomik
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

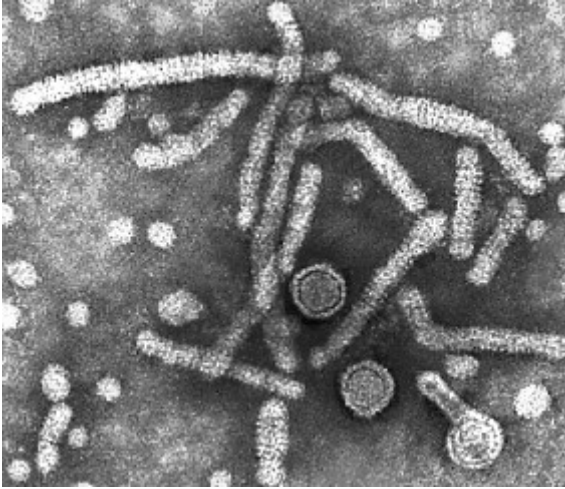
rcDNA	Pozitif iplikli çembersel DNA
RNA	Ribonükleik asit
rpm	Dakikadaki döngü sayısı (revolutions per minute)
RT-PCR	Real Time PCR
RNaz H	Ribonükleaz H
S	Serin (Ser)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
S-HBsAg	Küçük Hepatit B yüzey antijeni
T	Treonin (Thr)
TAE	Tris asetik asit EDTA
UV	Ultraviyole
V	Valin (Val)
YMDD	Tirozin-Metiyonin-Aspartat-Aspartat motifi

1. GİRİŞ

1.1. Hepatit B virüsü

Dünya çapında genel olarak 2 milyar kişinin HBV ile enfekte olduğu ve bunlardan yaklaşık olarak 400 milyon kişinin kronik HBV enfeksiyonlu olduğu tahmin edilmektedir (Dienstag 2008). Her yıl 500 bin ile 1.2 milyon kişi HBV'ye bağlı kronik hepatit, siroz ve hepatoselüler karsinoma (HCC) nedeniyle ölmektedir (Rantala ve ark. 2008). Hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonuna karşı, güvenilir aşuların 1980'lerden beri kullanımında olmasına rağmen, halen dünyadaki ölüm nedenleri arasında 10. Sırada yer almaktadır (Lavancy 2004, Hoofnagle 1990).

Hepatit B virüsü, elektron mikroskopunda incelendiğinde 3 farklı tip partiküle rastlanır. Bunlar birbirlerinden büyüklük, yapı ve miktar farklılıklarıyla ayrılır (Testut 1996).



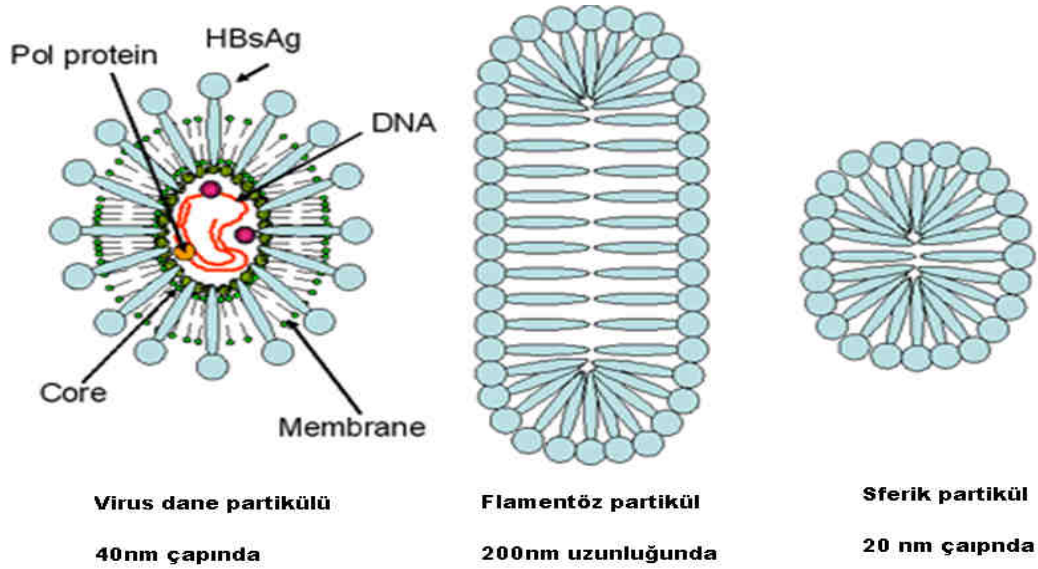
Şekil 1.1. HBV virüsü, elektron mikroskobu görüntüsü

1. Serumda, küresel formdaki dane partikülleri saptanmıştır. Bunlar ortalama 42 nm çapındadır. Tam bir virion yapısında olan dane partikülleri, enfeksiyözdür.

Dane partikülünde:

- a. Bir tane sirküler, kısmi çift sarmallı DNA, DNA polimeraz ve Rnase H aktiviteli enzim,

- b. İkozahedral yapıda, tek bir fosfoprotein (HBcAg) kopyalarından oluşan kapsid,
- c. Virüsün kodladığı üç adet protein (HBsAg) ve hücreden kazanılan lipidlerden oluşan zarf bulunur (Lai ve Mason 2001).
2. Serumda yaklaşık 200 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen, tübüler (filamentöz) partiküller saptanmıştır. Tübüler partiküllerin bulaşıcı olmadıkları bildirilmiştir
3. Serumda yaklaşık 22 nm çapında, içinde nükleik asit olmayan, küresel (sferik) partiküller saptanmıştır. Bu partiküller enfeksiyöz değildir ve kanda en fazla bulunan virüs partikülüdür (Robinson 2000).

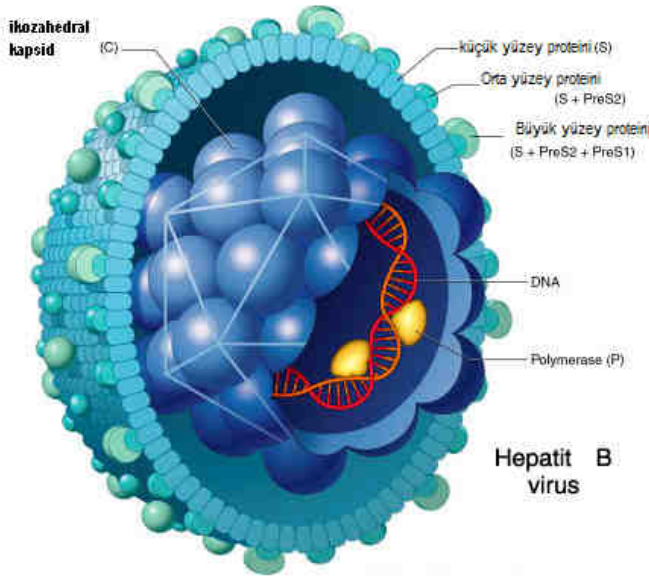


Şekil 1.2. HBV parikülleri (şematik)

Hepatit B de hepatit C gibi benzer yollarla kişilere bulaşmaktadır. Hepatit B virüsünde farklı olan en önemli özellik, ileri yaşlarda edinilen infeksiyonun kronikleşme riskinin az olmasıdır. Şöyle ki; yenidoğan ve ilk 1 yaşta geçirilen infeksiyon % 90 kronikleşmekte iken bu oran 1-5 yaş arasında % 30'a inmekte, daha erişkin yaşlar için % 2 civarında bulunmaktadır (Lai 2003).

1.2. HBV Virion Yapısı

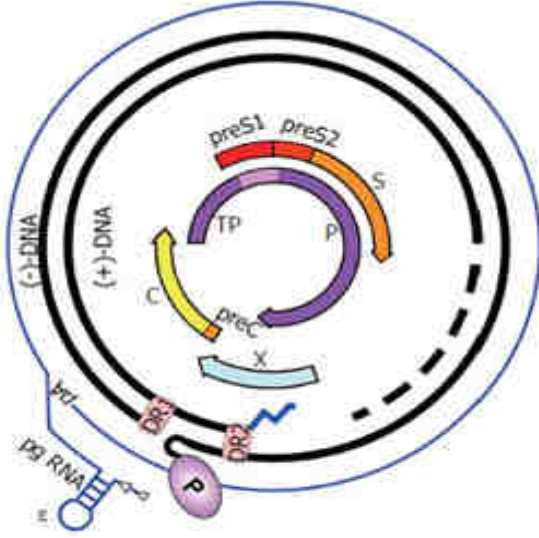
Hepatit B virüsü, yaklaşık 42 nm çapındadır ve insanlarda enfeksiyon yapabilen en küçük DNA virüsüdür. HBV genomu yaklaşık 3,2 kb uzunluğunda olup ikozahedral bir kapsid içerisinde bulunur ve bu kapsid dışında 3 farklı yüzey antijenini taşıyan lipid yapılı zarf yer alır. HBV zarf proteinleri, her biri birer tane protein ve glikoprotein yapısında yapı taşı içeren küçük, orta ve büyük yüzey antijenleri olarak adlandırılan proteinlerdir. Her 3 zarf proteininin de karboksi terminalindeki 225 aminoasiti ortaktır ve üçü de S domaininde yer alan sistein grupları arasında oluşan disülfid bağlarıyla stabilize edilen glikozile tip 2 transmembran proteini özelliği gösterirler (şekil 1.3).



Şekil 1.3. HBV virion yapısı

Hepatit B virüsü; yüzey (S), kor (C), X ve polimeraz (P) olmak üzere 4 farklı proteini kodlayan açık okuma çerçevelerine (ORF) sahiptir. Bu ORF'lerin transkripsiyonu en az dört promotor (preS1, S, pre C ve X) ve iki enhancer (Enh1, Enh2) bölgeler tarafından kontrol edilir (Yokosuka 2006, Will 1987). Hepatit B virüs genomunun en önemli özelliklerinden biri de, üst üste çakışan ORF'ler sayesinde, 4 ORF üzerinden 7 tane protein üretebilmektedir (Lee 1997).

HBV virionları genellikle 2 tip DNA taşır. Bunlardan biri uzun olan negatif zincir, diğeri ise kısmen tamamlanmış olan pozitif zincirli çembersel DNA (rcDNA) genomudur. (Şekil 1.4.) Her iki iplikçiğin 5' ucundaki H bağları onları bir arada tutar. Uzun zincir (zincir L/negatif zincir) virüsün tüm genetik bilgisini içerir. Kısa zincir (zincir S/pozitif zincir) uzun zincirin 3' ve 5' uçlarını bir araya getiren dizi içerir ve böylece iki zincir bir araya gelerek dairesel DNA olarak bilinen gevşek yapı oluşmaktadır (Zoulim 2006).



Şekil 1.4. HBV genom organizasyonu

Zarflı bir virus olmasına rağmen oldukça dirençli olan HBV, eter, düşük pH, ısı, dondurma ve çözmeye karşı dayanıklı bir yapı sergilemektedir. Bu özellikleri kişiden kişiye geçişte etkinlik ve dezenfektan direnci sağlar (Chieochansin 2006).

Genom içerisinde protein kodlayan genler şunlardır:

S Geni: preS1, preS2 ve S bölgelerini içerir. Büyük (39 kD) , orta (31 kD) ve küçük (24 kD) yüzey proteinlerini kodlar.

- Büyük yüzey proteini (L-HBs), okumanın pre-S1 bölgesinden başlaması halinde oluşur ve virionun hedef hücreye ulaşmasında rol oynamaktadır.

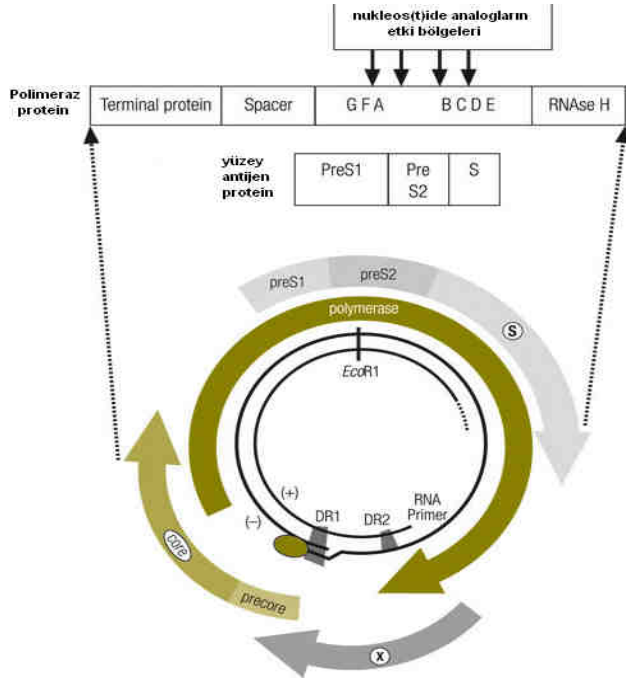
- Orta yüzey proteini (M-HBs), okumanın pre-S2 bölgesinden başlaması ile oluşur. Hepatositlere bağlanmada önemlidir (Urashima 2001). HBV'nin hücre içerisine absorpsiyonunda görevlidir.
- Küçük yüzey proteininin (S-HBs) ise kor partiküllerinin kılıflaşmasında görev aldıkları düşünülmektedir (Şekil1.3.).

Ayrıca S geni içinde yer alan ve Enh 1 ile bağlantılı olarak glukokortikoid varlığında gen ekspresyonunu yaklaşık 5 kat artıran bir elemanın (GRE, "glucocorticoid responsive element") varlığı tanımlanmıştır (Suzuki 1998). S geninde meydana gelen mutasyonlar sonucunda aşı elde edilmiştir (Cherry 1998).

C Geni: Pre-kor (preC) ve kor (C) bölgelerini bulundurur. İki farklı protein sentezletir. Bunlar; çekirdek proteini (HBcAg) ve infektivite protein (HBeAg)'dir. Translasyon C başlangıç kodonundan başlarsa, tam uzunluktaki C polipeptidi (HBcAg) sentezlenir; pre-C başlangıç kodonundan başlar ise, HBeAg sentezlenir. HBcAg 29 aminoasitlik ek sekanstan mahrum kaldığı için, endoplazmik retikuluma giremez, konak hücre sitoplazmasında kalır ve viral DNA'ya sıkıca bağlanır (Nassal M 1992). Bu olay pre-C dizisinin sinyal dizi gibi davrandığını düşündürür. Pre-C dizisinde, stop kodon mutasyonu taşıyan HBV mutantlarında HBeAg sentezlenememekte ancak HBcAg sentezlenmektedir. Bu mutant suşlar fulminan hepatit patogenezinde önem taşımaktadır (Conway 1998).

P Geni: Viral genomun $\frac{3}{4}$ 'ünü oluşturur. Polimeraz geninin ürünü olan polipeptidin bilinen 4 farklı bölgesi vardır. N terminali "priming" fonksiyonundan sorumludur. Pregenomik RNA'dan DNA sentezlenebilmesi için gereken "priming" fonksiyonunu sağlamak üzere epsilon sekansına bağlanabilir. Diğer bölgeler ise "spacer", reverse transkriptaz ve karboksi uçta yer alan RNase H bölgesidir. RNase H, RNA'dan DNA sentez edilirken işi biten RNA'ları parçalar. DNA polimeraz, revers transkriptaz (rt) ve ribonükleaz (RNaz H) aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimlerini kodlar. P geni, C geninin karboksi uç kısmını, tüm S genini ve X geninin aminoterminal bölümünü kapsar. Bu gende oluşan mutasyonlar sonucunda genel olarak antiviral ilaçlara karşı direnç gelişmektedir (Stuyver 2001).

X Geni: X proteinini kodlar. HBxAg ile ilişkilidir viral transkripsiyonu transaktive eden faktör olup hepatosellüler karsinoma'dan (HCC) sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu gende meydana gelen mutasyonlar sonucunda HBV protein sekresyonlarının baskılanması etkilenir. X proteini dolaylı yollardan viral ve bazı hücrel genlerin transkripsiyonunu artırabilme özelliği taşır (Yokosuka 2001).



Şekil 1.5. HBV genom yapısı

HBV genomu içindeki protein kodlayan bölgeler dışında iki direkt tekrar bölgesi vardır (Şekil.1.5.). Bunlar DR1 ve DR2 olarak isimlendirilmiştir ve replikasyonda önemlidir. İki direkt tekrar dizilerinin (Direct Repeats) birbirine tutunması ile viral DNA'nın yapısal bütünlüğü sağlanır (Seeger 2000).

1.3. HBV Yaşam Döngüsü

HBV'nun en önemli replikasyon merkezi hepatositlerdir. Safra kanalı epitel hücreleri, pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, böbrek ve lenfoid dokularda da replikasyon gerçekleşebilmektedir. Ancak hepatosit dışı replikasyon yerlerinin viral patogeneze rolü olmadığı düşünülmektedir. Lenfositlerdeki replikasyon ise virus perzistansı için ikinci bir rezervuar olabilmektedir (Seeger 2000). HBV ile enfekte hücreden günde 10^{11} - 10^{13} virüs salınır (Schaefer 2007). Viral kinetiklerle yapılan *in vivo* çalışmalarda virüsün plazma yarı ömrünün 4,4 saat olduğu ve hepatosite girdikten sonra replikasyonun 17 saat – 1.5 gün kadar sürdüğü saptanmıştır (Murray 2006). Vücuttaki virüs yükünün yaklaşık %50'si her gün yenilenmektedir. HBV replikasyonu sitopatik olmadığından hücrede belirgin morfolojik değişiklik oluşturmamaktadır (Glebe 2007). HBV ile enfekte hücrelerin yaşam süreleri 10 – 100 gün olduğu belirtilmiştir (Nowak MA 1996).

1.4. HBV Replikasyonu

HBV DNA replikasyonu bir RNA kalıbı aracılığı ile revers transkripsiyonla olur. Viral replikasyon sitoplazmada gerçekleşir ve negatif zincir pregenomik RNA'dan, pozitif zincir negatif zincirden sentezlenir.

1.4.1. Virüsün Hücre İçine Girmesi

HBV'nin hepatositlere tutunması HBsAg glikoproteinleri aracılığıyla gerçekleşir. L-HBs Ag ve diğer HBV zarf proteinlerini bağlayan çeşitli hücresel ligantlar tanımlanmıştır. Hücreye tutunmada en etkin işlev olan viral tutunma ve hücre içine girişte rol alan hepatosit reseptörü henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak L-HBs Ag'nin amino terminalinde olan pre-S1 proteininin hedef hücreye tutunmada en önemli etken olan epitoplara içerdiği anlaşılmış ve özellikle de pre-S1 bölgesinin 21-47. aminoasitlerinin hücreye bağlanmada kilit bölge olduğu tespit edilmiştir (Dash 1992, Petit 1991). Ayrıca HBV zarf proteinlerini bağlayan çeşitli hücresel ligandlar üzerine yapılan araştırmalarda,

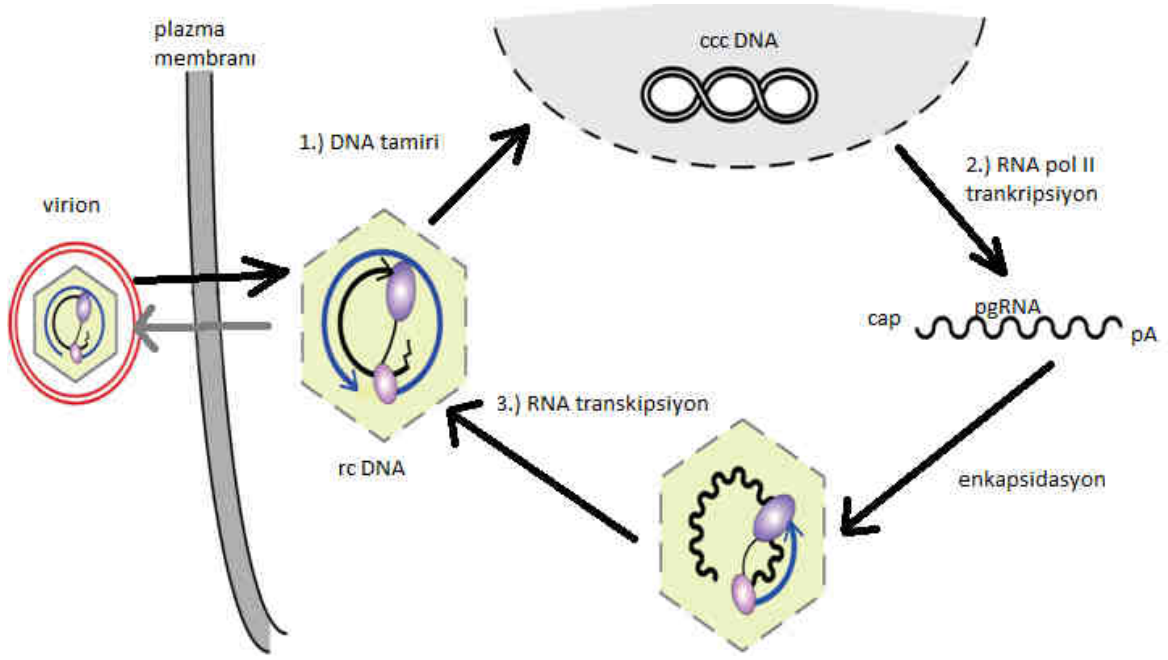
Pre-S1 proteini epitopları içerisinde QLDPAF dizisi tanımlanmıştır. Bu dizi de hücreye tutunmada kritik rol oynar (Paran 2003). HBV'nin doku, organ özgüllüğünün belirlenmesinde ise geriye kalan pre-S1 kısımlarının etkili olduğu bilinmektedir L-HBs Ag ve M-HBs Ag'de bulunan Pre-S2 proteini ancak serum albumine bağlanarak hepatositlere bağlanabilir. Her üç yüzey antijenlerinde (L-M-S HBsAg) de bulunan S proteini, hücreye tutunmada hepatositlere özgü olmayan epitoplar içermektedir (Cooper 2003, Glebe 2007, Seyec 1999).

X proteininde de benzer şekilde QLDPAR dizisi içermesi, X proteininin de hücreye tutunmada rolü olma ihtimalini akla getirmektedir (Cooper 2003). Ancak *in vitro* çalışmalarda virusun karaciğer hücresine tutunmasında tüm yüzey proteinlerinin aynı derecede aktivite gösterdiği de görülmüştür (Torresi 2000).

Hücre yüzeyine tutunmanın ardından virus zarfı ve hücre membranı arasında füzyon meydana gelir ve nükleokapsid sitoplazmaya aktarılır.

1.4.2. Nükleusta çift zincirli DNA oluşumu

Nükleokapsidin pasif difüzyon veya tübüler taşınım ile çekirdeğe taşındığı düşünülmektedir (Nassal 2008). Sitoplazma içerisinde kapsid parçalanır ve viral genomik DNA ve polimeraz çekirdeğe taşınır (Torresi 2000). Replikasyonun normal seyri sırasında HBV-DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez. Nükleer pora ulaşan nükleokapsidin içindeki gevşek sirküler DNA (relaxed circular DNA = rcDNA) nüklusa geçer. Nükleusta, pozitif iplikçik, 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlanarak viral polimeraz enzimi tarafından tamamlanır ardından polimeraz, oligonükleotid RNA ve negatif iplikçikteki 8 nükleotidlik fazla diziler molekülden ayrılır. Bu ayrılmaların mekanizmaları tam aydınlanmamıştır (Beck 2007). Her iki iplikçik 3' ve 5' uçlarından birbirine bağlanır ve kovalan bağlı sirküler DNA (covalently closed circular DNA = cccDNA) yapısı oluşur (şekil1.6.). Genom replikasyonunun ilk ve en önemli aşaması burasıdır. cccDNA'dan hücresel RNA polimeraz II enzimi sayesinde viral pregenomik RNA (pgRNA) ve mRNA'lar oluşturulur. Bu mRNA'lar virus proteinlerinin sentezinde kullanılır.



Şekil 1.6. ccc DNA oluşum mekanizması (Nassal 2007)

cccDNA oldukça stabil yapıdadır. Hepatosit içinde DNA giraz ve topoizomerazların yardımıyla süpersarmal oluşturur ve bir mini kromozom şeklinde kalır. cccDNA'nın yarı ömrü 14-50 gün kadardır ve enfekte hücrelerde yaklaşık 10 - 100 kopya bulunur. Hepatosit çekirdeğinde oluşturulan cccDNA rezervuarı, HBV enfeksiyonunun persistansında en önemli faktördür (Levrero 2009).

1.4.3. Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi

Çekirdekte hücresel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak, cccDNA'dan 4 tip RNA sentezlenir (Nassal 2008) Bunlar:

3.5 kb'lık mRNA: PgRNA olarak da bilinen bu mRNA'yı öz ("core") promotor bölgesi sentezler. PgRNA üzerinde DR-1 ve DR-2 bölgeleri ve enkapsidasyon bölgeleri ile poly A kuyruğu içermesi viral genomdan ~150 nukleotitik fazlası olmasına sebep olmuştur.

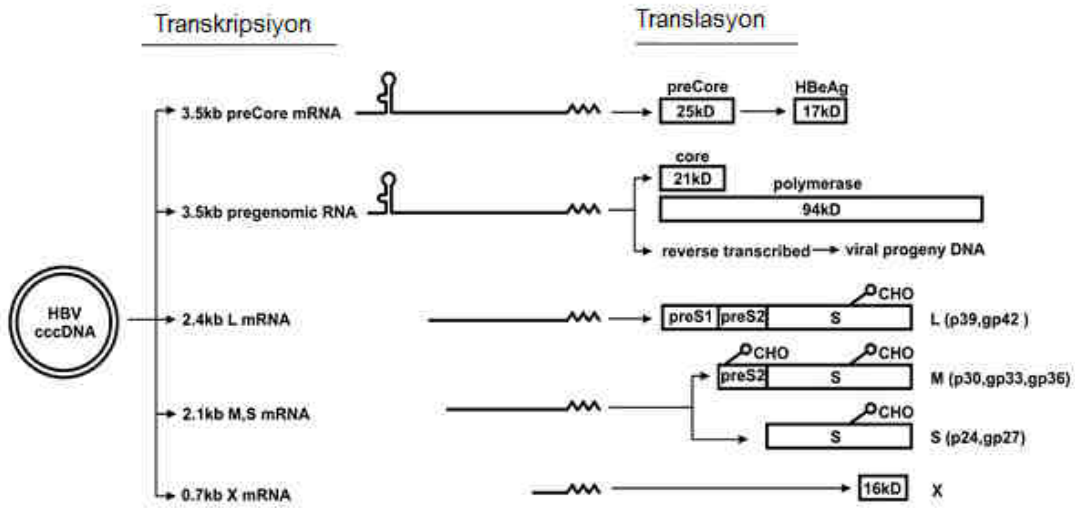
PgRNA üzerinden; - viral genom (revers transkripsiyonla)
- çekirdek proteini (HBcAg), HBeAg ve polimeraz proteinleri (P proteini) (translasyonla) sentezlenir.

Sentezlenen polimeraz proteini de PgRNA'nın enkapsidasyon dizisine (5'e-dizisine) bağlanır ve böylece enkapsidasyon sinyali oluşturulmuş olur (Jeong 2000).

2.4 kb'lık mRNA: Üç ayrı başlangıç kodonu aracılığı ile küçük, orta ve büyük (S-M-L HBsAg) yüzey proteinlerini sentezletir.

2.1 kb'lık mRNA: Sadece preS2 ve S proteinlerini sentezletir.

0.7 kb'lık mRNA: HBx proteinini sentezletir



Şekil1.7. cccDNA'dan transkript ve translasyon ürünleri (Timothy, Block 2007)

Bu mRNA'lar viral proteinlerini oluşturmak üzere sitoplazmaya taşınırlar (Locarnini S 2004).

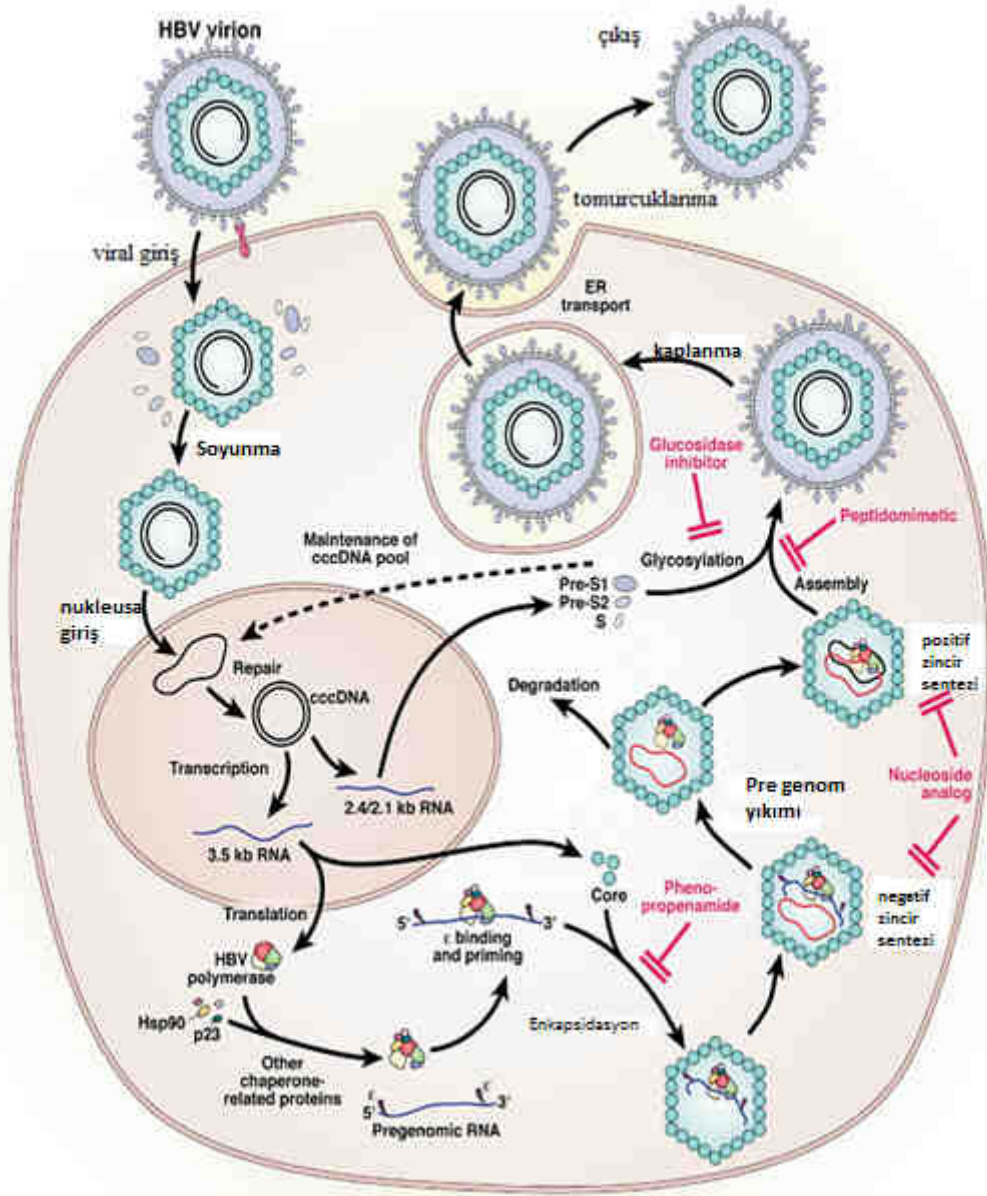
1.4.4. Viral kapsidin sentezi ve HBV genom replikasyonu:

PgRNA önce 200-300 molekül HBcAg sentezletir, sonra polimeraz sentezine izin verir. Öz proteini olan HBcAg'ler ikiyeşerli olarak bir araya gelerek, disülfid bağları ile bağlanırlar. Bu birimlerden 180-240 tanesi bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturur. Öz proteinin C terminali ile e-dizisi etkileşmesi ile pgRNA kapsid içine yerleşir. Burada pgRNA'dan negatif DNA zinciri sentezi sitoplazmada gerçekleşir. Sentez sırasında enzimin C-terminalinde bulunan RNazH bölgesi, pgRNA yıkımını da gerçekleştirir. Ancak enzimin revers transkriptaz ve RNazH aktiviteleri gösteren katalitik bölgeleri arasındaki 18 nükleotidlik mesafe yıkılmaz ve negatif zincir üzerinde kalır. pgRNA'nın 5' ucundaki DR1 bölgesinde yer alan 18 nukleotitlik RNA oligomeri ve polimeraz enziminin katlanması ile 3' ucundaki DR2 bölgesine geçer ve böylece pozitif zincir sentezi buradan başlamış olur. Ancak bu zincirin sentezi tamamen tamamlanmaz ve eksik kalır. Kapsid içine dNTP giremediği için kapsid içindeki dNTP miktarı ile orantılı olarak pozitif zincirin boyu değişkenlik gösterir. Her iki zincir 5' uçlarından kovalent bağlarla bağlanarak rcDNA sentezi tamamlanmış olur (Beck 2007).

Hepatit B viral polimeraz, retroviral reverse transkriptaz enzimine aminoasit dizilimi ve viral nükleus içinde aktivite göstermesi açısından benzemektedir. DNA sentezi için, hepadnavirus revers transkriptazı, kendisini bir protein primeri olarak kullanır. Bu özellik hepadnavirüslere özgü bir durumdur (Beck 2007).

1.4.5. Zarfla çevrilme ve hücreden çıkış:

İçinde DNA sentezi devam eden viral kapsit endoplazmik retikulumdan geçerken yüzey proteinlerini taşıyan zarfla kaplanır. Zarfin eldesi için, L-HBsAg elzemdir. Endoplazmik retikulum zarının iç kısımlarına kor proteini ile bağlanmış olan L-HBsAg virüsün tomurcuklanmasını sağlamaktadır (Chen 2004). Üç yüzey proteinlerini de içeren zarflı virüsler golgi aygıtına taşınırlar, orada sadece olgunlaşan virionlar veziküler transport ile hücre yüzeyine taşınır ve salınır (Seeger 2000).



Şekil 1.8. HBV replikasyon döngüsü (Ghany 2007)

1.5. HBV Mutantları

Hepatit B virüsü de HIV ve HCV'de görüldüğü gibi yüksek virion üretimi ve yıkımı ile karakterizedir. İlaçlar ya da bağışıklık sistemi tarafından replikasyon baskılanmadığı takdirde günde yaklaşık 10^{11} virion meydana geldiği tahmin edilmektedir. Fazla ve hızlı virion üretimi ve revers transkriptaz enziminin düzeltici fonksiyonu olmaması, replikasyonda yüksek düzeyde hata oluşmasına neden olmaktadır. HBV'nin yıllık hata oranının nükleotid başına 1.4-5/10.000 olduğu hesaplanmıştır. Bu oran retroviruslarla eşit, ancak diğer DNA viruslarından 100-1000 kat yüksek gibi görülmektedir. Mutasyon olduğu durumlarda infekte kişilerde genetik olarak birbirine yakın ancak birbirinden farklı olan ve farklı özellikler taşıyan varyantların bir kombinasyonu var olmaktadır. Konaktaki virustan daha avantajlı bir özellik oluşur ise mutant virus baskın hale gelmektedir.

Tedavi ve korunma bakımından önemli sorunlar oluşturan HBV mutasyonları (Chen 1999).

- a) Virusun hücreye girişini ve integrasyonunu kolaylaştırabilir.
- b) Virusun antijenik yapısını değiştirerek bağışık yanıtı kaçırmaya neden olabilir.
- c) Virusun replikasyonunu artırabilir.
- d) Antiviral ilaçlara direnç gelişimine neden olabilir.

Genom üzerindeki herhangi bir yerde (S, pre C/C, X, P, promotör ve enhancer) ortaya çıkabilen bu mutasyonlar;

- a) Tek bir taban bazınının değişimi (nokta mutasyonu)
- b) Bir veya daha fazla sayıda nükleotidin silinmesi
- c) Aynı sekansın düz veya ters biçimde tekrar edilmesi
- d) Nükleotid sekanslarının yeniden düzenlenmesi gibi farklı genetik mekanizmalarla oluşabilir (Thomas 1994)

1.5.1. P Geni Mutasyonları

P geni, diğer üç gen (S, C, X) ile ortak bölgeleri olmasının yanı sıra genomun %80'ini kapsamaktadır. Bu genin sentezlediği polimeraz proteini pgRNA'dan sentezletilir. Polimeraz proteininde, terminal protein, spacer bölge, rt-DNA polimeraz, RNazH bölümleri mevcuttur (Sheldon 2006). C bölgesinde YMDD motifi bulunur ki bu motif, nukleotit bağlayan katalitik bölgedir. Nukleosid/nukleotit analoglarının hedef bölgesi rt-DNA polimerazdır ve bu ilaçların kullanımını sonrasında P geni mutasyonları oluşmuştur.

Lamivudin (LMV) direncinde en sık saptanan mutasyonlar, rtL180M + rtM204V; ikinci sıklıkta ise rtL180M + rtM204V + rtV173L mutasyonları birlikteliğidir. Lamivudin HBV'ye karşı ters transkriptaz ve DNA polimeraz üzerinden etki eder. Q215S/P için *in vitro* çalışmalar devam etmektedir.

Adefovir (ADV), lamivudine dirençli HBV kökenlerine de etkili olabilmektedir. Adefovir kullanımında direnç, lamivudin'e oranla daha zor gelişmektedir. Doksan altı hafta kullanımdan sonra %2 direnç oranı bildirilmiştir. Direnci sağlayan; D katlantısında rtN236T, rtI233V, rtR217R; B katlantısında rtA181T/V; A katlantısında rtV84M, rtS85A mutasyonları tanımlanmıştır (Sheldon 2006).

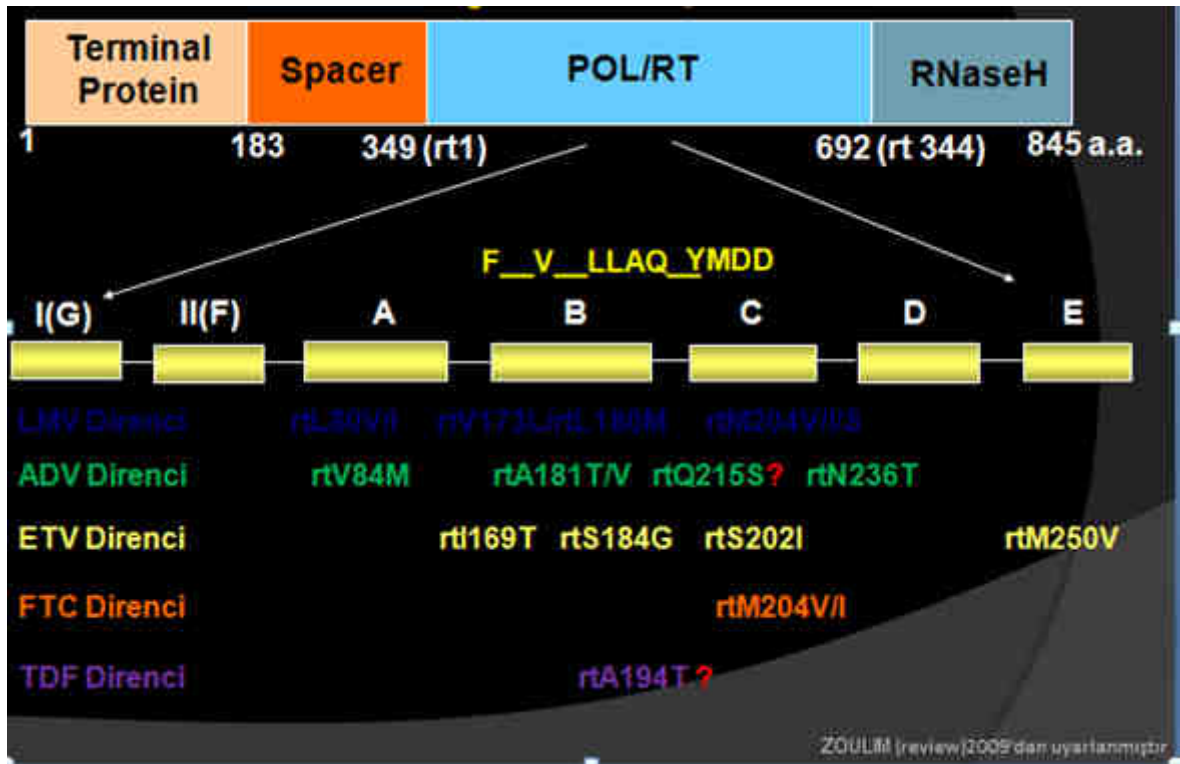
Entecavir (ETV), viral polimerazın 3' aktivitesini inhibe eder. Bunlar; priming, pgRNA'dan (-) zincirli DNA'nın reverse transkripsiyonu, (+) zincirli DNA sentezi. LAM direncinden sorumlu mutasyonların var olması ETV için en önemli risk faktörüdür. LAM direnci yokken rtM250V mutasyonu *in vitro* koşullarda ETV'nin IC50 değerinde 9 kat artış sağlarken, rtS184G+ rtS202I mutasyonları ETV'nin IC50 değerine bir etkisi yoktur. *In vitro* çalışmalarda lamivudine oranla 300 kat daha fazla potent olduğu anlaşılmıştır. Polimeraz B bölgesindeki rtI169T veya rtS184G, C bölgesindeki rtS202I ve E bölgesindeki rtM250V mutasyonları ETV direncine neden olurlar (Tenney 2004, Shaw 2006).

Tenofovir (TNF), molekül yapısı itibariyle adefovire çok benzer, sadece bir metil grubu fazladır. TNF tedavisi altında seçilen bir direnç mutasyonu henüz tanımlanmamıştır. HIV'li kişilerde rtA194T mutasyonu TNF direncine neden olduğu iddiası *in vitro*

çalışmalarla henüz kesin olarak doğrulanmamıştır. Ancak adefovir direncine neden olan rtN236T mutasyonunun TNF'ye hassasiyeti azalttığı gösterilmiştir (Sheldon 2005).

Emtricitabine (FTC) direnci, etki mekanizması ve direnç profili LAM (rtM204V/I) gibidir. FTC henüz monoterapi ve TDF ile kombine tedavi için ruhsatlandırılmamıştır (Lim 2006).

YMDD bölgesindeki mutasyonlar, tamamen çakışık olduğu S genini de etkiler. Lamuvidin direncine neden olan rtA181T mutasyonunda, HBsAg'de sW172stop değişikliği görülür ve bu mutasyon sebebiyle HBsAg sekresyonunun ve virusun replikasyon kapasitesinin azaldığı bildirilmiştir. Fakat lamuvidin varlığında virüsün replikasyon kapasitesi onarılmaktadır (Yeh 2000). Antiviral tedavi altında rtM204I mutasyonu ile sW194stop, ve rtV207I mutasyonu ile sW199stop değişiklikleri olduğu bildirilmiştir (Sheldon 2006).



Şekil1.9. HBV Polimeraz Direnç Mutasyonları

1.5.2 Yüzey Mutantları

HBsAg'yi kodlayan S genine ait mutasyonlar HBsAg'nin immünojenitesini değiştirebilir. Bu durum iki önemli probleme sebep olabilir.

1. HBsAg negatif HBV enfeksiyonu
2. Aşının ve HBIG'in (Hepatitis B immune globulin) korunmasından kaçan HBV enfeksiyonları (HBsAg'nin major hidrofilik bölgesindeki 123, 124, 126, 129, 133, 142, 144, 145 kodon mutasyonları)

Mevcut HBV enfeksiyonun göstergesi olan HBsAg'nin tespitinde kullanılan ticari kitler, anti HBs-HBsAg bağlanması esasına dayanır. Mutasyonlar sonucu HBsAg'nin antijenik yapısındaki değişimler ile ticari kitler tarafından tespit edilemeyen HBsAg molekülleri meydana gelebilir. Böyle durumlarda HBV ile enfekte kişilerde HBsAg negatif saptanabilir(Carman 1997).

1.5.3. Pre-kor/kor bölgesi mutasyonları

HBeAg, virüsün replikasyonunun bir göstergesi olmasına rağmen, bazı replikatif enfeksiyonlarda HBeAg negatif saptanmaktadır. Bunun 2 sebebi olabilir:

1. Pre-kor stop kodonu mutasyonu (28. Kodonda TGG—TAG)
2. Kor promotör bölgesi mutasyonu (T1774A ve T1776G)

Kor geninin bir stop kodonu ve iki adet başlatma kodonu vardır. Translasyon ilk başlatma kodonundan başlarsa, oluşan polipeptit hücre içinde bazı değişimlerden geçerek HBeAg'yi oluşturur. İkinci kodondan başlar ise kor proteinini (HBcAg) yani nukleokapsiti oluşturan protein meydana gelir. Antivirallerle tedavi bakımından Pre-kor mutantlar bir farklılık yaratmamaktadır.

1.5.4 X Mutantları

X gen bölgesi virüsün replikasyon ve ekspresyonu için önemlidir. HBxAg regülatör bir protein olup, HBV genleri yanı sıra farklı hücrel gen promoterlerini aktive edebilir. X geni mutasyonlarının fonksiyonel önemi tam olarak açığa kavuşmamakla beraber bu tip varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon seviyeleri düşüktür (Ulcida 1997).

1.6. Bulaşma Yolları ve Belirtileri:

Hepatit B virüsünün 4 ana bulaşma şekli vardır:

- 1- İnfekte kan ya da vücut salgıları ile parenteral temas (perkütan)
- 2- cinsel temas
- 3- infekte anneden yeni doğana bulaşma (perinatal vertikal)
- 4- infekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas (horizontal).

Hepatit B virüs enfeksiyonunun tehlikeli olan yanı, çoğunlukla herhangi bir özel belirti vermeksizin seyretmesidir. Hepatit B virüsü HIV'den yüz kat daha bulaşıcıdır. (Werner 1982) HBV' nin bulaşmasında mevsim ve yaş faktörlerinin rolü yoktur. HBV fekal oral yolla bulaşmadığından enfeksiyonun yayılmasında su ve gıdalar aracı değildir. Oral yolla bulaşma ancak infekte kanın hasarlanmış oral mukozaya temasıyla gerçekleşebilir. Bu bulaş yollarının dışında aynı ev içinde, yakın yaşama koşullarında HBV bulaşması olmaktadır. Özellikle HBV taşıyıcılarının aile bireylerinde saptanan ve diğer bulaşma yollarının söz konusu olmadığı ortak yaşam koşullarının bulaşmaya neden olduğu düşünülmektedir (Chen 2000). Virüs insan vücudu dışında yedi günden uzun süre canlı kalabildiği için enfekte diş fırçası ve jiletler de bulaş kaynağı olabilir.

- **Akut enfeksiyonun belirtileri şunlardır:** Yorgunluk, eklem ve kas ağrıları ve ayrıca halsizlik. Hastalanan kişiler bunun bir grip olduğunu düşünürler. Daha nadiren ciltte sararma, idrar renginde koyulaşma ve/veya karnın sağ üst tarafında şikayetler mevcuttur.

- **Kronik enfeksiyonun belirtileri şunlardır:** Çoğunlukla yıllarca herhangi bir şikayete neden olmadan seyrederek. Bazı hastalar aşırı yorgunluk ya da karnın sağ üst tarafında rahatsızlık hissederler (www.who.int).

1.7. HBV Enfeksiyonu Tedavisi:

Epidemiyolojik açıdan HBV sıklığına göre dünya, düşük, orta ve yüksek endemisite olarak üç coğrafik bölüme incelenmektedir. Türkiye, %3–5 prevalans oranı ile Ortadoğu ve Güney Avrupa ülkeleri ile beraber orta endemik bölgede yer almaktadır. HBV enfeksiyonunun prevalansı genellikle virüsün geçiş biçimi ile ilişkilidir. Türkiye'nin de içinde bulunduğu orta endemik kuşakta perinatal, horizontal, enfekte tıbbi malzeme, cinsel temas ve diğer bulaş yolları beraber görülebilmektedir. Dünya üzerinde yaygın olarak bulunan virüs ile mücadelede en etkin ve akılcı yol korunmadır. En etkin koruyuculuk ise aşı ile mümkündür. Günümüzde kullanılan aşuların büyük bir kısmı rekombinant olup, HBsAg'nin S proteinini içermekte, diğer bir kısmı ise buna ek olarak Pre-S1 / Pre-S2 proteinlerini de içermektedir (Pol 1994).

Hepatit B enfeksiyonlarının tedavisinde viral replikasyonun kalıcı olarak baskılanması hedeflenmektedir. 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 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.

1.8. Fenotipleme ve Direnç Profilleri

Herhangi bir antiviral ilacın veya molekülün yabancı tip ve/veya çeşitli viral varyantlara karşı etkisini değerlendirmek amacıyla *in vitro* hücre kültür modelleri baz alınarak '*in vitro* fenotiplendirme' yapılır. Bu çalışmada mutasyonu tespit edilen virüs bir ekspresyon vektörüne klonlanır ve karaciğer hepatoma hücrelerinden elde edilen HepG₂, Huh7 hücre kültürlerine transfeksiyonları gerçekleştirilir.

İlaça karşı duyarlılık testlerinin yapılmasındaki yegâne amaç yeni oluşan mutasyonların antiviral ajanlara karşı direnç profillerini gözlemleyebilmektir. Bu tür testlerde, Huh7 ve HepG₂ gibi hepatit enfeksiyonu taşımayan hücre hatlarına, direnç mutasyonu taşıdığı düşünülen Hepatit B genomu geçici transfekte edilir ve ardından test edilecek antiviralin çeşitli konsantrasyonları kültür ortamlarına eklenir. İnkübasyon süresi sonunda test edilen antiviral ajanın mutasyon paterni üzerine etkisi RT-PZR (Real time PCR) gibi duyarlılığı yüksek metodlardan da yararlanılarak gözlemlenir, böylece HBV replikasyonundaki baskılanma sayısal verilerle kanıtlanmış olur (Durantel 2004, Fu ve Cheng 2000, Yang 2004). Günümüze kadar yapılmış olan *in vitro* fenotipleme ile direnç profilleri araştırılan mutasyonlar çizelge 1.1'de derlenmiştir.

Kronik HBV enfeksiyonlarına karşı antiviral terapi alanında, yeni antiviral ilaçların geliştirilmesi, özellikle lamivudine (LMV) de dahil olmak üzere adefovir dipivoxil (ADV), telbivudine (LdT), tenofovir (TDF) ve entecavir (ETV) ile son 10 yıl içerisinde hızlı bir artış söz konusu olmuştur. Diğer yandan birçok ilacın klinik değerlendirmeleri hala devam etmektedir, (emtricitabine (FTC) ve clevudine (CLD) gibi), çoklu antiviral kullanımı uzun süreli terapilerde maalesef ilaç dirençli suşların ve çapraz direnç patternlerinin oluşmasını kolaylaştırmaktadır (Zoulim 2006).

Çizelge 1.1. HBV direnç mutasyonlarında *in vitro* fenotipleme çalışmaları (Locarnini 2006) Ø: Çalışılmamış

HBV	Adefovir	Clevudine	Entekavir	Lamivudine	Telbivudine	Tenofovir
Yabancıl tip	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
L180M	0.5	> 120	1	1.7	12	Ø
M204I	0.7	> 120	30	>1000	>1000	Ø
L180M+M20I	0.2	>120	30	>1000	133	2.1
L180M+M204V + T184G/S202I	2.0	Ø	>1000	>1000	>1000	Ø
L180M+M204V + I169T/M250V	1.0	Ø	>1000	>1000	>1000	Ø
M204I+A181S	28.3	5.86	Ø	>1000	Ø	5.57
A181T/V	1-5	Ø	Ø	2-6	Ø	Ø
A181S+M204I	28.3	5.86	Ø	>1000	Ø	5.57
M204+L80I	>10	>120	Ø	>1000	>1000	Ø
N236T	7-10	4.7	0.67	3-8	2.4	Ø
V204A/Q215S	7-10	Ø	Ø	10-20	Ø	Ø
A194T+L18M + M204V	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	2.4
A194T	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	1.5

Yukarıdaki çizelgede, HBV polimeraz geninde oluşmuş olan çeşitli direnç mutasyonları üzerinde altı farklı antivirale yapılan *in vitro* fenotipleme çalışmaları sonucunda bulunmuş olan IC50 değerleri (viral replikasyonun %50'sini baskılayabilecek antiviral doz) mevcuttur. 1.0'den büyük olan değerler bizlere ilgili mutasyonun antivirale karşı direnç profili hakkında bilgi vermektedir.

1.9. Amaç

En önemli sağlık sorunlarımızdan biri olan HBV tedavisinde onaylı yedi ilaç vardır: standart ve pegile interferon olmak üzere 2 interferon, lamivudin, adefovir, entekavir, telbivudin ve tenofovir olmak üzere 5 tane nükleosid analogu. Ülkemizdeki kronik hepatit B (KHB) olgularının tümünde etkenin genotip D olduğu bilinmektedir (Bozdayı 2004). KHB’de interferon bazlı tedavilerin kalıcı etkileri tatmin edici olmaktan çok uzaktır. Buna karşılık viral replikasyonu baskılamak için tedavide kullanılan entekavir ve tenofovir kolay tolere edilebilen etkili antivirallerdir ve bu yüzden kronik HBV enfeksiyonlarının tedavisinde sıkça kullanılmaktadır. Tüm bunların yanı sıra ilaç uyumsuzluğu ve uzun süren tedaviler sonrası direnç gelişmiş olması veya ilacın düşük genetik bariyerinin olması gibi etkenler söz konusu olduğunda, virüsün bu antivirallere karşı direnç geliştirmesinin önüne geçilememektedir. Günümüze kadar entekavire karşı direnç gelişimleri bildirilmiş olsa da tenofovire karşı direnç oluşumu henüz bildirilmemiştir. Bu ilaçlara karşı gelişen/gelişebilecek ve antiviral dirence sebep olan mutasyonlar HBV polimeraz geninin 7 fonksiyonel (“A-G domains”) ünitelerinde yer alır.

Bu çalışmada mutasyonu tespit edilen virüs bir ekspresyon vektörüne klonlanır ve karaciğer hepatoma hücrelerinden elde edilen HepG2 veya Huh7 hücre kültürlerine transfeksiyonları gerçekleştirilir. Amplifiye edilen HBV izolatlarının tüm genomları PHY106 vektörünün içine klonlanabilir ya da doğrudan PZR ürünlerinin SapI restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilebilir, sonrasında hücre kültür sistemlerinde *in vitro* fenotipleme ile virüs mutasyon paternlerinin antivirallere karşı direnci tanımlanmaya çalışılması sağlanabilir.

Çalışmada belirli HBV mutantlarının hücre kültürlerinde replikasyon çalışmalarının yapılması ve bu HBV varyantlarına karşı değişik antivirallerin ekspresyonu baskılama özelliklerinin test edilmesi ve mutasyonların direnç profillerinin ortaya çıkarılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇLER ve YÖNTEMLER

2.1. Gereçler

2.1.1. Hasta

2006 yılından beri Ankara Üniversitesi Gastroenteroloji kliniğine başvurmuş HBV ile enfekte hasta serumları kullanılmıştır. 88'i erkek 36'sı kadın olmak üzere toplam 124 hastanın viral DNA'ları ekstrakte edilerek, serum HBV DNA düzeyleri RT-PCR ile tespit edilebilir oranda olanların polimeraz gen bölgesinde bulunan mutasyonlar analiz edilmiştir. Tüm hastaların en az bir kere de olsa antiviral tedavi; adefovir, lamivudin, entekavir almış oldukları ve bilinmektedir.

2.1.2. Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerler aşağıdaki çizelge 2.1.'de verilmiştir.

Çizelge 2.1. Primerler

Primerler	DNA Dizisi
HBV P1	5' -CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCT TTT TCA CCT CTG CCT AAT CA -3'
HBV P2	5' - CCG GAA AGC TTG AGC TCT TCA AAA AGT TGC ATG GTG CTG -3 '
188 (F)	5'- TCC CCA ACC TCC AAT CAC -3'
887 (R)	5'- AAA CCC AAA AGA CCC ACA A -3'
440 (F)	5'- GTA CCA AAC CTT CGG ACG GA -3'
891 (R)	5' AGC AAA ACC CAA AAG ACC CA -3'

2.1.3. Kimyasallar

Çizelge 2.2. Kimyasallar

Kimyasal Adı	Üretici Firma
Agaroz	Quantum Biotechnologies, ABD
Borik Asit	Merck, Frankfurt, Almanya
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Mutlak Etanol	Kimetsan, Türkiye
Proteinaz K	Sigma, Almanya
SDS	Sigma, Almanya
Tris HCl	Sigma, Almanya
dNTP'ler	QBiogeen, Almanya
Fikol	Biochrom, Almanya
DMEM	İnvitrogen, ABD
PBS	Biochrom, Almanya
Tripsin-EDTA	Invitrogen, ABD
Opti-MEM	Invitrogen, ABD
DMSO	Appllichem, Almanya
Penisilin-strepromisin	Invitrogen, ABD
L-glutamin	Invitrogen, ABD
FBS	Invitrogen, ABD
Gliserol	Sigma, ABD
Ampisilin	Dateks, Türkiye
Kanamisin	Dateks, Türkiye
MgCl ₂	Sigma, Almanya
CaCl ₂	Sigma, Almanya

2.1.4. Enzimler

Çizelge 2.3. Enzimler

Enzim Adı	Üretici Firma
Dream Taq DNA polimeraz	Fermantas, Türkiye
Pfu Taq DNA polimeraz	Fermantas, Türkiye
“High Fidelity” Taq DNA polimeraz	Roche, Almanya
Taq DNA polimeraz	Fermantas, Türkiye

2.1.5. Tampon ve Çözeltiler

Çalışmalarımızda kullanılan tampon ve çözeltiler ile bunların içerikleri Çizelge 2.4.’de mevcuttur.

Çizelge 2.4. Çözelti ve tamponların içerikleri

Tampon ve Çözelti	İçerik
Tris-Asetat -EDTA tamponu (TAE) (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 fikor %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	1000 mL ddH ₂ O içerisinde 25 g LB tozu çözüldü, antibiyotik (kanamisin veya ampisilin 50µg/ml olacak şekilde eklendi.
Antibiyotikli katı bakteri büyütme besiyeri	1000 mL ddH ₂ O içerisinde 25g LB tozu çözüldü, 15g/mL agar-noble eklenerek otoklavlandı ve tabaklara 15’er mL dökülüp oda sıcaklığına kadar soğutuldu

2.1.6. Kullanılan Cihazlar

Çizelge 2.5. Cihazlar

Thermal Cycler PZR Cihazı
Light cycler 1.2 Real Time PZR Cihazı
ABI PRISM 310 Genetic Analyzer
pH Metre
Hassas Terazı
Su Banyosu
Jel Görüntüleme Sistemi
Kuru Blok
Karbondiyoksitli inkübatör
Laminar Flow
Sallamalı inkübatör
Elektroforez güç kaynağı ve tankı
Mikrodalga fırın
Derin dondurucu
Otoklav
Distile su cihazı
Mikropipet seti

2.1.7. Kullanılan Kitler

Çizelge 2.6: Kitler

LightCycler Faststart DNA Master HybProbe Kit (Roche)
Plazmid DNA Purification (MACHEREY-NAGEL)
Nukleosin pcr clean-up jel eks-2. Kit (MACHEREY-NAGEL)
Topo-XL PCR Cloning kit (invitrogen)
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems, USA)
High Pure viral nucleic acid (Roche)
Fugene 6 Transfection Reagent (Roche)

2.2. YÖNTEMLER

2.2.1 Hasta Serumundan Viral DNA İzolasyonu

Serumdan HBV DNA izolasyonu, üretici firmanın “High Pure Viral Nucleic Acid”(Roche) 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. Vorteks yardımıyla iyice karıştırılır ve 10 dakika 72°C’de inkübasyona bırakılır.

- İnkübasyon sonrası 100 µl bağlama tamponu daha eklenir.
- Karışım karıştırılarak filtreli toplama tüpüne aktarılır ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (inhibitor removal buffer) eklenir ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- Filtreden geçen sıvı atılır ve 450 µl yıkama tamponu eklenir ve 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir bu basamak 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 elde edilir.

2.2.2. Real Time PZR ile HBV DNA'nın Kantitatif Tayini

Real Time PZR (HBV DNA için);

Lightcycler DNA Master HybProbe Kit (Roche) kullanılarak yapılmıştır. Reaksiyon karışımı çizelge 2.7.'de mevcuttur.

Çizelge 2.7. RT-PZR reaksiyon içeriği

Malzeme	Miktar
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
Prob1 (5 pmol)	0.75 µl
Prob2 (5 pmol)	0.75 µl
MgCl ₂ (25mM)	2.5 µl
Enzim (Master mix)	2 µl
ddH ₂ O	7.5 µl
DNA	5 µl

Reaksiyon Şartları:

95°C.....10 dakika

95°C..... 5 sn

58°C* 8 sn

72°C.....11 sn

} 45 döngü

* Her döngüde 1°C düşerek 50 dereceye kadar inilir.

2.2.3. HBV DNA'nın Tüm Genomunun PZR ile oğaltılması

Serumdan elde edilen HBV DNA'nın tüm genomunun PZR ile çoğaltılması, reaksiyon karışımı 0,2 ml'lik tüplerde hazırlanmasıyla, "Applied Thermal Cyclers" cihazında yapıldı. Çalışmamızda birçok farklı Taq DNA polimeraz enzimleri kullanıldı. Deam taq polimeraz enzimi büyük viral DNA ve genomik DNA'lar için oldukça uygun ve sonrasındaki TA klonlama için de oldukça elverişli bir enzim olmasına rağmen, en uygun devamlılık sağlayabilen yöntem pfu+taq polimeraz enzimleri kullanılarak yapılan karışım olmuştur. PZR sonuçları yüksek viral yüklerle sahip olan serum örneklerinde pozitif sonuç almamızı sağlamıştır.

Çizelge 2.8. HBV tüm genom PZR içeriği

PZR malzemesi	Miktar
P1 (10pmol)	1,5 µl
P2 (10pmol)	1,5 µl
MgCl ₂ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Taq DNA polimeraz (fermantas/dream) (5 U/µl)	0,5 µl
PZR tamponu (10x)	5 µl
Jelatin	5 µl
DNA (kalıp)	5 µl
ddH ₂ O	Hacim 50 µl'ye tamamlanır

Çizelge 2.9. En uygun HBV tüm genom PZR içeriği

PZR malzemesi	Miktar
P1 (10pmol)	1,5 µl
P2 (10pmol)	1,5 µl
MgSO ₄ (25mM)	3 µl
dNTP (2mM)	5 µl
Pfu Tampon (10x)	5 µl
Fermantas Tampon(10x)	5 µl
Taq (Pfu) (5 U/µl)	1 µl
Taq (ferm) (5 U/µl)	0.5 µl
DNA (kalıp)	5 µl
ddH ₂ O	Hacim 50 µl'ye tamamlanır

Reaksiyon Şartları:

94°C.....5 dk

94°C.....40 sn

60°C.....1.5 dk.

68°C.....3 dk. *

72 °C.....7 dk

4 °C ∞

} 40 döngü

* Uzama bölümünde her 10 döngüden sonra süre 2 dakika artırılarak yapıldı.

2.2.4. PZR Ürünlerinin Pürifikasyonu

Elde edilen PZR ürünleri % 0.8'lik agaroz jele, 1 kb'lik DNA belirteci ile yüklenerek, jelin yürütülmesinden sonra jel ekstaksiyonu yapılır, buradaki amaç PZR reaksiyonunda bulunan dNTP ve oluşan primer dimerlerini uzaklaştırmaktır.

2.2.4.1 Jelin Hazırlanması ve DNA'nın Jele Yüklenmesi

Jelin hazırlanması ve DNA'nın jele yüklenmesi için aşağıdaki basamaklar izlenir;

- 0,4 g agaroz 50 ml 1X TAE tamponuyla karıştırılır ve mikrodalgada çözdürülür, ardından soğumaya bırakılır.
- 30 µl kristal violet boyası eklenir ve karıştırılır.
- Tarak jel tabağına yerleştirilir ve jel dökülür.
- Jel donduğunda tarak çıkarılır ve içerisinde 1X TAE tamponu bulunan tanka konulur.
- 40 µl PZR amplifikasyon ürününü, bromofenol blue yükleme tamponu ile yeterli miktarda karıştırılır ve jeldeki kuyucuklara yüklenir.
- 75 voltta 1-2 saat kadar 1 kb ladder ile yürütülür.
- Jel görüntüleme cihazında jelde bulunan DNA bantları görüntülenir.

2.2.4.2. PZR Ürününün Jelden Ekstraksiyonu

PZR ürününün jelden ekstraksiyonu için aşağıdaki basamaklar izlenir;

- Sadece istenilen bant bistürü yardımıyla jelden kesilip çıkarılır.
- Çıkarılan bant 1,5 ml'lik bir ependorf tüpüne konulur.
- Üzerine jelin hacminin (1mg yaklaşık 1 µl gelmektedir.) 2,5 katı kadar bağlama tamponu (binding buffer) eklenir.
- 50°C'de jel tamamen eriyene kadar su banyosunda inkübasyona bırakılır.

- Jelin eridiğinden tamamen emin olunca, karışım SNAP pürifikasyon kolonuna yüklenir.
- 2000-3000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilir.
- Altta kalan sıvı atılır ve SNAP pürifikasyon kolonuna 400 µl 1X yıkama solüsyonu eklenir ve yine 2000-3000 rpm’de 30 saniye santrifüj edilir.
- Altta kalan sıvı atılır ve SNAP pürifikasyon kolonuna 800 µl 1X yıkama solüsyonu eklenir ve santrifüj edilir.
- Altta kalan sıvı atılır ve SNAP pürifikasyon kolonu boş olarak maksimum hızda 2 dakika santrifüj edilir.
- 25 µl ddH₂O filtrenin tam ortasına gelecek şekilde pipetlenir ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
- Oda sıcaklığında maksimum hızda santrifüj yapılarak DNA elde edilir.

2.2.5. 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 kitapçığında yazan yöntem izlenerek klonlandı.

2.2.5.1. Kompetent Hücre Hazırlanması

- 1- DH5α, sıvı besiyerinde 5 ml kadar o/n büyütülür
- 2- 100-150 ml sıvı besiyerine, 50 µl kadar büyütülen bakteriden ekilir ve log faza kadar (orta derecede bulanıklık) üretilir.
- 3- 5000 rpm’de 10-20 dakika santrifüj edilir.
- 4- Süpernatant atılır, kalan pelete 10 ml 0.1 M soğuk MgCl₂ ile iyice süspanse edilir ve ardından 50 ml’ye tamamlanır. 10 dakika buz üzerinde inkübasyona bırakılır.
- 5- 5 dakika 5000 rpm de 4°C’de santrifüj edilir.

- 6- Üstte kalan sıvı dökülür ve pelete 10 ml 0.1 M soğuk CaCl₂ ilave edilerek süspansiyon edilir. Sonrasında 50ml'ye tamamlanılır ve 30 dk buz üstünde inkübasyon gerçekleştirilir.
- 7- 5 dk 5000 rpm de 4°C de santrifüjlenir
- 8- Pelete 1-2 ml (35 ml H₂O, 5 ml 0.1 M CaCl₂, 10 ml gliserol) karışımından eklenerek süspansiyon edilir
- 9- Ependorflara 50 µl şeklinde dağıtılarak -80°C'de muhafaza edilir.

2.2.5.2. Klonlama Reaksiyonunun Hazırlanması

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

2.2.5.3. 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'lik su banyosunda 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 sallamalı ısıtıcıda 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.

2.2.5.4. Klonlaması Sonrası Klonların Analizi

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

2.2.6. Büyüyen Kolonilerin PZR ile Kontrolü

Kanamisinli sıvı LB’de büyüyen koloniler 440 ve 881 nolu primerler kullanılarak 450 bp’lik bölge çoğaltılır, içerisinde HBV genomu olup olmadığına %1’lik agaroz jelde görüntülenerek bakılır. Bant veren kolonilerin plazmid ekstraksiyonları yapılır. Bu yöntem ile zamandan ve malzemeden zarar minimuma indirgenmiş olur.

2.2.7. Plazmid DNA ekstraksiyonu

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

1. 37°C’de bir gece büyütülen kolonilerin 50 µl’si, pozitif klonların tekrar büyütülüp sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi amacıyla dondurularak saklanmak üzere ayrı bir ependorfa ayrılır. Dondurma işlemine kadar bu hücreler kısa bir süre için +4°C’de bekletilebilir.
2. Kalan hücreler 30 dakika 11000 rpm’de santrifüj edilerek çöktürülür ve üstte kalan besiyeri atılır.
3. Hücreler 250 µl RNaz içeren A1 tamponu ile homojenize edilir.
4. 250 µl A2 tamponu eklenir hafifçe karıştırılır ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.

5. 300 µl A3 tamponu eklenir, karıştırılır ve 11000 rpm'de 10 dakika santrifüj edilir.
6. Santrifüj sonrası pelet atılır ve süpernatant NucleoSpin kolonuna aktarılır.
7. 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
8. Filtreden geçen sıvı atılır ve 600 µl A4 yıkama tamponu eklenir.
9. 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilir.
10. Filtreden geçen sıvı atılır ve 11000 rpm'de 2 dakika santrifüj edilir.
11. Kolon 1,5 ml'lik steril bir ependorf tüpüne konur ve üzerine 50 µl ddH₂O tamponu eklenir.
12. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakılır ve 11000 rpm'de 1 dakika santrifüj edilerek plazmid DNA eldesi yapılır.

2.2.7.1. Plazmidlerin Jelde Görüntülenmesi ve Analizi

- 50 ml 1X TAE tampon içinde, % 1 lik agaroz (0.50 g) hazırlanır ve mikrodalga fırında agaroz eriyene kadar ısıtılır.
- Ardından 3 dakika soğuması için beklenir.
- 1 damla etidyum bromür boyası eklenir ve karıştırılır ve tarağı yerleştirilmiş tabağa dökülür.
- Jel donduğunda tarak çıkarılır ve üzerini kaplayacak kadar 1X TAE tamponu eklenir.
- 5µl plazmid DNA, bromofenol mavi yükleme tamponu ile karıştırılır ve jeldeki kuyucuklara yüklenir.
- 100 voltta 1 kb DNA belirteci eşliğinde 1 saat kadar yürütülür.
- UV ışığı altında DNA bantı görüntülenir.
- Uygun boydaki (vector+HBVgenomu, yaklaşık 7 kb) plazmid DNA'sına sahip pozitif koloniler jelde tespit edilir.

2.2.8. Pozitif Kolonilerin Dondurulması ve Saklanması

1. Jelde uygun boyda plasmid 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.
2. Hücrelerin üzerine %10 gliserol (200 µl) eklenir ve -80°C'de saklanır.

2.2.9. DNA Dizi Analizi

Hastanın serumundan ekstraksiyonu yapılan HBV DNA'sının dizi analizi direkt olarak, plazmid ekstraksiyonu üzerinden, üretici firmanın "Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing" (Applied Biosystems, Fostercity, USA) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek yapıldı.

2.2.9.1. DNA Dizi Analizi PZR'si

DNA dizi analizinin PZR reaksiyonunun içeriği ve şartları çizelge 2.10.'da gösterildiği gibidir:

Kullanılan primerler:

PE 440: (F) 5' GTA CCA AAC CTT CGG ACG GA 3' } 450 bç
PE 891: (R) 5' AGC AAA ACC CAA AAG ACC CA 3' }

CLC 188: (F) 5' TCC CCA ACC TCC AAT CAC 3' } 500 bç
CLC 887: (R) 5' AAA CCC AAA AGA CCC ACA A 3' } bölgeyi çoğaltmaktadırlar.

Çizelge 2.10. DNA dizi analizi reaksiyon içeriği

Malzeme	Miktar
Big Dye Karışımı	0.5 µl
Primer (3.2 pmol)	1 µl
Plazmid	1-2 µl
ddH ₂ O	Toplam Hacmi 20 µl'ye tamamlayacak

Reaksiyon Şartları:

94°C.....10 sn
50°C.....5 sn
60°C.....4 dk

} 30 döngü

DNA dizi analizi “ABI PRISM 310 Genetic Analyzer” cihazı ile yapılır.

2.2.9.2. Sekansı yapılan plazmidler içerisindeki tüm HBV genomunun çoğaltılması

Plazmidlerin SapI restriksiyon enzimi ile kesimi PZR ürünü kesimine oranla daha düşük verimle çalıştığı için hücre kültürü aşamasına geçilmeden önce pozitif olduğu yani içerisinde HBV genomu içerdiği düşünülen plazmid ekstraksiyonlarından tekrar PZR konularak içerdiği HBV tüm genomu amplifiye edilmiştir.

Reaksiyon karışımı

Çizelge 2.11. Tüm genom amplifikasyon içeriği

Malzeme	Miktar
P1 (10 pmol)	2 µl
P2 (10 pmol)	2 µl
dNTP(2mM)	5 µl
Tampon (fermantas) 10x	5 µl
MgSO ₄ (25 mM)	3 µl
Taq polimeraz (ferm.) 5u/ µl	1 µl
Plazmid	1 µl
ddH ₂ O	50 µl'ye tamamlanır

2.2.9.3. Çoğaltılan HBV tüm genomunun SapI restriksiyon enzimi ile kesilmesi

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

Reaksiyon karışımı:

Çizelge 2.12. Sap I kesim reaksiyon içeriği

Malzeme	Miktar
DNA	17 µl
Sap-1 enzimi (NEB)	1 µl
10X NEB4 Tamponu	2 µl
Toplam Hacim	20 µl

2.2.10. HBV Tüm Genomunun *in vitro* Sistemde Analizi

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

2.2.10.1 Huh7 Hücre Dizilerinin Çözülmesi

1. Sıvı nitrojende muhafaza edilen Huh7 hücreleri 37°C su banyosunda çözülür ve zaman kaybedilmeden hücreler 15 ml'lik falkon tüplere aktarılır.
2. Üzerlerine 2 ml'lik Huh7 büyüme ortamı damla damla eklenir.
3. 1300 rpm'de 5 dakika santrifüj yapılarak çöktürülür.
4. Pelet 2 ml Huh7 büyüme ortamı ile nazikçe çözülür.
6. 25 ml'lik flaslara aktarılır ve üzerlerine 8 ml Huh7 büyüme ortamı eklenerek inkübatöre (37°C , %5 CO₂) kaldırılır.

2.2.10.2 Huh7 Hücre Dizilerinin Pasajlanması

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

2.2.10.3 Huh7 Hücre Dizilerinin Dondurulması

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

2.2.10.4 Klonlama Ürününün Huh7 Hücrelerine Transfeksiyonu

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

1. 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.
2. Oda sıcaklığında 5 dakika inkübasyona bırakılır.
3. 1 µg DNA karışımın içerisine eklenir ve iyice karıştırılır.
4. Karışım 30 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakılır.
5. İnkübasyon süresi başladığında 24 kuyucuklu tabaklardaki Huh7 hücrelerinin büyüme ortamı, 500 µl OPTIMEM ile değiştirilir.
6. Hücreler inkübatörde (37°C, %5 CO₂) bekletilir.
7. İnkübasyon sonrası karışım her kuyuya 20 µl olacak şekilde kuyucuklara dağıtılır.
8. inkübatörde (37°C, %5 CO₂) 6-8 saat inkübasyona bırakılır.
9. 8 saatin sonunda kuyucuklardaki OPTIMEM çekilir.
10. Kuyucuklar 3 defa 1 ml PBS (“Phosphate Buffer Saline”) ile iyice yıkanır.
11. Kuyucuklara Huh7 hücrelerinin büyüme ortamı eklenir ve inkübatörde inkübasyona bırakılır.
12. 5 gün boyunca hergün bir kuyucuktaki büyüme ortamı (süpernatant) toplanır.

2.2.10.5 *Hücre kültüründe test edilen örnekler*

Çizelge 2.13. Test edilen mutasyonlar ve antiviraller

ÖRNEKLER	LAMİVUDİNE (40 mM)	ADEFOVİR (40 mM)	TENOFOVİR (40 mM)	ENTECAVİR (40 mM)	EMTRİCİTABİNE (40 mM)
A (2-11) x 2	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM
B (18-5) x 2	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM
C (10-10) x 2	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM
D (3A-41) x 2	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM
E (3A-13) x 2	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM
Yabancıl tip (WT)	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM	100 µM 10 µM 1 µM
İlaçsız	Örnek A	Örnek B	Örnek C	Örnek D	Örnek E
Negatif kontrol (WT)	1. gün	2. gün	3. gün	4. gün	5. gün

40mM'lik stok antiviral ilaçlardan (Lamivudine, Adefovir, Tenofovir, Entecavir, Emtricitabine) 1, 10, 100 µM'lık konsantrasyonlar Huh 7 büyüme medium ile seyreltilerek hazırlandı ardından platelere 50 µL şeklinde dağıtıldı. A(2-11), B(18-5), C(10-10), D(3A-41), E(3A-13) şeklinde isimlendirilen örneklerin her birisi için çalışma iki defa tekrarlandı.

2.2.10.6 *Toplanan Kültür Ortamlarından Viral DNA Ekstraksiyonu*

Roche nükleik asit ekstraksiyon kiti ile üretici firmanın kullanma klavuzundaki yöntem ile yapıldı.

2.2.11. *In vitro* Ortamdaki HBV DNA Replikasyonunun Analizi

Real-time PZR: “Fast Start DNA hibridizasyon” kiti (Roche Diagnostics) kullanılarak toplam 20 µl içerisinde amplifikasyon yapıldı

Reaksiyon içeriği

Çizelge 2.14. RT PZR içeriği

Malzeme	Miktar
Primer 1 (10 pmol)	1 µl
Primer 2 (10 pmol)	1 µl
Prob1 (5 pmol)	0.75 µl
Prob2 (5 pmol)	0.75 µl
MgCl ₂ (25mM)	2.5 µl
Enzim (Master mix)	2 µl
ddH ₂ O	7.5 µl
Kalıp	5 µl

Reaksiyon Şartları

95°C.....10 dakika

95°C..... 5 sn

58°C* 8 sn

72°C.....11 sn

} 45 döngü

* Her döngüde 1°C düşerek 50 dereceye kadar inilir.

3.BULGULAR

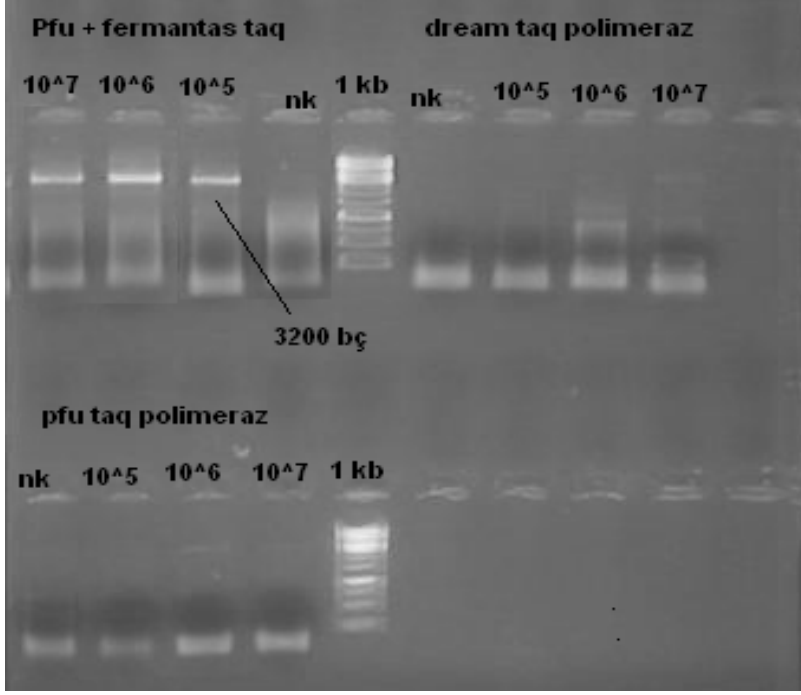
3.1. Hastalar

Kanında HBV tespit edilmiş olan hasta serumlarından ekstrakte edilen HBV DNA, 188-887 (reverse-forward) primerleri ile polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) yapılmıştır ardından dizi analizleri çalışılmış ve polimeraz gen bölgesi finchTV programı ile okunarak çıkan mutasyonlar kaydedilmiştir. Burada farklı mutasyon tiplerini bir arada bulunduranlar üzerinde çalışılmaya başlanmış ve bunlardan ilgili mutasyonlara sahip olanların HBV tüm genomu amplifiye edilmiştir.

HBV tüm genomların PZR ile çoğaltılmasında birçok farklı özellikte Taq polimeraz enzimleri (Dream, Pfu, Fermantas, Roche vb.) ve PZR protokolleri (touchdown, hotstart vb.) kullanılmıştır. Tüm bunlara rağmen viral yükleri düşük olan grubların tüm genomları amplifiye edilememiştir. Çoğaltılabilen full genomların viral yükleri genel olarak 10^5 den yüksek olduğu sonrasında yapılan Real time PZR ile saptanmıştır.

PZR amplifikasyon denemelerinde en sağlıklı sonuç pfu+taq polimeraz karışımı ile yapılan PZR'den alınabilmiştir. (Şekil 3.1.).

Elde edilen HBV tüm genom PZR ürünlerine dATP eklenerek TA vektörüne klonlamanın daha verimli bir şekilde gerçekleşmesi sağlanmıştır. %1'lik agoraz jelde yürütülen PCR ürünleri jelden ekstraksiyon protokolüne uygun şekilde ekstrakte edilmiştir. Ardından TOPO-XL cloning kit veya Qiagen PCR cloning kit kullanılarak jelden ekstrate edilen temizlenmiş PZR ürünleri ile klonlama çalışmalarına geçilmiştir, bunlardan en iyi sonuç TOPO-XL klonlama kitinden elde edilmiştir.

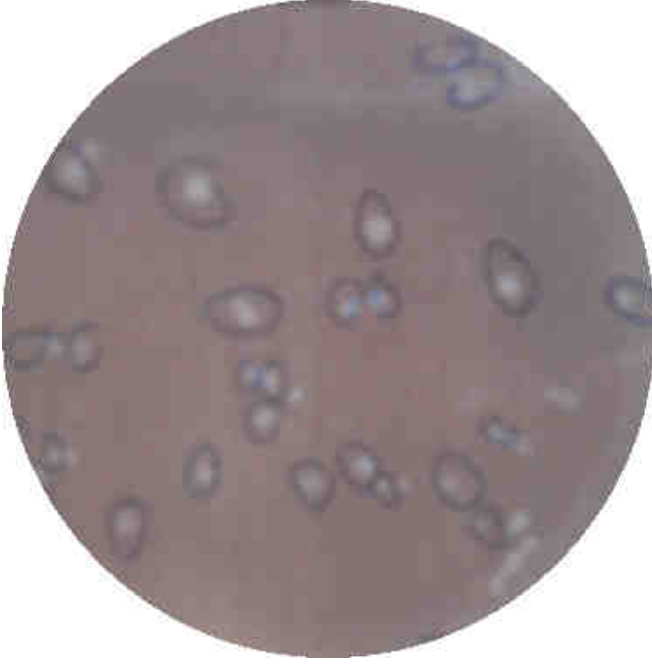


Şekil 3.1 PZR amplifikasyon çalışmaları

3.2. Klonlanan HBV Tüm Genomlarının Jelde Gösterimi

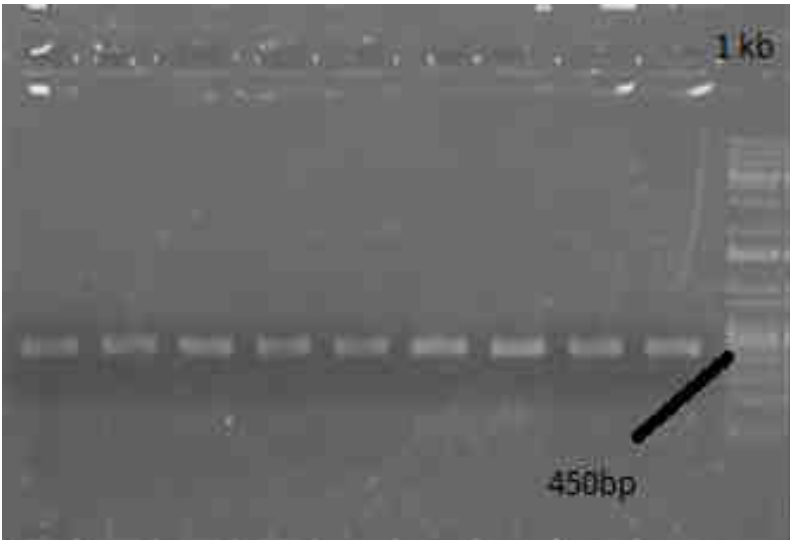
HBV DNA'nın ekstraksiyonu sonrası yapılan PZR sonucunda elde edilmiş olan 3200 bp'lik amplifikasyon ürünü jelden kesilerek klonlama yapılmıştır. TA vektörüne klonlanan HBV tüm genomları önceden hazırlanan kompetent hücreler içerisine “*heat shock*” yöntemi ile (42°C su banyosunda 30-45 sn, ardından buzda 2 dk) aktarılmıştır ve antibiyotikli katı bakteri büyütme besiyerine ekimi yapılmıştır.

Petriye düşen koloniler (şekil 3.2.) steril bir kürdan yardımıyla toplanarak antibiyotikli sıvı besiyerinde büyütülmüştür. Koloni sayısı oldukça fazla olduğu örneklerde plazmid ekstraksiyonuna geçmeden önce 440-891 nolu primerler (bu primerler 450 bazçiftlik bir bölgeyi çoğaltabilmektedir.) ile büyümüş kolonilerin PZR'si yapılmıştır. Şekil 3.3.'de jel görüntüsü mevcuttur. Böylece hem zamandan ve hem de malzemeden tasarruf sağlamanın yanı sıra sadece HBV genomunu içerisine alan plazmidlerin izolasyonunun gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Pozitif bant veren PZR ürünleri referans alınarak plazmid ekstraksiyonları yapılmıştır. Elde edilen plazmidlerin %1'lik agaroz jel görüntüsü Şekil 3.4.'de verilmiştir.

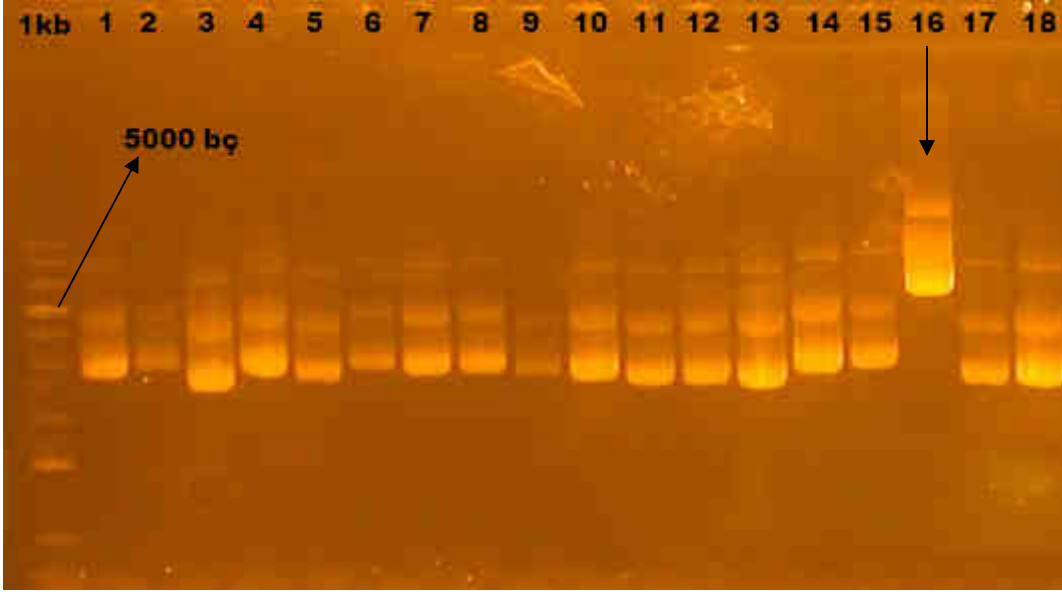


Şekil 3.2. Kanamisine dirençli suşlar

Kanamisinli katı bakteri büyütme besiyerinde ancak kanamisine direnç genini taşıyan vektöre klonlanabilen HBV tüm genomunu barındıran bakteriler koloni oluşturabilir. Şekil 3.2 'de çember içerisine alınmış olan kolonilerin klonal analizleri yapılması ile viral havuzda bulunan sadece baskın olan mutasyonlar değil varolan tüm varyantlar tespit edilebilir. Her vektöre tek bir HBV genomu girebilir.



Şekil 3.3. 440-891 ile hücre PZR jel görüntüsü



Şekil 3.4. Plazmid ekstraksiyonu jel görüntüsü

16 nolu izolasyon örneğinde HBV genomu içerisine alan plazmidin agaroz jel görüntüsü mevcuttur. Diğer kuyularda görülen kolonilerin plazmidleri negatif olduğu görülmektedir.

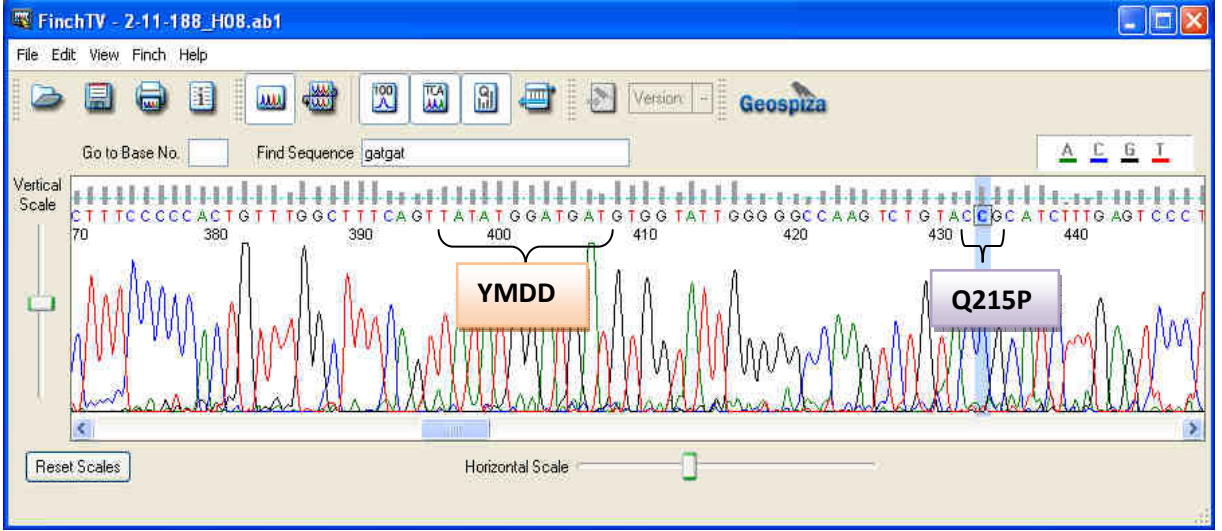
3.3 Plazmidlerin Dizi Analizi

Pozitif olduğu düşünülen plazmidlerin, 188 ve 887 nolu primerler (polimeraz bölgesini çoğaltabilen primer) ile dizi analizleri ABI 310 ile yapıldı. Öncelikle üzerinde çalışılacak mutasyonlar çizelge 3.1.'de gösterilmiştir.

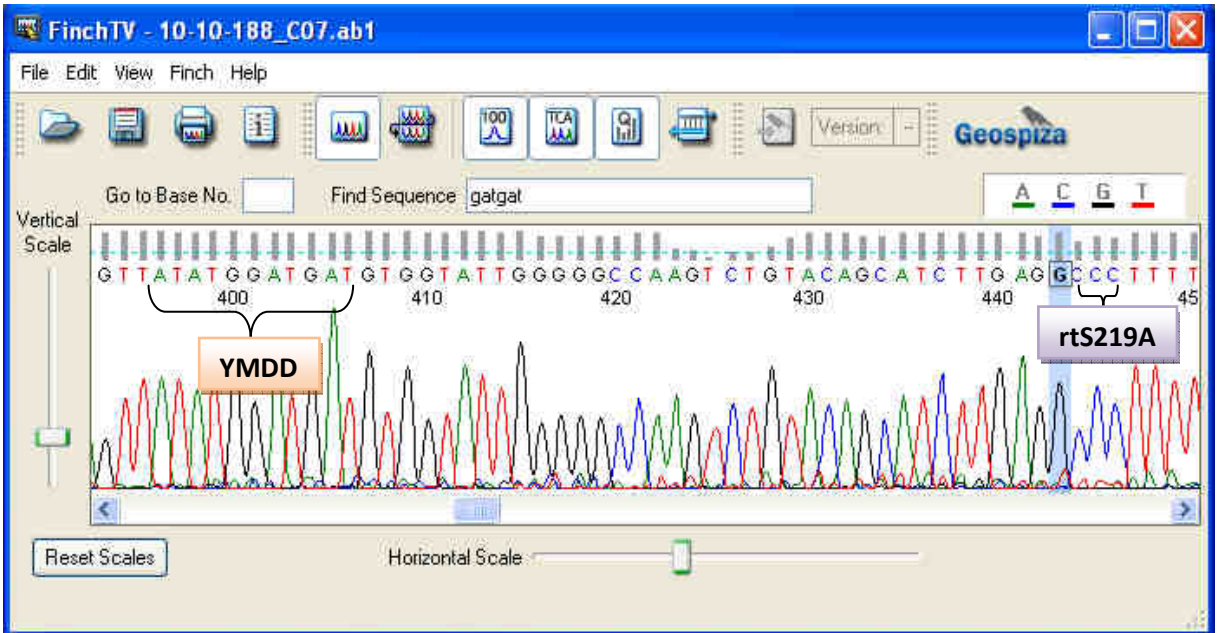
	N76	L80	H124	Q125	N131	D134	S135	R138	N139	L144	L180	M204	D205	Q215	S219	T222	Y245	C256	I266	V278	N279	V286	C303
A-) 2--11			Y											P		A		S		I			
B-) 18--5	D	I	D	K		E						I	G				H		R				
C-) 10--10			D		D										A			S	R				M
D-) 3a-41		I	Y				Y	K	Q	P		I		S									
E-) 3a-13		I	Y				Y	K	Q			I											A

Çizelge 3.1. Mutasyonlar

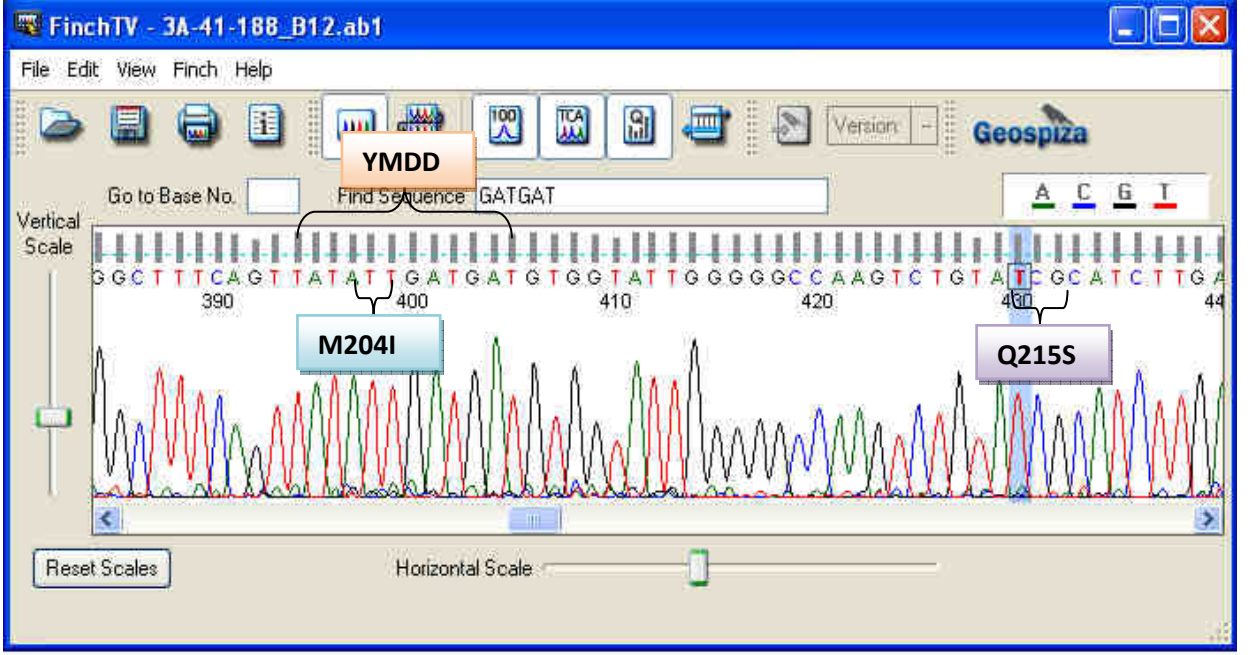
Şekil 3.5. Mutasyonların dizi analizi görüntüsü



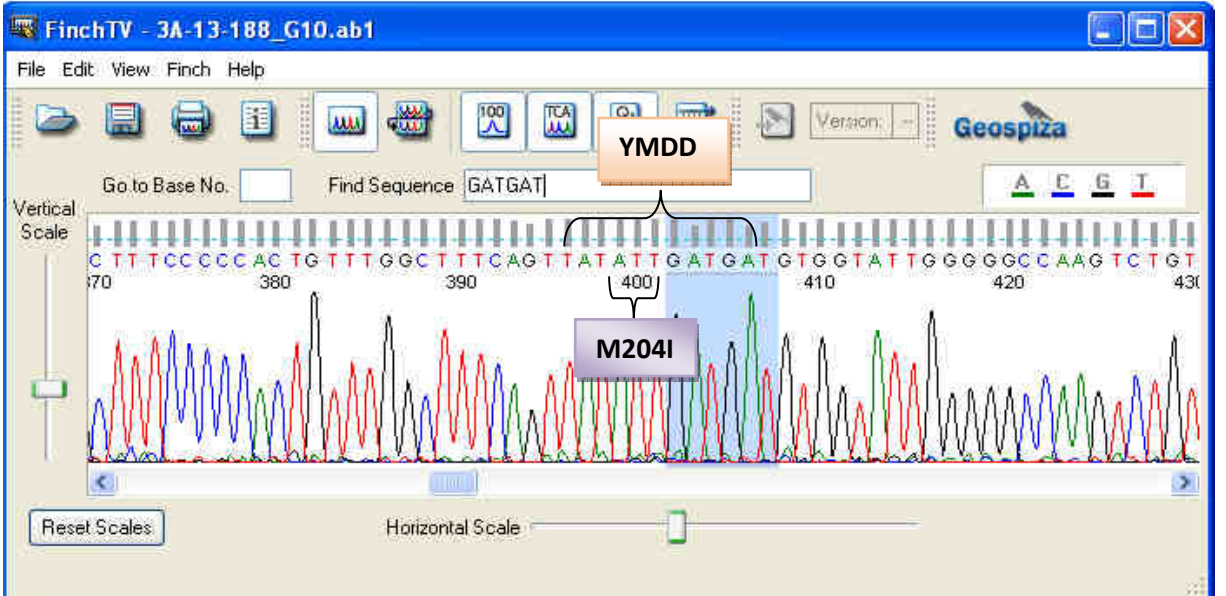
Bu mutasyon dizi analizi görüntüsü örnek 2-11'e aittir. Burada 215. kodondaki CAG → CCG değişimi ile glutamin aminasiti proline dönüşmüştür (Rt Q215P).



10-10 nolu örnekte, 219. kodondaki TCC → GCC dönüşümü ile serin aminoasiti alanine dönüşmüştür (rtS219A).



3A-41 nolu örneğin mutasyon dizi analizi sonucunda, 80. 204. ve 215. kodonlarda mutasyonlar saptanmıştır. 80. kodonda TTA → ATA ile lösin aminoasiti izolösine, 204. kodonda ATG → ATT ile metiyonin aminoasiti izolösine, 215. Kodondaki CAG → TCG ile glutamine serine dönüşmüştür (rtL80I, rtM204I, rtQ215S).

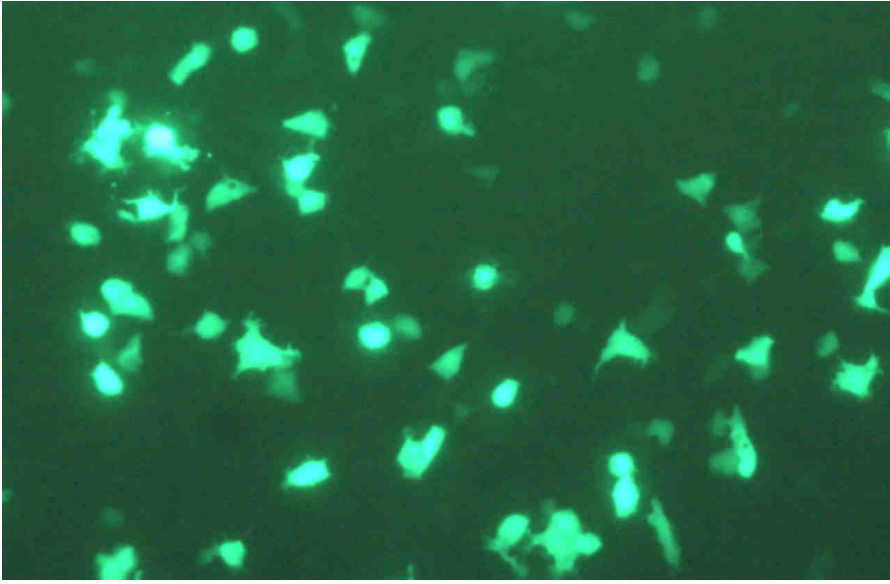


3A-13 örneğinde ise 204. kodonda ATG → ATT ile metiyonin aminoasiti izolösine dönüşmüştür (rtL 80I, rtM204I).

3.4. HBV Tüm Genom Klonlama Ürününün *in vitro* HBV DNA Ekspresyonunun Analizi

İlgilenilen mutasyonlara sahip olan plazmid ekstraksiyon ürünlerinin sapI ile kesimi PZR ürününe oranla daha zor gerçekleşeceği için, elde edilen klonlama ürünlerinden P1 ve P2 primerleri kullanılarak PZR reaksiyonu yapılmış ve HBV tüm genomu elde edilmiştir. PZR ürünü Sap-1 enzimi ile belirli bölgelerden kesilmiştir.

Sap-1 ile kesilen PZR ürünleri transfeksiyon verimliliğini ölçebilmek amacıyla yeşil floresan proteini (GFP) ile beraber transfekte edilmiştir. Transfeksiyon kontrolü mikroskop altında hücreler içerisinde yeşil floresan proteini aranarak yapılmıştır. Yapılan araştırmalar neticesinde yeşil floresan proteinleri gözlemlenebilmiştir, mikroskop görüntüsü de şekil 3.6'da mevcuttur.

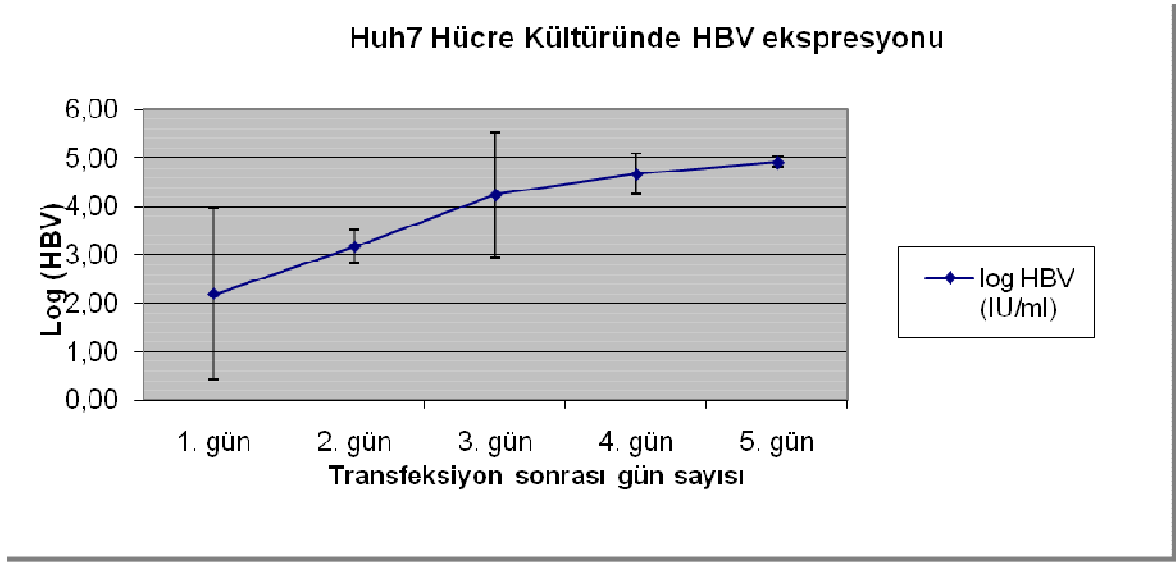


Şekil 3.6. GFP ile transfeksiyon

Huh7 hücrelerindeki HBV DNA replikasyonunu ölçebilmek amacıyla, transfeksiyon sonrası hücre süpernatantından 5 gün boyunca her gün belli miktarlarda toplanan örneklerin viral ekstraksiyonları yapılarak HBV DNA'ları elde edilmiştir. Real Time PZR ile yapılan deneyler sonucunda HBV DNA miktarındaki değişimler analiz edilmiştir. Yapılan analizler klonlama ürünlerimizin *in vitro* ortamda HBV replikasyonunu gerçekleştirebildiğini göstermektedir.

3.5. Örneklerin *in vitro* fenotipleme sonuçları

Her ilaç 2 şer kere aynı ilaç konsantrasyonu ile test edilmiştir. Hücre kültürlerinde HBV genomlarının ekspresyon çalışmaları 5 farklı antiviralin (Lamivudine, Adefovir, Tenofovir, Entecavir, Emtricitabine) 1, 10, 100 μM 'lik konsantrasyonları ile yapılmıştır. Transfeksiyonu yapılmış Huh7 hücrelerinin beş gün süreyle her gün toplanan süpernatantlarındaki HBV DNA, Real Time RZR ile test edilmiştir. Her örnek için bulunan kantitatif değerler aşağıdaki çizelge 3.2'den itibaren gösterilmiştir.



Şekil 3.7. Huh 7 hücre kültüründe HBV ekspresyonunun şematik gösterimi

Huh7 hücre kültür sisteminde HBV ekspresyonu transfeksiyon sonrasında her gün test edilmiş ve şekil 3.7'de ifade edildiği gibi 5.günün sonuna kadar HBV ekspresyonda logaritmik bir artış gözlenmiştir. Bu sebeptendir ki ekspresyonların gerçekleştiği süpernatantlar 5.gün sonunda toplanarak bir diğer test aşamasına geçilmiştir.

Çizelge 3.2. Örnek A(2-11) fenotiplleme sonuçları

İlaç konsantrasyonu	LAMİVUDİN (IU/ml)	ADEFOVİR (IU/ml)	TENOFOVİR (IU/ml)	ENTECAVİR (IU/ml)	EMTRİCİTABİN (IU/ml)
İlaçsız	1,66x 10⁴	1,66x 10⁴	1,66x 10⁴	1,66x 10⁴	1,66x 10⁴
İlaçsız	1,52 x 10⁴	1,52 x 10⁴	1,52 x 10⁴	1,52 x 10⁴	1,52 x 10⁴
1 µM	6,08 x 10 ³	1,10 x10 ⁴	2,0x 10 ³	1,56 x 10 ³	1,15 x 10 ³
1 µM	2,02 x 10 ³	8,53 x10 ²	1,56x10 ³	3,4 x 10 ³	3,41 x 10 ³
10 µM	-	-	-	-	2,95 x 10 ²
10 µM	-	5,19 x10 ²	-	9,25 x 10 ²	-
100 µM	8,38 x 10 ¹	-	-	2,75x10 ²	-
100 µM	3,49 x 10 ¹	-	-	-	-

Çizelge 3.3. Örnek B (18-5) fenotiplleme sonuçları

İlaç konsantrasyonu	LAMİVUDİN (IU/ml)	ADEFOVİR (IU/ml)	TENOFOVİR (IU/ml)	ENTECAVİR (IU/ml)	EMTRİCİTABİN (IU/ml)
İlaçsız	6,20 x 10⁴	6,20 x 10⁴	6,20 x 10⁴	6,20 x 10⁴	6,20 x 10⁴
İlaçsız	6,56 x 10⁴	6,56 x 10⁴	6,56 x 10⁴	6,56 x 10⁴	6,56 x 10⁴
1 µM	6,34 x 10 ⁴	3,65 x 10 ³	3,06 x 10 ²	4,09 x 10 ²	3,35 x 10 ⁴
1 µM	6,51 x 10 ⁴	3,76 x 10 ³	5,43 x 10 ³	1,4 x 10 ³	2,9x 10 ⁴
10 µM	3,33 x 10 ⁴	3,23 x10 ²	9,63 x 10 ¹	-	4,09 x 10 ⁴
10 µM	6,66 x 10 ⁴	3,14 x10 ²	-	7,98 x 10 ²	5,96 x 10 ⁴
100 µM	2,04 x 10 ⁴	-	-	-	1,32 x 10 ⁵
100 µM	7,03 x 10 ⁴	-	-	-	3,33 x 10 ⁴

Çizelge 3.4. Örnek C (10-10) fenotipleme sonuçları

İlaç konsantrasyonu	LAMİVUDİN (IU/ml)	ADEFOVİR (IU/ml)	TENOFOVİR (IU/ml)	ENTECAVİR (IU/ml)	EMTRİCİTABİN (IU/ml)
İlaçsız	8,24 x 10⁴	8,24 x 10⁴	8,24 x10⁴	8,24 x 10⁴	8,24 x 10⁴
İlaçsız	5,28 x 10⁴	5,28 x 10⁴	5,28 x10⁴	5,28 x 10⁴	5,28 x 10⁴
1 µM	1,05 x 10 ²	3,06 x10 ³	4,74 x10 ³	3,39 x 10 ³	5,41 x 10 ³
1 µM	4,77x 10 ³	2,65 x10 ³	5,77x 10 ³	7,14 x 10 ³	4,4 x 10 ³
10 µM	-	-	-	-	-
10 µM	5,43 X 10 ¹	8,72 x 10 ²	-	-	-
100 µM	-	-	-	-	-
100 µM	-	-	-	-	-

Çizelge 3.5. Örnek D (3A-41) fenotipleme sonuçları

İlaç konsantrasyonu	LAMİVUDİN (IU/ml)	ADEFOVİR (IU/ml)	TENOFOVİR (IU/ml)	ENTECAVİR (IU/ml)	EMTRİCİTABİN (IU/ml)
İlaçsız	1,35 x 10⁴	1,35 x 10⁴	1,35 x 10⁴	1,35 x 10⁴	1,35 x 10⁴
İlaçsız	1,14 x 10⁴	1,14 x 10⁴	1,14 x 10⁴	1,14 x 10⁴	1,14 x 10⁴
1 µM	1,29 x 10 ⁴	8,06 x 10 ³	6,44 x 10 ²	1,48 x 10 ³	1,3 x 10 ⁴
1 µM	1,18 x 10 ⁴	2,11 x 10 ²	2,78 x 10 ²	1,13 x 10 ³	3,4 x 10 ⁴
10 µM	1,2 x 10 ⁴	7,86 x 10 ²	-	-	8,43 x 10 ³
10 µM	1,14 x 10 ⁴	4,46x 10 ²	9,5 x 10 ²	-	1,19 x 10 ⁴
100 µM	1,8 x 10 ⁴	-	-	-	9,78 x 10 ³
100 µM	5,87 x 10 ³	-	-	-	6,57 x 10 ³

Çizelge 3.6. Örnek E (3A-13) fenotipleme sonuçları

İlaç konsantrasyonu	LAMİVUDİN (IU/ml)	ADEFOVİR (IU/ml)	TENOFOVİR (IU/ml)	ENTECAVİR (IU/ml)	EMTRİCİTABİN (IU/ml)
İlaçsız	$3,53 \times 10^4$	$3,53 \times 10^4$	$3,53 \times 10^4$	$3,53 \times 10^4$	$3,53 \times 10^4$
İlaçsız	$5,62 \times 10^4$	$5,62 \times 10^4$	$5,62 \times 10^4$	$5,62 \times 10^4$	$5,62 \times 10^4$
1 µM	$1,07 \times 10^4$	$2,36 \times 10^3$	$7,21 \times 10^2$	$5,87 \times 10^2$	$1,86 \times 10^4$
1 µM	$1,2 \times 10^4$	$3,81 \times 10^3$	$2,44 \times 10^3$	$4,3 \times 10^3$	$4,63 \times 10^4$
10 µM	$1,09 \times 10^4$	$2,10 \times 10^3$	$5,95 \times 10^2$	-	$3,57 \times 10^4$
10 µM	$6,73 \times 10^3$	$7,8 \times 10^2$	$3,0 \times 10^2$	-	$1,87 \times 10^4$
100 µM	$2,31 \times 10^4$	-	-	-	$3,50 \times 10^4$
100 µM	$1,10 \times 10^4$	-	-	-	$1,85 \times 10^4$

Çizelge 3.7. Yabancıl tip HBV'nin fenotipleme sonuçları

İlaç konsantrasyonu	LAMİVUDİN (IU/ml)	ADEFOVİR (IU/ml)	TENOFOVİR (IU/ml)	ENTECAVİR (IU/ml)	EMTRİCİTABİN (IU/ml)
İlaçsız	1. gün $3,09 \times 10^2$	2. gün $2,23 \times 10^3$	3. gün $5,22 \times 10^2$	4. gün $7,53 \times 10^4$	5. gün $6,93 \times 10^4$
İlaçsız	1. gün -	2. gün $7,32 \times 10^2$	3. gün $3,48 \times 10^4$	4. gün $1,96 \times 10^4$	5. gün $9,66 \times 10^4$

İlaç konsantrasyonu	LAMİVUDİN (IU/ml)	ADEFOVİR (IU/ml)	TENOFOVİR (IU/ml)	ENTECAVİR (IU/ml)	EMTRİCİTABİN (IU/ml)
ilaçsız	5. gün $9,66 \times 10^4$	5. gün $9,66 \times 10^4$	5. gün $9,66 \times 10^4$	5. gün $9,66 \times 10^4$	5. gün $9,66 \times 10^4$
1 µM	$2,43 \times 10^3$	$8,56 \times 10^3$	$3,42 \times 10^3$	$2,2 \times 10^3$	$1,30 \times 10^3$
1 µM	$5,41 \times 10^3$	$7,77 \times 10^3$	$3,10 \times 10^3$	$1,09 \times 10^3$	$1,12 \times 10^3$
10 µM	-	$5,40 \times 10^2$	-	-	
10 µM	-	$3,30 \times 10^2$	$1,10 \times 10^2$	-	
100 µM	-	-	-		
100 µM	-	-	-		

Yabancıl tip HBV'nin fenotipleme sonuçları yukarıdaki her iki çizelgede mevcuttur.

Çizelge 3.8. IC 50 ve FR değerleri

HBV	LAM		ADV		TDF		ENTE		FTC	
	FR	IC50	FR	IC50	FR	IC50	FR	IC50	FR	IC50
Yabanıl tip	1,00	0,09	1,00	0,19	1,00	0,15	1,00	0,09	1,00	0,07
A(2-11)	0,44	0,04	4,47	0,85	0,87	0,13	0,78	0,07	0,43	0,03
B(10-10)	>1000	>1000	1,42	0,27	0,67	0,10	1,00	0,09	>1000	>1000
C(18-4)	1,33	0,12	1,20	0,23	1,13	0,17	1,33	0,12	1,00	0,07
D(3A-41)	>1000	>1000	4,89	0,93	1,13	0,17	1,33	0,12	>1000	>1000
E(3A-13)	>1000	>1000	2,00	0,38	1,26	0,19	1,00	0,09	>1000	>1000

FR: “fold resistance”

IC50: “The half maximal inhibitory concentration”

Çizelge 3.8’de IC50 (viral replikasyonun %50’sini baskılayabilecek antiviral doz) ve misli direnç (“fold resistance”) değerleri mevcuttur. Buradaki hesaplamalar Delaney ve arkadaşlarının çalışmasındaki hesaplama yöntemleri esas alınarak yapılmıştır.(Delaney ve ark.2001)

Misli direnç değeri, ilgili mutantın IC50 değerinin yabanıl tip IC50 değerine bölünmesi ile elde edilir. Böylece bu değer, mutantların ilaçlara yabanıl tipe oranla kaç kat daha dirençli olduğu sonucunu verir.

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Dünyayı tehdit eden sağlık problemleri arasında yer alan Hepatit B virüsünün yaklaşık olarak dünyada 400 milyon taşıyıcısı bulunmaktadır. İnaktif HBV aşısının kullanımı, bu virüsle mücadelede önemli bir adım olmuştur ancak gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerde halen ciddi halk sağlığı sorunu olarak karşımıza çıkmaktadır. Hepatit B virüsünün replikasyon mekanizmasındaki birçok kilit nokta halen aydınlatılamamıştır. Bu sebeple kullanılmakta olan antivirallere mücadelede HBV kolaylıkla kaçabilmektedir. Enfekte ettiği hücreler günümüz ilaçlarıyla tedavi edilememektedir. HBV'nin rezervuar olarak kullandığı cccDNA'ya yönelik antiviraller ise mevcut dahi değildir. HBV'ye yönelik ilaçlar sadece replikasyonu baskılamaya yöneliktir, dolayısıyla uzun süreli tedaviler özellikle kronik HBV'li hastalarda ilaç dirençli mutantların oluşumuna sebep olmaktadır. (Zoulim 2004).

Her antiviralin farklı etki mekanizmalarının oluşu aklılara, kombinasyon tedavilerin HBV replikasyonunu baskılayabileceğini getirmiştir. *In vitro* hücre hatlarında yapılan deneylerde, adefovir ve lamivudin, telbivudine, emtricitabine kombinasyon terapisinin viral replikasyonu baskıladığı gözlenmiştir (Delaney 2004). Bu olumlu gelişmenin yanı sıra bu kadar fazla antiviralin kullanımına bağlı olarak birden fazla antivirale direnç gösteren virüs varyantlarının oluşması, virüslere karşı tedavideki direnç problemini arttırarak problemi daha da büyötmüştür (Wai ve Fontana 2004).

Antiviral direncin, yani antiviral ilaçlara duyarlılığın azalmasının *in vitro* testlerle ölçülmesi mümkündür. Bu tür testler moleküler teknikler ve hücre kültürlerinin gelişmesi ile artan bir öneme sahiptir. *In vitro* sistemler sayesinde virus genomunda aminoasit ve kodon değişiklikleri yabanıl tip ("wild type") ile karşılaştırılarak ilaç dirençlerinin boyutu, aynı grup ilaçlarda çapraz direnç oluşup oluşmayacağı ve *in vitro-in vivo* uyum olup olmadığı hakkında bilgi edinilir.

In vitro fenotipleme tekniklerinde ise, hastadaki tüm virüs popülasyonunda antiviral ilacın inhibitör etkisi ölçülür. İlacın inhibitör konsantrasyonu IC₅₀ veya IC₉₀ (virüs popülasyonunun %50 veya %90'ını inhibe eden ilaç konsantrasyonu) ile ifade edilir. Bu teknikler ile antiviral

ilaçlara çoklu dirençlerin klinik sonuçlarını göstermek açısından elverişlidir (Zhu 2007, Warner 2007).

Çalışmamızda *in vitro* sistemde HBV replikasyonunun gerçekleşebilmesi için hepatit B tüm genomu doğrudan Huh 7 hücre hattına transfekte edilmiş ardından ilaçlar verilmiştir (Günther ve ark., 1998, Liu ve ark., 2003). HBV genomunda oluşan mutasyonların direnç fenotiplerinin tespitinde bu klonlama çalışmaları oldukça önemlidir. Her bir virüs genomunun ayrı ayrı analiz edilebilmesi için klonlama çalışmaları şarttır.

Klonlamanın en büyük avantajı, *in vitro* replikasyon sistemleri ile karşılaştırıldığında, çok büyük sayıdaki örneği kontrol edebilme yeteneği sağlaması ve istenen hedef dizi hakkında daha öncede herhangi bir bilgi gerektirmemesidir. Klonlamanın en önemli dezavantajı ise, oldukça zamana bağlı bir süreci otomatikleştirmede güçlük çekilmesi ve bazı DNA dizilerinin klonlanabilir olamamasıdır, ya belirli konakçılara karşı toksik oldukları için ya da bu DNA'ların bu konakçılarda stabil olmaması ve fragmentlerin yeniden düzenlenmesinden dolayıdır.

Hücre kültür sisteminde Huh7 hücre hattına transfeksiyon sonrası 5 gün süre zarfı içerisinde hergün toplanan süpernatanttan HBV ekspresyonunun 5. günün sonunda optimum seviyeye ulaştığı gözlemlendi (Şekil3.7). Beşinci günün sonunda toplanan süpernatantların Real Time PZR ile HBV DNA miktarları tespit edildi. (Çizelge 3.2.- 3.6)

A (2-11) ve D (3A-41) örneklerinde bulunan Q215P/S mutasyonu herhangi bir birincil adefovir mutasyonu olmaksızın adefovir direncine çok yakın bir profil sergilemesi dikkat çekicidir. Bazı kaynaklarda bu mutasyonun telafi edici/ikincil (“compensatory”) adefovir mutasyonu olduğuna dair bilgiler bulunmakla birlikte (Shaw 2006), ikincil mutasyon çeşitleri tek başına bir direnç oluşturamazlar. Birincil (“primer”) mutasyonlar eşliğinde önem kazanırlar. Sekonder mutasyonların HBV replikasyon kapasitesi üzerinde telafi edici etkileri olduğu bilinmektedir (Lok et al. 2007 ve Locarnini 2008).

Çizelge 3.8’de IC50 ve misli direnç değerleri mevcuttur. Burada dikkat çekici olan A ve D örneklerindeki IC50 değerleridir. Bu değerler her ne kadar kesin olarak adefovir direnci var olduğunu ifade edemese de oldukça dirence yatkın bir eğilimin var olduğunu göstermektedir.

Adefovir mutasyonları (A181T, N236T, V214A, Q215S, I233V) *in vitro* koşullarda adefovirin IC50'sini 3-14 misli azaltmaktadır.

B (18-5), D(3A-41), E(3A-13) örneklerinde Çizelge 3.8'de de görüldüğü gibi lamivudine ve emtricitabine yabancı tipe oranla >1000 kat daha dirençli olarak bulunmuştur. Her 3 örnek grubunda da ortak olan mutasyon M204I mutasyonudur. Bu mutasyon reverse transkriptazın katalitik bölgesi olan C bölgesinde bulunan YMDD motifinde görülen, primer lamivudin direnç mutasyonudur. Dolayısıyla bu beklenen bir sonuçtur.

B(18-5) örneğinde bulunan N76D ve D205G mutasyonlarının gözlenen lamivudin direnci dışında herhangi bir dirence sebep olmamıştır. Bu mutasyonların sekonder mutasyonlar olabileceği düşünülmektedir. C(10-10) örneğinde bulunan S219A mutasyonuna dair direnç kesin olarak kesin olarak literatürde belirtilmemiştir ve bu mutasyona dair çalışmamızda herhangi bir direnç profili gözlenmemiştir.

D(3A-41) ve E(3A-13) örneklerindeki tek fark olan D örneğinde bulunan Q215S'nin (adefovir) ekstra ilaç direncine sebep olmadığı ancak adefovir direncine yatkınlık eğilimi olduğunu sayısal veriler göstermektedir. Ancak bu mutasyon dışında her ikisinin de genomunda bulunan mutasyonlar tamamen aynıdır. M204I mutasyonunun varlığı ile her iki örnekte de Lamivudin ve emtricitabine karşı açıkça görülebilen bir ilaç direncinin olduğunu görülmektedir.

In vitro fenotipleme deney sonuçları neticesinde, tenofovir direncine sebep olabilecek mutasyon bulunamamıştır.

5. KAYNAKLAR

- Beck ,J., Nassal, M. 2007. Hepatitis B virus replication. *World J Gastroenterol*; 13: 48-64.
- Carman, WF. 1997. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. Review. *J Viral Hepat.*;4 Suppl 1:11-20.
- Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayi G, et al. 2004.Molecular epidemiology of hepatitis B, C and D viruses in Turkish patients, *Arch Virol.*; 149(11): 2115-29
- Chen, WN., Oon CJ. 1999. Human hepatitis B virus mutants: significance of molecular changes. *FEBS Lett*, 453(3):237–242.
- Chen, WN., Oon, CJ., Koh, S. 2000. Horizontal transmission of a hepatitis B virus surface antigen mutant. *JClin Microbiol* 38 (2):938-9.
- Chen, CH, Lee, CM., Wang, JH., Tung, HD. 2004. Correlation of quantitative assay of hepatitis B surface antigen and HBV DNA levels in asymptomatic hepatitis B virus carriers. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 16: 1213-8.
- Cherry, JD., Nielsen, K., Vargas, J. 1998. Hepatitis B and D. In: Feigin RD, Cherry JD (Eds). *Textbook of Pediatric infectious diseases* (4 th Edition). Toronto, WB Saunders Company, 162: 1685-1698.
- Chieochansin T, Chutinimitkul S, Payungporn S, Theamboonlers A ve ark. 2006. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus mutations by PCR-based methods.*Tohoku J Exp Med* 210: 67-78
- Conway, JF., Cheng, N., Zlotnick, A., Stahl, SJ., Wingfield, PT., Belnap, DM.,Kanngiesser, U., Noah, M., Steven, AC. 1998. Hepatitis B virus capsid: localization of the putative immunodominant loop (residues 78 to 83) on the capsid surface, and implications for the distinction between c and e-antigens. *J Mol Biol* 279:1111–1121

- Cooper, A., Paran, N., Shaul, Y. 2003. The earliest steps in hepatitis B virus infection. *Biochimica et Biophysica Acta* 89-96.
- Dash, S., Rao, KV., Panda, SK. 1992. Receptor for pre-S1(21-47) component of hepatitis B virus on the liver cell: role in virus cell interaction. Department of Pathology, All India Institute of Medical Sciences, New Delhi. *J Med Virol.*37(2):116-21
- 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.
- Dienstag, JL. 2008. Hepatitis B virus infection. (Review). *N Engl J Med.* 2;359(14):1486-500.
- Durantel, D., Carrouee-Durantel, S., Werle-Lapostolle, B., Brunelle, MN., Pichoud, C., Trepo, 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.
- Fu, L., Cheng, YC. 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.
- Gunther,S., Sommer, G., Von Breunig, F., Iwanska, A., Kalinina, T., Sterneck, M., Will, H. 1998. Amplification of full-length hepatitis B virus genomes from samples from patients with low levels of viremia: frequency and functional consequences of PCR-introduced mutations. *J. Clin. Microbiol.* 36: 531-8.
- Glebe,D., Urban, S. 2007. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World J Gastroenterol* 13: 22-38
- Hoofnagle, JH. Chronic hepatitis B. *N Engl J Med* 1990;323:337-9.

- Jeong, JK., Yoon, GS., Ryu, WS. 2000. Evidence that 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J Virol*, 74(12): 5502-8.
- Karatayli, E., Karayalcin, S., KARAASLAN H., Kayhan, H., Türkyılmaz, A.R., Sahin F., Yurdaydin, C., Bozdayi, A.M. 2007. A novel mutation pattern emerging during treatment shows cross resistance to adefovir dipivoxil treatment antiviral therapy. *J Viral Hepat.* 12(5):761-8
- 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
- Lai, CL., Ratziu, V., Yuen, MF., Poynard, T. 2003. Viral hepatitis B. *Lancet*; 362: 2089-94
- Lavanchy, D. 2004. Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures.(Review.) *J Viral Hepat.* 11(2):97-107.
- Lee, WM. 1997. Hepatitis B virus infection. *N Engl J Med*, 337: 1733-45.
- 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(3):581-92
- Lim, SG., Krastev, Z., Ng, TM. 2006. Randomized double-blind study of emtricitabine (FTC) alone in treatment of chronic hepatitis B. *Antimicrob agents chemother.* 50:1642-1648
- Liu, CJ., Chen, PJ., Lai, MY., Kao, JH., Chang, CF., Wu, HL., Shau, WY., Chen DS. 2003. A prospective study characterizing full-length hepatitis B virus genomes during acute exacerbation. *Gastroenterology.*, 124: 80-90.
- Locarnini, S. 2004. Molecular virology of hepatitis B virus, *Semin Liver Dis*;24 (Supplement 1): 3-10

- Nassal M. 2008. Hepatitis B viruses: Reverse transcription a different way. *Virus Res*; 134: 235-49.
- Murray, JM., Purcell, RH., Wieland, SF. 2006. The half-life of hepatitis B virions. *Hepatology*44: 1117-21.
- Nowak, MA., Bonhoeffer, S., Hill, AM., Boehme, R. 1996. Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA*; 93: 4398-402.
- Osamu, Y., Makoto, A.. 2006. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B *Med Mol Morphol* 39:113–120
- Paran, N., Cooper, A., Shaul, Y. 2003. Interaction of hepatitis B virus with cells. Department of Molecular Genetics, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel. *Rev Med Virol*. Jun;13(3):137-43.
- Paran, N., Geiger, B., Shaul, Y. 2001. HBV infection of cell culture: evidence for multivalent and cooperative attachment. Departments of Molecular Genetics and Molecular Cell Biology, Weizmann Institute of Science, Rehovot 76100, Israel. *EMBO J*. Aug 15;20(16):4443-53.
- Petit, MA., Dubanchet, S., Capel, F., Voet, P., Dauguet, C., Hauser, P. 1991. HepG2 cell binding activities of different hepatitis B virus isolates: inhibitory effect of anti-HBs and anti-preS1 (21–47). *Virology* 180:483–491
- Pol, S., Driss, M., Michel, D., Nalpas, P., Brechot, C. 1994. Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection. *The Lancet*, vol. 344, no.8918, p. 342.
- Rantala, M. van de Laar, MJ. 2008. Surveillance and epidemiology of hepatitis B and C in Europe. *Euro Surveill*. (review). 22;13(21). pii: 18880.

- Robinson, WS. 2000. Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Eds: Mandell GL, Douglas RG, Bennett JE. Principles and Practice of Infectious Disease. 5th ed. New York, Churchill Livingstone, 1652-85
- Seeger, C., Mason, WS. 2000 Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev* 64(1), 51–68.
- Seyec, JL., Chouteau, P., Cannie, I., 1998. Role of the pre-S2 domain of the large envelope protein in hepatitis B virus assembly and infectivity. *J Virol*; 72: 5573-8.
- Seyec, JL., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P. 1999. Infection process of hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the pre-S1 domain. *J Virol*; 73: 2052-7.
- Schaefer, S. 2007. Hepatitis B virus taxonomy and hepatitis B virus genotypes. *World J Gastroenterol* 13: 14-21.
- Shaw, T., Bartholomeusz, A., Locarnini, S. 2006. HBV drug resistance: Mechanisms, detection and interpretation Victorian Infectious Diseases Reference Laboratory, Locked Bag 815, Carlton South, Vic. 3053, Australia *Journal of Hepatology Review* 44 593–606
- Sheldon, J., Camino, N., Rodes, B., Bartholomeusz, A., Kuiper, M., Tacke, F. 2005. Selection of hepatitis B virus polymerase mutations in HIV-coinfected patients treated with tenofovir. *Antivir Ther*, 10: 727–734.
- Sheldon, J., Rodes, B., Zoulim, F., Bartholomeuzs, A. 2006. Mutations affecting the replication capacity of the hepatitis B virus. *J Viral Hepat.* 13: 427-34.
- Stuyver, LJ., Locarnini, SA., Lok, A., Richman, DD., Carman, WF., Dienstag, JL., Schinazi, RF. 2001. Nomenclature for antiviral resistant human hepatitis B virus mutations in the polymerase region. *Hepatology.* 33: 751–757

- Suzuki, H., Sata, M., Sasaki, M., Murashima, S., Akiyoshi, F., Noguchi, S., Tanikawa, K. 1998. Mutations of glucocorticoid responsive element of HBV DNA Second Department of Medicine, Kurume University School of Medicine, Japan. *Kurume Med J.* 45(2):171-4
- Tenney, DJ., Levine, SM., Rose, RE., Walsh, AW., Weinheimer, SP., Discotto, L. 2004. Clinical emergence of entecavir-resistant hepatitis B virus requires additional substitutions in virus already resistant to Lamivudine. *Antimicrob Agents Chemother*, 48:3498–3507.
- Thomas, HC., Carman, WF. 1994. Envelope and precore/core variants of hepatitis B virus. Martin PM, Friedman LS(Eds). *Viral Hepatitis. Gastroenterol. Clin. N Amer.* 23: 499–514.
- Torresi, J., Locarnini, S. 2000. Antiviral chemotherapy for the treatment of hepatitis B virus infections. *Gastroenterology.* 118: 83-103
- Uchida, T., Saitoh, T., Shinzawa, H. 1997. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications Department of Pathology, *Pathol Int.* 47(4):183-93.
- Urashima, T., Saigo, K., S., Imaseki, H., Matsubara, H., Koide, Y.A. Takehide, K.Y., Koike, K., Isano, K. 1996. Identification of hepatitis B virus integration in hepatitis C virus infected hepatocellular carcinoma tissues. *J Hepatol.*26:771-778
- Wands, JR. 2004. Prevention of (HBV) hepatocellular carcinoma. *N Engl J Med,* 351:1567-70
- Warner, N., Locarnini, S., Kuiper, M., Bartholomeusz, A., Ayres, A., Yuen, L., Shaw, T. 2007. 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.* 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.

World Health Organization:

http://www.who.int/csr/disease/hepatitis/HepatitisB_who.cdscr.lyo2002_2.pdf

<http://www.who.int/bulletin/volumes/88/1/08-065722/en/>

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

Yeh, CT., Chien, RN., Chu, CM., Liaw, YF. 2000. Clearance of the original hepatitis B virus YMDD-motif mutants with emergence of distinct lamivudine-resistant mutants during prolonged lamivudine therapy. *Hepatology*, 31: 1318-26.

Yokosuka, O., Makato A. 2006. Molecular biology of hepatitis B virus: effect of nucleotide substitutions on the clinical features of chronic hepatitis B. *Med Mol Morphol.* Sep;39(3):113-20.

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

Zoulim, F. 2004 Mechanism of viral persistence and resistance to nucleoside and nucleotide analogs in chronic hepatitis B virus infection. *Antiviral Res*;64:1-1

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Soyadı, adı : ÇELİK, Esra
Uyruğu : T.C.
Doğum tarihi ve yeri : 21.10.1984 / Ankara
Medeni hali : Evli
E-posta : esraayanci@gmail.com

EĞİTİM

Derece	Eğitim Birimi	Mezuniyet tarihi
Yüksek lisans	Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü	2011
Lisans	Ankara Üniversitesi Biyoloji Bölümü	2007
Lise	Kırıkkale Anadolu Lisesi	2002

EĞİTİMLER, KONGRELER, KONFERANSLAR

- 8. Biyoteknoloji Günleri, Ankara Üniversitesi Kasım, 2010
- ESCV 2009, İstanbul, 27-30 Eylül 2009
‘Retrospective Analysis of Mutation Patterns with Chronic Hepatitis B having Breakthrough under Antiviral treatment’ adlı poster sunumu
- Hepatoloji Sempozyumu, Ankara, 9-11 Nisan 2009
- Ulusal Gastroentoloji Kongresi, Adana Hilton Oteli, Kasım 2008
- Biyoteknoloji Seminerleri, Ankara Üniversitesi, Mayıs 2008
- Sosyo-Ekonomik Gelişme ve Biyoteknoloji Seminerleri, Ankara Üni., Mayıs 2008
- 6. Biyoteknoloji Günleri, Ankara Üniversitesi, Kasım 2007

İŞ DENEYİMİ

- **03.2009-** **A.Ü Tıp Fakültesi Hepatoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji**
Araştırma Laboratuvarı.
Ünvanı: Biyolog
- **07.2006 – 09.2006** **Ankara Üniversitesi İbn-i Sina Hastanesi,**
Hematoloji Ana Bilim Dalı
Görevi: Stajyer
- **09.2004 –06.2007** **Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi Biyoloji Bölümü,**
Mikrobiyoloji Araştırma Laboratuvarı
Görevi: Part – Time çalışma

YABANCI DİL

İngilizce, Almanca