

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATİT B VİRÜS İNFEKSİYONLU HASTALARDA ACE,
TNF α - 238, TGF β 1 + 25, VDR 8 GEN
POLİMORFİZMLERİ**

Ela KESEN

**DİSİPLİNERARASI BİYOTEKNOLOJİ
A. B. D.
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI**

2006-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**HEPATİT B VİRÜS İNFEKSİYONLU HASTALARDA ACE,
TNF α - 238, TGF β 1 + 25, VDR 8 GEN
POLİMORFİZMLERİ**

Ela KESEN

**DİSİPLİNLERARASI BİYOTEKNOLOJİ
A. B. D.
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI**

2006 – ANKARA

ÖZET

HEPATİT B VİRUS İNFEKSİYONLU HASTALARDA ACE, TNF α - 238, TGF β 1 + 25, VDR 8 GEN POLİMORFİZMLERİ

Hepatit B virüsü hücreye girdikten sonra konakçısında farklı tablolara neden olmaktadır. Bazı kişilerde akut olarak geçirilen infeksiyondan sonra iyileşme görülürken, bazı kişilerde hastalık kronikleşmekte, ilerleyen dönemde karaciğer sirozu hatta karaciğer kanserine dönüşebilmektedir. Hastalığın bu kadar farklı sonuca yol açması ile konağa ait genetik faktörler arasında ilişki kurulmaktadır. ACE, TNF α , TGF β , VDR 8 gen bölgelerindeki polimorfizmler ile HBV'ye karşı geliştirilen immun yanıt ilişkilendirilmiştir.

Bu çalışmada hepatit B virüsünün farklı tablolara yol açmasında konağa ait genetik faktörlerin etkisinin araştırılması amaçlanmıştır.

Çalışmaya hasta grubu olarak HBs Ag pozitif, HBV DNA pozitif 220 hasta (153 erkek, 67 kadın) alındı. Bu kişilerden 116'sı HBeAg negatif, 51'i HBeAg pozitif, 25'i asemptomatik taşıyıcı, 28'i karaciğer kanseri hastalarıydı. Kontrol grubu olarak HBsAg negatif, anti HBs pozitif 122 kişi (75 erkek, 47 kadın) alındı. TGF β 1 kodon 25 bölgesi için allele özgü polimeraz zincir reaksiyonu, ACE 8, TNF α -238, VDR 8 bölgeleri için polimeraz zincir reaksiyonu ve restriksiyon fragmanı uzunluk polimorfizmi, ACE ID bölgesi için polimeraz zincir reaksiyonu yapıldı ve sonuçlar agaroz jel elektroforezinde analiz edildi.

ACE 8, TNF α -238, VDR 8, TGF β 1 + 25 bölgelerindeki polimorfizmlerin analizi sonucunda, hasta ve kontrol grubunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ACE ID bölgesi için yapılan istatistiksel analiz sonucu DD genotipi bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur. (p: 0.006)

Anahtar Sözcükler: Hepatit B, immun yanıt, polimorfizm, ACE

ABSTRACT

ACE, TNF α -238, TGF β 1+25, VDR8 GENE POLYMORPHISMS IN PATIENTS WITH HEPATITIS B VIRUS INFECTION

Hepatitis B Virus (HBV) infection may trigger different disease patterns depending on some features of the host. In some patients although acute infection could be followed by disease recovery, in some other patients the disease could become chronic, which may progress to liver cirrhosis and also liver cancer. Therefore, the various disease progression is thought to be associated with the genetic factors of the patients. Some of the polymorphisms examined in the ACE, TNF α , TGF β and the VDR 8 genes were found to be associated with the immune response to HBV. In this study, it was aimed to investigate the relation of the genetic factors with the distinct progression of the disease.

In this study, we investigated 220 patients (153 males and 67 females) who were positive for both HBs Ag and HBV DNA. Among these patients, 116 were HBeAg negative, 51 were HBeAg positive, 25 were asymptomatic carriers and 25 patients were with liver cancer. Our control group was consist of 122 people (75 males, 47 females) who were HBsAg negative and anti-HBs positive. We analyzed the genomic DNA samples using allele specific polymerase chain reaction method for codon 25 of the TGF β 1 gene (TGF β 1+25), polymerase chain reaction-restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) methods for the ACE 8, TNF α -238 and VDR 8 genes, and polymerase chain reaction method for the ID location of the ACE gene (ACE ID). Subsequent analyzis were performed using agarose gel electrophoresis.

When compared with the control group the polymorphisms examined in the ACE 8, TNF α -238, VDR 8 and the TGF β 1+25 genes were not found to be statistically significant. However, the frequency of the DD variant of the ACE ID gene was significantly different among the patient and the control groups ($p=0.006$).

Key Words : Hepatitis B, immune response, polymorphism, ACE

İÇİNDEKİLER

Sayfa No:

Kabul ve Onay	i
Özet.....	ii
Abstract.....	iii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller.....	vii
Çizelgeler	viii
1. GİRİŞ.....	1
1.1. Hepatit B virüsü.....	1
1.1.1. HBV Genom Yapısı	2
1.1.2. HBV Yaşam Döngüsü	4
1.2. HBV İnfeksiyonu.....	6
1.3. Hepatit B İnfeksiyonunda immün yanıtlar	9
1.3.1. Akut hepatit B’de immün yanıt	11
1.3.2. Kronik hepatit B’de immün yanıt	15
1.3. Polimorfizmler.....	16
1.4. Amaç	21
2. GEREÇ VE YÖNTEM	22
2.1. Gereçler	22
2.1.1. Hastalar	22
2.1.2. Primerler	22
2.1.3. Kimyasallar	23
2.1.4. Restriksiyon Enzimleri	23
2.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri	24
2.1.6. Standart Çözeltiler ve Tamponlar	25
2.2. Yöntem	26
2.2.1. DNA izolasyonu	26
2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu	26
2.2.3. Restriksiyon enzim analizi	27

2.2.4. Agaroz jel elektroforezi	28
2.2.5. İstatistiksel analizler	30
3. BULGULAR	31
3.1. Hastalar	31
3.2. Angiotensin dönüştüren enzim	31
3.2.1. Angiotensin dönüştüren enzim 8	31
3.2.2. Angiotensin dönüştüren enzim ID	33
3.3. Tümör nekroz faktörü α 238	34
3.4. Transforme edici büyüme faktörü β 1 25	35
3.5. Vitamin D reseptörü intron 8	37
4. TARTIŞMA ve SONUÇ	39
KAYNAKLAR	43
ÖZGEÇMİŞ	53

SİMGELER ve KISALTMALAR

ALT	Alanin amino transferaz
ACE	Angiotensin converting enzyme (Anjiyotensin Dönüştürücü Enzim)
anti-HBc	Hepatit B kor antikoru
anti-HBcIgG	Hepatit B kor antikori immunglobulin G
anti-HBcIgM	Hepatit B kor antikoru immunglobulin M
anti-HBe	Hepatit B e antikoru
anti-HBs	Hepatit B yüzey antikoru
cccDNA	Kovalent kapalı dairesel (Covalently Closed Circular) DNA
CD4	Başkalaşma topluluğu (Cluster of Differentiation) 4
CD8	Başkalaşma topluluğu (Cluster of Differentiation) 8
ddH ₂ O	Çift saflaştırılmış (double distilled) su
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR1	Doğrudan tekrar (direct repeat) dizisi 1
DR2	Doğrudan tekrar (direct repeat) dizisi 2
ECM	Ekstraselüler matriks
EDTA	Etilen Diamin Tetra-asetik asit
eIF- 2	Protein sentezi başlama faktörü
ER	Endoplazmik Retikulum
Enh	Enhancer
GRE	Glukokortikoid düzenleyici element
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBeAg	Hepatit B e antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HLA	İnsan lökosit antijenleri (Human leucocyte antigens)
IFN	İnterferon
IL	İnterlökin
K	Potasyum
Kb	Kilobaz

L-HBsAg	Geniş Hepatit B yüzey antijeni
MgCl	Magnezyum klorür
M-HBsAg	Orta Hepatit B yüzey antijeni
MHC	Major histokompatibilite kompleksi
mRNA	Mesajcı RNA
Na	Sodyum
NaCl	Sodyum klorür
NK	Doğal katil hücreler (Natural killer cells)
NKT	Doğal katil T hücreler (Natural killer T cells)
ORF	Açık okuma bölgeleri (Open Reading Frame)
PKR	Protein kinaz
PRA	Plazma Renin Aktivitesi
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RAS	Renin Anjiyotensin Sistemi
RE	Restriksiyon Enzimi
RFLP	Restriksiyon Fragmanı Uzunluk Polimorfizmi
RNA	Ribonükleik asit
RNaz H	Ribonükleaz H
Rpm	Dakikadaki döngü sayısı (Revolution Per Minute)
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
s-HBsAg	Küçük Hepatit B yüzey antijeni
STL	Sitotoksik T Lenfositleri
TAE	Tris Asetik asit EDTA
TBE	Tris Borik asit EDTA
TGF	Transföme edici büyüme faktörü
TH1	T yardımcı hücreler (T helper cells) 1
TH2	T yardımcı hücreler (T helper cells) 2
THR	T hücre reseptörü
TNF	Tümör nekroz faktör
Tris HCl	Tris hidroklorik asit
VDR	Vitamin D reseptör

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1. HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü

Şekil 1.2. Hepatit B virüsünün genom yapısı

Şekil 1.3. Hepatit B virüsünün yaşam döngüsü

Şekil 1.4. HbsAg'nin dünyadaki dağılım haritası

Şekil 1.5. İmmün yanıt mekanizması

Şekil 1.6. Hücre içi HBV'nin temizlenmesi

Şekil 3.1. Φ X174 DNA/Hinfi Marker, 1.0 işaretleyicisinin bant açılımının gösterimi

Şekil 2.2. Φ X174 DNA/*HaeIII* 1.0 moleküler ağırlık belirleyicisinin bant açılım modeli.

Şekil 3.1. ACE 8 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi.

Şekil 3.2. ACE ID genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi.

Şekil 3.3. TNF α - 238 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi.

Şekil 3.4. TGF β 1 + 25 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi.

Şekil 3.5. VDR 8 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi.

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1. Polimorfik bölgeler

Çizelge 1.2. Konu ile ilgili yapılmış çalışmalar

Çizelge 2.1. Primerler

Çizelge 2.2. Çalışmada kullanılan restriksiyon enzimleri

Çizelge 2.3. PZR şartları

Çizelge 3.1. ACE 8 genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.2. Hasta grupları için ACE 8 genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.3. ACE ID genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.4. Hasta grupları için ACE ID genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.5. TNF α -238 genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.6. Hasta grupları için TNF α -238 genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.7. TGF β 1 genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.8. Hasta grupları için TGF β 1 genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.9. VDR 8 genotip ve allellerinin dağılımı

Çizelge 3.10. Hasta grupları için VDR 8 genotip ve allellerinin dağılımı

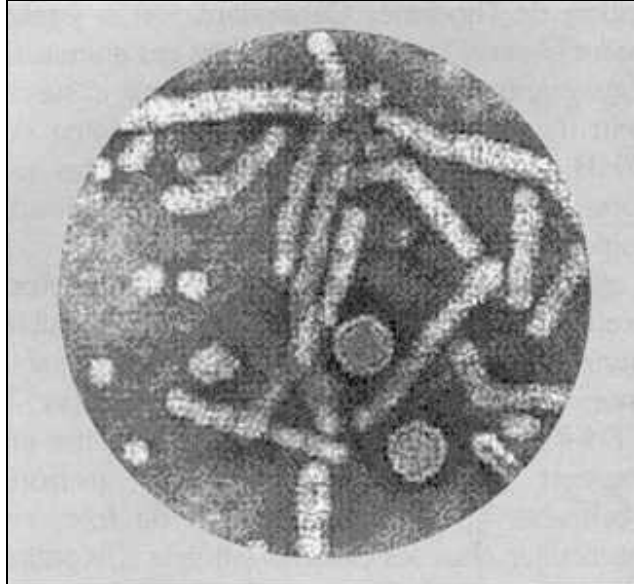
1.GİRİŞ

1.1. Hepatit B Virüsü

Hepatit B virüsü; Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirus cinsinde yer alan, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır.

Hepatit B virüsü elektron mikroskopunda incelenecek olur ise; büyüklük, yapı ve miktar gibi özellikleri bakımından birbirine benzemeyen üç tip partiküle rastlanır. (Testut P., 1996)

- 42-47 nm çapında, infektif özellikte, tam bir virion yapısında, küresel şekilli; Dane partikülleri,
- 16-25 nm çapında içinde nükleik asit bulunmayan, infektif olmayan; küresel partiküller,
- Özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumunda bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda nükleik asit içermeyen, infektif olmayan; tübüler partiküller.



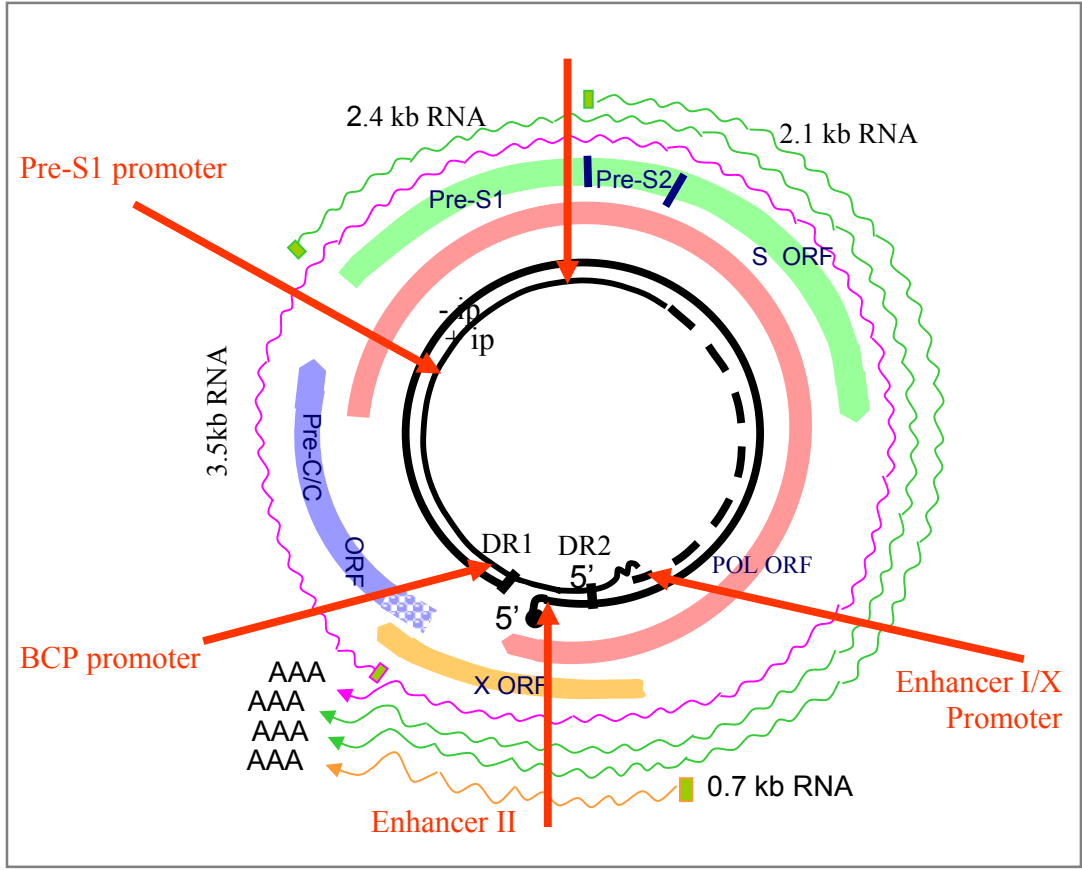
Şekil 1.1. HBV partiküllerinin elektron mikroskobu görüntüsü

Virüs elektron mikroskopunda çift katmanlı olarak görülür. Dıştaki katman viral zarftır, HBsAg proteinlerinden oluşur. HBsAg üç protein çeşidinden oluşur; geniş (L), orta (M), ve küçük (S). Bunlar aynı diziyi paylaşırlar fakat L ve M proteinlerinin farklı uzunluklarda amino ucu uzantıları vardır. L-HBsAg; pre- S1 ve pre-S2 bölgelerini içerirken, M-HBsAg pre-S2'yi içerir. Kor partikülü veya kapsit olarak adlandırılan, DNA'yı saran içteki katman ise HBcAg proteinlerinden oluşmaktadır ve 37 nm çapındadır. Kandaki titresi 10 titre/ml den 10⁹ titre/ml'ye kadar çıkabilmektedir. Kandaki en yaygın virüs parçacıkları virionlar değil, HBsAg'den oluşan ve viral DNA içermeyen 20 nm çaplı küresel partiküllerdir. Bu boş partiküller DNA içermedikleri için enfeksiyöz değildirler. (Lai ve Mason 2001)

1.1.1 HBV Genom Yapısı

Hepatit B virüsü kısmen çift sarmallı, sirküler, 3,2 kb uzunluğunda bir DNA molekülü taşır. Virüsün en önemli özelliği genomu oluşturan sarmalların asimetric olmasıdır.(Summers ve ark., 1975, Gerlich ve ark., 1980) Tamamlanmış negatif sarmal mRNA'ya komplementerdir. Tamamlanmamış pozitif sarmal ise daha kısadır.

HBV de genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup bu sarmal kor, polimeraz, yüzey ve X olmak üzere dört değişik protein kodlayan nükleik asit dizisine (ORF) sahiptir. Bu ORF'lerin transkripsiyonu promoter ve enhancer denilen düzenleyici diziler tarafından kontrol edilmektedir. HBV genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış en az 4 promoter (pre S1, S, X, pre C) ve 2 Enhancer (Enh 1 ve Enh 2) bölgesi bulunmaktadır. (Serter D. 1997, Thiollais P ve ark., 1985) Ayrıca S geni içinde yer alan ve Enh 1 ile bağlantılı olarak glukokortikoid varlığında gen ekspresyonunu yaklaşık 5 kat artıran bir elemanın (GRE) varlığı tanımlanmıştır.



Şekil 1.2. Hepatit B virüsünün genom yapısı

HBV DNA'daki genler bazı bölgelerde çakışmış durumdadırlar. Genomun en uzun geni olan P geni; X ve C genleri ile kısmen, S geni ile tamamen çakışmıştır. Sonuç olarak uzun sarmal 1,5 defa okunmaktadır. Bu özellik nedeniyle HBV, bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genomik yapıya sahip olmakla birlikte, kendini kodlama kapasitesi en fazla olan virüstdür. (Mahoney ve ark., 1999 Neurath ve ark., 1986)

Uzun sarmaldaki S geni yüzey proteinlerini, C geni kapsid proteinlerini, X geni X proteinini ve P geni de DNA polimerazı kodlamaktadır. Ancak başlangıç kodonları farklı olduğu için S geni üzerinde pre S1, pre S2 ve S olmak üzere üç, C geni üzerinde ise pre C ve C olmak üzere iki bölge bulunmaktadır; dolayısıyla farklı başlangıç kodonlarından sentezlenen proteinler de farklı olmaktadır. Bu nedenle 4 adet ORF'ye sahip olmasına rağmen HBV tarafından 7 değişik polipeptit üretilmektedir. (Lau JYN ve Wright TL, 1993)

HBV genomu içindeki protein kodlayan bölgeler dışında iki direkt tekrar bölgesi vardır. 10-12 nükleotit uzunluğunda olan bu yapılar DR1 ve DR2 olarak adlandırılır ve replikasyonda

önemli rol oynar. Bu direk tekrar dizilerinin birbirine tutunması ile viral DNA'nın yapısal bütünlüğü sağlanır. DNA üzerindeki EcoRI restriksiyon kesim bölgesi genomun numaralandırılmasında ilk referans bölge kabul edilir. Kor geninin 5' ucunda bulunan TATA benzeri diziler ise viral RNA polimerazın, promoter bölgesine bağlanması için sinyal görevi görür.

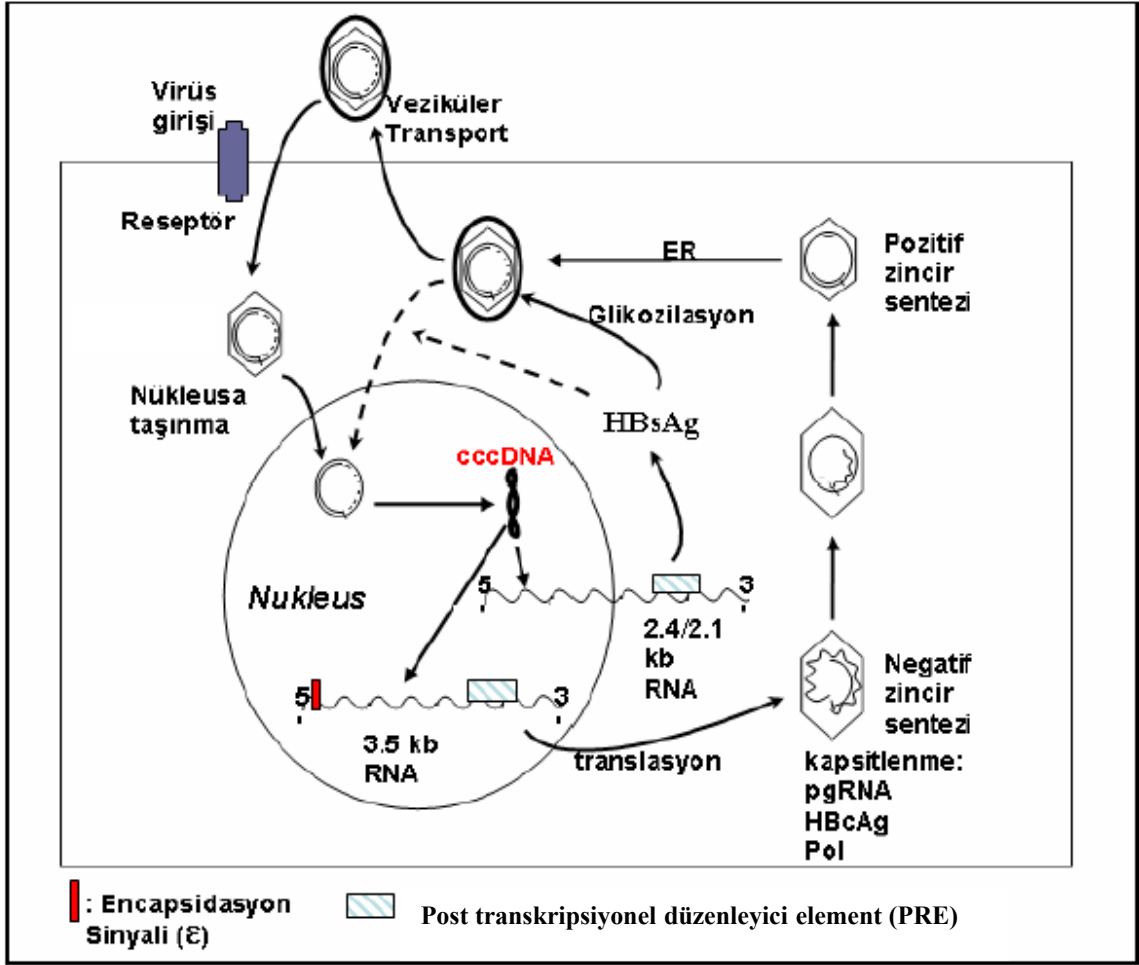
1.1.2. HBV Yaşam Döngüsü

HBV'nin konak hücreye bağlanmasında rol oynadığı düşünülen fibronektin, transferin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albumini, pre S2 glikan, HBV bağlayan faktör gibi birçok reseptör adayları tanımlanmıştır. (A. Budkowskca ve ark., 1995, A.Franco ve ark., 1993, A. R. Neurath ve ark.,1994, U. Treichel ve ark., 1997) S proteinine özgü bazı reseptörlerin varlığı gösterilmiş olsa da HBV'nin hepatosite tutunmasında Lve M proteinlerinin de önemli olduğu saptanmıştır. İn vitro olarak pre S1 ve pre S2 de karaciğere spesifik tutunma bölgeleri tanımlanmıştır. (Robinson WS, 1991)

Hepatosite bağlanan virüsün konak hücre çekirdeğine nasıl ulaştığı tam olarak aydınlatılamamıştır. HBV; muhtemelen reseptöre bağımlı endositoz yoluyla hücre içine girmekte, viral DNA ile nükleokapsid viriondan ayrılmakta ve işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınmaktadır. Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Bu sırada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklıkta onarılmış ve sonuçta tümüyle çift sarmallı, süper kıvrımlı, uçları kapalı, sirküler yapıda 3,2 kb'lık bir HBV-DNA (cccDNA: covalently closed circular DNA) meydana gelir. Replikasyonun normal seyri sırasında, HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez. HBV ile infekte bazı kişilerin serumunda nadir olarak HBcAg'nin varlığı gösterilmiş olsa da, bu antijen viral replikasyon sırasında konak hücre çekirdeğinde sıklıkla saptanabilmektedir. Bu nedenle HBcAg'nin nükleusa girmesinin cccDNA'nın ortaya çıkmasından önce olduğu tahmin edilmektedir. (Lau JYN ve Wright TL, 1993)

cccDNA kalıp olarak kullanılarak konak hücre RNA polimerazının (RNA polimeraz II) yardımı ve viral düzenleyicilerin (4 adet promoter ve 2 adet enhancer) etkisiyle viral RNA'lar sentezlenir. HBV RNA'ların hepsinin 3' uçları aynı nükleotittedir (1934. nükleotid). Bunlar C genine ait ORF'den gelen sinyalin özelliğine göre ya mRNA ya da pregenom görevi yapar. HBV'de fonksiyonu bilinen 4 mRNA transkripti tanımlanmıştır. Genomdan daha uzun olan 3,5 kb'lık pregenomik RNA üzerinden farklı başlangıç noktalarına sahip 3 farklı protein (e antijeni, kor ve polimeraz) sentezlenir. Pregenomik RNA ters transkripsiyon için de kalıp görevi yapar. 2,4 kb'lık transkript üzerinden farklı başlangıç noktalarına sahip preS1, preS2 ve S olmak üzere 3 farklı protein sentezlenir. 2,1 kb'lık transkript üzerinden de preS1 dışındaki yüzey proteinlerinin sentezi gerçekleşir. 0,7 kb'lık en küçük transkript, X proteininin sentezinden sorumludur. (Lau JYN ve Wright TL, 1993) Translasyon sırasında oluşan pregenom, kor partikülü içine yerleşir. Konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca 3.5 kb'lık RNA'dan (-) DNA sarmalı sentezlenir. Bu oluşan (-) iplik DNA sentezi için kalıp görevi görür veya nükleusa dönerek cccDNA'ları çoğaltmak ya da viral envelop proteinleri ile kaplanmak üzere çift iplikli, açık dairesel DNA genomu haline gelir. Eğer viral envelop proteinleri ile kaplanırsa endoplasmik retikulumun içine girer, golgi aparatı ile birlikte kana atılır ve diğer hepatositlere yayılır. (Chisari,2000)

Negatif iplikçiğin sentez işlemi; DR1'in 3' ucundaki terminal proteinin bulunduğu yerden başlar. Sentez ilerledikçe RNA otomatik olarak RNaz H etkisiyle tahrip edilir. Kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır. Sentez DR2'nin 3' ucundan başlar ve uzun zincirin 5' ucundaki terminal protein geçilinceye kadar devam eder. Genomun sirkülasyonu (-) iplikçiğin 3' ucundaki 9-10 nükleotitlik terminal artık sayesinde olur. Kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesiyle ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesi nedeniyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır. (Thiollais, P., Pourcel, C., Dejean, A., 1985)

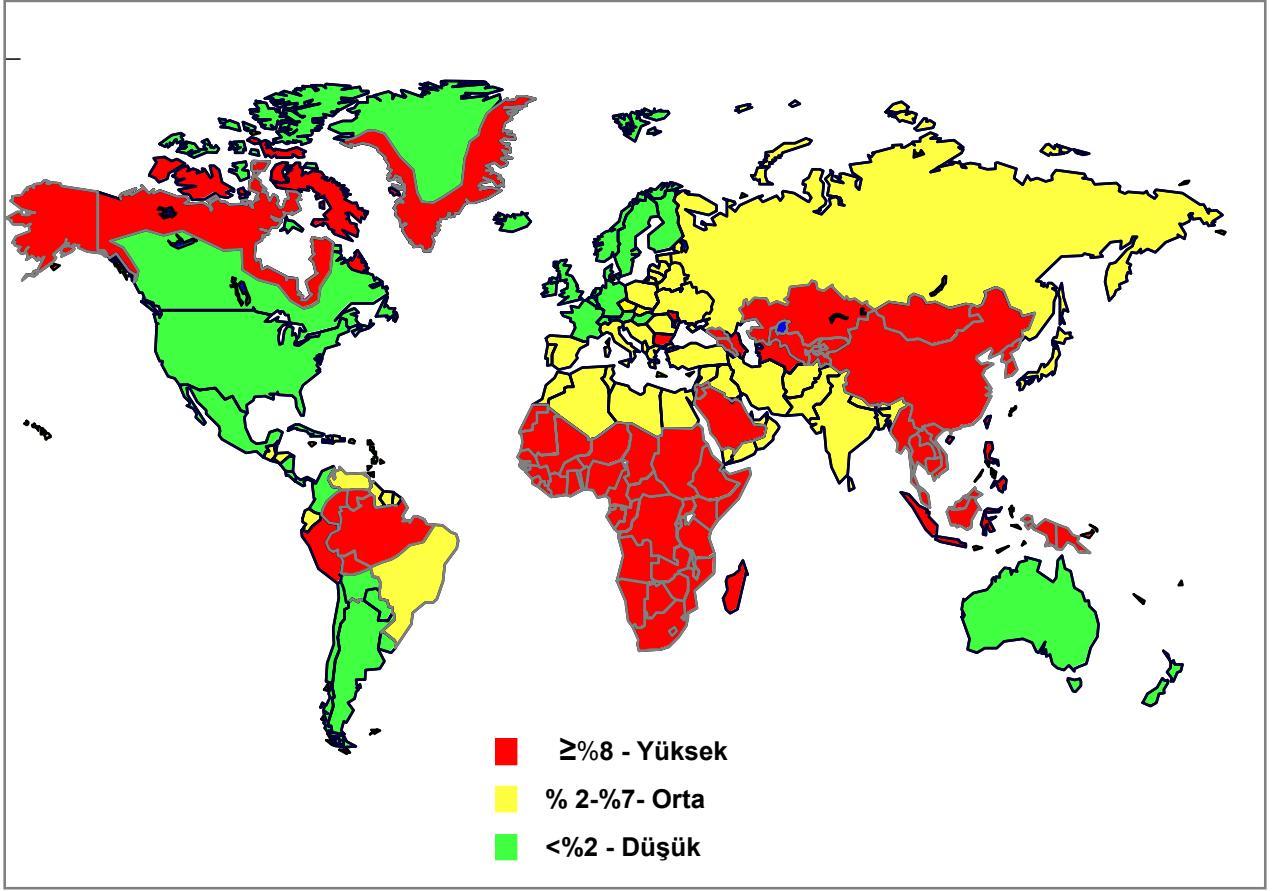


Şekil 1.3. HBV'nin yaşam döngüsü

1.2. Hepatit B Virüs İnfeksiyonu

Bütün dünyada yaygın olarak görülen Hepatit B virüsüne bağlı akut hepatitin ortalama % 5'inin kronikleştiği ve bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü, sirozlu olgularda da hepatoselüler kanser gelişme riskinin oldukça yüksek olduğu bilinen bir gerçektir.

HBV enfeksiyonunun dünyadaki dağılımı, bölgelere göre farklılık göstermektedir. Bu farklılıklar nedeniyle dünya; düşük, orta ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır. Dünya nüfusunun üçte biri yüksek enfeksiyon riski olan bölgelerde yaşamaktadır.



Şekil 1.4: HBsAg'nin dünyadaki dağılım haritası

HBV'nin dört ana bulaş yolu vardır: İnfekte kan ya da vücut sıvıları ile parenteral temas (perkütan), cinsel temas, infekte anneden yeni doğana bulaşma, infekte kişilerle cinsellik içermeyen yakın temas.

Viral hepatitler, asemptomatik infeksiyondan fulminant hastalığa kadar değişen farklı klinik seyir göstermektedir. Hastalık çocuklarda ve gençlerde yetişkinlere göre daha hafif ve asemptomatik olarak seyretmektedir. HBV infeksiyonunun 4 yaşın altındaki çocuklarda % 90, 30 yaşın üzerindeki yetişkinlerde ise 2/3 oranında asemptomatik olarak geçirildiği bildirilmektedir.(Koff, RS., 1993)

Akut HBV infeksiyonunun inkübasyon dönemi 4-28 hafta olarak belirlenmiş fakat çoğu vakada bu aralık 60-180 gündür. Hepatitin ortaya çıkması serumda HBsAg'nin saptanmasından ortalama 4 hafta (1-7 hafta) sonradır.(Robinson, WS., 1995)

Yeni infekte olan kişilerde, HBsAg, HBV ile temastan 30-60 gün sonra serumda belirlenir. HBsAg varlığı devam eden infeksiyonu gösterir. HBsAg'nin 3 aydan uzun süre kalması kronik hepatit B infeksiyonunun gelişeceğini gösterir.

Anti-HBs, HBsAg kaybolduktan sonra ve genellikle hastalığın başlangıcından 3 ay sonra ortaya çıkar. İyileşmeyi ve immüniteyi gösterir. Anti-HBs çoğu kişilerde hayat boyu kalıcıdır. Anti-HBs ile birlikte anti-HBcIgG pozitifliği doğal immüniteyi, sadece anti-HBs pozitifliği aşılama ile oluşan koruyuculuğu gösterir. Ayrıca HBsAg taşıyıcılarının %10- 40'ında düşük titrede anti-HBs olabilir. Bu durum, mekanizması kesin olmamakla beraber farklı subtiplerle aynı zamanda infeksiyon olmasına bağlanmaktadır. (Sherlock, S., Dooley, J., 1997)

Anti-HBcIgM ve IgG semptomların başlamasıyla ortaya çıkar, IgM birkaç ay pozitif kalır ve hastalığın başlangıcından 4-8 ay sonra serumda tespit edilemez. HBsAg'nin serumdan kaybolup anti-HBs gelişinceye kadar geçen dönemde anti-HBcIgM'nin varlığı akut infeksiyonu gösteren en önemli işarettir. Anti-HBcIgM'nin varlığını sürdürmesi hastalığın kronikleşeceğinin işaretidir. Anti-HBcIgM'nin 7-8S formunun kronik HBV infeksiyonunda, 19S formunun ise akut infeksiyonda dominant olduğu bildirilmektedir. (Siogren, MH., 1996)

Hepatit B virüsüne maruz kalanlarda anti-HBcIgG yıllarca veya hayat boyu pozitif kalabilir. HBsAg taşıyıcılarında anti-HBcIgG yüksek titrede bulunur. Anti-HBs olmadan, yüksek titrede anti-HBcIgG olması viral infeksiyonun devam ettiğini gösterir. Anti-HBs ile birlikte anti-HBcIgG'nin düşük titrelerde bulunması hepatit B infeksiyonunun çok eskiden geçirildiğini gösterir.

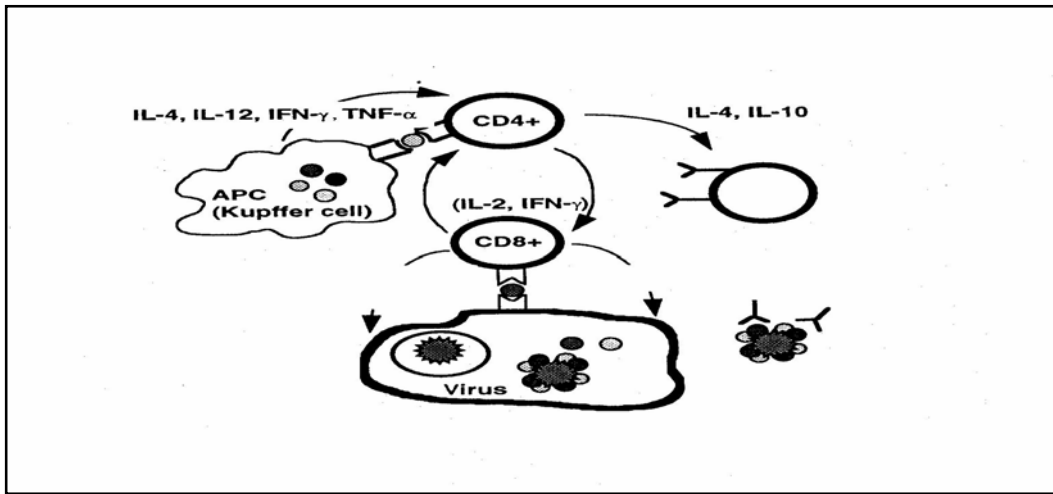
HBeAg, viral replikasyonun devam ettiğini ve infektiviteyi gösterir. HBsAg'den kısa bir süre sonra pozitifleşir. 10 haftadan daha uzun süre devam etmesi infeksiyonun kronikleşeceğinin belirtisidir. Anti-HBe nispeten düşük infektivitenin ve hastalığın tamamen iyileşeceğinin güçlü

bir göstergesidir. Anti-HBe genellikle akut infeksiyondan yıllar sonra kaybolur. (Alter ve Bell, 2001)

HBV-DNA viral replikasyonun en önemli göstergesidir. HBsAg varlığında serumda HBV-DNA tespiti viremi düzeyini ortaya koyar ve serum transaminaz düzeyleri ile orantılıdır.

1.3. Hepatit B İnfeksiyonunda İmmün Yanıtlar

Viral infeksiyonun hemen ardından, antijen belirli olmayan bazı etki mekanizmaları çalışmaya başlarlar (Şek. 1.5. İmmün yanıt mekanizması). Bunlardan biri olan interferonlar, viral yaşam döngüsünün pek çok fazına karşı etki eden bir grup proteindir. İki temel IFN tipi: Tip 1 IFN; IFN- α , - β 'dir ve bunlar antiproliferatif ve antiviral etki gösterirler. Diğeri, tip 2 IFN veya IFN- γ 'dir ve immün düzenleyici sitokin olarak görev yapar.



Şekil 1.5. İmmün yanıt mekanizması

Tip1 interferonlar bir grup hücrel genin transkripsiyonunu aktif hale getirirler. Bunlardan Mx protein, 2'-5' oligoadenilat sentetaz (2'-5' OAS) ve IFN tetikli protein kinaz (PKR) antiviral aktiviteye sahiptir. En iyi bilinen hücrel protein, 2'-5' OAS'dir. RnazL'yi aktif hale getirerek çift iplikli RNA'yı parçalarlar (Foster, 1997; Peters, 1996).

PKR, serin/treonin belirli protein kinazdır ve eIF-2'yi (protein sentezi başlama faktörü) fosforile ederek protein sentezini ve dolayısıyla viral replikasyonu global olarak engellerler. PKR'nin tümör baskılayıcı ve apoptozu tetikleyici fonksiyonları da olabilir. Bu protein kinazın IFN tarafından düzenlenmesi önemlidir (Clemens ve Elia, 1997).

Bu etkilerin yanı sıra interferonlar, hücre yüzeyinde HLA sınıf I ifadesini arttırarak enfekte hücrelerin immün aracılı parçalanmasını arttırır (Attallah ve Strong, 1979).

NK hücrelerinin tetiklenmesi, aktivasyonu ve çoğalması interferonlara bağlıdır (Trinchieri, 1997).

Bazı çalışmalar NK hücrelerinin sitotoksik etkisinin kronik HBV enfeksiyonunda azalmış olduğunu göstermektedir (De Martino ve ark., 1985; Corado, 1997).

Virüs hücreye girdikten sonra viral yayılmayı baskın olarak engelleyen, hücreyel immün cevaptır. T hücre reseptörü (THR) ile HLA sınıf I veya sınıf II molekülleri ile işlenmiş viral proteinlerden oluşan kompleksin ilişkisi sonucu CD4+T ve CD8+T hücreleri fonksiyon görür. THR ile uygun moleküler kompleksin ilişkisi ile, T hücreleri aktif hale gelir ve sitoliz, sitokin üretimi gibi fonksiyonlar sergilerler.

CD4+ hücreler sitokin üretme kapasitelerinden dolayı önemli rol oynarlar. İşaretçi (prekursor) hücreler öncelikle IL-4 ve IFN- γ üretirler, bu tip 0 modeli olarak adlandırılır, daha sonra tip 1 ve tip 2 hücrelere başkalaşır.

Tip 1 cevapları IL-2 ve IFN- γ cevabı ile karakterizedir, bunlar da antijen belirli hücreyel bağışıklığı sağlarlar (Biron, 1994). Ayrıca tip I interferonlar da bu gruptadır ve virüsler gibi hücre içi patojenlere karşı etkilidirler (Tough, 1996). Tip 2 cevapları IL-4, IL-5 ve IL-10 ile karakterizedir ve humoral immün cevapları desteklerler. Tip 0 hücreleri, sitokin ortamına ve antijen yüküne ve bazı diğer faktörlere göre tip I veya tip II'ye başkalaşır (Mosmann ve Sad, 1996). Mesela, IFN- γ , IL-12, TGF- β 1 varlığı, cevap veren bir hücreyi tip I fenotipine çevirirken, IL-4 ve IL-10 varlığı tip 2 fenotipine çevirir. Tam tersine, IL-4 ve IL-10 tip I cevapları engeller (Croft ve ark., 1994). Tip 0 hücrelerin değişimini sağlayan sitokinler T-

olmayan hücreler tarafından sentezlenir. Mesela IL-12 makrofajlardan ve NK hücrelerden, IL-4 mast hücrelerden ve karaciğere özgü olan NK hücrelerden salgılanabilir (Chen ve Paul, 1997). IL-2, TNF- α , IL-6; naif (CD45RA+) ve bellek (CD45RO+) CD4+ hücrelerini çoğalmaları için aktif hale getirir. Bu antijenden bağımsız T hücre aktivasyon yolu, etken T hücreleri *in vivo* ortamda bir araya toplamak için ve bellek T hücrelerin klonal büyüklüğünü antijen yokluğunda sağlamak için gereklidir. (Unutmaz, j infect dis, 1997:176:217-226)

1.3.1. Akut Hepatit B'de İmmun Yanıt

Akut HBV enfeksiyonu süresince, immün sistemin pek çok kolu harekete geçer ve viral temizliği sağlayabilmek için bunların bir arada hareket etmeleri gereklidir. Akut HBV enfeksiyonu sırasında, transaminazların yükselmesiyle aynı anda HBV proteinleri için belirli antikorlar oluşur (Milich ve ark., 1995b). Bunlardan anti-HBs kritiktir. Akut, HBV enfeksiyonu sırasında da HbcAg, HbeAg, HbsAg'ye karşı yoğun CD4+ cevabı vardır (Ferrari ve ark., 1991). Kor proteinine karşı yoğun bir CD4+, klas II sınırlı cevap, HBV'nin serumdan temizlenmesi ve vireminin kontrolü için gereklidir. Bu arada yer alan bazı mekanizmalar ise şöyledir:

1. HbcAg belirli yardımcı T hücreleri, HBs ve Hbc belirli B hücrelerine yardım ederler (Milich ve ark., 1987).
2. HBV belirli CD4+, HBV belirli STL'nin uyarılmasına katılır. Kronik HBV enfeksiyonunda akut enfeksiyona göre daha zayıf CD4+ ve STL cevabı vardır (Penna ve ark., 1991; Nayersina ve ark., 1993).

Akut HBV'den iyileşmiş olan kişilerden alınan T hücre hatlarında ve klonlarında tip1 cevabı, ve baskın olarak IFN- γ görülür (Penna ve ark., 1997). Fakat kronik hepatit B'de CD4+ ve CD8+ karaciğer T hücrelerinin çoğu tip 0 hücreler oldukları ve hem IFN- γ hem de IL-4 ve IL-5 salgılayabildikleri görülmüştür (Bertoletti ve ark., 1997). Ayrıca interferona cevap verenlerde, vermeyenlere göre IL-12 ve tip 1 sitokinlerin daha çok salındığı görülmüştür. Bu bulgular, akut HBV'nin iyileşmesinde, CD4+ ve CD8+ HBV belirli hücrel immün

cevapların kritik olduğu bulgusuyla tutarlıdır. Fakat bu polarizasyonun neden bazı insanlarda olup bazılarında olmadığı belli değildir.

HBV antijeninin miktarı da değişik immün yanıtı yol açar. Farede, HBcAg, tip 1 benzeri hücreleri harekete geçirirken, HBeAg tip0 ve tip2 benzeri hücreleri harekete geçirir (Milich ve ark., 1997). Dolayısıyla, erken infeksiyon döneminde, HBeAg'yi kıyasla, daha fazla üreten kişide tip 2 cevabı oluşabilir.

CD4+ hücre cevabının yanı sıra, akut HBV infeksiyonunun ayırt edici özelliği, kor, envelop, polimeraz gen ürünlerine karşı oluşmuş güçlü, poliklonal, multispesifik STL cevabıdır. (Nayersina ve ark., 1993; Penna ve ark., 1992).

HBV'ye özel bu STL cevabı, virüsün temizlenmesinde önemli rol oynar (Chisari, 1995). Bunun bir kısmı enfekte hücrelerin tanınması ve yok edilmesidir (Eddleston, 1982). Hem *in vitro* hem *in vivo* deneyler bazı sitokinlerin HBV replikasyonunu engellediğini göstermiştir. *In vitro* ortamda, rekombinant TNF- α , HBV replikasyonunu engeller (Gilles ve ark., 1992). Bunu HBV mRNA'nın parçalanmasını hızlandıran bir post-translasyon mekanizması ile yaptığı düşünülmektedir (Tsui ve ark., 1995). Ayrıca kor promotör element, TNF- α , IFN- γ ve IFN- α 'ya karşı duyarlıdır (Romero ve Lavine, 1996). Guidotti ve Chisari'nin (1994) grubunun yaptığı bir çalışma STL tarafından salgılanan sitokinlerin *in vivo* ortamda HBV infeksiyonu üzerinde test etmiştir. Tüm genom HBV replikatif formu ifade eden fareye HBV belirli STL transferinden sonra, karaciğer inflamasyonu ve HBV gen ifadesinin azaldığı görülmüştür. Virüs belirli STL tarafından sitokin salgılanması (IFN- γ ve TNF- α), bu modelde STL'nin virüsü temizleme kabiliyetini artırır (Guidotti ve ark., 1994). Hayvanlara IFN- α ve TNF- α 'ya karşı antikor verildiğinde de kaskadın engellendiği görülmüştür (Guidotti ve ark., 1994).

Bu tez çalışması kapsamında yer alan TNF α gen bölgesine ait bilgiler yukarıda anlatılmıştır. Çalışmamızda yer alan HBV ye karşı immün yanıtta önemli olduğu düşünülen diğer gen bölgeleri; VDR, ACE, TGF β 'ya ait bilgiler aşağıda verilmiştir.

Vitamin D kalsiyum metabolizmasında etkilidir ve ayrıca önemli bir immün düzenleyici

hormondur. Vitamin D'nin aktif metaboliti, 1,25D₃, monositleri aktive eder, hücre-ortamlı immüneyi stimule eder, lenfosit proliferasyonunu, immunglobin üretimini ve sitokin sentezini baskılar. (Manologas, 1994)

Vitamin D reseptör geni (VDR); Vitamin D'nin hormonal fonksiyonlarının düzenlenmesi ve böylece Vitamin D'nin akışkanlığını sağlamakla görevlidir. Bu sebeple de kalsiyum metabolizmasının sağlanmasında temel rol oynar. VDR molekülünde meydana gelen değişiklikler, hücre ve doku hemostazının düzenlenmesinde kritik değerler oluşturarak aksamalara sebep olabilir. VDR, monositler ve lenfositler üzerinde ifade edilir ve bu reseptörün uyarılması immün sistemi etkiler (Hutchinson ve ark., 2000).

Karaciğerde bulunan makrofajlar, Kupfer hücreleri, TNF- α gibi sitokinlerin etkisiyle aktif hale gelirler ve TGF- β 1 üretirler. TGF- β 1, Hücre büyümesi, farklılaşması ve matriks üretimini düzenleyen multifonksiyonel bir sitokindir. TGF- β 1 geni 19.kromozomda lokalizedir. TGF- β 1 mRNA, lobuler nekroz ile ilişkilidir (Napoli ve ark., 1994; Paradis ve ark., 1996). TGF- β 1 aynı zamanda, CTL'lerin sitolitik aktivitesini engeller.

Hepatik fibrozda dominant fibrojenik sitokin TGF- β 1'dir. Transforme edici büyüme faktörü (TGF) beta 1, stellat hücrelerinin ve bunların ECM protein üretimlerinin aktivasyonuna katılır (Friedman, 1999)

TGF- β 1 sekresyonunun ve aktivasyonunun düzenlenmesi kompleks post-translasyonel olayları içerir. Bunlar mRNA stabilizasyonu, TGF- β 1 kompleksinin oluşması ve aktivasyonu ve reseptör ekspresyonunun modülasyonunu içerir (Kim ve ark., 1992).

TGF- β 1, karaciğerde, parenkimal olmayan hücrelerde çoğunlukla stellat ve, Kupfer ve endotel hücreleri tarafından sentezlenir (Nakatsukasa ve ark., 1990a; Nakatsukasa ve ark., 1990b).

Kardiak ve renal fibrozda, TGF- β 1 üretimi anjiyotensin II (AII) tarafından artabilir. AII, renin-anjiyotensin sistem (RAS)'in efektör molekülüdür (Kim, 95; Lee, 95) RAS'ın birincil görevi vascular tonu ve renal tuz salınımını ayarlamaktır. Fakat yeni bulgulara göre, kan basıncı

üzerine olan etkilerinden bağımsız olarak, AII, ECM birikimini çoğaltır. (Noble, 97)

Anjiyotensin I dönüştürücü enzim (ACE), çinko metalloproteazdır ve asıl fonksiyonu anjiyotensin I' i vasoaktif ve aldosteronu uyaran peptid anjiyotensin II' ye çevirmektir. (Erdös, 87). Anjiyotensin II inflamatuvar öncüsüdür. NF Kappa B' nin ekspresyonunu uyarır. İnflamatuvar sitokin olan IL- 6' nın gen ekspresyonunu düzenler. (Phillips MI. Ve ark., 2002)

Renin Anjiyotensin Sistemi: Renin bir proteolitik enzim olup jukstaglomerüler hücrelerde depolanır ve sekrete edilir. Jukstaglomerüler hücreler afferent arteriyol duvarında özel bir grup hücredir. Renin karaciğerde yapılan renin substratını (anjiyotensinojen) etkileyerek anjiyotensin I' i oluşturur. Anjiyotensin I, Dönüştürücü Enzim ile (ACE) Anjiyotensin II' ye dönüşür. Kimaz Anjiyotensin I' i Anjiyotensin II' ye dönüştüren diğer bir enzimdir.

Renin sekresyonunu etkileyen mekanizmalar: Renal perfüzyon basıncı, tübül içi Na konsantrasyonu, diyetle K alımı ve Anjiyotensin II' nin kendisidir. Plazma renin aktivitesi (PRA); azalmış sıvı hacmi, efektif plazma hacmi, renal perfüzyon basıncı; artmış sempatik aktivite, renin substrat düzeyi; renin salgılayan tümörler, renal parankimal lezyonlardan kaynaklanan iskemi ve yüksek renin düzeyiyle birlikte olan primer hipertansiyonda yüksek iken ekstrasellüler sıvı birikimi, sempatik sistem yetersizliği, hiperkalemi ve düşük renin düzeyiyle birlikte olan primer hipertansiyonda düşük düzeydedir.

Anjiyotensin II' nin Tip I (AT1) ve Tip II (AT2) olmak üzere başlıca iki reseptörü vardır. Anjiyotensin II' nin bilinen hemen bütün etkileri AT1 reseptörü aracılığı ile olur. AT2 reseptörlerinin rolü tam olarak anlaşılamamıştır. AT2 reseptörlerinin aktivasyonunun bradikinin ve nitrik oksid aracılığı ile vazodilatasyon oluşturduğu düşünülmektedir.

Anjiyotensin II çok etkili bir sistemik vazokonstriktör ajandır. Vasküler düz kas, sempatik sinir sistemi, adrenal korteks ve böbrek üzerine olan etkileri anjiyotensin II' nin vazokonstriktör ve volüm tutucu özelliklerini artırır.

Anjiyotensin II' nin yukarıdaki etkilerinden başka vasküler düz kas hücrelerinde inflamatuvar bir yanıt oluşturur ve ateroskleroz ile bir ilişkisi mevcuttur.

ACE'nin başka pek çok fizyolojik rolleri olduğu düşünülmektedir. Çünkü enzim belirliliği geniştir ve çok dağılmıştır. (Ehlers, 89)

1.3.2.Kronik Hepatit B'de İmmün Yanıt

Kalıcı HBV enfeksiyonunun gelişimini açıklamak için bazı mekanizmalar öne sürülmüştür:

1. Akut hepatit B'nin iyileşmesinde etken olan mekanizmalar, kronik enfeksiyonlu hastaların iyileşmesini engelliyor olabilir. HBV replikasyonunun ve antijenin ifade edilmesinin, hasarlı T hücre yanıtı ile kısmi olarak engellenmesi, enfekte hücrelerin immün sistemden kaçmasına neden olabilir. T hücre etken fonksiyonları iki yol izlerler: düşük peptid konsantrasyonları ve zayıf T hücre reseptör antagonistleri, CD8+T hücrelerinin sitotoksik etki mekanizmalarını tetiklerken, yüksek peptid konsantrasyonu IFN. üretimi ve IL-2'ye yanıt verebilmek için ve T hücre çoğalması için gereklidir (Valitutti ve ark., 1996). Dolayısıyla yeterli derecede aktive olmamış CD8+T hücreler, sitokin aracılı mekanizmalar ile enfeksiyonu temizleyemezler fakat hala karaciğer hasarı oluşabilir.

2. Eger enfeksiyonun kinetiği konakçı immün yanıtlara değil de HBV replikasyonuna doğru eğilim gösteriyorsa, HBV konağın savunmasını yıkar (Chisari, 2000). Pek çok hepatositi enfekte eder ve HBV'ye özgü T hücrelerin ulaşamayacakları, karaciğer dışı dokulara ulaşır (Bertoletti ve ark.,1994b).

3. Üçüncü mekanizma, T hücre tanıma bölgelerinde oluşan viral kaçış mutasyonları ile ilgilidir. T hücre epitoplarında HBV varyasyonları kronik HBV enfeksiyonunda gözlenmiştir (Bertoletti ve ark., 1994a; 1994b).

4. T hücre epitoplarında varyasyon gösteren viral diziler, çoğalma ve sitokin salgılanması gibi T hücre fonksiyonlarını engelleyebilirler ve orijinal epitopa karşı immün yanıtı tamamen veya kısmen engellerler (Lanzavecchia, 1997; Evavold ve Allen, 1991; Sloan-Lancaster ve

ark., 1993). Fakat HBV, çok yönden özgün bir immün yanıtta kaçmak için pek çok farklı epitopta mutasyona uğramalıdır ve en azından bazı epitoplardaki mutasyonlar viral yaşam döngüsüyle bağdaşmayacaktır (Bertoletti ve ark., 1994a; 1994b).

1.3. Polimorfizmler

TGF- β 1 25 bç'deki kodondaki polimorfizm arjinin-prolin aminoasit değişimine yol açar. Bu noktada arjinin amino asit varlığı yüksek TGF- β 1 salgılanmasıyla ilişkilendirilmiştir (Awad ve ark., 1998).

Pro/arg yer değiştirmesi küçük, yüklü bir aminoasidin değişimine işaret eder ve bu da kodon 29'da ki bitişik kesim noktası üzerinde direkt etkisi olabilir (Awad ve ark., 1998).

Yapılan çalışmalarda, 25 bç'deki kodon için TGF- β 1 polimorfizminin *in vitro* ortamda TGF- β 1 üretimi ile ilişkili olduğu görülmüştür. *In vitro* ortamda periferik mononükleer kan hücrelerinin uyarılması sonucu arjinin/arjinin homozigot genotipin arjinin/prolin genotipteki hastalara göre daha fazla TGF- β 1 proteini ürettikleri görülmüştür. Ayrıca daha fazla TGF- β 1 üreten genotipte (arg/arg) hastaların daha az TGF- β 1 üreten genotipte (arg/pro veya pro/pro) olan hastalara göre hepatik fibrozun fazla olduğu görülmüştür.

PBL tarafından TGF- β 1 üretimi, sağlıklı insanlarda bakıldığında, TGF- β 1 +74 bölgesinde (kodon 25) G/G genotipinde, G/C genotipine göre daha yüksektir (Awad ve ark., 1998).

ACE konsantrasyonu ile ilgili olarak bazı bölgeler belirlenmiştir. Bunlardan intron 17'deki polimorfizm, ACE 8, ACE'deki toplam çeşitliliğin %19'una etkilidir. (Zhu ve ark. 2001)

ACE intron 16'daki polimorfizm, ACE I/D, bir Alu ekleme/çıkarma bölgesidir. Bu bölge ile ilgili, DD genotipinin, yüksek; DI genotipinin, orta; II genotipinin düşük ACE konsantrasyonu ile ilgili olduğu bulunmuştur (Rigat ve ark., 1990).

TNF α geni, MHC'nin sınıf III bölgesinde bulunur. HLA-B bölgesinin 250 kb sentromerik yönünde, HLA-DR bölgesine ise 850 kb telomerik yönünde bulunur. TNF'nin potansiyel biyolojik etkileri nedeniyle, üretimi hem transkripsiyonel hem de post-transkripsiyonel olarak kontrol edilir (Sariban ve ark., 1988). TNF α promotörü 238. kodona bulunan polimorfizmde; GG genotipi düşük, GA orta, AA yüksek TNF sekresyonuna neden olmaktadır.

Vitamin D reseptörü, monositler ve lenfositler üzerinde ifade edilir ve bu reseptörün stimule edilmesi immün sistemi etkiler. Vitamin D reseptöründe pek çok polimorfizm bulunur. Bunlardan transkripsiyon verimini etkileyen polimorfizmlerin viral replikasyonun kontrolü ile ilişkili olduğu düşünülmektedir.

VDR intron 8 genotipleri AA, Aa, aa olarak adlandırılmıştır (Hutchinson ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar sonunda Vitamin D ile kronik HBV enfeksiyonunun engellenebileceği düşünülüyor. (Bellamy ve ark., 1999).

Çalışmamızda ele alınan faktörler ve bu faktörlerin bilinen polimorfik bölgelerinin gen ifadesine etkisi çizelge 1.1 de verilmiştir.

Çizelge 1.1. Polimorfik bölgeler

Genler	Polimorfik Bölgeler	Genotip	Gen ifadesine etkisi	Kaynak
ACE	- 8	AA AG GG	Bağlantı dengesizliği	Zhu ve ark., 2001
ACE	ID	DD ID II	Yüksek Orta Düşük	Rigat ve ark., 1998
TNF- α	-238	GG GA AA	Düşük Orta Yüksek	Wilson ve ark., 1993
TGF- β 1	⁺ 74 (kodon 25)	GG GC CC	Yüksek Orta Düşük	Awad ve ark., 1998
VDR	8	AA Aa aa	Bağlantı dengesizliği	Bellamy ve ark., 1999

Çizelge 1.2: Konu ile ilgili yapılmış çalışmalar

Çalışılan bölgeler	Hasta grubu	Sonuçlar	Kaynak
ACE 4 ACE8	332 aileden 1343 kişi	ACE 4 ve ACE 8 arasında güçlü bağlantı dengesizliği görülmüştür. Bu allelik etkileşimler kan basıncı düzeylerinde önemli role sahiptir.	Zhu ve ark., 2001
ACE ID	109 tip 2 diyabet hastası (86 diyabetik nefropati, 23 normal albumunuri)	D alleli ile diyabetik nefropati arasında bir ilişki olduğu saptanmıştır.	Viswanathan ve ark., 2001
TNF α - 238 TNF α - 308 TNF β NcoI	63 Akut Hepatit 32 Fulminant Hepatit 120 sağlıklı kontrol	TNF α - 238, -308 gen bölgeleri için hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. TNF β gen bölgesi için yüksek sekresyona neden olan genotip fulminant hepatit hastalarında daha fazla görülmüştür.	Noriko Tsuchiya ve ark., 2004

TGF β 1+ 25 TGF β 1+ 10	55 siroz 94 hemakromatozis hastası	Arg/pro, pro/pro genotipleri arg/arg genotipine göre sirozda daha çok görölmektedir. TGF β 1+ 10 bölgesi için ise bir farklılık görölmemiştir.	Christoph, H. ve ark., 2005
VDR intron 8 VDR ekzon 9	214 kronik HBV inf. 408 sağlıklı kontrol	Hasta ve kontrol grubu arasında anamlı bir fark bulunmamıştır. aa genotipi HAI \leq 5, fibroziz skor \leq 2 olan hasta grubunda, HAI > 5, fibroziz skor > 2 olan hasta grubuna göre daha fazla görölmüştür.	Suneetha ve ark., 2006

1.4. Amaç:

Hepatit B virüsü hücreye girdikten sonra konakçısında farklı tablolara neden olmaktadır. Bazı kişilerde akut olarak geçirilen infeksiyondan sonra iyileşme görülürken, bazı kişilerde hastalık kronikleşmekte, ilerleyen dönemde karaciğer sirozu hatta karaciğer kanserine dönüşebilmektedir. Hastalığın bu kadar farklı sonuca yol açmasının bireysel farklılıklardan kaynaklandığı düşünülmektedir. Bu bireysel farklılıklarda; infekte kişilerin virüse karşı verdikleri değişik immün yanıtlardır. Hastalığa karşı kendiliğinden doğal bağışıklık geliştiren kişilerle, kronik hastalık geliştiren kişilerin immün yanıt farklılıklarında pek çok faktörün yanında sitokin yanıtlarındaki farkların da rolü olabilir. Bu faktörlerin genetik polimorfizmleri hastalığın bireylerde farklı seyretmesinde etken olabilir. Bu çalışmada ACE, TNF α , TGF β , VDR 8 faktörlerinin gen polimorfizmleri ile hepatit B'nin farklı tablolara yol açması arasındaki ilişkinin araştırılması amaçlanmıştır.

2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1. Gereçler

2.1.1. Hastalar

Bu çalışmaya Üniversitemizin Gastroenteroloji ve Hepatoloji polikliniğine başvuran kişilerden, HBV hasta grubu olarak HBsAg pozitif ve karaciğer biyopsileri ile histolojik tanıları elde edilen 220 hasta alınmıştır. Kontrol grubu olarak 122 anti-HBs pozitif sağlıklı kişi alınmıştır.

Hastalardan ve kontrol grubundan alınan kanlar EDTA'lı tüplerde toplanmış ve bekletilmeden DNA izolasyonları yapılmıştır.

2.1.2. Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonlarında kullanılan primerlerin tümü TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Almanya) tarafından sentezlenmiştir. Primer dizileri Çizelge 2.1'de verilmiştir.

Çizelge 2.1: Primerler.

Primer no	Primer dizisi (5'→3' yönünde)	Kaynak:	Çoğaltılan baz çifti
P 1	CTGACGAATGTGATGGCCGC	Zhu ve ark.,2001	130
P 2	TTGATGAGTTCCACGTATTTTCG		
P 3	CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT	Zhu ve ark.,2001	497
P 4	GAT GTG GCC ATC ACA TTC GTC AGA T		
P 5	AGA AGA CCC CCC TCG GAA CC	Day ve ark., 1998	152
P 6	ATC TGG AGG CGG TAG TG		
P 7	ACT GGT GCT GAC GCC TGG CCC	Li ve ark., 2003	197
P 8	ACT GGT GCT GAC GCC TGG CCG		
P 9	TGC TGT TGT ACA GGG CGA GCA		
P 10	CAA CCA AGA CTA CAA GTA CCG CGT CAG TGA	Verbeek ve ark., 2000	872

P 11	AAC CAG CGG GAA GAG GTC AAG GG		
------	--------------------------------	--	--

2.1.3. Kimyasallar

Agaroz	Quantum Biotechnologies
Amoniyum	Sigma, Almanya
Borik asit	Merck, Frankfurt, Almanya
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Etidium Bromide	Sigma, Almanya
Fikol	Biochrom, Almanya
Mutlak Etanol	Kimetsan, Türkiye
NaCl	Sigma, Almanya
Na ₂ EDTA	Sigma, Almanya
Proteinaz K	Sigma, Almanya
SDS	Sigma, Almanya
Tris HCl	Sigma, Almanya
Xylene Cyanol	Sigma, Almanya
ΦX174 DNA/HaeIII	MBI Fermentas, Litvanya

2.1.4. Restriksiyon Enzimleri

RFLP (Restriksiyon parçacığı uzunluk polimorfizmi) reaksiyonlarında kullanılan enzimler, enzimin tanıma ve kesim bölgeleri, tavsiye edilen tampon çözeltileri, önerilen sıcaklıklar ve enzimleri sağlayan firmalar Çizelge 2.2’de verilmiştir.

Çizelge 2.2: Çalışmada kullanılan Restriksiyon enzimleri.

Restriksiyon enzimi	Kesim Bölgesi	Tampon Çözelti (1X)	Uygun sıcaklık (°C)	Üretici Firma
Bsm I	5'.GAATGCN↓.3' 3'.CTTAC↓GN.5'	NEBuffer 2 50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1mMdithiothreitol pH 7.9 25 °C	65	BioLabs Beverly, MA USA
BstU I	5' ...CG ↓CG...3' 3' ...GC ↓CG...5'	NEBuffer 2 50 mM NaCl 10 mM Tris-HCl 10 mM MgCl ₂ 1 mM DTT pH 7.9 25 °C	60	BioLabs Beverly, MA, USA
Msp I	5' ...C↓CGG....3' 3.....GGC↓C....3'	TAMPON Y ⁺ 5 33 mM Tris Asetat 10 mM magnezyum asetat 0,1 mg/ml BSA pH: 7,9 37 °C	37	MBI Fermentas, Litvanya

2.1.5. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Malzemeleri

PZR için, Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, Litvanya) seti kullanılmıştır. Set, 5u/μl *Thermus aquaticus* DNA polimeraz enzimi, 10X PZR tamponu (750 mM Tris-HCl (25°C'de pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, %0.1 (Tween 20), 25 mM MgCl₂) içermektedir. Ayrıca her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dGTP, dCTP (QBiogene, Almanya) içerir. PZR reaksiyonları

0.2 ml'lik tüpler (GreinerBioone, Avusturya) içinde "Eppendorf Mastercycler Personal" kullanılarak yapıldı.

2.1.6. Standart Çözeltiler ve Tamponlar

Agaroz jel yükleme tamponu (6X)

15 % ficol

0.05 % bromofenol mavi

0.05 % ksilen siyanol

Doymuş amonyum asetat çözeltisi

148 g Amonyum asetat

ddH₂O ile 200 ml'ye tamamlandı.

Nükleoliziz tamponu

10 mM Tris-HCl

400 mM NaCl

2 mM Na₂EDTA

Tris-Asetat -EDTA tamponu (TAE) (10 X) (1L)

24.2 g Tris Base

5,7 ml Glacial asetik asit

10 ml 0,5 M EDTA (pH 8,5)

ddH₂O ile 1000 ml'ye tamamlandı.

2.2. Yöntem

2.2.1. DNA izolasyonu

EDTA'lı tüpler içerisindeki 15 ml'lik kan örneği falkon tüplerine aktarıldıktan sonra +4°C sıcaklığındaki 35 ml distile su eklenerek 5 dakika hızlıca çalkalandı. Daha sonra 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan pelet üzerine +4°C sıcaklığındaki distile sudan 25 ml eklenerek kuvvetlice çalkalandı ve 2000 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldı ve geriye kalan pelet 3 ml nükleoliz tamponu, 200 µl SDS ve 150 µl proteinaz K içinde vorteks aracılığı ile çözüldü. Bir gece 37 °C'de bekletildi. Daha sonra bu çözeltinin üzerine 2 ml amonyum asetat eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra, 3000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildi. Süpernatant başka bir tüpe alınarak üzerine hacminin 2 katı kadar mutlak etanol eklendi. Kısa bir süre bekletildikten sonra, tüp yavaşça çevrilerek genomik DNA'nın toplanması sağlandı. Genomik DNA, daha önce içine 1 ml distile su konulmuş olan steril tüpe bir pipet ucu yardımıyla aktarıldı ve su içinde çözünmesi sağlandı. Elde edilen DNA'ların konsantrasyonu ve saflığı RNA/DNA metre (Pharmacia Biotech, GeneQuant, İngiltere) kullanılarak ölçüldü.

2.2.2. Polimeraz zincir reaksiyonu

Kandan elde edilen genomik DNA'nın çoğaltılması için PZR tekniği kullanıldı. PZR, hacmi 0,2 ml olan steril reaksiyon tüplerinde (Greiner Bioone, Avusturya) gerçekleştirildi. Her reaksiyon için hazırlanan PZR karışımının son hacmi, ddH₂O ile 50 µl'ye tamamlandı. Çoğaltılan hedef gen bölgesi için hazırlanan PZR karışımında, 100 ng genomik DNA, 1,25 ünite (U) Taq polimeraz enzimi, 5 µl 2 mM karışık dNTP, her biri 25 pmol/µl olmak üzere "forward ve reverse" primerler ve 1mM MgCl₂ kullanıldı. Her bir reaksiyon için kullanılan özgül primerler, çoğaltılan hedef bölgeler, her bir bölge için uygun PZR sıcaklıklarını (sırasıyla denatürasyon, primer bağlanma ve uzama sıcaklıkları) Çizelge 2.3'te verilmiştir.

Çizelge 2.3: PZR şartları

Hedef Bölge	Primerler	Reaksiyon şartları	Döngü sayısı
ACE 8	P 1 P 2	95 °C 5 dk 95 °C 30 sn 58 °C 30 sn 72 °C 30 sn 72 °C 10 dk	35
ACE ID	P 3 P 4	95 °C 5 dk 94 °C 60 sn 62 °C 45 sn 72 °C 60 sn 72 °C 10 dk	35
TNF 238	P 5 P 6	95 °C 5 dk 95 °C 60 sn 55 °C 60 sn 72 °C 60 sn 72 °C 7 dk	35
TGF β1	P 7 P 8 P 9	95 °C 3 dk 95 °C 30 sn 65 °C 30 sn 72 °C 30 sn 72 °C 5 dk	30
VDR 8	P 10 P 11	95 °C 5 dk 95 °C 40 sn 60 °C 35 sn 72 °C 40 sn 72 °C 7 dk	35

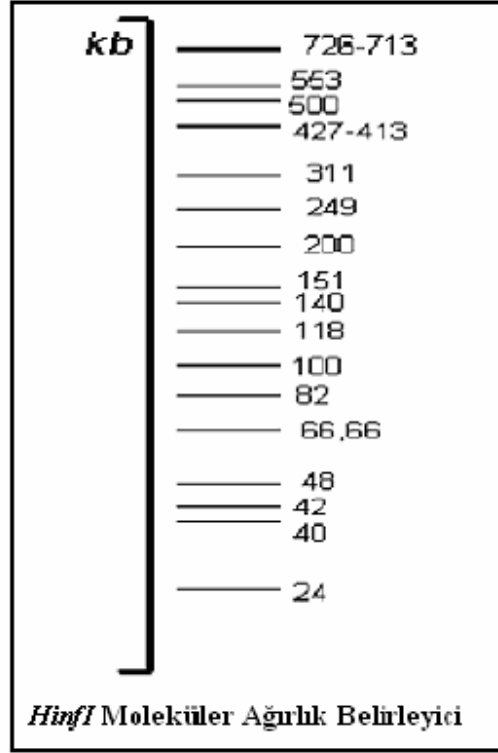
2.2.3. Restriksiyon enzim analizi

Restriksiyon enzim (RE) analizleri her reaksiyon için üretici firmanın önerilerine göre kullanıldı. Her bir reaksiyon 20 µl'lik hacimde gerçekleştirildi. Her bir restriksiyon enzim kesimi için çizelge 2.2'de verilen tamponlar (son konsantrasyon 1X) ve 5 U restriksiyon enzimleri kullanıldı. ACE 8 bölgesi için BstU1, TNFα 238 bölgesi için Msp1, VDR 8 bölgesi için ise Bsm1 restriksiyon enzimi kullanıldı. Enzim kesimi reaksiyonları ACE 8 bölgesi için

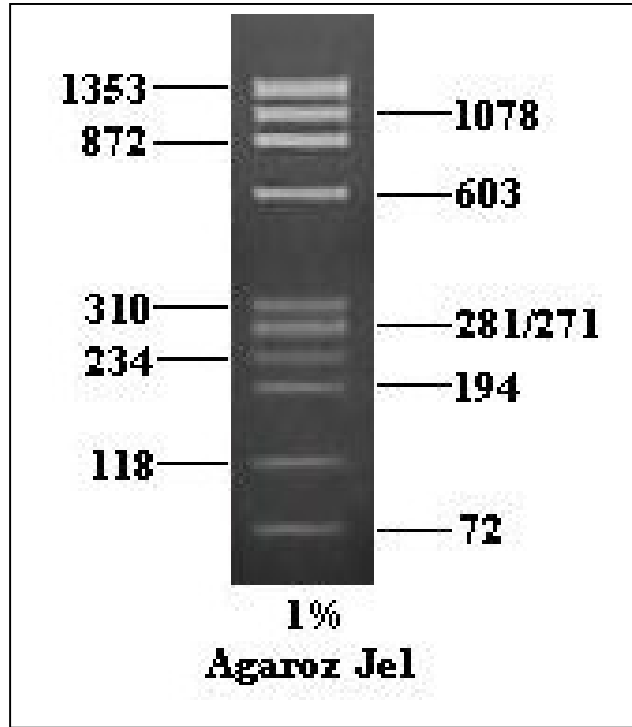
60 °C 3-4 saat, VDR 8 bölgesi için 65 °C 3-4 saat, TNF 238 bölgesi için 37°C tüm gece bekletilerek yapıldı.

2.2.4. Agaroz jel elektroforezi

PZR ve restriksiyon enzim analizi sonrasında reaksiyon ürünlerini incelemek için agaroz jel elektroforezi kullanıldı. Tüm PZR ürünleri için %1'lik jel kullanılırken, RE analizlerinde, %2-3 konsantrasyonunda jel kullanıldı. Jel tankı, taraklar konularak hazırlandı ve 25 ml TBE ve 0.25 g, 0.50 g, 0.75 g (sırasıyla %1, 2, ve 3'lük jel için) agaroz hassas tartıda ölçüldü. 1 µg/ml Etidyum Bromür eklenerek döküldü. PZR veya R E ürünleri yükleme tamponu ile karıştırılarak yüklendi ve 100 V, 15-30dakika yürütüldü. Jellerin görüntülenmesi için UVP Jel dokümantasyon sistemleri ve Olympos 40X kamerası kullanıldı.



Şekil 2.1. Φ X174 DNA/*Hinfi* Marker, 1.0 işaretleyicisinin bant açılımının gösterimi



Şekil 2.2. Φ X174 DNA/*HaeIII* 1.0 moleküler ağırlık belirleyicisinin bant açılım modeli.

2.2.5. İstatistiksel analizler

Kategorik değişkenlerin değerlendirilmesinde Ki-Kare ya da Fisher'in Kesin Ki-Kare testleri kullanılmıştır.

3. BULGULAR

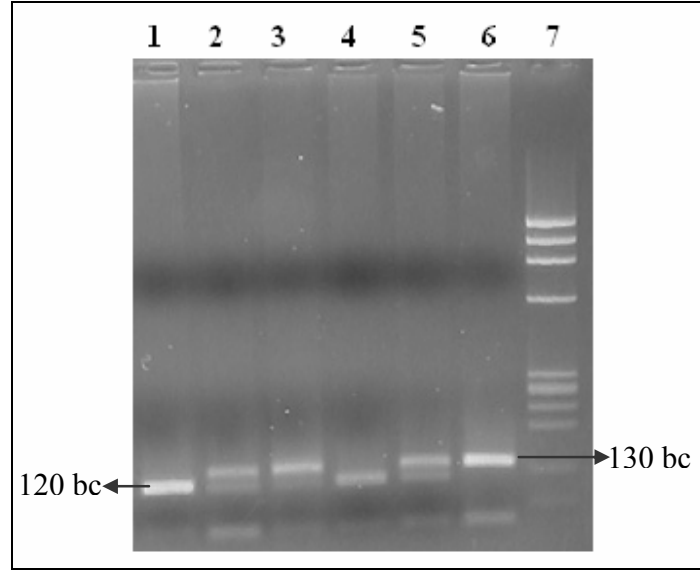
3.1. Hastalar

220 HBsAg pozitif hastanın 153'ü erkek, 67'si kadındı. Bu kişilerden 116'sı HBeAg negatif, 51'i HBeAg pozitif, 25'i HBeAg negatif inaktif taşıyıcı, 28'i karaciğer kanseri hastalarıydı. Kontrol grubu olarak; HBsAg negatif, anti-HBs pozitif 122 kişi (75'i erkek, 47'si kadın) alınmıştır.

Hasta grubunun yaş ortalaması $42,8 \pm 13,56$, kontrol grubunun yaş ortalaması $41,8 \pm 13,28$ 'di ve aralarında istatistiksel olarak anlamlı bir fark yoktu.

3.2. Angiotensin Dönüştüren Enzim

3.2.1. Angiotensin Dönüştüren Enzim Kodon 8



Şekil 3.1: ACE 8 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu 6: Kesime uğratılmamış PZR ürünü. Kuyu 2,3,5: GA (130b.ç. + 120 b.ç.), kuyu 1,4: GG(120 b.ç. + 10 b.ç.). % 1'lik agaroz jel kullanılmıştır. (Kuyu 7: Hae III Marker).

ACE 8 polimorfizmi için yapılan PZR sonucu 130 b.ç.'lik ürün elde edildi. Bst U1 enzimi ile yapılan kesim sonucu, 120 ve 10 b.ç.'lik ürünler elde edildi. 130 b.ç.'lik bantlar A, 120 ve 10 b.ç.'lik kesim ise G olarak adlandırıldı. (Şekil 3.1). Elde edilen sonuçlara göre her bir genotipteki kişi sayıları HBV ve kontrol gruplarına göre çizelge 3.1.'de verilmiştir.

Çizelge 3.1: ACE 8 genotip ve allellerinin dağılımı

ACE 8		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		AA	AG	GG	A	G
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
Hasta	133	58 (43.6)	51 (38.3)	24 (18)	62.7	37.2
Kontrol	96	40 (41.6)	35 (36.4)	21 (21.8)	59.8	40.2

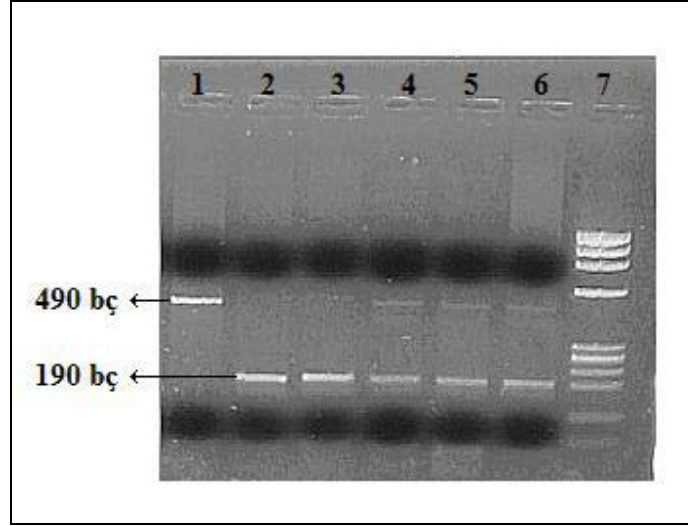
Hasta ve kontrol grubunun genotip ve allel dağılımı açısından karşılaştırılması sonucunda, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. (p: 0,772)

Çizelge 3.2: Hasta grupları için ACE 8 genotip ve allellerinin dağılımı

ACE 8		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		AA	AG	GG	A	G
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
eAg Negatif	67	31 (23.3)	31(23.3)	5(3.8)	34.96	15.4
eAg Pozitif	26	14 (11)	11 (8.3)	1 (0.8)	14.6	4.8
ASC	16	12 (9)	3(2.2)	1(0.8)	10.1	1.87
HCC	24	1 (0.8)	6 (4.5)	17 (12.7)	2.63	15.03

Hasta gruplarının kendi aralarında genotip ve allel dağılımı açısından karşılaştırılması sonucunda; AA genotipi açısından eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında, eAg negatif ve Asc grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. AG genotipi açısından ise eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında, eAg negatif ve Asc grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. (p<0.01)

3.2.2. Angiotensin Dönüştüren Enzim I/D



Şekil 3.2: ACE ID genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu 1: II, kuyu 2,3: DD, kuyu 4,5,6: ID % 1'lik agaroz jel kullanılmıştır. (Kuyu 7: Hae III marker)

ACE ID polimorfizmi için yapılan PZR sonucu elde edilen ürünlerden 490 bç'lik olanlar I, 190 bç'lik olanlar ise D genotipini belirledi. (Şekil 3.2). Elde edilen sonuçlara göre her bir genotipteki kişi sayıları HBV ve kontrol gruplarına göre çizelge 3.3.'de verilmiştir.

Çizelge 3.3: ACE ID genotiplerinin dağılımı

		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		DD	ID	II	D	I
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
Hasta	204	159 (77.9)	32 (15.6)	13 (6.3)	85.7	14.2
Kontrol	122	75 (61.4)	36 (29.5)	11 (9)	76.2	23.7

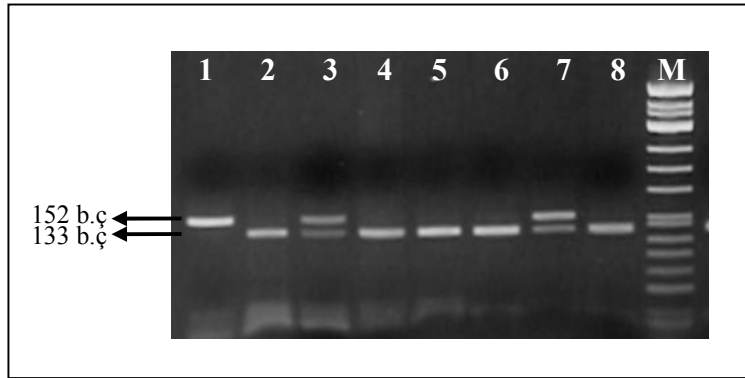
Hasta ve kontrol gruplarının DD genotipi bakımından karşılaştırılması sonucunda, bu genotip bakımından iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. (p: 0.006)

Çizelge 3.4: Hasta grupları için ACE ID genotip ve allellerinin dağılımı

ACE ID		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		DD	ID	II	D	I
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
eAg Negatif	108	78 (38.23)	22 (10.78)	8 (3.92)	43.62	9.31
eAg Pozitif	48	39 (19.11)	7 (3.43)	2 (0.9)	20.8	2.69
ASC	24	21 (10.29)	3 (1.47)	0	11.02	1.47
HCC	24	21 (10.29)	0	3 (1.47)	10.29	1.47

Hasta gruplarının kendi aralarında genotip ve allel dağılımı açısından karşılaştırılması sonucunda; DD genotipi bakımından eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında, eAg negatif ve Asc grubu arasında, eAg negatif ve Asc grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. ID genotipi bakımından eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. ($p<0.001$)

3.3. Tümör Nekroz Faktörü α 238



Şekil 3.3: TNF α -238 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu 1: kesime uğratılmamış PZR ürünü, kuyu 2, 4, 5, 6, 8: GG (133 b.ç.+ 19 b.ç.), kuyu 3, 7: GA (152 b.ç.+ 133 b.ç.+ 19 b.ç.), %2 lik agaroz jel kullanılmıştır (M: Hinfl marker).

TNF α 238 polimorfizmi için yapılan PZR sonucu 152 b.ç.'lik ürün elde edildi. Elde edilen ürünlerin Msp I enzimi le kesimi sonucu 152 b.ç.'lik bantlar A alleli, 133 ve 19 b.ç.'lik kesim ise G alleli, olarak adlandırıldı. (Şekil 3.3.) Elde edilen sonuçlara göre her bir genotipteki kişi sayıları HBV ve kontrol gruplarına göre çizelge 3.5'te verilmiştir.

Çizelge 3.5: TNF α - 238 genotip ve allellerinin dağılımı

TNF α - 238		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		AA	GA	GG	A	G
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
Hasta	171	8 (4.6)	9 (5.2)	154 (90.4)	7.3	92.6
Kontrol	109	3 (2.7)	3 (2.7)	103 (94.4)	4.1	95.8

Hasta ve kontrol grubunun genotip ve allel dağılımı açısından karşılaştırılması sonucu, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. (p: 0.398)

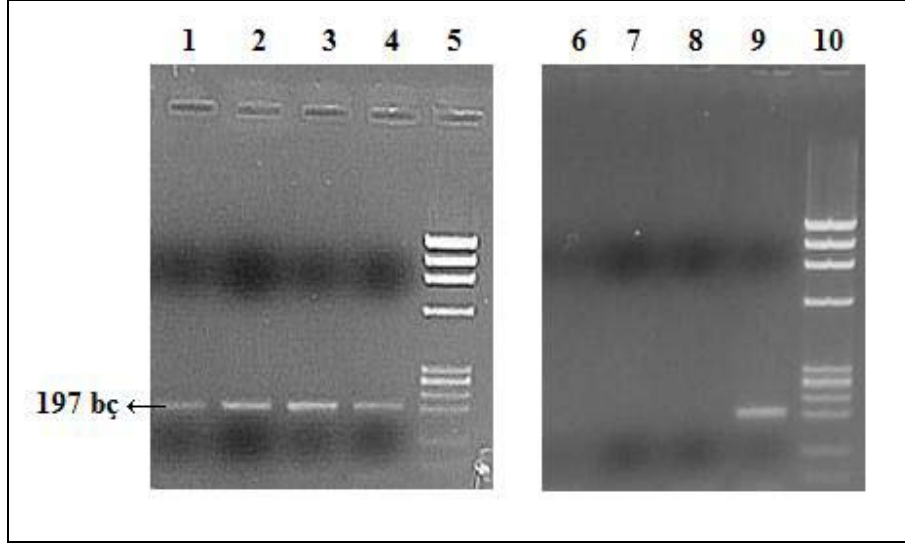
Çizelge 3.6: Hasta grupları için TNF α - 238 genotip ve allellerinin dağılımı

TNF α - 238		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		AA	GA	GG	A	G
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
eAg Negatif	83	5 (2.92)	6 (3.5)	72 (42.1)	4.67	43.85
eAg Pozitif	40	1(0.58)	3(1.75)	36 (21)	1.46	21.92
ASC	21	2 (1.16)	0	19 (11.1)	1.16	11.1
HCC	27	0	0	27 (15.78)	0	15.78

Hasta gruplarının genotip ve allel dağılımı açısından kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. (p>0.01)

3.4. Transforme edici büyüme faktörü $\beta 1 + 25$

TGF $\beta 1$ kodon 25 polimorfizmi için her kişiye 2 PZR yapıldı. PZR sonucu 197 b.ç.'lik ürün elde edildi. Bir reaksiyonda P 7 ve P 9 primerleri kullanıldı ve bu tüp G allelini belirledi. Diğer tüpte ise P 8 ve P 9 primerleri kullanıldı ve bu tüp C allelini belirledi. (Şekil3.4.) Elde edilen sonuçlara göre her bir genotipteki kişi sayıları HBV ve kontrol gruplarına göre çizelge 3.7.'de verilmiştir.



Şekil 3.4: TGF β 1 25 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu 1,6: hasta 1; kuyu 2,7: hasta 2, kuyu 3,8: hasta 3, kuyu 4,9: hasta 4. Kuyu 1,2,3,4: primerler P 7 ve P 9; kuyu 6,7,8,9: primerler P 7 ve P 8. Genotipler hasta 1: CC; hasta 4: GC (% 1'lik agaroz, kuyu 5 ve 10: Hae III Marker)

Çizelge 3.7: TGF β 1 25 genotip ve allellerinin dağılımı

		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		GG	GC	CC	G	C
		n (%)	n (%)	n (%)	%	%
Hasta	213	1 (0.4)	14 (0.65)	198 (92.9)	0.37	96
Kontrol	120	0	10 (8,3)	110 (91,6)	0.41	95.8

Hasta ve kontrol gruplarının genotip ve allel dağılımı açısından karşılaştırılması sonucu, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p>0,05$)

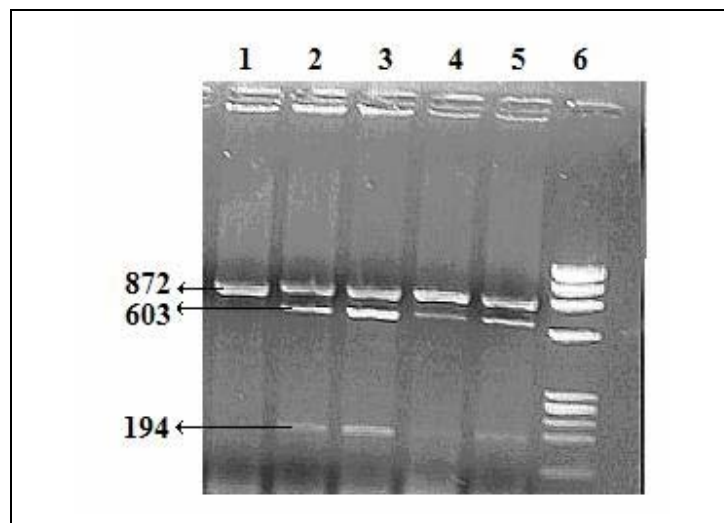
Çizelge 3.8: Hasta grupları için TGF β 1 25 genotip ve allellerinin dağılımı

		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		GG	GC	CC	G	C
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
eAg Negatif	114	0	0	107(50.23)	0	50.23
eAg Pozitif	46	0	1 (0.46)	45 (21.12)	0.23	21.36
ASC	25	0	2 (0.93)	23 (10.79)	0.46	11.26
HCC	28	1(0,46)	4(1.87)	23 (10.79)	0.93	9.38

Hasta gruplarının genotip ve allel dağılımı açısından kendi aralarında karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0.01$)

3.5. Vitamin D reseptörü intron 8

VDR intron 8 polimorfizmi için yapılan PZR sonucu 872 b.ç.'lik ürün elde edildi. Bsm I enzimi ile yapılan kesim sonucu, 872 b.ç.'lik bantlar B, 603 ve 194 b.ç.'lik kesim ise b olarak adlandırıldı. (Şekil 3.5.) Elde edilen sonuçlara göre her bir genotipteki kişi sayıları HBV ve kontrol gruplarına göre çizelge 3.9.'da verilmiştir.



Şekil 3.5: VDR intron 8 genotiplerinin agaroz jelde gösterilmesi. Kuyu 1: kesime uğratılmamış PZR ürünü.

Çizelge 3.9: VDR 8 genotip ve allellerinin dağılımı

VDR 8		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		BB	Bb	bb	B	b
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
Hasta	50	20 (40)	25 (50)	5 (10)	65	35
Kontrol	50	9 (18)	34 (68)	7 (14)	52	48

Hasta ve kontrol gruplarının genotip ve allel dağılımı açısından karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmadı. ($p:0,094$)

Çizelge 3.10: Hasta grupları için VDR 8 genotip ve allellerinin dağılımı

VDR 8		Genotip frekansı			Allel frekansı	
		BB	Bb	bb	B	b
	Toplam	n (%)	n (%)	n (%)	%	%
eAg Negatif	33	14 (28)	14 (28)	5 (10)	42	24
eAg Pozitif	10	5 (10)	5 (10)	0	15	5
ASC	7	1 (2)	6 (12)	0	10	6
HCC	0	0	0	0	0	0

Hasta gruplarının genotip ve allel dağılımı açısından kendi aralarında karşılaştırılması sonucu istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamamıştır. ($p>0.01$)

4. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu çalışmada HBsAg pozitif 220 hepatit B hastası ve 122 HBsAg negatif, anti-HBs pozitif kontrol grubu üzerinde deneyler yapılmıştır. Toplam 4 faktörde 5 polimorfik bölge (ACE 4, ACE 8, TNF α - 238, TGF β 1 kodon 25, VDR intron 8) çalışılmıştır.

ACE 8; intron 17'deki polimorfizm, ACE'deki toplam çeşitliliğin %19'una etkilidir (Zhu ve ark. 2001). Bu bölgedeki polimorfizm AA, AG, GG genotipleriyle temsil edilmektedir. Daha önce 332 aileden 1343 kişinin katıldığı bir çalışmada ACE 4 ve ACE 8 bölgeleri arasında güçlü bir bağlantı eşitsizliği görülmüştür ve bu allelik etkileşimlerin kan basıncı düzeyiyle ilişkili olduğu bulunmuştur (Zhu ve ark., 2001).

ACE bölgelerindeki polimorfizmler pek çok renal ve kardiyovaskular hastalıkta, bireyler arası çeşitliliğe katkıda bulunur. Fakat diğer organlara olan katkısı çalışılmamıştır. Bu anlamda çalışmamız bir ilktir.

Bizim çalışmamızda ACE 8 bölgesinin analizi yapıldığında, hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır.

Hasta gruplarının kendi içinde analizi yapıldığında, AA genotipi açısından eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında, eAg negatif ve Asc grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. AG genotipi açısından ise eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında eAg negatif grup lehine, eAg negatif ve Asc grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur ($p<0.01$).

ACE ID intron 16 da 287 bç'lik bir Alu ekleme çıkarma bölgesidir. Bu bölgede DD genotipi yüksek; DI genotipi, orta; II genotipinin düşük ACE konsantrasyonu ile ilgili olduğu bulunmuştur (Rigat ve ark., 1990).

Angiotensin geninde metioninin treonine yer değiştirmesini sağlayan 235. kodonda (M235T) bir nokta mutasyonu tanımlanmıştır. Angiotensin plazma konsantrasyonlarında farklılıklar, hipertansiyon ve koroner kalp hastalıkları ile ilişkili olduğu ve ACE insersiyon/ delesyon (I/D) polimorfizmi ile birlikteliklerinin anlamlı olduğu bildirilmiştir. angiotensin II tip 1 reseptör geninde (ATR1) 1166. pozisyonda (A1166C) polimorfizmi adeninin sitozine değişimi tanımlanmıştır. ACE I/D polimorfizmi ile birlikteliği koroner kalp hastalıklarında risk faktörü oluşturmaktadır. Üçünün birlikte etkisi renal hastalıklarında fonksiyon kayıplarına yol açmaktadır.

Bizim çalışmamızda bu bölgenin analizi sonucu yüksek ACE sekresyonuna neden olan DD genotipi bakımından hasta ve kontrol grubu arasında anlamlı bir fark bulunmuştur (p:0,006). Yüksek sekresyona neden olan genotip hasta grubunda daha fazla bulunmuştur. Bu da bu genotipin HBV enfeksiyonu ile ilişkili olabileceğini düşündürmektedir.

Çalışmamızda HBV hasta grupları arasında da bir değerlendirme yapılmıştır. Yüksek ACE sekresyonuna neden olan genotip bakımından eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında, eAg negatif ve Asc grubu arasında, eAg negatif ve Asc grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur. Orta düzeyde ACE sekresyonuna neden olan genotip bakımından eAg negatif ve eAg pozitif grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmuştur (p<0.001).

Çalışmamızın kapsamında yer alan bir diğer faktör TNF α 'dır. TNF α inflamatuvar öncüsü ve antiviral etkisi olan bir sitokindir. Virüslere karşı verilen immün yanıtta en etkili sitokindir.

TNF α geni promotörü – 238. pozisyondaki G/A değişimi bu gende en fazla çalışılan bölgelerdendir. GG genotipi düşük, GA orta, AA yüksek TNF sekresyonuna neden olmaktadır (Wilson ve ark., 1993).

Avrupa popülasyonunda yapılan bir çalışmada TNF α – 238 yüksek TNF sekresyonu ile ilişkili allel HBV'nin eliminasyonu ile ilişkili bulunmuştur (Hohler, 1998).

Yapılan başka bir çalışmada TNF gen polimorfizmlerinin akut ve fulminant hepatit hastaları üzerindeki etkisi araştırılmıştır. TNF α -238 bölgesi için gruplar arasında anlamlı bir fark bulunmamıştır (Noriko Tsuchiya ve ark., 2004).

Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grubu arasında istatistiksel olarak anlamlı bir sonuç bulunmamıştır (p: 0,398). Düşük TNF sekresyonuna neden olan genotip hasta ve kontrol grubunda daha yüksek oranda görülmektedir.

Hasta gruplarının kendi içinde genotipik ve allelik olarak karşılaştırılması sonucunda da anlamlı bir farklılık görülmemiştir (p > 0,01).

Çalışmamızda ele alınan bir diğer faktör TGF β 1'dir. Karaciğerde bulunan makrofajlar, Kupfer hücreleri, TNF- α gibi sitokinlerin etkisiyle aktif hale gelirler ve TGF- β 1 üretirler. TGF- β 1, Hücre büyümesi, farklılaşması ve matriks üretimini düzenleyen multifonksiyonel bir sitokindir. TGF- β 1 geni 19.kromozomda lokalizedir.(Napoli ve ark., 1994; Paradis ve ark., 1996). Hepatik fibrozda dominant fibrojenik sitokin TGF- β 1'dir.

İn vitro ortamda periferik mononükleer kan hücrelerinin uyarılması sonucu arjinin/arjinin homozigot genotipin arjinin/prolin genotipteki hastalara göre daha fazla TGF- β 1 proteini ürettikleri görülmüştür. Ayrıca daha fazla TGF- β 1 üreten genotipte (arg/arg) hastaların daha az TGF- β 1 üreten genotipte (arg/pro veya pro/pro) olan hastalara göre hepatik fibrozun fazla olduğu görülmüştür (Awad ve ark., 1998)

Bizim çalışmamızda genotipik ve allelik olarak hasta ve kontrol grupları arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunmamıştır (p>0,05). Düşük TGF sekresyonuna neden olan genotip hasta ve kontrol grubunda daha yüksek oranda görülmektedir.

Hasta gruplarının kendi aralarında karşılaştırılması sonucunda da gruplar arasında bir farklılık bulunmamıştır (p>0,01).

Vitamin D kalsiyum metabolizmasını düzenler. İmmun düzenleme, hücre büyümesi ve farklılaşmasının lokal kontrolü, immunregülatör hormon gibi davranarak monositlerin aktivasyonu, hücre aracılı immunitenin uyarılması, lenfosit proliferasyonunun baskılanması, antikor ve sitokin üretiminden sorumludur. (Suneetha PV. ve ark., 2006)

Teorik olarak, vitamin D reseptörü geni üzerinde bulunan polimorfizmler, viral replikasyonun kontrolü ile ilişkili olabilirler. VDR intron 8 polimorfizmi bağlantı dengesizliğine neden olmaktadır. (Suneetha PV. ve ark., 2006) Vitamin D ile kronik HBV enfeksiyonunun engellenebileceği düşünülüyor. (Bellamy ve ark., 1999).

Bizim çalışmamızda hasta ve kontrol grupları arasında anlamlı bir fark bulunamamıştır. Hasta gruplarının analizi sonucunda da bir fark olmadığı görülmüştür.

Populasyonu temel alan olgu-kontrol çalışmaları, belli bir hastalık fenotipi ile alleller arasındaki ilgiyi saptamada oldukça yararlı olmalarına rağmen sitokin genleri üzerinde yapılan farklı çalışmalar arasında olduğu gibi birbiriyle uymayan sonuçlar ortaya çıkabilmektedir. Bunun pek çok açıklaması olabilir; öncelikle çalışmaların yapıldığı etnik grupların farklılığı bu çelişen sonuçlardan sorumlu olabilir. Çalışmalarda örnek sayısındaki farklılıklarda önemli olabilir. Küçük örnek sayılarıyla yapılan çalışmalarda, pozitif bir ilginin olduğu gözlenirken daha büyük örnek konsantrasyonunda bu ilgi gözlenmeyebilir. Yukarıdaki çalışmalarda da çalışmalardaki örnek sayıları değişkenlik göstermektedir.

Konağa ait çeşitli faktörler viral enfeksiyonun seyrini belirleyebilir. Ancak tek başına etkili değildir. Viral enfeksiyonun seyrini etkileyen immün sistemin tüm mekanizmalarını incelemek gerekmektedir.

KAYNAKLAR

- A.BUDKOWSKA, P. BEDOSSA, F. GROH, A. LOUSIE, J. PILLOT (1995). Fibronectin of human liver sinusoids binds hepatitis B virus: identification by an anti- idiotypic bearing the internal image of the Pre- S2 domain. *J Virol*, 69: 840-848
- A.FRANCO, M. PAROLI, U. TBENVENUTO, C. PESCHLE, V. BALSANO, V. BARNOBA (1992). Transferin receptor mediates uptake and presentation of hepatitis B envelope antigen by T lymphocytes. *J.Exp. Med.*, 177: 116-121
- ALTER, M.J., BELL, B.P., (2001). Epidemiology, natural history and prevention of viral hepatitis. In: *The Liver Biology And Pathobiology*, 4th Ed. Ed: I.M. Arias, J.L., Boyer, F.V., Chisari, N., Fausto, D., Schachter, D.A., Shafritz. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. Pp: 783-801
- AR. NEURATH, N. STRICK (1994). The putative cell receptor for hepatitis B virus, annexin V and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV. *Virology* 204: 475-477
- ARIELA BENIGNI, CARLA ZOJA, DANIELA CORNA, CRISTINA ZATELLI, SARA CONTI, MARCO CAMPANA, ELENA GAGLIARDINI, DANIELA ROTTOLI, CRISTINA ZANCHI, MAURO ABBATE, STEVE LEDBETTER GIUSEPPE REMUZZI. Add-on anti TGF antibody to ACE inhibitor arrests progressive diabetic nephropathy in the rat. *J Am Soc Nephrol* 14: 1816–1824, 2003
- AWAD MR, EL-GAMEL A, HASLETON P, TURNER DM, SINNOTT PJ, HUTCHINSON IV. Genotypic variation in the transforming growth factor-beta1 gene: association with transforming growth factor-beta1 production, fibrotic lung disease, and graft fibrosis after lung transplantation. *Transplantation*. 1998 Oct 27;66(8):1014-20
- BADUR S., KILIÇTURGAY K. (1994): Hepatits B virüsü: Moleküler biyoloji ve serolojik tanı. *Viral Hepatit* 94. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri. 65-90

- BALSANO, C., BILLET, O., BENNOUN, M., CAVARD, C., ZIDER, A., GRIMBER, G, NATOLI, G., BRIAND, P., LEVRERO, M. (1994). Hepatitis B virus X gene product acts as a transactivator *in vivo* J. Hepatol. 21:103-109
- BEN-ARI, Z., MOR, E., PAPO, O., KFIR, B., SULKES, J., TAMBUR, A.R., TURKASPA, R., KLEIN, T. (2003). Cytokine gene polymorphisms in patients infected with hepatitis B virus. Am. J. Gastroenterol. 98:144-150
- BERTOLETTI, A., D'ELIOS, M.M., BONI, C., DE CARLI, M., ZIGNENO, AL., DURAZZO, M., MISSALE, G., PENNA, A., FIACCADORI, F., DEL PRETE, G., FERRARI, C. (1997). Different cytokine profiles of intrahepatic T cells in chronic B and C virus infections. Gastroenterology. 113: 1050-1051
- BIRON, C.A., (1994) Cytokine in the generation of immune responses to, and resolution of, virus infection. Curr Opin Immunol. 6: 530-8
- BOUSEMA JT, BUSSEMAKERS MJ, VAN HOUWELINGEN KP, DEBRUYNE FM, VERBEEK AL, DE LA ROSETTE JJ, KIEMENEY LA. Polymorphisms in the vitamin D receptor gene and the androgen receptor gene and the risk of benign prostatic hyperplasia. Eur Urol. 2000 Feb;37(2):234-8
- CHISARI, F.V., FERRARI, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathogenesis. Annu Rev. Immunol. 13:29- 60
- CHISARI, F.V. (2000). Viruses, immunity and cancer: lessons from Hepatitis B. Am J Pathology. 156: 1118-1132
- CHUNG-IL JOUNG, YONG-WOOK PARK, SOOK-KYOUNG KIM. , WAN-SIK UHM, TAE-HWAN KIM, DAE-HYUN YOO. (2006) Angiotensin-Converting Enzyme Gene Insertion/Deletion Polymorphism in Korean Patients with Systemic Sclerosis J Korean Med Sci. 21: 329-32

- CLANCY, RM., BACKER, CB., YIN, X., KAPUR, RP., MOLAD, Y., BUYON, JP.(2003) Cytokine polymorphisms and histologic expression in autopsy studies: contribution of TNF-alpha and TGF-beta 1 to the pathogenesis of autoimmune-associated congenital heart block. *J Immunol.* 15;171(6):3253-61.
- CLEMENS, MJ., ELIA, A. The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res.* 1997 Sep;17(9):503-24.
- GANEM, D., VARMUS, H.E. (1987) The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem.* 56-651-693
- GANEM, D., FIELDS, BN., KRIPE, DM, HOWLEY, PM,.(1996) Hepadnaviridae and their replication . *Field Virology*, 3rd ed. Lippincott, Raven Pres. 2703-37
- GANEM, D. PRINCE, AM. (2004) Hepatitis B virus infection. Natural History and Clinical consequences. *N Engl J Med.* 350: 1118-1129
- GERLICH, W.H., LU,X., HEERMAN, K.H. (1993). Studies on the attachment and penetration of hepatitis B virus. *J Hepato.* 17 Suppl 3: S10-4
- HYAMS, KC., Risks of chronicity following acute hepatitis B virus infection : a review. *Clin. Infect. Dis.* 1995; 20(4): 992-1000
- KAAN, M. LU, X., GERLICH, WH. (1995) Recent studies on replication of hepatitis B virus. *J Hepatol.* 22 (Suppl 1): 9
- KAUFMAN KM, KELLY J, GRAY-MCGUIRE C, ASUNDI N, YU H, REID J, BAIRD T, HUTCHINGS D, BRUNER G, SCOFIELD RH, MOSER K, HARLEY JB. (2001) Linkage analysis of angiotensin-converting enzyme (ACE) insertion/deletion polymorphism and systemic lupus erythematosus. *Mol Cell Endocrinol* 77: 81-5.

- KOFF, RS: Viral Hepatitis, Diseases of the Liver 7th Edition (Eds: Schiff, L. and Schiff, ER.) Philadelphia, J.B. Lippincott Company, 1993: 492-577
- KWON, O.S., SONG, S.H., JU, K.T., CHUNG, M.G., PARK, D.K., KIM, S.S., KIM, Y.S., CHOI, D.J., KIM, J.H., HWANG, Y.J., BYUN, K.S., LEE, C.H. (2003) Polymorphism in codons 10 and 25 of the transforming growth factor beta 1 gene in Korean population and in patients with liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. Korean J Gastroenterol. Sep; 42(3): 212-9
- LAI, M.M.J., MASON, W.S. (2001). Molecular biology of hepatitis viruses, 4th Ed : ARIAS, I.M., BOYER, J.L., CHISARI, F.V., FAUSTO, N., SCHACHTER, D., SHAFTRITZ, D.A. Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins pp: 831-856
- LANIER, L.L., (1998). NK cell receptors. Annu Rev Immunol. 16: 359-393
- LANZAVECCHIA, A. (1997). Understanding the mechanisms of sustained signaling and T cell activation. J Exp. Med. 185: 1717-9
- LAU, JYN, WRIGHT TL.(1993) Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. Lancet 342: 1335-40
- LEE, WM. (1997) Hepatitis B virus infection. N.Engl. J. Med. 337:1733-45
- LIEYING FAN, XIAOQING TU, YE ZHU, LIN ZHOU, THOMAS PFEIFFER, RALPH FELTENS, WINFRIED STOECKER, AND RENQIAN ZHONG. (2005). Genetic association of vitamin D receptor polymorphisms with autoimmune hepatitis and primary biliary cirrhosis in the Chinese. Journal of Gastroenterology and Hepatology 20, 249–255

- LÍ Z, HABUCHI T, TSUCHIYA N, MITSUMORI K, WANG L, OHYAMA C, SATO K, KAMOTO T, OGAWA O, KATO T. Increased risk of prostate cancer and benign prostatic hyperplasia associated with transforming growth factor-beta 1 gene polymorphism at codon10. *Carcinogenesis*. 2004 Feb;25(2):237-40.
- MAHONEY, FJ. Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin. Microbiol. Rev.* (1999) 12: 351-66
- MANOLAGAS, SC., YU, XP., GIRASOLE, G., BELLIDO, T. Vitamin D and the hematolymphopoietic tissue: a 1994 update. *Semin Nephrol.* 1994 Mar;14(2):129-43.
- MARÍA E. PUEYO, MIREILLE CHALLAH, DOMINIQUE GAUGUIER, LILIANE LOUEDEC, MONIQUE PHILIPPE, ROGER GAERTNER, MICHEL MARRE, JEAN-BAPTISTE MICHEL, AND MARIE-PAULE JACOB.(2004) Transforming Growth Factor- β 1 Production Is Correlated With Genetically Determined ACE Expression in Congenic Rats. *Diabetes Vol 53*
- MARIÓ STEFANIA, IVAN KARNER, LJUBICA GLAVAS-OBROVAC, STANA PAPIA,DUBRAVKA VRDOLJAK, GORDANA LEVAK, BRANISLAV KRSTONOSIA.(2005) Association of Vitamin D Receptor Gene Polymorphism with Susceptibility to Graves'Disease in Eastern Croatian Population: Case-control Study *Croat Med J* 46(4):639-646
- MILICH, D.R., PETERSON, D.L., SCHODEL, F., JONES, J.E., HUGHES, J.L. (1995). Preferential recognition of hepatitis B virus nucleokapsid antigens by Th1 or Th2 cells is epitope and major histocompatibility complex dependent. *J. Virol.* 69: 2776-2785
- MILICH, D.R., SCHODEL, F., PETERSON, D.L., JONES, J.E., PETERSON, D.L. (1997). The Hepatitis B virus core and e antigens elicit different Th cell subsets: antigen structure can affect Th cell phenotype. *J. Virol.* 71: 2192-2201

- NEURATH, AR., KENT, SB., PARKER, K. PRINCE, AM. STRICK, N. BROTMAN, B., SPROUL, P. (1986). Antibodies to a synthetic peptidew from the Pre S(2) 120-145 region of the jepatitis Bvirus envelope are virus neutralizing. *Vaccine*, 4:35-7
- NIRO GA, FONTANA R, GIOFFREDA D, VALVANO R, IACOBELLIS A, FACCIORUSSO D, ANDRIULLI A. Tumor necrosis factor gene polymorphisms and clearance or progression of hepatitis B virus infection. (2005) *Liver International* 25-1175
- Noriko Tsuchiya, Katsutoshi Tokushige, Naoko Yamaguchi, Kiyoshi Hasegawa, Etsuko Hashimoto, Katsumi Yamauchi, and Keiko Shiratori Influence of TNF gene Polymorphism in patients with acute and fulminant hepatitis. (2004) *J Gastroenterol* 39:859–866
- NOVAK, MA., BONHOEFFER, S. (1996) HILL, AM., Viral dynamics in hepatitis B virus infection. *Proc Natl Acad Sci USA* . 93: 4398-402
- OLIVER, J., AGUNDEZ, JA., MORALES, S., FERNANDEZ-ARQUERO, M., FERNANDEZ,GUTIERREZ, B., DE LA CONCHA, EG., DIAZ-RUBIO, M., MARTIN, J., LADERO, JM. (2005) Polymorphisms in the transforming growth factor beta gene (TGF- beta) and the risk of advanced alcoholic liver disease. *Liver Int.* 25 (5) : 935-9
- OSTERREICHER, CH., DATZ, C., STICKEL, F., HELLERBRAND, C., PENZ, M.,HOFER, H., WRBA, F., PENNR, E., SCHUPPAN, D., FERENCI, P. TGF, beta 1 Codon 25 polymorphisms is associated with cirrhosis in patients with hereditary Hemochromatozis. (2005) 31(2):142-8.
- PENNA A, CHISARI FV, BERTOLETTI A, MISSALE G, FOWLER P, GIUBERTI T, FIACCADORI F, FERRARI C. Cytotoxic T lymphocytes recognize an HLA-A2-restricted epitope within the hepatitis B virus nucleocapsid antigen. *J Exp Med.* (1991) 1;174(6):1565-70.

- Pothakamuri Venkata Suneetha¹, Shiv Kumar Sarin¹, Ankur Goyal¹, Gollapudi Tharun Kumar, Deepak Kumar Shukla, Syed Hisar. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-a and TNF-b gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *Journal of Hepatology* 44 (2006) 856-863
- ROBINSON, WS. MANDELL, GL., DOUGLAS, RG., BENNETT, JE. Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. *Principles and Practice of Infectious Disease*. 3rd ed. New York, Churchill Livingstone, 1990: 1204-31
- ROBINSON, WS. Hepadnaviridae and their replication (1991) *Fundamental Virology* 2nd edition. New York, Raven Pres, 989,1021.
- ROBINSON, WS: Hepatitis B viruses and Hepatitis D virus, *Principles and Practice of Infectious Diseases*. 4th Edition (Eds: Mandell, GL., Bennet, JE., Dolin, R.) USA, Churcill- Livingstone; 1995 ;1406-1439
- SARIBAN, E., IMAMURA, K., LUEBBERS, R., KUFE, D. (1998). Transcriptional and post transcriptional regulation of tumor necrosis factor gene expression in human monocytes. *J. Clin. Invest.* 81: 1506-10
- SEEGER, C. MASON, WS. (2000) Hepatitis B virus biology *Microbial Mol Biol Rev* 70:4210-9
- SERTER, D. (1997). Hepatit B virüsleri ve viral hepatitler. *Virüs, Riketsiya ve Klamidya hastalıkları*, İstanbul, Nobel Kitabevleri, 175-206
- SHERLOCK, S., DOOLEY, J.: *Virus Hepatitis, Diseases of the Liver and Biliary System*, 10th Edition, London, The Blackwellscience, 1997:265-302
- SJOGREN, MH: Serologic Diagnosis of Viral H epatitis, *Medical Clinics of North America*, Management of Chronic Liver Disease (Guest Ed:Paul Martin and Lawrence S. Friedman) W.B. Saunders Company, Septemver 1996. 80(5): 929-1000

- SUMMERS, J., MASON, W.S. (1982) Replication of the genome of a hepatitis B like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell*. 29:403-415
- Suneetha PV, Sarin SK, Goyal A, Kumar GT, Shukla DK, Hissar S. Association between vitamin D receptor, CCR5, TNF-alpha and TNF-beta gene polymorphisms and HBV infection and severity of liver disease. *J Hepatol*. 2006 May;44(5):856-63
- THIOLLAIS, P., POURCEL, C., DEDEJAN, A. (1985). The hepatitis B virus. *Nature*. 317: 175-206
- TESTUT, P., RENARD, CA., TERRADILLOS, O. et al. (1996) A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *J. Virol*. 70: 4210-9
- TERRAULT, NA., WRIGHT, TL: *Viral Hepatitis A Through g, Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease, Pathophysiology/Diagnosis/Management, 6th Edition* (Eds: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH) W.B. Saunders Company, 1998: 1123-1170
- Trinchieri, G. Cytokines acting on or secreted by macrophages during intracellular infection (IL-10, IL-12, IFN-gamma). *Curr Opin Immunol*. 1997 Feb;9(1):17-23.
- YENEN, OŞ., TOPÇU, AW., SÖYLETİR G., DOĞANAY, M. (1996) *Viral Hepatitler. İnfeksiyon Hastalıkları. İstanbul, Nobel Kitabevleri*. 641-700
- VILLARD E, TİRET L, VISVIKIS S, RAKOTOVAO R, CAMBIEN F, SOUBRIER F Identification of new polymorphisms of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene, and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation linkage analysis. (1996) *Am J Hum Genet* 58:1268–1278

- VIJAY VISWANATHAN, YANQING ZHU, KARTHIK BALA, STEPHEN DUNN, CHAMUKUTTAN SNEHALATHA, AMBADY RAMACHANDRAN, MUTHU JAYARAMAN, KUMAR SHARMA. (2001). Association between ACE gene polymorphism and diabetic nephropathy in South Indian patients. *JOP. J. Pancreas*.2(2):83-87
- WEBSTER, G.J., REIGNAT, S., MAINI, M.K., WHALLEY, S.A., OGG, G.S., KING, A., BROWN, D., AMLOT, P.L., WILLIAMS, R., VERGSNI, D., DUSHEIKO, G.M., BERTOLETTI, A. (2000). Incubation phase of acute hepatitis B in man: dynamic of cellular immune mechanisms. *Hepatology* 32: 1117-1124
- WEI-ZHEN YE, ANDRE F REIS, DANIEJLE DUBOIS-LAFORGUE, CHRISTINE BELLANNE, CHANTELOT, JOSE TIMSIT, GILBERTO VELHO. Vitamin D receptor gene polymorphisms are associated with obesity in type 2 diabetic subjects with early age of onset. *European Journal of Endocrinology* (2001) 145 181±186.
- WILSON, A.G., DE VRIES,N., POCIOT, F.S., VAN DER PUTTE, L.B., DUFF, G.W. (1993) An allelic polymorphism within the human tumor necrosis factor alfa promoter region is strongly associated with HLA A1, B8 and DR3 alleles. *J Exp Med*. 177:557-60
- WYNNE, S.A., CROWTHER, R.A., LESLIE, A.G., (1999) The cyrstal structure of the human hepatitis B virus capsid. *Mol Cell*. 3:771-80
- XIAOFENG ZHU, NOURDINE BOUZEKRI, LORRAINE SOUTHAM, RICHARD S. COOPER, ADEBOWALE ADEYEMO, COLIN A. MCKENZIE, AMY LUKE, GUANGJIE CHEN, ROBERT C. ELSTON, AND RYK WARD. Linkage and Association Analysis of Angiotensin I-Converting Enzyme (ACE)-Gene Polymorphisms with ACE Concentration and Blood Pressure. (2001). *Am. J. Hum. Genet*. 68:1139-1148

YOFFE, B., BURNS, D.K. BHATT, H.S., COMBES, B. (1990). Extrahepatic hepatitis B virus DNA sequences in patients with acute hepatitis B infection. *Hepatology*. 12: 87-92

ZHU X, MCKENZIE CA, FORRESTER T, NICKERSON DA, BROECKEL U, SCHUNKERT H, DOERING A, JACOB HJ, COOPER RS, RIEDER MJ. (2000). Localization of a small genomic region associated with elevated ACE. *Am J Hum Genet* 67:1144–1153

ZOULIM, F., SAPUTELLI, J., SEEGER, C. (1994). Woodchuck hepatitis virus X protein is required for viral infection *in vivo*. *J Virol*. 68:2026-2030

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı Soyadı: Ela Kesen
Doğum Yeri Tarihi: Karabük – 21.09.1980
Uyruğu: T.C.
Ünvanı: Biyolog

EĞİTİM:

- 2003-2006 **Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü, Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Hepatoloji Enstitüsü / ANKARA**
Yüksek Lisans programı 3.48/ 4.00
- 10.2003- 01.2005 **Ankara Üniversitesi Eğitim Bilimleri Enstitüsü**
Yüksek lisans Programı
- 09.1999- 07.2003, **Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi** Biyoloji Bölümü/ Moleküler Biyoloji Ana Bilim Dalı /ANKARA.
Lisans Ortalaması: 87.73/ 100
- 09.1994-06.1998, **50. Yıl Süper Lisesi / ANKARA.**
Ortalama: 4.52/5.

Yabancı Dil: İngilizce

Bilgisayar Bilgileri MS DOS, Word, Excel, Power Point, Windows 98- ME, XP

DENEYİM:

- **09.2003- Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü, Moleküler Biyoloji Araştırma Laboratuvarı.**

Ünvanı: Biyolog

-Kullandığı Laboratuvar Teknikleri:

- DNA İzolasyonu
 - HBV DNA İzolasyonu
 - HCV RNA İzolasyonu
 - HDV RNA İzolasyonu
 - PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonları)
 - Restriksiyon Fragmenti Uzunluk Polimorfizmi (PZR-RFLP)
 - Jel elektroforezi
 - DNA Dizi Analizi
- **10.2003- 01.2005 İncesu Anadolu Lisesi**
Görevi: Stajyer Biyoloji Öğretmeni
- **04.2002- 06.2002 Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Biyokimya Laboratuvarında staj**

-Seminerler:

- ‘Çölyak hastalığında HLA DQB1 Polimorfizmi’
- ‘ Çölyak Hastalığı’
- ‘siRNA’da son gelişmeler’
- ‘HBV hastalarında sitokin gen polimorfizimleri’

-Katıldığı Sempozyumlar:

- HEPATOLOJİ 2003, 20.06.2003, Bilkent Oteli/ Ankara
- KORDON KANI BANKASI 21.09.2003
- HEPATOLOJİ 2004, 25.06.2004, Bilkent Oteli / Ankara
- Antiviral Direnç Sempozyumu, 21.04.2005 Etap Altınel Oteli/ Ankara
- Hepatoloji Kongresi, 5-7 Haziran 2005 Swiss Otel/İstanbul

-Katıldığı Kurslar:

- 06.2000- 11.2000 British School Bilgisayar İşletmenliği Kursu (Word, Excel, Power Point)
- 11.2000- 05.2003 British School Bilgisayar Programcılığı Kursu
- 15.06.2005 Laboratuvar Güvenliği Kursu ANKÜSEM/ Ankara Üniversitesi