

T.C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
MİKROBİYOLOJİ ve KLİNİK MİKROBİYOLOJİ
ANABİLİM DALI

144 446

**HEPATİT B VİRÜSÜNÜN KESİM ENZİMLERİ
KULLANILARAK TİPLENDİRİLMESİ**

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Hazırlayan

Biyolog AZİZ AKSOY

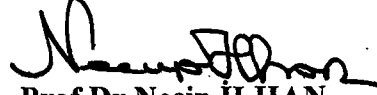
ELAZIĞ - 2005

İTHAF

Bu çalışmayı, eğitimim süresince maddi ve manevi desteğini hiçbir zaman esirgemeyen aileme ithaf ediyorum.



ONAY SAYFASI


Prof.Dr.Necip İLHAN

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Prof.Dr.Mustafa YILMAZ

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji

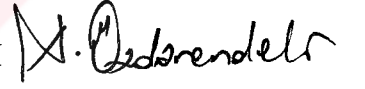
Anabilim Dalı Başkanı



Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora

Tezi olarak kabul edilmiştir.

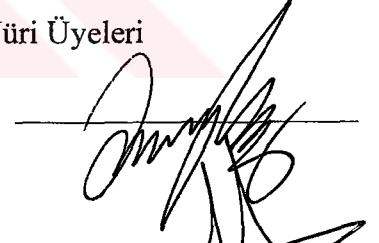
Doç.Dr. Aykut ÖZDARENDELİ



Danışman

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı Jüri Üyeleri

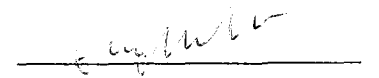
Prof.Dr. Mustafa YILMAZ



Prof.Dr. Ayhan AKBULUT



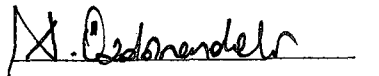
Prof.Dr. Zülal AŞÇI TORAMAN



Doç.Dr. Adnan SEYREK



Doç.Dr. Aykut ÖZDARENDELİ



TEŞEKKÜR

Yüksek Lisans tez çalışmam sırasında, değerli bilgi ve görüşlerinden yararlandığım, sevdiğim ve saygı duyduğum kıymetli danışman hocam Doç.Dr. Aykut ÖZDARENDELİ ve kendimi her zaman sıcak ve sevgi dolu bir ortamda hissetmemi sağlayan tüm F.Ü.Tıp Fak. Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalındaki hocalarım, Prof.Dr.Mustafa YILMAZ, Prof.Dr.Zülal AŞÇI-TORAMAN, Doç.Dr.Adnan SEYREK, Yrd.Doç.Dr.Ahmet KİZİRGİL, Yrd.Doç.Dr.Yasemin BULUT'a, laboratuvarındaki desteklerinden dolayı değerli çalışma arkadaşlarıma, laboratuvarlarında çalışma imkanı sağlayan Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı hocalarıma ve Arş.Görevlisi arkadaşlarıma, bu çalışmayı maddi yönden 984 nolu projeyle desteklemiş olan Fırat Üniversitesi Bilimsel Araştırmalar Projeleri (FÜBAP)'a teşekkür etmeyi bir borç biliyorum.

Saygılarımla.

Aziz AKSOY

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1. ÖZET.....	1
2. ABSTRACT.....	2
3. GİRİŞ.....	3
3.1. Hepatit B Virüsü.....	5
3.1.1. Virüsün Genel Özellikleri.....	5
3.1.2. Sınıflandırma.....	6
3.1.3. Genom Yapısı.....	7
3.1.4. Replikasyon Stratejisi.....	10
3.1.5. Viral Proteinler ve Antijenik Yapıları.....	14
3.1.5.1 Yüzey (Kılıf) Proteinleri	14
3.1.5.2. Kor Proteinleri.....	17
3.1.5.3. Polimeraz (P) Proteinini.....	20
3.1.5.4. X Proteinini.....	21
3.1.6. Duyarlılık- Dirençlilik	22
3.1.7. Hepatit B Virüsü Mutantları	22
3.1.7.1. Yüzey (Kılıf) Mutantları	23
3.1.7.2. Prekor/kor Mutantları (preC/C).....	25
3.1.7.3. Polimeraz Mutantları.....	26
3.1.7.4. X Mutantları.....	27
3.1.8. HBV Genotipleri.....	28
4. GEREÇ VE YÖNTEM.....	31
4.1. Gereç.....	31
4.1.1. Hasta Grubu.....	31
4.1.2. Kimyasallar (Tampon Çözeltiler ve Solüsyonlar).....	31
4.1.3. DNA Ekstraksiyonu için Kullanılan Kimyasal Maddeler.....	32
4.2. Yöntem.....	33
4.2.1. Serumdan HBV DNA İzolasyonu	33

	Sayfa
4.2.1.1. DNA Ekstraksiyon Yöntemi	33
4.2.2. HBV DNA'nın S gen Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu.....	34
4.2.2.1. Primerler	34
4.2.2.2. PZR Amplifikasyon Karışımı	35
4.2.3. PZR Ürünlerinin Analizi	36
4.2.4. PZR Ürünlerinin Jel Elektrofrezinde Yürütülmesi	37
4.2.5. Restriksiyon Enzimi Kesim Deneyleri	37
4.2.5.1. <i>AlwI</i> Enzim Kesimi.....	39
4.2.5.2. <i>EcoRI</i> Enzim Kesimi	39
4.2.5.3. <i>HpaI</i> ve <i>NciI</i> Enzimleri ile Kesim.....	39
4.2.5.4. <i>NlaIV</i> Enzim Kesimi	39
5. BULGULAR.....	41
5.1. Hastalar.....	41
5.2. Hepatit B Virüsü S geninin PZR ile gösterilmesi.....	41
5.3. Hepatit B Virüsü S geninin semi-nested PZR ile gösterilmesi	42
5.4. Enzim Kesim Deneyleri ile HBV genotiplerinin belirlenmesi.....	43
5.4.1. Hepatit B Virüsü PZR ürünlerinin <i>AlwI</i> enzimiyle kesimi.....	43
5.4.2. Hepatit B Virüsü PZR ürünlerinin <i>EcoRI</i> enzimiyle kesimi.....	44
5.4.3. Hepatit B Virüsü PZR ürünlerinin <i>HpaI</i> ve <i>NciI</i> enzimleriyle kesimi....	45
5.4.4. Hepatit B Virüsü PZR ürünlerinin <i>NlaIV</i> enzimiyle kesimi.....	46
6. TARTIŞMA.....	47
7. KAYNAKLAR.....	51
8. ÖZGEÇMİŞ.....	59

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

Şekil - 1: HBV genom yapısı.....	8
Şekil - 2: HBV'nin replikasyonu.....	13
Şekil - 3 : HBV'nin yüzey proteinleri.....	16
Şekil - 4 : RFLP yöntemiyle HBV genotipleme stratejisi.....	38
Şekil - 5 : HBMF1 ve HBMR2 primerleri ile, PZR amplifikasyonu yapılan 685 bp'lık S gen bölgesi.....	41
Şekil - 6 : HBMF2 ve HBMR2 primerleri ile, PZR amplifikasyonu yapılan 485 bp'lık S gen bölgesi.....	42
Şekil - 7 : <i>AlwI</i> enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.	43
Şekil - 8: <i>EaeI</i> enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.	44
Şekil - 9: <i>HphI</i> ve <i>NciI</i> enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.....	45
Şekil - 10: <i>NlaIV</i> enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.	46

TABLÖLAR LİSTESİ

Sayfa

Tablo - 1 : <i>Hepadnaviridae</i> ailesi.....	7
Tablo - 2 : Viral hepatit B'nin nomenklatürü.....	10
Tablo - 3 : HBV genleri ve bu genler tarafından sentezlenen proteinlerin özellikleri...	14
Tablo - 4 : HBV genotip ve subtiplerin coğrafik dağılımı.....	29



KISALTMALAR LİSTESİ

ALT	Alanin aminotransferaz
Anti-HBe	Hepatit B Virüsü e Antikoru
Anti-HBs	Hepatit B Virüsü yüzey Antikoru
AST	Aspartat aminotransferaz
cccDNA	Circular Closed Covalent DNA
CTL	Sitotoksit T Lenfosit
DNA	Deoksiribonükleik asit
DR	Directly Repeated
HAV	Hepatit A Virüsü
HBcAg	Hepatit B Virüsü Core Antijeni
HBeAg	Hepatit B Virüsü e Antijeni
HBsAg	Hepatit B Virüsü Yüzey Antijeni
HBV	Hepatit B Virüsü
HBV DNA	Hepatit B Virüsü DNA'sı
HBxAg	Hepatit B Virüsü x Antijeni
HCC	Hepatosellüler Karsinom
HCV	Hepatit C Virüsü
HDV	Hepatit Delta Virüsü
HEV	Hepatit E Virüsü
HGV	Hepatit G Virüsü
IFN	İnterferon
IU	International Unit
LAM	Lamivudine
LHBs	Large Hepatitis B Surface Protein

M	Molar
mg	Miligram
MHBs	Middle Hepatitis B Surface Protein
ml	Mililitre
mRNA	Messenger RNA
nm	Nanometre
pmol	Pikomol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RFLP	Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA	Ribonükleik asit
SHBs	Small Hepatitis B Surface Protein
TTV	Transfusion Transmitted Virus
µl	Mikrolitre

1. ÖZET

Hepatit B virüsü (HBV), dünyada en fazla yaygın olan enfeksiyon etkenlerinden birisidir. Dünyada ortalama 350 milyon kronik hepatit B virüs taşıyıcısı olduğu tahmin edilmektedir. Hepatit B virüsünün tam genom nükleotid dizisi baz olarak alındığında %8'lik veya daha fazla nükleotid farklılıklarına göre HBV'nin 8 genotipi (A-H) bulunmaktadır. Farklı HBV genotipleri hastalığın klinik durumunu etkileyebilmektedir. Restriksiyon enzimleri kullanarak yapılan enzim kesim deneyleri (RFLP) HBV genotiplendirilmesinde kullanılmaktadır. Hepatit B virüsü S gen dizisi kullanılarak yapılan genotiplendirme ile tam genom belirlenerek yapılan tiplendirme sonuçları arasında uyum vardır. Bu çalışmada, HBV DNA pozitif 127 hastada, RFLP yöntemi ile virüsün genotiplendirilmesi amaçlandı. Semi-nested polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çoğaltılan spesifik S gen bölgesi RFLP ile analiz edildi. HBV S geninin genotip spesifik bölgelerinde bulunan *AlwI*, *EcoRI*, *HphI*, *NciI*, and *NlaIV* enzim kesim bölgeleri kullanıldı. RFLP sonuçları 127 örneğin tamamında genotip D'nin varlığını ortaya koydu. Bu sonuçlar, bölgemizdeki Hepatit B hastalarında dominant olarak genotip D'nin bulunduğunu ve HBV genotiplendirmede kullanılan RFLP yönteminin kolay ve yapılabilir olduğunu göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virüsü, PZR, RFLP, HBV genotipleri.

2. ABSTRACT

Hepatitis B is one of the most common infectious diseases in the world. It has been estimated that 350 million people world-wide are chronic hepatitis B virus (HBV) carriers. Hepatitis B virus (HBV) has been classified into 8 genotypes (A-H) based on an intergroup divergence of 8% or more in the complete nucleotide. Different genotypes of the hepatitis B virus may influence the clinical outcome of the disease. The Hepatitis B virus genotyping method using restriction fragment length polymorphism (RFLP) can reliably identify genotypes. HBV genotyping with the S gene sequence is consistent with genetic analysis using the full genomic sequence. The aim of this study was to determine genotypes of the Hepatitis B virus using restriction fragment length polymorphism (RFLP) in the region of Elazig. A total of 127 HBV DNA positive patients were included in this study. Semi-nested PCR was performed to amplify a specific part of S gene of HBV. Then, the PCR products were used for RFLP assay. After alignment of the S sequences, genotype specific regions are identified and digested by the restriction enzymes, *AlwI*, *EcoRI*, *HpaI*, *NciI*, and *NlaIV*. The RFLP assay indicated that genotype D was the only detected type found in 127 samples. In conclusion, genotype D is the predominant type among hepatitis B patients in our region. This simple and easy HBV genotyping system using RFLP is considered to be useful for research on genotyping of HBV.

Key Words: Hepatitis B virus, PCR, RFLP, genotypes of HBV.

3. GİRİŞ

Hepatit B virüsü (HBV), tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de yaygın olarak görülen önemli bir viral patojendir. 350 milyondan fazla insan HBV ile infekte durumdadır (2). Günümüzde iki milyardan fazla kişinin HBV ile temas etmiş olduğu, % 95'i gelişmekte olan ülkelerde olmak üzere, yaklaşık 500 milyon kişinin HBV taşıyıcısı olduğu, her yıl 50 milyon HBV olgusunun ortaya çıktığı, HBV'ye bağlı nedenlerle ölenlerin yılda 2 milyona yaklaştığı bilinmektedir (16). HBV enfeksiyonu klinik olarak akut veya fulminant hepatit, kronik hepatit veya kronik taşıyıcılık olarak görülebildiği gibi, karaciğer sirozu ve hepatoselüler karsinomaya (HCC) yol açtığı da bilinmektedir (21,38,74).

Hepatit B virüsü; sirküler, kısmen çift iplikli ve yaklaşık, 3200 nükleotit uzunluğunda bir DNA genomu içerir. HBV suşlarının, tam genomlarının moleküler analizleri yapıldığında suşlar arasında farklılıklar saptanmış ve gen diziliminde % 8 ya da daha çok farklılığı olanlar ayrı bir genotip olarak sınıflandırılmıştır. Bu çalışmalar sonucunda Hepatit B virüsüne ilişkin altı ayrı genotip belirlenmiştir (50). Ancak son zamanlarda yapılan çalışmalarda genotip G ve H olarak adlandırılan iki yeni genotip bulunmuş ve böylece HBV sekiz genotip (A,B,C,D,E,F,G ve H) olarak sınıflandırılmıştır (3,34).

Her bir genotipin farklı bir coğrafik dağılım gösterdiği ortaya konmuştur. Kuzeybatı Avrupa, Kuzey Amerika ve Afrika'da genotip A daha sık görülürken, Doğu Asya ve Uzakdoğu ülkelerinde ise genotip B ve C'nin sıklığı daha yüksektir. Genotip D tüm dünyada yaygın olarak görülmekte ve Akdeniz bölgesi, Yakındoğu ve Ortadoğu ülkeleri ile Güney Asya'da sıktır. Genotip E Batı Afrika'da, genotip F Orta Amerika bölgesinde baskın olarak görülmektedir (55).

Genotip G Amerika ve Fransa’da, genotip H ise Güney Amerika, Meksika ve İspanya’da yaygın olduğu bilinmektedir (3,4,10,73,83).

Hepatit B virüsünün patogenizinde genotip farklılıkların, hastalığın klinik seyri üzerine etkisinin ne olduğu henüz tam olarak belli değildir. Ancak bulgular HBV genotipleri arasında klinik ve patojenik farklılıklar olduğunu desteklemektedir. Araştırmalar sonucunda genotip C’nin kronik karaciğer hasarına yol açtığı bildirilirken genotip B’nin gençlerde hepatoselüler karsinoma gelişimi ile ilişkili olabileceği belirtilmiştir. Kronik aktif hepatitlerde genotip A baskın olarak saptanırken, akut hepatitlerde genotip D’nin sıklığı daha yüksek bulunmuştur (31,40).

Ülkemizde sık görülen Hepatit B enfeksiyonu, ciddi bir halk sağlığı sorunu olmasının yanı sıra, tedavi giderleri ve iş gücü kayıpları nedeniyle ekonomik kayıplara da yol açmaktadır. Bu denli önemli bir enfeksiyonla mücadelede başarılı olmak için HBV’nin moleküler yapısı, biyolojisi ve epidemiyolojisinin iyi bilinmesi gerekmektedir. Ülkemizde HBV DNA’sının ve HBsAg sıklığının araştırıldığı çok sayıda çalışma bulunmaktadır (13,39,41,43,53,75).

Bu çalışmada, toplum sağlığını tehdit eden ve ülkemizde endemik olarak enfeksiyon oluşturan hepatit B virüsünün, epidemiyolojik çalışmalara uygun, hızlı ve kolay uygulanan bir RFLP yöntemi ile genotiplendirilmesi amaçlanmıştır. HBV enfeksiyonlarının ülkemiz açısından da önemi gözönüne alındığında Türkiye’deki HBV genotiplerinin dağılımına ilişkin araştırmalara gerek olduğu bilinmektedir (41). Ülkemizde HBV genotipleri ile ilişkili veriler son derece sınırlıdır. Bu veriler gelecekte toplum sağlığının korunabilmesi, enfeksiyonun

klirik gidişi hakkında 6nceden fikir sahibi olunabilmesi ve tedavinin y6nlendirilmesi için yararlı olacaktır (8,41).

3.1. Hepatit B Vir6s6

3.1.1. Vir6s6n Genel 6zellikleri

Hepatit B vir6s6, t6m d6nyada olduğu gibi 6lkemizde de, karaciğer bozukluklarına sebep olan 6nemli bir viral patojendir. 350 milyondan fazla insanın HBV ile infekte olduğu bilinmektedir. Viral hepatit ilk olarak M.6. 5. y6zyılda tanımlanmış, Hippocrates; epidemik (infeksiy6z) sarılığı tarif etmiş ve tarih boyunca 6zellikle savaşlar sırasında birçok sarılık salgını g6r6lm6řt6r. Bu salgınların çoğu muhtemelen hepatit A vir6s6ne bağlı olduğu halde HBV'nin epidemik bulaşı kan ve kan 6r6nleri kullanımının yaygın olduğu yerlerde g6zlenmeye başlamıştır. Direkt kan ve kan 6r6nleri ile bulaşan hepatit formu ilk kez 1883 yılında Lurman tarafından tanımlanmış, 1930'lu yıllarda yapılan çalışmalar, infeksiy6z hepatit ve serum hepatiti etkenlerinin g6n6m6zde herkes tarafından iyi bilinen bazı 6zellikleri hakkında 6nemli bilgiler kazandırmıştır (1,6,79). 1943 yılında ABD.'de bulaşıcı hepatit "infeksiy6z hepatit" olarak isimlendirilirken, İngiltere Sağlık Bakanlığı aynı yıl bir memorandum ile kan, plazma ve serum naklinden sonra gelişen sarılıkları "homolog serum sarılığı" adı altında toplamış, 1947 yılında Mc Callum, infeksiy6z hepatit için "hepatit A", serum hepatiti için ise "hepatit B" deyimlerini kullanmıştır. HBV'nin tarihçesinde 1965 yılı d6n6m noktasıdır. Blumberg ve arkadaşları Avustralya'lı bir yerlinin serumunda, çok sayıda kan transf6zyonu yapılmış bir hastanın serumu ile agar jelde presipitasyon veren bir antijen bulunduğunu g6stermişler ve g6n6m6zde

“hepatit B yüzey antijeni HBsAg” olarak bilinen bu proteine “Avustralya antijeni-Au antijeni” adını vermişlerdir (1,22,38,71).

Dane ve arkadaşları 1970’de HBV’nin kısmen saflaştırılmış preparatları hazırlayarak elektron mikroskopik incelemelerinde üç değişik partiküle rastlamışlardır. Bunlardan infeksiyöz özelliğe sahip, 42 nm çapında olanlara “Dane partikülü” adı verilmiş ve sonraki yıllarda ise kor antijeni, DNA polimeraz ile viral DNA tanımlanmıştır (12,82).

3.1.2. Sınıflandırma

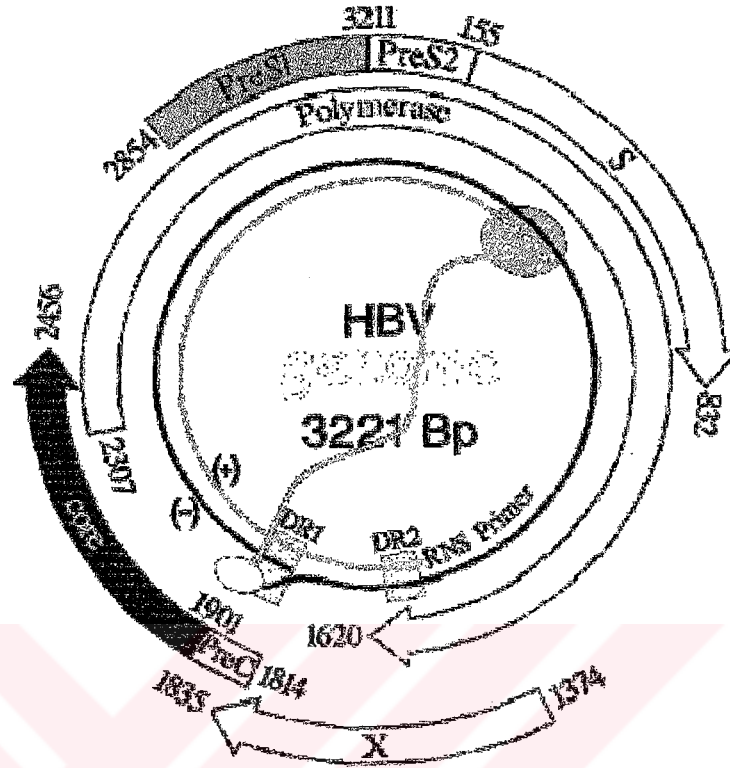
Hepatit B virüsü, *Hepadnaviridae* ailesi içinde memeli virüslerinin bulunduğu *Orthohepadnavirus* cinsi içinde sınıflandırılır. Zarflı ve kısmen çift sarmallı bir DNA virüsüdür. *Hepadnaviridae* ailesinin üyeleri içinde insanlarda enfeksiyon oluşturan tek tür HBV’dir. Ailenin diğer üyeleri: Woodchuck (dağ sıçanı) hepatit virüsü (WHV), Ground Squarrel (yer sincabı) hepatit virüsü (GSHV), Pekin ördeklerinden izole edilen Duck (ördek) hepatit virüsüdür (DHBV). Üyelerin; konak farklılığı, virion morfolojisi, polipeptit büyüklüğü, gen sayısı, nükleotid homolojisi ve antijenik çapraz reaksiyonlar gibi birçok bakımdan benzerlik ve farklılıkları tablo-1’de gösterilmiştir (8,41,82).

Tablo – 1: *Hepadnaviridae* ailesi ve özellikleri (Kaynak 41’den alınarak uyarlanmıştır).

	HBV	WHV	GSHV	DBHV
Büyükklük	42 nm	40-42 nm	40-42 nm	46-48 nm
Genom	3.2 kb	3.3 kb	3.3 kb	3.0 kb
Viral DNA	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tamamlanmamış	Tam
Zarf Proteinleri	L,M,S	L,M,S	L,M,S	L,S
Gen	S,C,P,X	S,C,P,X	S,C,P,X	S,C,P
Konak	İnsan Şempanze	Dağsıçanı	Yer Sincabı Dağ Sincabı Amerika Sincabı	Kaz
Replikasyon	Karaciğer Böbrek Pankreas Lökosit	Karaciğer Böbrek Pankreas Beyaz küreler Diğer	Karaciğer	Karaciğer Böbrek Pankreas Dalak Diğer
Hastalık	Aseptomatik Taşıyıcılık Hepatit Siroz ve HCC	Aseptomatik Taşıyıcılık Hepatit HCC	Aseptomatik Taşıyıcılık Hepatit HCC	Aseptomatik Taşıyıcılık Hepatit HCC
Dağılım	Tüm Dünya	Doğu ABD.	Kalifornia	Çin, ABD.

3.1.3. Genom Yapısı

Virial genom çift iplikçikli ve çember şeklinde olmakla birlikte, çemberin bir kısmı tek iplikçiklidir. Uzun zincir, yaklaşık 3200 baz çiftinden oluşmaktadır. Virial replikasyon tamamlanmadan DNA molekülleri virion içinde paketlenmektedir. HBV genomunun bu uzun zincirinde (L veya (-) zincir) virüs proteinlerini kodlayan 4 adet açık okuma bölgesi (open reading frames, ORF) vardır. Virüsün kor (core; C), zarf (surface; S), polimeraz (P) ve X proteinlerinin sentez için dizilimlerin olduğu belirlenmiştir (36) (Şekil - 1).



Şekil – 1: HBV Genom Yapısı (Kaynak 36'dan alınarak uyarlanmıştır).

Dört gen bölgesi arka arkaya ve birbirinden ayrı bölgelerde bulunmazlar. Tam tersine birbirleri ile iç içedirler ve farklı bölgelerden okunmaya başlanması ile farklı proteinlerin şifrelenmesinde rol alırlar. Uzun zincirin 5' ucunda terminal bir protein vardır. Kısa zincir 1800-2700 nükleotid içerir (S veya (+) zincir), uzunluğu değişkendir. HBV DNA'sının yapısal bütünlüğü, kısa ve uzun zincirlerin 5' uçlarından birbirlerine tutunması ile gerçekleşir. Bu uç bölgelerinde 11'er nükleotidli tekrar elementleri (DR1 ve DR2) bulunur. HBV genomunun uzun zincirindeki dört gen bölgesinden C geni (core nükleokapsid geni) 21 kDa'lık "core" (çekirdek) nükleokapsid polipeptidini (HBcAg) şifreler. Bu proteinin 17.5

kDa'lık kesik bölümü HBeAg'dir. Hücrelerde translasyon pre-C başlangıç kodonundan başladığında HBeAg özgülüğüne sahip proteinler hücrelerden salınır. Bu olay pre-C dizisinin sinyal dizi gibi davrandığını göstermektedir. Translasyon, C başlangıç kodonundan başladığında tam uzunluktaki C polipeptidi sentezlenir. Pre-C dizisinde, mutasyonları sonucu durdurma kodonu oluşmakta ve böyle HBV mutantlarında HBeAg sentezlenememekte; ancak HBcAg sentezlenmektedir. Viral hepatit B nomenklatürü tablo-2'de gösterilmektedir. Bu mutant suşlar fulminant hepatit patogeneğinde rol oynamaktadır (12,41,82).

Pre-S1, S2 ve S bölgelerini içeren S geni, HBV ile infekte bireylerin serum ve karaciğer hücrelerinde bulunan virion zarfı ve tam olmayan HBsAg'leri şifreler. Bunlar sırası ile yalnızca S dizisi, preS2+S dizisi, ve preS1+ preS2+S dizisi tarafından kodlanan 24 (S küçük), 33 (M- orta) ve 39 (L- büyük) kDa'lık proteinlerdir. (10,12,41).

Polimeraz geni, viral genomun 3/4'ünü oluşturur, C geninin karboksî uç kısmını, tüm S genini ve X geninin aminoterminal bölümünü kapsar. DNA polimeraz (revers transkriptaz) ile ribonükleaz aktivitesine sahip 90 kDa'lık temel polipeptidi kodlar. Ayrıca DNA (-) zincir sentezi için bir protein başlatıcı gibi davranmaktadır. Küçük X geni, 154 aminoasitlik X proteinini kodlar (12,23,41).

Tablo-2: Viral hepatit B'nin nomenklattürü (Kaynak 12'den alınarak uyarlanmıştır),

Terminoloji	Kısaltma	Tanımlama
Hepatit B virüsü	HBV	42nm çapta, çift kılıflı (en dışta 7nm kılıf ve 27nm'lik iç bölüm). Çekirdek küçük, çember şeklinde kısmen çift iplikçikli DNA molekülüne, DNA polimeraz aktivitesine sahip. Dane partikülü olarak da bilinir. <i>Hepadnaviridae</i> ailesinin prototipi.
Hepatit B yüzey antijeni	HBsAg	HBV'nin yüzeyinde ve 20 nm'lik partikül ve tübüler şekillerde bulunan kompleks bir antijen. Eskiden Au ve HAA olarak isimlendirilen antijen.
Hepatit B çekirdek antijeni	HBcAg	HBV'nin 27nm'lik çekirdek kısmı ile ilişkili antijen.
Hepatit B e antijeni	HBeAg	HBV'nin nükleokapsidi ile yakından ilişkili antijen.
HBsAg, HBcAg ve HBeAg'ye karşı antikorlar	Anti-HBs Anti-HBc Anti-HBe	Antijenlere karşı özgül yanıt sonucu oluşan antikorlar

3.1.4. Replikasyon Stratejisi

Hepatit B virüsünün hedef organı karaciğer olup, üremesini bu organda gerçekleştirir. Karaciğer; çok çeşitli hücrelere sahip olmakla beraber fonksiyonel aktivite, kupffer hücreleri (makrofajlar), safra kanal epitel ve hepatositler tarafından yürütülür. Hepatosit ve safra kanalı epitel hücreleri sadece karaciğere özgü ve birbirleriyle yakından ilişkili hücrelerdir. Karaciğerin %70'ini oluşturan hepatositler majör hücre grubu olduğundan, HBV gibi karaciğere tropizmi olan bir virüsün asıl hedefini de bu hücreler oluşturur. Hepadnavirüs ailesinde yer alan üyelerin tümü için doğrulanmış primer replikasyon yeri hepatositlerdir. Safra kanal epitel hücreleri, pankreas, böbrek ve lenfoid sistemdeki bazı hücre grupları

da enfeksiyonun hedefi olabilir. Ancak bu hücrelerde viral replikasyon ile ilgili veriler yeterli ve güvenilir değildir (23,41,42,56).

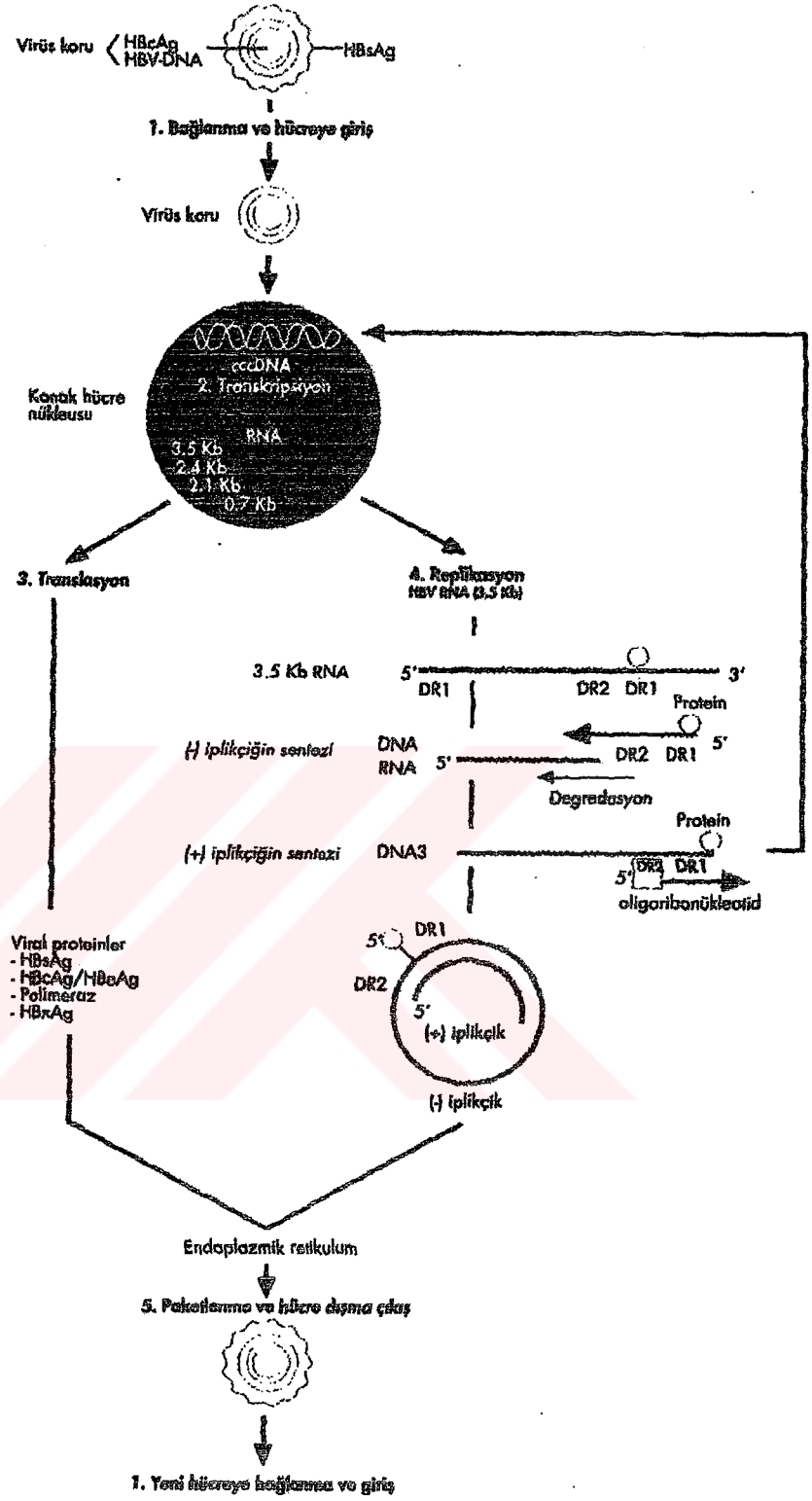
Replikasyonun ilk aşamasında, HBV hepatositlere tutunur ve hücre içerisine girer. Tutunma; hepatosit üzerindeki özgül bir reseptöre ya da reseptörlere bağlanan Pre-S alanındaki özel bölgelerle gerçekleşir. Hepatositlere bağlanan virüsün konak hücre çekirdeğine nasıl ulaştığı tam olarak aydınlatılamamıştır. HBV; muhtemelen reseptöre bağımlı endositoz yoluyla hücre içine girmekte, viral DNA ile nükleokapsid viriondan ayrılmakta ve işlenmeden konak hücre çekirdeğine taşınmaktadır. Kısmen çift sarmallı ve her iki ucu serbest halde bulunan DNA'nın kısa sarmalının eksik olan bölümü endojen DNA polimeraz tarafından tamamlanır. Bu sırada uzun sarmalın 5' ve 3' uçları arasındaki açıklık da onarılmış ve sonuçta tümüyle çift sarmallı, süper kıvrımlı, uçları kapalı, sirküler yapıda bir HBV-DNA (cccDNA) meydana gelir (42). Replikasyonun normal seyri sırasında, HBV-DNA'nın konak genomuna integrasyonu görülmez. Kalıp olarak cccDNA'dan konak hücre RNA polimerazının (RNA polymerase II) yardımı ve viral düzenleyicilerin (4 adet promoter, 2 adet enhancer) etkisiyle viral RNA'lar sentezlenir. HBV-RNA'ların hepsinin 3' uçları 1934. pozisyonundaki nükleotiddir. Bunlar C genine ait ORF'den gelen sinyalin özelliğine göre; ya mRNA ya da pregenom görevi yaparlar (41,42).

Hepatit B virüsünde fonksiyonu bilinen 4 mRNA transkripti tanımlanmıştır. Genomdan daha uzun olan 3.5 kb'lık kalıp, viral replikasyondan ve pre-C/C ile polimeraz proteinlerinin açıklanmasından sorumludur. 2.4 kb'lık transkript pre-S1, pre-S2 ve HBsAg'yi kodlarken, 2.1 kb'lık olanı pre-S1 haricindeki yüzey proteinlerini kodlamaktadır. En küçük (0.7 kb) transkript olan

X geni, X proteininin açıklanmasından sorumludur. Translasyon sırasında oluşan pregenom, kor partikülü içine yerleşir. Konak hücre sitoplazmasında devam eden replikasyon boyunca 3.5 kb'lık RNA'dan (+RNA), (-) DNA sarmalı sentezlenir (41,42).

Negatif iplikçiğin sentez işlemi; DR1'in 3' ucundaki terminal proteinin bulunduğu yerden başlar. Sentez ilerledikçe RNA, RNase H etkisiyle tahrip edilir. kısa zincirin sentezinde kalıp olarak uzun sarmal kullanılır. Sentez DR2'nin 3' ucundan başlar ve uzun zincirin 5' ucundaki terminal protein sonlanıncaya kadar devam eder. Genomun sirkülasyonu (-) iplikçiğin 3' ucundaki 9-10 nükleotidlik terminal artık sayesinde olur. Kısmen çift sarmallı sirküler yapıdaki kor kısmının kılıf proteinleri tarafından çevrelenmesi ve aynı zamanda polimerazın da tükenmesiyle kısa zincirin sentezi tamamlanamaz ve bu sarmal eksik kalır (6,12) (Şekil - 2).

Hepatit B yüzey proteini (HBs), endoplazmik retikulumda öncelikle transmembran proteinleri olarak sentezlenir. Oligomerizasyon, molekül içi ve moleküller arası disülfid köprülerinin oluşmasıyla olgunlaşır, tomurcuklanma sırasında membran lipidleri ile birlikte kor partiküllerini çevreleyip hücre dışına çıkarlar. Transgenik farelerde ve hücre kültürleri üzerinde yürütülen çalışmalarda pre-SI'nin hücre içinde birikmesinin HBsAg sekresyonunu inhibe ettiği gözlenmiştir. Ancak pre-SI/HBsAg oranının, HBsAg'nin hücre dışına sekresyonundaki rolü kesin olarak bilinmemektedir. HBsAg, cccDNA formasyonunu inhibe ettiğinden bunun HBV replikasyonunda negatif feedback mekanizması olduğu kabul edilmektedir (2,22,65,77).



Şekil -2 : HBV'nin Replikasyonu (Kaynak 41'den alınarak uyarlanmıştır).

Tablo-3 : HBV genleri ve bu genler tarafından sentezlenen proteinlerin özellikleri (Kaynak 41'den alınarak uyarlanmıştır),

Gen Bölgesi	Nükleotid yerleşimi	Protein	Aminoasit sayısı	Molekül ağırlığı Nonglikolize	(kDa) Glikolize
Pre-S1	2850-3174	LHBs	389	39	42
Pre-S2	3174-157	MHBs	281	33	36
S	157-833	SHBs	226	24	27
Pre-C/C	1816-2452	HBcAg	212	15	-
C	1903-2452	HBcAg	183	19	-
P	2309-1623	DNAPol	832	92	-
X	1376-1838	HBxAg	154	16	-

3.1.5. Viral Proteinler ve Antijenik Yapıları

3.1.5.1 Yüzey (Kılıf) Proteinleri

Hepatit B virüsünün yüzey proteinleri, Pre-S ve S gen bölgesinden oluşur ve üç farklı viral zarf proteinini kodlar. Bu proteinler aynı karboksil ucunu paylaşırlar; ama amino uçları bir başka deyişle başlangıçları farklıdır. En uzun olan L (large) protein (LHBs) pre-S1, pre-S2 ve S geni, M (medium) protein (MHBs) pre-S2 ve S geni, en kısa olan S (small) protein (SHBs-majör protein) ise sadece S geni tarafından kodlanır. 2850 ile 3174. nükleotidler arasında yer alan pre-S1 gen bölgesi 108 aminoasitten oluşan bir polipeptidi sentezlerken, 3174-157. nükleotidler arasında bulunan pre-S2 bölgesi 55 aminoasitlik bir protein molekülünü, 157-833. nükleotidler arasındaki S bölgesi ise 226 aminoasitten oluşan polipeptid sentezini gerçekleştirmektedir (1,12,77). Kanda sirküle olan S geni ürünlerinin yaklaşık %5-15'i M, % 1-2'si L ve geri kalan kısmı S proteininden oluşmaktadır. Her üç partikül tipinde de predominant olarak S proteinleri bulunurken, subviral 22 nm'lik partiküllerde değişebilen miktarlarda M

polipeptidleri ve çok az miktarda da L zincirleri bulunur. Küçük partiküllerde bazen yüzeyin büyük proteinine (LHBs) hiç rastlanmayabilir ama Dane partiküllerinde L proteini daima vardır. Dane partiküllerinde L:M:S oranı yaklaşık 1:1:4 şeklindedir. Dane partiküllerinin oluşumu, bir araya gelmesi (assembly) ve konak hücreden salınması için M proteininin varlığı şart olmamakla birlikte S ve L proteinlerinin mutlaka sentezlenmiş olması gerekmektedir. L ve M proteinleri enfeksiyonun erken dönemlerinde ortaya çıkmakta ve bunlara karşı gelişen antikörlerin gösterilmesi iyileşmenin habercisi olarak kabul edilmektedir (1,6,12,41,81).

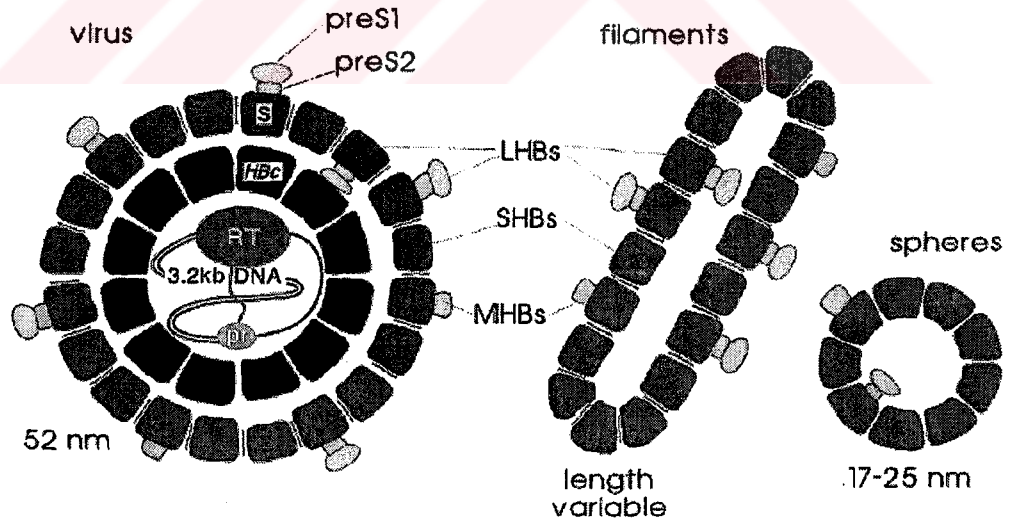
Yüzeyin büyük proteini (LHBs veya L proteini): Bu protein 39 kDa molekül ağırlığında 389 aminoasitten (bazen 400 aminoasite kadar uzar) oluşmuş bir polipeptid olup glikolize edilmiş formu 42 kDa ağırlığında ve sırasıyla p395/gp42s şeklinde gösterilir. LHBs en fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur (12).

Yüzeyin orta proteini (MHBs veya M proteini): Bu protein 33 kDa molekül ağırlığında 281 aminoasitten oluşmuş bir polipeptid (p33s) olup, daima bir ya da iki bölgesi glikolize edilmiştir. Glikolize formu 36 kDa ağırlığındadır ve gp36s şeklinde gösterilir. M proteininin 133-139. aminoasitleri arasındaki bölge, grup spesifik, 137-143. aminoasitleri arasındaki bölge ise tip spesifik epitoplar olarak tanımlanmıştır (6). Yüzeyin orta proteini (MHBs), HBV'nin hepatositlere adsorbsiyonunda rol oynadığı düşünülen yapılardan biridir. Bu proteinin pre-S2 gen bölgesi tarafından kodlanan parçası monomerik albümin ve diğer albümin türlerine bağlanmadığı halde glutaraldehitte polimerize edilmiş insan ve şempanze serum albüminine (poly-HSA) bağlanma özelliğine sahiptir. Pre-S genleri

tarafından kodlanan proteinlerin hepsinde (p395, gp42s, p33s ve gp36s) poly-HSA reseptörü olmakla birlikte reaktivitesi en fazla olan pre-S2'nin non-glikolize ürünüdür (p33s). İnsan serumunda bulunmayan poly-HSA'nın hepatosit yüzeyinde varolduğu gösterilmiş ve bunun "virüs-konak hücre" bağlanmasında rol oynadığı ortaya konmuştur (6).

Küçük protein SHBs (S proteini): 24 kDa molekül ağırlığında 226 aminoasitten oluşmuş bir peptid olup glikolize edilmiş formu 27 kDa ağırlığındadır. Sırasıyla p24s ve gp27s şeklinde gösterilir. HBV tarafından sentezlenen proteinlerin özellikleri tablo-3'de gösterilmektedir.

HBsAg'nin büyük kısmını oluşturan SHBs kılıfın majör proteini olarak bilinir ve B lenfositleri için epitop bölgesine sahiptir (6) (Şekil-3).



Şekil- 3 : HBV'nin Yüzey Proteinleri (Kaynak 36'den alınarak uyarlanmıştır).

Yüzeyin küçük proteinini (SHBs) 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 olarak yer alan gruba özgül “a” determinanı mevcuttur. Virion’un dış yüzünde bulunan “a” determinanı, aşı veya doğal enfeksiyon sonrası oluşan anti-HBs’lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir. HBsAg’nin diğer iki determinanı d/y ve w/r’dir. SHBs’nin, aminoasit 122 pozisyonunda lizin varsa “d”, arginin varsa “y” determinanı oluşmakta, aminoasit 160 pozisyonundaki arginin “r” determinantını meydana getirirken, lizin “w” subtipinin tanımlanmasına yol açmaktadır. Ancak “w” antijenik heterojenite gösterir. Tüm “w” determinantlarında lizin bulunmakla birlikte pozisyon 127’deki aminoasite göre 4 farklı “w” subtipi saptanmıştır. Bu determinatların kombinasyonları 4 subtip (adw, ard, ayw, ayr) halinde bulunur. Ayrıca “x” ve “g” gibi ek determinatların varlığı da gösterilmiştir (3,21,34,36,41).

3.1.5.2. Kor Proteinleri

Hepatit B virüs genomunda, C geni üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (nükleotid 1816 ve nükleotid 1903) bulunmaktadır. Bu şekilde pre-C ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı iki değişik protein (HBeAg ve HBcAg) sentezleme kabiliyetine sahiptir. Pre-C bölgesi 29 aminoasitlik bir peptidin üretiminden sorumlu olup, bu peptid sentez sırasında oluşan polipeptidin konak hücre endoplazmik retikulumuna yönlendirilmesini sağlar. Nükleotid 1903 ile 2452 arasında yer alan C bölgesi ise 183 aminoasitten meydana gelen bir polipeptid (p23c) sentezler. p23c’nin karboksi terminal ucunda arginince zengin ve bu nedenle oldukça bazik özelliğe sahip olan 34 aminoasitlik

bir bölüm vardır. Bu bölümün viral DNA'ya bağlanmadan sorumlu olduğu düşünülmektedir (1,12,41).

Her iki bölgeye ait durdurma kodonu aynı nükleotidde (nükleotid 2452) bulunur. Dolayısıyla protein sentezi sırasında okuma işlemi hangi başlangıç kodonundan başlarsa başlasın aynı ortak noktada sonlanır. Pre-C'den başlayan okuma işleminde her iki bölge de okunarak 212 aminoasitden (29aa+183aa) oluşan, 25 kDa molekül ağırlığında bir polipeptid (p25c) sentezlenir. İşlenmemiş haldeki bu proteinin aminoasit dizisi, N terminal ucunda yer alan 29 aminoasitlik ek parça dışında, HBcAg dizisi ile tamamen benzerdir. Bu ek parça, sentez sırasında giderek uzamaya başlayan pre-C polipeptidini (p25c) endoplazmik retikuluma yönlendirir, burada bir peptidaz tarafından C terminal bölgesindeki 34 aminoasitlik bölüm kesintiye uğrar ve işlenmiş protein (p15c-p18c) haline gelerek ya golgi cisimciği üzerinden HBeAg olarak sekrete edilir ya da nukleusa yönlendirilir (1,12,41,45,80).

Sonuç olarak pre-C dizisi, aynı gen (pre-C/C) tarafından sentezlenen polipeptidlerin sitoplazmada mı kalacağı; yoksa endoplazmik retikuluma mı gideceğinin belirlenmesinde, karboksi terminal uçtaki DNA bağlayan kısmın konak hücre tarafından uzaklaştırılmasında, hücre membranlarında protein birikmesi ve HBeAg özelliği gösteren p15c'nin sekresyonunda rol oynadığı için, sentezlenen proteinlerin kaderini belirleyen bir yapıdır (80). HBeAg ile HBcAg ortak determinantlar içerir. Kanda dolaşan HBeAg spesifik olarak serum albümini, immünglobulin ve antitripsine bağlanma özelliğine sahip olduğundan yapısındaki HBcAg ile ilgili determinantlar maskelenir ve özgül olarak anti-HBe'ye bağlanabilirken, anti-HBc ile reaksiyona girmez. Ayrıca HBcAg'nin

antikor bağlama özelliği bu antijenin yapısını oluşturan proteinin bütünlüğü ve konformasyonuna bağlıdır. p23c kor partiküllerinde toplandığı zaman HBeAg determinantları maskelenmektedir. HBcAg, viral DNA'ya sıkıca bağlı bir molekül olduğundan anti-HBc ile reaksiyona girebilmesi; ancak kor partiküllerinin parçalanması ve serbest polipeptid zincirlerinin açığa çıkmasıyla gerçekleşir. HBcAg, C geninin ikinci bölgesi tarafından sentezlenen polipeptidin (p23c) ön kısmı 29 aminoasitlik ek dizileri eksik olduğu için endoplazmik retikuluma gidemez ve konak hücre sitoplazmasında kalır. Pre-C olmadan p23c'nin ekspresyonu, hücre içinde kora benzer partiküllerin birikimine neden olur. Hücre sitoplazmasında modifikasyona uğrayan p23c, HBcAg olarak bilinen yapı (p19c-21c) haline gelir ve karboksiterminal ucundaki 34 aminoasitlik kısım sayesinde viral DNA'ya sıkıca bağlanır. Yüksek derecede saflaştırılmış virion korlarında ve HBV ile infekte hasta hepatositlerinde gösterilebilen HBcAg sıklıkla intranükleer bölgede bulunur. Ancak aktif hastalık döneminde ve aşırı viral replikasyon gösteren olgularda sitoplazmada da yaygın olarak saptanabilir. HBeAg ekstrasellüler ortama (serum) sekrete edildiği halde, HBcAg için böyle bir durum söz konusu değildir. Bu nedenle dolaşımda serbest halde HBcAg'ye rastlanmaz. Kanda sadece Dane partiküllerinin içinde bulunur. Serum defalarca dondurulup, çözülür veya lipid eriticiler ile muamele edilirse virionlar parçalanır ve HBcAg serbestleşir. HBeAg ve HBcAg oldukça immunojeniktir. Bununla beraber, HBcAg'nin immunojenitesi HBsAg'den daha fazladır. HBV ile infekte hastaların hemen tamamında gerek HBeAg, gerekse HBcAg'ye karşı hem hücresel hem de humoral cevap gelişir. Bu konuda yapılan çalışmalar, her iki antijenin de T ve B hücreleri ile ilişkili olan epitoplara sahip olduğunu ortaya koymuştur (1,12).

HBcAg'ye özgül T hücreleri, HBsAg humoral cevabını başlatabilir ya da bu yanıtı fonksiyonel yardım sağlayabilir. Böylece genetik kaynaklı S epitop cevapsızlığının üstesinden gelinmesine yardım eder. Bu nedenlerle S antijen aşılara HBcAg eklenmesinin insanlardaki etkinliği arttırabileceği ve S antijenine cevapsızlığın söz konusu olduğu bireylerde antikor yanıtı geliştirebileceği düşünülmektedir. Ancak anti-HBs'nin tersine HBcAg'ye karşı oluşan antikorlar koruyucu değildir. Erken beliren ve uzun süre kalıcı özelliği olan anti-HBc antikorları, HBV enfeksiyonu geçiren sağlıklı bireyler yanında persistan HBV enfeksiyonlu hasta serumlarında da bulunur. Anti-HBc IgM akut dönemde, HBsAg'nin kaybolup anti-HBs'nin henüz belirmediği dönemde (window period) pozitifleşir. Fakat bu antikoru tek başına akut enfeksiyon göstergesi olarak algılanması yanlıştır; çünkü bazı HBsAg taşıyıcıları ile çoğu kronik hepatitli hastada düşük titrelerde de olsa bu antikora rastlanır. Dolayısıyla anti-HBc IgM'nin pozitifliğinden çok negatif bulunması daha değerlidir (1,12,14,23,24,38,47).

3.1.5.3. Polimeraz (P) Proteinini

Hepatit B virüsünün yapısında bulunan polimeraz geni, HBV genomunun yaklaşık 3/4'ünü içine alan en uzun gen bölgesidir. P proteini, 832 aminoasitten (bazen 845 aminoasite kadar uzar) oluşmuş ve 90 kDa molekül ağırlığındadır. P proteini, fonksiyonel olarak revers transkriptaz, endonükleaz (RNase H), DNA'ya bağlı RNA polimeraz ve RNA'ya bağımlı polimeraz aktivitesine sahiptir. Genetik analizler sonucunda, aminoterminal uçtan karboksiterminal uca doğru düzenlenmiş farklı fonksiyonel bölgeler tanımlanmıştır (23). Bu bölgeler ve fonksiyonlarını sıraladığımızda;

⇒ terminal protein; negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde RNA pregenomunun tersine transkripsiyonu için “primer” olarak hizmet verir.

⇒ spacer bölge; bu bölgenin enzim aktivitesi üzerine direkt etkisi yoktur, çıkarılması durumunda aktivite kaybı olmaz.

⇒ DNA polimeraz; revers transkriptaz aktivitesi

⇒ RNase H aktivitesi; RNA pregenomunun sindirilip yok edilmesinde endonükleaz görevi üstlenir.

Ancak etkinlikleri farklı olan bu bölgelerin viral bir proteaz tarafından parçalanma sonucunda mı? yoksa yapının bütünlüğünün korunmasıyla mı? işlev gördüğü henüz tam olarak açıklığa kavuşmamıştır. P proteini immunojeniktir. Hasta serumunda bulunan anti-DNA polimeraz antikorları, sentetik peptid antijenleri ile gösterilebilmektedir (23,41,58).

3.1.5.4. X Proteini

X geni, HBV genomunda 1376 ile 1838. nükleotidler arasında yer alan en küçük gen bölgesidir. Tüm memeli hepatit B virüslerinde bulunur. X geni, transkripsiyonel transaktivatörler olarak görev yapan iki protein sentezler. X geni tarafından sentezlenen HBxAg, 154 aminoasitten meydana gelmiş, 16 kDa molekül ağırlığında, küçük, bazik bir proteindir. X proteini, kB gen bölgesi (hücrel transkripsiyon faktör-NFkB-için bağlayıcı dizi) tarafından kontrol edilen transkripsiyonu aktive eder. Bu gen bölgesi bazı virüs (Human Immunodeficiency Virüs tip 1; HIV-1 ve Simian Virüs 40; SV-40) ve hücrel genleri (β - interferon geni) regüle eden ortak bir enhancer dizisidir. Dolayısıyla X proteini; β -inferferon enhancer elementlerince kontrol edilen transkripsiyonu, HIV-1 ve SV-40 virüsünü aktive eder. Diğer taraftan X proteini tümör supressör gen ürününün (p53) işlevini

bozar (23,28). Bu durum HBV ile ilişkili hepatokarsinogenez sürecinin ilk aşamasında, X proteininin etkili olduğunu ve HBxAg'nin hepatoselüler karsinoma gelişiminde rol oynayabileceğini düşündürmektedir. HBxAg'nin HBV transkripsiyonunu da aktive ettiği gösterilmiştir. Ancak invitro çalışmalar bu proteinin gen açıklanması veya HBV replikasyonu için mutlak gerekli değildir (23). Viral DNA'ya bağlanmayan HBxAg'nin HBV ile infekte hastaların karaciğerlerinde açıklandığına dair görüşler vardır. Ayrıca, bu proteinin tümör baskı geni ürününün işlevini bozduğu belirlenmiş ve bu nedenle X proteininin HCC'nin şekillenmesinde etkin olduğu düşünülmektedir (18,23).

3.1.6. Duyarlılık ve Dirençlilik

Hepatit B virüsü, serum içinde 30-32°C'de 6 ay, -20°C'de ise yıllarca canlılığını korur. Serum içinde 60°C'de 4 saat içinde inaktive olur, albümin içinde aynı ısı derecesindeki dayanıklılığı daha uzun olup, 10 saat kadardır. Kuru sıcak hava ile 180°C'de 1 saatte, otoklavda 121°C'de 15 dakikada, kaynatma ile 10-20 dakikada inaktive olur. Kimyasal ajanlardan; %0.1-%0.2 glutaraldehit, %0.5-%1'lik sodyum hipoklorid (veya 500 ppm serbest klor) izopropil veya etil alkol virüsü inaktive eder. HBsAg içeren kan, plazma ve diğer kan ürünlerinin ultraviyole ışınlarına maruz bırakılmasının infektivite ve antijenik yapı üzerine etkisi yoktur (6,12).

3.1.7. Hepatit B Virüsü Mutantları

Kısmen çift sarmallı bir DNA virüsü olan HBV, yaşam siklusu sırasında pregenomik RNA'dan tersine transkripsiyonla DNA'ya dönüşür. Her ne kadar hızlı replikasyon yeteneğine sahip bir virüs olarak bilinse de, revers transkriptaz

enziminin ilk okuma yeteneğindeki zayıflık nedeniyle, bu aşamada nükleotid yerleşiminde yanlışlıklar meydana gelmekte ve sonuçta genom yapısında moleküler düzeyde mutasyonlar ortaya çıkmaktadır (17). HBV ile infekte olgulardan elde edilen değişik suşlar üzerinde yürütülen çalışmalar, genom üzerindeki herhangi bir yerde (S, pre-C/C, X, P, promotor ve enhancer) ortaya çıkabilen bu mutasyonların;

- ⇒ tek bir taban bazının değişimi
- ⇒ bir veya daha fazla sayıda nükleotidin silinmesi
- ⇒ aynı dizinin düz veya ters biçimde tekrar edilmesi
- ⇒ nükleotid dizilerinin yeniden düzenlenmesi, gibi farklı genetik

mekanizmalarla oluştuğunu göstermiştir. Virüsün gen bazında oluşturduğu mutasyonlar, açıklanan antijenik determinantların değişimine neden olmakta, böylece gerek immün yanıtta kaçma gerekse aşılmalarda başarısızlıklara yol açmaktadır (13,23).

3.1.7.1. Yüzey (Kılıf) Mutantları

Hepatit B virüsü yüzey varyantları ile ilgili olarak tanımlanan ilk önemli mutasyon, allellerde ki subtip determinant çiftlerinde (d/y veya w/r) saptanmıştır. Yapılan incelemeler bu immünolojik farklılığın 519. ve 633. nükleotidlerdeki değişiklikten kaynaklandığını ortaya koymuştur. Sentez sırasında 519. nükleotiddeki değişime bağlı olarak HBsAg'nin 122. aminoasiti olan lizinin, arginin ile yer değiştirmesi durumunda "d" determinantı "y" determinantına dönüşmekte; aynı şekilde nükleotid 633'ün sorumlu olduğu 160. aminoasitteki lizinin yerine arginin gelmesi "w" determinantının "r" determinantına dönüşmesine sebep olmaktadır. Yüzey geni ile ilgili mutasyonlar, daha az sıklıkta,

pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinde de ortaya çıkabilmektedir. Anti-HBs ve HBsAg'nin birlikte pozitif olduğu kronik hepatitli bir hastada pre-S2 bölgesinin 9-22. aminoasitleri arasında 14 aminoasitlik kısmın silindiği ve "a" determinantının ilk kıvrımında üç, ikinci kıvrımında ise bir aminoasitin yer değiştirdiği bir mutant tanımlanmıştır. Yapılan çalışmalar, özellikle kronik ve fulminant hepatitli olgularda pre-S gen mutasyonlu defektif HBV varyantlarına, daha sık rastlandığını ortaya koymuştur (1,12,19,23,29,67).

Hepatosit membranına bağlanma ve akut HBV enfeksiyonu sırasında pre-SI bölgesinde de mutasyonel değişiklikler görülebileceği bildirilmiştir (26). Gerken ve arkadaşları HBsAg ve HBeAg pozitif, karaciğer kanserli bir hastadan pre-SI bölgesinin 183.baz çiftinde silinme mutasyonu tanımlamışlar (25), sonraki yıllarda aynı mutasyonu içeren varyant, Japonya'da kronik hepatit hastası olan iki kişiden de izole edilmiştir. HBV genomunda pre-SI bölgesinin 183. baz çiftindeki silinme mutasyonu, pre-S2 promoter bölgesi ile pre-SI'deki T ve B hücre tanıma bölgelerini ortadan kaldırmakta virüs immün yanıtı kaçılabilmektedir (32). Çalışmalar göstermektedir ki; viral replikasyon kaybı olmaksızın anti-HBe serokonversiyonu gösteren bazı hastalardan izole edilen HBV DNA'ların incelenmesi ile prekor/kor geni üzerindeki mutasyonların varlığı ortaya konmuştur. Klasik HBsAg subtiplerinde en önemli mutasyon 145. aminoasit pozisyonunda glisin yerine arginin gelmesidir. 587. nükleotidde guanin (G) bazı bulunmakta ancak mutant suşlarda guanin, adenin (A) ile yer değiştirmekte, sonuçta GGA (glisin) yerine AGA (arginin) sentezlenmektedir. Bu durumda klasik HBsAg subtipleri ile hazırlanan aşının koruyuculuğu yeterli olmamaktadır. HBV S mutantları ile infekte olgularda görülebilen, tek başına

HBV DNA pozitifliği ve tek başına HBsAg pozitifliği, anti-HBs ile HBsAg'nin birlikteliği gibi alışılmadık serolojik profiller görülebilmektedir. Bu durumda HBsAg saptanmasında hangi tip (monoklonal veya poliklonal) antikor kullanıldığı da önem kazanmaktadır (1,6,14,25,29,30).

3.1.7.2. Prekor/kor Mutantları (pre-C/C)

Prekor bölgesinde görülen en önemli mutasyon HBeAg'nin açıklanmasını engelleyen durdurma kodonun oluşumudur. Normal şartlarda, prekor bölgesinde durdurma kodonu bulunmaz ve prekor bölgesinin başlangıç kodonundan başlayan sentez işlemi kor bölgesinin başlangıç kodonu ile devam eder. Eğer prekor bölgesinin 1896. nükleotidindeki guaninin (G) yerini adenin (A) alırsa, kodon 28 (TGG, triptofan kodonu) TAG (durdurma kodonu) niteliğini kazanır ve HBeAg sentez edilemez (69). HBeAg'nin hepatosit yüzeyinde açıklanmasını engelleyen durdurma kodon mutasyonu virüsün, konağın sitotoksik yanıtından kaçarak yaşamını sürdürmesini sağlar (76). Prekor bölgesinde 1896. nükleotiddeki durdurma kodon mutasyonu, nükleotid 1858 varyantları ile yakın ilişkilidir. Nükleotid 1858'de prekor kodon 15'deki prolin için timin (T) veya sitozin (C) olabilir (CCT veya CCC). Nükleotid 1858'de sitozin bulunan gen bölgesinde 1896. nükleotiddeki durdurma kodon mutasyonu görülmemekte; fakat, timin bulunan gen bölgesinde gelişmektedir (7,15,46,69).

Son yıllarda yapılan çalışmalar, adenin 1896 mutasyonunun genomik duyarlılığının HBV genotiplerine bağlı olabileceğini düşündürmektedir. Genotip A içinde yer alan gen bölgelerinde, prekor mutantlarının düşük sıklığı nükleotid 1858'de sitozin bulunması ile açıklanabilmektedir. HBV'nin D genotipine sahip olan gen bölgelerinde ise prekor mutantlarının sıklığı çok yüksektir. Bu durum

nükleotid 1858'de timin varlığı ile ilişkilidir. Nükleotid 1858'de timin varlığı genotip B ve E'ye ait gen dizilimlerinde %100, genotip C'ye ait gen dizilimlerinde %85 ve genotip D'ye ait gen dizilimlerinde %99 oranında gözlenmiştir (44). Bu da genotip B, C ve D'nin yaygın olduğu Doğu Asya ve Akdeniz bölgesinde TAG mutasyonlarının neden yüksek sıklığa sahip olduğunu açıklamaktadır. Genotip F'ye ait gen dizilimlerinde nükleotid 1858'de timin varlığı ile prekor TAG mutantlarının varlığı saptanmıştır (44,49). Hepatit B virüsü kor bölgesi mutasyonları, prekor mutasyonları ile birlikte veya bunlar olmadan da ortaya çıkabilir. Prekor/promotor bölgesindeki değişiklikler hem HBeAg sentezini hem de viral replikasyonu etkilediği bildirilmektedir (11,15,44).

3.1.7.3. Polimeraz Mutantları

Hepatit B virüsünün replikasyonunu inhibe etmek amacıyla, viral hastalıkların tedavisi için geliştirilmiş olan gansiklovir, lamivudine ve famsiklovir gibi pek çok antiviral ilaçlar kullanılmaktadır. Bu ajanlar her ne kadar HBV replikasyonunu baskılamakta oldukça etkili olsalar da uzun süreli kullanımlarından sonra ilaca dirençli HBV suşları ortaya çıkmaktadır (5). Şu ana kadar ilaca bağlı en iyi tanımlanmış HBV mutantları lamivudine (LAM) dirençli olanlardır. Hepadnavirüsler, retrovirüslerde olduğu gibi tersine transkripsiyon mekanizmasını kullanarak çoğalır ve revers transkriptazlarının katalitik bölgesinde polimerizasyon aktivitesi için gerekli olan yüksek derecede korunmuş tirozin-metionin-aspartat-aspartat (YMDD) motifine sahiptirler. Uzun süre LAM verilen hastalarda tedavinin 32-40. haftalarından sonra daha fazla olmak üzere HBV-DNA'nın yeniden pozitifleştiği saptanmış ve YMDD motifi incelendiğinde; metioninin valin veya izolösün ile yer değiştirdiği YVDD (tirozin-valin-aspartat-

aspartat) veya Y1DD (tirozin-izolösin-aspartat-aspartat) mutasyonları tespit edilmiştir. Famsiklovir (FAM) ise YMDD mutasyonundan ziyade revers transkriptazın B bölgesinde, 508 (V508L) ve 515 (L515M) pozisyonundaki mutasyonlara neden olmaktadır (57). Bu tip B bölge yer değiştirmeleri, LAM tedavisini takiben YI/VDD ile ilgili olarak da tanımlanmıştır (52). Söz konusu mutant viral suşlar immunsuprese hastaların serumlarında daha yüksek titrelere ulaşmaktadır (9,30,33,70).

3.1.7.4. X Mutantları

Hepatit B virüsü X gen bölgesi, virüsün replikasyonu için önemlidir. Çünkü X proteini HBV genlerini transaktive etmekte ve kor/promotor, enhancer II, DR1 ile DR2 bu bölgede yer almaktadır. Dolayısıyla bu bölgelerde ortaya çıkan mutasyonlar söz konusu yapıları da etkilemektedir. X geninde meydana gelen değişik mutasyonların fonksiyonel önemi tam olarak açıklığa kavuşmamış olmakla beraber bu tip varyantların infektiviteleri zayıf, replikasyon seviyeleri düşüktür (18). Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'lı, fulminant hepatitli ve sirozun son döneminde bulunan hastalarda X geni üzerindeki 130. (AAG→ATG, lizin→methionin) ve 131. (GTC→ATC, valin→izolösin) kodonlarda nokta mutasyonları bildirilmiştir (6). Her iki mutasyonda transaktivasyon için gerekli olan ve genomun 132-139. kodonları arasında yer alan enhancer II-kor/promotor bölgesine lokalizedir. Nükleotid 1655'deki C'nin T ile yer değiştirdiği bir nokta mutasyonu da tanımlanmıştır. Nükleotid 1770-1777 arasındaki 8 nükleotidlik silinme DNA replikasyonunu baskıladığı ve sonuçta HBsAg'nin negatif hale geldiği bildirilmiştir (6,18,20,81).

3.1.8. HBV Genotipleri

Moleküler düzeyde yapılan çalışmalar sonucunda; Hepatit B virüsünün tam genom nükleotid dizisinde %8'lik veya daha fazla nükleotid farklılıklarına göre, HBV'nin 8 genotipi (A-H) bulunmaktadır (3,34). HBV taşıyıcılık oranları, dünyanın değişik bölgelerinde önemli farklılıklar gösterir. HBV sıklığının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa, Güney Afrika ve A.B.D.'deki persistan taşıyıcılar arasında genotip A yaygındır. HBV bulaşında vertikal geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde (Japonya, Tayvan, Endonezya, Çin, Kore, Avusturalya) genotip B ve C'nin sıklığı yüksektir. Akdeniz Bölgesi, Rusya, Hindistan'da genotip D yaygındır. Batı Afrika'da genotip E görülmektedir. Şu ana kadar HBV suşlarıyla ilgili sınırlı genetik bilginin elde edilebildiği Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV sıklığına sahip ülkelerde ise genotip F'nin sık olduğu tespit edilmiştir. Orta Amerika, Almanya ve Fransa'da genotip G, Güney Amerika, Meksika ve İspanya'da ise en son tanımlanan genotip H bulunmuştur (3,35,83). Bu durum kısmen, vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif dönemin daha uzun oluşu ile açıklanır. Vertikal geçişle infekte olan çocuklarda kronikleşme oranı yaklaşık %80'dir. Bu nedenle hepatit B enfeksiyonu yönünden endemik olan bölgelerde, yüksek taşıyıcılık oranının devamında en önemli mekanizmanın vertikal geçiş olduğu kabul edilmektedir (27,51,78). Bunun aksine genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş daha önemlidir. (3,10,35).

HBV genotipleri ile HBsAg subtipleri arasındaki ilişkilerin saptanması amacıyla tüm genom dizisi ile HBsAg'nin antijenik determinantlarına göre belirlenmiş subtiplerin temel alındığı S gen bölgesi karşılaştırılmış ve genotipler

arasındaki farklılık sınırı % 4 olarak tesbit edilmiş ve genotip-subtip dağılımı yapılmıştır. Ancak, genotip ve subtipler birbirleriyle paralellik göstermemektedir. Bir subtip farklı genotiplere sahip olabileceği gibi, farklı subtiplerde aynı genotipe sahip olabilir (49,65). HBV genotip ve subtiplerinin coğrafik dağılımları tablo-4’de belirtilmiştir.

Tablo- 4 : HBV Genotip ve Subtiplerinin Coğrafik Dağılımı (Kaynak 10 ve 34’den alınarak uyarlanmıştır),

Genotip	Subtipler	En sık görülen bölgeler
A	adw2, ayw1	Kuzeybatı Avrupa, Amerika, Orta Afrika, Hindistan
B	adw2, ayw1	Japonya, Taiwan, Endonezya, Çin
C	adw2, adr ^q +, adr ^q -, ayr, adr	Doğu Asya, Taiwan, Kore, Çin, Japonya, Polonya, Vietnam, Avustralya, Amerika
D	ayw2, ayw3, ayw4,	Akdeniz Bölgesi, Türkiye, Rusya, Hindistan
E	ayw4	Batı ve Sahra altı Afrika
F	adw4q-, adw2, ayw4	Orta ve Güney Amerika, Polonya
G	adw2	Orta Amerika, Fransa, Almanya
H	adw	Güney Amerika, Meksika, İspanya

Hepatit B virüsünün genotiplendirilmesi, virüsün geçişi ve patogenezinin aydınlatılmasında önemlidir. Virüsün farklı izolatları arasında dizilem farklılığının incelenmesi, genotipler arasındaki rekombinasyonlar sonucu oluşan mozaik yapının görülmesi, varyantların serolojik reaktivitesi ve patojenitesi, virülens ve tedaviye yanıtını gösterebileceği farklılıkların anlaşılabilmesi açısından önemlidir. Bununla birlikte HBV coğrafik dağılımla bağlantılı olarak da genetik farklılıklar

göstermektedir. HBV enfeksiyonu epidemiyolojisinin analizi ve bireysel olgulardaki enfeksiyon kaynağının belirlenmesinde de önemlidir (62).

Hepatit B virüs patojenitesinde genotipik farklılıkların rolü ve HBV genotiplerinin enfeksiyonun klinik seyri üzerine etkisi henüz tam olarak belirlenememiştir. Bununla beraber HBV genotipleri arasında klinik ve patolojik farklılıkların olduğuna dair deliller mevcuttur. Kronik hepatitlerde A genotipi baskın bulunurken, akut hepatitlerde genotip D daha baskın olduğu saptanmıştır. Genotip B özellikle gençlerde hepatoselüler karsinoma gelişimi ile ilişkili olarak görülürken, genotip C, daha ciddi uzun süreli karaciğer hastalığı ile ilişkilendirilmiştir. Genotip A'nın, çocuklarda daha çok kronik B hepatitine sebep olduğu saptanmıştır. Genotip G'nin de kronik HBV hastalarından izole edildiği belirtilmektedir (40,48,61,63).

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. Gereç

4.1.1. Hasta Grubu

Çalışmaya, Fırat Üniversitesi Tıp Merkezine HBV enfeksiyonu şüphesi ile başvuran ve Fırat Üniversitesi Mikrobiyoloji Ana Bilim Dalı Viroloji Laboratuvarı'nda, HBV DNA yönünden araştırılması yapılan hastalar arasında serum HBV DNA'sı pozitif 127 hasta (74 erkek ve 53 kadın) dahil edildi.

4.1.2. Kimyasallar (Tampon Çözeltiler ve Solüsyonlar)

Agaroz	Onbio Inc
DNA Marker (100bp)	MBI Fermentes
dNTP set (100 mM)	Promega
Ethanol (Etil Alkol Absolute)	Carlo Erba Reagenti
Etidyum Bromür (EtBr)	Sigma
Etilendiamintetraasetikasit (EDTA)	Sigma
Fenol Kloroform	Merck
Hidroklorik Asit (HCL)	Riedel-de Haën
İzoamilalkol	Sigma
Mineral yağ	Sigma
Prim erler (sense, inler ve anti sense)	IDT
Proteinaz K	MBI Fermentes
Sodyum Asetat	Sigma
Sodyum Dodesil Sülfat (SDS)	Sigma
Sodyum Hidroksit (NaOH)	Merck
Taq DNA polimeraz (500UI)	MBI Fermentes

☐	Tris base	Sigma
☐	Restriksiyon Enzimleri (RE)	
»	<u><i>AlwI</i></u> (1250 ÜNİTE)	10 units/μl (NEB R0513L)
»	<u><i>EcoRI</i></u> (1500 ÜNİTE)	10 units/μl (MBI FERMENTAS)
»	<u><i>HphI</i></u> (2000 ÜNİTE)	10 units/μl (NEB R0158L)
»	<u><i>NciI</i></u> (5000 ÜNİTE)	10 units/μl (MBI FERMENTAS)
»	<u><i>NlaIV</i></u> (1000 ÜNİTE)	10 units/μL (MBI FERMENTAS)
»	<u><i>NlaIV</i></u> (200 ÜNİTE)	10 units/μl (NEB R0126L)

4.1.3. DNA Ekstraksiyonu için Kullanılan Kimyasal Maddeler

☐	Proteinaz K	(Promega, ABD)
»	Proteaz	0.5 gr (Sigma, ABD)
»	NaCl	150mM (Sigma, ABD)
»	Tris-HCl, pH=8	20mM (Sigma, ABD)
»	EDTA	50mM (Sigma, ABD)
»	SDS	%10'luk (Sigma, ABD)
»	Distile su	100 ml
☐	Fenol Kloroform-izoamil alkol (24:24:1)	(Sigma, ABD)
☐	Kloroform-izoamil alkol (24:1)	(Sigma, ABD)
☐	3 M Sodyum Asetat	(Sigma, ABD)
☐	% 99.5'lik etanol	(Kimetsan, Türkiye)
☐	% 70'lik etanol	(Kimetsan, Türkiye)

4.2. Yöntem

4.2.1. Serumdan HBV DNA İzolasyonu

Hasta serumları analiz yapılincaya kadar -20°C 'de muhafaza edildi ve HBV DNA ekstraksiyonu için serumlar çözündürülerek, Proteinaz K/Fenol-Kloroform-İzoamil alkol yöntemi ile DNA ekstraksiyon işlemi yapıldı (72).

4.2.1.1. DNA Ekstraksiyon Yöntemi

1. 1.5 ml'lik ependorf tüpler numaralandırılarak içine 500 μl Proteinaz K solüsyonu eklendi.
2. Üzerine 100 μl serum örneği eklenip pipetlenerek homojenize edildi.
3. Bir gece 37°C 'de sıcak odada bekletildi.
4. Tüpler sıcak odadan alınarak üzerlerine 1:1 oranında 600 μl fenol/kloroform/izoamil alkol (24:24:1) eklenerek, 15 saniye vortekslendikten sonra 13.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi.
5. Üst faz, 1 ml'lik pipetle protein tabakasına değmeden dikkatlice alınarak yeni tüplere aktarıldı.
6. Karışım üzerine 600 μl kloroform/izoamil alkol (24:1) eklenip 13.500 rpm'de 8 dakika santrifüj edilerek üst faz tekrar yeni bir tüpe aktarıldı.
7. Üzerine 1000 μl %99.5'lik etanol ve alınan üst fazın %10'u kadar 3M'lık sodyum asetat eklendi. Karışım 5 saniye vortekslenerek -20°C de bir gece bekletildi.
8. -20°C den alınan tüpler 13.500 rpm'de 15 dakika santrifüj edildi. DNA pelletine dokunmadan, 1 ml'lik pipet ile etanol dikkatlice çekildi.
9. Pellet üzerine % 70'lik etanolden 800 μl eklendi ve 15 saniye vortekslenip, 13.500 rpm'de 10 dakika santrifüj edildi.

10. Etanol, 1 ml'lik pipet ile çekilerek, tüplerin ağzı açık kalacak şekilde 30 dakika kurumaya bırakıldı.
11. Tüpler üzerine 40 µl distile su eklenip, DNA'nın süspansiyonu için yarım saat oda ısısında bekletildi.
12. Böylece PZR için gerekli DNA süspansiyonu kullanıma hazır hale geldi.

4.2.2. HBV DNA'nın S Gen Bölgesinin PZR ile Amplifikasyonu

4.2.2.1. Primerler

Aşağıda nükleotid pozisyonları belirtilen sense, inner sense ve anti sense primerlerle; HBV S gen bölgesinde, 685 bp ve 485 bp uzunluklarının amplifikasyonu için 127 hasta HBV DNA'larının semi-nested PZR ile amplifikasyonu planlandı (54).

<u>Primer</u>	<u>Tip</u>	<u>Baz dizisi</u>	<u>Nt. pozisyonu</u>
HBMF1	Sense	5'-YCCTGCTGGTGGCTCCAGTTC-3'	nt. 55-75
HBMF2	Inner sense	5'-GTCTAGACTCGTGGTGGACTTCTCTC-3'	nt. 246-271
HBMR2	Anti sense	5'-AAGCCANACARTGGGGGAAAGC-3'	nt. 730-709

Birinci aşamada; sense primer HBMF1 ve anti sense primer HBMR2 kullanılarak 685 bp'lık bölgenin çoğaltılması sağlandı.

İkinci aşamada; Inner sense primer HBMF2 ve anti sense primer HBMR2 kullanılarak 485 bp'lık bölgenin çoğaltılması sağlandı.

4.2.2.2. PZR Amplifikasyon Karışımı

Amplifikasyon karışımı 50 µl'lik reaksiyon hacminde gerçekleştirildi. Bunun için otomatik ısı döngü cihazı (thermal-cycler PCR, Hybaid, Sprint, İngiltere) kullanıldı.

Amplifikasyon karışımı

Hacim

10X PZR tamponu	5 µl
25 mM MgCl ₂	5 µl
10mM dNTP karışımı	1 µl
Sense primer HBMF1 (100 nmol)	0.25µl
Anti sense primer HBMR2 (100 nmol)	0.25 µl
Taq Polimeraz (5U/µl)	0.5 µl
dH ₂ O	28 µl
HBV DNA kalıbı	10 µl

PZR Amplifikasyon Protokolü

Başlangıç denatürasyon	: 94 °C'de 4 dakika
Denatürasyon	: 94 °C'de 1 dakika
Primer bağlanması	: 60 °C'de 1 dakika
Uzama	: 72 °C'de 1 dakika
Döngü sayısı	: 40 siktüs
Son uzama	: 72 °C'de 5 dakika

4.2.3. PZR Ürünlerinin Analizi

Thermal-Cycler cihazından alınan PZR ürünlerinin analizi jel elektroforezi yöntemi ile gerçekleştirildi. Agaroz jel elektroforezi için kullanılan kimyasal karışımların içerikleri aşağıda belirtilmiştir (72).

50X TAE solüsyonu

Tris base (Sigma, ABD)	242 gr
Glasial asetik asit (Sigma, ABD)	57.1 ml
0.5 M EDTA pH=8 (Sigma, ABD)	100 ml

1X TAE solüsyonu

50X TAE solüsyonu	20 ml
dH ₂ O	980 ml

Bromfenol blue jel yükleme boyası

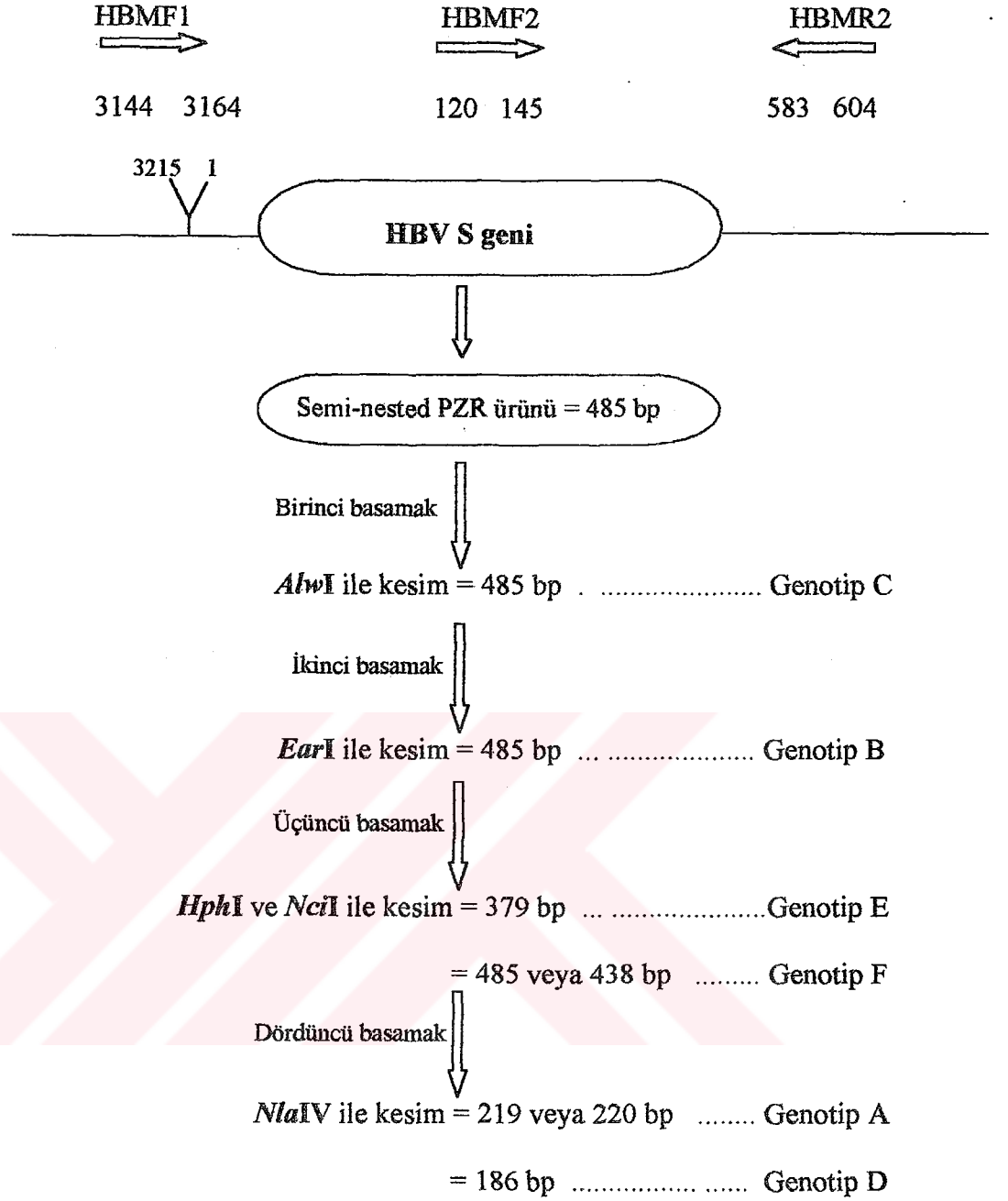
%30 Bromfenol blue	6 gr
%40 Gliserol	8ml
1X TAE solüsyonu	20 ml

4.2.4. PZR Ürünlerinin Jel Elektroforezinde Yürütülmesi

PZR ürünlerinin elektroforeze yüklenmesi için %3'lük agaroz jel hazırlandı. Bunun için 3 gr agaroz hassas terazide tartıldı. Üzerine 100 ml 1X TAE solüsyonu eklendi. Kaynayınca kadar ısıtıcıda bekletildi daha sonra ısı 50 °C'ye soğutularak, üzerine 10 µl etidyum bromür eklendi. Hazırlanan karışım elektroforez tepsisine döküldü. Jel donduktan sonra yatay olarak elektroforez tankına yerleştirildi. Amplifikasyon ürününden 10 µl alınarak, 3 µl Bromfenol blue yükleme boyası ile karıştırılıp jeldeki kuyucuklara yüklendi. Moleküler ağırlık belirteci (100 bp Marker) eşliğinde 30 dakika 90 V sabit elektrik akımında yürütüldü (72). Daha sonra ultraviyole (UV) transuliminator altında, moleküler ağırlık belirteci (Marker: M) ile karşılaştırılarak bant büyüklükleri değerlendirildi.

4.2.5. Restriksiyon Enzimi Kesim Deneyleri

Genotiplendirme çalışması, daha önce Mizokami ve arkadaşları tarafından yapılan ve GenBank'tan alınan 68 HBV full-genom dizileriyle karşılaştırılarak ortaya çıkarılan RFLP yöntemiyle, HBV genotiplerini belirleme stratejisine göre uyarlanarak gerçekleştirildi (54) (Şekil- 4). Semi-nested PZR amplifikasyonu ile elde edilen 485 baz çifti uzunluğundaki gen bölgesinde 5'-G G A T C-3' dizisini tanıyan *AlwI*, 5'-C T C T T C-3' dizisini tanıyan *EcoRI*, 5'-G G T G A-3' dizisini tanıyan *HphI*, 5'-C C S G G-3' dizisini tanıyan *NciI* ve 5'-G G N N C C-3' dizisini tanıyan *NlaIV* enzimi kullanılarak yapıldı.



Şekil – 4 : RFLP yöntemiyle HBV genotiplerini belirleme stratejisi. Semi-nested PZR ürünlerinin, birinci basamakta *AlwI* ve *EarI* enzim kesim deneyi sonucu 485 bp’lık bölgede, genotip C ve genotip B sınıflandırılmaktadır. *HphI* ve *NciI* enzim kesimleriyle oluşan bölgelerde genotip E ve genotip F olarak sınıflandırılmaktadır. Son basamakta ise *NlaIV* enzim kesim deneyi sonucunda oluşan kesim bölgelerine göre genotip A ve genotip D olarak sınıflandırılmaktadır.

4.2.5.1. *AlwI* Enzim Kesimi

5µl PZR ürünü, 1µl *AlwI* enzimi, 5µl buffer 4 ve 14 µl dH₂O varlığında 25µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37 °C'de kesime bırakıldı. Kesim ürünlerinden 20µl alınarak ve 3µl bromfenol blue ile karıştırılarak %3'lük agaroz içeren jele yüklendi. Ürünler 1X TAE içinde ve 140V sabit voltajda yaklaşık 30-40 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

4.2.5.2. *EcoRI* Enzim Kesimi

5µl PZR ürünü, 2µl *EcoRI* enzimi, 5µl buffer 1 ve 13 µl dH₂O varlığında 25µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37 °C'de kesime bırakıldı. Kesim ürünleri 20µl alındı ve 3µl bromfenol blue boya ile karıştırılarak %3'lük agaroz içeren jele yüklendi. Ürünler 1X TAE içinde ve 140V sabit voltajda yaklaşık 30-40 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

4.2.5.3. *HphI* ve *NciI* Enzimleri ile Kesim

5µl PZR ürünü, 2µl *HphI* enzimi ve 5µl buffer 4, 2µl *NciI* ve 5µl buffer 4, 6 µl dH₂O varlığında 25µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37 °C'de kesime bırakıldı. Kesim ürünlerinden 20µl alınarak, 3µl bromfenol blue boya ile karıştırılıp %3'lük agaroz içeren jele yüklendi. Ürünler 1X TAE içinde ve 140V sabit voltajda yaklaşık 30-40 dakika elektroforeze tabi tutuldu.

4.2.5.4. *NlaIV* Enzim Kesimi

5µl PZR ürünü, 1µl *NlaIV* enzimi, 5µl buffer 4+BSA ve 14 µl dH₂O varlığında 25µl hacim içinde 3 ile 6 saat 37 °C'de kesime bırakıldı. Kesim ürünleri 20µl alındı ve 3µl bromfenol blue boya ile karıştırılarak %3'lük agaroz

içeren jele yüklendi. Ürünler 1X TAE içinde ve 140V sabit voltajda yaklaşık 30-40 dakika elektroforeze tabi tutuldu.



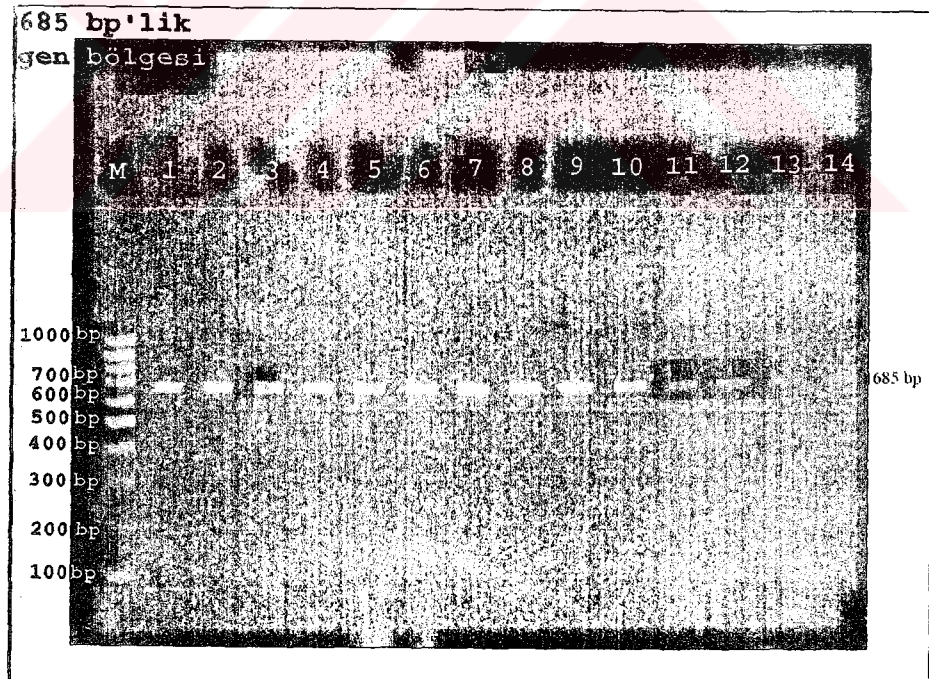
5. BULGULAR

5.1. Hastalar

Çalışmaya rutin HBV-PZR taramaları sonucunda HBV ile infekte olduğu belirlenen 127 hasta (74 erkek ve 53 kadın) dahil edildi. Bütün örnekler HBsAg pozitif olup, ortalama HBV DNA düzeyleri 7000 pg/ml (1300 ile 18142 pg/ml) olarak saptandı. 127 serum örneğinin ekstraksiyonu sonucu elde edilen DNA'lar PZR işleminde kalıp olarak kullanıldı.

5.2. Hepatit B virüsü S geninin PZR ile gösterilmesi

Hepatit B virüsü S geni bölgesine özgül HBMF1 ve HBMR2 primerler kullanılarak PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünü % 3'lük agaroz jelde yürütülerek 685 bp uzunluğunda gen bölgesi görüntülendi (Şekil-5).

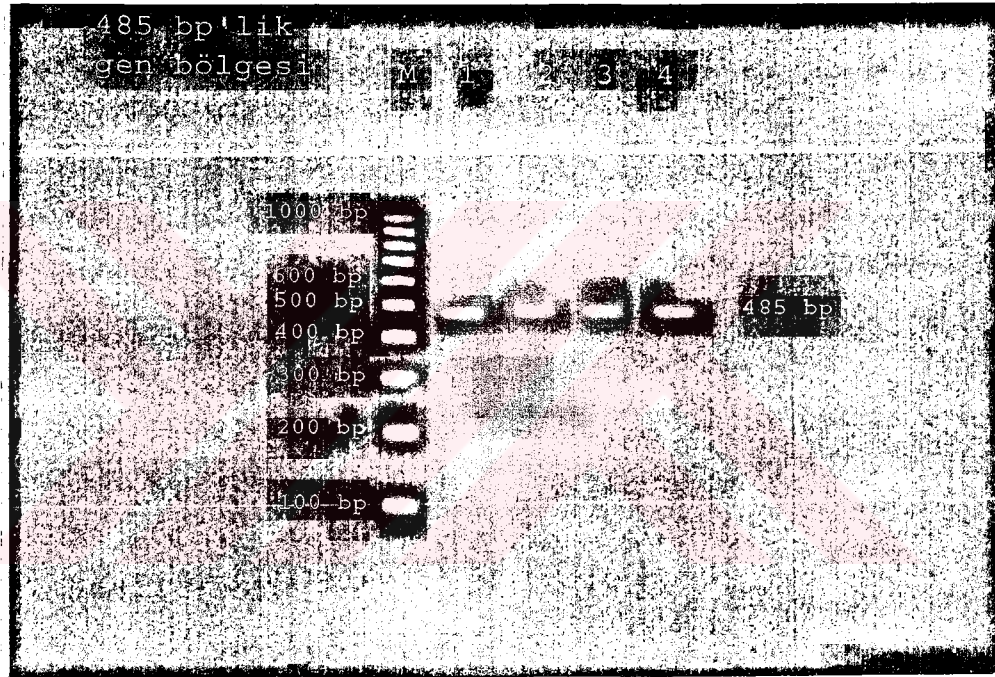


Şekil – 5 . HBMF1 ve HBMR2 primerleri ile, PZR sonucu elde edilen 685 bp'lik S gen bölgesi

M; 100 bp'lik DNA markeri, Sütun 1-14 S gen bölgesi PZR ürünü

5.3. Hepatit B virüsü S geninin semi-nested PZR ile gösterilmesi

HBMF1 ve HBMR2 primerleriyle çoğaltılan birinci PZR ürünleri kalıp olarak kullanılarak, HBMF2 ve HBMR2 primerleriyle semi-nested PZR amplifikasyonu gerçekleştirildi. Amplifikasyon ürünü %3'lük agaroz jelde yürütülerek 485 bp uzunluğundaki S gen bölgesi görüntülendi (Şekil-6).



Şekil – 6 : HBMF2 ve HBMR2 primerleriyle yapılan semi-nested PZR sonucu elde edilen 485 bp'lik S gen bölgesi

M, 100 bp'lik DNA markeri, Sütun 1-4 S gen bölgesi semi-nested PZR ürünleri

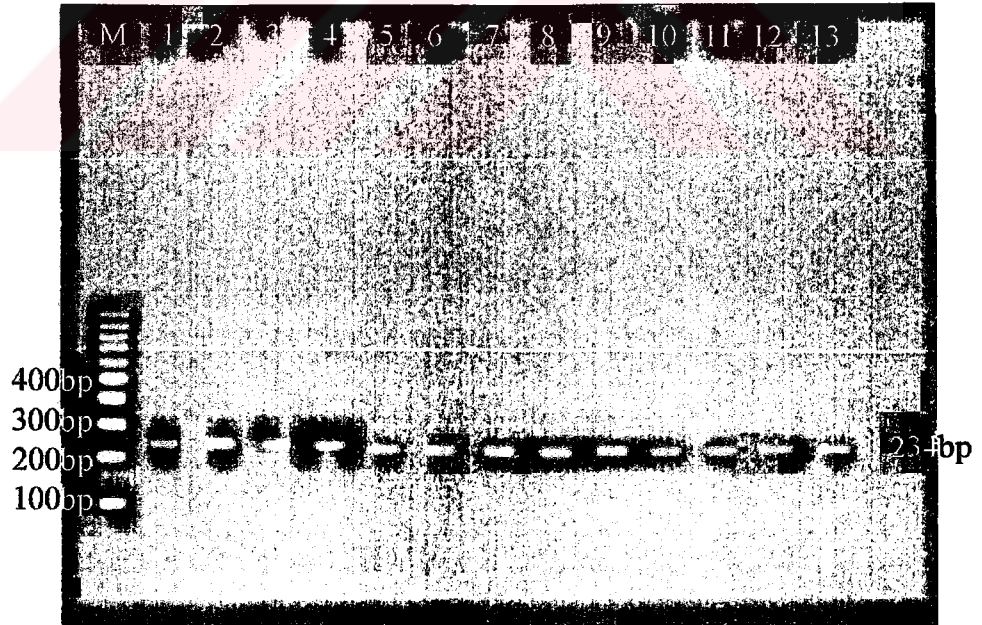
5.4. Enzim kesim deneyleri ile HBV genotiplerinin belirlenmesi

HBV DNA'larından, semi-nested PZR ile çoğaltılan 485 bp'lik PZR ürünlerinden 5'er µl alınıp, beş farklı enzimle (*AlwI*, *EcoRI*, *HphI*, *NciI* ve *NlaIV*) enzim kesim deneyi yapılarak her bir örneğin genotipi belirlendi.

5.4.1. Hepatit B virüsü PZR ürünlerinin *AlwI* enzimiyle kesimi

Semi-nested PZR ile çoğaltılan HBV S geni, *AlwI* enzimiyle kesildi. *AlwI* kesim ürünleri jelde yürütülerek, 485 bp'lik S gen bölgesinin 251. pozisyonda kesildiği ve 234 bp uzunluğunda fragmentin varlığı görüldü. Genotip C dışındaki bütün genotipler de bulunan bu enzim bölgesi kullanılarak, örneklerimizin genotip C olmadığı ortaya konuldu (Şekil-7).

AlwI

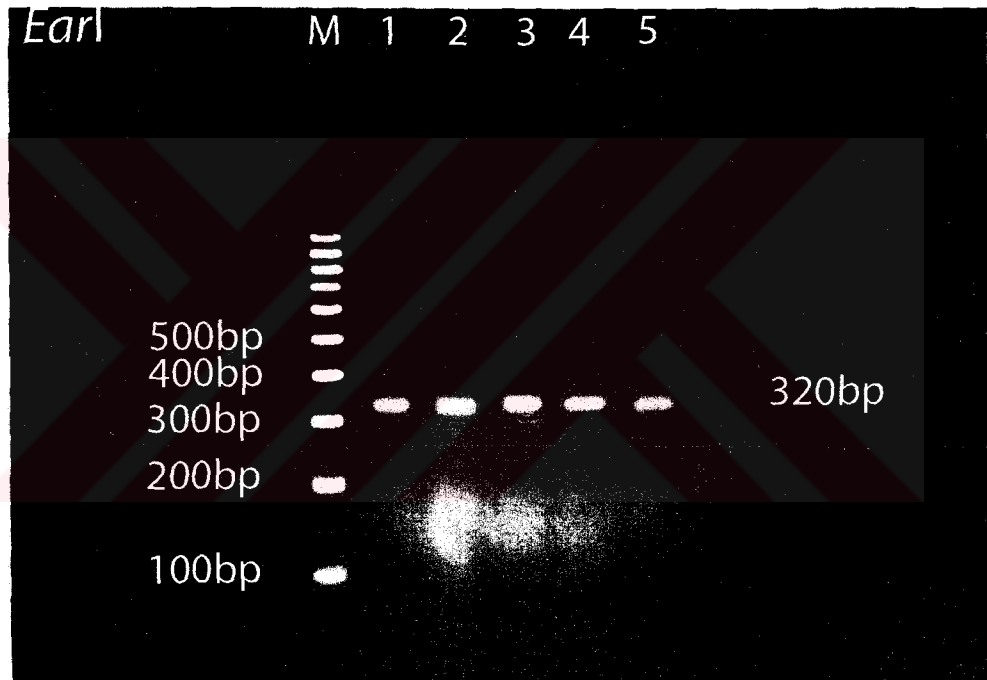


Şekil-7: *AlwI* enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.

M; 100 bp'lik DNA markeri, Sütun 1-13 *AlwI* enzim kesim ürünleri

5.4.2. Hepatit B virüsü PZR ürünlerinin *EarI* enzimiyle kesimi

HBV S geni sadece genotip B için *EarI* enzim kesim bölgesini içermemektedir. Örneklerimizin *EarI* ile 165. pozisyonda kesildiği ve 320 bp uzunluğunda fragmentin varlığı gözlemlendi (Şekil-8). Böylece örneklerimizin genotip B olmadığı ortaya konuldu.

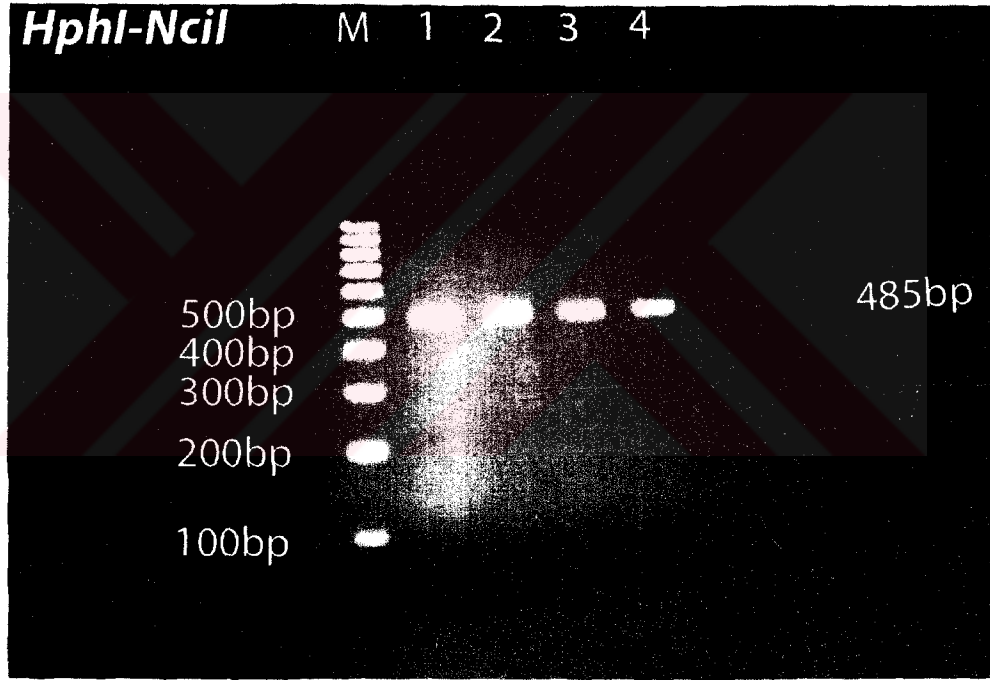


Şekil-8: *EarI* enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.

M; 100 bp'lik DNA markeri, Sütun 1- 5 *EarI* enzim kesim ürünleri

5.4.3. Hepatit B virüsü PZR ürünlerinin *HphI* ve *NciI* enzimleriyle kesimi

Genotip E ve genotip F tayini için, *HphI* ve *NciI* enzimleriyle kesim yapıldı. 485 bp'lık gen bölgesinin kesilmediği gözlendi (Şekil-9). 461. pozisyonda *NciI* enzimi ile kesilmiş olsaydı, genotip E olarak tiplendirilecekti. 82. pozisyonda *HphI* enzimi ile kesilmiş olsaydı genotip F olarak tiplendirilecekti. Sonuç olarak, örneklerimizde genotip E ve F bulunamadı.

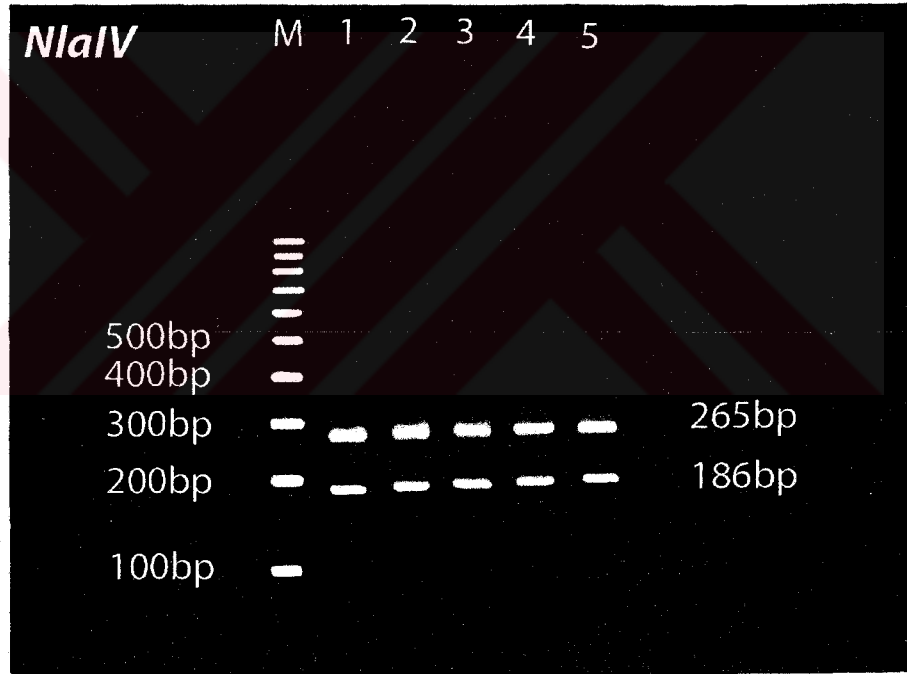


Şekil-9: *HphI* ve *NciI* enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.

M; 100 bp'lık DNA markeri, Sütun 1- 4 *HphI* ve *NciI* enzim kesim ürünleri.

5.4.4. Hepatit B virüsü PZR ürünlerinin *NlaIV* enzimiyle kesimi

Genotip A ve genotip D'yi belirlemek için *NlaIV* enzimi ile kesim yapıldı. 485 bp'lik gen bölgesinde 299. pozisyonda genotip A için *NlaIV* enzim kesim bölgesinin bulunmadığı, bununla beraber genotip D'nin *NlaIV* enzim kesim bölgesinin, 265 ve 299. pozisyonlarda kesim işleminin gerçekleştiği belirlendi. *NlaIV* enzimiyle kesim sonucu, 186 ve 265 bp uzunluğunda fragmentlerin oluştuğu görüldü ve böylece bütün örneklerimiz genotip D olarak tiplendirilmiş oldu (Şekil-10).



Şekil-10: *NlaIV* enzimi ile kesim sonrası PZR ürünlerinin %3'lük agaroz jeldeki görünüşleri.

M; 100 bp'lik DNA markeri, Sütun 1- 5 *NlaIV* enzim kesim ürünleri.

6. TARTIŞMA

Bütün dünyada yaygın olarak görülen hepatit B virüsüne bağlı akut hepatitlerin %5'inin kronikleştiği bunların önemli bir bölümünün siroza dönüştüğü, sirozlu olgularda da hepatacelüler karsinoma (HCC) gelişme riskinin yüksek olduğu bilinmektedir (36,60). Bu yüzden önemli bir sağlık sorunu olan HBV ile mücadelede başarılı olabilmek için HBV epidemiyolojisinin ve moleküler yapısının çok iyi bilinmesi gerekmektedir.

Bu çalışmada, toplum sağlığını tehdit eden ve ülkemizde de endemik enfeksiyon oluşturan HBV'nin epidemiyolojik çalışmalara uygun, hızlı ve kolay uygulanan RFLP (restriction fragment length polymorphism) yöntemi ile genotiplendirmesi yapılmıştır. Toplam 127 örnek kullanılmış ve bütün örneklerimiz genotip D olarak tespit edilmiştir.

Son yıllarda rekombinant DNA teknolojisinin gelişmesine paralel olarak HBV'nin genotiplendirilmesi konusunda yoğun araştırmalar yapılmıştır (35,37,54). Okamoto ve arkadaşları HBV'nin tüm genomunun dizisini belirleyerek, genomlar arasında en az %8'lik bir fark bulmuşlar ve bu farklılığa göre HBV'yi (A-D) 4 genotip olarak sınıflandırmışlardır (36,66). Norder ve arkadaşları, S geni dizisinin genotiplerle bağlantısını inceleyerek, S geni dizileri arasında farklılıkları ortaya koyarak E ve F olmak üzere iki yeni genotip daha tanımlamışlar ve böylece HBV'yi 6 genotip olarak belirlemişlerdir (64,65). Stuyver ve arkadaşları, 2000 yılında Belçika'da yaptıkları bir çalışmada, 3248 baz uzunluğunda ve filogenetik olarak bilinen, hiçbir genotipe uymayan HBV genomları belirlemişlerdir. Bunları bir grupta toplayarak genotip G olarak adlandırmışlardır (77). Arauz-Ruiz ve arkadaşları, 2002 yılında yaptıkları bir

çalışmayla, yeni bir genotipin varlığını ortaya koymuşlar ve genotip H olarak tanımlamışlardır (3). Böylece günümüzde, HBV'nin (A-H) 8 genotipi tanımlanmıştır (3,34,68,83).

Hepatit B virüs genotiplerinin dağılımı coğrafi bölgelere göre farklılıklar göstermektedir (10,34). Bu farklılıklar nedeniyle dünya; düşük, orta, ve yüksek endemisite bölgelerine ayrılmıştır. Sınıflandırılmanın oluşturulmasında, bölgedeki HBsAg ve anti-HBs pozitifliği oranları, enfeksiyonun alınma yaşı ve virüsün hangi bulaş yoluyla alındığı gibi kriterler göz önünde tutulmaktadır. 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 anti-HBs pozitifliği bulunmuştur (8,45).

Yapılan çalışmalarda, bölge sayısının ve hasta sayısının sınırlı olması, çalışmaların yeterli düzeyde olmadığını göstermektedir. Elde edilen sonuçlara göre HBV taşıyıcılık oranları dünyanın değişik bölgelerinde önemli ölçüde farklılıklar göstermektedir. HBV prevalansının düşük olduğu Kuzeybatı Avrupa, Güney Afrika ve A.B.D.'deki persistan taşıyıcılar arasında genotip A baskındır. HBV bulaşında vertikal geçişin ilk sırada olduğu Doğu Asya ülkelerinde (Japonya, Tayvan, Endonezya, Çin, Kore, Avusturalya) genotip B ve C'nin prevalansı yüksektir. Akdeniz Bölgesi, Rusya, Hindistan'da genotip D yaygındır. Batı Afrika'da genotip E görülmektedir (50). Şu ana kadar HBV suşlarıyla ilgili sınırlı genetik bilginin elde edilebildiği Amazon bölgesi ve Peru gibi yüksek HBV prevalansına sahip ülkelerde ise genotip F'nin sık olduğu tespit edilmiştir. Bu durum kısmen, vertikal geçişten sorumlu olan HBeAg pozitif dönemin daha uzun

oluşu ile açıklanır. Vertikal geçişle infekte olan çocuklarda kronikleşme oranı yaklaşık %80'dir. Bu nedenle hepatit B'nin endemik olduğu bölgelerde, yüksek taşıyıcılık oranının devamında en önemli mekanizmanın vertikal geçiş olduğu kabul edilmektedir. Bunun aksine genotip A ve D'nin dominant olduğu Akdeniz ve Sahra altı Afrika ülkelerinde horizontal geçiş daha önemlidir. Orta Amerika, Almanya ve Fransa'da genotip G, Güney Amerika, Meksika ve İspanya'da ise en son tanımlanan genotip H bulunmuştur (3,10,34,35,59).

Hepatit B virüs genotiplerinin, virüs konak ilişkisinde rolü olduğunu gösteren çalışmalar vardır. Tayvan'da yapılan bir çalışmada, hepatocellüler karsinomali (HCC) genç hastaların özellikle genotip B ile infekte olduğu, yaşlı hasta grubunda ise daha çok genotip C'nin etken olduğu belirlenmiştir. Buna karşın Japonya'da yapılan çalışmalarda, hem genç, hem de yaşlı HCC'li hastalarda genotip C saptanmıştır. Genotip C daha ciddi, uzun süreli karaciğer bozukluklarıyla ilişkili olduğu bilinmektedir (10,16,31).

Ülkemizde, HBV genotiplendirme ile ilgili yapılan çalışmalar vardır. Leblebicioğlu ve arkadaşları; nested PZR ve RFLP yöntemiyle; 158 HBV hastasında yaptıkları çalışmayla, 11 olguda PZR analizi negatif sonuçlandığı için genotiplendirme yapılamamış, 147 olgunun tamamı genotip D olarak bulunmuştur (43). Külah ve arkadaşları HBV enfeksiyonu olan 84 hastada S gen bölgesinin nükleotid dizi analizi ile yaptıkları çalışmada tüm örneklerin genotip D içinde yer aldığını belirlemişlerdir (39). Mısırlıoğlu ve arkadaşları İskenderun'da ilkökul öğrencilerinde yaptıkları S geni DNA dizi analizi yapılan 57 öğrencinin tamamında genotip D saptamışlardır (53). Bozdayı ve arkadaşları 67 hasta üzerinde pre-S gen bölgesi dizileriyle yaptıkları genotiplendirme çalışmasında

tüm hastalarda genotip D'yi bulmuşlardır (13). Şentürker ve arkadaşları; HBV DNA'sı pozitif 23 kronik hastada yaptıkları nükleotid dizi analizi ve RFLP yöntemiyle, olguların tümünde genotip D'yi saptamışlardır (75). Elazığ ve yöresinde yaptığımız bu çalışmada, HBV DNA'sı pozitif toplam 127 örnek kullanılmış ve tamamı genotip D olarak tespit edilmiştir. Elde ettiğimiz bu sonuçlar ülkemizin diğer bölgelerinde yapılan çalışmalarla uyum göstermekte ve Türkiye'de sirküle olan HBV genotipinin genotip D olduğu sonucunu desteklemektedir.

Genotip D'nin görüldüğü, ülkemizin de içinde bulunduğu Akdeniz bölgesinde erken horizontal bulaş, enfeksiyonun yayılmasında en önemli geçiş yoludur. Elde ettiğimiz sonuçlar bu yönüyle HBV'nin ülkemizdeki başlıca geçiş yoluna da ışık tutacaktır. Horizontal geçiş mekanizması tam olarak anlaşılamamış; ancak HBV'nin hepatositler yanında periferik mononükleer kan hücrelerinde de replike olabilme yeteneğinin olduğu bilinmektedir. Tükürük gibi vücut sıvılarının veya çok küçük miktarlarda infekte kanın bile, yakın temastaki bireylerde, hasarlı derilere temasında bulaşa neden olabileceği bilinmektedir. Ayrıca bulaş yollarıyla HBV genotipleri arasında ilişki olduğu bildirilmiştir (2,41).

Hepatit B virüs enfeksiyonunda genotip tayini yapılması; farklı genotipler arasında hastalık şiddeti, tedaviye cevap oranı, virüs konak ilişkisi ve virüsün oldukça karmaşık olan yapısının bilinmesi önem arz etmektedir. Sonuç olarak bu çalışmada; RFLP yöntemiyle bölgemizde HBV genotiplendirilmesi yapılarak zaman alıcı ve pahalı bir yöntem olan DNA dizileme yöntemi yerine RFLP metodunun kullanılabileceği ve kısa zamanda sonuç vermesi açısından, rutin HBV genotiplendirme metodu olarak yararlanılabileceği sonucuna varılmıştır.

7. KAYNAKLAR

1. Akan E. (1994). Viral hepatitler. Genel ve özel viroloji. 3. Baskı. Saray Kitabevleri. İzmir. Sayfa: 502-49.
2. Anna SF, Lok and Brian J, Mahon MC. (2001), Chronic hepatitis B. Hepatology 34: 6-13
3. Arauz-Ruiz P, Norder H, Robertson BH, Magnius LO, (2002), Genotype H: a new Amerindian genotype of hepatitis B virus revealed in Central America. Journal of General Virology 83: 2059–2073.
4. Arauz-Ruiz P, Norder H, Visona KA, Magnius LO. (1997), Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of the small gene. The Journal of Infection Diseases 176:851-858.
5. Aye TT, Bartholomeusz AJ, Shaw T, et al. (1997). Hepatitis B virus polymerase mutations during antiviral therapy in patient following liver transplantation. Journal of Hepatology 26:1148-3153.
6. Badur S. (1994). Hepatit B virusu, moleküler viroloji ve serolojik tanı. 'Viral Hepatit' adlı kitaptan (Editör. Kılıçturgay K.), Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. Sayfa: 65-90.
7. Bagci S, Torre F, Stuyver L, et al. (1996). Importance of hepatitis B virus genotypes for the development of precore/core gene mutations and the outcome of interferon treatment. Hepatology 24: 1015-1019.
8. Balık İ. (1994). Hepatit B epidemiyolojisi: 'Viral Hepatit' adlı kitaptan (Editör. Kılıçturgay K.), Nobel Tıp Kitabevleri. İstanbul. Sayfa: 91-101.
9. Barilholomew MM, Jansen RW, Jeffers LJ, et al. (1997). Hepatitis B virus resistance to lamivudine given for recurrent infection after orthotopic liver transplantation. Lancet 349:20-22.
10. Bartholomeusz A, Schaefer S. (2004). Hepatitis B virus genotypes: comparison of genotyping methods. Journal of Medical Virology 14: 3-16.
11. Blackberg T, Kidd-Ljunggren K. (2000). Genotypic differences in hepatitis B virus core promoter and precore sequences during seroconversion from HBeAg to Anti-HBe. Journal of Medical Virology 60: 107-112.

12. Bilgiç A, Özacar T. (1999). Hepatit B ve D virusları, 'Temel ve Klinik Mikrobiyoloji' adlı kitaptan (Editör.Ustaçelebi Ş.), Güneş Kitabevleri, Ankara. Sayfa: 871-880.
13. Bozdayı AM, Bozkaya H, Türkyılmaz AR, et al. (2001). Nucleotide divergences in the core promoter and precore region of genotype D hepatitis B virus in patients with persistently elevated or normal ALT levels. *Journal of Clinical Virology* 21: 91-101.
14. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, et al. (1990). Vaccine induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 336: 325-329.
15. Chu CM, Yeh CT, Chiu CT, Sheen IS, Liaw YF. (1998). Precore mutants of hepatitis B virus prevails in acute and chronic infections in an area in which hepatitis B is endemic. *Journal of Clinical Virology* 34: 1015-1019.
16. Clarke B, Bloor S. (2002). Molecular genotyping of hepatitis B virus. *Journal of Clinical Virology* 25: 41-45.
17. De Nys K, Janssen HLA, Juras J, et al. (2003). Detection and prevalence of HBV mixed genotype infections in chronic HBV patients. *Journal of General Virology* 81: 1759-1773.
18. Feitelson MA, Duan L-X, Guo J, Blumberg BS. (1995). X region deletion mutants associated with surface antigen-positive hepatitis B virus infection. *World Journal of Gastroenterology* 108: 1810-1819.
19. Flodgren E, Bengtsson S, Knutsson M, et al. (2000). Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. *Journal of Clinical Microbiology* 38: 3311-3316.
20. Fukuda R, Ishimura N, Kushiyaama Y, et al. (1996). Hepatitis B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically "silent" non-b, non-c chronic hepatitis. *Journal of General Virology* 40: 481-488.
21. Gandhe SS, Chadha MS, Arankalle VA. (2003). Hepatitis B virus genotypes and serotypes in Western India: lack of clinical significance. *Journal of Medical Virology* 69: 324-330.
22. Gallimore A, Glithero A, Godkin A, et al. (1998). Induction and exhaustion of lymphocytic choriomeningitis virus-specific cytotoxic T lymphocytes visualized using soluble tetrameric major histocompatibility complex class I-peptide complexes. *Journal of Medical Virology* 187: 1383-1393.

23. Ganem D. (1996). *Hepadnaviridae* and their replication. 'Fields Virology' adlı kitapta (Eds. Fields BN, Knipe DM, Howley PM). Raven Press, New York. 2703-2737.
24. Geissler M, Tokushige K, Chante CC, Zurawski VR, Wands JR. (1997). Cellular and humoral immune response to hepatitis B virus structural proteins in mice after DNA-based immunisation. *World Journal of Gastroenterology* 112: 1307-1320.
25. Gerken G, Kremsdorf D, Capel. (1991). Hepatitis B defective virus with rearrangement in the pre S gene during chronic HBV-infection. *Virology* 183: 555-565.
26. Ghany MG, Ayola B, Villamil FG. (1998). Hepatitis B virus S mutants in liver transplant recipients who were reinfected despite hepatitis B immune globulin prophylaxis. *Hepatology* 27: 213-222.
27. Grete GB, Giusti G. (1990). Epidemiology of chronic viral hepatitis in the Mediterranean area. *Infection* 18: 29-33.
28. Hannoun C, Krogsgaard K, Horal P, Lindh M. (2002). Genotype mixtures of hepatitis B virus in patients treated with interferon. *The Journal of Infectious Diseases* 186:752-759.
29. Hawkins AE, Gilson R, Gilber N. (1996). Hepatitis B virus surface mutations associated with infection after liver transplantation. *Hepatology* 24: 8-14.
30. Hussain M, Sablon E, Lok Anna S F, Chu CJ. (2003). Rapid and sensitive assays for determination of hepatitis B virus (HBV) genotypes and detection of HBV precore and core promoter variants. *Journal of Medical Virology* 70:529-536.
31. Idrees M, Khan S, Riazuddin S. (2004). Common genotypes of hepatitis B. *Journal of Medical Virology* 14: No.6.
32. Jamieson BD, Ahmed R. (1998). T-cell tolerance: exposure to virus in utero does not cause a permanent deletion of specific T cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 85: 2265-2268.
33. Jardi R, Buti M, Rodriguez-Frias F, et al. (1999). Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *Journal of Virological Methods* 83: 181-187.

34. Kato H, Gish RG, Bzowej N, et al. Y. (2002). Eight genotypes (A–H) of hepatitis B virus infecting patients from San Francisco and their demographic, clinical, and virological characteristics. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1207–1209.
35. Kato H, Ruzibakiev R, Yuldasheva N, et al. (2002). Hepatitis B virus genotypes in Uzbekistan and validity of two different systems for genotyping. *Journal of Medical Virology* 67:477–483.
36. Kidd-Ljunggren K, Miyakawa Y, Kidd AH. (2002). Genetic variability in hepatitis B viruses. *Journal of General Virology* 4: 1-18.
37. Kristensen VN, Kelefiotis D, Kristensen T, Borresen-Dale AL. (2001), Genotyping techniques: high-throughput methods for detection of genetic variation. *BioTechniques* 30: 318-332.
38. Kukka C. (2004). Hepatitis B. *Journal of Medical Virology* 68:685–692.
39. Kūlah C, Yalınay Çırak M. (2002). Genotyping of Turkish hepatitis B virus isolates based on the sequencing of the S region. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, Kemer, Antalya-Turkey.
40. Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. (Apr. 2002). Genotypes and clinical phenotypes of hepatitis B virus in patients with chronic hepatitis B infection. *Journal of Clinical Microbiology* 40: 1207-1209.
41. Kıyan M, (2001). Hepatit B virüsü. ‘Viral Hepatit’ (Editör. Kılıçturgay K, Badur S.), Viral Hepatit Savaşım Demeği, İstanbul. Sayfa: 86-120.
42. Lau JYN, Wright TL. (1993). Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet* 342: 1335-1340.
43. Leblebicioglu H, Eroglu C; Members of the hepatitis study group. (2004). Acute hepatitis B virus infection in Turkey, epidemiology and genotype distribution. *Journal of Clinical Microbiology* 10:537-541.
44. Lee Yi, Hur CM, Şuh DJ, Kim SH. (1996). Novel pre C/C gene mutants of hepatitis B virus in chronic active hepatitis: naturally occurring escape mutants. *Journal of General Virology* 77: 1129-1138.
45. Lee WM. (1997). Hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 337:733-745.

46. Li JS, Tong SP, Wen YM, et al. (1993). Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe-minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *Journal of Virology* 67:5402-5410.
47. Lindh M, Horal P, Dhillon AF, Puruta Y, Norkrans G. (1996). Hepatitis B virus carriers without precore mutations in hepatitis Be antigen-negative stage show more severe liver damage. *Hepatology* 24:494-501.
48. Lindh M, Hannoun C, Dhillon AP, Norkrans G, Horal P. (1999). Core promoter mutations and genotypes in relation to viral replication and liver damage in east Asian hepatitis B virus carriers. *The Journal of Infectious Diseases* 179: 775-782.
49. Lindh M, Anderson AS, 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* 175: 1285-1293.
50. Lindh M, Gonzalez JE, Norkrans G, Horal P. (1998). Genotyping of hepatitis B virus by restriction pattern analysis of a pre-S amplicon. *Journal of Virological Methods* 72 163-174.
51. Liu CJ, Kao JH, Chen PJ, Lai MY, Chen DS. (2002). Molecular epidemiology of hepatitis B viral serotypes and genotypes in Taiwan. *Journal of Biomedical Science* 9:166-170.
52. Ling RD, Muirer D, Ahmed M, et al. (1996). Selection of mutations in the Hepatitis B virus polymerase during therapy of transplanted recipients with lamivudine. *Hepatology* 24:711-713.
53. Misirlioğlu M, Kayın E, Akman E, Tuncer S. (2002). Hepatitis B virus genotypes and viral load analysis in pre and post vaccination sera from carrier children. 2nd Molecular and Diagnostic Microbiology Congress. April 21-25, Kemer, Antalya-Turkey.
54. Mizokami M, Nakano T, Orito E, et al. (1999). Hepatitis B virus genotype assignment using restriction fragment length polymorphism patterns. *FEBS Letters* 450:66-71.
55. Moraes MTB, Niel C, Gomes SA. (1999). A polymerase chain reaction-based assay to identify genotype F of hepatitis B virus. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 32: 45-49.

56. Mahoney FJ. (1999). Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Journal of Clinical Microbiology* 12:351-366.
57. Melegari M, Scagioni PP, Wands JR. (1998). Hepatitis B virus mutants associated with 3TC and famciclovir administration are replication defective. *Hepatology* 27:628-633.
58. Moradpour D, Wands JR. (1995). Understanding hepatitis B virus infection. *Journal of Medical Virology* 332:1092-1093.
59. Moraes MT, Gomes SA, Niel C. (1996). Sequence analysis of pre S/S gene of hepatitis B virus strains of genotypes A, D, and F isolated in Brasil. *Virology* 141: 1767-1763.
60. Mbayed VA, Lo JL, Telentra PFS, et al. (1998). Distribution of hepatitis B virus genotypes in two different pediatric populations from Argentina. *Journal of Clinical Microbiology* 36:3362-3365.
61. Mayerat C, Mentagani A, Frei PC. (1999). Does hepatitis B virus genotype influence the clinical outcome of hepatitis B virus infection. *Hepatology* 6:299-304.
62. Naito 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. *Journal of Clinical Microbiology* 39: 362-364.
63. Nakano T, Ling L, Hu X, et al. (2000). Characterization of hepatitis B virus genotypes among Yucpa Indians Venezuela. *Journal of General Virology* 35: 1-10.
64. Norder H, Hammas B, Löfdahl S, Courouce AM, Magnus LO. (1992). Comparison of the amino acid sequences of nine different serotypes of hepatitis B surface antigen and genomic classification of the corresponding hepatitis B virus strains. *Journal of General Virology* 73: 1201-1208.
65. Norder H, Couroucé AM, Magnus LO. (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.
66. Okamoto H, Tsuda F, Sakugawa H, et al. (1988). Typing hepatitis B virus by homology in nucleotide sequence: comparison of surface antigen subtypes. *Journal of General Virology* 69: 2575-2583.

67. Osiowy C, Giles E. (2003). Evaluation of the INNO-LiPA HBV genotyping assay for determination of hepatitis B virus genotype. *Journal of Clinical Microbiology* 41:5473-5477.
68. Peng L, Ding JJ, Zhang LS. (2004). Establishing a new genotyping method of hepatitis B virus by polymerase chain reaction- restriction fragment length polymorphism (PCR-RFLP) to analysis on S region and its application. *Zhonghua Gan Zang Bing Za Zhi* 12:475-478.
69. Rodriguez Prias P, Buli M, Jardi R. (1995). Hepatitis B virus infection: precore mutanta and its relational viral genotypes and core mutations. *Hepatology* 22:1641-7.
70. Rodriguez-Novoa SR, Gomez-Tato A, Castroagudyn J, et al. (2004). Hepatitis B virus genotyping based on cluster analysis of the region involved in lamivudine resistance. *Journal of Virological Methods* 115: 9-17.
71. Sakurai M, Sugauchi F, Tsai N, et al. (2004). Genotype and phylogenetic characterization of hepatitis B virus among multi-ethnic cohort in Hawaii. *World Journal of Gastroenterology* 10:2218-2222.
72. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (2001). *Molecular cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Newyork.
73. Sanchez LV, Maldonado M, Bastidas-Ramirez BE, Norder H, Panduro A. (2002). Genotypes and S-gene variability of Mexican hepatitis B virus strains. *Journal of Medical Virology* 68:24-32.
74. Saady N, Sugauchi Y, Suzuki S, et al. (2003). Genotypes and phylogenetic characterization of hepatitis B and D viruses in Egypt. *Journal of Medical Virology* 70:529-536.
75. Senturker Guldaz N, Abacioglu YH. (2004). S-gene sequences and genotype-related restriction sites in hepatitis B virus carriers in Turkey. *The Journal of Infection Diseases* 32:344-349.
76. Sheng Li K, Yamashiro T, Sumie A, et al. (2001). Hepatitis B virus harboring nucleotide deletions in the core promoter region and genotype B correlate with low viral replication activity in anti-HBe positive carriers. *Journal of Clinical Virology* 23: 97-106.

77. Stuyver L, De Gendt S, Van Geyt C, et al. (2000). A new genotype of hepatitis B virus: complete genome and phylogenetic relatedness. *Journal of General Virology* 81: 67-74.
78. Taşyaran MA, (2001). HBV infeksiyonu epidemiyolojisi. 'Viral Hepatit' adlı kitaptan, (Editör, Kılıçturgay K, Badur S.), Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul. Sayfa:121-128.
79. Testul P, Renard CA, Terradillos O, (1996). A new hepadnavirus endemic in arctic ground squirrels in Alaska. *Journal of Virology* 70: 4210-4219.
80. Thomas HC, (1995). The emergence of envelope and precore/core variants of Hepatitis B virus: the potential role of antibody selection. *Hepatology* 22:1-8.
81. Uchida T, Sailoh T, Shinzawa H, (1997). Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implications. *Patology* 47: 183-193.
82. White DO, Fenner FJ, (1999). *Medikal Viroloji*, (Editör, Doymaz MZ.), Nobel Tıp Kitabevleri, Ankara. Sayfa: 3-373.
83. Zeng GB, Wen SJ, Wang ZH, et al. (2004). A novel hepatitis B virus genotyping system by using restriction fragment length polymorphism patterns of S gene amplicons. *World Journal of Gastroenterology* 10:132-137.

8. ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Aziz AKSOY

Doğum Yeri: Elazığ

Doğum Tarihi: 11.09.1971

İlk ve Ortaöğretim Süreci: Kavallı Köyü İlköğretim Okulu, Atatürk Ortaokulu,
Elazığ Lisesi.

Üniversiteye Giriş Tarihi: 1997

Üniversiteden Mezuniyet Tarihi: 2001

Bitirdiği Fakülte: Fırat Üniv. Fen-Edb. Fak. Biyoloji Bölümü

Yüksek Lisansa Başlama Tarihi : 2002, Eylül

Yüksek Lisans Programı: Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Mikrobiyoloji