

154706

**HEPATİT B VİRÜSÜNE AİT GENOTİP D SEROTİPİNİN S GEN  
BÖLGESİ ÜZERİNDE MEYDANA GELEN MUTASYONLAR VE  
BUNLARIN TRANSKRİPTLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ  
HASTA GRUPLARI İÇERİSİNDE ARAŞTIRILMASI**

**FEN BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**BİYOLOJİ BÖLÜMÜ**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**ARZU BARSGAN**

**EYLÜL 2004**

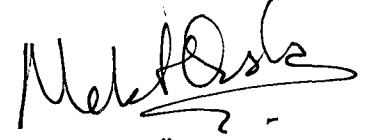
Fen Bilimleri Enstitüsü Onayı



Prof.Dr. Osman ERKMEN

(Ünvan ve İsim)  
FBE Müdür V.

Bu tezin Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak gerekli şartları sağladığımı onaylarım.



Doç.Dr. Mehmet ÖZASLAN

(Ünvan ve İsim)  
Bölüm Başkanı

Bu tez tarafımızca okunmuş, kapsamı ve niteliği açısından bir Yüksek Lisans/Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.



Doç.Dr. Mehmet ÖZASLAN

(Ünvan ve İsim)  
Danışman

Sınav Juri Üyeleri

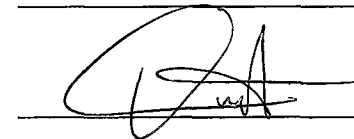
Doç.Dr. Mehmet ÖZASLAN

Yard.Doç.Dr Canan CAN

Yard.Doç.Dr. Berna BAŞ

Yard.Doç.Dr. İsmail Varol

Doç.Dr. Mehmet KORUK



## ÖZ

# HEPATİT B VİRÜSÜNE AİT GENOTİP D SEROTİPİNİN S GEN BÖLGESİ ÜZERİNDE MEYDANA GELEN MUTASYONLAR VE BUNLARIN TRANSKRİPTLER ÜZERİNE ETKİSİNİN ÇEŞİTLİ HASTA GRUPLARI İÇERİSİNDE ARAŞTIRILMASI

BARSGAN, Arzu

Yüksek Lisans Tezi, Biyoloji Bölümü

Tez Yöneticisi: Doç. Dr. Mehmet ÖZASLAN

Eylül 2004, 124 sayfa

Hepatit B virüsü dünyanın en büyük sağlık problemlerinden birisi olan hepatit B enfeksiyonunun ajanıdır. Enfekte ettiği kişilerde siroz ve karaciğer kanserlerine neden olmaktadır. Bu çalışmada HBsAg'si pozitif olan 132 hasta üzerinde yaptığımız PCR çalışmasında 40 HBV-DNA pozitif olgu tespit edilmiştir. Semi-nested PCR devamında yapılan dizi analizi yönteminden elde edilen veriler ile tüm varyantlar Genotip D ve subtip ayw3 olarak belirlenmiştir. Bu serotipteki kişiler farklı hasta gruplarından oluşmaktadır. Buna bağlı olarak mutasyon verileri hasta grupları içerisinde incelenerek bunların gruplardaki oranları saptanmış ve mutasyonların transkriptler üzerine etkisi araştırılmıştır. Bu araştırmalar mutasyona uğrama açısından stabil bir bölge olan ve yüzey antijenlerinden sorumlu olan S gen bölgesi üzerinde yapılmıştır. En yüksek mutasyon bulunduran grubun kronik HBV hastaları ve aile üyelerinden oluştuğu belirlenmiştir. En yüksek aminoasit mutasyonu yine aynı gruplarda meydana gelmiştir. En önemli sonuçlardan birisi ise tüm örneklerimizde rastladığımız aminoasit mutasyonlarından 125.(M→T) ve 127.(T→P) mutasyonları a-determinantının birinci lobu üzerinde bulunmasıdır.

Anahtar Kelimeler: HBV, S gen bölgesi, Mutasyon, Semi-nested PCR.

## **ABSTRACT**

### **INVESTIGATION OF THE MUTATIONS ON S GENE REGION OF HEPATITIS B VIRUS' GENOTYPE D SEROTYPE AND RESEARCH OF THIS MUTATIONS' EFFECTS ON THE TRANSCRIPTS AMONG THE DIFFERENT PATIENT GROUPS**

BARSGAN, Arzu

M. Sc. In Biology

Supervisor: Assoc. Prof. Dr. Mehmet ÖZASLAN

September 2004, 124 pages

Hepatitis B virus is an agent causing the Hepatitis B that important public health problem. HBV causes liver cirrhosis and hepatocellular carcinoma. In this study 40 HBV-DNA positive patients were determined from among 132 HBsAg positive patients by PCR. All variants were designated Genotype D and subtype ayw<sub>3</sub> using the semi-nested PCR and DNA sequencing techniques. These patients consisting of different groups. According to these, mutations were investigated in the patient groups and the rates were determined. In addition effects of these mutations on the transcripts were researched. For these studies S gene region that a stable region against mutations and responsible expression of surface antigens, was worked. In chronic patients and family members' mutation rates were designated as maximum among other groups. Amino acid mutations' maximum rates were occurred in same groups. The one of the most important consequences is 125.(M→T) and 127.(T→P) amino acid mutations that present all of the variants. And these mutations were founded on the first loop of a-determinant.

Keywords: HBV, S Gene Region, Mutation, Semi-nested PCR

## TEŞEKKÜR

Tez konumun belirlenmesi ve yürütülmesinde bana destek veren, sonuna kadar arkamda olan, hem bilimsel olarak hem de hayata dair hep örnek aldığım danışman hocam, Biyoloji Bölüm Başkanı sayın **Doç.Dr. Mehmet ÖZASLAN**'a,

Laboratuar çalışmalarım esnasında yardımları ve önerileri ile destek veren, sonuçlar olumlu çıktığı zaman benden çok sevinen, moral motivasyonunu esirgemeyen değerli hocam sayın **Yrd.Doç.Dr. Canan CAN**'a,

Tezin yazılması esnasında değerli önerileri ile destek veren sayın **Yrd.Doç.Dr. Berna Baş**'a,

Laboratuarlarında bana kurs alma imkanı veren KTÜ Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Başkanı sayın **Yrd.Doç.Dr. Faruk AYDIN** ve ekibine,

Çalışmalarım esnasında gerek materyal desteği gerekse değerli fikirleri ile çalışmalarına yol gösteren, Metis Biyoteknoloji'den sayın **Doç.Dr. Serdar TUNCER** ve ekibine,

Laboratuar örneklerinin temininde yardımlarını gördüğüm Gaziantep Hastaneleri personellerine,

Tez çalışmalarım esnasında beni motive eden ve destekleyen, her konuda da destekleyeceğine inandığım değerli arkadaşım **Rezzan BOZDANA ve AİLESİ**'ne,

Tezimin yazılması ve düzeltilmesinde gece gündüz yardımını isteyebildiğim ve yardımlarını hiçbir şekilde esirgemeyen, desteğini her daim hissettiğim sevgili arkadaşım **Esat SONSAYAR**'a,

Manevi olarak hep yanımda olduklarından ve sabırlarından dolayı **AİLEME**,

Teşekkürü bir borç bilirim.

<b>İÇİNDEKİLER</b>	<b>SAYFA</b>
ONAYLAR	i
ÖZ	ii
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR	iv
İÇİNDEKİLER	v
ŞEKİLLER DİZİNİ	ix
TABLolar DİZİNİ	x
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	xi
1. GİRİŞ	1
1.1. HBV-DNA'nın genel özellikleri	1
1.2. Hepatit B virüsünü diğer virüslerden ayıran bilinen bazı özellikleri	2
1.3. HBV genotip ve serotipleri	2
1.3.1. HBV Mutasyonlarının Viral Genotip ile İlişkisi	3
1.3.2. Hepatik Karaciğer Kanseri ile HBV genotiplerinin İlişkisi	3
1.3.3. HBV genotiplerinin terapi ile ilişkisi	3
1.4. S gen mutasyonları	4
2. GENEL BİLGİLER	7
2.1. HBV'nin Tarihçesi	7
2.2. HBV'nün Hepadnavirüsler İçindeki Yeri	8
2.3. Hepatit B Virüsünün Yapısı	9
2.4. HBV'nin Stabilitesini Etkileyen Faktörler	12
2.5. Hepatit B Virüsünün Genomik Yapısı	12
2.5.1. Promotorlar, Sinyal Bölgeleri ve Transkripsiyon Faktörleri	17
2.6. Viral Yaşam Siklusu	22
2.6.1. Hücreye bağlanma ve penetrasyon	22

2.6.2. Çekirdekte çift iplikli DNA'nın tamamlanması	23
2.6.3. Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi	23
2.6.4. Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu	24
2.6.5. Zarfin kazanılması ve hücreden salınma	26
2.7. HBV'nün Yapısal Proteinleri	27
2.7.1. Yüzey proteinleri	27
2.7.2. Kor Proteinleri	31
2.7.3. P Proteini	32
2.7.4. X Proteini	33
2.8. HEPATİT B VİRÜSÜ MUTASYONLARI	33
2.8.1. Precore-core bölgesi mutasyonları	34
2.8.2. Precore bölgesindeki diğer mutasyonlar	38
2.8.3. Core bölgesi mutasyonları	39
2.8.4. Yüzey geni mutasyonları	40
2.8.5. Polimeraz geni mutasyonları	42
2.8.6. X geni mutantları	43
2.9. HBV Genotipleri ve Subtipleri	44
2.9.1. HBV mutasyonlarının viral genotiplerle ilişkisi	47
2.9.2. HBV genotipleri ile HBV enfeksiyonlarının klinik seyri arasındaki ilişki	50
2.9.3. HBV genotipleri ile HBV enfeksiyonlarının interferon tedavisine verdiği cevap arasındaki ilişki	51
2.9.4. HBV genotiplerinin Hepatit B aşılmasının koruyuculuk oranı ile ilişkisi	52
2.10. Hepatit B Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi	52
2.10.1. Dünyada Hepatit B Enfeksiyonlarının Durumu	53

2.10.2. Türkiye’de Hepatit B Enfeksiyonlarının Durumu	54
2.11. Hepatit B Enfeksiyonunun İmmünopatogenezisi	55
2.12. HBV Enfeksiyonunda İmmün Yanıttan Kaçma Mekanizmaları	57
2.13. HBV Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısı	59
2.14. Moleküler Biyolojik Yöntemler İle HBV-DNA’nın Tanısı	61
2.14.1. İlk Uygulamalar	61
2.14.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve HBV-DNA	62
3. MATERYAL VE METOT	64
3.1. Materyal	64
3.2. Metod	64
3.2.1. PCR Yöntemi İle HBV-DNA’nın Saptanması Prensibi	65
3.2.2. PCR Temel Prensibine Bağlı HBV İçin Uygulanan Semi-Nested PCR Prensibi	66
3.2.3. HBV-DNA’nın İzolasyonu	66
3.2.4. Semi-Nested PCR Uygulaması	68
3.2.4.1. 1. aşama PCR işlemi	68
3.2.4.2. 1.aşama PCR ürünlerinin incelenmesi	69
3.2.4.3. 2. aşama PCR işlemi	70
3.2.4.4. 2. aşama PCR ürünlerinin incelenmesi	71
3.2.5. Kullanılan primer dizinleri ve sentez bölgeleri	71
3.2.6. HBV-DNA S Gen Bölgesi Dizi Analizi	72
3.2.7. Genotiplendirim ve Mutasyon analizi	73
3.2.8. Çalışmada Kullanılan Reaktifler	73
4. BULGULAR	79
4.1. 1.aşama PCR bulguları	79
4.2. 2.aşama PCR bulguları	81



4.3. Dizi analizi ve serotip bulguları	81
4.4. Genotip sonucuna bağlı sentez bölgesinin önemi	81
4.5. Mutasyon bulguları	83
4.5.1. Hasta Gruplarında Nükleotid Değişim Verileri	84
4.5.2. Hasta Gruplarında Aminoasit Değişim Verileri	89
4.6. Yaş ve Cinsiyete Bağlı Bulgular	94
4.7. Yaş Grubuna Göre Nokta Mutasyonların Durumu	95
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	98
6. KAYNAKLAR	106



<b>ŞEKİLLER DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Şekil 2.1</b> HBV partiküllerinin elektron mikroskopik görüntüsü	9
<b>Şekil 2.2</b> HBV ve HBs partiküllerinin şematik yapısı	10
<b>Şekil 2.3</b> Hepatit B Kor partikülü	11
<b>Şekil 2.4</b> HBV-DNA sarmalında terminal yapılar	13
<b>Şekil 2.5</b> HBV-DNA okuma bölgeleri	15
<b>Şekil 2.6</b> HBV-DNA genomik organizasyonu	16
<b>Şekil 2.7</b> Kor promotorunun şematik anlatımı	19
<b>Şekil 2.8</b> Epsilon-stem ilmiğinin şematik gösterimi	21
<b>Şekil 2.9</b> Hepatit B virüsünün hayat döngüsü	23
<b>Şekil 2.10</b> HBV-DNA'nın replikasyonu	26
<b>Şekil 2.11</b> a-determinantının lob yapısı ve oluşması mümkün mutasyon bölgeleri	30
<b>Şekil 2.12</b> HBV Genotiplerinin Dağılım Haritası	46
<b>Şekil 2.13</b> HBV enfeksiyonunda immünopatogenezin olası süreçleri	56
<b>Şekil 3.1</b> Semi-nested PCR için kullanılan HBV S gen bölgesi primerleri ve sentez bölgesinin HBV orijinal dizin üzerinde gösterimi	72
<b>Şekil 4.1</b> %2'lik jel kullanılarak elde edilmiş 1. aşama PCR ürünü	79
<b>Şekil 4.2</b> Aynı çalışma ile ilgili farklı bir jel görüntüsü	80
<b>Şekil 4.3</b> %1'lik jel kullanılarak elde edilmiş semi-nested PCR ürünü	81
<b>Şekil 4.4</b> HBV S gen bölgesi üzerinden sentezlenen yüzey proteinleri ve çalışma alanımız	82
<b>Şekil 4.5</b> Hasta gruplarının mutasyon oranı	83
<b>Şekli 4.6</b> Nokta mutasyonların hasta grupları içerisinde dağılımı	87
<b>Şekil 4.7</b> Gerçek viriyonun göstergesi olan HBV-DNA'nın yaş dağılımı	94
<b>Şekil 4.8</b> Yaş aralıklarına göre mutasyon dağılımı	97

<b>TABLolar DİZİNİ</b>	<b>SAYFA</b>
<b>Tablo 2.1</b> HBV Genotipleri ve Subtiplerinin Coğrafi dağılımı	46
<b>Tablo 3.1</b> HBV S Gen Bölgesine İçin Belirlenen Primer Dizinleri	71
<b>Tablo 4.1</b> 1.aşama PCR sonucuna bağlı olarak HBV-DNA pozitif olan hasta grupları	80



## SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ

A	Adenin
A	Alanin
aa	Aminoasit
anti HBc	Hepatit B kor antikoru
anti HBe	Hepatit B e antikoru
anti HBs	Hepatit B yüzey antikoru
BCP	Ana kor promotor (basic core promoter)
C	Sitozin
C	Sistein
ccc	Kovalent olarak kapalı sirküler ( covalently closed circular)
CURS	Kor ileri düzenleyici dizini (core upstream regulatory sequence)
ddH <sub>2</sub> O	Double distile su
DHBV	Ördek Hepatit B virüsü ( Duck hepatitis B virus)
DNA	Deoksiribonükleik asit
dNTP	Deoksinükleotidtrifosfat
DR	Tam tekrarlı ( direct repeat)
ε	Epsilon
EBP	Enhancer bağlama proteini
EDTA	Etilendiamintetraasetat
Enh	Enhancer (güçlendirici)
F	Fenilalanin
G	Guanin
G	Glisin
GSHV	Yer sincabı Hepatit B virüsü (Ground squirrel hepatitis B viru)
H	Histidin

HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBsAg	Hepatit B e antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HCC	Karaciğer kanseri (hepatoselüler karsinoma)
HLA	İnsan lökosit antijeni
HNF	Hepatik nükleer faktör
IL	İnterlökin
kb	Kilobaz
kd	Kilodalton
L	Lösin
LHBsAg	Büyük Hepatit B yüzey antijeni
M	Metionin
MBP	Mannoz bağlayıcı protein
MHBsAg	Orta Hepatit B yüzey antijeni
ml	Mililitre
mRNA	Messenger RNA
nm	Nanometre
NRE	Negatif düzenleyici element (negative regulatory element)
ORF	Açık okum bölgesi (open reading frame)
P	Prolin
PCR	Polimeraz zincir reaksiyonu ( Polymerase chain reaction)
pgRNA	Pregenomik RNA
Prom	Promotor (başlatıcı)
Q	Glutamin
R	Arjinin

RNA	Ribonükleik asit
S	Serin
SDS	Sodyum Dodesil Sülfat
SHBsAg	Küçük Hepatit B yüzey antijeni
T	Timin
T	Treonin
TBP	TATA bağlama proteini
URR	Üst regülatör bölgesi (upper regulatory region)
WHBV	Dağ sıçanı Hepatit B virüsü (Woodchuck hepatitis B virus)
$\mu$ l	Mikrolitre



## 1. GİRİŞ

HBV, Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısıyla, bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır [1]. Uzun kuluçka dönemli serum hepatininin etkenidir [2].

Dünyada yaklaşık olarak 2 milyar kişi HBV ile enfekte olmuş ve bunlardan 350 milyonu bu virüsün kronik taşıyıcısıdır. Türkiye’de ise toplumun %4-10’u HBV ile enfekteli olup bölgemiz halkının HBV yüzey antijen (HBsAg) taşıyıcılığı %4-7.5 arası değişmektedir. HBV açısından ülkemizde yüksek endemisite alanına giren Güneydoğu Anadolu bölgesinde özellikle aile içi taşıyıcılığının daha sık olduğu dikkati çekmektedir [3,4].

### 1.1 HBV-DNA’nın genel özellikleri

- Kısmen çift sarmallıdır,
- 3200 baz çiftinden oluşan bir uzun zincir ile 1800-2700 baz çiftinden oluşan bir kısa zincirden oluşur.
- (-) zincirin 5’ ucunda kovalent olarak bağlı terminal protein bulunur. (+) zincirin 5’ ucunda 17-19 nükleotid uzunluğunda RNA oligomeri bulunur. Bu açık uçlar bu şekilde polinükleotid kinazlar tarafından fosforile edilemezler ve ait oldukları zincirin sentezinde görev alırlar.
- Negatif sarmalın 3’ ucu 9-10 nükleotidlik bir artı uca sahiptir.
- Her iki sarmalın 5’ uçları DRs (direct repeats) adı verilen kısa, 10-12 nükleotidlik sabit bölgelerde yer alırlar.
- S, C, X ve P şeklinde 4 adet ORF (açık okuma bölgesi) bulundurulur. Bu bölgeler farklı başlangıç kodon bölgelerinin kullanımından dolayı yedi farklı tip proteinin sentezinden sorumludur.

- ORF'lerin transkripsiyonu en az dört promotor (preS1 prom, S prom, preC prom ve X prom) ve iki enhancer (Enh1, Enh2) bölgeler tarafından kontrol edilir [1,5].

## **1.2. Hepatit B virüsünü diğer virüslerden ayıran bilinen bazı özellikleri**

1-Sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısıyla, bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır.

2- Çembersel yapıdaki DNA'sı yarı çift zincirlidir.

3-Hepadnavirüsler replikasyonları sırasında "reverse transkriptaz" kullandığı bilinen tek DNA virüsü grubudur.

4-Hepadnavirus revers transkriptazı, negatif DNA zinciri sentezi için, kendisini bir protein primeri olarak kullanır. Bu özellik Hepadnaviruslara özgüdür.

5-Enfekte serumda enfektif partiküller ile birlikte enfektif olmayan iki tip partikülle beraber bulunur.

6-Karaciğerde çoğalırlar, kronikleşme ve hepatosellüler karsinomaya sebep olurlar [1,5,6].

## **1.3. HBV genotip ve serotipleri**

Genel olarak Hepatit B virüsü hepatit B yüzey antijeninin antijenik determinantlarına dayalı olarak dört subtip içerisinde sınıflandırılır [7]. Bu subtipler de kendi içerisinde 9 serotipe (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ ve adrq-) ayrılmaktadır [8].

Nükleotid dizileri arasındaki farklılık %8 veya daha fazla olan HBV genomları farklı genotip olarak tanımlanmış ve A'dan G'ye kadar 7 farklı genotip ortaya konmuştur. Bu HBV genotipleri S geni sekansları karşılaştırılarak belirlenmektedir. Sekanslar arasındaki %92 yada daha fazla benzerlik oranından faydalanılarak HBV suşları aynı genotip grubunda toplanarak 7 tip genotip belirlenmiştir. HBV genotipleri farklı coğrafi yayılım göstermektedir [5].



Hepatit B genotiplendirilmesi, virüsün patogenezi ve izlediği yolu açıklamak için önemlidir. Çünkü varyantlar terapiye verdikleri yanıt, virulensi, patogenezi ve serolojik aktiviteleri yönünden farklılık gösterebilmektedir [9]. Ayrıca mevcut çalışmalar, hepatit B e antijeni (HBeAg) üretimini azaltan ya da durduran precore ve core promotor bölgelerindeki mutasyonlar ile HBV genotipleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Genotiplendirmenin bir diğer önemi ise HBV genotiplerinin, interferon terapisine verilen yanıt ile de ilişkili olmasıdır [10,11].

### **1.3.1 HBV Mutasyonlarının Viral Genotip ile İlişkisi**

Hindistan'da 130 hasta üzerine yapılan çalışmada, Genotip A'da bazal core promotor mutasyon sıklığının Genotip D'ye göre daha yüksek olduğunu (%45; %12) buna karşın, Genotip D'de precore stop kodon mutasyonu sıklığının Genotip A'ya göre daha fazla olduğunu (%43; %6.5) bulunmuştur [3].

Japonya ve Çin'de yapılan çalışmalar sonucunda ise, genotip B'de genotip C'ye kıyasla yüksek oranda precore stop kodon mutasyonu görüldüğü, Genotip C'de ise B'ye kıyasla yüksek oranda core promotor mutasyonu görüldüğü ortaya konmuştur [10].

### **1.3.2. Hepatik Karaciğer Kanseri ile HBV genotiplerinin İlişkisi**

Japonya'da 26 sirozlu hasta üzerinde çalışılmıştır. Genotip B'li hastaların 19'undan 4'ünde (%21), genotip C'li hastaların 7'sinden 5'inde (%71) HCC geliştiğini bulmuşlardır. Genotip B'li hastaların terapiye iyi sonuç vermeleri ve uzun bir zamanda HCC'nin tekrarlamamasına karşın Genotip C'li hastalar terapiye zayıf yanıt vermeleri nedeni ile, HBV genotipi, HCC'nin gelişimi, terapiye yanıt ve HCC'nin tekrarlanması konularıyla ilişkilendirilebilir [3].

### **1.3.3. HBV genotiplerinin terapi ile ilişkisi**

Almanya'da 64 hasta üzerine yapılan çalışmada interferonun HBeAg üzerine etkisinin Genotip A'lı hastalarda, Genotip D'li hastalara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur [12].

Tayvan, Japonya ve Çin'de de genotip B ve C üzerinde çalışmalar yapılmıştır Genotip B'ye interferon ve lamivudin Genotip C'ye göre daha iyi etki etmektedir [13].

Bu şekilde çeşitli ülkelerde hepatit B virüsünün genotipleri arasında virülenslik, patogenezi ve oluşturduğu mutasyonları, vs. arasındaki farklılıklar incelenmekte ve böylece pek çok değerli sonuçlara ulaşarak, genotiplendirmenin, bu virüsün pek çok özelliklerini ve farklılıklarını ortaya koymada büyük ölçüde gerekli olduğu ifade edilmektedir.

#### **1.4. S gen mutasyonları**

Her ne kadar S gen bölgesinde meydana gelen mutasyonlarla ilgili literatür bilgileri ve yapılan çalışmalar kısıtlı da olsa şu ana kadar yüzey proteinlerinde meydana gelebilecek mutasyonların doğurduğu sonuçlar bir kısım araştırmacıların çalışmaları ile bilinmektedir.

HBsAg'de meydana gelebilecek bir mutasyon öncelikle varyantın hayatta kalması için ona avantaj sağlamaktadır. Dolayısı ile HCC de dahil olmak üzere akut ve kronik karaciğer hastalığı teşvik edilmiş olacaktır [14].

HBsAg hepatositi tanımda da görevli olduğundan dolayı bir takım mutasyonların meydana gelmesi bu tanımanın gerçekleşmesini engellemekte ve konak için avantaj sağlayan bir mutasyon söz konusu olmaktadır.

Serolojik kitler ile HBsAg'nin tanımına gidildiğinde yüzey antijeninde meydana gelen mutasyon kaynaklı yapısal değişiklik bu antijenin monoklonal antibody tarafından tanınmasını engellemektedir. Böylece yalancı negatiflik olarak bilinen HBsAg (-) olmasına rağmen HBV-DNA pozitifliği söz konusu olabileceği bildirilmiştir [15,16].

Ayrıca yapılan çalışmalarda HBsAg'de meydana gelen mutasyonların aşırıya karşı direnç meydana getirdiği HBIg ve HBV aşılması olmasına rağmen HBV-DNA'nın saptanması söz konusu olmuştur [17].

Çalışmamızın öncelikli amacı HBV'nin mutasyonlar açısından oldukça stabil bir bölgesi olan ancak mutasyon geliştiği takdirde de önemli sonuçlara neden olabilecek S gen bölgesindeki mutasyonları hasta gruplarına göre ortaya koymaktır. Ancak bu çalışma için HBsAg pozitif sonuçlu kişiler arasından HBV-DNA varlığı saptanan kişilerde serotip tespiti yapılması gerekmektedir. HBV genotip ve subtipleri coğrafi bir dağılım göstermesinden dolayı bölgemiz halkının seropini belirledikten sonra mutasyon analizlerine geçmeyi amaçladık. Ancak bu şekilde elde ettiğimiz dizinlerle Genbankasındaki bu serotipe ait orijinal dizin ile kendi dizinlerimizi kıyaslamak doğru verileri elde etmemizde önemli bir adım olacaktır.

Bölgeye ait HBV serotipinde, hasta grupları arasında meydana gelen mutasyonları araştırmanın yanı sıra Gaziantep'te daha önce Genotip bulgusu olmaması nedeni ile yaptığımız bu çalışmada öncelikle bölge için baskın genotip grubunu da önemli bir veri olarak sağlamış olduk. Ayrıca belirlediğimiz serotipe ait meydana gelen sabit mutasyonlar, diğer bölgelerde farklı serotiplerde meydana gelebilecek mutasyonlar ile çalışan grupların çalışmaları ile birlikte serotipler ile mutasyonlar arası ilişkiyi ortaya koymada bilim dünyasına katkıda bulunulacaktır.

Özellikle bölgemizde aşılmanın ve ileri aşamalara varmadıkça ilaç tedavisinin dikkate alınmamasından aşılammış ve ilaç terapisi görmemiş hastalar seçilmiştir. Böylece bölgedeki gerçek varyant ortaya konulabilecek yani mutasyonlar tümüyle kişinin kendi immün sistemine karşı geliştirilmiş sonuçlardan ibaret olacaktır.

Mutasyonları belirlemek için S gen bölgesinde özel bir bölge seçilmiştir. Bu bölge 250-715 nükleotidleri arasında olup yüzey proteinlerinin üç tipinin de sentezinde görevli olan ortak dizinleri bulunduran bir bölgedir. Bu şekilde bu bölge üzerinde meydana gelebilecek mutasyonla aynı anda tüm yüzey proteinleri de etkilenmiş olacaktır.

S gen bölgesinde meydana gelebilecek mutasyonları oransal olarak değerlendirerek belirlediğimiz beş hasta grubu içerisinde kıyaslamalar yapılarak en yüksek mutantları içeren grubu belirlemek çalışmamızın esas amacıdır. Bunun yanı sıra mutasyonların meydana geldiği bölgelerin aminoasitler üzerinde ne oranda değişikliklere neden olduğunu saptamak çalışmamızın devamını oluşturmaktadır.

Hasta örnekleri toplanırken yaş ve cinsiyet faktörlerinin de üzerinde durularak gerçek viriyonun göstergesi olan HBV-DNA'nın yaş ve cinsiyet üzerine insidansı da belirlenmiştir. Yaş gruplarına bağlı olarak hangi yaş grubunda en yüksek oranda mutasyon meydana gelme yüzdeleri de incelenmiştir.



## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HBV'nin Tarihçesi:

İlk defa M.Ö. beşinci yüzyılda tanımlanmış olan viral hepatitlerin kan ve kan ürünleri yoluyla salgın oluşturdukları 1883 yılında Almanya, Bremen'de çiçek aşılması sırasında dökümanete edilmiştir. İnsan lenf sıvısı kullanılarak hazırlanan aşının yapıldığı denizcilerin %15'i birkaç hafta ile sekiz ay kadar sonra sarılık hastalığı geçirmişlerdir. Yirminci yüzyılın başlarında kan verilen, serum yapılan veya aşılanan çeşitli risk gruplarında uzun inkübasyonlu sarılık salgınları bildirilmiştir. Bundan sonra sarılık etkeni olarak epidemiyolojik özellikleri farklı olan en az iki virüsün bulunduğu fikri gelişmiş ve 1947'de **MacCallum** ve **Bauer** infeksiyöz hepatit için 'Hepatit A' ve serum hepatiti için 'Hepatit B' nomenklatürünü geliştirmişlerdir [18].

Hepatit B virüsü (HBV) kan yoluyla bulaşan sarılık etkeni olarak ilk defa **Blumberg** ve **Alter**'in 1965'de "Avustralya antijeni"ni bulmasıyla tanımlanmıştır [18]. Araştırmacılar Avustralya kökenli bir Amerikalının kanında, çok sayıda kan transfüzyonu yapılmış hemofili bir hastadan elde edilen serum ile agar jel difüzyonda presipitin bandı oluşturan bir antijen saptamıştır. "Avustralya antijeni" adı verdikleri bu antijeninin Kuzey Amerika ve Avrupa kaynaklı serumlarda ender olarak bulunduğunu; buna karşılık Asya ve tropikal bölgelerden gelen kanlarda aynı antijenin sık olarak görüldüğünü bildirmişlerdir. Başlangıçta konağa ait bir antijen olarak düşünülen Au antijeninin yıllar sonra akut hepatitle ilişkisi saptanmış ve "Hepatitis associated antigen- HAA" olarak isimlendirilmiştir. Daha sonraki çalışmalar Au antijeninin B hepatiti ile ilişkisini ortaya koymuş ve "Hepatitis B surface antigen – Hepatit B yüzey antijeni – HbsAg" olarak bugünkü ismini almıştır. Bu antijenik yapının bulunmasından sonra yapılan araştırmalar HBV'nin tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu oluşturduğunu ortaya koymuştur [2,19].

Hepatit B'nin viral etiolojisi; **Dane** ve arkadaşları (1970) tarafından "Avustralya antijeni" serumu ile reaksiyona giren ve "Dane partikülü" olarak adlandırılan viral partiküllerin elektron mikroskopunda gösterilmesi ile kanıtlanmıştır. Dane

partikülünün HBV olduğu, yüzeyinde “Avustralya antijeni” olarak daha önce tanımlanmış yüzey antijeni bulunduğu ve ayrıca bir de çekirdek antijeni içerdiği gösterilmiştir. 1971 yılında **Krugman** ısı ile inaktive edilen hepatit B yüzey antijeni pozitif serumların immünojenik olduğunu ve aşı olarak kullanılabileceğini göstermiştir. 1972’de **Magnius** ve **Espmark** virüsün “e antijeni”ni tanımlamışlardır [20].

1973 yılına gelindiğinde **Kaplan** ve ark. virüsün kor bölgesinde DNA’ya bağımlı DNA polimeraz varlığını saptamışlardır [21]. **Robinson** ve ark. ise, HBV genomunun çeşitli özelliklerini deneysel olarak göstermişlerdir. Aynı yıllarda immun elektron mikroskobu ile virüsün çeşitli antijenlerinin hepatositlerdeki yerleşim özellikleri belirlenmiş; HBsAg’nin hepatosit sitoplazmasında, HBcAg’nin ise nükleusda depolandığı saptanmıştır [22].

Hepatit B virüsünün (HBV) doku kültüründe üretilmemesi, hayvan deneylerinin belirli maymun türleri ile sınırlı olması nedeniyle, bu virüsün yapısını ve replikasyon mekanizmasını saptamak oldukça uzun sürmüştür. 1980’li yıllarda bazı hayvanlarda HBV benzeri virüslerin neden olduğu enfeksiyonların gösterilmesi ve Moleküler Biyoloji’deki ilerlemeler sayesinde virüsün epidemiolojisi, doğası, enfeksiyonun seyri anlaşılır hale gelmiştir [23].

## 2.2. HBV’nün Hepadnavirüsler İçindeki Yeri

HBV, Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs cinsinde yer alan hepatotropik, zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. Sadece 3200 nükleotidden oluşan genomik yapısıyla, bilinen tüm hayvan DNA virüsleri içinde en küçük olanıdır [1].

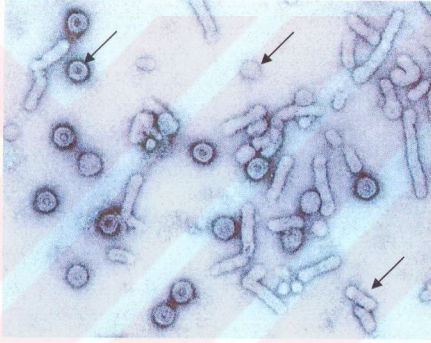
Hepadnaviridae ailesinin ortak özellikleri, DNA genomuna sahip olmaları, karaciğerde çoğalmaları, kronikleşme ve hepatosellüler karsinomaya sebep olmalarıdır. Hepadnavirüsler replikasyonları sırasında “reverse transkriptaz” kullandığı bilinen tek DNA virüsü grubudur [6].

Hepadnaviridae ailesinin üyeleri arasında hepatit B virüsünden başka; bir cins dağ sıçanı virüsü olan Woodchuck hepatit virüsü (WHV), vahşi yer sincabından izole edilen Ground squirrel hepatit virüsü (GSHV) ve pekin ördeklerinde bulunan Duck hepatit virüsü (DHBV) yer almakta olup bunların arasında insanlarda enfeksiyon

oluşturan tek tür hepatit B virüsüdür. Ancak şempanze, gibbon ve orangutan gibi hayvanların kanında da HBsAg ve Anti HBs bulunmuştur. Deneysel olarak bazı şempanze ve primatlarda da HBV enfeksiyonu oluşturulabilmiştir [1,5].

### 2.3. Hepatit B Virüsünün Yapısı

HBV'nün yapısını araştırmak amacıyla, akut ve kronik hepatit hastalarının serumları, ultrantrifügasyon işlemini takiben elektron mikroskopunda incelendiğinde büyüklük, yapı ve miktar gibi değişik özellikler bakımından farklı özelliklere sahip üç tip partikül saptanmıştır (Şekil 2.1.) [24,25].



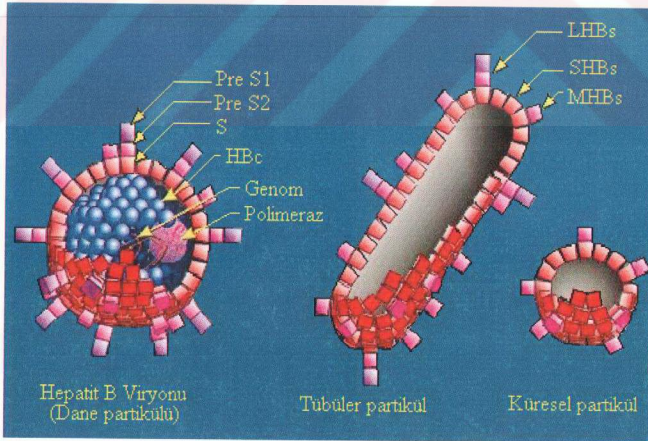
**Şekil 2.1.** HBV partiküllerinin elektron mikroskopik görüntüsü [26]

Bunlardan birisi, yaklaşık 42 nm (42-47 nm) çapında, infeksiyöz özellikte, tam bir viriyon yapısında ve küresel şekilli olan Dane partikülleridir. Bu partikülün dış yüzeyi 7-8 nm kalınlığında HBsAg protein ve glikoproteinleri ile hücreli lipitleri içeren bir kılıf ile kaplıdır [1,5]. Üç formda viral yüzey antijeni (HBsAg) bulunmaktadır. Bunlar büyük (L), orta (M) ve küçük (S) yüzey antijenleri şeklindedir [26]. Viriyonun iç bölümünü 27-28 nm çapında küresel nükleokapsid (internal core) oluşturmaktadır. Nükleokapsid 180 Hepatit B kor proteinlerinden oluşmuştur ve bu proteinler T=3 ve T=4 (T=Triangulation number = Üçgenleşme sayısı) simetrisi ile

ikozahedral yapıdadır. Kor partikülünün içerisinde endojen viral DNA polimeraz ve kısmen çift sarmallı sirküler DNA bulunmaktadır [27].

Olgun viriyonun dışında viriyon ile aynı antijenik özelliklere sahip olan diğer iki partiküller ise; özellikle replikasyonun söz konusu olduğu kişilerin serumlarında bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen, non-infektif tübüler partiküller ile yaklaşık 22 nm (16-25 nm) çapında, içinde nükleik asit bulunmayan, non-infektif, küresel partiküllerdir. Bu non-infektif partiküller sadece yüzey antijeninden (HBsAg) oluşmuştur [1,5,27]. Küresel partiküller küçük (S) ve orta (M) Hepatit B yüzey antijenlerinden oluşurken Dane partiküller ve tübüler partiküller ayrıca büyük (L) yüzey antijenlerini de bulundurmaktadırlar [28].

Her üç form da infekte konak serumunda yüksek miktarda (200-500 µg/ml) saptanabilir. Dane partiküllerinin sayısı serumda  $10^4$ - $10^9$  /ml iken non-infektif formlar serumda daha fazla bulunmaktadır. Non-infektif küresel partiküllerin serumdaki miktarı  $10^{13}$ /ml veya daha fazladır. Serumdaki HBsAg'nin büyük kısmını 22nm'lik küresel partiküller oluşturmaktadır [1].



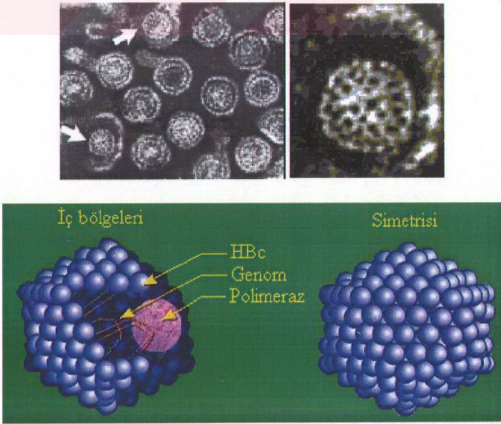
Şekil 2.2. HBV ve HBs partiküllerinin şematik yapısı [29'dan modifiye edilmiştir.]



Bazen Dane partikülü bir tarafından tübüler kuyruk şeklinde uzayabilmektedir. Bu kuyruk şeklindeki yapı tübüler partiküllerle benzerdir ancak uzunluk ve çap bakımından farklılık göstermektedir.

Non-infektif partiküller, enfeksiyonun akut fazında yüksek oranlarda bulunabilmektedirler. Bu partiküller olgun viriyonla aynı antijenik özelliğe sahip olduklarından dolayı, enfekte olan kişide yüksek oranda bulunması önemli bir derecede immün yanıtı neden olmaktadır. Bununla birlikte non-infektif partiküllerin bu şekilde yüksek oranlarda bulunmalarıyla antidyelerin kandaki infektif viral partikülleri bulma oranının da bu doğrultuda düşük olabileceği de düşünülmektedir [28,29].

Deterjanlar ile muamele edilen Dane partiküllerinden, dış kabuk ayrılarak kapsidi oluşturan kor bölgesi elde edilebilmektedir. Bu ürünün AntiHBs antikorları ile reaksiyon vermediği, buna karşılık akut viral hepatit olgularında saptanan bir diğer antikor (AntiHBc) ile reaksiyon verdiği belirlenmiştir. Günümüzde HBcAg adı verilen bu iç bölgenin, dışındaki kılıf tabakasından farklı bir antijenik yapıya sahip olduğu bilinmektedir. Nükleokapsid bölgesi HBcAg özelliğinin yanı sıra bu antijenin yapısal değişikliğe uğramış şekli olan HBeAg özelliğini de taşımaktadır. Bu iki antijenin dışında kor kısmında virüsün DNA'sı, DNA polimeraz enzimi ve DNA'ya kovalent bağlarla bağlanmış bir polipeptid bulunmaktadır [5].



Şekil 2.3. Hepatit B Kor partikülü [30'dan modifiye edilmiştir.]

HbC protein dimerleri birincil olarak, T3 simetrisindeki izometrik partiküllerde 0.8  $\mu\text{M}$  konsantrasyonunda toplanmaları ile şekil kazanmışlardır (bir kor partikülünde 180 HbC alt ünitesi bulunur). Kor partiküllerinin, dış uç kısmında bulunan kor proteininin T şeklindeki dimerlerden oluştuğu görülmektedir. Elektron mikroskopik analizlere göre; dimerdeki iki kor proteininin N-terminali bu uç kısmın tepesindedir. Toplanmış kor partikülleri bu şekilde disülfid bağları ile sabitleşmektedir [30].

#### **2.4. HBV'nin Stabilitesini Etkileyen Faktörler**

HBV'nin stabilitesi her zaman HBsAg'nin stabilitesi ile paralel olmamaktadır. Eter, asid (pH 2.4)'de en az 6 saat ve ısı ( $98^{\circ}\text{C}$ 'de 1 dakika,  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 10 saat)'da immünojenite ve antijenik özellik kaybolmadığı halde enfektivite kaybolmaktadır. Eğer virüs yoğunluğu çok fazla ise bu işlemler sonucu inaktivasyon tam olmamaktadır. HBsAg, %2.5 Sodyum hipoklorit varlığında 3 dakikada antijenik özelliğini ve enfektivitesini kaybetmektedir. Serumda enfektivite doğrudan kaynatmakla 2 dakikada,  $121^{\circ}\text{C}$ 'de 0.5 atm basınç altında 20 dakikada,  $160^{\circ}\text{C}$ 'de kuru sıcak havada 1 saatte, albümin içinde  $60^{\circ}\text{C}$ 'de 10 saatte kaybolmaktadır. Son çalışmalar HBV'nün sodyum hipoklorit (500mg serbest Cl/ml) ile 10 dakikada, %0.1-2 aköz glutaraldehid, %70 izopropil alkol, %80 etil alkolde 2 dakikada inaktive olduğunu göstermiştir.

HBV,  $30-32^{\circ}\text{C}$ 'de saklandığında en az 6 ay,  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de 15 yıl enfektivitesini yitirmemektedir. Enfekte plazmadan elde edilen fibrinojen, protrombin, gama globülin ve plazma proteininde çeşitli miktarlarda HBsAg bulunmaktadır. HBsAg içeren kan ve kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarla tabi tutulması enfektiviteyi etkilememektedir [1,2,5].

#### **2.5. Hepatit B Virüsünün Genomik Yapısı**

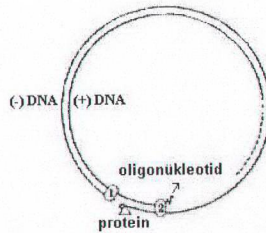
Hepatit B virüsünde kısmen çift sarmallı, molekül ağırlığı  $2.3 \times 10^6$  dalton, G+C oranı ise yaklaşık %49 olan, sirküler bir DNA molekülü bulunmaktadır. HBV-DNA 3200 baz çiftinden oluşan uzun (L veya negatif) zincir ile 1800-2700 baz çiftinden oluşan kısa (S veya pozitif) zincir olmak üzere iki sarmaldan meydana gelmiştir. L zinciri tam bir halka oluşturur ancak kapalı bir çember halinde değildir. Çünkü L sarmalı S sarmalının 5' ucuna yakın bir yerde (1230 numaralı nükleotidde) kesilmiştir. S zinciri ise değişik uzunluklarda bulunur, 3' ve 5' uçları birleşmemekte, bununla birlikte bu

sarmallar; ortak nükleotid baz çiftlerine sahip olduklarından, zincirlerin 5' ucundaki hidrojen bağlarından ve çakışan sekansları olduğundan sirküler bir yapı halinde bulunmaktadır [1,5,31].

HBV genomu üzerinde baz çiftlerini numaralandırma, EcoR1 restriksiyon enziminin kırma bölgesi üzerinden yapılmaktadır. Bununla beraber, RNA pregenomunun ilk bazı üzerinden ya da kor proteininin başlama kodonu üzerinden de numaralandırılmaya başlanması kullanılan diğer metodlardır [32].

Her iki sarmalın 5' uçları (koheziv bölgeleri) DRs (direct repeats) adı verilen kısa, 10-12 nükleotidlik sabit bölgelerde yer almaktadırlar. Uzun zincirin 5' ucu 1826. nükleotidde DR1 içinde, kısa zincirin 5' ucu ise 1592. nükleotidde DR2 içinde bulunmaktadır. Viral DNA'nın yapısal bütünlüğünü, bu koheziv bölgelerin birbirlerine tutunmaları sağlamaktadır.

Negatif sarmalın 5' ucuna kovalan olarak bağlanmış terminal protein (TP) ve pozitif sarmalın 5' ucunda bulunan 17-19 nükleotid uzunluktaki RNA oligomeri, ait oldukları sarmalların sentezinde primer görevi görmektedirler. Negatif sarmalın 3' ucu 9-10 nükleotidlik bir artı uca (terminal redundancy "r") sahiptir. Bu alan; pozitif DNA sarmalının sentezinde "template switching" işleminde DNA polimerazın da etkisi ile kısa zincirin tamamlanmasında ve sonuçta süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklindeki DNA molekülünün oluşmasında rol oynamaktadır [33].

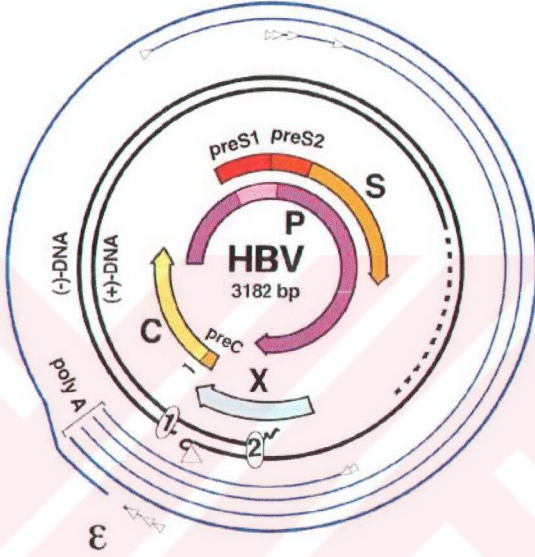


**Şekil 2.4** HBV-DNA sarmalında terminal yapılar. (-) zincirin 5' ucunda kovalent olarak bağlı terminal protein bulunur. (+) zincirin 5' ucunda 17-19 nükleotid uzunluğunda RNA oligomeri bulunur. Bu açık uçlar bu şekilde polinükleotid kinazlar tarafından fosforile edilemez ve ait oldukları zincirin sentezinde görev alırlar. Negatif sarmalın 3' ucu 9-10 nükleotidlik bir artı uca sahiptir [26].

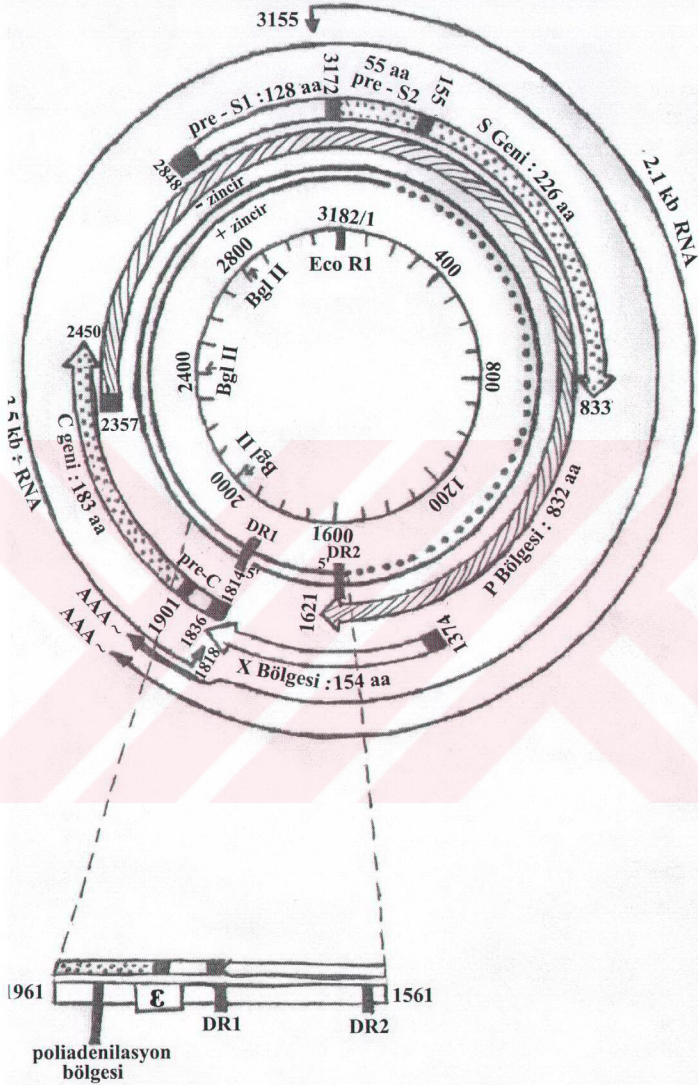
Hepatit B virüsünde genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmıştır. HBV, proteinlerini sentezlerken aynı genomik dizileri, kayan çerçeveler esasına göre farklı açık okuma çerçeveleri (Open Reading Frame=ORFs=protein kodlayabilecek bölgeler) olarak kullanmaktadır. ORF dört adet uzun S, C, X ve P bölgelerinden oluşmaktadır. Bu bölgeler farklı başlangıç kodon bölgelerinin kullanımından dolayı yedi farklı tip Hepatit B proteininin transkripsiyonu ve translasyonundan sorumludurlar. Örneğin, küçük Hepatit B yüzey proteini (sHBsAg), ribozomun adw genomunun 155. pozisyonundaki ATG'den translasyona başlamasıyla düzenlenmektedir. Orta Hepatit B yüzey proteini (mHBsAg) ise, ribozomun genomun 3211. pozisyonundaki ATG bölgesinden itibaren translasyonu düzenlenmektedir [34,35].

Genom içerisinde bu proteinleri kodlayan genler şunlardır [31];

1. S geni: Büyük (39 kD), orta (31 kD) ve küçük (24 kD) yüzey proteinlerini kodlamaktadır.
2. C geni: İki ayrı protein sentezletir. Bunlar; 21kD'luk çekirdek proteini (HBcAg) ve 30 aminoasitlik preC ürünü taşıyan 16 kD'luk enfektivite proteini (HBcAg)'dir.
3. P geni: DNA polimeraz, revers transkriptaz ve Ribonükleaz H aktivitesine sahip olan viral polimeraz enzimini kodlamaktadır.
4. X geni: X proteinini kodlamaktadır.



**Şekil 2.5** HBV-DNA okuma bölgeleri. S, C, X ve P şeklinde 4 adet ORF (açık okuma bölgesi) bulundurmaktadır. Bu bölgeler farklı başlangıç kodon bölgelerinin kullanımından dolayı yedi farklı tip proteinin sentezinden sorumludur. ORF'lerin transkripsiyonu en az dört promotor (preS1 prom, S prom, preC prom ve X prom) ve iki enhancer (Enh1, Enh2) bölgeleri tarafından kontrol edilmektedir [26].



Şekil 2.6 HBV-DNA genomik organizasyonu [26,29,30 nolu kaynaklardan modifiye edilmiştir]

Aynı zamanda genom, transkripsiyon dengesini düzenleyen, poliadenilasyon bölgesini belirleyen ve nükleokapsidde kapsidasyon için spesifik bir transkript belirleyen genetik elementleri de içermektedir [35].

### **2.5.1. Promotorlar, Sinyal Bölgeleri ve Transkripsiyon Faktörleri**

HBV genomu, viral replikasyonun olabilmesi için gerekli olan birçok promotor ve sinyal bölgeleri bulundurmaktadır.

ORF'lerin transkripsiyonu, “promotor” (prom=başlatıcı) ve “enhancer” (enh=güçlendirici) olarak adlandırılan düzenleyici dizinler tarafından kontrol edilmektedir. HBV'nin genomunda fonksiyonel olarak tanımlanmış en az dört promotor (preS1 prom, S prom, preC prom ve X prom) ve iki enhancer (Enh1, Enh2) bölgeleri bulunmaktadır. Tüm HBV transkriptleri, genomda 1916-1921 üzerindeki bölgeye lokalize olan ortak bir adenilasyon sinyalini paylaşmaktadırlar. Sonuç olarak transkriptler uzunluk olarak 3.5 nükleotid ile 0.9 nükleotid arasında değişmektedirler. Kor/ pregenomik promotörün lokalizasyonundan dolayı poliadenilasyon bölgesinin farklı kısımlarından (farklı kombinasyonlardaki kodonlar şeklinde) yararlanılmaktadır [36]. Poliadenilasyon bölgesi heksanükleotid bir dizidir (TATAAA) [37].

#### **Kor promotor**

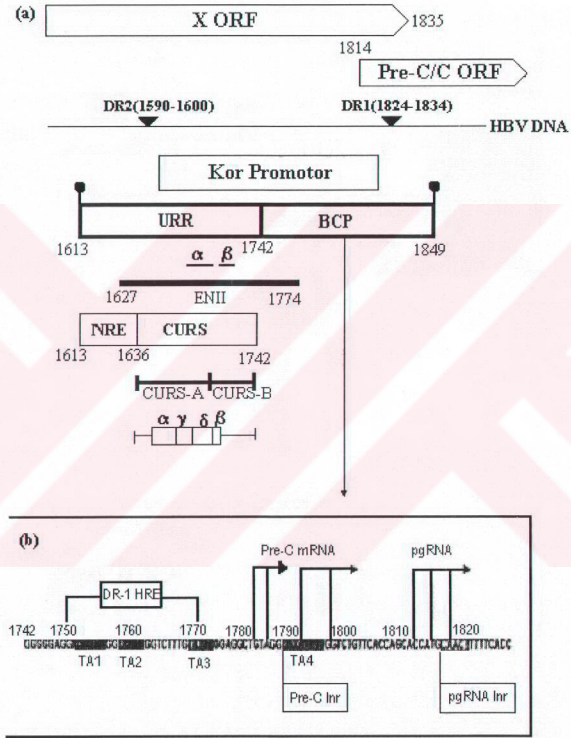
Kor/ pregenomik promotor, 5' heterogenetiğe sahip olan çeşitli RNA'ların transkripsiyonunu kontrol etmektedir. Bu transkriptler; kor antijeni, e antijeni, polimeraz ve pgRNA'dır. Bu transkriptler ayrıca hem viral enhancer elementleri hem de bir negatif regülatör elementi (NRE) tarafından da düzenlenmektedir [38,39]. Kor/ pregenomik bölgenin pozitif kontrolü birkaç hücreyel faktör tarafından kontrol edilmektedir. Bu faktörler, CCAAT/enhancer bağlama proteini (C/EBP), HNF-3, HNF-4, Sp1 gibi faktörler olup bunların aktivasyonu desteklediği görülmüştür [39].

Pre-kor /kor mRNA ve pregenomik RNA'nın transkripsiyon başlangıç bölgeleri farklıdır [40,41]. Pre-kor mRNA başlangıç alanı 1783-1784 ve 1789-1791 nükleotidler arasındadır. Bu alan RNA polimerazın bağlanması ve pre-kor transkripsiyonunu başlatmak için esansiyeldir. Pregenomik mRNA başlangıç alanı ise 1816-1818 nükleotidler arasındadır.

TATA içermeyen bir promotordur. Bu tür promotorlarda T ve A'ca zengin bölgelerin TATA kutusu fonksiyonu gösterebileceği kanıtlanmıştır [40,42]. Kor promotor bölgesinde 4 TA zengin bölge bulunmaktadır. Bu bölgeler: 1.TA zengin bölge: 1752-1755, 2. TA zengin bölge: 1758-1763, 3.TA zengin bölge: 1771-1775, 4. TA zengin bölge: 1789-1795 nükleotidler arasındadır [42].

2.TA zengin bölgenin pre-kor mRNA transkripsiyon başlangıcı için kritik bir bölge olduğu ancak pregenom mRNA transkripsiyonundan sorumlu olmayabileceği speküle edilmiştir, bunun yanı sıra 3. TA zengin bölgenin pregenom mRNA transkripsiyonundan sorumlu olabileceği düşünülmüştür [43]. Nitekim bu teorik yaklaşıma dayanılarak yapılan çalışmalarda, 2. TA zengin bölgede ortaya çıkan mutasyonların pre-kor mRNA transkripsiyonunu bloke edip HBeAg sentezini baskılayabileceği ve bu mutasyonların HBeAg negatif olan hastaların önemli bir kısmında bulunduğu bildirilmiştir [43-45]. Bu çalışmalarda, kor promotor bölgesindeki mutasyonların özellikle nükleotid 1762 (A'dan T'ye) ve 1764 (G'den A'ya)'de konsantrite olduğu bulunmuştur. Pregenom mRNA transkripsiyonu ile ilgili olduğu invitro çalışmalarla ileri sürülmüş 3. TA zengin bölgede herhangi bir mutasyonun yokluğu ve 2. TA zengin bölgedeki söz konusu mutasyonların varlığı ile viral replikasyonun inhibe olmadığı ancak HBeAg sentezinin bloke edilebileceği düşünülmüştür. Ancak yeni gözlemler, 4. TA zengin bölgenin her iki transkriptin oluşumundan sorumlu en önemli bölge olabileceğini düşündürmektedir [42].





Şekil 2.7 Kor promotörünün şematik anlatımı [44 nolu kaynaktan modifiye edilmiştir.]

## **S ve PreS promotor**

ORF S, üç farklı hepatit B yüzey proteinlerinin sentezini yöneten üç başlangıç bölgesi içermektedir [46-48]. Burada bu proteinlerin anlatımını kontrol eden, preS1 promotor ve pres2 promotor olarak adlandırılan, iki promotor bölge bulunmaktadır. preS1 promotörü tüm ORF S bölgesini içine alan, 2.4 kb uzunluğundaki tek bir RNA molekülünün transkripsiyonunu kontrol etmekte fakat preS2 promotörü 2.1 kb uzunluğundaki transkriptlerin transkripsiyonlarını kontrol etmektedir. PreS2 promotörlerin preS1 promotörden daha aktif olduğu gösterilmiştir [49,50]. Bu durum, orta ve küçük yüzey proteinlerinin büyük yüzey proteinine kıyasla daha fazla olduğu şekilde sonuçlanmaktadır. Yüzey proteinleri endoplazmik retikulumda tutunmaktadır [51-53]. Oct-1, HNF-1, ve HNF-3 gibi transkripsiyon faktörlerinin PreS1 promotörünün aktivasyonundan sorumlu olduğu görülmüştür [54-57]. HBV enhancer elementlerinin de preS1 promotörünün yüksek oranlı regülasyonunda görevli olduğu görülmektedir [58,59]. PreS1 promotörünün düşük oranda regülasyonu preS2 promotörü içindeki bir bölge tarafından kontrol edilmektedir. Ancak mekanizma tam olarak anlaşılammıştır. PreS2 promotörünün, aynı zamanda preS1 promotörünün düşük oranda regülasyonunu kontrol eden bir CCAAT elementi tarafından yüksek oranda regüle edildiği görülmektedir. NF-Y ve CCAAT bağlanma faktörü, her iki HBV enhancer'lar gibi preS2 aktivasyonunu sağlamaktadır. Ayrıca, büyük Hepatit B yüzey proteinlerinin de varlığından dolayı endoplazmik retikulum üzerinde oluşan stres de bu aktivasyonu artırmaktadır [60,61]. Büyük HBs promotörü, transkripsiyonun başlangıç bölgesinin 30 nükleotid yukarısında lokalize olan tipik TATA kutusu ile diğerlerinden farklılık göstermektedir [40,42].

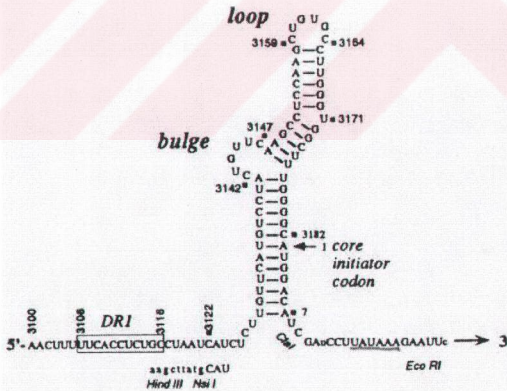
## **X promotor**

Hepatit B X proteini (HBx) olarak bilinen 17kd'luk bir proteini kodlayan ORF X, 0.9kb'lik RNA'nın transkripsiyonunun kontrolü için kendine ait promotora sahiptir. Ancak, X promotörünün enhancer I bölgesine yakınlığından dolayı tam olarak sınırları kesinleştirilememiştir. Promotorun 1230 ile 1376 nükleotidleri arasında kalan bölgede bulunduğu düşünülmektedir [62,63]. Enhancer I ise 970 ile 1240 nükleotidleri arasındaki bir bölgede lokalize olmuştur. Birçok transkripsiyon faktörünün HBV genomunun bu bölgesi ile etkileşim halinde olduğu düşünülmektedir. Bu moleküller HNF-3, HNF-4, EF-C ve NF-1 şeklinde çok azı

isimlendirilmiş faktörlerden oluşmaktadır. Hem enhancer I hemde enhancer II pozisyonlarına rağmen promotörleri aktive edebilmektedirler. Her iki enhancer bölgesinin olmaması viral transkriptlerin büyük oranda azalması anlamına gelmektedir [64-66].

### Epsilon-stem ilmeği

Son bölge epsilon-stem ilmeği olarak bilinmektedir. Bu bölge HBV genomunda 1847-1907 nükleotidleri arasında bulunmaktadır ve HBV DNA enkapsidasyonunda anahtar rolü oynamaktadır [67-69]. pgRNA'daki artık uçtan (terminal redundancy) dolayı sadece 5'-stem ilmeği fonksiyoneldir [70]. Bundan dolayı, bütün HBV transkriptlerinin 3' uçlarında stem ilmek bölgeleri olmasına rağmen sadece pgRNA'lar enkapside edilmektedirler. Stem ilmeğinin dizi analizi, üç boyutlu stem ilmeği yapısının, katlanmış olarak bulunan bir seri ters tekrarlardan oluştuğunu göstermektedir [71]. Polimeraz proteininin stem ilmeği yapısını tanıdığı ve bu yapı ile direk etkileştiği düşünülmektedir. Hepatit B polimeraz ve stem ilmeğinin etkileşime girmeleriyle hem enkapsidasyon hem de HBV pgRNA'nın revers transkripsiyonu başlamaktadır [72].



Şekil 2.8. Epsilon-stem ilmeğinin şematik gösterimi [69]

Transkripsiyon faktörleri, bir taraftan RNA polimerazı bağlarken diğer taraftan promotör ve enhancer bölgelerine bağlanarak RNA polimerazın DNA ile ilişkisini sağlamaktadır.

Hepatit B virüs ailesinin genomik düzenlenişi kendini diğer virüsler arasında eşiz kılmaktadır [73].

## **2.6. Viral Yaşam Siklusu**

HBV'nin plazma yarı ömrü 24 saat olup her gün vücutta bulunan virüslerin %50'si yeniden oluşmaktadır. Günlük virüs üretimi 1011 virion kadar olan HBV'nün replikasyonu başlıca hepatositlerde gerçekleşmektedir. Safra kanalı epitel hücreleri, pankreasın bazı endokrin ve ekzokrin hücreleri, böbrek ve lenfoid doku da replikasyon bölgesi olabilmektedir. Fakat hepatosit dışı replikasyon bölgelerinin viral patogeneze rolü olmadığı düşünülmektedir. Lenfositlerdeki replikasyon virüs perzistansı için ikincil bir rezervuar olabilmektedir [74].

### **2.6.1. Hücreye bağlanma ve penetrasyon**

Replikasyonun ilk adımı HBV'nün hepatosite bağlanması ve hücre içine girmesidir. Virüsün hepatosit içerisine alınışı tam aydınlatılamamakla beraber bunun reseptöre bağlı endositozla olduğu düşünülmektedir. Bağlanmada; fibronektin, transferrin reseptörü, apolipoprotein H, polimerize insan serum albümini, preS2 glikan, HBV bağlayan faktör gibi bir çok reseptör rol oynamaktadır [75,76].

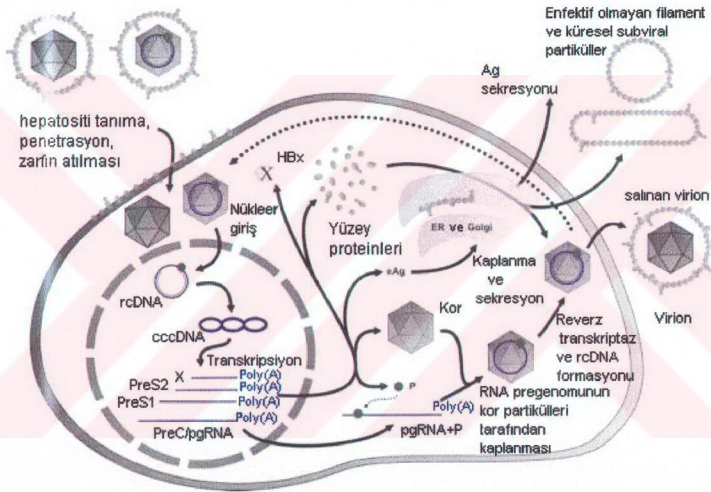
In vitro olarak, HBV genomunun pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinde hepatosite tutunma bölgelerinin bulunduğu saptanmıştır. Pre-S1 ürünü olan L proteini ile beraber M proteini de hepatosite bağlanmada önemli işlevlere sahiptir. L proteini ayrıca monositlere de bağlanabilmektedir. Mononükleer hücrelerde saptanabilmekle beraber HBV'nün bu hücrelerde aktif olarak replike olduğuna dair kanıt bulunamamıştır [77,78].

PreS1 proteininin 3-77. aminoasitleri viral enfektivite ile ilişkilidir. PreS2 ayrıca serum albüminine bağlanmakta ve hepatosite bağlanmada albümini aracı olarak kullanmaktadır.

Viral tutunmayı takiben membran füzyonu ile nükleokapsid sitoplazmaya girmekte, pasif difüzyon veya tübüler taşıyım ile çekirdeğe taşınmaktadır [79].

### 2.6.2. Çekirdekte çift iplikli DNA'nın tamamlanması

Viral replikasyonun başında polimeraz enzimi rcDNA'nın tamamlanmasında rol oynamaktadır. Negatif zincirin 5' ucuna tutunmuş olan viral polimeraz, pozitif zincirin 5' ucuna tutunmuş olan kısa RNA dizisinden başlayarak pozitif zinciri tamamlamaktadır.



Şekil 2.9. Hepatit B virüsünün hayat döngüsü [74. kaynaktan modifiye edilmiştir.]

Oluşan, kovalent bağlarla kapanmış sirküler DNA (covalently closed circular DNA = cccDNA), viral pgRNA için kalıp görevi gördüğünden enfeksiyonun başladığını göstermektedir. Virüs enfeksiyonundan 24 saat sonra karaciğerde cccDNA oluşumu gösterilmiştir [80].

### 2.6.3. Pregenomik ve subgenomik RNA'ların sentezi

Çekirdekte hücrel RNA polimeraz II enzimi kullanılarak cccDNA'dan mRNA'lar sentezlenmektedir. Kor promotör bölgesi viral replikasyonun merkezidir ve negatif zincirden pregenomik RNA (pgRNA) olarak adlandırılan 3.5 kb'lık en büyük RNA'yı sentezletmektedir. Sentezlenen mRNA'lar sitoplazmaya taşınarak translasyona uğramakta ve viral proteinler sentezlenmektedir [80].

### 2.6.4. Viral kapsidin sentezi ve genomun replikasyonu

pgRNA önce 200-300 molekül çekirdek proteini sentezletmekte, sonra polimeraz sentezine izin vermektedir. Polimeraz sentezi pgRNA'nın kor bölgesi içinde kalan bir başlangıç kodonundan başlamaktadır. Sentezlenen polimeraz kendi mRNA'sının 5' ucuna bağlanarak revers transkripsiyonu başlatmakta ve aynı anda çekirdek içine yerleşmektedir. Polimerazın sentezlenmesi pgRNA sentezini durdurmaktadır. pgRNA'nın 5' ucunda bulunan enkapsidasyon dizisi (e-dizisi) adı verilen nükleotid dizileri, viral polimeraz enzimini bağlamakta ve viral korun yapımı başlamaktadır. Çekirdek proteinleri ikiye ikiye bir araya gelmekte, disülfid bağları ile stabilize olmaktadır. Bu birimlerden 120 tanesi bir araya gelerek ikozahedral kapsidi oluşturmaktadır. Enkapsidasyon dizisi taşıyan pgRNA'lar kapsid içine yerleşmekte ve pgRNA'dan revers transkripsiyon ile negatif DNA zincirinin sentezi; viral çekirdek içinde, sitoplazmada gerçekleşmektedir. Bu olayda enkapsidasyon dizisi çekirdek içine bir kopya nükleik asit yerleşmesini sağladığı gibi viral DNA sentezini başlatmada da rol oynamaktadır [81]. Negatif DNA sentezlendikten sonra viral polimerazın RNaz H aktivitesi ile pgRNA yıkılmakta ve DNA polimeraz aktivitesi ile 5' RNA primeri kullanılarak pozitif zincir sentezlenmektedir. Pozitif zincir sentezi için negatif zincirin 5' ucundaki DR1 bölgesindeki primer DR2 bölgesine taşınmakta ve pozitif zincir sentezi buradan başlamaktadır. Her iki zincirin 5' uçları bu nedenle farklılık göstermektedir [18,33,74]. Yani pozitif zincirin sentezinde kalıp olarak negatif zincir kullanılmaktadır. Negatif zincirin 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik terminal artık, pozitif zincirin sentezi sırasında genomun sirkülize olmasını sağlamaktadır. Bu arada kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi, prekürsör nükleozid trifosfatların polimerazını tüketmekte ve bu yüzden pozitif zincirin sentezi tamamlanamamakta ve eksik olarak

kalmaktadır. Her iki zincir 5' uçlarından bağlanarak rcDNA sentezi tamamlanmış olmaktadır.

HBV'nin viral polimerazı, aminoasit dizilimi ve fonksiyonu açısından retroviral revers transkriptaz enzimine benzemektedir. Her iki enzim de viral kor içinde aktivite göstermektedir. Hepadnavirus revers transkriptazı negatif DNA zinciri sentezi için, kendisini bir protein primeri olarak kullanmaktadır. Bu özellik Hepadnaviruslara özgüdür [18,31]. Hepadnaviral revers transkriptaz, retroviral enzimden farklı olarak replikasyon aracısı olarak kullanılan viral pgRNA'yı kalıp olarak kullanmakta ve son ürün olan viral DNA'yı sentezletmektedir. Retroviral revers transkriptaz enzimi ise viral genomu kalıp olarak kullanmakta ve son ürünü replikasyon aracısı olarak kullanılan cDNA olmaktadır [81].

HBV'nün replikasyonunun normal seyri sırasında HBV DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmemektedir. Bununla birlikte, HBV ile enfekte bazı kişilerin serumlarında nadir olarak HBcAg'nin varlığı gösterilmiş olsa da, bu antijen viral replikasyon sırasında konak hücre çekirdeğinde sıklıkla tespit edilmektedir. Bu nedenle HBcAg'nin nükleusa girmesinin cccDNA'nın ortaya çıkmasından önce olduğu tahmin edilmektedir [5,40,82].

Kronik HBV enfeksiyonunda viral DNA, konak genomuna integre olmaktadır. Bu integrasyon karsinogenesis için önemli olmakla beraber sirküler biçimini kaybeden genomun replikasyon potansiyelini azaltmaktadır [83].

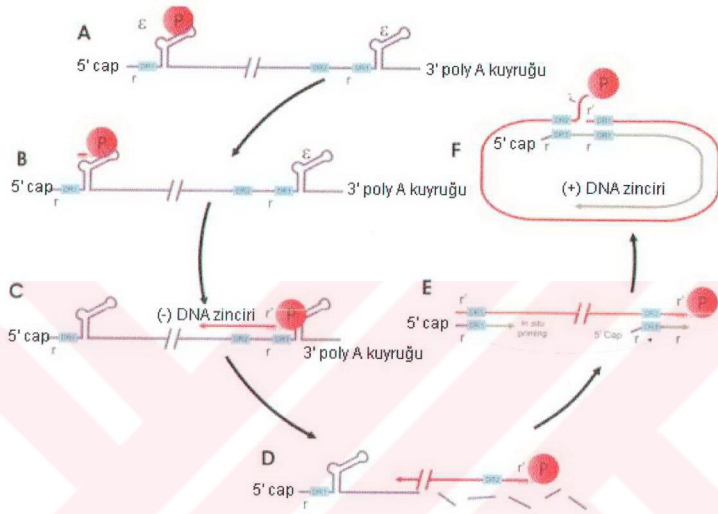
HBV'ünde fonksiyonu bilinen dört mRNA transkripti tanımlanmıştır [18,33,74];

1. 3.5 kb'lık mRNA: Negatif polariteli iççikten sentezlenen bu mRNA, hem genom replikasyonu için kalıp görevi görmekte, hem de "prekor/kor" ve polimeraz proteinlerini sentezletmektedir.

2. 2.4 kb'lık mRNA: Üç ayrı başlangıç kodonu aracılığı ile küçük, orta ve büyük yüzey proteinlerini sentezletmektedir. mRNA'nın amino terminalindeki başlangıç kodonundan başlayan sentez ile preS1, preS2 ve S proteinlerini içeren L yüzey proteini oluşturulmaktadır. M yüzey proteini ise ikinci okuma kodonundan başlayarak sentezlenmekte; preS2 ve S proteinlerini içermektedir. S proteini en küçük protein olup, üçüncü başlangıç kodonundan başlayarak sentezlenmektedir.

3. 2.1 kb'lık mRNA: Sadece preS2 ve S proteinlerini sentezletmektedir.

4. 0.7 kb'lık mRNA: X proteinini sentezletmektedir.



Şekil 2.10. HBV-DNA'nın replikasyonu [84. kaynaktan modifiye edilmiştir]

### 2.6.5. Zarfın kazanılması ve hücreden salınma

Viral çekirdek endoplazmik retikulumdan geçerken zarf ve yüzey proteinlerini kazanmaktadır. Zarfın kazanılması için büyük yüzey proteini gerekmektedir. L proteini endoplazmik retikulum zarına yerleşmekte, zarın iç kısmında kalan bölümleri çekirdek proteinleri ile bağlanarak tomurcuklanmaktadır. Her üç yüzey proteinini de içeren zarflı virüsler Golgi cihazına taşınmaktadır. Burada S proteininin asparagin rezidüsü glikozillenmekte ve olgun viriyonlar veziküler transport ile hücre yüzeyine taşınarak salınmaktadır [85].

Hepadnavirus replikasyonunda en önemli rolü cccDNA sentezinin regülasyonu oynamaktadır. Enfeksiyonun erken döneminde nükleokapsidler tercihen hücre



çekirdeğine geri taşınmaktadır. Burada pozitif zincirin sentezi tamamlanmakta ve cccDNA oluşturulmaktadır. Bu yolla çekirdekte oluşturulan cccDNA rezervuarı, hepatosit bölünmesiyle yavru hücrelere enfeksiyonun aktarılmasını sağlamaktadır. Enfeksiyon yerleştikten sonra ise salınan virionlar horizontal yayılımı sağlamaktadır [83].

## 2.7 HBV'nün Yapısal Proteinleri

**2.7.1 Yüzey proteinleri:** Bu proteinler HBV-S geni tarafından kodlanmaktadır. Bu proteinler hem Dane partikülünün yüzeyinde hem de infekte hastaların karaciğer ve serumlarında saptanan 22nm çapındaki küresel ve tübüler (eksik viral) partiküllerin yapısında bulunmaktadır. Yüzey proteinleri değişik molekül ağırlığındaki (24000-42000 Dalton) glikolize ve nonglikolize altı farklı polipeptidin değişik oranlarda bir araya gelmesi ile oluşmaktadır. Bu proteinlerdeki farklılık, sentezin aynı gen üzerindeki farklı başlangıç kodonlarından başlaması nedeniyle olmaktadır.

2850-3174. nükleotidler arasındaki preS1 bölgesi 108 aminoasitten oluşan polipeptid sentezlemekte, 3174-157. nükleotidler arasındaki preS2 bölgesi 55 aminoasitten oluşan bir protein sentezlemekte, 157-833. nükleotidler arasındaki S bölgesi 226 aminoasitlik bir polipeptid sentezlemektedir. Başlangıç kodonları farklı olmakla beraber, protein sentezi 3' ucunda sonlanmakta ve üç farklı protein sentezlenmektedir [33,86].

**Büyük Yüzey (LHBs) Proteinleri:** Okuma işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa preS1+preS2+S bölgesinin tümü okunmakta ve kılıfın büyük proteini (LHBs) sentezlenmektedir. Bu protein 39kd molekül ağırlığında, 389 veya bazen 400 aminoasitten oluşmuş bir polipeptit olup glikolize olmuş formu 42kd'dur. Bu protein en fazla Dane partikülünün yüzeyinde bulunmaktadır. Tübüler partiküllerin yüzeyinde orta miktarda, küçük küresel partiküllerde çok az miktarda bulunmaktadır.

Viriyonun konak hücreye bağlanmasında LHBs proteinin rolü olduğuna inanılmaktadır. LHBs'nin preS1 bölgesinde yer alan 21-47. aminoasitler arasındaki bölge, hepatosit membranına bağlanma alanını oluşturmaktadır. Bu bölgeye karşı gelişen antikorlar bu bölgenin hepatosit membranına bağlanmasını engellemektedir [87]. Ayrıca preS1 proteini viriyonun olgunlaşmasında ve sekresyonunda da önemli rol üstlenmektedir.

Dane partikülünün oluşumu, bir araya gelmesi ve konak hücreden salınmasında küçük ve büyük yüzey proteinler gerekliken orta yüzey proteinleri gerekli olmamaktadır. Küçük ve orta yüzey proteinleri diğer viral proteinlerin katkısı olmaksızın 20nm'lik küresel partiküller oluşturma yeteneğindedir. Oysa LHBs proteini hücreden tek başına salınmamaktadır. Bununla birlikte hücrede LHBs oranı çok yükseldiğinde, SHBs ve MHBs'nin hücreden sekresyonu inhibe olmaktadır. Ayrıca LHBs'nin SHBs'ye oranı sekrete edilecek HBs partikülünün morfolojisini belirlemektedir. %5'den daha az LHBs olduğunda 22nm'lik küresel partiküller meydana gelirken, daha yüksek konsantrasyonda LHBs olduğunda tübüler partiküller sekrete edilmektedir. Konsantrasyon daha da arttığında yukarıda belirtildiği gibi filament sekresyonu önlenmektedir [5,40].

Asemptomatik HBsAg taşıyıcılarında devamlı, fakat düşük düzeyde, sekrete edilmeyen LHBs'nin üretilmesinin hepatositlerde lezyon oluşumuna ve hepatosellüler karsinomaya (HCC) neden olabileceği düşünülmektedir. HBs proteinleri endoplazmik retikulumdan salınmaktadır ve preS1 ürünlerinin endoplazmik retikulum (ER) içinde birikimi ER'da şişmeye ve karaciğerde buzlu cam görünümüne neden olmaktadır.

Orta Yüzey (MHBS) Proteinleri: Okuma işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa preS2+S bölgesi ürünü olan orta yüzey (MHBS) proteinler oluşmaktadır. Bu proteinler 33kd ağırlığında olup 281 aminoasitten oluşmaktadır. Bunlar hemen bir veya iki bölgesinden glikolize edilmiştir. Bu partiküller üç yüzey proteini içinde, en az bulunan proteinlerdir. Replikasyon olmadığında HBsAg içinde bulunmazlar ve bu nedenle preS2 antijeninin varlığı viral replikasyonun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir [82].

Hayvanlar üzerinde yapılan çalışmalarda M Yüzey proteinine karşı gelişen antikorların HBV'ne karşı koruyucu özellikte olduğu gösterilmiştir [88,89].

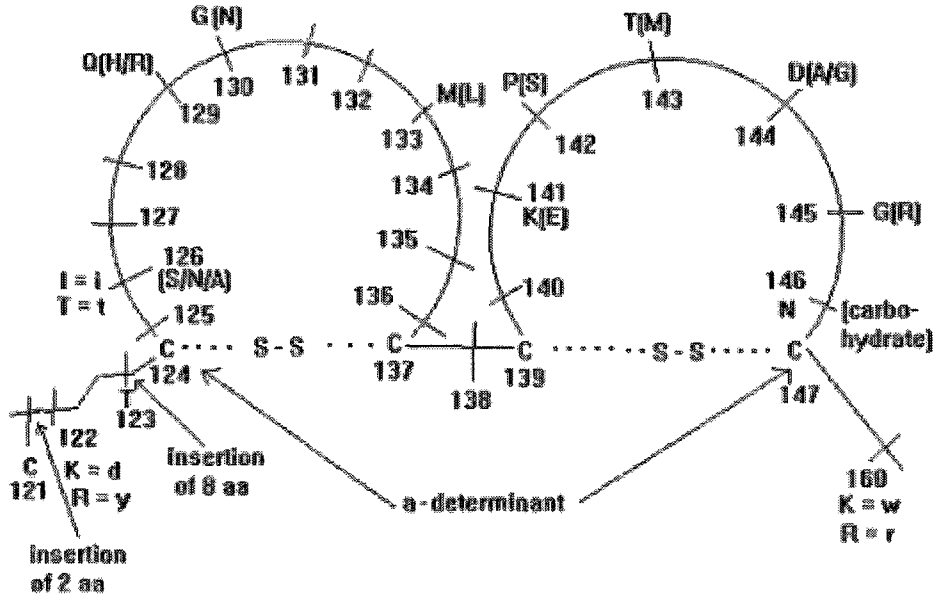
MHBs'nin HBV'nün hepatositlere adsorbsiyonunda rol oynadığı düşünülmektedir. HBV'nün karaciğer hücrelerine tutunmasında rolünün olabileceği düşünülen diğer bir reseptör de preS2 glikondur. M proteini üzerinde pozisyon 4'te bir asparagin rezidüsü bulunmaktadır. Bu rezidü mannoz ile sonlanan bir oligosakkarid ile glikolize haldedir. HBV'nün bu bölgeden mannoz bağlayan protein (MBP) aracılığı

ile hepatositlere bağlandığı düşünülmektedir. MBP, doğal immünitede önemli rolü olan kalsiyuma bağımlı bir lektindir. Fagositozu aktive etmektedir [90].

Küçük Yüzey (SHBs) Proteinleri: Okuma işlemi sadece S bölgesini içerirse kılıfın küçük proteini üretilmektedir. Bu protein 24kd ağırlığında olup 226 aminoasitten oluşmaktadır. Glikolize edilmiş formu da olan bu protein, HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan majör proteindir ve B lenfositleri için de epitopik bölgelere sahiptir. HBsAg'nde S proteininden başka değişik oranlarda M ve L yüzey proteinleri de vardır. Kanda dolaşan yüzey proteinleri içinde ve toplam olarak üç protein içinde de en baskın olan protein S proteindir [91].

SHBs'yi oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre HBsAg üzerinde en az 5 antijenik determinant (a, d/y ve w/r) bulunduğu saptanmıştır. Bütün subtiplerde ortak olan gruba özgül "a" determinanı; 124-147. aminoasitler arasındaki hidrofilik bölgedir. Konvelesan (iyileşme dönemi) serumdaki antikor bağlayan aktivitenin %80'i bu bölgeye aittir ve bu bölgeye karşı gelişen antikorlar HBV'nün hepatositlere bağlanmasına engel olmakta ve tüm subtiplere karşı etkin bir bağışıklık oluşmaktadır. "a" determinanı gerek aşı gerekse doğal bağışıklık sonrası gelişen anti HBs antikorlarının büyük kısmını bağlamaktadır. Yine "a" determinanı disülfid köprüleri ile oldukça iyi korunan bir determinanttır [92,93]. Ancak yapılan çalışmalarda bir takım mutasyonlar da saptanmıştır.

a-determinantına konformasyonel olarak bakılacak olursa iki lobdan oluştuğu görülmektedir [94].



**Şekil 2.11** a-determinantının lob yapısı ve oluşması mümkün mutasyon bölgeleri.

Çizgi şeklindeki hatlar muhtemel mutasyon alanlarını göstermekte olup yeni oluşan aminoasitler de parantez içerisinde verilmiştir [94].

Pepsin ile preS1 ve preS2 gen ürünleri uzaklaştırıldıktan sonra sadece S proteinleri bulunan HBsAg'nden üretilen aşılarda da HBV enfeksiyonuna karşı etkin bağışıklık oluşturulmuştur [95].

Son yapılan çalışmalarda 9 adet HBsAg subtipi bulunmuştur, bunlar: ayw<sub>1</sub>, ayw<sub>2</sub>, ayw<sub>3</sub>, ayw<sub>4</sub>, ayr, adw<sub>2</sub>, adw<sub>4</sub>, adr<sub>q</sub><sup>+</sup> ve adr<sub>q</sub><sup>-</sup> olup, ayrıca x ve q gibi ek determinantların varlığı da gösterilmiştir.

Uzak doğu'da az sayıda olguda nadir kombinasyonlar bulunmuştur ve bunların spontan mutasyonlara bağlı olabileceği düşünülmüştür. Ancak aynı partikül üzerinde birden fazla subtip bulunması üzerine, bunlardan mikst enfeksiyonların sorumlu olabileceği üzerinde durulmuştur.

HBsAg subtipleri coğrafi dağılım farklılığı göstermektedirler. Bu nedenle subtip determinantları bireyler arasında virüsün yayılımını izlemede viral göstergeler olarak kullanılabilir. Ayrıca HBsAg subtipleri HBV'nün hem horizontal hem de vertikal geçiş yolunu izlemede yardımcı olmaktadır [5].

**2.7.2 Kor Proteinleri:** C geni ve pre-C ve C olmak üzere iki bölgeye sahiptir. Bu bölgelerden antijenik özellikleri farklı 2 değişik protein (HBeAg ve HBcAg) sentezlenmektedir. Pre-kor proteininin başlangıç kodonundan başlanarak 212 aminoasitten oluşmakta ve 25kd ağırlığında bir polipeptid sentezlenmektedir. Bu polipeptid N terminal ucundaki 29 aminoasitlik ek parça dışında HBcAg sekansı ile tamamen benzemektedir. Bu ek parça pre-C polipeptidini endoplazmik retikuluma yönlendirmektedir. Burada C terminalindeki 34 aminoasit yıkılmakta, geri kalan protein ya golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak salınmakta ya da nükleusa yönlendirilmektedir [86]. HBeAg ile HBcAg ortak determinantlar içermektedir. Kanda dolaşan HBeAg spesifik olarak serum albumini, immünglobülin ve alfa antitripsine bağlanma özelliğine sahip olduğundan yapısındaki HBcAg ile ilgili determinantlar maskelenmekte ve anti HBc ile reaksiyona girmemektedir. P23<sup>c</sup> (C bölgesinin sentezlediği 183 aminoasitlik protein) kor partikülünde toplandığı zaman HBeAg determinantları maskelenmektedir. HBcAg viral DNA'ya sıkıca bağlı bir molekül olduğundan, bu molekülün anti HBc ile reaksiyona girebilmesi, kor partiküllerinin parçalanması ve serbest polipeptid zincirlerinin açığa çıkması ile mümkün olmaktadır.

HBe proteini HBV için yapısal bir protein değildir. Gerek insanlarda gerekse hayvanlarda viral replikasyon için HBe proteininin gerekli olmadığı gösterilmiştir. Ayrıca HBe proteininin virüsün hayat siklusundaki biyolojik rolü henüz bilinmemektedir [96,97].

Yüksek düzeyde viremik HBsAg taşıyıcılarının serumları üzerinde yürütülen çalışmalarda, bunların bol miktarda HBeAg içerdiği saptanmış, replikasyonda rol oynayan preC/C geni tarafından sentez edilmesi nedeniyle HBeAg'nin aktif HBV replikasyonunu belirleyen uygun bir gösterge olabileceği düşünülmüştür. Ancak HBV-DNA testlerinin yaygın olarak kullanılmaya başlanması ve anti HBe ile birlikte HBV-DNA pozitifliğini de gösteren kronik hepatitli hastalarda bir HBV mutantının tanımlanmasından sonra gerek HBeAg, gerekse AntiHBe'nin vireminin saptanmasında çok güvenilir parametreler olmadığı anlaşılmıştır [98].

C geninin 2. bölgesi tarafından sentezlenen polipeptidin ( P23<sup>c</sup>) ön kısmı 29 aminoasitlik ek sekanstan yoksun olup endoplazmik retikuluma giderek işlenmemektedir. Konak hücre sitoplazmasında kalmakta ve değişime uğrayarak

HBcAg haline gelmektedir. HBcAg karboksiterminal ucundaki 34 aminoasitlik kısım sayesinde viral DNA'ya sıkıca bağlanmaktadır. Yüksek derecede saflaştırılmış viriyon korlarında ve HBV ile enfekte hasta hepatositlerinde gösterilebilen HBcAg sıklıkla intranükleer yerleşimlidir. Ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı viral replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada da saptanabilmektedir. Hasta serumları defalarca dondurulup, çözülür veya lipit eriticilerle işleme tutulursa viriyonlar parçalanmakta ve HBcAg serbestleşmektedir. Doğal enfeksiyon sırasında, timustan bağımsız antijen olan HBcAg'ne karşı antikor gelişmesi, bu antijenin kısa bir sürede olsa serumda bulunduğunu düşündürmektedir [99]. Ancak kısa sürede anti HBc oluşmakta, antijenik kompleks oluşmakta ve antijen serumda tespit edilememektedir [77,91].

HBeAg ve HBcAg oldukça immünojendir. Hatta HBcAg'nin immünojenitesi HBsAg'nkinden daha fazladır. HBV ile enfekte hastaların hemen hemen tamamında gerek HBeAg'ne gerekse HBcAg'ne karşı hem hücresel hem de humoral immün cevap gelişmektedir. Her iki antijenin de T ve B lenfositleri tanıyan epitoplari vardır [40,76,86]. Bununla birlikte üzerinde pek çok epitop bulunan HBV nükleokapsid proteini, kronik hepatit B enfeksiyonunda konak immün cevabında major hedefdir.

HBcAg'ne özgül T hücreleri; HBsAg'ne karşı humoral cevabı başlatabilmekte veya bu cevaba yardımcı olabilmektedir. Böylece genetik kaynaklı S epitop cevapsızlığının üstesinden gelmeye yardım etmektedir. Bu nedenle S antijen aşilarına HBcAg eklemesinin insanlarda bu aşiların etkinliğini artırabileceği ve S antijenine yanıtısızlığın söz konusu olduğu durumda antikor yanıtı geliştirebileceği üzerinde durulmaktadır. Ancak antiHBc antikorları enfeksiyona karşı koruyucu değildir [100].

**2.7.3 P Proteini:** Polimeraz proteini HBV'nün en büyük proteindir ve 834-845 proteinden oluşmaktadır. Tüm genomun dörtte üçünü kodlayan gen tarafından kodlanılmaktadır. P proteininin immünojen özelliği vardır. Bu proteinin ağırlığı 92 kd olup dört bölge içeren bir proteindir [77];

a) Aminoterminal bölge, negatif DNA zinciri sentezinde primer olarak görev almaktadır.

b) Spacer bölge, enzim aktivitesi üzerine etkisi olmayan bölgedir.

c) DNA polimeraz ve Revers transkriptaz aktivitesi olan bölgedir.

d) RNaz H bölgesi, RNA'nın parçalanmasında görev alan bölgedir.

**2.7.4 X Proteini:** HBV'nün en küçük proteini olan HBx, 154 aminoasit taşımaktadır ve 16kd ağırlığındadır. Bu protein sadece Orthohepadnaviridae HB virüslerinde bulunmaktadır. Diğer türlerin HBV'lerinde bulunmaması, bu proteininin genom replikasyon ve viriyon olgunlaşmasında rol almadığını düşündürmektedir. Yani mutlak gerekli bir protein değildir. Bununla birlikte transkripsiyonu aktive etme özelliği de vardır. HBx proteininin tümör supressör gen ürünü (p53)'nün işlevini bozarak hepatosellüler kansere neden olduğu düşünülmektedir. Ayrıca HBx proteininin hepatosellüler kanserin erken tanısında marker olarak kullanılabileceği belirtilmiştir [33,77,101].

## 2.8 HEPATİT B VİRÜSÜ MUTASYONLARI

Hepatiti B virüsü (HBV), dünyada 350 milyonu aşkın kişiyi enfekte etmesi, karaciğer sirozu ve karaciğer kanserine yol açabilmesi nedeniyle çok ciddi bir sağlık sorunudur. HBV'nün hangi mekanizmayla karaciğerde hasar yaptığı bilinmemektedir. Virüsün sitopatik olmadığı, enfekte hepatositlere karşı gelişen immün yanıtın karaciğer hasarından sorumlu olduğu düşünülmektedir. Bu durumda konakçının immün cevabının etkinliğinin yanısıra virüsün antijenik yapısındaki, antijen ekspresyonu ve replikasyon kapasitesindeki değişiklikler de karaciğer hasarının farklı görünümüne neden olabilmektedir. Virüse ait bu faktörler doğal olarak virüsün genomik yapısındaki değişikliklerle yakından ilişkilidir. Bu nedenle HBV infeksiyonlarının akut kendi kendini sınırlayan hepatitten, asemptomatik taşıyıcılığa, fulminan hepatite, kronik hepatit ve karaciğer kanserine kadar değişen farklı klinik görünümünden virüsün genomik değişikliklerinin sorumlu olup olmadığı hep merak edilmiştir. Moleküler biyolojik yöntemlerin gelişmesi virüsün genomundaki değişikliklerin daha kolay ve daha geniş incelenmesini sağlamıştır.

HBV genomik yapısı çok özel olup genetik elemanlar arasında büyük oranda overlap (üst üste binmeler) vardır. Ancak okuma alanları birbirinden farklı olduğu için farklı aminoasit dizilerinin sentezini sağlarlar. Virüse ait genetik düzenleyiciler de bahsedilen genetik elemanların üzerinde bulunmaktadır. Bu nedenlerle bir genetik elemanda meydana gelen mutasyon birden fazla bölgede değişikliğe neden

olmaktadırlar. Bir okuma alanı için avantaj teşkil edebilen bir mutasyon diğeri için fatal olabilmektedir. Bu özellik nedeniyle aslında diğeri RNA virüsleri gibi yüksek oranda mutasyon sıklığına sahip olan HBV, doğal olarak çok az mutasyon geliştirmektedir.

Mutasyonların doğal olarak bulunmaları meydana gelme hızlarına ve virüse sağladığı avantaja bağlıdır. HBV reverz transkriptaz'ı da diğeri virüslerde olduğu gibi proof reading (yanlışları düzeltme) fonksiyonuna sahip değildir. Yani replikasyon sırasında yanlış giren nükleotidlerin düzeltilmesi mümkün olmamaktadır. Bunun için yüksek oranda mutasyon gelişme ihtimali vardır. Ancak yukarıda söz edilen nedenden dolayı ancak yılda baz başına  $2 \times 10^{-4}$  değişiklik söz konusu olmaktadır. Bu oran retroviruslardan 10-100 misli daha azdır [102].

### **2.8.1. Precore-core bölgesi mutasyonları:**

HBV'nün ilk tespit edilen ve üzerinde en çok durulan mutasyonları bu bölgede yerleşen mutasyonlardır.

Kronik B hepatitinin aktif dönemlerinde virüs replikasyonunun devam ettiği bilinmektedir. Serumda HBV-DNA'sının tesbiti ve HBeAg varlığı HBV'nün replike olduğunu gösteren parametrelerdir. Bu nedenle kronik aktif karaciğer hastalığı olan HBV enfeksiyonlarında HBV-DNA ve HBeAg pozitif olarak saptanmaktadır. Bazı karaciğer hastalarında, karaciğerde aktif nekroinflamatuvar süreç ve serumda HBV-DNA pozitifliğine rağmen HBeAg'nin negatif olduğu saptanmıştır. Bu hastaların serumlarından izole edilen HBV-DNA'sının incelenmesinde HBeAg'inin kodlandığı precore bölgesinde 28inci kodonda TGG kodonunun TAG dönüşümü gösterdiği yani triptofan kodonu yerine stop kodon meydana geldiği tespit edilmiştir.

Core geninin bir stop kodonu olduğu halde iki başlatma kodonu vardır. Translasyon ikinci başlatma kodonundan başladığında ortaya çıkan polipeptid, core proteini denilen ve nükleokapsidi oluşturan proteindir. Eğer translasyon birinci başlama kodonundan başlarsa meydana gelen polipeptid hücre içinde bazı süreçlerden geçip karboksil ve amino bölgelerinden kırılmalar göstererek sonuçta HBeAg'ni oluşturmaktadır. Yukarıda bahsedilen precore bölgesindeki 28inci kodon ikinci başlama kodonundan iki önceki kodon olduğu için HBeAg translasyonu



durdurulduğu halde virüsün en önemli yapısal proteinlerinden olan core proteini (HBcAg) sentezi eksiksiz gerçekleşmektedir.

HBeAg sentezi olmadığı halde virüs canlılığını, patojenitesini ve büyük ihtimalle enfektivitesini kaybetmemektedir. Bu durumda HBeAg'nin virüs için fonksiyonunun ne olduğu sorgulanmakta, ancak kesin bir cevap verilememektedir. Büyük ihtimalle virüse karşı oluşan immün toleransta, dolayısıyla enfeksiyonun devamlılığında HBeAg'nin rolü olduğu düşünülmektedir. HBeAg'nin bebeklikte transplasental geçişten dolayı immün tolerans yapacağı düşünülmüş, erişkinlerde Th hücrelerinde apoptozisi indüklediği gösterilmiştir. Enfeksiyonun erken evrelerinde gerekli olduğu halde ileri evrelerde önemini kaybettiği düşünülmektedir [102].

Precore stop kodon mutasyonu ilk önce ağır karaciğer hastalığı olanlarda ve fulminan hepatitli hastalarda tespit edildiği için araştırmacılar fulminan B hepatitinin etken ve etiolojisini bulduklarını düşünmüşlerdir [103]. HBeAg immün tolerojen olarak düşünüldüğü için, bu proteinin kaybının agresif bir immün saldırıya ve dolayısıyla fulminan veya ağır seyirli bir karaciğer hastalığına neden olduğu iddia edilmiştir. Ancak hemen arkasından yapılan geniş araştırmalar stop kodon mutantının asemptomatik taşıyıcılarda da tespit edildiğini göstermiştir [104]. Amerika Birleşik Devletleri'nden yapılan yayınlarda fulminan B hepatitli hastalarda precore stop kodon mutantlarının seyrek olarak bulunduğu bildirilmiştir [105,106]. Bu durumda hastalığın klinik görünümü ile precore mutantının ilişkili olduğu görüşü tehlikeye girmiştir. Çeşitli araştırmalar bu mutasyonun hastalığın immün temizlenme dönemlerinde seçildiğini ve muhtemelen bu nedenle aktif hastalığı olanlarda daha fazla tesbit edildiğini göstermiştir [107]. "Precore stop kodon mutasyonu ağır klinik tablonun sebebi değil sonucudur." görüşü ağırlık kazanmıştır. Hatta mutantlarla enfekte hastalarda akut alevlenmeler geliştiğinde, yükselen HBV-DNA titresinden çoğunlukla wild tip sorumlu tutulmuştur [108]. HBeAg hepatositlerin yüzeyinde sitotoksik T hücrelerinin cevap geliştirdiği en önemli antijenik yapılardandır. Bu antijenin olmaması virüsün immün sistemden kaçmasına ve enfeksiyonun devamlılığına neden olmaktadır. Wild tip virüse karşı gelişen immün saldırı, wild tipin temizlenip HBeAg (-) suşun (precore stop kodon mutantının) seçilmesini sağlamaktadır. Bunun için aktif inflamasyon ve nekrozun olduğu dönemlerde mutant virüsler artmaktadır. Fulminan hepatitlerde de büyük oranda mutantların saptanması

da çok süratle wild tipin temizlenmesi ile izah edilmiştir [109]. Bunlara rağmen, bugün için henüz hastalığın kliniği ile HBeAg (-) mutantların ilişkisi tam olarak anlaşılamamıştır. Muhtemelen HBeAg'inin immün hedef antijen olma özelliği ile immün tolerojen olma özelliği arasındaki denge hastalığın aktivitesini belirlemektedir. Hastalığın erken evrelerinde tamamen HBeAg (+) suşların varlığında immün toleranstan dolayı genellikle hastalık aktivitesi az ve transaminaz düzeyleri düşük olmaktadır. Halbuki wild tipin temizlendiği ve HBeAg (-) mutantların hakim olduğu dönemde HBeAg (+) virüslerdeki replikasyon artışları dönemlerinde, zeminde immün tolerojen bu maddenin bulunmaması, fakat HBeAg'inin hepatositlerin yüzeyinde eksprese olması yeni bir immün saldırıya, dolayısı ile alevlenmelere neden olmaktadır. Bu saldırının arkasından HBeAg (-) virüsler var olmaya devam etmektedirler. Tamamıyla HBeAg (-) virüslerin tüm populasyona hakim olduğunda gene hastalık genellikle inaktif veya hafif transaminaz yüksekliği ile seyretmeye devam etmektedir [110].

Mutantların hastalığın tedavi cevabıyla ilişkisi de çeşitli araştırmalara konu olmuştur. İlk araştırmalar mutantların interferona cevabının daha kötü olduğunu telkin etmiştir [111]. Ancak sonraki araştırmaların vardığı ortak sonuç, tedavi sonu cevap açısından mutantlarla wild tip enfeksiyonları arasında fark olmadığı yönündedir. Fakat mutant virüs enfeksiyonlarında nüks oranı çok daha yüksek bulunmaktadır. Bunlara karşın hem ülkemizde, hem Uzak Doğu'da mutant virüs enfeksiyonlarında kalıcı cevap oranının yüksek olduğuna dair yayınlar vardır. Bu yayınlarda mutant virüsle olan enfeksiyonlarda tedavi sonu cevabın wild tiple olan enfeksiyonlardan çok daha iyi olduğu vurgulanmaktadır [112]. Nüks oranı yüksek bile olsa kalıcı cevap daha iyi olmaktadır. Bütün bu veriler bir araya toplandığında muhtemelen virüsün stop kodon mutasyonuna sahip olup olmamasından çok araya giren diğer faktörler (confounding factors) hastalığın kliniği ve tedavi cevabı üzerinde etkili gibi görünmektedir. Örneğin stop kodon mutantları hastalığın seyri esnasında seçilmeleri nedeniyle daha ileri yaşlarda ve daha uzun sürmüş enfeksiyonlarda tespit edilmektedir. Bunlar hastalığın prognozu ve tedavi cevabı açısından olumsuz faktörlerdir. Bunun yanında HBeAg (-) hastaların HBV-DNA titresinin düşük olması ise tedavi cevabı açısından olumlu prediktif bir faktördür. Bütün bu faktörler muhtemelen mutant virüs enfeksiyonları ile klinik ve tedavi cevabı arasındaki ilişkilerde rol oynayan, belki de belirleyici olan değişkenlerdir.

Precore stop kodon mutantlarıyla enfekte sirozlu hastalarda karaciğer transplantasyonu sonrası B hepatiti rekürrensi ve buna bağlı graft kaybı wild tipte enfekte olanlara göre daha fazla görülmektedir [112,113]. Transplante karaciğerde görülen komplikasyonlardan biri olan fibrosing cholestatic hepatitis gelişimi, hatta bu histolojik bulgunun renal transplant alıcılarında görülmesi ile precore mutantlar arasında ilişkiler rapor edilmiştir [114].

Kronik B hepatiti seyri esnasında görülen ekstrahepatik belirtiler, örneğin cryoglobulinemia gibi, ile precore mutantları arasında ilişki olduğu da bildirilmiştir [115].

İlk tespit edildikleri zamandan itibaren, precore stop kodon mutasyonlarının Akdeniz çevresi ülkelerde ve Uzak Doğu'da daha fazla rastlandıkları dikkati çekmiştir. Bunun nedeni HBV'nun genotiplerinin farklı coğrafi dağılımıdır. Precore stop kodon mutasyonu ancak virüs genomunun 1858inci nükleotidinde thymine bulunan genotiplerde (genotip C ve D) meydana gelebilmektedir. Halbuki aynı numaralı nükleotidde cytosine bulunduran genotip A'da C1858T mutasyonu olmadıkça hiçbir zaman stop kodon mutasyonu meydana gelmemektedir [11,116]. Bunun nedeni precore bölgesinde yerleşen ve regülatör bir bölge olan epsilon encapsidation sinyal dizisinin ikincil yapısıdır. Epsilon encapsidation sinyal dizisinin ikincil yapısı çeşitli baz eşleşmeleri ile stabil hale gelmektedir. Bu ikincil yapıda 1858 ve 1896 numaralı nükleotidler karşılıklı gelmektedirler. Genotip A'da eğer stop kodon mutasyonu meydana gelirse C1858 ile G1896 arasındaki mevcut baz eşleşmesinin kırılması gerekmektedir. Bu da ikincil yapının stabilitesini bozar ve virüs için avantaj kaybına neden olur. Halbuki 1858'de T bulunduran genotip C ve D'de G1896A mutasyonu iki nükleotid arasındaki baz eşleşmesini sağlayıp yapıyı daha stabil hale getirmektedir [114]. Belki de virüsün replikasyon kabiliyeti artmaktadır. Bu moleküler yapısal özellik dünyanın bazı bölgelerinde stop kodon mutantlarının daha sık görülmesini açıklamaktadır. Ülkemizde kronik B hepatitli replikatif hastaların %60-70'inde HBeAg negatiftir, yani büyük oranda mutant virüs enfeksiyonu vardır. İsveç'ten yapılan bir yayında HBeAg (-) olduğu halde stop kodon mutasyonu bulundurmayan virüslerle olan enfeksiyonların, stop kodon mutasyonu bulunduranlardan daha ağır seyrettiği iddia edilmiştir [115]. Belki de antiHBe (+)

enfeksiyonların daha ağır seyrettiğine dair Batı ülkelerinden yapılan ilk yayınlarda bu gerçeğin de katkısı olmuş olabilir.

Son yıllarda kronik B hepatiti tedavisine nükleozid analoglarının, özellikle lamivudin'in girmesiyle mutant virüslerin lamivudin tedavisine cevaplarının farklı olup olmadığı incelenmiştir [116]. Tassopoulos'un çalışmasında lamivudin ile tedavi edilen 60 HBeAg (-) hastanın %63'ünde 24 haftada tam cevap elde edilmiştir. Bir yılda hastaların %60'ında Knodell skoruna göre en az 2 puan histolojik iyileşme sağlanmıştır. Bu çalışmada, mukayese edilen HBeAg (+) grup olmamasına rağmen, elde edilen sonuçlar diğer çalışmalardaki sonuçlara benzer görünmektedir. Yani, HBeAg (-) hastaların lamivudine cevabı HBeAg (+)'lerle aynıdır.

Sonuç olarak HBeAg (-) precore mutantlarının klinik açıdan asemptomatik taşıyıcılıktan fulminan hepatite kadar farklı klinik tablolarda enfeksiyonlarla birlikte olduğu görülmektedir. Siroza ilerleme ve kanser gelişimi açısından da HBeAg (-) ve HBeAg (+) enfeksiyonlar arasında fark görünmemektedir. HBeAg (-) hastaların interferon tedavisi sonrası daha yüksek oranda nüks oldukları anlaşılmaktadır. Kısa süreli takiplere göre lamivudin tedavisine cevap açısından da HBeAg (-) ve HBeAg (+) hastalar arasında fark yoktur.

### **2.8.2 Precore bölgesindeki diğer mutasyonlar:**

Precore bölgesinde 1896ncı nükleotiddeki G®A değişimi dışında da bazı mutasyonlar rapor edilmiştir. Bunlardan en sık rastlanana 1899uncu nükleotiddeki G®A değişimidir. Bu mutasyon sıklıkla 1896 mutasyonu ile birlikte görünmektedir. İki mutasyonun bir arada bulunmasının hastalığın kliniğini ağırlaştırdığı iddia edilmişse de bu veri başka araştırmalarla desteklenmemiştir [117]. Precore bölgesinde başlama kodonunda veya diğer kodonlarda çeşitli ender mutasyonlar görülmüş olmasına karşın bunların bilinen bir klinik önemi yoktur [118].

### **2.8.3 Core bölgesi mutasyonları:**

Core geni, 183 kodondan müteşekkil olup HBcAg'nin sentezinden sorumlu bölgedir. İmmün sistem için en önemli hedef antijenlerden biridir. Bu nedenle hastalığın aktivitesi ve tedavi cevabında bu antijene ait değişikliklerin önemli olabileceği belirtilmiştir. Nitekim yapılan bazı çalışmalarda core geninde mutasyon sayısı fazla

olanlarda tedavi cevabı daha kötü bulunmuştur [119]. Sonraki daha geniş kapsamlı çalışmalar bu mutasyonların hastalığın prognozu veya tedavi cevabıyla ilişkisinin olmadığını ortaya koymuştur [120]. Core geni mutasyonları HBeAg serokonversiyonu döneminde ve sonrasında daha fazla tesbit edilmektedir [121, 122]. Muhtemelen immün klerens esnasında seçilmektedirler. Core geni mutasyonlarının ağır veya fulminan seyirli karaciğer hastalıkları ile korale olması da muhtemelen immün seçilme ile ilişkilidir. Nitekim immün tolerans fazında kalan hastalarda enfeksiyon süresi uzun olsa da core geni mutantlarının hemen hemen saptanmadığı görülmektedir. Bu mutasyonların CD4 (+) ve sitotoksik T hücrelerinin tanıdığı epitoplarda yerleşmeleri de bu hipotezi desteklemektedir. Doğrudan dizi analizi yerine, klonlama yöntemi ile yapılan çalışmalar hastalığın seyrinin erken dönemlerinde az oranda bulunan mutantların ileri dönemlerde, özellikle akut alevlenmeleri takiben oransal olarak arttığını göstermektedir [123].

Core geninde delesyona sahip olan virüsler defektif virüsler olup mutlaka wild tipin varlığına ve yardımına ihtiyaç göstermektedirler. Genellikle HBeAg/AntiHBe serokonversiyonundan sonra ortamdan uzaklaştırıldıkları görülmüştür. Delesyona sahip mutantların tedavi cevabıyla da ilişkisi bulunmamıştır [124].

Nadir görülen atipik serolojilerden olan anti-HBc negatif kronik B hepatitlerinden core genindeki mutasyonların sorumlu olup olamayacağı araştırılmış ancak bu tür hastalarda core proteininin immün epitoplarında önemli değişikliklere neden olacak mutasyonlara rastlanmamıştır [125].

Sonuç olarak core geninde belirgin ve hep aynı özellikte tanımlanmış bir mutasyon yoktur. Daha çok hastalığın seyri ilerledikçe ve alevlenmeler geliştikçe sayıca artan mutasyonlardan bahsedilmektedir. Mutasyonların B hücresi, CD4 (+) T hücreleri ve sitotoksik T hücrelerinin tanıdığı epitoplarda yoğunlaşmaları bu mutasyonların immün sistemin tanımasından kaçmayı sağladığı (escape mutants) ve bu nedenle immün ataklar sonrasında seçildiklerini düşündürmektedir. Mutasyonların hastalığın kliniği veya tedavi cevabı ile doğrudan bir ilişkisi yoktur. Belli bir mutasyonun olmaması ve hastalığın seyriyle ilişkileri olmaması nedeniyle core geni mutasyonlarının saptanmasının pratik bir önemi yoktur [102].

#### 2.8.4 Yüzey geni mutasyonları:

Zarf proteinleri humoral ve hücresele immün cevap için hedef teşkil eden antijenler içerirler. Anti-HBs cevabı nötralizan bir aktiviteye sahiptir. Bu nedenle zarf proteinleri HBV profilaksisinde kullanılmaktadırlar.

Bazı zarf mutantları yüzyıllar boyunca HLA baskısıyla seçilerek HBV'nün farklı fenotiplerini meydana getirmektedirler. 122 ve 160. aminoasitlerde lizin veya arjinin bulunmasına göre d/y veya w/r subtipleri ayırt edilmektedir.

Son yıllarda bunların dışında da yüzey (zarf) proteinlerinde mutasyonlar tanımlanmaktadır. Özellikle aşılammış çocuklarda HBsAg pozitifliğinin saptanması üzerine yapılan araştırmalarda HBsAg a determinantında öncelikle 145. aminoasitte glisin@arjinin yer değiştirilmesi saptanmıştır. Yani aşının geliştirdiği anti-HBs antikorunun tanınmasından kaçan bir mutasyon söz konusudur [102]. Yüzey geni mutasyonlarının klinik açıdan önemleri şunlar olabilir.

1. Aşılammış kişilerde HBV enfeksiyonu meydana gelebilmesi: İlk olarak İtalya'da HBV profilaksisi yapılmış 44 bebekte HBV enfeksiyonu görülmesi ve bunlardan birinin kliniğinin ağır seyretmesi üzerine yapılan araştırmada bu bebekte HBsAg a determinantında 145. aminoasitte glisin@arjinin değişimi görülmüştür. Bu mutantın anti-HBs ile de bağlanmadığı anlaşılmıştır [126]. Bu ve benzeri veriler toplandıkça ve özellikle mutant virüslerin enfeksiyöz ve patojenik olduğu anlaşıldıkça yakın gelecekte yaygın HBV aşılamasından sonra mutant virüslerin sorun teşkil etmesinden korkulmuştur. Bu nedenle aşılara preS1, preS2 antijenlerinin de ilave edilmesi gerektiğini savunanlar olmuştur. Yada mutant antijenlerin gelecekteki aşılara eklenmesi tartışılmıştır. Ancak günümüzde çok geniş aşılamalara rağmen toplumsal sorun teşkil edecek mutant virüs enfeksiyonlarıyla karşılaşılmamıştır. Yalnız HBsAg bulunduran aşılarda, preS1 ve/veya preS2 bulunduran aşılarda koruyuculukları arasında da fark saptanmamaktadır [102,127].
2. HB immün globülini ile korunan karaciğer transplant alıcılarında HBV enfeksiyonu reaktivasyonu: Karaciğer transplantasyonu sonrası HBIG almasına rağmen HBV rekürrensi görülenlerde, aynı immünosupresif rejimi alan fakat HBIG almayan HBV ile enfekte renal transplant alıcılarına göre

çok daha fazla HBsAg a determinanı mutasyonu görülmektedir. Muhtemelen koruyucu antikorların tamamının bağlanabildiği bölge olan a determinanı üzerinde immün bir baskı ve bu baskıdan kaçış söz konusudur. HBIG profilaksisinde B hepatiti rekürrensi görülenlerde meydana gelen mutantların HBIG ile zayıf bir bağlanma gösterdiği de saptanmıştır. Mutant suşlarla olan enfeksiyonlarda graft yaşam süresinin azaldığı da görülmüştür [128].

3. HBsAg tayini için kullanılan ELISA kitlerinin tanıyamayacağı antijenik yapıların teşekkülü ve atipik serolojik profiller: Hiçbir serolojik göstergesi pozitif olmayan kronik HBV enfeksiyonlu bir hastada yapılan HBV dizi analizi çalışmasında 22 farklı nükleotid değişikliği görülmüştür. Bunların bir kısmı S geninde toplanmıştır. Ökaryotik hücrelerde bu virüse ait preS ve S genlerinin ekspresyonunda normal antijeniteye sahip ve anti-preS ve anti-HBs ile tanınabilen proteinlerin sentezlendiği tespit edilmiştir. Yani, atipik serolojiden S geni mutasyonları sorumlu bulunmamıştır. Buna karşın HBsAg (-) HBV enfeksiyonlu bir hastada 5 çeşit ELISA kitinden yalnızca birinde HBsAg saptanabilmiştir. Bu hastada kodon 129'da Q (Gln) ® R (Arg) ve kodon 133'te M (Met) ® T (Thr) değişiklikleri saptanmıştır. Yüzey geni mutantlarının atipik serolojiden sorumlu olabileceğini, ancak her atipik serolojiden mutantların sorumlu olmadığını söylemek mümkündür. Muhtemelen virüs replikasyonundaki, konakçının spesifik immün yanıtındaki değişiklikler de atipik serolojiye neden olabilmektedir. Bugün için yüzey genindeki mutasyonların ELISA kitleriyle tanınma sorununun ne ölçüde pratik bir sorun yaratacağı bilinmemektedir. Tek tek vaka raporlarına bakarak HBsAg dışındaki serolojik göstergelerin de kan donörlerinde bakılmasını gerektirecek bir durum yoktur [129].
4. Hastalığın kliniğinde farklılıklar, örneğin fulminan seyir gibi: Pollicino ve arkadaşları her ikisi de fulminan B hepatiti gelişen anne ve oğul iki hastada izole ettikleri HBV-DNA'nın tam genomik olarak dizi analizini yapmışlardır. Genomik yapı itibarıyla aynı yapıda olan bu izolatlarda precore sekansının wild tip olmasına karşılık, preS2 başlama kodonundaki iki nükleotid insertiyon'u görülmüştür. PreS2 sentezinin olmadığı bu viral suşların fulminan seyirden sorumlu olabileceği düşünülmüştür. Aynı araştırmacılar daha

sonra farklı klinik görünümdeki hastalarda HBV genomunun analizini yapmışlar ve 5 fulminan hepatitli hastanın üçünde aynı mutasyonları saptamışlardır. Her hastada hastalığın başlangıcında wild tip precore dizi hakimiyeti varken daha sonra precore mutantlarda artış görülmüştür. Bu durumda precore mutantların fulminan seyrin sebebi değil sonucu olduğu görüşü desteklenirken, preS2 ekspresyonunun olmamasına neden olan mutasyonların fulminan seyirden sorumlu olabileceği kanaatine varılmıştır. Başka araştırmacılar neonatal fulminan hepatitli bir bebek ve annesinde benzeri preS2 başlama kodonu mutanı (precore'a ilaveten) saptamışlardır [130,131].

Sonuç olarak yüzey geni mutantlarının aşının ve HBIG'in korumasından kaçabilen, HBsAg negatif HBV enfeksiyonlarına yol açabilen, fulminan seyirle ilişkisi olabilen virüsler meydana getirebildiği gösterilmiş olmasına rağmen halen günlük pratikte önemleri olduğu kuşkuludur [102].

#### **2.8.5 Polimeraz geni mutasyonları:**

Polimeraz geni HBV'nün en büyük geni olup diğer 3 genle de overlap'lar yapmaktadır. Bu nedenle gen üzerindeki değişiklik hemen hemen daima diğer genlerde de değişikliğe neden olmaktadır. Bunun için doğal olarak polimeraz mutasyonlarına çok az rastlanır. Geçmiş yıllarda polimeraz geninde bazı delesyonlar tanımlanmışsa da önemleri anlaşılmamıştır. Bugün için polimeraz geni mutasyonları dendiğinde akla nükleozid analoglarına karşı direnç sağlayan mutasyonlar gelmektedir.

Polimeraz geni içinde A'dan E'ye 5 bölge ayırt edilmektedir. Bunlar diğer RNA'ya bağımlı polimerazlarda da mevcuttur. Her bir bölge nükleotidlerin veya şablon RNA'nın bağlandığı alanlar veya katalitik alanlar olabilir. Nükleozid analoglarının viral enfeksiyonlarda yaygın kullanılmasıyla bu alanlardaki mutasyonlar daha fazla dikkati çekmektedir [132]. Bu mutasyonların fonksiyonel önemi çoğunlukla bilinmemektedir ve in vitro çalışmalarla ilaç direncinin çalışılması gerekmektedir. Enzimin katalitik bölgesinde yer alan C bölgesinde yer alan YMDD motifindeki mutasyonların lamivudine direnciyle ilişkili olduğu anlaşılmıştır. Tirozin, metionin, aspartat, aspartat dizisinden meydana gelen bu motifte ikinci aminoasit olan metioninin izolösin veya valine dönüşmesi lamivudine'e karşı direnç oluşumuna



neden olur. Bu mutasyonlar grup1 (M550V + L526M), grup 2 (M550I) ve grup 3 (M550I + L526M) olarak incelenmektedir [133]. Bunlardan en sık rastlanana (%80) grup 1 mutasyonlar olup L526M mutasyonunun famciclovir'e direnç teşekkülünden sorumlu olması dolayısıyla famciclovire çapraz dirence neden olur. YMDD mutasyonlarının tedavinin birinci yılında %14-32, ikinci yılında %40 oranında görüldüğü bilinmektedir. Tedavi süresi ilerledikçe dirençli mutantların görülme oranı da artmaktadır. Bu mutantların lamivudine 200-10000 kat daha dirençli olduğu in vitro çalışmalarda gösterilmiştir. Ayrıca lamivudine dirençli mutantların replikasyon kapasitesi de wild tipe nazaran yaklaşık 200 misli daha azdır. Mutant virüslerin patojenitesinin wild tipten az olup olmadığı veya bu virüslerin interferon tedavisine cevapları konusunda henüz bilgi yoktur [134].

#### **2.8.6 X geni mutantları:**

HBV X proteininin fonksiyonunun ne olduğu tam olarak bilinmemektedir. Diğer bir hepadnavirüs olan ördek hepatit virüs'te X geni bulunmamaktadır. Bugün için en yaygın inanış X proteininin virüse ve konakçıya ait diğer genlerin transkripsiyonunu etkileyebildiği yönündedir. DNA'ya bağlanma özelliği olmadığı için de bu etkisini muhtemelen diğer proteinlerle etkileşerek veya bazı sinyal iletim sistemleri ile etkileşerek yapmaktadır. HBV serolojik göstergeleri negatif olan bazı diyaliz hastaların serumlarında HBV DNA polimerazın bulunması sonucunda yapılan araştırmalarda X geninde delesyonlarla giden bazı mutasyonlara rastlanmıştır. X proteinin viral replikasyonda rolü olabileceğini gösteren deliller vardır. Bu nedenle bu gendeki mutasyonların virüsün replikasyonunda ve diğer bazı genlerin ekspresyonunda değişiklikler yapması ve atipik serolojilere neden olması beklenebilir. Mesela HBsAg (-) bazı HBV enfeksiyonlarında X geni delesyonlarının bulunması atipik serolojilerle X geni mutasyonları arasında ilişki kurulmasına neden olmuştur [135]. Ayrıca X geninin polimeraz ve precore genleri ile overlap yapması, HBV enhancer II'nin ve precore ve core promotorlarının X geni içerisinde yer almaları X geni bölgesindeki mutasyonların çok yönlü etkileri olabileceğini düşündürmektedir. Örneğin core promoter bölgesi mutasyonları geniş olarak ele alınmış mutasyonlardandır. HBeAg (-) bütün hastalarda precore stop kodon mutasyonunun olmaması üzerine yapılan açıklamalardan biri de bu hastalarda HBeAg ekspresyonunun azalmasına yol açan core promoter mutasyonlarıdır. Core

promoter bölgesindeki AT tekrarlamalarınca zengin bölgede yer alan iki mutasyon üzerinde durulmuştur (A1762T ve G1764A). Bu mutasyona sahip virüslerde HBeAg ekspresyonu azalırken HBcAg ekspresyonunda artma olduğu bildirilmiştir. Bu iki mutasyonun fulminan hepatitle ilişkili olduğu iddia edilmişse de sonraki çalışmalar bu iddiayı doğrulamamıştır. Bu iki mutasyonun interferon tedavisine cevapla da bir ilişkisi bulunmamıştır [136,137].

X geni ürününün hepatokarsinogeneziste rolü olduğu kabul edilmektedir. Bazı karaciğer kanseri hücrelerinde X geni delesyonlu HBV mutantları tespit edilmiştir. Bunlar genellikle 128-132 kodonlar civarında çerçeve kaymasına neden olan ve 20 aminoasit kısa X proteinlerinin meydana gelmesine sebep olan mutasyonlardır. HBx proteinin apoptozisi p53'ten bağımsız bir yolla indüklediği ve hücrelerin klonal aşırı çoğalmasını azalttığı gösterilmiştir [138,139]. Ayrıca HBe ekspresyonunun hücre siklusunun geç G1 fazını bloke edip apoptozise gidiş öncesinde de hücre bölünmesini durdurduğu gösterilmiştir. HBV X geni mutantlarının HBx'in apoptozisi indükleyici ve G1 durdurumunun yapıcı tesirini ortadan kaldırdığı, bu şekilde hepatosellüler kanser gelişmesinin kolaylaştığı iddia edilmektedir.

HBX mutasyonlarının hepatosellüler kanserle ilişkisine dair birçok hipotezler ortaya atılmıştır. Bunlardan biri de HBx proteininin hücrenin hasarlı DNA'sına bağlanma özelliğinde olduğu, böylece DNA tamirini engellediği şeklindedir. Aynı çalışmada hasarlı DNA'ya bağlanan HBx'in bu DNA'yı ultraviyole ışığının kırılma yapıcı tesirine hassas hale getirdiği de iddia edilmiştir [140].

## **2.9 HBV Genotipleri ve Subtipleri**

Genel olarak Hepatit B virüsü hepatit B yüzey antijeninin antijenik determinantlarına dayalı olarak dört subtip içerisinde sınıflandırılmaktadır [7]. Bu subtipler de kendi içerisinde 9 serotipe (ayw1, ayw2, ayw3, ayw4, ayr, adw2, adw4, adrq+ ve adrq-) ayrılmaktadır [8]. Ortak determinant "a" ya karşı oluşturulan antibody bütün serotiplere karşı koruma sağlamaktadır. Şu ana kadar HBV serotiplerinin klinik önemi ile ilgili çok az literatür bilgisi bulunmaktadır [141].

Moleküler biyolojik düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda HBV genomları arasında farklılıklar olduğu saptanmış ve birbirlerine benzerlik oranı %92 ve daha fazla olan HBV suşları aynı grupta toplanarak 7 farklı genotip (A,B,C,D,E,F,G) belirlenmiştir.

Bu genotipler ile HBsAg subtipleri arasındaki ilişkilerin saptanması amacı ile genom dizinleri ile S geni karşılaştırılmış ve genotip / subtip dağılımı yapılmıştır [5].

Genotip dağılımları HBV genomunun tamamında bulunmasına karşın en yüksek varyant gösteren kısmın S gen bölgesinde olduğundan dolayı genotip çalışmaları genellikle genomun bu bölgesi üzerinde gerçekleştirilmekte ve kesin sonuç alınmaktadır [35].

1988'de Okamoto ve arkadaşları HBV izolatlarını, nükleotid zincirlerinin %8'den fazla farklılık göstermesi esasına göre 4 farklı genotipe ayırmışlardır (A-D). Daha sonra Norder ve arkadaşları genotip E ve F'yi tanımlamışlardır [142,143].

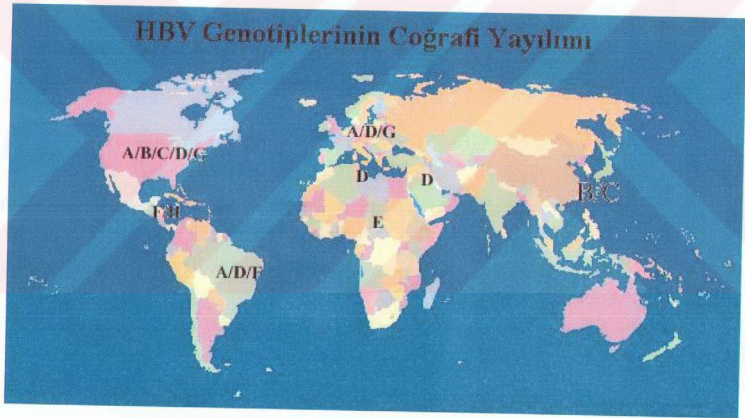
Fransa'da yapılan bir çalışmada, Fransa ve ABD'den toplanan 121 HBV ile enfekte hasta serumu incelenmiş ve bu hastalarda çeşitli HBV genotipleri tespit edilmiştir. Ancak 13 (%11) hastanın genotipi tayin edilememiştir (2'si Fransa'da 11'i ABD'den). Daha sonra bu hastaların genotipleri genotip G olarak isimlendirilmiş ve genotip G'nin serolojik grubu adw2 olarak bulunmuştur [144].

HBV genotipleri karakteristik bir coğrafi yayılma sahiptir. HBV genotiplerinin dağılımının coğrafi bölgelere göre farklılık göstermesi esasına dayanarak HBV ile enfekte hastaların atalarının göçleri konusunda bilgi edinilebilmektedir. Şöyle ki: Genotip A'nın Amerika'da Afrika ve Asya kökenli gruplarda bulunduğu varsayılır. İspanya'da genotip A genotip D kadar yaygındır ve İspanya'dan Orta Amerikaya göç olmadan genotip A'nın İspanya'da şu andakinden daha baskın olabileceği tahmin edilmektedir. Ayrıca subtip dağılımından genotip D'nin Akdeniz Bölgesin'den Batıya doğru bir hareketi olduğu görülmektedir [145].

Genotip C Kuzey Doğu Asya'daki tüm hastalarda C1 kalıbı, Güney Asyalı hastaların hepsinde C2 kalıbı taşımaktadır. D genotipi Hindistan, Afrika, Kuzey Avrupa ve İsveç'te D1 şeklindedir. Orta Doğu'da ise D genotipi D2 kalıbı taşımaktadır. Bu bilgiye dayanarak İsveçli intravenöz ilaç bağımlısı HBV taşıyan hastaların orjininin Hindistan, Afrika ve Kuzey Avrupa olduğu fakat Orta Doğu olmadığı söylenebilir [146].

**Tablo 2.1.** HBV Genotipleri ve Subtiplerinin Coğrafi dağılımı [78]

Genotip	Subtip	En çok görüldüğü coğrafi bölge
A	adw <sub>2</sub> adw <sub>1</sub>	Kuzey Batı Avrupa Sahra altı Afrika
B	adw <sub>2</sub> adw <sub>1</sub>	Endonezya, Çin, Vietnam
C	adw <sub>2</sub> adrq <sup>+</sup> adrq <sup>-</sup> Ayr	Doğu Asya, Japonya, Kore, Çin, Fransız Polinezyası, Vietnam
D	ayw <sub>2</sub> ayw <sub>3</sub>	Akdeniz Bölgesi, Hindistan, Pakistan, Yakın Doğu
E	ayw <sub>4</sub>	Batı ve Sahra altı Afrika
F	adw4q <sup>-</sup>	Orta Amerika, Şili, Arjantin, Peru, Amazom Bölgesi
G	adw <sub>2</sub>	Fransa, Kuzey Amerika



**Şekil 2.12.** HBV Genotiplerinin Dağılım Haritası [78]

HBV genotiplerinin incelenmesi HBV enfeksiyonunun doğal biyolojisini anlamaya yardımcı olmaktadır. Çünkü farklı genotipler arasında anti HBe serokonversiyonu ve replikatif potansiyel açısından fark vardır [147]. Yani genotipler anti HBe serokonversiyonu ve HBV'nin replikatif potansiyeli üzerine etki etmektedirler. Dünyanın çeşitli yerlerinde HBV taşıyıcısı oranları arasında önemli farklılıklar ve bunlar bir ölçüye kadar genotip dağılım farklılıklarına paraleldir.

Genotip A Kuzey Batı Avrupa ve ABD'nin persistan taşıyıcılar arasında yaygındır ve buralarda HBV prevelansı düşüktür. Yüksek sosyoekonomik durum bunun nedeni ise de, genotipin alan etkisinin de bunda etkili olabileceği düşünülmektedir. Amazon ve Peru gibi yüksek HBV prevelansı olan yerlerde (şu ana kadar HBV ile ilgili yeterli genetik bilgi elde edilememekle beraber) elde edilebildiği kadarıyla genotip F baskındır.

Genotip B ve C Doğu Asya'da yaygındır ve bu bölgelerdeki kadınlarda vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg'nin pozitif olduğu dönem daha uzundur (Genotip B ve C kendi aralarında karşılaştırıldığında genotip C'nin immün klirensi daha uzundur. Genotip B daha kısa sürede serumdan temizlenir ve HBV-DNA kaybolur). Bunun aksine Sahra altı Afrika ve Akdeniz bölgesi'nde HBV'nün horizontal geçişi daha önemlidir ve buralarda genotip A ve genotip D yaygındır. Bu bölgelerdeki doğurgan kadınlarda antiHBe serokonversiyonu Asyalı kadınlara göre daha çabuk olur ve bu kadınlar çocuklarına HBV enfeksiyonunu daha az bulaştırmaktadırlar. Çünkü vertikal (doğum sırasında) geçişte viral replikasyonun olup olmadığı önemlidir. Vertikal geçen enfeksiyon %80 kronikleşir ve HBV enfeksiyonunun endemik olduğu yerlerde vertikal geçiş önemlidir [145,148].

Hepatit B genotiplendirilmesi, virüsün patogenezi ve izlediği yolu açıklamak için önemlidir. Çünkü varyantlar terapiye verdikleri yanıt, virülensi, patogenezi ve serolojik aktiviteleri yönünden farklılık gösterebilmektedir [9]. Ayrıca mevcut çalışmalar, hepatit B e antijeni (HBeAg) üretimini azaltan yada durduran precore ve core promotör bölgelerindeki mutasyonlar ile HBV genotipleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir. Genotiplendirmenin bir diğer önemi ise HBV genotiplerinin, interferon terapisine verilen yanıt ile de ilişkili olmasıdır [10].

### **2.9.1 HBV mutasyonlarının viral genotiplerle ilişkisi**

Pre-kor mutantlar genotip B, C ve D'nin yaygın olduğu Doğu Asya ve Akdeniz Bölgesi'nde yaygınken, genotip A'nın baskın olduğu ABD ve Kuzey Avrupa'da bu mutantların insidansı düşüktür [149]. Pre-kor stop kodon 28 (adenin 1895) sıklığı ile genotip A arasında zıt ilişki vardır [150]. Genotip C'de genotip B'ye göre daha sık kor promotör mutasyonu gözlenmektedir [13]. Bununla birlikte kor gen delesyonu ile genotipler arasında ilişki olmadığı belirlenmiş yayınlarda da vardır. Ayrıca bu yayınlarda

kor gen delesyonlarının interferon tedavisinin üzerine de etkisi olmadığı belirtilmektedir [150].

Normalde HBV virüs enfeksiyonlarında HBeAg ve HBV-DNA birlikte pozitifdir. Bununla birlikte bazı kronik Hepatit B'li hastalarda antiHBe ile birlikte HBV-DNA pozitifdir. Bu farklılık sıklıkla HBV-DNA genomunun pre-kor bölgesindeki 1896 numaralı nükleotiddeki mutasyonla açıklanmaktadır. Bu mutasyonla HBeAg sentezi durur ama viral replikasyon devam etmektedir [149]. 1896. nükleotiddeki pre-kor TAG mutasyonu (guanin adenin mutasyonu) antiHBe serokonversiyonu ile beraber görülmektedir. Bu mutasyon 1858. nükleotidde sitozinin bulunması ile engellenmektedir. Halbuki nükleotid 1858'de sitozin yerine timin olduğunda pre-kor TAG stop kodon mutasyonu engellenmemektedir.

Kuzey Avrupa'da HBV enfeksiyonu taşıyan hastalarda TAG mutasyon prevalansının daha düşük olması, bu bölgede en sık görülen genotip A ve B'de nükleotid 1858'de sitozinin bulunması ile açıklanmaktadır. Gerçekten de pre-kor stop kodon mutasyonu genotip A'da genotip D'den daha azdır [151]. Nükleotid 1858'de sitozin bulunması sadece Kuzey Avrupa'da değil; Güney Amerika, Afrika ve Güney Doğu Asya'da da görülür. Yapılan bir çalışmada; timin 1858 (T-1858) genotip B'nin %100'ünde (39), genotip E'nin %100'ünde (5), genotip C'nin %85'inde (45/53) ve genotip D'nin %99'unda (68/69) bulunmuştur [13].

16 hastanın serumu anti HBe serokonversiyonu sırasında toplanmıştır. Bu serumların 6'sı genotip A, 6'sı genotip D, 2'si genotip B, biri genotip C, biri genotip E taşıyor olduğu bulunmuştur. Genotip B, C ve E kor promotör, pre-kor veya 2 mutasyonu beraber bulubdururken genotip A ve D farklı özellik göstermiştir. AntiHBe pozitif 6 genotip A'nın 2'sinde, 6 genotip D'nin tümünde pre-kor ve kor promotör mutasyonu bulunmamıştır. Ancak mutasyon olmayan bu 8 hasta 17 ay takip edildiğinde, bunlarda da mutasyon tespit edilmiş ve antiHBe serokonversiyonun genomik konversiyondan önce olduğu neticesine varılmıştır [152].

Neticede, Akdeniz Bölgesi'nde HBe Ag negatif kronik hepatit B'li hastaların %95'inden fazlasında 1896 pre-kor mutantlarının olduğu tahmin edilmektedir. Dünyadaki yaygınlığı bilinmemekle beraber bu mutantların Akdeniz Bölgesi ve Asya'da yaygınlığının %40-80 arası olduğu düşünülmektedir [13,149]. Ülkemizde

Bozdayı ve arkadaşları tarafından yapılan bir çalışmada 19 hastanın %84'ünde (16/19) pre-kor mutasyonu tespit edilmiştir [153].

Yapılan in-vitro çalışmalarda sitozin-1858 (C-1858) ile timin-1858 (T-1858) arasında replikatif açıdan fark olmadığı gösterilmiştir. C-1858 ile enfekte kişilerde T-1858 ile enfekte kişilere göre daha ciddi karaciğer hasarı olmakla beraber son çalışmalarda genotip A (C-1858) ile enfekte hastaların interferon tedavisine non A genotiplerle (T-1858) enfekte hastalardan daha iyi yanıt verdiği rapor edilmiştir. Bağcı ve arkadaşlarının çalışmalarında ise genotip A'da az görülen pre-kor stop kodon 28'in varlığının interferona daha yüksek cevap oranıyla birlikte olduğu belirtilmiştir. Bununla birlikte pre-kor mutantlarla oluşan enfeksiyonlarda tedavi sonrası relaps (kötüye gitme) oranı fazladır. Yine çeşitli çalışmalarda lamivudinin HBeAg negatif hastalarda HBeAg pozitif hastalar gibi cevap oluşturduğu gösterilmiştir [13,149,150].

Japonya'da 50 kronik HBV enfeksiyonlu hasta üzerinde çalışma yapılmıştır. Genotip B'de genotip C'ye göre HBeAg daha az pozitif (%16, %42  $P<0,1$ ) olduğu, antiHBe ise daha fazla pozitif (%84, %56  $P<0,1$ ) olduğu saptanmıştır. Bu çalışmada genotip C ve B arasında 1896. nükleotiddeki G'nin A'ya mutasyonu açısından fark bulunmamıştır. Ancak kor-promotor bölgede 1762. nükleotidde A-T (adenin-Timin) mutasyonu ve 1764. nükleotidde G-A (guanin-adenin) mutasyonu genotip C'de daha sık bulunmuştur (%58, %16  $P<0,1$ ). Bu mutasyonlar HBeAg veya antiHBe pozitifliği ile korele değildir [10].

Hindistan'da 130 hasta üzerine yapılan çalışmada ise, Genotip A'da bazal kor promotor mutasyon sıklığının Genotip D'ye göre daha yüksek olduğunu (%45, %12) buna karşın, Genotip D'de pre-kor stop kodon mutasyonu sıklığının Genotip A'ya göre daha fazla olduğunu (%43, %6.5) bulmuşlardır [3].

Japonya ve Çin'de yapılan çalışmalar sonucunda, Genotip B'de Genotip C'ye kıyasla yüksek oranda pre-kor stop kodon mutasyonu görüldüğü, Genotip C'de ise B'ye kıyasla yüksek oranda kor promotor mutasyonu görüldüğü ortaya konmuştur [3].

## 2.9.2 HBV genotipleri ile HBV enfeksiyonlarının klinik seyri arasındaki ilişki

Genotiplerin HBV enfeksiyonlarının klinik seyri üzerine etkisi, Hepatit C virüsü genotiplerinin klinik seyir üzerindeki etkisi kadar açık değildir [148].

Bununla birlikte Japonya'da kronik HBV enfeksiyonunun klinik sonucu ve hepatosellüler karsinoma (HCC)'nin gelişimi üzerine HBV genotipinin etkisini tanımlamak üzere 26 sirozlu hasta üzerinde çalışılmıştır. Genotip B'li hastaların 19'undan 4'ünde (%21), genotip C'li hastaların 7'sinden 5'inde (%71) HCC geliştiğini bulmuşlardır. Genotip B'li hastaların terapiye iyi sonuç vermeleri ve uzun bir zamanda HCC'nin tekrarlamamasına karşın Genotip C'li hastalar terapiye zayıf yanıt vermekte, terapi uygulanmasına rağmen hızla HCC'nin ilerlemesinden dolayı hepatic zayıflıktan ölüm gerçekleşmektedir. Böylece HBV genotipi, HCC'nin gelişimi, embolizasyon terapiye yanıt ve HCC'nin tekrarlanması konularıyla ilişkilendirilebilir [3].

Yine aynı şekilde İsveç'te yapılan bir çalışmada Genotip C'nin Genotip B'ye göre daha ciddi karaciğer hasarı yaptığı bulunmuştur [148].

Tayvan'da 100 asemptomatik HBV taşıyıcısı, 170 kronik hepatit B ve HBV'ne bağlı karaciğer kanseri olan hastalar üzerinde çalışılmıştır. Bu hastalarda genotip B ve C en sık gözlenen genotipler olarak belirlenmiştir. Genotip C, sirozlu ve 50 yaş üstü HCC'li hastalarda asemptomatik taşıyıcılara göre daha sık bulunmuştur (%60,5 %23  $P<0,001$  ve %41, %15  $P=0,005$ ). Genotip B ise 50 yaş altı HCC'li hastalarda asemptomatik taşıyıcılara göre daha sık olduğu ortaya konmuştur (%52, %8  $P=0,03$ ). Bu baskınlık genç HCC'li hastalarda daha belirgin (35 yaş altı HCC'li hastaların %90'ı genotip B olup bunlarda siroz tanısı bulunmamıştır) olduğu belirtilmiştir. Bu çalışmada; genotip C'li hastalarda genotip B'li hastalara göre ciddi karaciğer hasarının anlamlı derecede daha sık olduğu bulunmuştur. Genotip C hem nekroinflamatuvar aktivite hem de fibrozis skoru açısından genotip B'den daha yüksek skora sahiptir. Bu çalışmada, sirozlu hastalarda genotip C'nin daha sık olmasına rağmen, genç ve HCC'li hastalarda genotip B'nin daha sık olmasının nedeni aydınlatılamamıştır [148].

Mayerat ve arkadaşları tarafından yapılan bir araştırmada, HBV enfeksiyonlarının %90'nından sorumlu olan genotip A ve D'nin klinik üzerine etkileri araştırılmıştır.



Kronik aktif hepatitli 35 hastanın 28'inde genotip A, 4'ünde genotip D, diğerlerinde ise diğer genotipler bulunmuştur. Akut hepatit B'li 30 hastanın 24'ünde genotip D, 3'ünde genotip B, 3'ünde diğer genotipler bulunmuştur. Buna göre de genotip A ile kronik hepatit B arasında açık bir ilişki bulunmuştur [154].

### **2.9.3 HBV genotipleri ile HBV enfeksiyonlarının interferon tedavisine verdiği cevap arasındaki ilişki**

Akut HBV enfeksiyonunun diğer viral hepatitler gibi özgül tedavisi yoktur. Kronik HBV enfeksiyonunda ise alfa-interferon tedavisi uygulanmaktadır. Sirozlu hastalarda ise alfa-interferon yeterli gelmediği için lamivudin ve famsiklovir tedavilerinin yararı görülmüştür. Halen uzun süreli lamivudin, uzun süreli famsiklovir ve lamivudin+alfa-interferon kombine tedavisinin yararlılığını araştıran çalışmalar devam etmektedir [155].

İnterferon tedavisinin genotip farklılığından etkilenmediğini belirten yayınlar olmakla beraber [150], genotip farklılığı ile interferon tedavisine yanıt arasında ilişki kuran çalışmalar da vardır. Zhang ve arkadaşları HBeAg negatif ve interferon tedavisi alan 35 hasta üzerinde çalışma yapmışlardır. Serum aminotransferazlarının normale inmesi ve vireminin anlamlı derecede düşmesi tedaviye cevap olarak değerlendirilmiş, tedaviye cevap, interferon dozuna ve başlangıç serum DNA seviyesine bağlı olarak değerlendirilmiştir. Genotip A'da %70 interferon cevabı bulunur iken, pre-kor mutasyonlarının sık olduğu genotip D/E'de %40 cevap alınmıştır [156].

Başka bir çalışmada 58 kronik hepatit B'li hasta grubuyla çalışılmıştır. Hastaların genotipleri genotip B ve C olarak saptanmıştır. Tedaviye cevap kriteri olarak, serum aminotransferazlarının normale dönmesi, HBeAg ve HBV-DNA'nın kaybolması kabul edilmiştir. Genotip B tedaviye %41, genotip C %15 oranlarında yanıt vermiştir. Ayrıca genotip B'ye sahip genç hastalar tedaviye daha iyi cevap vermiştir [13]. Bu bulgular, mutant virüslerle oluşan enfeksiyonların alfa interferon tedavisine direnç gösterdiği ve genotip tayinine göre HBeAg negatif kronik hepatit B'li hastalarda interferon tedavisine yanıtın önceden tahmin edilebileceği yolundaki görüşleri desteklemektedir.

Almanya’da 64 hasta üzerine yapılan çalışmada interferonun HBeAg üzerine etkisinin Genotip A’lı hastalarda, Genotip D’li hastalara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (%37; %6) [12].

Tayvan, Japonya ve Çin’de de genotip B ve C üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Tayvan’da 58 hasta üzerine yapılan çalışmada HBeAg’nin azalma oranının Genotip B’li hastalarda Genotip C’li hastalara göre önemli ölçüde daha yüksek (%41; %15) olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca Genotip B’ye interferon ve lamivudin Genotip C’ye göre daha iyi etki etmektedir [13].

#### **2.9.4 HBV genotiplerinin Hepatit B aşılmasının koruyuculuk oranı ile ilişkisi**

“a” determinantı hepatit B aşılmasına cevap için gerekli determinanttır. 139-147 numaralı aminoasit rezidülerinin oluşturduğu loop ise “a” determinantının esansiyel bir parçasıdır. Bununla birlikte E ve F genotiplerinin bu looplarının aminoasit zincirleri son zamanlarda kullanılan hepatit B aşılarının aminoasit zincirlerinden büyük farklılık göstermektedir. Bu farklılık genotip A ve B’de daha azdır. Bu durum genotip E ve F suşlarına karşı hepatit aşılarının koruyuculukta yetersiz olup olmayacağı sorusunu gündeme getirmiştir [147].

Başka bir çalışmada, genotip A SHBs proteinleri içeren rekombinant hepatit B aşılarının koruyuculuğunun daha düşük olduğu belirtilmiştir. Bunun nedeni diğer genotiplerin SHBs proteinlerinde %9’dan az farklılık olmasına rağmen genotip A’da farklılığın %14 olmasına bağlanmaktadır [142].

#### **2.10 Hepatit B Enfeksiyonunun Epidemiyolojisi**

Virüsün antijenik yapıları ile ilgili ilk bulguları takiben, HBV yüzey antijeninin belirlenmesinde kullanılmak üzere serolojik tanı teknikleri geliştirilmiştir. Yapılan tarama çalışmalarının sonuçları hastalığın dünyada yaygın olduğunu göstermiştir. Günümüzde çeşitli bölgesel dağılım farklılıkları bulunmasına rağmen yeryüzünde yaklaşık 300 milyon kişinin HBV taşıyıcısı olduğu ve bunların %95’nin gelişmekte olan ülkelerde buldukları kabul edilmektedir [157].

Virüs ile temas eden kişilerin ortalama %90’ında hiçbir klinik belirtinin oluşmadığı gözlenmiş olup, bireylerin virüs ile karşılaştıkları ancak bir tarama sırasında serumdaki spesifik antiHBs’nin gösterilmesi ile anlaşılmaktadır. Bu tip antikor

taramaları ile bir ülkede virüs ile temas etmiş kişilerin oranını saptamak olasıdır ve böyle bir hesaplama sonucu dünyada 2-3 milyar kişinin yaşamlarının herhangi bir döneminde HBV ile temas ettikleri tahmin edilmektedir [158].

Hepatit B virüsü ile temas eden erişkinlerin ortalama %10'unda, yeni doğanların ise %80'inde taşıyıcılık gelişmektedir. Bu tip olgularda zaman içerisinde ağır karaciğer hasarına bağlı olarak siroz ve hepatosellüler karsinomanın gelişme olasılığı enfeksiyonun yaygınlığı göz önüne alındığında büyük önem kazanmaktadır [159]. Sosyal olarak bu denli büyük kitleleri ilgilendiren ve ağır klinik tablolara sebep olan bir enfeksiyon hastalığı ile karşı karşıya olmamız, bu önemli hastalık ile mücadelede başarılı olabilmek için her şeyden önce hastalığın epidemiyolojik özelliklerinin iyi bilinmesini gerekli kılmaktadır.

### **2.10.1 Dünyada Hepatit B Enfeksiyonlarının Durumu**

HBsAg ve antiHBs gibi serumda kalıcı göstergelerin varlığı sayesinde HBV enfeksiyonunun prevalansı çok iyi araştırılabilmektedir. Enfeksiyonun dağılımı çeşitli coğrafi bölgelerde çok değişkenlik gösterir. HBV göstergeleri ve taşıyıcıların prevalansı dikkate alınarak dünya düşük, orta ve yüksek endemik bölgelere ayrılmıştır. Sınıflandırmanın oluşturulmasında bölgedeki HBsAg ve antiHBs pozitifliğinin yanı sıra, enfeksiyonun alınma yaşı ile virüsün en sık bulaşma yolu gibi kriterler de göz önüne alınmıştır [160].

Hepatit B virüsü endemisitesinin düşük olduğu bölgelerde HBV taşıyıcılık prevalansı %2'den azdır. Erişkinler açısından enfeksiyonla karşılaşma oranı da %20'yi aşmamaktadır. Cinsel temas en önemli bulaşma nedenidir. Etken ile çoğunlukla erişkin dönemde karşılaşılmaktadır. Ancak perinatal ya da erken çocukluk dönemlerindeki bulaşma HBV taşıyıcılığına önemli ölçüde kaynaklık etmektedir [160].

Düşük endemisite profili Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa, Avustralya, Yeni Zelanda gibi gelişmiş ülkelerde görülmektedir. Bu ülkelerde genel popülasyonda hepatit B sıklığı düşük iken, eşcinseller, çok eşli heteroseksüeller, damar içi uyuşturucu bağımlıları gibi risk gruplarında ve Eskimolar, Avustralya yerlileri, ABD zencileri gibi bazı etnik gruplarda enfeksiyon endemiktir [160].

Orta endemisite profili Güney ve Doğu Avrupa, Güney ve Orta Amerika, Orta Asya ile Türkiye'nin de içinde bulunduğu Ortadoğu'da izlenmektedir. Bu grupta toplumdaki HBsAg pozitifliği %2-10 arasında değişmektedir ve erişkinlerin %20-60'ında antiHBs pozitifliği bulunmaktadır [160]. Enfeksiyon çoğunlukla çocukluk, ergenlik veya genç erişkinlik dönemlerinde alınmaktadır. Başlıca bulaşma yolu horizontal olmakla birlikte, diğer bulaşma yolları da enfeksiyonun yayılmasında rol oynamaktadır. Özellikle Akdeniz havzasında perinatal bulaşma, taşıyıcı annelerde düşük oranlarda bulunan HBeAg pozitifitesi nedeniyle daha nadirdir [161].

Afrika ve Asya gibi yüksek endemisite gösteren bölgelerde HBV enfeksiyonunun epidemiolojik kalıbı oldukça farklıdır. Toplumun %10'undan fazlası HBV ile kronik olarak enfektedir ve erişkinlerin %70'inden fazlası ise antiHBs taşımaktadır. Bu bölgelerde perinatal veya horizontal bulaşma asıl bulaşma yoludur. Asya'da perinatal bulaşma daha önemli iken, Afrika'da bulaşma daha çok bir yaşın üzerindeki çocuklarda aile içi (horizontal) yolla olmaktadır [161].

Dünya'da HBsAg'nin dağılımı ile kronik Hepatit B ve primer hepatoselüler kanser arasında yakın bir epidemiolojik ilişki vardır. Onkojen bir virüs olan HBV ile küçük yaşlarda enfekte olmak, yüksek oranda kronikleşme ve primer hepatoselüler kansere yakalanmayla sonuçlanmaktadır. Güneydoğu Asya ve Güney Afrika gibi yüksek endemisite görülen yerlerde enfeksiyonun bebeklikte alınması ve en yüksek taşıyıcı kitlesini çocukların oluşturması hepatoselüler kanser sıklığının bu bölgelerde artmasına neden olmuştur.

### **2.10.2 Türkiye'de Hepatit B Enfeksiyonlarının Durumu**

Türkiye genelinde Sağlık Bakanlığına bildirilen akut viral hepatitlerin sayısı yıllık olarak 15-20 bin dolayındadır [162]. Ancak tahmin edilen gerçek sayı bunun en az on katıdır. Ülkemizde hastaneye yatırılıp izlenen akut viral hepatit tanılı olguların etiolojik dağılımı incelendiğinde çocukluk çağında A tipi, erişkinlerde ise B tipinin daha fazla olduğu kabul edilebilmektedir [158].

Kızılay kan merkezleri'nde 1989-1993 yılları arasında yapılan çalışmalarda 20 ilde yaklaşık 2 milyon donörün kanlarında HBsAg pozitiflik oranı ortalama %5.1 olarak bulunmuştur [162]. Bu oran Türkiye'de HBsAg pozitifliğinin ortalamasını gerçeğe yakın gösteren oldukça yüksek bir rakamdır ve bu bilgiler ışığında Türkiye'de 3

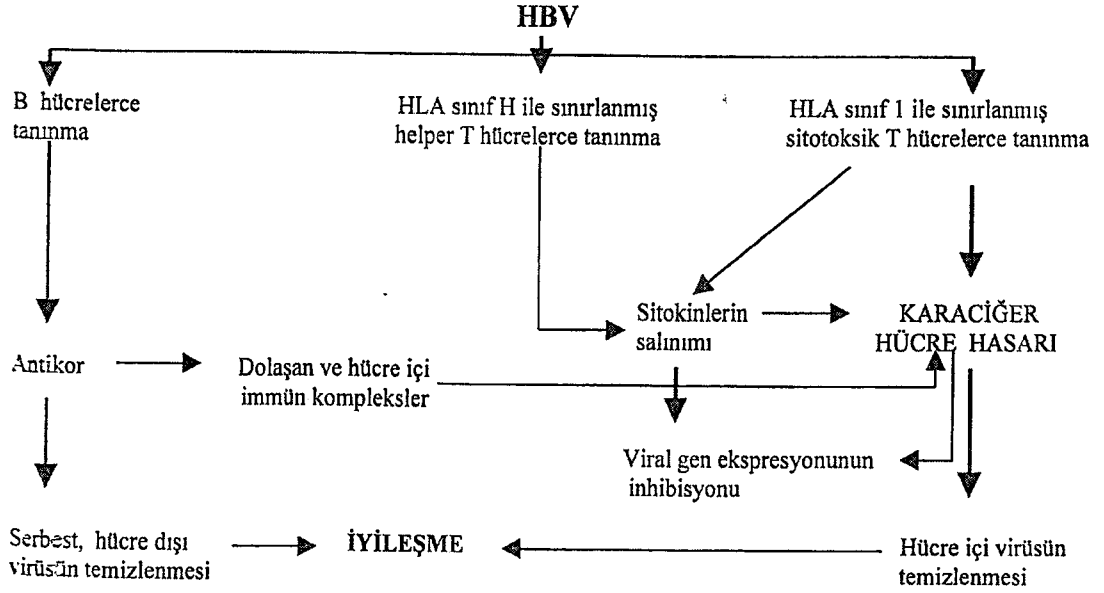
milyon civarında insanın kronik HBV taşıyıcısı olduğu tahmin edilebilmektedir. Birçok araştırmacı tarafından yurdumuzun çeşitli bölgelerinde sivil donörler arasında yapılan çalışmalarda saptanan HBsAg pozitifliği ortalama % 5.7 olarak bulunmuştur [158].

Ülkemizde HBV konusunda yapılan tarama çalışmalarında bazı risk gruplarında HBsAg oranları da incelenmiştir. Çalışmaların bir kısmında sağlık personeline kontrol grubuna oranla 1.5-2 kat yüksek seropozitivite saptanırken, bazılarında önemli bir fark bulunmamıştır. HBsAg pozitifliği ortalama %8, antiHBs pozitifliği ise %40 olarak saptanmış olup, antiHBs pozitifliğinin yüksek bulunması bu kesimin etken ile daha sık karşılaştığını göstermektedir [158].

B tipi viral hepatit açısından önemli risk gruplarını oluşturan hastalar hemodiyaliz, hemofili ve lösemi gibi hastalardır. Bu grup hastalarda yapılan çalışmalarda HBsAg pozitiflik oranları %5.6-73.3 arasında bulunmuş olup normal popülasyon ve donör oranlarından istatistiksel olarak anlamlı derecede yüksek bir taşıyıcılık görülmektedir [158]. HIV ile enfekte hastalar da önemli risk grubu oluşturmakta olup bu hastalarda hepatite yakalanma öyküsü %60'lara varmaktadır [163].

### **2.11 Hepatit B Enfeksiyonunun İmmünopatogenezisi**

Hepatit B enfeksiyonunun çok değişken bir klinik spektrumu vardır. Hastalık akut, fulminan veya kronikleşerek siroza gidebilen hepatit tabloları ile uzun sürede hepatoselüler karsinomaya sebep olabildiği gibi persistan viremiye rağmen aminotransferazların ve karaciğer histolojisinin normal bulunduğu “sağlam taşıyıcılık” diyebileceğimiz masum bir tablo içinde de kalabilmektedir. Şekil 2.13’de HBV enfeksiyonunda immünopatogenezin olası süreçleri gösterilmektedir [164].



**Şekil 2.13** HBV enfeksiyonunda immünopatogenezin olası süreçleri [5].

Hepatit B virüsünün hepatositlere nasıl girdiği tam olarak anlaşılamamıştır. Bu konuda en yeni görüş virüsün preS1 aracılığı ile karaciğer hücresinin membranında fosfolipid bağlayan türe spesifik bir protein olarak yer alan anneksin V aracılığı ile membrana bağlandığıdır [165]. HBV direk sitopatik etki göstermemektedir. Transgenik farelerde HBV'nin gen ürünlerinin ve replikasyon sürecinin normal koşullarda hepatositler için direk sitopatik olamaması da bu görüşü desteklemektedir [166]. Gerek hastalık tablosunun oluşması, gerekse de konağın virüsten temizlenmesi esas olarak hücrel immün yanıtlara bağlı olarak gelişmektedir [167].

Hepatositin yüzeyinde bulunan küçük HBV proteinlerine, özellikle HBcAg epitoplarına karşı verilen hücrel yanıt ile karaciğer hasarı meydana gelmektedir. Hepatosit içerisinde işlenip HLA Class 1 molekülleri tarafından hücre yüzeyinde eksprese edilen HBV peptid fragmentleri (HBcAg), CD8 + sitotoksik T hücreleri tarafından tanınmakta ve bu hücreler tarafından, enfekte olmuş hepatositler yok edilmektedir [168-170]. T hücrelerinin reseptör miktarı kişiden kişiye değişmekte ve bu farklılık T hücrelerinin HBV peptidlerine bağlanmasını etkilemektedir. Bu nedenle T hücrelerinde tam bir aktivasyon olursa enfekte tüm hepatositler parçalanmakta ve viral replikasyon durmaktadır. Anti-HBs oluşmaktadır. Eğer

immün yanıt yetersiz ise enfeksiyon devam etmektedir. Bununla birlikte yapılan son çalışmalarda, sitotoksik T hücrelerinin, enfekte olmuş hepatositleri öldürmeden de viral replikasyonu durdurabileceği gösterilmiştir [171,172].

HLA Class 2 sınırlı CD4+ lenfositler ile makrofajlar gibi ekstrahepatik antijen sunan hücrelerin viral peptid parçalarını tanımaktadırlar. CD4+ hücreler tarafından viral protein epitoplalarının tanınması T hücrelerinin çoğalmasını sağlamakta, sitokin sentezini düzenlemekte ve B hücrelerine yardımcı olmaktadır. Bütün bunlardan başka akut HBV enfeksiyonu sırasında, vücutta virüse karşı interferon sentezinde artış olmaktadır. İnterferon, HLA antijenlerinin sayısını artırmakta ve HLA antijenleri ile viral proteinlerin birleşmesini sağlayan enzimlerin üretilmesini düzenlemektedir [86,173].

## **2.12 HBV Enfeksiyonunda İmmün Yanıttan Kaçma Mekanizmaları**

HBV enfeksiyonunda immün sistemin etkilerinden virüsün kaçmasını sağlayacak pek çok karşı mekanizma geliştiği görülmüştür. HBV enfeksiyonunda HBc, HBpol ve HBx proteinleri sitokin genlerinin ekspresyonunu etkilememektedir. HBx proteini viral mRNA ekspresyonunu arttırırken IL-6'yı inhibe ederek immün yanıtı etkilemektedir; ayrıca IL-8 ekspresyonunu da arttırmakta, bunun aracılığı ile IFN-alfa'yı inhibe etmektedir. HBx ayrıca hücrel transformasyonda rol oynayan TGF- $\beta$ 1'in büyüme inhibisyonu etkisine yanıtı da azaltmaktadır. HBV'nin immün yanıttan kaçmak için kullandığı mekanizmalardan biri de lenfositlerde replike olabilmesidir. Bu hücrelerde apoptozisin indüklenmesi ile HBV'ye karşı immün yanıtta klonal anergi gelişebilmektedir [174].

HBV'nin immün yanıttan kaçmakta kullandığı mekanizmalar şöyle özetlenebilir [175].

1.Görünmeyen virüs (Gizli bölgeler ve antijenik özelliğin kaybı): HBV'nin enfekte ettiği hücreler immün yanıtın güçlüğüle ulaşabildiği vücut bölgelerinde olup CTL saldırısından kaçabilmektedir. Karaciğerin sıkışık parankim yapısı, pankreas ve böbrek dokuları; enfekte hücrelerin CTL yanıtından korunmasını sağlamakta ve böylece viral perzistans gerçekleşmektedir. Ayrıca virüsün pre-kor/kor genlerinde olan mutasyonlarla HBeAg sentezi durmakta, immün tanıma için oldukça önemli olan bu antijenin yokluğunda virüse karşı yanıtlar

zayıflamaktadır. HBeAg sentezlemeyen virüsler ise replikasyonunu sürdürmekte ve enfeksiyon devam etmektedir.

2. Antikorlardan kaçma: Akut HBV enfeksiyonunda virüsün temizlenmesinde etkin olan antikorlar; yüzey antijenlerine karşı oluşan nötralizan özellikteki antikorlardır. Yüzey antijenlerinde “a” determinantında değişikliğe neden olan mutasyonlar, virüsün bu antikorların nötralizan etkisinden kaçmasını sağlamaktadır.

3. Antijen işlenmesi ve T lenfositte sunumunun etkilenmesi: viral antijenlerde değişikliğe yol açan mutasyonlar bu antijenlerin MHC antijenlerine bağlanması ve TCR ile bağlanma özgülüğünü etkiler. HBc proteininde olan bazı mutasyonların, T hücre tanınmasını engellediği ve hatta farklı bağlanma bölgeleri nedeni ile değişik T hücre klonlarını aktive ederek immün yanıtı antagonize ettiği gösterilmiştir. Gene HBc proteini belli HLA epitoplarına bağlanabilen bölgeler içerebilmektedir. Bu durumda kişinin HLA tipini bağlı olarak immün yanıt değişmektedir.

4. Aktivite hücre yanıtlarının değiştirilmesi: Virüsün yükünün çok fazla olduğu durumlar gibi immünodominant epitopların uzun süreli ya da maksimal T hücre uyarısı, T hücrelerde yanıtızsızlığa ya da apoptosis sinyaline neden olabilir. Bu durumda subdominant epitoplarca aktive edilen T hücre yanıtları enfeksiyonu kontrol etmeye çalışır. Fakat bu yanıtlar enfeksiyonun eliminasyon için yeterli olmadığından kronik enfeksiyon meydana gelir. T hücre yanıtını değiştiren bir başka mekanizma da HBsAg spesifik CD8+ T hücrelerin CD4+ T hücre yanıtlarını baskılamasıdır. Ekzojen HBsAg birçok hücre tipinde MHC I antijenleriyle işlenmekte ve ardından HBsAg spesifik CTL tarafından hücre öldürülmektedir.

5. İmmün yanıtı değiştiren viral proteinler: Daha çok sitokinler üzerinden immün yanıtları değiştirmektedirler. HBcAg, IFN-beta transkripsiyonunu inhibe etmekte; terminal kısmı IFN-alfa ve IFN-beta'ya hücresel yanıtları inhibe etmektedir.



### 2.13 HBV Enfeksiyonlarının Serolojik Tanısı

HBV antijenlerinin karşı özgül antikorlar meydana gelmekte ve antijen/antikorlarının serum örneklerinde incelenmesi ile enfeksiyon tanısı konmakta; hastaların takibi, toplumların ve çeşitli risk gruplarının taraması yapabilmektedir. Bu bölümde, serolojik tanı amacı ile en sık başvuru alan dört “antijen-antikor” sistemi ayrı ayrı ele alınarak değerlendirilmeleri yapılacaktır.

HBsAg/Anti-HBs sistemi: Enfeksiyon göstergesi olarak kabul edilen HBsAg'nin varlığı, virion replikasyonu ile eş anlamlı değildir; yapılan incelemeler sağlıklı taşıyıcılarda HBsAg üretiminin devam ettiği dönemlerde enfeksiyöz virüs partiküllerinin bulunmadığını göstermiştir. Bu tip olgularda, hepatosit içine viral genomun kısmen veya tamamen entegre olduğu ve sadece major protein (S proteini) sentezlediği bilinmektedir.

Klasik olarak, HBV ile teması takiben, henüz inkübasyon döneminde transaminaz düzeyinde artış olmadan ve sarılık belirtileri başlamadan HBsAg'ye serumda saptamak mümkündür [176]. Bu antijenin belirlenmesinde ortalama dört hafta kadar sonra klinik hepatit tablosu ortaya çıkmaktadır. Belirtilerle birlikte serumda HBeAg, DNA-polimeraz ve HBV-DNA da saptanabilmektedir. HBsAg, akut viral hepatit B olgularında 2-6 ay içerisinde kaybolur ve bir “boşluk” döneminden sonra koruyucu anti-HBs antikorları belirler (aslında, akut dönemde anti-HBs'lerin oluştuğu; ancak antijen fazlalığı nedeniyle rutin testler ile bu dönemde anti-HBs'lerin saptanamadığı bilinmektedir). Akut enfeksiyon geçiren kişide, HBsAg varlığını 6 aydan fazla sürdürür ise, hastalığın kronikleşmesi söz konusu olmaktadır [177].

HBcAg/Anti-HBc sistemi: HBcAg'nin serumda saptanması oldukça güçtür; bu nedenle kor bölgesi ile ilgili, pratik önemi olan tek gösterge Anti-HBc antikorlarıdır. Özellikle iyileşme ile sonlanan akut olgularda, HBsAg'nin kaybolup, henüz anti-HBs'lerin belirmediği boşluk döneminde, enfeksiyonun tek göstergesi bu antikorlardır (bu dönemde serumun enfeksiyöz olduğu kabul edilir). Anti-HBc antikorları erken beliren ve uzun süre kalıcı olan antikorlardır. Ancak Anti-HBc'nin akut dönemin yanı sıra, konvalesan dönemde de pozitif bulunması, bu antikor aktivitesine sahip IgM sınıfı immünglobülinlerin aranmasını önemli kılmaktadır. Ancak anti-HBc-IgM antikorlarının sadece akut dönemde pozitif olabileceğini

düşünmek hatalıdır. Günümüzde kullanılan duyarlı teknikler ile, akut olguların yanı sıra taşıyıcıların % 20'sinde, kronik hepatitlilerin ise % 80'inde düşük titrede de olsa bu antikora rastlanmaktadır [178]. Ancak farklı gruplardaki pozitiflik karşılaştırıldığında, önemli titre düzeyi farkı bulunmaktadır. Gerçekten de akut olgularda saptanan pozitiflik çok yüksek değerlerdeyken diğer tip olgularda görülen pozitiflik düşük düzeydedir [179].

Anti-HBc-IgM titresinin karaciğer harabiyeti ile yakın ilgisi kabul ediliyorsa da, replikasyonun göstergesi olup olmadığı tartışma konusudur.

HBeAg/Anti-HBeAg sistemi: Akut olgularda serumda HBeAg, HBsAg ile hemen hemen aynı dönemde belirmekte ve HBsAg'den daha önce kaybolmaktadır. HBeAg'nin varlığı viral partiküllerin, DNA polimerazın ve HBV-DNA'nın serumda bulunduğunu göstermekte; kısaca bu antijen enfeksiyözitenin ve aktif replikasyonun işaretidir. HBeAg'nin kaybolması ve özellikle spesifik antikoru olan anti-HBe'nin belirlenmesi, iyileşmeye doğru gidişin kanıtı olarak kabul edilmektedir [180].

Ancak son yıllarda HBV-DNA ile ilgili hibridizasyon ve özellikle PCR çalışmalarının yaygınlaşması HBe/Anti-HBe sisteminin güvenilir replikasyon göstergeleri olarak ele alınmalarında bazı kuşkuvarın doğmasına yol açmıştır. Örneğin, HBeAg negatif olgularda aktif replikasyonun göstergesi olan DNA'nın bulunması; özellikle PCR gibi duyarlı yöntemlerle anti-HBe (+) olguların % 80'inde HBV-DNA gösterilmesi [180]; ve nihayet HBeAg pozitif bazı olgularda, DNA'ya rastlanılmaması [181]; bazı klasik bilgilerin zaman içinde değişebildiğini kanıtlamaktadır.

PreS/Anti-PreS sistemi: Son yıllarda yapılan ön çalışmalar preS1 ve preS2 antijenlerinin varlığının, HBeAg'ye oranla replikasyonun daha kesin göstergeleri olarak değerlendirilmesine yol açmaktadır. Bu antijenler, HBsAg ile birlikte ortaya çıkmakta ve iyileşme ile sonlanan olgularda, çok daha erken yerlerini anti-preS antikolarına bırakmaktadırlar. Bu durumda, henüz HBsAg pozitif olgularda saptanan preS/anti-preS serokonversiyonu, kronikleşmenin olmayacağını erken bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Nitekim İstanbul'da yapılan bir çalışmada da, akut B tipi viral hepatit geçiren ve iyileşme ile sonlanan 34 olguda preS antijenlerinin HBsAg'den çok daha önce kaybolduğu saptanmıştır [182]. Ancak preS antijenlerinin

eser miktarda da olsa, 22 nm'lik partiküllerde de bulunması, bu göstergenin saptanmasının kesin replikasyon kanıtı olarak değerlendirilmesinde bazı teorik kuşkulara yol açmaktadır. Günümüzde preS sistemi ile ilgili yayınlarda bazı çelişkili bulgulara rastlanmaktadır. Bu durum her araştırmacı grubun farklı özelliklerdeki kendi reaktiflerini kullanmalarından kaynaklanabilmektedir. Konu ile ilgili standardizasyon çalışmalarının yakın bir zamanda tamamlanması, bu antijen-antikor sisteminin gerçek değerinin daha net olarak belirlenmesini sağlayacaktır.

## **2.14 Moleküler Biyolojik Yöntemler İle HBV-DNA'nın Tanısı**

1970'li yıllardan sonra HBV enfeksiyonlarının serolojik tanısında çeşitli serolojik göstergelerin araştırılması yaygın olarak kullanıma girmiştir. Özellikle HBsAg hem kan bankalarındaki taramalarda, hem de akut/kronik olguların tanısında en sık başvurulan göstergedir. Ancak, 1980'li yıllarda Moleküler Biyolojik tekniklerin birçok alanda yaygın biçimde kullanımı gündeme gelmiş ve çeşitli etkenlerin nükleik asitlerini araştırma yöntemleri geliştirilmiştir [176].

Bugün HBV ile ilgili laboratuvar çalışmalarında Moleküler Biyolojik teknikler kullanılarak HBV-DNA araştırması gittikçe yaygınlaşmaktadır [183]. Özellikle, seronegatif kişilerden bulaşan hepatit B enfeksiyonlarında, tek göstergenin DNA olduğunun kanıtlanması [184]; ayrıca HBsAg negatif olup, transaminazları yüksek bulunan donörlerin %9'unda HBV-DNA'nın saptanması [185] ve nihayet PCR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) gibi duyarlılığı çok yüksek yöntemlerin kullanıma girmesi, DNA incelemelerinin önemini artırmıştır [186].

### **2.14.1 İlk Uygulamalar**

İlk HBV-DNA çalışmalarında klasik hibridizasyon yöntemlerinden faydalanılmıştır. Bu amaçla örneğin; Scotto ve ark. [187] çalışmalarında içinde DNA aranacak serum örneği lizis edildikten sonra naylon/nitroselüloz filtrelerden geçirilmiş ve olası nükleik asitler membranda tutulmuştur. Daha sonra P<sup>32</sup> ile işaretlenmiş HBV genomu (prob) ortama ilave edilip örnekte DNA'nın varlığı söz konusu ise her iki DNA'nın hibridizasyonu sağlanmış ve pozitif sonuçlar, otoradyografi ile siyah lekeler şeklinde gösterilmiştir. Bu uygulamada oluşan lekelerin yoğunluğuna bakılarak semi-kantitatif bir sonuç elde etmek mümkündür ve deneyin duyarlılığı, serumun ml'sinde 10<sup>5</sup> viral partikül kadardır [188]. "Dot-blot hibridizasyon" uygulamasında

karşılaşılan standardizasyon sorunu, I<sup>125</sup> işaretli problemlerin kullanıldığı ve kolon kromatografisi esasına dayanan “sıvı faz hibridizasyonu” tekniği ile çözülmeye çalışılmıştır; sonuçların gama sayıcılarında objektif biçimde değerlendirildiği bu uygulamada, örnekteki HBV-DNA miktarı pg/ml düzeyinde saptanmaktadır.

Doku örneklerinde ise HBV-DNA araştırmak amacıyla “Southern blot hibridizasyon” tekniği kullanılmıştır. Örneğin Brechot ve ark. bu yöntem ile iğne biyopsisi ile alınan muayene maddelerinde integre veya serbest epizomal HBV-DNA varlığını araştırmışlar; hepatik kanser olgularında hücre DNA’ya integre olmuş viral DNA’yı göstermişler ve bu tür incelemelerin HBeAg araştırmasına oranla viral replikasyonun daha kesin göstergesi olduğunu; kronik hepatitte etiyolojinin belirlenmesinin yanı sıra, antiviral tedaviye alınacak hastaların seçiminde bu uygulamanın yararını saptamışlardır [186].

#### **2.14.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu ve HBV-DNA**

Dot blot ya da southern blot şeklinde uygulanan klasik hibridizasyon çalışmaları, nükleik asitleri çoğaltarak, hibridizasyon ile saptanabilirlik oranını arttırmayı amaçlayan PCR uygulamaları ile daha farklı bir boyut kazanmıştır. 1990’lı yıllarda PCR teknolojisinin HBV-DNA için de kullanımı söz konusu olduğunda, serumda saptanabilen viral partikül sayısı ml.de 10-50 oranına kadar düşmüş ve sonuçta, vireminin bulunup bulunmadığı daha kesin biçimde gösterilmeye başlanmıştır [188].

Böylece AntiHBe pozitif olan ve klasik yöntem ile DNA saptanamayan asemptomatik HBsAg taşıyıcılarının %50’sinden fazlasında HBV-DNA varlığı gösterilmeye başlanmış, ayrıca pre-C bölgesinin PCR ile çoğaltılması ve dizi analizinden sonra çeşitli mutasyonları da belirlemek kolaylaşmış ve tamamen seronegatif olgularda DNA varlığı gösterilmiştir [189].

Duyarlılığı çok yüksek olan PCR tekniği ile düşük düzeyde vireminin söz konusu olduğu taşıyıcılarda, eser miktardaki HBV-DNA’sının saptanması, genomun klonlanması ve dizi analizi yapılması mümkün olmaktadır [190]. Genel olarak, HBV-DNA saptanmasında, klasik dot blot hibridizasyon tekniğine göre, PCR’ın 10<sup>4</sup> kez daha duyarlı olduğu kabul edilince teorik olarak tek bir genomun bile bu yöntem ile belirlenmiş olması gerekmektedir. Eğer PCR sonuçları ethidium bromide içeren jeldeki görüntüye göre değerlendirilir ise yaklaşık 3x 10<sup>-6</sup> pg düzeyindeki klonlanmış

HBV-DNA'nın, işaretli problar ile hibridizasyonu sonucunda değerlendirme yapılır ise 0.2 fg ( 100 ag) DNA'nın saptanması m¼mk¼n olmaktadır [191].



### **3. MATERYAL VE METOT**

#### **3.1 Materyal**

Bu çalışma 2002-2004 yılları arasında ilk olarak örnek serumların toplanmaya başlanması ile birlikte başlamıştır. Çalışmalar Gaziantep Üniversitesi Biyoloji bölümü Moleküler Biyoloji laboratuvarlarında yapılmıştır. Örnek grubu Gaziantep'ten ve Güneydoğu'nun pek çok yerinden Gaziantep'teki çeşitli hastanelere başvuran kişiler arasından seçilmiştir. Örnekler seçilirken hastaların HBsAg serolojik göstergelerinin pozitif olması esas alınmıştır. Çalışmanın amacına uygun olarak hastalar belirli gruplar halinde seçilmiştir. Bu gruplar HBsAg sonucu pozitif olan; aile içi bulaşın söz konusu olduğu aile bireyleri, diyaliz hastaları, kronik hasta grupları, donörler ve hastane personellerinden oluşmak üzere beş ayrı grup şeklinde değerlendirmeye alınmıştır. Serum örnekleri toplanırken örneklerin homojenitesini sağlamak amacı ile yaş ve cinsiyet durumlarına da dikkat edilmiştir. Çalışması yapılan bu hastalar 10-50 yaş arasında olup %75'i erkek bireylerden oluşmaktadır.

Buna bağlı olarak çalışma periyodumuz içerisinde HBsAg sonuçları pozitif olan toplam 132 hastadan kan örnekleri alınarak materyallerimiz temin edilmiştir.

#### **3.2 Metod**

Kan örnekleri bekletilmeden santrifüj edilerek serum kısmı ayrılmıştır ve buz kalıplarına yerleştirilmiştir. Her bir serum örneği yedekli olarak tüplere bölünerek ve numaralandırılarak -20°C'de saklanmıştır.

İzolasyon çalışmalarına geçilmeden önce serumlar tekrar yüksek devirde santrifüj edilerek olası pıhtılardan arındırılmıştır.

PCR çalışması ile HBV-DNA (+) sonuç veren hastalardan 40 hasta ortaya konulmuş; bunlardan 5'i diyaliz hastası, 19'u farklı aile bireyleri, 6'sı donör, 6'sı hasta olarak başvuran hastalar, 4'ü hastane personelinden olacak şekilde gruplar oluşmuştur. Her bir gruptaki mutasyonlar grup içerisinde değerlendirilecek ve grup içi ve gruplar arası mukayeseler yapılacak şekilde mevcut mutasyonlar da bu gruplara göre gruplanmıştır.

### 3.2.1 PCR Yöntemi İle HBV-DNA'nın Saptanması Prensipleri

Polimeraz zincir reaksiyonu tekniği ortamda az sayıda bulunan etkene özgü nükleik asitlerin sayısını çoğaltmaya dayanır. Saptanabilir düzeye erişen bu moleküllerin varlığı daha sonra klasik hibridizasyon yöntemi ile gösterilir. PCR uygulamasına geçilmeden önce muayene maddesinden etkene özgü nükleik asitlerin izolasyonu gerekmektedir. Basit bir yöntem olmasına karşılık yeterli DNA ayırımı uygun biçimde yapılamaz ise, ortamda çoğaltılacak hedef molekül bulunmayacağından deney olumsuz sonuç verecektir. Klasik olarak biyolojik örneklerden DNA izolasyonu için organik çözücüler ile ayırım ve etanol ile çöktürme yöntemleri uygulanır [192].

Çoğaltma uygulamasını başlatmak için ortamda kalıp bir DNA molekülü, bu molekülün komplementer zincirini sentez etmek üzere hedef bölgelere bağlanacak primerler, reaksiyonu indükleyecek ısıya dayanıklı bir enzim (Taq DNA polimeraz) ve nükleotidler bulunmalıdır. Primerler; dizisi bilinen 15-30 bazdan oluşan tek iplikçikli oligonükleotidler olup etkene özgül olarak önceden sentez edilmişlerdir. PCR uygulaması üç aşamada yapılır;

a) Ayrılma (Denatürasyon): İlk aşamada sayısı artırılmak istenen nükleik asit denatüre edilerek iki zinciri birbirinden ayrılır. DNA molekülünün her iki iplikçiği birbirine hidrojen bağları ile bağlanmışlardır. Isının  $92^{\circ}$ - $94^{\circ}$ C'ye yükseltilmesi ile bu bağlar kopar ve iki iplikçik birbirinden ayrılır [192].

b) Bağlanma (Annealing): Isının aniden düşürülmesi ( $37^{\circ}$ - $65^{\circ}$ C, ideal olarak  $55^{\circ}$ C) ile ortama ilave edilmiş olan primerler ayrılmış olan nükleik asit zincirlerinin komplementer bölgelerine bağlanır [192].

c) Uzama (Extension): Isının  $72^{\circ}$ C'ye yükselmesi ile DNA üzerindeki hedef bölgelere bağlı primerler ortamdaki enzim ve nükleotidleri kullanarak yeni komplementer zincirin sentezini gerçekleştirirler. Bu zincir 5' uçtan 3' uca doğru ve kalıp görevi yapan ana zincirin her bir bazının karşısına komplementeri olan baz yerleşerek ilerler [192].

Bu şekilde üç aşamada meydana gelen reaksiyon tek bir "siklus" olarak adlandırılır ve ısıyı süratle yükseltip alçaltan "thermal cycles" denilen otomatik bir aygıtta

gerçekleşir. Bu işlem 30-40 kez yinelenildiğinde, başlangıçta az miktarda olan DNA'nın sayısı her siklusun sonunda ikiye katlanarak artar ve milyonlarla ifade edilir düzeye gelir ( $2^n$ ) [193].

### **3.2.2 PCR Temel Prensibine Bağlı HBV İçin Uygulanan Semi-Nested PCR Prensibi**

Semi-nested PCR iki aşamalı çoğaltma yöntemi olup ilk aşamada iki adet dış primer kullanılarak hedef molekül üzerinde uzunca bir bölgenin amplifikasyonu yapılmış, sonra bu amplifikasyon tüpünden alınan örnekteki DNA'nın daha kısa bir bölümü iç primerlerle çoğaltılmıştır. İç primer, dış primerlerin bağlanma yerlerinin iç kısmında kalan, kendilerine özgül yerlerine tutunmaktadırlar.

İkinci aşamada kullanılan primerlerden biri içerden, diğeri dış primerle aynı yerden başlamaktadır.

Örnekte tek bir hedef DNA molekülü bulunsa bile, iki aşamalı olarak yapılan amplifikasyonlarla çok sayıda DNA elde etmek mümkün olmaktadır. Böylece amplifikasyon sonucu oluşan fazla miktardaki hedef molekül, herhangi bir yalancı pozitiflik olmadan, kolayca gözlenebilmektedir. Bu yöntem ile pozitif sonuç alma olasılığı arttığı için testin duyarlılığı da artmaktadır. Duyarlılığın çok yüksek olmasına dayalı olarak gözlenebilen önemli bir dezavantaj; birinci amplifikasyondan sonra tüpteki DNA ikinci amplifikasyon tüpüne aktarılırken, ürün çok az miktarda dahi çevreye saçılırsa sonraki denemelerde hava yolu ile kontaminasyona yol açabilmektedir [194].

### **3.2.3 HBV-DNA'nın İzolasyonu**

PCR uygulaması öncesinde örneklerden proteinaz K- Fenol yöntemi ile izolasyon yapılmıştır. Bu amaçla 1.5 ml'lik steril bir eppendorf tüpünün içerisine taze hazırlanmış veya  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de bekletilmiş ve çözünmesi beklenmiş hasta serumu konularak üzerine 500 $\mu\text{l}$  K buffer ilave edilmiştir. Çalışırken her bir eppendorf tüpü tek tek açılmış, solüsyonlar eklendikten sonra hemen kapakları kapatılmıştır.

K Buffer (20mM Tris (PH 8.0); PH'yı düzenler, 150 mM NaCl; İzotonik ortam sağlar, 10 mM EDTA (PH 8.0); DNA'yı korur, % 0.2 SDS; Protein subünitelerini alt



birimlere ayırır, 20µl/ml Proteinase K; Proteinleri subünitelerine parçalar.) konulduktan sonra 37°C'de 2 saat inkübe edilmiştir.

İnkübasyon süresi sonunda tüpler 1 dakika yüksek devirde santrifüj edilerek tüplerin kenarlarında oluşmuş damlacıkların düşmesi sağlanmıştır. Daha sonra karışım 700µl Tamponlu fenol (+ 4°C) ile ekstrakte edilip, 3 dakika tüpler alt üst edilerek (yavaş yavaş) karıştırılmıştır. Tamponlu fenol aşamasında ortamdaki artık maddeler eppendorf tüpünün dibine çöker, tris+ DNA üstte kalır. Karıştırıldıktan sonra tüpler mikrosantrifüj aletinde (JP Selecta, s.a. 7001085, Spain) 6 dk. 11.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Bu aşama sonucunda tüplerdeki karışımların iki faz oluşturduğu gözlemlenir; oluşan artık bileşikler tüpün ortasında toplanır, fenol çöker, tris+ DNA üstte kalır.

Üst kısmı pellete dokunmadan steril bir eppendorfa aktarıldıktan sonra üzerine 700µl 24:1 oranında hazırlanmış Chloroform:Isoamyl alkol karışımı ile ekstrakte edilmesini takiben tüpler 3 dakika alt üst edilmiş ve 6 dakika 11.000 rpm'de santrifüj edilmiştir. Böylece bulunması muhtemel fenol ortamdaki uzaklaştırılmıştır. Üstte kalan berrak faz tekrar steril yeni tüplere dikkatlice aktarılmış ve üzerine 70µl 3M Sodyum Asetat (PH 4.9 veya 5) ve 1ml % 96 Etanol (-20°C) ilave edilip tüpler 10- 11 defa yavaşça ve dikkatlice alt üst edilmiştir. -20°C'de minimum 1 saat veya 1 gece presipite edilmiştir. %96'lık alkol DNA'nın suyunu çekerek yapısının bozulmadan büzüşüp agregasyon halinde (zDNA) presipite olmasını sağlar. Bu haldeki DNA daha ağır hale gelerek tüpün dibine çöker ve oraya yapışır. -20°C'den çıkardıktan hemen sonra bekletilmeden 10dk. 11.000 rpm'de santrifüj edilip yine bekletilmeden tüpün tamamı otomatik pipetle dikkatlice alındıktan sonra, tüpler kurutma kağıdının üzerine ters çevrilerek tüp kenarlarında kalan sıvının akması sağlanmıştır. Daha sonra 500µl %70 Etanol (-20°C) ilave edilmiştir. Bu aşamada hem DNA yıkanır hem de su oranı %96'lık alkole oranla daha fazla olduğundan, bir sonraki aşama için ortam suya hazırlanmış olur. 2 dakika 12.000 rpm'de çevirerek DNA yıkanmıştır. Alkolün tamamı otomatik pipetle DNA'ya zarar vermeden dikkatlice çekilerek atılmıştır. Tüplerin ağızları açık olarak yaklaşık 15 dakika 65°C'de bekletilerek alkolün tamamen uçması sağlanmıştır.

Dip kısımda kalan DNA'nın üzerine 20µl TE (Tris + EDTA) (PH 8.0) ilave edilerek tüpler tilt edilmiş ve DNA'nın çözünmesi sağlanmıştır. Daha sonra oda ısısında 30

dakika bekletilmesini takiben bir gece +4°C'de bekletilmiştir (veya 15 dakika 65°C'de bekletilebilir). Bu aşamada izotonik ve tampon özelliği ile DNA tamamen 3 boyutlu yapısına kavuşur. PCR aşamasına kadar izole edilmiş DNA'lar -20°C'de saklanmıştır.

TE içerisinde çözülmüş olan DNA ile PCR çalışması yapmadan önce çözünmesi beklenilmiş ve tekrar 1 dakika kadar santrifüj yapılarak tüm sıvının tüpün dibine çökmesi sağlanmıştır. Çalışma esnasında gerek DNA'nın sağlıklı bir şekilde elde edilmesi gerekse de kontaminasyonun engellenmesi için oldukça hassas ve dikkatli davranılmıştır.

### 3.2.4 Semi-Nested PCR Uygulaması

#### 3.2.4.1 1. aşama PCR işlemi:

Amplifikasyon işleminden önce temiz PCR odasında çoğaltma karışımı hazırlandı. Bunun için bir eppendorf tüpünün içerisine her bir örnek için aşağıdaki reaktifler karıştırılmıştır.

PCR tamponu	5µl
dNTP (10mM)	1µl
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	4µl
Primer	1µl
Taq DNA polimeraz	0.25µl
<u>ddH<sub>2</sub>O</u>	<u>28.75µl</u>
Toplam	40µl

Bu miktarlar çalışılacak örnek sayısı oranında çoğaltılarak, her tüpte 40µl olacak şekilde ince cidarlı PCR tüplerine paylaştırılmıştır. Çoğaltma karışımı konmuş tüplere izolasyon odasında daha önce elde edilmiş olan DNA'dan 10µl ilave

edilmiştir. Bu şekilde final konsantrasyon 50 µl'ye tamamlanmıştır. Buharlaşmayı engellemek amacı ile de karışımın üzeri bir miktar mineral yağ ile kaplanmıştır. Negatif kontrol tüpüne izolasyon ürünü yerine reaksiyon karışımı için kullanılan distile sudan ilave edilmiştir. Pozitif kontrol tüpüne ise önceden HBV-DNA'sının pozitif olduğu bilinen izolasyon ürününden aynı miktarda eklenmiştir. Daha sonra tüplerin kapakları kapatılarak PCR cihazına (Techne Genius FGENO5TD, England) yerleştirilmiştir. Thermal cyler cihazı aşağıdaki derecelere ve zaman dilimlerine programlanmıştır. Çoğaltma işlemi tamamlandıktan sonra ürünler +4°C'de görüntüleme işlemine kadar saklanmıştır. Daha uzun süre bekletilme durumlarında ise ürünler -20°C'de saklanmıştır.

94°C	5 dk.	1 siklus
94°C	20 sn.	30 siklus
55°C	40sn.	
72°C	60sn.	
72°C	5 dk.	1 siklus
+4°C	10 dk.	1 silus

#### 3.2.4.2 1.aşama PCR ürünlerinin incelenmesi

Birinci aşama çoğaltma işlemi tamamlandıktan sonra HBV-DNA pozitif ve negatif örnekleri birbirinden ayırmak için ürünler elektroforez jel işlemine tabi tutulmuştur. Bu amaçla hazırlanan %1'lik agaroz jel içine 1 µg/ml ethidium bromid ilave edildikten sonra tarakların yerleştirilmiş olduğu jel tankına agaroz ile hazırlanmış jel dökülmüş ve donması için bir süre bekletilmiştir. Jelin döküldüğü jel tankının bulunduğu zeminin düz bir zemin olmasına, jelin tankın her yerine homojen bir şekilde dağılmasına ve üzerinde herhangi bir hava kabarcıklarının olmamasına dikkat edilmiştir.

Elektroforez tankı TAE (1X) (Tris- asetik asit-EDTA) ile doldurulmuştur. Taraklar çıkarıldıktan sonra, jel bu tankın içerisine yerleştirilmiş ve 10µl PCR ürünü yaklaşık 2µl kadar yükleme tamponu (loading buffer) ile parafilm üzerinde karıştırılarak jel üzerinde oluşmuş olan kuyucuklara yerleştirilmiştir. Örnekler haricinde bu kuyucuklara negatif ve pozitif kontroller de yüklenmiştir. Ayrıca ortama amplifiye olmuş ürünleri boylarına göre değerlendirmek amacı ile 1 kb ağırlık markörü

(Fermentas) ilave edilmiştir. DNA'nın yüklendiği taraf (-) kutba gelecek şekilde jel tankının kapağı takılmıştır. Elektroforez işlemi 70-80 V akım verilerek yükleme tamponu jel tankının orta hizasına gelene kadar DNA'nın jel arasındaki porlardan yürümesi beklenmiştir.

Oluşan bantlar jelin transillüminatörde ultraviyole (UV) ışığı altında izlenmesi ile ortaya çıkmıştır. Her elektroforezde oluşan bantların dijital kamera ile görüntüleri alınmıştır. Oluşan DNA bantlarının beklenen boyda olduğuna moleküler ağırlık markörünün bantları ile karşılaştırarak karar verilmiştir.

### 3.2.4.3 2. aşama PCR işlemi:

Semi-nested PCR'in 2. aşamasında ilk aşamadaki gibi bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Bu karışımı oluşturan tüm reaktifler ve miktarları 1. aşamadaki gibi hazırlanmıştır. Ancak kullanılan primer dizinlerinde farklılık bulunmaktadır. Bu aşamada kullanılan primerlerden ileri primer 1. aşamadaki ileri primer ile aynı dizinlere sahip iken geri primer sentez edilmesi istenen bölgenin daha iç kısmında kalmaktadır.

Reaksiyon karışımı yine toplam 40µl olacak şekilde hazırlandıktan sonra 1. aşamada sadece pozitif sonuç veren PCR ürünlerinin her birinden 1'er µl alınarak daha önce hazırlanmış ve ince cidarlı PCR tüplerine örnek sayısı başına 40'ar µl olacak şekilde paylaştırılmış reaksiyon karışımına ilave edilmiştir. Tüpler thermal cycler cihazına yerleştirilmiş ve thermal cycler cihazı aşağıdaki derecelere ve zaman dilimlerine programlanmıştır.

94°C	2 dk.	1 siklus
94°C	20sn.	30 siklus
60°C	30sn.	
72°C	40sn.	
72°C	5dk.	1 siklus
+4°C	10dk.	1 siklus

2. aşama ürünleri Dizi Analizi yapıncaya kadar -20°C'de saklandı.

### 3.2.4.4 2. aşama PCR ürünlerinin incelenmesi

Bu aşamadan elde edilen ürünler %1.5'lik agaroz jelde ilk aşama jel elektroforezinde olduğu gibi kuyucuklara yerleştirilip akım yardımı ile bantların yürümleri beklenip yine UV transillüminatörde bant büyüklükleri ağırlık markörü ile kıyaslanarak incelenmiş ve jelin görüntüsü kamera (Fuji Finepix S602 Zoom) ile fotoğraflanmıştır.

### 3.5 Kullanılan primer dizinleri ve sentez bölgeleri

Çalışmada semi-nested PCR yapmaya uygun yüzey antijen bölgesini çoğaltmaya yönelik primerler kullanılmıştır. Primer dizini seçiminde birkaç referans kaynaktan yararlanılarak bizim hastalarımızdaki HBV'nin S gen bölgesine en spesifik olanı denemeler yapılarak belirlenmiştir (Şekil 3.1, Tablo3.1).

**Tablo 3.1** HBV S Gen Bölgesine İçin Belirlenen Primer Dizinleri

Kullanıldığı aşamalar	Primer dizinleri	Amplifiye bölgesi	Ürün büyüklüğü
1. aşama primerleri	Forward (sense) 5'-CTAGACTCGTGGTGGACTTCTC3' Reverse (antisense) 5'-AAATCCCAAAGACCCACAAT-3'	250-1019	770 bp
2. aşama primerleri	Forward (sense) 5'-CTAGACTCGTGGTGGACTTCTC-3' Reverse (antisense) 5'-AAGCCANACARTGGGGGAAAGC-3'	250-732	482 bp

```

1  ctccacaaca  ttccaccaag  ctctgctaga  tcccagagtg  aggggcctat  attttctgce
61  tgggtggctcc  agttccggaa  cagtaaaccc  tgttccgact  actgcctcac  ccatatcgtc
121  aatttctctcg  aggactgggg  accctgcacc  gaacatggag  agcacaacat  caggatctct
181  aggaccctcg  ctctgtttac  aggcgggggt  ttctctgttg  acaagaatcc  tcacaatacc
241  acagatttcta gactcgtgat gaacttctct caattttcta gggggagcac ccacgtgtcc
301  tggccaaaat  tcgcagttcc  caacctccaa  tcaactcaca  acctcttgtc  ctccaacttg
361  tcctggctat  cgtctggatg  gtctgctggg  ttttatcata  ttctcttca  tctctgtctg
421  atgcctcac  ttctctgttg  ttctcttggg  tttcaagggt  atgtttccc  ttgtctctt
481  acttccagga  acatcaacta  ccagcacggg  accatgcaga  acctgcagca  ttctctgtca
541  aggaacctct  atgtttccct  cttgttctg  tacaaaacct  tcggagcgaa  actgcacttg
601  tattcccatc  ccacatcct  gggctttcgc  aagattccta  tgggagtggg  cctcagtcg
661  ttctctctg  ctcagtttac  tagtgccatt  tgttcagtg  ttctgtaggc  tttcccccac
721  tgtttggctc tcagctatat ggatgatgtg gtattggggg ccaagtctgt acaacatctt
781  gagtcctctt ttaccctcat taccaatttt actttgtctt tgggtataca tttgaacctt
841  aataaaacca aacgttgggg ctactccttg aacttcattg gatattgat tgggaagtgg
901  qgtactttac cqcaqaaca tattqtacaa aaactcaagc aatgtttctg aaaattgcct
961  gtaaatagac ctactgattg gaaagtatgt caaagcattg tgggtctttt gggcttttgct
1021  gcccctttta cacaatgtgg ctatcctgcc ttgatgcctt tatatgcctg tatacaatct
1081  aagcaggett tcactttctc gccaaactac aaggcctttc tgtgtaaca atatctaaac
1141  ctttaccctg ttgcccgga acggtcaggt ctctgccaag tgttttctga cgcaaccccc
1201  acgggtgggg gcttgcccat aggccatcgg cgcctgcctg gaacctttgt ggctcctctg

```

 1. ve 2. aşama ileri primer       2. aşama geri primer  
 1. aşama geri primer       Sentez bölgesi

Şekil 3.1. Semi-nested PCR için kullanılan HBV S gen bölgesi primerleri ve sentez bölgesinin HBV orijinal dizin üzerinde gösterimi

### 3.2.6. HBV-DNA S Gen Bölgesi Dizi Analizi

HBV S gen bölgesinin dizi analizi otomatik DNA analizatörü (Visible Genetics Inc, Kanada) kullanılarak yapılmıştır. Amplifikasyonda TNF- $\alpha$  gen bölgesine özgül primer kullanılmıştır. Reaksiyon; Cy5/5.5 Dye Primer Cycle sequencing Kit (Visible Genetics Inc, Kanada) protokolü kullanılarak Cy 5.5 floresans işaretli 3 $\mu$ M konsantrasyona ayarlanmış primerden 2.5  $\mu$ l (5' AAAGCCCTACGACCACTGA 3'), (TibMolbiol Syntheselabor, Almanya), Sequencing reaction buffer' dan 2.5  $\mu$ l, DMSO (dimetilsulfoxide) (Sigma D8779, ABD), sequencing Taq polimeraz' dan 4 $\mu$ l ve 7  $\mu$ l distile su eklenerek total volüm 22  $\mu$ l olacak şekilde reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Karışımının 20 $\mu$ l'si ayrıldıktan sonra üzerine 2 $\mu$ l PCR ürünü eklenmiştir. ddNTP (ddA, ddC, ddG, ddT)'lerden 3 $\mu$ l alınarak 0.2 ml' lik PCR tüplerine dağıtılmıştır. Karışımın 5  $\mu$ l' si herbir tüpe eklenmiştir. Reaksiyon karışımları "thermal cyler" içinde (MJR PTC200, USA) 94°C' de 20 sn, 58°C' de 30dk, 72°C' de 1 dk olacak şekilde 30 siklusta yapılmıştır. İlk siklusta denatürasyon

94°C' de 2 dk ve son siklustan sonra 72°C' de 2 dk olarak tamamlanmıştır. Thermal cycler cihazı +4°C' ye geldiğinde örneklerin üzerine formamide içeren stop solution' dan 6µl eklenip vortekslelendikten sonra otomatik Dizi Analizatöründe kullanılmaya kadar -20°C' de bekletilmiştir. Dizi analizi yapılacak ürünler 94°C' de 2 dk denatüre edildikten sonra +4°C' ye alınıp yükleme işlemi yapılır. Visible Genetics Otomatik DNA dizi analizatörü; Long-Read Tower sequencer (Otomatik floresans elektroforez ünitesi), Geneobject software system (Geneobject software sistemi), Microcell cassettes (Microcell kasetleri), SureFill cartridge (premixed acrylamide gel (%6 lık akrilamid karışımı) ve injector (enjektör), Gel Toaster ( Photo- polymerize acrylamide gel ) ünitelerini içermektedir. Enjektör yardımıyla akrilamid karışımı microcell kasete uygulanır ve UV ışık altında 3 dk. polimerize olması beklenir. Polimerize olduktan sonra Long Read Tower sequencer içinde bulunan buffer chamber ünitesine yerleştirilir. 2 dk. önyürütme işleminden sonra sekans ürünlerinden 1.8 µl alınarak jele yüklenir. 55°C' de 2000 volta 110 dk yürütme işleminden sonra ham veriler Gen bankasından alınan HBV S gen bölgesi ile karşılaştırılarak analiz edilmiştir (Metis Biotechnology, Turkey).

### 3.2.7 Genotiplendirim ve Mutasyon analizi

Elde edilen sekans verileri GenBankasındaki çeşitli genotip ve serotipe sahip olan HBV dizinleri içerisinde AJ131956 versiyonlu HBV dizinine uyumluluk göstermektedir. Bu uyuma bağlı olarak genotipler ve serotipler belirlenmiştir. Her bir hastanın HBV dizinini bu veri ile kıyaslayarak farklılık gösteren nükleotidlere bağlı olarak mutasyonlar saptanmıştır. Mutasyonlar amacımıza uygun olarak hasta grupları içerisinde ayrı ayrı değerlendirmeye alınmıştır.

### 3.2.8 Çalışmada Kullanılan Reaktifler

- **Proteinaz K**

Toz halindeki proteinaz K, hazırlanan proteinaz K Buffer ile sulandırılmıştır, şişenin üzerinde de belirtildiği gibi sulandırma miktarı 10mg/ml olarak ayarlanmıştır. Proteinaz K tozu proteinaz K buffer ile sulandırılırken işlemler buz üzerinde yapılmıştır. Daha sonra bu karışım -20°C'de saklanmıştır.

**Proteinaz K buffer:** Proteinaz K buffer; 0.05 M Tris-HCl, 0.9 mM CaCl<sub>2</sub> reaktiflerinden oluşur. 100ml'lik buffer için; 0.788 gr Tris-HCl ve 9.99 gr CaCl<sub>2</sub> tartılmıştır. 80ml ddH<sub>2</sub>O suda çözülüp, 100ml'ye tamamlanıp, PH: 8'e ayarlanmıştır. Buffer hazırlandıktan sonra otoklavlanmış ve +4'de saklanmıştır.

- **K Buffer**

K buffer hazırlanırken içeriğindeki bütün komponentler için hazırlanmış stok solüsyonlar kullanılmıştır. Bu reaktifler ayrı ayrı hesaplanmış, ddH<sub>2</sub>O ilave edilerek istenilen miktara tamamlanmıştır. Buna göre bir örnek için hesaplanan değerler ne kadar örnek ile çalışılacak ise oranlar örnek sayısına göre çoğaltılmıştır. Buna göre oranlar bir örnek için şu şekilde verilebilir;

20 mM Tris (PH 8.0)	10µl
150mM NaCl	30µl
10mM EDTA (PH 8.0)	10µl
% 0.2 SDS	10µl
20µg/ml Proteinase K	10µl

- **1M Tris-HCl**

Tris-HCl; Tris base'ye HCl ekleyerek elde edilmiştir. 100ml için 12.11 gr Tris base tartılmış, önce 50ml ddH<sub>2</sub>O'da çözdürülmüş ve PH 8'e ayarlanmıştır. Tekrar stok solüsyon ddH<sub>2</sub>O ile 95ml'ye tamamlanmış ve tekrar PH 8'e ayarlandıktan sonra 100ml'ye tamamlanmış ve otoklavlanmıştır.

- **5M NaCl**

100ml stok solüsyon için 29.220 gr NaCl tartılarak bir miktar suda çözdürüldükten sonra istenilen miktara tamamlanmıştır.



- **0.5M Etilendiamintetraasetat (EDTA)**

100ml stok solüsyon için 18.61 gr/lt EDTA ilk olarak 50ml NAOH (20gr/lt) ile çözdürülüp PH 8'e ayarlanmış ve tekrar solüsyon NAOH ile 95ml'ye tamamlanarak PH 8'e ayarlandıktan sonra 100ml'ye tamamlanarak otoklavlanmıştır.

- **%20 Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)**

Sulandırma miktarı %20 olacak şekilde dH<sub>2</sub>O ile karıştırılmış ve 65°C'de ısıtılarak çözünmesi sağlanmıştır. Yine ilk önce bir miktar su ile çözünmesi sağlandıktan sonra istenilen miktara tamamlanmış ve PH 7,2'ye ayarlanmıştır.

- **Fenol**

Fenol çeşitli firmalar tarafından kristalize ya da sıvı halde satılmaktadır. Bu çalışmada 10mM Tris-HCl ile doymuş fenol solüsyonu kullanılmıştır.

- **Kloroform**

Moleküler biyolojik çalışma için hazırlanmış solüsyon kullanılmıştır.

- **İzoamil Alkol**

Moleküler biyolojik çalışma için hazırlanmış solüsyon kullanılmıştır.

- **3M Sodyum Asetat**

408.24 gr/lt olacak şekilde bir miktar ddH<sub>2</sub>O ile çözülmüş, 3M asetik asit ile PH 4.8-5.2 olacak şekilde ayarlandıktan sonra istenilen miktara tamamlanmıştır.

- **TE Tamponu**

10mM Tris-HCl 1.211 gr/lt PH:8

1mM EDTA 0.3722 gr/lt PH:8

olacak şekilde reaktifler karıştırılarak PH 8'e ayarlanmış ve otoklavlanmıştır.

- **Primerler**

Hazır olarak alınan primerler sense ve antisense primerler olarak ayrı ayrı alınmıştır. Bu primerlerin sulandırılması şişelerin üzerinde yazan oranlara göre yapılmıştır.

Çalışmamızda kullandığımız primerler HBV S gen bölgesine ait olup, ticari olarak (Metis Biotechnology, Turkey) sentezletilmişlerdir. Her bir aşamaya ait primer çiftleri ayrı ayrı hazırlanmıştır.

Primer 1'den 100pmol/ml, Primer 2'den 100pmol/ml olacak şekilde sulandırılmış şekli ile satın alınmış primerlerden 10'ar µl alınıp bir eppendorf tüpüne konulmuştur. Üzerine 80µl ddH<sub>2</sub>O konularak 100µl'ye tamamlanmıştır. Kısa bir süre vortekslenip Quick yapılarak, tüpün üzerine yazılıp -20°C'de saklanmıştır.

- **PCR tamponu**

Kullanıma hazır bir şekilde alınmış ve -20°C'de muhafaza edilmiştir.

- **Deoksinükleotidtrifosfatlar (dNTP: dATP, dGTP, dTTP, dCTP)**

100'er mM'lık olarak dATP, dGTP, dTTP, dCTP ayrı ayrı set şeklinde satın alınarak her birinden 10'ar µl olacak şekilde bir eppendorf tüpüne konulmuş ve 60µl ddH<sub>2</sub>O ile 100µl'ye tamamlanarak -20°C'de saklanmıştır.

- **Taq DNA Polimeraz**

5U/µl olarak kullanıma hazır şekilde satın alınıp -20°C'de saklanmıştır.

- **PCR Reaksiyon karışımı**

PCR reaksiyon karışımını hazırlarken kullanılan eldivenin üzerindeki toz alkolle temizlenip kurulanmıştır. PCR çalışma odasında kullanılacak ortam ve malzemeler steril edildikten sonra önce Buffer, dNTP karışımı, MgCl<sub>2</sub>, Primer karışımı -20°C'den çıkarılmıştır. Buzlu suda çözünmeye bırakılmışlardır. Kısa süreli çok hafif bir şekilde vortekslenip 10 sn. 13.000 rpm'de santrifüj edilmiş ve buz üzerine tekrar alınmıştır. Bu reaktifler belirtilen oranlarda bir eppendorf tüpünün içerisine bırakıldıktan sonra Taq polimeraz -20°C'den çıkarılıp,

belirtilen oranda ortama ilave edildikten sonra tüm malzemeler tekrar -20°C'ye kaldırılmıştır. Tüm karışım kısa bir süre vortekslenmiş ve santrifüj edilmiştir.

Reaksiyon karışımı her çalışmada örnek sayısına göre taze olarak hazırlanmıştır.

- **Yükleme tamponu (Loading Buffer)**

Ficoll	%10
Na <sub>2</sub> EDTA	0.1 M
SDS	%2
Bromfenol mavisi	0.25 gr

Yukarıdaki reaktifler bire bir oranında TE tamponu ile çözündürüldükten sonra +4°C'de saklanmıştır.

- **Elektroforez Tamponu (TAE = Tris - Asetik asit – EDTA Buffer)**

İlk önce 50X'lik olacak şekilde yoğun olarak stok hazırlandıktan sonra çalışma esnasında 1X olacak şekilde seyreltilmiştir.

2M Tris base	242 gr
% 5.7 glacial asedik asit	57.1 ml
0.5 M EDTA (PH:8)	100 ml

reaktifleri 1 litre ddH<sub>2</sub>O'ya tamamlanıp otoklav edilmiştir.

- **Etidyum Bromid (EB)**

Stok olarak 10 mg/ml olacak şekilde EB solüsyonu hazırlanmıştır.

- **Agaroz jel**

%1'lik jel için; 0.5 gr. Agaroz tartılarak 50ml (1X) TAE tamponu ile birlikte ısıya dayanıklı cam erlene konarak ısıtıcı üzerinde çözünmesi sağlanmıştır. Çözelti soğumaya bırakılmıştır. Sıcaklığı 40-50°C'ye indiğinde 1/10000 oranında sulandırılmış etidyum bromid ilave edilmiş ve içerisine tarakların yerleştirilmiş olduğu jel tankına yaklaşık 5 mm kalınlığında dökülerek bir süre donması için bekletilmiştir.

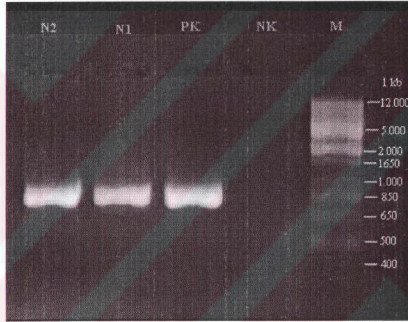
- **Moleküler Ağırlık Markörü**

Moleküler biyolojik çalışmalara uygun olarak hazırlanmış reaktif kullanılmıştır. 4µl moleküler ağırlık markörü (1kb) alınarak agaroz jel üzerinde bulunan birinci kuyucuğa elektroforez öncesi apliedilmiştir.

## 4. BULGULAR

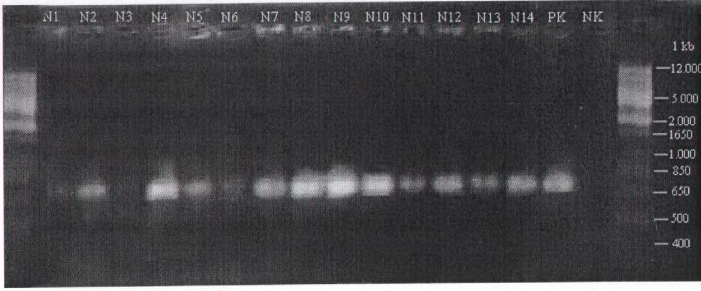
### 4.1 1.aşama PCR bulguları

Bu çalışmada HBsAg (+) serolojik sonuç veren 132 hasta serumu üzerinde çalışılmıştır. Bunlardan HBV-DNA pozitif olanlar, 1.aşama PCR'dan elde edilen ürünlerin jel elektroforezi sonucunda negatif bireylerden ayrılmış ve 2. aşama PCR'a sadece 1. aşamadan elde edilen pozitif örnekler alınmıştır. 132 hastadan 40 tanesinde (%30.30) HBV-DNA pozitif bulunmuştur.



**Şekil 4.1** %2'lik jel kullanılarak elde edilmiş 1. aşama PCR ürünü. PK: Pozitif kontrol, NK: Negatif kontrol, M: DNA ladder, N: Numuneler

Şekil 4.1'de görüldüğü gibi negatif olan örneklerde hiçbir şekilde band oluşmadığı ve HBV-DNA pozitif olanlarda ise 770 bp.lik bandların oluştuğu 1kb. DNA ladder ile kıyaslanarak belirlenmiştir. Bu şekilde gerçek viriyon tespit edilmiştir.



**Şekil 4.2** Aynı çalışma ile ilgili farklı bir jel görüntüsü. N; numuneleri ifade etmekte olup 14 örnek görüntülenmiştir.

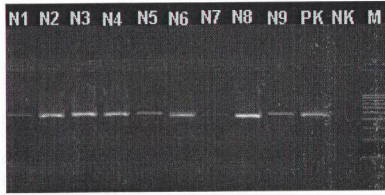
**Tablo 4.1** 1.aşama PCR sonucuna bağlı olarak HBV-DNA pozitif olan hasta grupları

Hasta grupları	Toplam birey sayısı
Aile üyeleri ( 7 farklı aile)	19
Diyaliz üyeleri	5
Hastane personelleri	4
Kronik HBV hastaları	7
Donörler	5

Çalışmamızda iki hastayı iki yıllık takibe almış idik. Bu hastalar bir aileye ait iki üyeden oluşmaktadır. Şekil 4.2’de N6 bireyin 2002’deki N7 ise aynı bireyin 2004’deki görüntüsüdür. Diğer bireyin ise 2002’deki görüntüsü N3’ün hizasındaki şekliyle olup 2004’de ise N4’deki gibi görüntülenmiştir. Bu iki birey iki yıl içerisinde jel üzerinde farklı konsantrasyonlarda bandlar oluşturmuşlardır.

## 4.2 2.aşama PCR bulguları

Birinci aşamadan elde edilen sadece pozitif örnekler içinde semi-nested PCR yapılarak sekanslama çalışmalarına uygun hale getirilen örneklerin ikinci aşama sonrası görüntüleri Şekil 4.3'deki gibi belirlenmiş ve aranan band büyüklüğü 482bp.olarak doğrulanmıştır.



Şekil 4.3 %1'lik jel kullanılarak elde edilmiş semi-nested PCR ürünü.

## 4.3 Dizi analizi ve serotip bulguları

Bu şekilde HBsAg pozitif olan 132 serumdan HBV-DNA pozitif olan 40 örnekte S bölgelerine ait çoğaltılmış ürünlerin band büyüklüklerinden emin olunduktan sonra ürünler bir sonraki aşama olan dizi analizi çalışmalarına alınmıştır.

Dizi analizi sonuçları GenBankasındaki çeşitli genotip ve serotipe sahip olan HBV dizinleri içerisinde AJ131956 versiyonlu HBV dizinine uyumluluk göstermektedir. Bu uyuma bağlı olarak HBV-DNA pozitif olan 40 hastanın tümünü Genotip D olarak ve suptip ise ayw3 olarak belirlenmiştir. Bu genotip içerisinde meydana gelen nükleotid değişimleri değerlendirmeye alınmıştır.

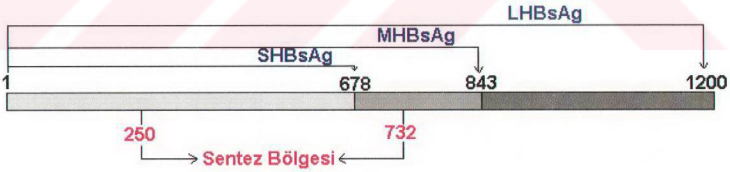
## 4.4 Genotip sonucuna bağlı sentez bölgesinin önemi

Dizi analizi çalışmamıza geçmeden önce örneklerimizin hangi serotipe ait olduğunu henüz belirlememiş olduğumuzdan dolayı primer seçimi öncelikle Genbankasındaki Hepatit B virüsünün orijinal dizini üzerinden yapılmıştır. Ancak tüm örneklerimizin serotipini belirledikten sonra aynı dizinler AJ131956 versiyonlu HBV dizini üzerinden değerlendirmeye alınmıştır ve bu primerlerin bölge ile tam uyumlulukta olduğu görüldükten sonra sentez bölgemizin HBV için önemi araştırılmıştır.

Böylece bu bölgede yani S bölgesinde meydana gelebilecek mutasyonların hangi transkriptleri etkileyebileceği konusunda fikir edinilerek çalışmaya devam edilmiştir.

Ayrıca HBV S gen bölgesi mutasyonlar açısından kor bölgesine göre daha stabil bir bölge olduğundan serum örneklerini seçerken kişilerin herhangi bir antiviral terapi görmüyor olmalarına ve aşılanmış olmamalarına da dikkat edilmiştir; bu şekilde stabil bir bölge olan ve viriyonun yüzey antijenleri ile ilgili olan bu bölgede meydana gelebilecek mutasyonların tümüyle organizmanın kendi immün yanıtından kaynaklanmış olacağını, özellikle Gaziantep ve yöresindeki yerleşim alanlarında gelişmiş bölgelere nazaran antiviral tedavinin hastalığın ilkin aşamalarında kullanılmamasından ancak şikayetin artma durumunda tedaviyi seçmelerinden dolayı HBV'deki ilkin aşama mutasyonunun ilaç kaynaklı olmadığı düşüncesi ile bu gen bölgesi ile ilgili çalışmamıza devam edilmiştir.

Buna göre bölgenin önemi şu şekilde açıklanabilir; Şekil 4.4'de belirtildiği gibi sentez bölgemiz üç ayrı tip yüzey antijenlerinin sentez edildiği genlerde ortak dizinlerin bulunduğu bir bölge olup, bundan dolayı bu bölgede meydana gelebilecek değişimler ortak dizinlerden dolayı yüzey antijenlerinin üçünde de (LHBsAg, MHBsAg, SHBsAg) oluşacaktır.



**HBV S Gen Bölgesi**

**Şekil 4.4.** HBV S gen bölgesi üzerinden sentezlenen yüzey proteinleri ve çalışma alanımız.



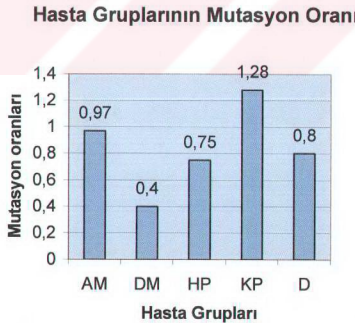
#### 4.5. Mutasyon bulguları

Dizi analizi sonucu elde edilen veriler hasta grupları içerisinde ayrı ayrı gruplandırılarak incelemeye alınmıştır. Mutasyon sayılarının gruplar içerisinde ortalamaları alınarak rakamsal olarak kıyaslanmıştır. Bu şekilde hangi grupta en fazla mutasyonun meydana geldiği kolayca saptanabilmektedir.

Yapılan bu gruplamalar 283-603 (S gen bölgesi) nükleotidleri arasında değerlendirilmiş ancak nokta mutasyonların en fazla 490-550 nükleotidleri arasında meydana geldiği saptanmıştır. Nokta mutasyon sıklıklarına bakıldığında ise en fazla kronik HBV hasta grubunda ikinci olarak da aile içinde meydana geldiği görülmektedir. En az mutasyonun gerçekleştiği grup ise diyaliz hastalarının bulunduğu grup olarak belirlenmiştir.

Tüm izolatlarda C498A, A531G ve T536C nokta mutasyonu bulunmuştur. İzolatların % 82,5 kısmında C501A nokta mutasyonu tespit edilmiştir.

Nokta mutasyonundan farklı olarak kronik HBV hastasından elde edilen izolatta (K4) A531/532A yer değişim mutasyonu saptanmıştır.



**Şekil 4.5.** Hasta gruplarının mutasyon oranı. AM: Aile üyeleri, DM: Diyaliz üyeleri, HP: Hastane personelleri, KP: Kronik hastalar, D: Donörler.

## 4.5.1 Hasta Gruplarında Nükleotid Değişim Verileri

### Aile Üyeleri

(A= Aile, M= Üye W= Genotip D serotipine ait ana dizin)

#### Aile 1 (4-7)

490

550

W GGATCTT C G AC C ACCAGCACGGGACC A TGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

A1M1 ----- A --- T ----- C --- C -----

A1M2 ----- A --- A ----- C --- C -----

A1M3 ----- A --- T ----- C --- C -----

A1M4 ----- A ----- C ----- C --- C -----

#### Aile 2 (11-15)

490

550

W GGATCTTC G AC C ACCAGCACGGGACC A TGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

A2M1 ----- A --- T ----- C --- C -----

A2M2 ----- A --- T ----- C --- C -----

A2M3 ----- A --- T ----- C --- C -----

A2M4 ----- A ----- C ----- C --- C -----

A2M5 ----- A ----- C ----- C --- C -----

#### Aile 3 (23-24)

490

550

W GGATCTTC G AC C ACCAGCACGGGACCATGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

A3M1 ----- A --- T ----- C --- C -----

A3M2 ----- A --- T ----- C --- C -----

#### Aile 4 (25-26)

490

550

W GGATCTTC G AC C ACCAGCACGGGACCATGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

A4M1 ----- A --- T ----- C --- C -----

A4M2 ----- A ----- C ----- C --- C -----

### Aile 5 (29-30)

490

550

W GGATCTTC **G** AC C ACCAGCACGGGACCATGC AGAACCTGCA **T** GACT **A** CTGCTCAAGGAACC

A5M1 ----- **A** ----- **T** ----- **C** ----- **C** -----

A5M2 ----- **A** ----- **C** ----- **C** -----

### Aile 6 (39-40)

283

340

W GGGGGAAC TACC **T** GTGTCTTGCCAA AATTCGCAGT **C** CCCAACCTCCAATCACTCA

A6M1 ----- **C** ----- **T** -----

A6M2 -----

490

550

GGATCTTC **G** AC C ACCAGCACGGGACCATGC AGAACCTGCA **T** GACT **A** CTGCTCAAGGAACC

----- **A** ----- **G** ----- **C** ----- **C** -----

----- **A** ----- **T** ----- **C** ----- **C** -----

### Aile 7 (10,34)

490

550

W GGATCTTC **G** AC C ACCAGCACGGGACCATGC AGAACCTGCA **T** GACT **A** CTGCTCAAGGAACC

A7M1 ----- **A** ----- **T** ----- **C** ----- **C** -----

A7M2 ----- **A** ----- **T** ----- **C** ----- **C** -----

### **Diyaliz Üyeleri**

460

W GGTATGTTGCCCGTTTGTC **C** TCTAATTCCA GGATCTTC **G** ACCACCAGCACGGGACC **A** TGC

D1 ----- **A** ----- **C** -----

D2 ----- **A** -----

D3 ----- **A** -----

D4 ----- **A** ----- **A** -----

D5 ----- **A** -----

AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

-----C-----C-----  
 -----C-----C-----  
 -----C-----C-----  
 -----C-----C-----  
 -----C-----C-----

### Hastane Personelleri

490

550

W GGATCTTC G AC C ACCAGCACGGGACC A TGC AG A ACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

H1 -----A-----C-----C-----C-----  
 H2 -----A---T-----C-----C-----  
 H3 -----A-----C-----C-----  
 H4 -----A-----G-----C-----C-----

### Kronik HBV hastaları

490

550

W GGATCTT C G AC C ACCAGCACGGGACC A TGC AG A ACCTGCA T G ACT A CTGCTCAAGGAACC

K1 -----A---A-----C-----C-----  
 K2 -----A---T-----G-----C-----C-----  
 K3 -----A-----C-----C-----C-----  
 K4 -----A---T-----G---C-----C-----  
 K5 -----A-----C-----C-----C-----  
 K6 -----A---A-----C-----C-----  
 K7 -----A-----C-----C-----C-----

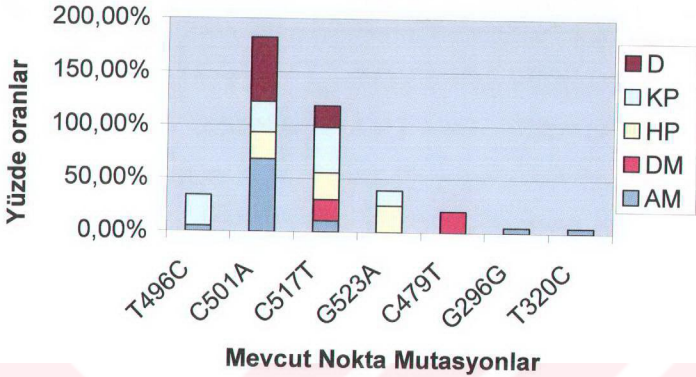
### Donörler

490

550

W GGATCTTC G AC C ACCAGCACGGGACC A TGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

DN1 -----A-----C-----C-----  
 DN2 -----A-----C-----C-----C-----  
 DN3 -----A---T-----C-----C-----  
 DN4 -----A---T-----C-----C-----  
 DN5 -----A---T-----C-----C-----



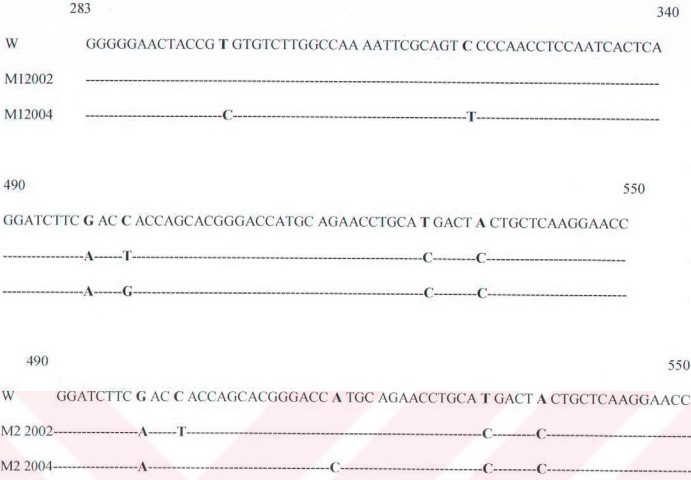
### Mevcut Nokta Mutasyonlar

**Şekil 4.6.** Nokta mutasyonların hasta grupları içerisinde dağılımı

Bütün örneklerde meydana gelen sabit mutasyonların haricindeki mutasyon grupları hangi hasta grubuna ait olduğu dikkate alınmaksızın incelendiğinde tüm hasta popülasyonumuzda en fazla C501A tipi mutasyonun meydana geldiği bunu en yakından takip edenin ise C517T mutasyonu olduğu tesbit edilmiştir. Hasta grupları arasındaki sıklık oranına bakıldığında ise C501A mutasyonunun en çok aile üyelerinde meydana geldiğini, G296G ve T320C mutasyonlarının ise sadece aile üyelerinde oluşurken diğer hasta gruplarında görülmediğini ortaya konmuştur. C479T mutasyonunun ise sadece diyaliz üyelerinde meydana gelmiştir.

Tüm mutasyonlara oransal olarak bakıldığında en fazla mutasyon oluşumu gösteren grup kronik HBV hastalarının bulunduğu grup olup en az ise diyaliz üyelerinin oluşturduğu grup olarak saptanmıştır.

## İki yıl içerisinde iki aile üyesinde ortaya çıkan mutasyon durumu



Bir aileye ait iki üyenin iki yıl içerisinde dizi analizi sonuçlarında meydana gelen nükleotid değişimleri kıyaslandığında tüm izolatlarda bulunan nokta mutasyonların haricinde, M12002'nin 283-340 bölgesinde herhangi bir mutasyon gözlenmemiş iken iki yıl sonra G296G ve T320C nokta mutasyonları gelişmiş, C501A noktasında ise iki yıl sonra T/G farklılaşması saptanmıştır.

M22002'de ise ilk yıl C501A mutasyonu mevcut iken iki yıl sonra bu mutasyon ortadan kalkmış olmasına rağmen iki yıl sonra C517T mutasyonu meydana gelmiştir. Mevcut bir mutasyonun tekrar normale dönmesi ilginç bir sonuç olarak değerlendirilebilir.

Bu iki bireyin 2002 ve 2004'deki jel elektroforezinde oluşturdukları bandların parlaklık konsantrasyonu da farklılık göstermiştir. Mutasyon meydana gelen izolatin immün yanıtın dolayı konsantrasyonunun azalması beklenirken konsantrasyonunun arttığı görülmüştür (Şekil 4.2; M1 için: N6=2002, N7=2004 M2 için: N3=2002, N4=2004).

#### 4.5.2. Hasta Gruplarında Aminoasit Değişim Verileri

Hasta gruplarımızda meydana gelen nükleotid değişimlerinin aminoasit düzeyinde önemli değişikliklere neden olup olmadığını ortaya koyabilmek için mutasyon bölgelerinin aminoasit çevrimi incelenmiştir. Sentez bölgemizin immünojenik tanıma açısından önemli olan transkriplerinde bir takım değişimler ortaya konulmuştur.

Buna göre sentez bölgemiz içerisinde nükleotid değişimlerinin en çok meydana geldiği bölge olan 490-550 aralığının gen bankasındaki aminoasit aralığı 112-131'e tekabül etmektedir, daha az oranda değişimin gözlemlendiği 283-350 nükleotid aralığı ise 43-61 nolu aminoasitlere uyum sağlamaktadır.

#### Aile Üyeleri

##### Aile 1

Nükleotid aralığı	490 – 550
	112 <span style="float: right;">131</span>
W	G S T T T S T G P C R T C M T T A Q G T
A1M1	-----T---P-----
A1M2	---T-----T---P-----
A1M3	-----T---P-----
A1M4	-----T---P-----

##### Aile 2

Nükleotid aralığı	490 – 550
	112 <span style="float: right;">131</span>
W	G S T T T S T G P C R T C M T T A Q G T
A2M1	-----T---P-----
A2M2	-----T---P-----
A2M3	-----T---P-----
A2M4	-----T---P-----
A2M5	-----T---P-----

### Aile 3

Nükleotid aralığı 490 – 550

112

131

W GSSTTSTGPCRTCMTTAQGT

A3M1 -----T---P-----

A3M2 -----T---P-----

### Aile 4

Nükleotid aralığı 490 – 550

112

131

W GSSTTSTGPCRTCMTTAQGT

A4M1 -----T---P-----

A4M2 -----T---P-----

### Aile 5

Nükleotid aralığı 490 – 550

112

131

W GSSTTSTGPCRTCMTTAQGT

A5M1 -----T---P-----

A5M2 -----T---P-----

### Aile 6

Nükleotid aralığı 283-340

43

61

W GGTTVCLGQNSQSPTSNSHS

A6M1 -----A-----F-----

A6M2 -----



Nükleotid aralığı 490 – 550

112

131

W GSSTTSTGPCRRCMTTAQGT

A6M1 -----T--P-----

A6M2 -----T--P-----

### Aile 7

Nükleotid aralığı 490 – 550

112

131

W GSSTTSTGPCRRCMTTAQGT

A7M1 -----T--P-----

A7M2 -----T--P-----

### **Diyaliz Üyeleri**

Nükleotid aralığı 460-550

102

131

W GMLPVCPLIPGSSTTSTGPCRRCMTTAQGT

D1 --M-----T--P-----

D2 --M-----T--P-----

D3 --M-----T--P-----

D4 --M-----T--P-----

D5 --M-----T--P-----

## Hastane Personelleri

Nükleotid aralığı 490 – 550

	112	131
W	GSSTTSTGPCRRTCMTTAQGT	
H1	-----T---P-----	
H2	-----T---P-----	
H3	-----T---P-----	
H4	-----T---P-----	

## Kronik HBV hastaları

Nükleotid aralığı 490 – 550

	112	131
W	GSSTTSTGPCRRTCMTTAQGT	
K1	---T-----T---P-----	
K2	-----T---P-----	
K3	-----T---P-----	
K4	-----S---P-----	
K5	-----T---P-----	
K6	---T-----T---P-----	
K7	-----T---P-----	

## Donörler

Nükleotid aralığı 490 – 550

	112	131
W	GSSTTSTGPCRRTCMTTAQGT	
DN1	-----T---P-----	
DN2	-----T---P-----	
DN3	-----T---P-----	
DN4	-----T---P-----	
DN5	-----T---P-----	

Yüzey antijen sentez bölgesini kapsayan bu bölge üzerinde yapılan aminoasit çevirimi görüldüğü gibi 125.(M→ T) ve 127.(T→ P) değişimi tüm izolatlarda görülmektedir.

Tüm izolatlarda bulunan bu mutasyonlar HBsAg'nin belirleyicisi olan a-determinantının birinci lobu üzerinde (124-137 a.a.) bulunmaktadır.

Tüm izolatlarda bu değişimler gözlenirken sadece K4 bireyinde 125. aminoasit düzeyinde diğerlerinden farklı olarak yer değişim mutasyonuna bağlı olarak aminoasit sentezi de etkilenmiş ve 125. (M→ T) şeklinde olmayıp 125.(M→S) şeklinde değişime uğramıştır.

114.(S→T) değişimi de nadiren gözlenmiştir (A1M2, K1, K2).

Bir aile üyesinde (A6M1) ise 47.(V→ A) ve 55.(S→F) aminoasit değişimleri gözlenmiştir.

Verilerde görüldüğü gibi hasta grupları içerisinde aminoasit değişimini en fazla gösteren gruplar yine kronik hastalar ve aile bireylerinden oluşmaktadır.

### **İki yıl içerisinde iki aile üyesinde ortaya çıkan aminoasit değişimi**

#### **M1 2002-2004**

Nükleotid aralığı 283-340

43

61

W G G T T V C L G Q N S Q S P T S N H S

M1 2002 -----

M1 2004 -----A-----F-----

Nükleotid aralığı 490 – 550

112

131

W G S S T T S T G P C R T C M T T A Q G T

M1 2002 -----T---P-----

M1 2004 -----T---P-----

## M2 2002-2004

Nükleotid aralığı 490 – 550

112

131

W GSSTTSTGPCRTCMTTAQGT

M2 2002 -----T---P-----

M2 2004 -----T---P-----

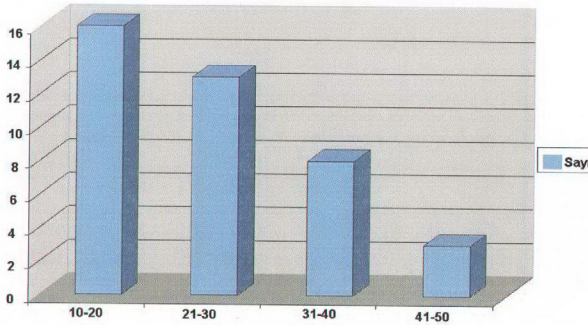
İki yıl içerisinde iki aile üyesinde ortaya çıkan aminoasit değişimi incelendiğinde M1 bireyi dikkat çekmekte olup bu bireyde 2002’de her hangi bir aminoasit değişimi söz konusu değilken iki yıl sonra 47.(V→A) ve 55.(S→F) değişimleri ortaya çıkmıştır.

M2’de ise 2002-2004 arası meydana gelen nükleotid değişimleri aminoasit sentezi üzerinde değişime neden olmadığı görülmüştür.

### 4.6. Yaş ve Cinsiyete Bağlı Bulgular

Serum örnekleri toplanırken kişilerin yaş ve cinsiyetleri de kaydedilmiştir. Buna göre HBV-DNA’sının pozitif olduğu PCR tekniği ile belirlenmiş olan hasta grubunun yaş aralığı 10-50 arasında olup en yüksek bulaşma grubunun 10-20 yaş aralığında olduğu en az taşıyıcılığın ise 41-50 yaş grubunda olduğu görülmüştür.

HBV-DNA Yaş Dağılım Grafiği



Şekil 4.7. Gerçek viriyonun göstergesi olan HBV-DNA’nın yaş dağılımı



21-30 yaş arası

490

550

W GGATCT T C G AC C ACCAGCACGGGACC A TGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

M1 ----- A --- T ----- C --- C -----

M2 ----- A ----- C --- C -----

M3 ----- A --- T ----- C --- C -----

M4 ----- A --- T ----- C --- C -----

M5 ----- A --- T ----- C --- C -----

M6 ----- A ----- C --- C -----

M7 ----- A ----- C --- C -----

M8 ----- A A ----- C --- C -----

M9 ----- A A ----- C --- C -----

M10 ----- A ----- C --- C -----

M11 ----- A --- T ----- C --- C -----

M12 ----- A --- T ----- C --- C -----

31-40 yaş arası

490

550

W GGATCT T C G AC C ACCAGCACGGGACC A TGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC

M1 ----- A ----- C ----- C --- C -----

M2 ----- A --- T ----- C --- C -----

M3 ----- A --- T ----- C --- C -----

M4 ----- A ----- C ----- C --- C -----

M5 ----- A ----- C --- C -----

M6 ----- A ----- C --- C -----

M7 ----- A ----- C ----- C --- C -----

M8 ----- A ----- G ----- C --- C -----

M9 ----- A ----- C ----- C --- C -----

## 41-50 yaş arası

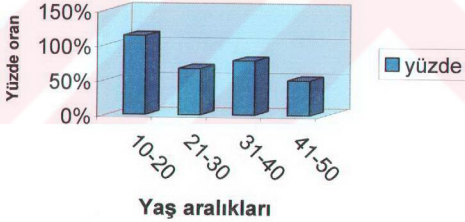
490

550

W GGATCT T C G A C ACCAGCACGGGACC A TGC AGAACCTGCA T GACT A CTGCTCAAGGAACC  
M1 -----A-----T-----C-----C-----  
M2 -----A-----C-----C-----  
M3 -----A-----C-----C-----  
M4 -----A-----C-----C-----C-----

Yaş gruplarını dört ana gruba ayırıp en çok nükleotid değişimlerinin meydana geldiği 460-490 bölgesinde en çok hangi yaş grubunda mutasyonların meydana geldiği saptanmıştır.

### Yaş grupları arasında mutasyon oranı



Şekil 4.8. Yaş aralıklarına göre mutasyon dağılımı

Şekil 4.8'de görüldüğü gibi 460-490 nükleotidleri arasında en fazla mutasyon gelişen grup 10-20 yaş grubu arası olup en az nokta mutasyon çeşitliliği gösteren grup ise 41-50 yaş arası olarak ortaya çıkmıştır.

## 5. TARTIŞMA ve SONUÇ

Çalışmamızın öncelikli amacı bölgeye ait HBV serotipinde, ki çalışmalarımız esnasında bu serotipi genotip D ve subtıp ayw3 olarak saptadık, hasta grupları arasında S gen bölgesinde meydana gelen mutasyonları araştırmak olmasına rağmen aynı zamanda Gaziantep'te daha önce Genotip bulgusu olmaması nedeni ile öncelikle bölge için baskın genotip grubu da saptanmıştır.

HBV genotiplendirmenin önemini şu şekilde sıralayabiliriz; [10,11]

- HBV genotiplerinin incelenmesi HBV enfeksiyonunun biyolojisini anlamaya yardımcı olur.
- Hepatit B genotiplendirilmesi, virüsün patogenezi ve izlediği yolu açıklamak için önemlidir. Çünkü varyantlar terapiye verdikleri yanıt, virulensi, patogenezi ve serolojik aktiviteleri yönünden farklılık gösterebilmektedir.
- Replikasyonun serolojik göstergesi olduğu düşünülen HBeAg üzerine etkisi vardır. Mevcut çalışmalar, hepatit H e antijeni (HBeAg) üretimini azaltan ya da durduran precore ve core promotör bölgelerindeki mutasyonlar ile HBV genotipleri arasında güçlü bir ilişki olduğunu göstermektedir.
- Genotiplendirmenin bir diğer önemi ise HBV genotiplerinin, interferon terapisine verilen yanıt ile de ilişkili olmasıdır.

Son zamanlarda HBV genotiplendirmesi konusunda yeni çalışmalar yapılmaya başlanmıştır. Yedi genotipi saptanan HBV enfeksiyonlarında terapiye verilen yanıtlar farklılık göstermektedir; genotip A genotip D'ye göre ve genotip B genotip C'ye göre interferon tedavisine daha iyi cevap vermektedir [12,13,156]. Bölgesel farklılık gösteren HBV genotipleri Akdeniz bölgesinde D genotipi sıklığı ile karşımıza çıkmaktadır. D genotipi en fazla premutant suşa sahip olan genotiptir [2].



Bölgemiz halkının HBV yüzey antijen (HBsAg) taşıyıcılığı %4-7.5 arası değişmektedir. Güneydoğu Anadolu bölgesi HBV açısından ülkemizde yüksek endemisine alanıdır. Özellikle aile içi taşıyıcılığının daha sık olduğu dikkati çekmektedir. Annesi pozitif olan çocukların bazıları kronik HBV olurken bir kısmında bu durumun olmadığı izlenmektedir. Her ne kadar yapılan çalışmalarda tiplendirim ile kronikleşme arasında tam bir ilişki saptanmasa da HBV temizlenmesinde zaman sürecinde gelişen mutant suşlar kronikleşme ile paraleldir. Özellikle Precore ve core promotor bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar ile genotipler arasında sıkı bir ilişki bulunduğu belirtilmektedir [2, 10].

Almanya'da 64 hasta üzerine yapılan çalışmada interferonun HBeAg üzerine etkisinin Genotip A'lı hastalarda, Genotip D'li hastalara göre daha yüksek olduğu bulunmuştur (%37; %6) [12]. Hindistan'da 130 hasta üzerine yapılan çalışmada ise, Genotip A'da bazal core promotor mutasyon sıklığının Genotip D'ye göre daha yüksek olduğu ( %45; %12) buna karşın, Genotip D'de precore stop kodon mutasyonu sıklığının Genotip A'ya göre daha fazla olduğu ( %43; %6.5) rapor edilmiştir [3].

Tayvan, Japonya ve Çin'de de genotip B ve C üzerinde çalışmalar yapılmıştır. Tayvan'da 58 hasta üzerine yapılan çalışmada HBeAg'nin azalma oranının Genotip B'li hastalarda Genotip C'li hastalara göre önemli ölçüde daha yüksek (%41; %15) olduğunu bulmuşlardır. Ayrıca Genotip B'ye interferon ve lamivudin Genotip C'ye göre daha iyi etki etmektedir [13]. Japonya ve Çin'de yapılan çalışmalar sonucunda ise, genotip B'de genotip C'ye kıyasla yüksek oranda precore stop kodon mutasyonu görüldüğü, Genotip C'de ise B'ye kıyasla yüksek oranda core promotor mutasyonu görüldüğü ortaya konmuştur [12].

Japonya'da kronik HBV enfeksiyonunun klinik sonucu ve hepatosellüler karsinoma (HCC)'nin gelişimi üzerine HBV genotipinin etkisini tanımlamak üzere 26 sirozlu hasta üzerinde çalışılmıştır. Genotip B'li hastaların 19'unun 4'ünde (%21), genotip C'li hastaların 7'sinin 5'inde (%71) HCC geliştiğini bulmuşlardır. Genotip B'li hastaların terapiye iyi sonuç vermeleri ve uzun bir zamanda HCC'nin tekrarlamamasına karşın Genotip C'li hastalar terapiye zayıf yanıt vermekte, terapi uygulanmasına rağmen hızla HCC'nin ilerlemesinden dolayı hepatik zayıflıktan

ölüm gerçekleşmektedir. Böylece HBV genotipi, HCC'nin gelişimi, embolizasyon terapiye yanıt ve HCC'nin tekrarlanması konularıyla ilişkilendirilebilir [13].

Bu şekilde çeşitli ülkelerde hepatit B virüsünün genotipleri arasında virülenslik, patogenezi ve oluşturduğu mutasyonları, vs. arasındaki farklılıklar incelenmekte ve böylece pek çok değerli sonuçlara ulaşarak, genotiplendirmenin, bu virüsün pek çok özelliklerini ve farklılıklarını ortaya koymada büyük ölçüde gerekli olduğu ifade edilmektedir.

Çalışmamızda HBsAg pozitif olan 132 hasta üzerinde uygulanan Moleküler Biyolojik yöntemlerden biri olan ve en yüksek duyarlılığa ve özgüllüğe sahip olan PCR yöntemi ile bu hastaların 40'ında (%30,30) HBV-DNA pozitif bulunmuştur. HBV-DNA pozitif olan tüm örnekler ise Genotip D olarak belirlenmiştir. Dünya haritasında Genotip dağılımlarına bakıldığında Türkiye'nin komşularında Genotip baskınlığı Genotip D şeklinde olup Türkiye'deki verilere bakıldığında ise Akdeniz bölgesindeki genotip verileri de Genotip D üzerinde yoğunlaşmıştır. Yaptığımız bu çalışma ile bölgemiz için HBV genotipi çevre bölgeler ile uyumluluk göstermektedir.

Çalışmamızın devamında belirlediğimiz serotip içerisinde hasta gruplarına bağlı olarak mutasyon analizi yapılmıştır. Bu bölgede meydana gelebilecek nükleotid değişimleri üç farklı tip yüzey antijenini etkileyeceğinden ve bu antijenler de hem viriyonun hepatositi tanıma ve bağlanmasında hem de viriyon varlığının serolojik olarak araştırılmasında önemli antijenik grup olmasından dolayı detaylı olarak araştırılmıştır.

HBV'ye karşı konağın yanıtındaki hedef bölge 100-160 aralığındaki aminoasitleri bulduran HBsAg'nin hidrofilik bölgesi olup bu bölgedeki mutasyonlar HBV varyantlarına farklı bir hayatta kalma avantajı sağlamaktadır. Böyle bir mutasyon, ilk olarak; doğduktan sonra aşılama ve HBIG verilmesine rağmen HBV gelişen İtalyan bir çocukta tanımlanmıştır [14]. Bu mutasyon 145. aminoasitte glisinin arjinine dönüşmesi şeklinde gelişmiştir. Yine bu bölgede tanımlanan diğer ortak mutasyonlar Asp144Ala, Met-133-Leu, Gln -129 - His and Ile/Thr - 126 – Ala şeklindedir [193]. HBsAg ya da S mutasyonları dünyanın bir çok bölgesinde dökümanite edilmiş olmasına rağmen en fazla Asyalı çocuklarda meydana geldiği bildirilmiştir [195]. Yüksek oranda anneden kaynaklı viral bulaşma S gen mutasyonlarının yavrularda da

meydana gelme riskini yükseltmektedir [196]. Aynı mutasyonlar aynı zamanda karaciğer nakli esnasında vericide bulunan S gen mutasyonları HBIg bulunduran alıcıda da meydana gelmektedir. Çok nadiren de olsa bunlar kronik HBV enfeksiyonu esnasında kendiliğinden gelişebilmektedir [15,197].

Bazı S gen mutasyonları diğer klinik olaylarla ilişkilendirilerek tanımlanmıştır. Örneğin; Thr-126-Ala mutasyonu sonradan fulminant hepatik yetmezlik gelişen aşılınmış çocuklarda tanımlanmıştır [198]. Farklı bir diagnostik ilişki ise 121-124 aminoasitleri bölgesine nükleotid eklenmesi ile teşhis konulmamış hastaların sağlığında ve kan nakli sisteminin güvenliğinde bir risk meydana getirecek HBsAg testinde, yanlış negatif sonuca neden olabilmektedir [15,16].

Aşılınmış şempanzelerdeki sonuçlar olumlu düşünmemize neden olmasına rağmen HBIg ve HBV aşılması kişileri S mutant enfeksiyonlarından koruyamamaktadır [17].

HBV'nin diğer formlarında da olduğu gibi S mutantları HCC de dahil olmak üzere akut ve kronik karaciğer hastalığını indüklemektedir [199].

Bu mutantlardaki geçişin horizontal ve vertikal olarak meydana gelebileceği belirtilmiştir [200].

Yapılan bu araştırmalara göre çalıştığımız bölge olan HBV S gen ya da yüzey antijen bölgesinde meydana gelebilecek mutasyonların sonuçları şu şekilde özetlenebilir:

- Varyanta hayatta kalma avantajı sağlamakta bunun sonucunda HCC de dahil olmak üzere akut ve kronik karaciğer hastalıkları indüklemektedir.
- Yüzey antijeninin belli bölgeleri hepatositi tanımda görevli olduğu için bu bölgede meydana gelebilecek bazı değişimler, ki bu durum çok nadir gözlenmekte olup, konağa avantaj sağlamaktadır.
- Serolojik göstergelerde monoklonal antibadilerin mutant antijeni tanımama ve yalancı negatiflik durumları söz konusu olmaktadır.
- Bazı mutant türler aşya karşı direnç oluşturabilir. HBIg ve HBV aşılmasına rağmen HBV-DNA saptanabilmektedir.

S gen bölgesi ile ilgili bu önemli noktaları göz önünde tutarak S gen bölgesi üzerinde belirlediğimiz belirli bir nokta üzerinde (yüzey antijen tiplerinin üçü içinde ortak dizinler bulunduran 250-715 nükleotid aralığı) yaptığımız mutasyon analizi çalışmalarında çeşitli veriler elde edilmiştir.

250-715 nükleotidleri arasında yapılan sekanslama çalışması sonucunda veriler Genbankasındaki Genotip D serotipi ile kıyaslandığında en çok mutasyonların meydana geldiği bölge 460-490 nükleotidleri arasında meydana geldiği görülmüştür. Daha da az olmakla beraber 283- 350 nükleotidleri arasında da bir takım nokta mutasyonlar saptanmıştır. Bu mutasyonlar beş ayrı hasta gruplarında ayrı ayrı değerlendirilmeye alınmıştır.

Hasta grupları içerisinde en fazla mutasyonun geliştiği grup, kronik HBV taşıyıcıları olarak saptanmıştır. Bu sonuç hastalığın kronikleşme aşamasına kadar viriyonun uzun süreli taşınmasından ayrıca kişiler aşılanmamış ve ilaç terapisi görmüyor olmalarından dolayı mutasyonların doğrudan immün yanıtı karşı oluşturulduğunu düşündürmüştür.

İkinci oranda yüksek mutanta sahip gruplar ise aile içi bulaşmanın söz konusu olduğu hastalardır. Buna bağlı olarak ebeveynden bulaşan viriyon ebeveynde mutasyona uğramış ise bu durum çocukta da mutasyonların gelişmesini indüklemektedir. Bu sonuca bağlı olarak ikincil oranda mutasyonların aile içerisinde bulunması beklenen bir sonuç olarak ortaya çıkmıştır.

Üçüncül oranda ise karşımıza hastane personelleri ve donörler çıkmaktadır.

En az ise diyaliz hastalarında mutantlar gelişmektedir. Bunun nedeni ise kişilerin hastanelerde steril olmayan aynı cihaza bağlanmalarından dolayı direk aynı mutant varyanta maruz kalmaları ve bu nedenle aralarında pek de çeşitlilik bulunmaması beklenen bir sonuçtur.

Yapılan mutasyon analizi çalışmamız sonucunda tüm izolatlarda C498A, A531G ve T536C nokta mutasyonu, izolatların % 82,5'inde ise C501A nokta mutasyonu olduğu tesbit edilmiştir.

C498A, A531G ve T536C nokta mutasyonları gibi kalıcı mutasyonların oluşması ve C501A gibi bir mutasyonun da yüksek oranda meydana gelmesi ve olası mutasyonların bu şekilde devam etmesi varyantın wild tip ile farkının %8 oranına ulaşması daha ilerisi için yeni bir genotipin ortaya çıkmasına neden olabilir.

Bu nokta mutasyonlarının haricinde belirli nokta mutasyonların ortaya çıkma sıklığı da araştırılmıştır. C501A nokta mutasyonundan sonra en sık görülen ve bu noktaya yakın olan C517T mutasyonu olup G523A ise bir sonraki sırayı almaktadır. Buldukları hasta grup içerisinde T496C ve C517T nokta mutasyonları yoğun olarak kronik hasta grubunda gözlenmiştir. C479T ise sadece tüm diyaliz hastalarında mevcut olup G296G ve T320C mutasyonlarına sadece aile üyelerinde rastlanmıştır (Şekil 4.6).

Farklı bir mutasyon çeşidi olarak Kronik HBV hastalarımızdan birisinde (K4) A(531→C)G noktasında A(531→G)C yer değişim mutasyonu gözlenmiştir.

İlginç bir sonuç olarak akut taşıyıcı, herhangi bir antiviral terapi görmeyen iki aile bireyinde 2002 yılı ve 2004 yılında aynı dönemlerde alınan serum örnekleri ile yapılan mutasyon analizi çalışmalarımız sonucunda bu bireylerde iki yıl içerisinde G296G, T320C, C501→CA (501 ilk yıl T dönümüğü gösterip ikinci yıl G'ye dönüşmüştür), C517T gibi çeşitli nokta mutasyonların meydana geldiği ancak bu mutasyonlara rağmen immün yanıtın kaçamadığı ve konsantrasyonunun düştüğü görülmüştür.

Bu durum S bölgesindeki mutasyonların önemi kısmında verildiği gibi oluşan bu mutasyonlar, ki bu mutasyonlardan G296G, T320C nokta mutasyonu sadece bu bireylerde gözlenmiştir, viriyonun hepatositi tanıyan antijen bölgesinde oluşmuş olabilir ve bundan dolayı hepatosit içerisine giremeyip viremi oranının düştüğü gözlenmiş olabilir. Bu konuyu daha ayrıntılı olarak inceleyebilmek için nükleik asit dizininin aminoasit üzerinde meydana getirebileceği sonuçlara dayanan verileri ele almak daha kesin karar vermemizi sağlayacaktır.

Yine bu hastalardan birisinde saptanan bir nokta mutasyonunun aynı nokta üzerinde iki yıl içerisinde normal yaygın serotipteki nükleotidlere dönüştüğü gözlenmiştir. Mutasyon C501→CA (2002: 501→T mutant, 2004: 501→C normal serotip) noktası üzerinde meydana gelmiştir. Bu durum viriyonun ilk mutasyonu gerçekleştirdikten

sonra iki yıl içerisinde immün sistemin bu duruma da alışması ve viriyonun kendisini konağın immün sistemine karşı tekrar koruma altına alabilmesi için almış olduğu bir çeşit tedbir şeklinde yorumlanabilir. Ancak bu durum tekrar normal nükleik asite dönüşme şeklinde değil de farklı bir nükleik asite dönüşme şeklinde de gelişebilirdi.

Dizi analizi sonucu ortaya koyduğumuz bu mutasyonların transkriptler üzerinde meydana getirebileceği sonuçları tam olarak anlamak için nükleik asit dizinimizi aminoasit dizinlerine çevirerek belirlediğimiz mutasyonların aminoasit çevriminde herhangi bir değişikliğe neden olup olmadığını araştırılmıştır.

Buna göre 125.(M→ T) ve 127.(T→ P) değişimi tüm izolatlarda görülmekle birlikte sadece K4 bireyinde 125. aminoasit düzeyinde diğerlerinden farklı olarak yer değişim mutasyonuna bağlı olarak aminoasit sentezi de etkilenmiş ve 125. (M→ T) şeklinde olmayıp 125.(M→S) şeklinde değişime uğramıştır. Bunların yanı sıra 114.(S→T) değişimi de gözlenmiştir (A1M2, K1, K2).

Bu bölgelerde meydana gelen değişimler HBsAg'nin klinik olarak en önemli belirleyicisi olan a-determinantı'nı akla getirmektedir.

a-determinantı iki lobdan oluşmakta olup 124-147 a.a. arasında bulunmaktadır. Enfeksiyonun doğal akışı esnasında antibody'ler tüm determinantlara karşı üretilir fakat sadece a-determinantına karşı oluşturulan antibody'ler diğer HBV subtiplerine karşı meydan okumada koruyucudur [201]. a-determinantında meydana gelebilecek mutasyonlar örneğin başarılı bir aktif veya pasif aşılardan sonra selekte olabilir.

a-determinantının konformasyonu iki lob yapısında olup bu yapılar disülfid bağları ile stabilize olup bu bölgeler Cys-124 ve Cys-137 (ilk lob) ve Cys-139 ve Cys-147 (ikinci lob) aralıklarındadır (Şekil 2.11) [94]. Bu loplarda bulunan 4 Cys yüksek oranda korumalı olarak bulunmuştur [202]. Eğer bu konformasyonu değişirse, doğal a-determinantına karşı daha önce oluşturulan antibody'ler daha fazla korumalı olamazlar [14].

Bizim çalışmamızda elde ettiğimiz aminoasit mutasyonlarından 125.(M→T) ve 127.(T→P) mutasyonları a-determinantının birinci lobu üzerinde bulunmaktadır. Bu sonuç, a-determinantının antibody'leri bağlama yeteneğinin azalması ve immün sistemden kaçma avantajının bulunması üzerine yapılan çalışmalar ile uyumluluk

sağlamaktadır. Bu mutasyon grubunun tüm bölgemizde çalışmasını yaptığımız tüm izolatlarda bulunması enfeksiyonun aşılarda ya da doğal bağışıklık ile yenilme oranını düşürebilir ve bu şekilde bölge için tehlike arzedebilir.

Bu mutasyonlardan farklı olarak bir aile üyesinde (A6M1) ise 47.(V→A) ve 55.(S→F) aminoasit değişimleri gözlenmiştir.

Ortaya konulan bu aminoasit değişimlerinin a-determinantı ile ilişkilendirilmesinin yanı sıra sentez bölgemiz tüm yüzey antijenleri üzerinde bulunduğu için bu mutasyonların üç tip yüzey antijenini etkilemesi üzerine de değinilmesi faydalı olacaktır. Özellikle yapılan çalışmalar sonucunda MHBsAg'nin hepatositi tanımada görevli olduğu belirtilmiştir [90]. Buna göre ortaya konulan ve MHBsAg üzerinde de olan bu mutasyonlar viriyonun hepatositi tanıma oranını azaltmaktadır. Bu durum ise a-determinantı ile ilgili sonucun aksine konağa avantaj sağlamaktadır.

Aminoasitler üzerindeki mutasyonlar hasta gruplarımız içerisinde de araştırılmıştır, bunun sonucunda nükleik asit mutasyonlarında olduğu gibi en yüksek aminoasit mutasyonu gösteren gruplar kronik hastalar ve aile bireylerinden oluşmaktadır.

Çalışmamızın istatistiksel analiz sonuçlarına göre yaş grupları arasında mutasyon analizleri, mutasyonların en sık 10-20 yaş grubunda gözlemlendiğini ortaya koymuştur. Bu durum immün sistemin 10-20 yaş grubu bireylerde daha verimli çalışması, doğal bağışıklığın daha rahat kazanılması (daha yaşlı kişilerde enfeksiyonun gerçekleşmesi ile virüsün atılarak doğal bağışıklık kazanma şeklinden ziyade hastalık yapma yüzdesi daha fazla olmaktadır) gibi olguların ilgili yaş grubunda yüksek olmasından kaynaklanabilir.

Tüm bu sonuçlara bağlı olarak Gaziantep ve çevresinde belirlenmemiş olan HBV genotipini belirleyerek ve oluşan mutasyonların transkriptler üzerindeki etkilerini kesin ve spesifik sonuçlar veren MOLEKÜLER BİYOLOJİK teknikler ile ortaya koyarak bölgemizle ilgili değerli verilere ulaşılmıştır.

## 6. KAYNAKLAR

- 1- Kıyan, M. (1998). Viroloji. HBV infeksiyonu. Kılıçturgay, K. (Ed.), *Viral Hepatit 98*, 66-94
- 2- Ustaçelebi, Ş. ve ark. (1999) Viroloji. *Temel ve klinik mikrobiyoloji*, **18**, 871-877
- 3- Kao, J.H. (2002). Hepatitis B viral genotypes: Clinical relevance and molecular characteristics. *Gastroenterology and Hepatology*, **17**: 643
- 4- Aydın, F. (2002) *Moleküler Mikrobiyoloji Kursu Notları*. Trabzon, K.T.Ü. Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
- 5- Yenen, O.Ş. Hepatit B. Wilke Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M (Eds.). (1996). *İnfeksiyon Hastalıkları*, 1. Baskı, Nobel Tıp Kitapevleri, İstanbul, 664-691
- 6- Robinson, W.S., and Marion, P.L. (1998). Biological Features of Hepadnaviruses. Zuckerman, A.J., Alan, R. L. (Eds.), *Viral Hepatitis and Liver Diseases*, New York, 449
- 7- Le Bouvier, G.L., McCollum, R.W., Hierholzer, W.J., Irwin, G.R., Krugman, S., Giles, J.P. (1972). Subtypes of Australia antigen and hepatitis B virus. *JAMA*, **222**, 928-930
- 8- Courouce-Pauty, A.M., Lemaire, J.M., Roux, J.F. (1978). New hepatitis B surface antigen subtypes inside the ad category. *Vox Sang*, **35**, 304-308
- 9- Natio, H., Hayashi, S., Abe, K. (2001). Rapid and specific genotyping system for hepatitis B virus corresponding to six major genotypes by PCR using type-specific primers. *Clinical Microbiology*, **39**: 362-364
- 10- Orito, E., Mizokami, M., Sakugawa, H., Michitaka, K., Ishikawa, K., Ichida, T., Okanoue, T., et al. (2001). A case-control study for clinical and molecular biological differences between hepatitis B viruses of genotypes B and C. *Japan HBV Genotype Research Group. Hepatology*, **33**, 218-223



- 11- Rodriguez-Frias, F., Buti, M., Jardí, R., Cotrina, M., Viladomiu, L., Esteban, R., Guardia, J.(1995). Hepatitis B virus infection: precore mutants and its relation to viral genotypes and core mutations. *Hepatology* **22**, 1641-1647
- 12- Erhardt, A., Reineke, U., Blondin, D., Gerlich, W.H., Adams, O., Heintges, T., Niederau, C., et al. (2000). Mutations of the core promoter and response to interferon treatment in chronic replicative hepatitis B. *Hepatology*, **31**, 716-725
- 13- Kao, J.H., Wu, N.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S. (2000). Hepatitis B genotypes and the response to interferon therapy. *J Hepatol*, **33**, 998-1002
- 14- Carman, W.F., Zanetti, A.R., Karayiannis, P., et al. (1990). Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet*, **336**, 325-329
- 15- Yamamoto, K., Horikita, M., Tsuda, F., et al. (1994). Naturally occurring escape mutants of hepatitis B virus with various mutations in the S gene in carriers seropositive for antibody to hepatitis B surface antigen. *J Virol*, **68**, 2671-2676
- 16- Wallace, L.A., Carman, W.F. (1994). Clinical implications of hepatitis B virus envelope protein variation. *Int J Clin Lab Res*, **24**, 80-85
- 17- Ogata, N., Cote, P.J., Zanetti, A.R., et al. (1999). Licensed recombinant hepatitis B vaccines protect chimpanzees against infection with the prototype surface gene mutant of hepatitis B virus. *Hepatology*, **30**, 779-86
- 18- Mahoney, F.J. (1999). Update on diagnosis, management, and prevention of Hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol rev*, **12(2)**, 351-66
- 19- Prince, A.M. (1984). Detection of the relation between the Australia antigen and hepatitis B virus. *Milestones in blood transfusion and immunohaematology*, 2257-2260
- 20- Vyas, G.N. and Yen, T.S.B. (1999). Hepatitis B virus - Biology, pathogenesis, epidemiology, clinical description, and diagnosis. In: Specter S. *Viral Hepatitis - Diagnosis, Therapy, and Prevention*. New Jersey: Humana Pres, 35
- 21- Kaplan, P.M., Greenman, R.L., Gerin, J.L., Purcell, R.H. Robinson, W.S. (1973). DNA polymerase associated with human hepatitis B antigen. *J. Virol.*, **12**, 995-997

- 22- Robinson, W.S., Clayton, D.A., Greenman, R.L. (1984). DNA of a human hepatitis B virus candidate. *J. Virol.*, **14**, 384-388
- 23- Tiollais, P., Charnay, P., Vyas, G.N. (1981). Biology of Hepatitis B virus. *Science*, **213**, 404-411
- 24- Hollinger, B.F. (1990). Hepatitis B virus. *Virology*, 2171-2190
- 25- Kılıçturgay, K. (1989). Viral hepatit etkenleri. *Klinik Mikrobiyoloji* **39**, 237-238
- 26- <http://www.hyg.uni-heidelberg.de/molvir/en/hbv/hbv.htm>
- 27- Onodera, S. et al. (1982). *J. Med. Virol.*, **15**, 147-156
- 28- Hoofnagle, J.H., (1981). Serological markers of hepatitis B virus infection. *Annu. Rev. Med.*, **32**, 1-11
- 29- <http://www.globalseve.net/~harlequin/HBV/hbvparts.htm>
- 30- <http://www.globalseve.net/~harlequin/HBV/hbvcore.htm>
- 31- Terrault, N.A., and Wright, T.L. (1998). Viral hepatitis A through G. In: Feldman M, Scharschmidt BF, Sleisenger MH (Eds.). *Sleisenger & Fordtran's Gastrointestinal and Liver Disease: Pathophysiology, Diagnosis, Management*. New York, W.B. Saunders Company, 1123-1155
- 32- Raney, A.K., and McLachlan, A. (1991). *In Molecular Biology of the Hepatitis B Virus*, 1-38, Florida: CRC Press, Boca Raton.
- 33- Ganem, D. (1996). *Hepadnaviridae and their replication. Field Virology*. 3 rd. Field, B.N., Knipe, D.M. (Eds.), Lippincott. Raven Press., 2703-2737
- 34- Serter, D. (1997). Hepatit Virüsleri ve Viral Hepatitler. *Virüs, Riketsiya ve Klamidya Hastalıkları*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 175-206
- 35- Heermann, K.H. et al. (1984). Large surface proteins of hepatitis B virus containng the pre-S sequence. *J. Virol.*, **52**, 396-402
- 36- Russnak, R., and Ganem, D. (1990). *Genes and Dev.*, **4**, 764-776
- 37- Sheets, M. et al. (1990). Point mutations in AAUAAA and the poly(A) addition site: effects on the accuracy and efficiency of cleavage and polyadenylation in vitro. *Nucleic Acids Res.*, **18**, 5799-5805
- 38- Lopez-Cabrera. et al. (1990). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **87**, 5069-5087

- 39- Zhang, P. et al. (1993). *J. Virol*, **56**, 1472-1492
- 40- Lau, J.Y.N., and Wright, T.L. (1993). Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet*, **342**, 1335-1344
- 41- Gerlich, W. (1993). HBV: Structure and molecular virology. Zuckerman AJ, and Thomas HC (Eds). *In Viral Hepatitis*, New York, Churchill Livingstone Publication, , 83-115
- 42- Chen, I.H., Huang, C.J., Ting, L.P. (1995). Overlapping initiator and TATA box functions in the basal core promoter of hepatitis B virus. *J. Virology*, **69**, 3647-3657
- 43- Okamoto, H., Tsuda, F., Akahane, Y., Sugai, Y., Yoshida, M., Moriyama, K., Tanaka, T., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1994). Hepatitis B virus with mutations in the core promoter for an e antigen-negative phenotype in carriers with antibody to e antigen. *J. Virology*, **68**, 8102-8110
- 44- Sato, S., Suzuki, K., Akahane, Y., Akamatsu, K., Akiyama, K., Yunomura, K., Tsuda, F., Tanaka, K., Okamoto, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1995). Hepatitis B virus strains with mutations in the core promoter in patients with fulminant hepatitis. *Ann Intern Med*, **122**, 241-248
- 45- Laskus, T., Rakela, J., Tong, M.J., Nowicki, M.J., Mosley, J.W., Persing, D.H. (1994). Naturally occurring hepatitis B virus mutants with deletions in the core promoter region. *J. Hepatology*, **20**, 837-841
- 46- Eble, B.E., Lingappa, V.R., Ganem, D. (1986). Hepatitis B Surface Antigen: An Unusual Secreted Protein Initially Synthesized as a Transmembrane Polypeptide. *Mol. and Cell Biology*, **6**, 1454-1463
- 47- Heermann, K.H., Goldmann, U., Schwartz, W., Seyffarth, T., Baumgarten, H., Gerlich, W.H. (1984). Large Surface Proteins of Hepatitis B Virus Containing the Pre-S Sequence. *J. Virol.*, **52**, 396-402
- 48- Heermann, K.H., and Gerlich, W.S. (1991). Surface Proteins of Hepatitis B Viruses. In McLachlan, A. (Ed.) *Molecular Biology of the Hepatitis B Viruses*. Boca Raton, CRC Press, 109-144

- 49- Schaller, H., and Fischer, M. (1991). *In Current Topics in Microbiology and Immunology*. Mason, W.S., Seeger, C. (Eds.), 21-39. Springer-Verlag, Berlin-Heidleberg, Germany.
- 50- Shaul, Y. (1991). *In Molecular Biology of Hepatitis B Virus*. McLachlan, A. (Ed). Boca Raton, Florida, CRC Press 193-211
- 51- Persing, D.H. (1986). *Science*, **234**, 1388-1398
- 52- Chisari, F.V. et al. *J. Virol.*, **60**, 880-892
- 53- Strandring, D.N. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 9338-9346
- 54- Zhou, D.X., and Yen, T.S.B. (1991). *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1353-1365
- 55- Courtois, G. et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **85**, 7937-7952
- 56- Zhou, D.X., and Yen, T.S.B. (1991). *Mol. Cell. Biol.*, **11**, 1353-1361
- 57- Raney, A.K. et al. (1995) *J. Virol.*, **69**, 3265-3275
- 58- Yuh, C.H., and Ting, L.P.J. *J. Virol.*, **64**, 4281-4232
- 59- Su, H., and Yee, J.K. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **89**, 2708-2712
- 60- Raney, A.K. et al. (1989). *J. Virol.*, **63**, 3919-3928
- 61- Xu, Z., Jensen, G., Yen, T.S. (1997). Activation of Hepatitis B Virus S Promoter by the Viral Large Surface Protein via Induction of Stress in the Endoplasmic Reticulum. *J. Virol.*, **71(10)**, 7387-7392
- 62- Treinin, M., and Laub, O. (1987). *Mol. Cell. Bio.*, **7**, 545-558
- 63- Siddiqui, A. et al. (1987). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **84**, 2513-2528
- 64- Yee, J. (1989). A liver-specific enhancer in the core promoter region of human hepatitis B virus. *Science*, **246**, 658-670
- 65- Yen, T.S.B. (1993). Regulation of hepatitis B virus gene expression. *Semin. Virol.*, **4**, 33-42
- 66- Lopez-Cabrera, M. et al. (1990). Transcriptional factor C/EBP binds to and transactivated the enhancer II element of the hepatitis B virus. *Virology*, **183**, 825-829

- 67- Chiang, P.W. et al. (1992). Characterization of a *cis* element required for packaging and replication of the human hepatitis B virus. *Virology*, **186**, 701-711
- 68- Junker-Niepmann, M. et al. (1990). A short *cis*-acting sequences is required for hepatitis B virus pregenome encapsidation and sufficient for packaging of feoreign RNA. *EMBO J.*, **9**, 3389-3396
- 69- Pollack, J. et al. (1993). An RNA stem-loop structure directs hepatitis B virus genomic RNA encapsidation. *J. Virol.*, **67**, 3254-3263
- 70- Hirsch, R. et al. (1991). *Cis*-acting sequences required for encapsidation of duck hepatitis B virus pregenomic RNA. *J. Virol.*, **65**, 3309-3316
- 71- Junker-Niepmann, M. et al. (1990). A short *cis*-acting sequence is required for hepatitis B virus pregome encapsidation and sufficient for packaging of foreign RNA. *EMBO J.*, **9**, 3389-3396
- 72- Pollack, J. et al. (1994). Site-specific RNA binding by a hepatitis B virus reverse transcriptase initiates two reactions: RNA packaging and DNA synthesis. *J. Virol.*, **68**, 5579-5587
- 73- Pabo, C.O., and Sauer, R.T. (1992). Transcription factors: Structural families principles of DNA recognition. *Annu. Rev. Biochem.*, **61**, 1053-1095
- 74- Seeger, C., Mason, W.S. (2000). Hepatitis B virus biology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64(1)**, 51-68
- 75- Kann, M., Lu, X., Gerlich, W.H. (1995). Recent studies on replication of hepatitis B virus. *J. Hepatol.*, **22**, ( Suppl 1), 9
- 76- Arauz, R.P., Norder, H., Visona, K.A., Magnius, L.O. Moleculer epidemiology of Hepatitis B Virus in Central America reflected in the genetic variability of the small gene. *J. I. D.*, **176**, 851-868
- 77- Robinson, W.S. (1991). Hepadnaviridae and their replication. Fields, B.W., Knipe, D.M. (Eds), *Fundamental Virology*. New York, Raven Press. Ltd.. 989-1021
- 78- Kıyan, M. (2001). Hepatit B virusu. Kılıçturgay, K., Badur, S. (Eds.), *Viral Hepatit*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 86-120

- 79- Seyec, J.L., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P. (1999). Infection process of the hepatitis B virus depends on the presence of a defined sequence in the Pre-S1 domain. *J. Virol.*, **73(3)**, 2052-2057
- 80- Jeong, J.K., Yoon, G.S., Ryu, W.S. (2000). Evidence that 5'-end cap structure is essential for encapsidation of hepatitis B virus pregenomic RNA. *J. Virol.*, **74(12)**, 5502-5508
- 81- Flint, S.J., Enquist, L.W., Krug, R.M., Racaniella, V.R., Skalka, A.M. (2000). *Principles of Virology- Molecular Biology, Pathogenesis, and Control*. Washington, ASM Press, 224-234
- 82- Badur, S. (1994). Viral Hepatit 94. Kılıçturgay, K. (Ed.), *Hepatit B Virüsü (HBV) Moleküler ve serolojik Tanı*, 65-99
- 83- Wilke Topçu, A., Söyletir, G., Doğanay, M. (Eds). (2002). *İnfeksiyon Hastalıkları ve Mikrobiyolojisi*. İstanbul, Nobel Tıp Kitapevleri, 1350-1360
- 84- Nassal, M. (1999). Hepatitis B virus replication: novel roles for virus-host interactions. *Intervirology*, **42**, 100-116
- 85- Seyec, J.L., Chouteau, P., Cannie, I., Guguen-Guillouzo, C., Gripon, P. (1998). Role of Pre-S2 domain of the large envelope protein in Hepatitis B virus assembly and infectivity. *J. Virol.*, **72(7)**, 5573-5578
- 86- Lee, W. (1997). H: Hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.*, **337**, 1733-1745
- 87- Neurath, A.R., Kent, S.B.H., Strick, N., Parker, K. (1986). Identification and chemical synthesis of a host cell receptor-binding site on hepatitis B virus. *Cell.*, **46**, 429-436
- 88- Itoh, Y., Takai, E., Ohnuma, H. et al. (1986). A synthetic peptide vaccine involving the product of the Pre-S2 region of Hepatitis B virus DNA: protective efficacy in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, **83**, 9174-9177.
- 89- Neurath, A.R., Kent, S.B.H., Parker, K. et al. (1986). Antibodies to a synthetic peptid from the Pre-S2 120-145 region of the Hepatitis B virus envelope are virus neutralizing. *Vaccine*, **4**, 35

- 90- Thomas, H.L., Foster, G.R., Sumiya, M. et al. (1996). Mutation of gene for mannose-binding protein associated with chronic hepatitis B viral infection. *Lancet*, **348**, 1417-1419
- 91- Akan, E. (1994). *Hepatitler. Genel ve Özel Viroloji*. (3. Baskı). İzmir, Saray Kitapevleri, 502-549
- 92- Guerrero. E., Gavilenes, F., Peterson, D.L. (1988). Viral Hepatitis and liver disease. Zuckerman, A.J. (Ed), *Model of protein arrangement in HBsAg particles on physical and chemical studies*, 606-613
- 93- Peterson, D., L, Paul D.A., Gavilenes, F., Achord, D.T. (1984). Advances in Hepatitis Research. Chisari, F.V. (Ed.), *Hepatitis B surface antigen: protein structure and the development of alternative hepatitis B vaccine*. New York, Massen Publishing USA Inc. 30-39
- 94- Brown, S.E., Howard, C.R., Zuckerman, A.J., Steward, M.W. (1984). Affinity of antibody responses in man to hepatitis B vaccine determined with synthetic peptides. *Lancet*, **2**, 184-187
- 95- Lemon, S.M, Thomas, D.L. (1997). Vaccines to prevent viral hepatitis. *N. Engl. J. Med.*, **336**, 196-204
- 96- Ulrich, P.P., Romesh, A., Bhat, R., Kelly, I., Brunetto, M.R., Benino, F., Vyas, G.N. (1990). A precore-minus mutant of hepatitis B virus causes e antigen negative chronic liver disease. *J. Med. Virol.*, **31**, 441-448
- 97- Tong, S.P., Li, J.S., Vitviski, L., Trepo, C. (1992). Replication capacities of natural and artificial precore stop codon mutants of hepatitis B virus relevance of pregenom encapsidation signal. *J. Med. Virol.*, **191**, 237-245
- 98- Kılıçturgay, K. (1995). Hepatit B Virüsünde mutasyon ve Getirdiği sorunlar. *Viral Hepatit Derg.*, **1**, 1-7
- 99- Chermello, L., Pontisso, P., Schiavon, E., Thiers, V., Tagariella, G., Albert, A. (1988). Hepatitis B core antigen in serum during acute hepatitis B. *J. Med. Virol.*, **24**, 361-365
- 100- Giessler, M., Tokushige, K., Chante, C.C., Zurawski, V.R., Wands, J.R. (1997). Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural

- proteins in mice after DNA based immunisation. *Gastroenterology*, **112**, 1307-1320
- 101- Hsia, C.C., Yuwen, H., Tabor, E. (1996). Hot spot mutations in hepatitis B virus X gene in hepatocellular carcinoma. *Lancet*, **348**, 625-626
- 102- Viral Hepatitle Savaşım Derneği - [www\\_vhsd\\_org.htm](http://www.vhsd.org.htm)
- 103- Omata, M., Ehata, T., Yokosuka, O., Hosoda, K., Ohto, M. (1991) Mutations in the precore region of hepatitis B virus DNA in patients with fulminant and severe hepatitis. *N. Engl. J Med.*, **324**, 1699-1704
- 104- Niitsuma, H., Ishii, M., Saito, Y., Miura, M., Kobayashi, K., Ohori, H., Toyota, T. (1995). Prevalence of precore-defective mutant of hepatitis B virus in HBV carriers. *J. Med. Virol.*, **46**, 397-402
- 105- Laskus, T., Persing, D.H., Nowicki, M.J., Mosley, J.W., Rakela, J. (1993). Nucleotide sequence analysis of the precore region in patients with fulminant hepatitis B in the United States. *Gastroenterology*, **105**, 1173-1178
- 106- Liang, T.J., Hasegawa, K., Munoz, S.J., Shapiro, C.N., Yoffe, B., McMahon, B.J., Feng, C., Bei, H., Alter, M.J., Dienstag, J.L. (1994). Hepatitis B virus precore mutation and fulminant hepatitis in the United States. A polymerase chain reaction-based assay for the detection of specific mutation. *J. Clin. Invest.*, **93**, 550-555
- 107- Karasawa, T., Aizawa, Y., Zeniya, M., Kuramoto, A., Shirasawa, T., Toda, G. (1995). Genetic heterogeneity in the precore region of hepatitis B virus in hepatitis B e antigen-negative chronic hepatitis B patients: spontaneous seroconversion and interferon-induced seroconversion. *J. Med. Virol.*, **45**, 373-380
- 108- Lorient, M.A., Marcellin, P., Talbodec, N., Guignon, V., Gigou, M., Boyer, N., Bezeaud, A., Erlinger, S., Benhamou, J.P. (1995). Low frequency of precore hepatitis B virus mutants in anti-hepatitis B e-positive reactivation after loss of hepatitis B e antigen in patients with chronic hepatitis B. *Hepatology*, **21**, 627-631
- 109- Bahn, A., Hilbert, K., Martine, U., Westedt, J., von Weizsacker, F., Wirth, S. (1995). Selection of a precore mutant after vertical transmission of different



- hepatitis B virus variants is correlated with fulminant hepatitis in infants. *J. Med. Virol.*, **47**, 336-341
- 110- Brunetto, M.R., Rodriguez, U.A., Bonino, F. (1999). Hepatitis B virus mutants. *Intervirology*, **42**, 69-80
- 111- Brunetto, M.R., Giarin, M., Saracco, G., Oliveri, F., Calvo, P., Capra, G., Randone, A., Abate, M.L., Manzini, P., Capalbo, M., et al. (1993). Hepatitis B virus unable to secrete e antigen and response to interferon in chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, **105**, 845-850
- 112- Angus, P.W., Locarnini, S.A., McCaughan, G.W., Jones, R.M., McMillan, J.S., Bowden, D.S. (1995). Hepatitis B virus precore mutant infection is associated with severe recurrent disease after liver transplantation. *Hepatology*, **21**, 14-18
- 113- McMillan, J.S., Bowden, D.S., Angus, P.W., McCaughan, G.W., Locarnini, S.A. (1996). Mutations in the hepatitis B virus precore/core gene and core promoter in patients with severe recurrent disease following liver transplantation. *Hepatology*, **24**, 1371-1378
- 114- Booth, J.C., Goldin, R.D., Brown, J.L., Karayiannis, P., Thomas, H.C. (1995). Fibrosing cholestatic hepatitis in a renal transplant recipient associated with the hepatitis B virus precore mutant. *J. Hepatology*, **22**, 500-503
- 115- Lindh, M., Horal, P., Dhillon, A.P., Furuta, Y., Norkrans, G. (1996). Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis B e antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology*, **24**, 494-501
- 116- Tassopoulos, N.C., Volpes, R., Pastore, G., Heathcote, J., Buti, M., Goldin, R.D., Hawley, S., Barber, J., Condreay, L., Gray, D.F. (1999). Efficacy of lamivudine in patients with hepatitis B e antigen-negative/hepatitis B virus DNA-positive (precore mutant) chronic hepatitis B. Lamivudine Precore Mutant Study Group. *Hepatology*, **29**, 889-896
- 117- Tillmann, H., Trautwein, C., Walker, D., Michitaka, K., Kubicka, S., Boker, K., Manns, M. (1995). Clinical relevance of mutations in the precore genome of the hepatitis B virus. *Gut*, **37**, 568-573
- 118- Protzer, U., Trippler, M., Ohl, J., Knolle, P., Duchmann, R., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Gerken, G. (1996). Rare pre-core stop-codon mutant nt.

- 1897 predominates over wide-spread mutant nt. 1896 in an unusual course of chronic hepatitis B. *J. Viral Hepat.*, **3**, 155-162
- 119- Naoumov, N.V., Thomas, M.G., Mason, A.L., Chokshi, S., Bodicky, C.J., Farzaneh, F., Williams, R., Perrillo, R.P. (1995). Genomic variations in the hepatitis B core gene: a possible factor influencing response to interferon alfa treatment. *Gastroenterology*, **108**, 505-514
- 120- Schepis, F., Verucchi, G., Pollicino, T., Attard, L., Brancatelli, S., Longo, G., Raimondo, G. (1997). Outcome of liver disease and response to interferon treatment are not influenced by hepatitis B virus core gene variability in children with chronic type B hepatitis. *J. Hepatology*, **26**, 765-770
- 121- Akarca, U.S., and Lok, A.S. (1995). Naturally occurring hepatitis B virus core gene mutations. *Hepatology*, **22**, 50-60
- 122- Bozkaya, H., Ayola, B., Lok, A.S. (1996). High rate of mutations in the hepatitis B core gene during the immune clearance phase of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, **24**, 32-37
- 123- Carman, W.F., Boner, W., Fattovich, G., Colman, K., Donran, E.S., Thursz, M., Hadziyannis, S. (1997). Hepatitis B virus core protein mutations are concentrated in B cell epitopes in progressive disease and in T helper cell epitopes during clinical remission. *J. Infect. Dis.*, **175**, 1093-1100
- 124- Marinos, G., Torre, F., Gunther, S., Thomas, M.G., Will, H., Williams, R., Naoumov, N.V. (1996). Hepatitis B virus variants with core gene deletions in the evolution of chronic hepatitis B infection. *Gastroenterology*, **111**, 183-192
- 125- Gotoh, K., Mima, S., Uchida, T., Shikata, T., Yoshizawa, K., Irie, M., Mizui, M. (1995). Nucleotide sequence of hepatitis B virus isolated from subjects without serum anti-hepatitis B core antibody. *J. Med. Virol.*, **46**, 201-206
- 126- Waters, J.A., Kennedy, M., Voet, P., Hauser, P., Petre, J., Carman, W., Thomas, H.C. (1992). Loss of the common "A" determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J. Clin. Invest.*, **90**, 2543-2547

- 127- Ogata, N., Zanetti, A.R., Yu, M., Miller, R.H., Purcell, R.H. (1997). Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J. Infect. Dis.*, **175**, 511-523
- 128- Protzer-Knolle, U., Naumann, U., Bartenschlager, R., Berg, T., Hopf, U., Meyer zum Buschenfelde, K.H., Neuhaus, P., Gerken, G. (1998). Hepatitis B virus with antigenically altered hepatitis B surface antigen is selected by high-dose hepatitis B immune globulin after liver transplantation. *Hepatology*, **27**, 254-263
- 129- Jongerius, J.M., Wester, M., Cuyper, H.T., van Oostendorp W.R., Lelie, P.N., van der Poel, C.L., van Leeuwen, E.F. (1998). New hepatitis B virus mutant form in a blood donor that is undetectable in several hepatitis B surface antigen screening assays. *Transfusion*, **38**, 56-59
- 130- Sterneck, M., Kalinina, T., Otto, S., Gunther, S., Fischer, L., Burdelski, M., Greten, H., Broelsch, C.E., Will, H. (1998). Neonatal fulminant hepatitis B: structural and functional analysis of complete hepatitis B virus genomes from mother and infant. *J. Infect. Dis.*, **177**, 1378-1381
- 131- Pollicino, T., Zanetti, A.R., Cacciola, I., Petit, M.A., Smedile, A., Campo, S., Saggiocca, L., Pasquali, M., Tanzi, E., Longo, G., Raimondo, G. (1997). Pre-S2 defective hepatitis B virus infection in patients with fulminant hepatitis. *Hepatology*, **26**, 495-499
- 132- Aye, T.T., Bartholomeusz, A., Shaw, T., Bowden, S., Breschkin, A., McMillan, J., Angus, P., Locarnini, S. (1997). Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in a patient following liver transplantation. *J. Hepatology*, **26**, 1148-1153
- 133- Allen, M.I., Deslauriers, M., Andrews, C.W., Tipples, G.A., Walters, K.A., Tyrrell, D.L., Brown, N., Condreay, L.D. (1998). Identification and characterisation of mutations in hepatitis B virus resistant to lamivudine. *Hepatology*, **27**, 1670-1677
- 134- Melegari, M., Scaglioni, P.P., Wands, J.R. (1998). Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology*, **27**, 628-633

- 135- Feitelson, M.A., Duan, L.X., Guo, J., Sun, B., Woo, J., Steensma, K., Horiike, N., Blumberg, B.S. (1995). X region deletion variants of hepatitis B virus in surface antigen-negative infections and non-A, non-B hepatitis. *J. Infect. Dis.*, **172**, 713-722
- 136- Baumert, T.F., Rogers, S.A., Hasegawa, K., Liang, T.J. (1996). Two core promoter mutations identified in a hepatitis B virus strain associated with fulminant hepatitis result in enhanced viral replication. *J. Clin. Invest.*, **98**, 2268-2276
- 137- Kanai, K., Kako, M., Aikawa, T., Hino, K., Tsubouchi, H., Takehira, Y., Iwabuchi, S., Kawasaki, T., Tsuda, F., Okamoto, H., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1996). Core promoter mutations of hepatitis B virus for the response to interferon in e antigen-positive chronic hepatitis B. *Am J. Gastroenterol.*, **91**, 2150-2156
- 138- Hsia, C.C., Nakashima, Y., Tabor, E. (1997). Deletion mutants of the hepatitis B virus X gene in human hepatocellular carcinoma. *Biochem Biophys Res. Commun.*, **241**, 726-729
- 139- Sirma, H., Giannini, C., Poussin, K., Paterlini, P., Kremsdorf, D., Brechot, C. (1999). Hepatitis B virus X mutants, present in hepatocellular carcinoma tissue abrogate both the antiproliferative and transactivation effects of HBx. *Oncogene*, **18**, 4848-4859
- 140- Capovilla, A., Carmona, S., Arbuthnot, P. (1997). Hepatitis B virus X-protein binds damaged DNA and sensitizes liver cells to ultraviolet irradiation. *Biochem Biophys Res. Commun.*, **232**, 255-260
- 141- Okamoto, H., Tsuda, F., Sakugawa, H., Sastrosoewignjo, R.I., Imai, M., Miyakawa, Y., Mayumi, M. (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *J. Gen. Virol.*, **69**, 2575-2583
- 142- Naumann, et. Al. (1993). Identification of a new hepatitis B virus (HBV) genotype from Brazil that expresses HBV surface antigen subtype adw4. *Journal of General Virology*, **74**, 1627-1632

- 143- Norder, H., Courouce, A.M., Lars, M.O. (1992). Molecular basis of hepatitis B virus serotype within four major subtypes. *Journal of General Virology*, **73**, 3141-3145
- 144- Stuyver, L., De Gendt, S., Van Geyt, C., Zoulim, F., Friend, M., Schinazi, R. F., Rossau, R. (2000). A new genotype of hepatitis B virus complete genome and phylogenetic relatedness. *J. Gen. Virol.*, **81**, Pt 1: 67-74
- 145- Patricia, A.R., Norder, H., Visona, A.K., Magnius, O.L. (1997). Molecular Epidemiology of hepatitis B virus in Central America Reflected in the Genetic Variability of the Small S Gene. *The Journal of Infectious Diseases*, **176**, 851-858
- 146- Lindh, M., Andersson S.A., Gusdal, A. (1997). Genotypes nt 1858 Variants, and Geographic Origin of Hepatitis B virus-large-scale Analysis Using a New Genotyping method. *The Journal of Infectious Diseases*, **75**, 1285-1293
- 147- Norder, H., Courouce, A.M., Magnius, O.L. (1994). Complete Genomes Phylogenetic Relatedness, and Structural Proteins of Six Strains of the Hepatitis B virus, Four of Which Represent Two New Genotypes. *Virology*, **198**, 489-503
- 148- Kao, J.H., Chen, P.J., Lai, M.Y., Chen, D.S. (2000). Hepatitis B genotypes correlate with clinical outcome in patients with chronic hepatitis B. *Gastroenterology*, **118** (3), 554-559
- 149- Nicolas, C., Tassopoulos, et. al. (1999). Efficacy of Lamivudine in Patients With Hepatitis Be Ag Negative/hepatitis B virus DNA Positive (precore mutants) Chronic Hepatitis B. *Hepatology*, **29**, 889-896
- 150- Bağcı, S., Torre, F., Styver, L., Maertens, G., Naoumov, N.V., Alper, A., Williams, R. (1996). Hepatit B virus genotiplerinin Precore/Core gen mutasyonlarının Gelişimi ve interferon Tedavisinin sonuçları üzerine etkisi. *Gastroenterology*, **7** (1 Ek), 8
- 151- Grandjacques, C., Pradat, P., Stuyver, L., Chevallier, M., Chevallier, P., Picho, C., Maisonnas, M., Trepo, C., Zoulim, F. (2000). Rapid detection of genotypes and mutations in the pre-core promoter and the pre-core region of hepatitis B

- virus genome: Correlation with viral persistence and disease severity. *J. Hepatol.*, **33** (3), 430-439
- 152- Blacberg, J., Kidd-Ljunggren, K. (2000). Genotypic differences in the hepatitis B virus core promoter and precore sequences during seroconversion from HBeAg to anti HBe. *J. Med. Virol.*, **60** (2), 107-112
- 153- Bozdayı, A.M., Uzunalimođlu, Ö., Bozkaya, H., Karayalçın, S., Yurdaydın, C., Çetinkaya, H., Aydođan, H., Arslan, M., Özsan, H. (1996). Türkiye’de Kronik hepatit B virüsü enfeksiyonu olan hastalarda Prekor geni ve Kor promotor Mutasyonu Prevelansı. *Gastroenteroloji*, **7** (1 Ek), 9
- 154- Mayerat, C., Mantegani, A., Frei, P.C. (1999). Does hepatitis B virus (HBV) genotype influence the clinical outcome of HBV infection? *J. Viral. Hepat. Jul.*, **6** (4), 299-304
- 155- Ustaçelebi, Ş. ve ark. (1999). *Temel ve klinik mikrobiyoloji, viroloji*, **18**, 871-877
- 156- Zhang, X., Zoulim, F., Habersetzer, F., Xiong, S., Trepo, C. (1996). Analysis of hepatitis B virus genotypes and pre-core region variability during interferon treatment of HBe antigen negative chronic hepatitis B. *J. Med. Virol.*, **48**, 8-16
- 157- Kılıçturgay, K., and Mıstık, R. (1994). Viral Hepatit’ 94. Kılıçturgay, K. (Ed.), *Türkiye’de Viral Hepatitler (Genel Durum)*. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 1-14
- 158- Mıstık, R., Balık İ. (1998). Viral Hepatit’98. Kılıçturgay, K. (Ed.), *Türkiye’de Viral Hepatitlerin Epidemiyolojisi*, Bir Meta analiz. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 9-39
- 159- Bayraktar, Y. (1998). Viral Hepatit’98. Kılıçturgay, K. (Ed.), *Viral Hepatitler ve Hepatoselüler Karsinoma*. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği Yayını, 320-327
- 160- Robinson, W.S. (1995). Hepatitis B Virus and Hepatitis D Virus. Mandell, G. L., Bennett, J.E., Dolin, R. (Eds.), *Principles and Practice of Infectious Diseases* (4<sup>th</sup> ed.). New York, Churchill Livingstone, 1406-1439
- 161- Balık, İ. (1994). Viral Hepatit’94. Kılıçturgay, K. (Ed.), *Hepatit B epidemiyolojisi*. İstanbul, Nobel Tıp Kitabevleri, 91-101

- 162- Yalçın, M., and Bardak, M. (1997). Türkiye İstatistik Yıllığı 1987-1994. *Sağlık Bakanlığı Yayını*, **589**, 62-63
- 163- Hofer, M., Joller, Jemelka, H.I., Grob, P.J., Luthy, R. (1998). Opravil M. Frequent Chronic Hepatitis B Virus Infection in HIV-Infected Patients Positive for Antibody to Hepatitis B Core Antigen Only. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.*, **17**, 6-13
- 164- Özdener, H. (1997). Hepatit Virüslerinin Moleküler Biyolojisi. *Viral Hepatit Derg.*,**3(1)**, 1-18
- 165- De Meyer, S., Gong, Z.J., Suwandhi, W., Van Pelt, J., Soumillion, A., Yap, S.H. (1997). Organ and Species Specificity of Hepatitis B Virus (HBV) Infection: A Review of Literature of HBV to Human Hepatocytes. *J. Viral Hepatitis*, **4**, 145-153
- 166- Guidotti, L.G., Matzke, B., Shaller, H., Et al. (1995). High Level Hepatitis B virus Replication in Transgenic Mice. *J. Virol.*, **69**, 6158-6169
- 167- Milich, D.R. (1997). Pathobiology of Acute and Chronic Hepatitis B virus Infection. *J. Viral Hepatitis*, **4** (suppl 2), 25-30
- 168- Chisari, F.V., and Ferrari, C. (1995). Hepatitis B virus immunopathology. *Spinger Semin. Immunopath.*, **17**, 261-281
- 169- Jung, M.J., Dispolder, H.M., Pape, G.R.T. (1994). cell recognition of hepatitis B and C viral antigen. *Fur. J. Clin. Invest.*, **24**, 641-650
- 170- Morodpour, D., Wands, J.R. (1995). Understanding hepatitis B virus infection. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 1092-1093
- 171- Ferrari, C., Bertoletti, A., Penna, A. (1991) İdentification of immunodominat T cell epitopes of hepatitis B virus nüclecapsid antigen. *J. Clin. Invest.*, **88**, 214-222
- 172- Thursz, M.R., Kwiatkowski, D., Allsopp, C.E.M., Greenwood, B.M., Thomas, H.C., Hill, A.V.S. (1995). Association between an MHC Class 2 allele and clearence of hepatis B virus in the Gambia. *N. Engl. J. Med.*, **332**, 1065-1069
- 173- Cavanaugh, V.J., Guidotti, L.G., Chisari, F.V. (1997). Interleukin 12 inhibitis hepatitis B virus replication in transgenic mice. *J. Virol.*, **71**, 3236-3243

- 174- Penna, A., Artini, M., Cavalli, A., et al. (1996). Long Lasting memory T-cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J. Clin. Invest.*, **98(5)**, 1185-1194
- 175- Rosenberg, W. (1999). Mechanisms of immune escape in viral hepatitis. *Gut*, **44**, 759-764
- 176- Douglas, R.G., Hilleman, M.R., Krugman, S., Maynard, J. (1991). Yeoh EK: Infections in medicine. Hepatitis B infection: strategies for clinicians. *Science*, **5**, 32
- 177- Hoofnagle, J.H. Schafer, D.F. (1986). Serologic markers of Hepatitis B Virus infection. *Seminars in liver disease*, **6 (1)**, 1-10
- 178- Hoofnagle, J.H. (1981). Type B hepatitis Virology, Serology and Clinical Course. *Sem. liver disease*, **1**, 7-14
- 179- Mels, C.G., Bellati, G., Leandro, G., Brunetto, M.R. (1993). Vicari O. Piantino P. Borzio M. Angeli G. Ideo G and Bonino F: Role of IgM antibody to hepatitis B core antigen in the diagnosis of hepatitis B exacerbations. *Arch. Virol.*, **8**, 203-211
- 180- Krogsgaard, K. (1988). Hepatitis B Virus DNA in serum. Applied molecular biology in the evaluation of hepatitis B infection. *Liver*, **8**, 257-283
- 181- Scot, J.S., Pace, R.A., Sheridan, J.W., Cooksley, W.G. (1990). Discordance of hepatitis Be antigen and hepatitis B viral deoxyribonucleic acid. *J. Med. Virol.*, **32**, 225-231
- 182- Fincancı, M., ve Badur, S. (1992). Akut B tipi viral Hepatitte Pre-S1 antijenlerinin ve anti Pre-S2 antikorlarının prognostik değeri. *Klinik Dergisi*, **5**, 74-76
- 183- Yoffe, B., and Noonan, C.A. (1992). Hepatitis B virus. New and Evolving Issues. *Digestive diseases and Sciences (Review article)*, **37**, 1-9
- 184- Pao, C.C., Yao, D.S., Lin, C.Y., Kao, S.M., Tsao, K.C., Sun, C.F., Liaw, Y.F. (1991) Serum hepatitis B virus DNA in hepatitis B virus seropositive and seronegative patients with normal liver function. *Am. J. Clin. Pathol.*, **95**, 591-596



- 185- Lai, M.E., Farci, P., Figus, A., Balestrieri, A., Arnone, M., Vyas, G.N. (1989). Hepatitis B virus DNA in serum of sardinian blood donors negative for the hepatitis B surface antigen. *Blood*, **73**, 17-21
- 186- Brechot, C., Hadchouel, M., Scotto, J., et al. (1981). Detection of hepatitis virus DNA in liver and serum: a direct appraisal of the chronic carrier satate. *Lancet*, **2**, 765-767
- 187- Scotto, J.S., Hadchouel, M., Hery, C., Yvart, J., Tiollais, P., Brechot, C. (1983). Detection of hepatitis B virus DNA in serum by a simple spot hybridization technique comparison with results for other viral markers. *Hepatology*, **3**, 279-284
- 188- Zaaijer, H.L., Borg, F., Cuypers, H.T.M., Hermus M.C., A.H., Lelie, P.N. (1994). Comparison of methods for detection of hepatitis B virus DNA. *J. Clin. Microbiol.*, **32**, 2088-2091
- 189- Lai, M.E., Solinas, A., Mazzoleni, A.P., Deplano, A., Farci, P., Lisci, V., Porru, A., Tocco, A., Balestrieri, A. (1994). The role of pre-core hepatitis B virus mutants on the long-term outcome of chronic hepatitis B virus hepatitis. A longitudinal study. *J. Hepatol.*, **20**, 773-781
- 190- Bell, J. (1989). The Polymerase Chain Reaction. *Immunology Today*, **10**, 351-355
- 191- Dusheiko, G., Xu, J., Zuckermann, A.J. (1992). Clinical diagnosis of hepatitis B infection. Becker, Y., Darai, G., Springer, V. (Eds.), *Application of the polymerase chain reaction "Diagnosis of human viruses by polymerase chain reaction technology*, 76-77
- 192- Bilgiç, A., Özacar, T. (1999). Temel ve klinik mikrobiyoloji. Ustaçelebi, Ş. (Ed.), *Hepatit B ve D virüsleri*. Ankara, Güneş Kitabevi, 871-880
- 193- Yüksel, D. (1996). *Hepatit B virus DNA'sının saptanmasında hibridizasyon ile Polymerase Chain Reaction (PCR) uygulamalarının karşılaştırılması*. İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı Yüksek lisans tezi
- 194- Persing, D.H. (1993). In vitro nucleic acid amplification techniques. In: Persing, D.H., Smitt, T.F., Tenover, F.C., White, T.J. (Eds.), *Diagnostic*

*Molecular Microbiology, Principles and Applications*. American Society For Microbiology, Washington DC : 51-87.

- 195- Hunt, C.M., McGill, J.M., Allen, M.I., et al. (2000). Clinical relevance of hepatitis B viral mutations. *Hepatology*, **31**, 1037-1044
- 196- Carman, W.F. (1997). The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J. Viral Hepatit*, **4**, 11-20
- 197- Carman, W.F., Korula, J., Wallace, L., et al. (1995). Fulminant reactivation of hepatitis B due to envelope protein mutant that escaped detection by monoclonal HBsAg ELISA. *Lancet*, **345**, 1406-1407
- 198- Hou, J., Karayiannis, P., Waters, J., et al. A unique insertion in the S gene of surface antigen-negative hepatitis B virus Chinese carriers. *Hepatology*, **21**, 273-278
- 199- Ogata, N., Zanetti, A.R., Yu, M., et al. (1997). Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of a surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J. Infect. Dis.*, **175**, 511-523
- 200- Hsu, H.Y., Chang, M.H., Liaw, S.H., et al. (1999). Changes of hepatitis B surface antigen variants in carrier children before and after universal vaccination in Taiwan. *Hepatology*, **30**, 1312-1317
- 201- Fiordalisi, G., Ghiotto, F., Castelnuovo, F., Primi, D., Cariani, E. (1994). Analysis of the hepatitis B virus genome and immune response in HBsAg, anti-HBs positive chronic hepatitis. *J. Hepatol.*, **4**, 487-493
- 202- Yamamoto, K., Horikita, M., Tsuda, F., Itoh, K., Akahane, Y., Yotsumoto, S., Okamoto, H., et al. (1995). Hepatitis B virus escape mutants: „pushing the envelope“ of chronic hepatitis B virus infection. *Hepatology*, **3**, 884-887