

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

HEPATİT B VİRÜSÜNÜN
HBsAg GENİNİN POLİMERAZ ZİNCİR REAKSİYONU
YÖNTEMİYLE GÖSTERİLMESİ

118445

YÜKSEK LİSANS TEZİ

118 445

Neslihan KELEŞTEMUR

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ
ELAZIG_2002

ONAY SAYFASI

Prof. Dr. Halis ÖCAL

Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

Bu tez Yüksek Lisans/Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.

Zahide Aşçı Taraman
Anabilim Dalı Başkanı

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans/Doktora Tezi olarak kabul edilmiştir.

Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu
Danışman

Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu

Yüksek Lisans/Doktora Sınavı/Jüri Üyeleri

Doç. Dr. Zahide Aşçı Taraman

Doç. Dr. Abhan Sevinç

Doç. Dr. Ahmet Kalkan

Yrd. Doç. Dr. Ahmet Kızılgil

Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu

Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu
Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu
Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu
Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu
Yrd. Doç. Dr. Aykut Özkavutlu

İÇİNDEKİLER

Sayfa

1.ÖZET	1
2.ABSTRACT	2
3.GİRİŞ	3
3.1.HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENEL ÖZELLİKLERİ ve GENOM YAPISI ...	3
3.2.HEPATİT B VİRÜSÜ GENOMU TARAFINDAN KODLANAN	
PROTEİNLER	9
3.2.1. Kor Proteinleri	9
3.2.2 Polimeraz (P) Proteinini	12
3.2.3. X Proteinini	14
3.2.4. Kılıf (yüzey) Proteinini	16
4. GEREÇ ve YÖNTEM	24
4.1. pcDNA3.1/V5 His-TOPO Plazmidini	24
4.2. Serumdan HBV DNA'sının Tespit Edilmesi ve İzolasyonu	24
4.3. HBsAg Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması	26
4.4. HBsAg Geninin Agaroza Jelden Saflaştırılması	27
4.5. DNA Miktarının Ölçülmesi	27
4.6. Kompetan E. Coli Hücrelerinin Hazırlanması	28
4.7. HBsAg Geninin pcDNA3.1/V5 His-TOPO Vektörüne Yerleştirilmesi ve	
Kompetan E. Coli'ye Transformasyonu	29
4.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tarama Deneyi (PZR-T)	29
4.9. Plazmid DNA'sının İzolasyonu	30
4.10. Restriksiyon Enzim Kesim Deneyleri	31
5. BULGULAR	33
5.1. HBsAg'nin pcDNA3.1/V5 His-TOPO'da Klonlanması	33
6. TARTIŞMA ve SONUÇ	36
7. KAYNAKLAR	39
8. ÖZGEÇMİŞ	43

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.** Hepatit B virüsünün genom yapısı 6
- Şekil 2.** Hepatit B virüsünün S geninin genom Organizasyonu 16
- Şekil 3.** Hepatit B virüsü ile infekte bireylerin kan serumlarından izole edilen DNA'nın HBsAg gen bölgesine özgül primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılan HBsAg gen parçasının %1.5 agaroz jelde görüntülenmesi 33
- Şekil 4.** HbsAg gen bölgesine özgül primerler kullanılarak yapılan PZR-T deneyi sonucunda çoğaltılan ürünün %1.5 agaroz jelde gösterilmesi 34
- Şekil 5.** Rekombinant plazmidin varlığının ve hedef gen bölgesinin doğru şekilde (oryantasyonda) yerleştiğinin, XbaI restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim deneyi sonucunda %2 agaroz jelde görüntülenmesi 35

KISALTMALAR LİSTESİ

Bç	:Baz çifti
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dH₂O	: Distile su
E. coli	: Escherichia coli
HBV	: Hepatit B virüsü
HbcAg	: Hepatit B virüsü kor antijeni
HbeAg	: Hepatit B virüsü e antijeni
HbsAg	: Hepatit B virüsü yüzey antijeni
LB	: Lurie-Bertani besiyeri
LHBs	: Yüzeyin büyük proteini
MHBs	: Yüzeyin orta proteini
M	: Molarite
µl	: Mikrolitre
OD	: Optik dansite
ORF	: Açık okuma bölgesi
PCR	: Polimeraz zincir reaksiyonu
Poly-HSA	: Polimerize edilmiş insan serum albumini
SHBs	: Yüzeyin küçük proteini
SV-40	: Simianvirüs 40

1. ÖZET

Bu çalışmada, Hepatit B virüsünün (HBV) yüzey antijeni geni (HBsAg), polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) yöntemiyle çoğaltıldı ve bir ekspresyon vektörü içine klonlandı.

Öncelikle kronik HBV'li bir hastanın serumundan HBV DNA'sı elde edildi. Daha sonra, HBsAg geni pcDNA3.1/V5 His-TOPO vektörü içine yerleştirildi. Elde edilen rekombinant plazmit E.coli hücrelerinin transformasyonunda kullanıldı.

Vektör içindeki HBsAg geninin varlığı polimeraz zincir reaksiyonu tarama deneyi (PZR-T) ile tespit edildi. Ayrıca, aynı amaç için restriksiyon enzim kesim deneyi yapıldı. Böylece HBV'nin HBsAg geni bir ekspresyon vektörü içine yerleştirildi.

Rekombinant vektör, ilerde DNA immünizasyonu ve ELISA yapımı gibi farklı çalışmalar için kullanılabilecektir.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B virüsü, polimeraz zincir reaksiyonu, klonlama.

2. ABSTRACT

In the present study, Hepatitis B (HBV) surface antigen (HBsAg) was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and cloned into an expression vector.

Firstly, HBV DNA was extracted from serum a patient with chronic HBV. Then, HBsAg gene was placed into pcDNA3.1/V5 His_TOPO vector. The resulting recombinant plasmid was used for transformation of E. Coli cells.

The presence of HBsAg gene in the vector was confirmed by PCR-Screening assay. Furthermore, Restriction enzyme cutting assay was performed fot the same purpose. So HBsAg gene of HBV was cloned into an expression vector.

The recombinant vector will be used for further studies such as DNA immunization and ELISA development in the future.

Key words: Hepatitis B virus, polymerase chain reaction, cloning.

3.GİRİŞ

Hepatit B virüsü (HBV) karaciğerde akut ve kronik hepatite sebep olan önemli bir viral patojendir (37). Kronik hepatit B virüs infeksiyonunun hepatosellüler karsinomanın (HCC) oluşumunda en önemli etkenlerden biri olduğu bilinmekle beraber HCC'nin etyolojisinde HBV'nin rolü henüz tam olarak bilinmemektedir (27,40). Dünyada yaklaşık 400-500 milyon kişinin kronik taşıyıcı olduğu ve her yıl 1 milyondan fazla insanın HBV ile ilişkili HCC'dan dolayı hayatını kaybettiği kabul edilmektedir (3,21,24,37).

Hepatit B virüsüne karşı koruyucu aşılama öncelikli hedef protein virüsün yüzey antijenidir (HBsAg).

HBsAg, HBV ile karşılaşan kişilerde ilk saptanan viral antijendir. İnfeksiyondan yaklaşık bir ay sonra ortaya çıkar ve birkaç hafta içinde en yüksek düzeye ulaşır. Akut HBV infeksiyonunda hastalık belirtilerinin kaybolmaya başlamasıyla beraber 2-3 ay içinde kaybolur. HBsAg'nin infeksiyondan sonra hasta serumunda 6 aydan daha uzun süre bulunması kronikleşme kriteri olarak değerlendirilmektedir. Kronik infeksiyonda HBsAg kaybolmaz ve genellikle yıllarca yüksek titrede bulunmaya devam etmektedir. Bu özellikleriyle HBsAg akut ve kronik hepatit B infeksiyonunun gerek tanısı gerekse hastalık seyrinin takibi için güvenilir bir viral antijen olarak değerlendirilmektedir (6,16,41,39).

3.1. HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENEL ÖZELLİKLERİ VE GENOM YAPISI

Hepatit B virüsü, Hepadnaviridae ailesinin Orthohepadnavirüs cinsine dahil bir virüstür. Ailenin diğer üyeleri, Woodchuck (dağ sıçanı) Hepatit virüsü (WHV), Ground Squarrel (yer sincabı) Hepatit virüsü (GSHV), Pekin

ördeklerinden izole edilen Duck (ördek) Hepatit virüsü (DHBV) ve Heron (balıkçıl) Hepatit virüsü (HHBV)'dür. Hepatit B virüsünün tek doğal konakçısı ise insandır (39).

1963 yılında, Blumberg, Avusturalya Aboriginlerinin ve pek çok defa kan transfüzyonu yaptırmış Amerikan hemofiliaklarının serumunda bir antijenin varlığını tespit etmiştir. 22nm çapındaki bu partiküller önce 'Avusturalya Antijeni' daha sonra ise hepatit B yüzey antijeni teriminin kısaltılmış şekli 'HBsAg' olarak isimlendirilmiştir (20,28,39).

Viremisi olan HBV taşıyıcı kanında virüs ile ilişkili, büyüklük, yapı ve konsantrasyon açısından farklılık gösteren üç farklı tip partikül belirlenmiştir (39).

1. Tam (Complete) partikül; (viryon, Dane partikülü);

HBV'nin bulaşımında primer neden olan Dane partikülleri, küresel şekilde olup 42-47 nm çapındadır. Tam bir virion yapısında ve infektiftir. Olgun virüs (Dane partikülü) nükleokapsid ve yüzey antijeninden oluşan 7 nm kalınlığındaki bir örtüden oluşmuştur. Non iyonik deterjanlarla örtü kaldırıldığında 25-27 nm büyüklüğünde iç çekirdek (core, nükleokapsid) açığa çıkar. Nükleokapsidin temel yapı proteini 22 kilodalton ağırlıktaki C proteini (HBcAg) dir. Bu bölge anti-HBs antikorları ile reaksiyon vermez. Farklı antijenik özelliğe sahip yapısı nedeni ile kendi spesifik antikorları ile reaksiyon vermektedir. Bu proteinin özellikle virüs replikasyonu ve yapılanması sırasında virüs genomunun korunması " Packaging " ında önemli rol aldığı bilinmektedir. Bu antijenik yapıların dışında kor kısmında virüs DNA'sı, DNA polimeraz enzimi ve 3' ucunda DNA'ya kovalent olarak

bağlı polipeptidi içerir. Ayrıca protein kinaz aktivitesi bulunmakla birlikte bu enzimin konak orijinli olduğu sanılmaktadır.

2. Eksik (İ incomplete) partikül;

İki farklı şekilde bulunmaktadır.

a- Küresel partiküller; Yaklaşık olarak 22nm (16-25) nm çapındaki, infeksiyöz özelliği bulunmayan ve nükleik asit içermeyen yapılardır.

b-Tübüler (filamentöz) partiküller; Aktif HBV replikasyonunun olduğu kişilerin serumlarında daha çok bulunan, 22 nm çapında, 50-500 nm uzunluğunda, nükleik asit içermeyen ve infeksiyöz özelliği bulunmayan yapılardır .

Her üç partikülde de HBsAg antijenik determinant (epitop) bulunmaktadır. İnfekte kişinin kanında miligram düzeyinde HBsAg bulunabilmektedir. Bunun büyük kısmı tam olmayan partiküller şeklindedir. Viremik bir taşıyıcı kanında 10^{13} /ml küresel partikül, 10^{16} /ml filamentöz partikül ve 10^8 /ml viryon bulunabilmektedir (17,31,39).

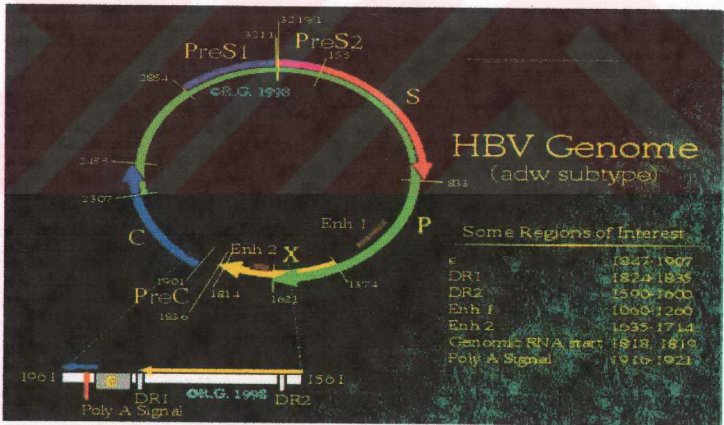
Hepatit B virüsü, sitopatojenik etkisi olmayan, hepatotropik, zarflı, 3200 nükleotid uzunluğunda negatif anlamlı sarmalla, 1700-2800 nükleotid uzunluğunda pozitif anlamlı sarmaldan oluşan, kısmen çift sarmallı sirküler bir DNA'ya sahip ve bilinen tüm hayvan virüsleri içinde en küçük olanıdır (17,22,24).

Negatif zincirin 5' ucunda, sentez sırasında " primer " olarak görev yapan terminal bir protein bulunurken, pozitif zincirin 5' ucunda aynı işlevi yapan bir RNA oligomeri yer alır. Negatif sarmalın 3' ucu ise 9-10 nukleotidlik artık uç (terminal redundancy) ile sınırlanır. Bu alan viral replikasyon sırasında pozitif

DNA sarmalının sentezindeki bir kalıp DNA'dan diğerine atlama işleminde DNA polimerazın da etkisi ile kısa zincirin tamamlanmasında ve sonuçta süper kıvrımlı, tamamen çift sarmallı, çember şeklindeki DNA molekülünün oluşumunda rol oynar (17).

Hepatit B virüsü genomunda genetik bilginin tamamı uzun sarmal üzerinde kodlanmış olup bu sarmalın üzerinde 7 tane protein kodlayan, 4 tane açık okuma bölgesi (open reading frames, ORF) belirlenmiştir.

Bu ORF'ler virüsün kor (core;C), zarf (surface;S), polimeraz(P) ve X proteinlerini kodlayan nükleik asit dizilerine sahiptir.(17,20) Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda HBV genomu üzerinde belirlenen 4 ORF'ye ilave olarak ORF5 ve ORF6 olarak isimlendirilen başka ORF'lerde belirlenmiştir.



Şekil 1. Hepatit B virüsünün genom yapısı

Bunlardan ORF5 diğerleri gibi negatif sarmalın üzerinde bulunurken, ORF6 pozitif sarmalın üzerinde yer alır (23). Bu açık okuma bölgelerinden, ORF 5, 70-100 kodon büyüklüğünde olup, X gen ORF'si ve P-ORF ile örtülmüştür ve AUG başlama kodonuna sahip olmayıp bu genin nasıl açıklandığı bilinmemektedir. Standart AUG başlangıcı sinyalinin haricinde bir başlangıç kodonunun bu proteinin açıklanmasında sorumlu olabileceği düşünülmektedir. Gerçekten, adeno-associated virus genomunda bulunan ACG'nin protein sentezi için başlangıç kodonu görevi gördüğünün açıklanması ve ORF 5'in 5' ucu yakınında ACG kodonuna rastlanmasıyla yukarıdaki ihtimal güç kazanmıştır. Diğer bir ihtimal X ve P geninin transkripsiyonu esnasında bir çatı değişiminin olduğudur.

Yeni keşfedilmiş olan ORF 6, virüsün pozitif DNA ipliği üzerinde bulunur. Bu nedenle, anti-sense mRNA moleküllerinden sentezlenmektedir. Bununla birlikte, ORF 6 yaklaşık olarak 210 aminoasit uzunluğunda ve komplementer DNA ipliğinin polimeraz, X, Pre-core ve ORF 5 gen sekanslarıyla örtülmüştür. Ayrıca, transkripsiyon başlangıç kodonu AUG bulunmakla birlikte ORF 6 geninin virüs gen ekspresyonunda önemli bir rolü olduğu ve yalnızca virüs replikasyonunun spesifik bölümlerinde açıklandığına ilişkin bulgular bulunmaktadır (23).

Hepatit B virus genomunda replikasyonda görev alan 3 tane önemli replikasyonu düzenleyici (cis-acting) element bulunmaktadır. Bunlardan ilk ikisi direkt tekrar (DR) elementleri olup, DR1 ve DR2 olarak isimlendirilmektedirler. Direkt tekrar element 1, pre-kor ORF içerisinde bulunmakta ve negatif sarmalın sentezi için başlangıç bölgesini meydana getirmektedir. Cis-elementlerden DR2, pre-core ORF'de bulunmakta ve pozitif sarmalın sentezinin başlangıç bölgesini

oluşturmaktadır. Yaklaşık 10-12 nükleotidden oluşan bu bölgeler viral DNA'ların 5' uçlarını bir arada tutarak viral genomun yapısal bütünlüğünü sağlamaktadırlar. Son cis-acting element retrovirüslerinin 5' – unique bölgesine benzerliğinden dolayı “ U5-like ” olarak isimlendirilmekte ve fonksiyonel olarak DR1 ile benzerlik göstermektedir (33).

Hepatit B virus genomunda bulunan nükleotidlerden bir kısmı ise sinyal elementleri olarak fonksiyon göstermektedir. Bunlardan ilki 4 adet promotor (pre-S1; S, X ve pre-C promotor) sinyali içermektedir. Hepatit B virüsünün genomik diziliminin analizi neticesinde, bu promotorların TATA ve CAAT kutuları olarak bilinen klasik promotorlarla benzerlik göstermedikleri belirlenmiştir. İkinci önemli sinyal elementi ise, güçlendirici olarak ifade edilen enhancer (Enh1 ve 2)'lerdir. Bu elementler, promotorlarla birlikte ORF'lerin transkripsiyonlarını düzenlemektedirler. Ayrıca son yıllarda yapılan çalışmalarda enhancer1 elementi ile interferon-stimulated regulatory elementi (ISRE)'nin gen dizilimindeki kısmi benzerlik nedeniyle enhancer1'in aktivitesinin interferon (IFN) indüklenmesinde baskılayıcı bir rolü olabileceği tespit edilmiştir. Viral genom yapısında yukarıdaki elementlere ilave olarak, S geni içerisinde bulunan ve Enh1'le bağlantılı olarak glikokortikoid hormonu varlığında gen açıklanmasını 4-5 kat arttıran farklı bir sinyal elementi (Glikokortikoid cevap elementi, GRE) bulunmaktadır. Başka bir sinyal elementi ise pol-A ekleme sinyalidir. Bu sinyal dizilimi 44 nükleotidden oluşmakta ve C-ORF içinde yer almaktadır. Hepatit B virüs transkriptlerinin tamamı yalnızca tek tip pol-A ekleme sinyali kullanmaktadır ve bu nedenle tüm transkriptlerin 3' ucu benzer dizilime sahiptir (6,9,26).

3.2 HEPATİT B VİRÜSÜ GENOMU TARAFINDAN KODLANAN PROTEİNLER

3.2.1. Kor Proteinleri

Yaklaşık olarak 640 nükleotit uzunluğunda olan HBV'nin C geni üzerinde bir ORF bulunmasına rağmen, gen üzerinde okuma işleminin başladığı iki farklı kodon (nükleotit 1816 ve 1903) yer alır. Bu nedenle pre-C ve C olmak üzere iki bölgeye ayrılan C geni, antijenik özellikleri farklı iki değişik protein sentezleme kabiliyetine sahiptir (6,17). Genin pre-C bölgesinde bulunan ilk AUG kodonundan başlayarak virüsün HBeAg proteini sentezlenmektedir. Protein yaklaşık 17×10^3 mol.A.'na sahip, suda eriyebilen ve prekürsör bir proteindir(2,6).

Pre-C'nin 1816 ve 1903. nükleotidleri arasında yer alan genom bölgesi 29 aminoasitlik bir peptidin üretiminden sorumludur. Açıklanan bu sinyal peptitleri sayesinde protein konak hücre endoplazmik retikulumuna gitmektedir. Endoplazmik retikuluma peptidaz tarafından kesime uğramakta ve bunun sonucunda protein sinyal peptitleri 19 aminoasitini kaybetmektedir (6,17). Sinyal bölgesinden geriye kalan 10 aminoasit ise kor partiküllerine dahil olmasını engellemekte ve salgısal protein olmasını sağlamaktadır. İşlenmiş olan protein (15-18 kDa) golgi cisimciği üzerinde HBeAg olarak sekrete edilir. Viryonun yapısına katılmayan bu proteinin fonksiyonu henüz tam olarak bilinmemektedir. Ancak in vitro araştırmalar sonucunda; HBeAg'nin viral replikasyon için gerekli olmadığı ispatlanmıştır. Bununla birlikte, bu proteinin konakçıdaki immün yanıtın düzenlenmesinde rolü olduğu bilinmektedir.

HBeAg ile HBcAg ortak determinantlar içerir. Kanda dolaşan HBeAg spesifik olarak serum albumini, immünglobulin ve antitripsine bağlanma özelliğine sahiptir. Bundan dolayı yapısındaki HBcAg ile ilgili determinantlar maskelenir ve özgül olarak anti-HBe'ye bağlanabilirken, anti-HBc ile reaksiyona girmez (6,15,17,19,34).

Yüksek düzeyde viremik HBsAg taşıyıcılarının serumları üzerinde yapılan çalışmalarda bu serumların bol miktarda HBeAg içerdiği tespit edilmiştir. Bundan dolayı HBeAg'nin aktif HBV replikasyonunun belirlenmesinde uygun bir marker olabileceği düşünülmüş ve uzun yıllar vireminin tespit edilmesi amacıyla önemli bir parametre olarak kullanılmıştır. Ancak HBV mutantlarının belirlenmesiyle birlikte gerek HBeAg ve gerekse anti-HBe'nin vireminin saptanmasında çok güvenilir parametreler olmadığı anlaşılmıştır (17,37).

HBV C geni tarafından sentezlenen diğer bir proteinde aynı transkriptin ikinci AUG kodonundan açıklatılmaya başlanan yaklaşık olarak 183 aminoasit uzunluğunda ve 22 kDa büyüklükte HBcAg proteinidir. Virüs genomunun 1903-2452. nükleotitleri arasındaki dizilim tarafından sentez edilen bu proteinin ön kısmında 29 aminoasitlik sinyal peptidi bulunmadığından bu protein endoplazmik retikuluma gidemez ve konak hücre sitoplazmasında kalır. Bu proteinin karboksi terminal ucunda argininden zengin ve bu nedenle oldukça bazik özelliğe sahip olan 34 aminoasitlik bir bölüm vardır. Bu dizilim sayesinde, viral DNA ile HBcAg arasında güçlü bir bağlantı oluşmaktadır (6,17,34).

HBeAg ekstrasellüler ortama (serum) sekrete edildiği halde, HBcAg kanda serbest halde belirlenemez ve yalnızca dane partiküllerinin içinde içsel bir yapı

unsuru olarak bulunur (2,17). HBcAg'nin kor partikül yapısını oluşturmaması, kendine ait bir birleşme kapasitesinden kaynaklanmaktadır (6).

Doğal infeksiyonun seyri sırasında, timusa bağımsız antijen özelliği gösteren HBcAg'ye karşı yüksek titrelerde antikor cevabı gelişmesi bu antijenin çok kısa bir sürede olsa serumda serbest halde bulunduğunu düşündürmüştü, Chermella ve Ark bu durumu göstermişlerdir. Ancak HBcAg ile anti-HBc süratle birleşip, kompleks oluşturduğundan serolojik tanıda HBcAg'nin saptanmaya çalışılması uygun değildir (17).

HBV ile infekte hepatositlerden saflaştırılan HBcAg partikülleri ile virion korlarında proteinkinaz ve proteaz aktivitesi olduğu gösterilmiştir. Bu özellik kor polipeptidleri içinde sadece p23'e aittir. Yapılan çalışmalar proteinkinaz'ın seçici bir şekilde polipeptidin serin ve treonin aminoasitlerini fosforilize ettiğini ve HBeAg oluşumunda rol oynadığını göstermektedir. Ancak bu aktivitenin hücresel yada viral kaynaklı olup olmadığı tam olarak bilinmemektedir (17,34).

Hepatit B virüsü kor proteininin en belirgin özelliklerinden birisi immünojenik bir protein olmasıdır. HBcAg'nin immünojenitesi HBsAg'den daha fazla olup gerek hücresel T immün yanıtı gerekse humoral immün yanıtı şekillendirebilen iyi bir immünojenik proteindir. HBV ile infekte hastaların tamamına yakınında HBeAg ve HBcAg'ne karşı hücresel ve humoral cevap gelişir. Bu konu ile ilgili yapılan çalışmalarda her iki antijenin de T ve B hücrelerini tanıyan epitoplara sahip olduğunu göstermektedir. HBcAg'ye özgül T hücreleri HBsAg humoral cevabını başlatabilir yada bu yanıtı fonksiyonel yardım sağlayabilir. Böylece genetik kaynaklı S epitop cevapsızlığının üstesinden gelmesine yardım eder. Bu anlamda, S antijen aşılara HBcAg eklenmesinin

insanlardaki etkinliği artırabileceği ve S antijenine karşı immun cevap yetersizliğinin söz konusu olduğu bireylerde antikor yanıtı geliştirebileceği düşünölmektedir. Ancak anti-HBs'nin tersine HBcAg'ne 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-HbcIgM akut dönemde; HBsAg'nin kaybolup anti-HBs'nin henüz belirlenmediği dönemde pozitifleşir. Fakat bu antikoru tek başına akut enfeksiyon göstergesi olarak algılanması yanlıştır. Çünkü HBsAg taşıyıcıları ile çoğu kronik hepatitli hastalarda düşük titrelerde de olsa bu antikora rastlanır. Dolayısıyla anti-HBcIgM'nin pozitifliğinden çok, negatif bulunması daha anlamlı olarak değerlendirilmektedir(6,17).

3.2.2 Polimeraz (P) Proteini

P geni, HBV genomunun yaklaşık ¼'ünü oluşturan en uzun gendir. Nökleotid 2309 ile 1623 arasında yer alır. Yaklaşık 832 aminoasitten oluşmuş 92 kDa moleköl ağırlığında bir protein sentezler (17). Ayrıca bu proteinin retrovirüslerin polimeraz protein geniyle benzerlik göstermesi, reverz transkriptaz aktivitesine sahip bir polipeptid kodlayabileceğini düşöndürmüş ve P geni sekansından elde edilen sentetik peptidlere karşın oluşturulan antikorların, deterjanla muamele edilmiş HBV viryonlarındaki revers transkriptaz etkinliğini immünopresipite ettiği vurgulanmıştır. Bu protein revers transkriptaz, endonökleaz (Rnase H) ve hem DNA hemde RNA'ya bağımlı polimeraz

aktivitesine sahiptir. Genetik analizler sonucunda aminoterminal uçtan karboksiterminal uca doğru düzenlenmiş değişik fonksiyonel bölgeler tanımlanmıştır (6,17,34,37).

a-Terminal protein; Negatif DNA sarmalının sentezlenmesinde RNA pregenomunun revers transkripsiyonu için primer olarak hizmet verir.

b-Spacer bölge; Bu bölgenin enzim aktivitesi üzerine direkt etkisi yoktur, çıkarılması durumunda aktivite kaybı olmaz.

c-DNA polimeraz / revers transkriptaz aktivitesi; DNA polimeraz aracılığı ile önce eksik sarmal tamamlanır ve çift sarmallı bu DNA'dan tek sarmallı RNA sentezlenir. Daha sonra RNA'dan ters transkriptaz aktivitesiyle tek sarmallı DNA ve bundan da komplementer eksik sarmal sentezlenir.

d-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 (17).

Hepatit B virüsünün tersine transkripsiyon mekanizmasında kullanılan revers transkriptaz enziminin katalitik bölgesinde polimerizasyon için gerekli olan iyi korunmuş tirozin-metionin-aspartat-aspartat (YMDD) yapısı bulunmaktadır. Lamivudin tedavisi gören HBV ile infekte hastaların %30-40'da tedaviden birkaç hafta sonra, HBV DNA miktarının yeniden artmaya başladığı belirlenmiştir. Bu hastalarda yapılan çalışmalarda YMDD yapısının değiştiği ve metionin aminoasitinin valin yada izolösin aminoasitlerinin birine değiştiği görülmüştür. Fansiklovir verilen hastalarda ise YMDD mutasyonundan ziyade revers

transkriptaz geninin 508 ve 515. nükleotitlerinde mutasyon görülmüştür. Ayrıca immün sistemi baskılanmış hasta serumlarında yüksek titrede bu mutasyona sahip virüsler belirlenmiştir (6,32).

P proteininin immünojen özelliği vardır. Hasta serumunda bulunan anti-DNA polimeraz antikorları, sentetik peptid antijenleri ile gösterilebilmektedir (17).

3.2.3. X Proteini

X proteini 154 aminoasitten oluşmakta ve viral genomun 1376 ile 1838. nükleotitleri arasında yer alan ve en küçük gen bölgesi olan X geni tarafından kodlanmaktadır.

Kanatlı hayvan hepadnavirüslerinde bulunmadığı halde tüm memeli hepatit B virüslerinde bulunur. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen deneylerle bu proteinin HBV'nin enhancer elementlerinin transaktivasyonunu sağladığı belirlenmiştir. Viral siklus ve HBV patobiyolojisinde bu proteinin fonksiyonu (veya fonksiyonları) henüz tam olarak aydınlatılamamıştır.

X proteini, kB sekansı (hücrel transkripsiyon faktör NFkB için bağlayıcı DNA bölgesi) tarafından regüle edilen transkripsiyonu aktive eder. Bu DNA bölgesi bazı virüsler (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü tip 1; HIV-1 ve Simianvirüs 40; SV-40) ile hücrel faktörleri (β -interferon geni) regüle eden ortak bir enhancer sekansıdır. Buna bağlı olarak da X proteini; β -interferon enhancer elementlerince kontrol edilen transkripsiyonu ve HIV tip 1 ile SV40 virüsünü aktive eder. Fakat bu aktivasyonun Nfkb benzeri hücrel bir faktör aracılığı ile

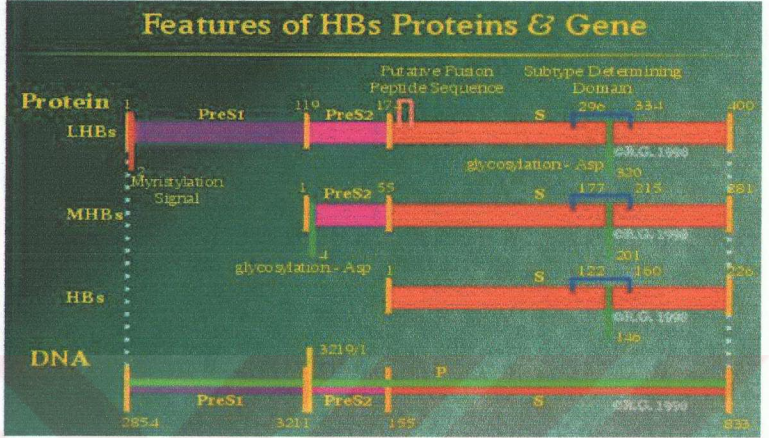
mi yoksa direkt etki ile mi olduğu henüz belli değildir. Ayrıca X proteini tümör süpressör gen ürününün (p53) işlevini bozar ve bu nedenle X proteininin hepatosellüler karsinoma gelişiminde etkin olduğu düşünülmektedir (6,17,34).

Virüsün kor promotörü, enhancer II, DR1 ve DR2 elementleri X gen bölgesi içinde yer aldığından ve X proteini HBV genlerini trans-aktive ettiğinden dolayı bu bölgede meydana gelen mutasyonlar önemli görölmektedir (23).

Bu gene ait ORF'de ortaya çıkan herhangi bir nokta mutasyonu veya gen silinmesi viral gen açıklanmasına ve çoğalmasına neden olan yeni bir genotip ortaya çıkarmaktadır. Sonuç olarak, bu mutasyona sahip hastalarda gerçekleştirilen HBV serolojik testlerinin bir kısmı veya tümü negatif sonuç verebilmektedir (6).

Viral DNA'ya bağlanmayan HBxAg'nin HBV ile infekte hastaların karaciğerlerinde açıklandığına dair çalışmalar vardır. X sekansına karşı oluşan antikorlar, HCC ve HBV ile infekte karaciğer dokularındaki X proteininin saptanmasında kullanılmış ve HBxAg yüzey ve kor antijenlerinden çok daha az olarak tespit edilmiştir. X sekansına ait sentetik peptidler, hasta serumlarında anti-HBx antikorlarının saptanmasında kullanılmış ve bu markerin HCC'un erken tanısında yararlı olabileceği bildirilmiştir (17).

3.2.4. Kılıf (yüzey) Proteinleri



Şekil 2. Hepatit B virüsünün S geninin genom organizasyonu

Hepatit B virusunun, S bölgesi, S geni ile preS bölgelerinden oluşmakta ve üç ayrı viral zarf proteinini kodlamaktadır. Bunlar L (large), M (middle) ve S (small) proteinleridir. Bu proteinler hem Dane partiküllerinin yüzeyinde hem de infekte hastaların karaciğer ve serumlarında saptanan 22 nm. çapındaki küresel ve tübüler (eksik viral) partiküllerin yapısında bulunmaktadır. Önceleri S geninin tek bir protein kodladığı düşünülmüştür. Fakat, jel elektroforez tekniği ile bu genin, 3 temel proteinin glikolize formları ile birlikte, ağırlıkları birbirinden farklı 6 adet polipeptidi sentezlediği gösterilmiştir. Temelde tek bir gen tarafından kodlanan bu proteinlerdeki farklılıklar sentezin aynı gen üzerindeki farklı başlangıç kodonlarından başlaması nedeniyle olmaktadır (6,17,39). Bu proteinler aynı karboksil ucunu paylaşımlarına karşın amino uçları farklıdır. L proteini pre-

S1, pre-S2 ve S; M proteini pre-S2 ve S; S proteini ise sadece S geni tarafından kodlanır. Bu proteinler golgi organinde glikolize olur ve enfeksiyöz viryon endoplazmik retikulumdan tomurcuklanırken viryonun zarfını oluştururlar. Ayrıca M ve S proteinleri endoplazmik retikuluma 22 nm'lik küresel partiküller olarak tomurcuklanırlar. Filamentöz partiküller ile viryonların protein kompozisyonları birbirleriyle aynıdır. Ancak küresel partiküllerde aynı oranda S ve M proteini bulunmakla birlikte, L proteini 20 kat daha azdır (35,39,43).

Translasyon işlemi gen üzerindeki ilk kodondan başlarsa pre-S1 + pre-S2 + S bölgelerinin tümü okunacağından kılıfın büyük proteini (L proteini: LHBs) sentezlenir. Bu proteinin glikolize edilmemiş formu 39 kDa molekül ağırlığında iken glikolize edilmiş formu 42 kDa ağırlığındadır ve sırasıyla p39^s, gp42^s şeklinde gösterilir. Uzunluğu ise HBsAg subtipine göre değişkenlik gösterir. Örneğin subtip “ad” 389 aminoasit, subtip “ay” ise 400 aminoasit'den meydana gelmektedir (17,39).

LHBs en fazla Dane partiküllerinin yüzeyinde bulunur. Tübüler partiküllerin kılıfında da orta miktarda L proteinine rastlanır ama küçük küresel partiküllerdeki miktarı çok azdır (17).

L proteini, viriyonun hepatosite tutunmasında, kor partiküllerinin kılıflanarak Dane partikülü oluşumunda ve konakçı hücresinden salınmasında rol almaktadır (39).

Henüz tam olarak tanımlanmamış bir reseptör olmasına rağmen 21. ve 47. aminoasitleri arasındaki bölgenin hepatositlere tutunma özelliğine sahip olduğu saptanmış ve bu bölgeye karşı oluşan antikorların bağlanmayı engellediği

gösterilmiştir. Dane partikülerinin oluşması, bir araya gelmesi ve konak hücreden salınması için M proteininin varlığı şart olmamakla birlikte S ve L proteinlerinin mutlaka sentezlenmiş olması gerekmektedir.

Semptomatik olmayan HBsAg taşıyıcılarında düşük düzeyde ama devamlı üretilen LHBs proteininin hepatositlerde lezyon oluşumuna ve hepatosellüler karsinomaya neden olabileceği düşünülmektedir.

L proteininde amino-terminal ucunda glisin aminoasitine bağlı miristik asit vardır. Kılıf proteinleri içinde asetillenmiş halde bulunan tek polipeptid LHBs'dir. Bu nedenle pre-S1 proteini hücreden tek başına salınamaz. Bu molekülün sekresyonu için S proteinine gerek vardır. Ancak aşırı L protein konsantrasyonları M ve S proteinlerinin salınımını bloke eder. Yüzey proteinlerinin sekresyonundaki bu karışık durum ve LHBs / SHBs oranı hepatositlerde oluşan partikülün morfolojisini belirler. LHBs düzeyleri %5'den daha az olduğunda sadece 22 nm'lik küresel partiküller meydana gelirken, daha yüksek konsantrasyonlarda tübüler partiküller sekresyona uğramakta aşırı LHBs konsantrasyonlarında ise filament sekresyonu önlenmektedir. Diğer taraftan kor partiküllerinin kılıflanabilmesi içinde L proteinine ihtiyaç vardır (6,19,23,39).

Translasyon işlemi S geni üzerindeki ikinci kodondan başlarsa bu kez pre-S2 +S bölgelerinin ürünü olan M protein (MHBs) sentezlenir. Bu protein 33 kDa molekül ağırlığında 281 aminoasitten oluşmuş bir polipeptid ($p33^2$) olup, çoğunluklabir yada iki bölgesi glikolize edilmiş haldedir. Glikolize formu 36 kDa ağırlığındadır ve gp36^s şeklinde gösterilir. Bu proteinin 133-139. aminoasitleri arasındaki bölgesi gruba özgü epitop taşıırken, 137-143. aminoasitleri arasındaki bölgesi ise tipe özgü epitoplar bulundurmaktadır.

Her üç partikül tipinde de minör komponent olarak bulunan MHBs'nin miktarı viryon ve tübüler partiküllerde en az, 22 nm'lik küresel partiküllerde ise LHBs'den biraz daha fazladır. Bu protein replikasyonun olmadığı durumlarda HBsAg içinde yer almaz. Bu nedenle pre-S2 antijeninin varlığı viral replikasyonun göstergesi olarak kabul edilmektedir (8,17).

L ve M proteinleri infeksiyonun erken dönemlerinde ortaya çıkar ve özgül antikorların oluşmasıyla beraber serumdan kaybolmaları iyileşmenin göstergesi olarak değerlendirilir (39). M proteini hepatositlere bağlanmada önemlidir. Pre-S2 proteini albumine bağlanmadığı halde gluter aldehitle polimerize edilmiş insan serum albuminine (poly-HSA) bağlanabilmektedir. poly-HSA albumini normalde insan serumunda bulunmamasına karşın hepatositlerin yüzeyinde bulunmaktadır. Bu proteinin hepatositlere tutunmasında önemli bir diğer reseptör ise pre-S2 glikandır (6,17).

Hepatit B virüsünün pre-S bölgelerinden sentez edilen proteinler (pre-S1 ve pre-S2) hidrofilik aminoasitlerden oluşmuş olup lipid zardan dışarı doğru çıkıntı yapmışlardır. Bu nedenle, bu proteinlere karşı oluşan antikor yanıtı virüse karşı korunmada önemli olup hedef hücre reseptörlerine bağlanma proteinleri olarak da görev yaptıkları düşünülmektedir. Pre-S1'in 27-35 ve 72-78 aminoasitleri arasındaki bölgeler ile pre-S2'nin 120-145 aminoasitleri arasındaki bölgenin nötralizan antikorların oluşumundan sorumlu bölgeler oldukları bilinmektedir (6,18,29).

Translasyon işlemi sadece S bölgesinden başlarsa kılıfın küçük proteini (S protein; SHBs) sentezlenir. Bu protein 24 kDa molekül ağırlığında 226 aminoasitten oluşmuş bir peptid olup glikolize edilmiş formu 27 kDa

ağırlığındadır. Sırasıyla p24^s ve gp27^s şeklinde gösterilir. HBsAg'nin büyük bölümlerini oluşturup B lenfosit için immünojenik epitoplara taşımaktadır (8,17,31,45).

HBsAg fazla miktarda sistein veya sistin, prolin, lösin ve fenilalanine sahiptir. Asidik ve bazik aminoasitler az miktarda bulunur. HBsAg'nin içerisinde sisteinin fazla miktarda bulunuşu partikülün antijenik yapısının korunmasıyla ilgili fonksiyonel bir rol oynadığını göstermektedir. Çünkü, redüksiyon ve alkilasyon onun immünolojik aktivitesini kısmen veya tamamen harap eder. Ayrıca az miktarda bulunan asidik ve bazik aminoasitlerde; lizin, arginin, histidin, glisin, alanin, threonin, valin, methionin, serin, aspartik ve glutamik asit aminoasitleridir. HBsAg'nin yapısında kolesterol, non-polar lipidler, hatta tripolar lipidlerin de bulunduğu ortaya çıkarılmıştır. HBsAg'nin lipid yapısının %65'ini phosphatidyl choline, %30'unu sphingomyeline ve %5'ini lysophosphatidyl choline oluşturur. Bu lipidlerden ayrı olarak yapısında karbonhidrat bulunan iki çeşit lipid daha tespit edilmiştir. Bunlardan birisi sialikaside sahip olmayan ve suda çözünebilen glycosphingolipid'dir. Bu komponent HBsAg'nin spesifik bir haptenidir. Bunlar %3,6 ile %6,5 kadar karbonhidrata sahiptir (2,7,17).

SHBs'yı oluşturan aminoasitlerin belli bölgelerdeki diziliş farklılıklarına göre HBsAg üzerinde en az 5 antijenik determinant bulunduğu saptanmıştır. Bunlar a, d/y ve w/r olarak isimlendirilmektedir. Bütün subtiplerde ortak olarak yer alan gruba özgül "a" determinanı; 124-147. aminoasitleri arasındaki hidrofilik bir bölgedir. Bu bölgeye karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engellemekte ve tüm subtiplere karşı etkili bir aşının oluşmasını

sağlamaktadır. SHBs üzerindeki bölge, yapısında yer alan 7 adet sistein arasındaki intramoleküler disülfid köprülerince oluşturulan ve 127 ile 147. aminoasitlerini çevreleyen iki ilmik sayesinde oldukça iyi bir şekilde korunmaktadır. Virionun dış yüzünde bulunan "a" determinanti; aşı veya doğal enfeksiyon sonrası oluşan anti-HBs'lerin büyük kısmını bağlama özelliğine sahiptir (6,17,37).

HBsAg'nin diğer iki determinanti d/y ve w/r'dir. SHBs'nin aminoasit 122 pozisyonunda lizin varsa "d", arginin varsa "y" determinanti oluşmakta; aminoasit 160 pozisyonundaki arginin "r" determinantını meydana getiren, lizin "w" subtipinin tanımlanmasında kullanılır. Tüm "w" determinantlarında lizin bulunmakla birlikte pozisyon 127'deki aminoasite göre 4 farklı "w" subtipi saptanmıştır. Bunlar adw, adr, ayr, ayw subtipleridir. Ayrıca yapılan son çalışmalara göre, toplam 9 adet değişik HBsAg subtipi (ayw₁, ayw₂, ayw₃, ayw₄, ayr, adw₂, adw₄, adrg⁺ ve adrg⁻) tanımlanmıştır. Ayrıca "x" ve "g" gibi yeni determinantların varlığı da gösterilmiştir (6,17,30,37).

Bazı olgularda subtip determinantların ,benzer partikeller üzerinde awr, adwr, adyw, adyr ve adywr şeklinde de birarada bulunabileceği bildirilmiştir. Bunun sebebi olarak fenotipik karışım yada karışık enfeksiyonlardan şekillenen genotipik rekombinasyonların olabileceği ifade edilmektedir.. Hepatit B virüsü türleri A'dan F'ye değişen 6 grupta isimlendirilirler ve coğrafik olarak farklı yayılıma sahiptirler (1,12,38).

Polimeraz zincir reaksiyonu ve DNA dizileme tekniğinin kullanımından sonra HBsAg'nin immunodominant olan 'a' determinantında nokta mutasyonları belirlenebilmiştir. Bu tipten variant HBV'nün ,koruyucu anti -HBsAg'lerden

kurtularak enfeksiyona sebep olduğu bildirilmiştir ve bu durum 'anti-HBS escape' olarak isimlendirilmiştir (5,11,13). Hepatitis B virus taşıyıcı annelerden doğan çocuklara hiperimmün (anti-HBS) globulin ve HBsAg ile aktif immunizasyonun yapılması gerekliliği tavsiye edilmektedir. Ancak, yapılan bazı çalışmalarda incelenen çocukların %2-3'ünde pasif yada aktif immunizasyon olmasına rağmen HBV enfeksiyonu gelişmiştir. Bu çocuklarda yapılan DNA dizileme analizi sonucunda HBV proteininin 'a' determinantında 145. aminoasitinde glisinin yerine arjinin bulunduran escape mutant belirlenmiştir. Ayrıca 129. Aminoasitinde glutamin yerine lösin bulunduran mutantlar belirlenmiştir (4,36,42).

Kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri boyunca karaciğer ve serumda pre-S bölgesinde mutasyon yönünden yaygın bir artış olduğu gözlenmiştir. Pre -S bölgesinde meydana gelen bu mutantların da escape mutant olabileceği ve viral replikasyonu etkileyebileceği düşünölmüştür. Özellikle pre-S2 bölgesinde meydana gelen delesyon mutasyonları ve diğer mutasyonlar yönünde çalışmalar artırılmıştır (10,25).

Dünya Sağlık Örgütü'nün bütün dünyada yeni hepatit B olgularının önlenmesine yönelik global stratejisinde, bütün kan ve kan ürünlerinin HBsAg açısından test edilmesi ve toplumdaki HBV taşıyıcılarının belirlenmesine özel bir önem verilmesinin gerekliliği vurgulanmaktadır. HBV prevalansı, kaynakları ve sağlık sistemleri kısıtlı olan ölkelerde daha yüksektir. Kan ve kan ürünlerinin kontrol edilebilmesindeki en önemli engelin kaynak sıkıntısı olduğu belirtilmektedir (39).

Medikal tedavisi kısıtlı olan hepatit B infeksiyonlarının tanınmasında veya immünizasyonda kullanılacak antijenin hazırlanması amacıyla hepatit B virüsünün üretilmesi mümkün olmadığından daha basit ve ucuz yolla elde edilmesi için çeşitli metodlar geliştirilmiştir. Sözkonusu yöntemlerden en önemlisi rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak, hepatit B virüsü yüzey antijeninin çeşitli sistemlerde açıklatılması yoluyla bol miktarlarda elde edilmesidir.

Günümüzde henüz etkin bir tedavi ajanının olmaması nedeniyle hepatit B'den aşı ile korunma yolu önemini korumaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi ile geliştirilen aşilar halen başarıyla uygulanmakta ve yeterli koruma sağlamaktadır (44).

Bu bilgilerin ışığı altında yapılan bu çalışmada tanisal veya korunma amaçlı olarak daha sonraki çalışmalarda temel oluşturması amacıyla HBsAg gen bölgesinin klonlanması amaçlanmıştır.

4. GEREÇ VE YÖNTEM

4.1. pcDNA3.1/V5 His-TOPO Plazmidi

pcDNA3.1/V5 His TOPO vektörü PCR ürünlerinin direkt olarak klonlanması ve memeli hücrelerinde açıklatılması amacıyla kullanılan ve 5523 baz çifti (bç) uzunluğunda olan bir vektördür. Plazmidin yapısında, prokaryotik hücrelere transformasyondan sonra rekombinant plazmidlerin seçiminde kullanılan ampisiline dirençlilik geni ve plazmitle transfeke memeli hücrelerinin seçiminde kullanılan neomisine dirençlilik genleri bulunmaktadır. Bunun yanı sıra, E.coli'de çoğalmayı sağlayan ColE1 orijin bölgesi ve transfeke edilen hücrelerin çekirdeğinde episomal olarak replikasyonu sağlayan SV40 erken promotor ve orijin bölgesini de bulundurmaktadır. Plazmidin yapısında bulunan insan sitomegalovirüs (CMV) erken promotor/enhancer bölgesi rekombinant proteinin yüksek oranda sentezlenmesini sağlamaktadır. Bununla birlikte plazmidde mRNA'nın poliadenilasyonu ve transkripsiyonun sonlandırılmasında etkinliği arttıran SV40 poliadenilasyon sinyal bölgesi ile Bovine growth hormon (BGH) poliadenilasyon sinyal bölgeleri bulunmaktadır. Ayrıca T7 promotor bölgesi ile fl orijin bölgeleri de plazmidin yapısında bulunmaktadır.

4.2. Serumdan HBV DNA'sının Tespit Edilmesi ve İzolasyonu

Hepatit B virüs DNA'sının izolasyonu için, materyal olarak, Fırat Üniversitesi Araştırma-Uygulama Hastanesine başvuran ve Quantiplex bDNA deney sistemi kullanılarak tespit edilen ve HBV ile infekte olduğu belirlenen bireylerin kan serumlarından elde edilen HBV DNA'sı kullanıldı.

a-Serumdan HBV DNA'sının Tespit Edilmesi; Bu amaçla kullanılan Quantiplex bDNA deney sistemine göre yapıldı; bDNA deneyi sandviç nükleik asit hibridizasyon deneyi olarak adlandırılan bir deneydir. Oligonükleotid hedef

prob ile kaplı kuyucuklara 10'ar µl serum örnekleri ,standart kontroller ve lizis buffer çalışma reaktifi eklenir.63°C'de 30 dak. inkübasyona bırakılır. Bu sürenin sonunda viral DNA ile viral partikellerin ayrılması ve hedef prob ile hedef DNA'nın hibridize olması sağlandı. Yıkama işlemlerinden sonra herbir kuyucuğa amplifier çalışma reaktifi eklenerek 53°C'de 30 dak. inkübasyon işlemi yapıldı. Bu sürenin sonunda bir önceki reaksiyona ait olan hedef probun ikinci kısmında spesifik bağlanmaların meydana gelmesi sağlanarak soğutma ve yıkama işlemlerinden sonra her bir kuyucuğa enzimle işaretli prob eklendi ve inkübasyon işlemi tekrarlandı .Son aşamada kuyucuklara dioxietan substrat eklenerek okutma işlemine geçildi. Sonuçlar meq ve pg miktarları olarak tespit edildi. 2.5 pg/ml ile 0.7 meq seviyelerinden daha yüksek olan değerler pozitif olarak kabul edildi.

b- Serum HBV DNA'sının İzolasyonu; 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine 100 µl HBV hasta serumu ve 500 µl K-tamponu (20 mM Tris pH 8.0, 10 mM EDTA, 150mM NaCl, 10 mg/ml pronase, %0.2 SDS) ilave edilerek bu tüpler 37 °C'de 2 saat bekletildi. Bu süre tamamlandıktan sonra tüplerin içindeki karışıma, eşit miktarda fenol-kloroform (fenol-kloroform-isoamilalkol 25:24:1, Fluka, BioChemika, Switzerland) eklendi. Tüpler 5 dk. karıştırıcıda tutulduktan sonra 12.000 rpm'de 15 dak. santrifüj işlemi yapıldı. Bu işlem sonunda üst sıvı yeni bir tüpe aktarılarak 1/10 volüm 3M sodyum-asetat (pH 5,4) ile 2,5 volüm mutlak etanol eklendi ve karıştırıldı. Karışım -20°C'de 1 gece bekletildikten sonra tekrar santrifüj işlemine tâbi tutularak tüplerin dip kısmına DNA peletinin çökmesi sağlandı. Peletin üzerine %70'lik soğuk etanol ilave edilerek santrifüj işlemi tekrarlandı ve üst sıvı uzaklaştırıldı. Tüpün dibindeki pelet DNA

kurutulduktan sonra 60 µl steril dH₂O sulandırıldı ve PCR'da çoğaltılma işlemine kadar -20°C'de saklandı.

4.3. HBsAg Gen Bölgesinin PCR ile Çoğaltılması

HBsAg gen bölgesini çoğaltmak için kullanılan primerlerin seçiminde Gen Bankasın (AJ344117)'dan yararlanıldı.

PCR ile HBsAg gen bölgesinin çoğaltılması için, 0,5ml'lik mikrosantrifüj tüpüne, izole edilen HBV DNA'nın 10µl'si ile 2µl 20pmol P1-P2 primer (P1 5' G ATG GAG AAC ATC GCA TCA GG 3', P2 5' GG TCA AAT GTA TAC CCA AAG 3'), 4µl 1,25mM dNTP (Promega, Co, Madison, WI, ABD), 5µl 25mM MgCl₂ (Promega, Co, Madison, WI, ABD), 5µl 10XPCR buffer (Promega, Co, Madison, WI, ABD), 0,5µl 2U Taq DNA polimeraz (Promega, Co, Madison, WI, ABD) ve 2,5µl 1XBSA ilave edilerek toplam 50µl'lik PCR karışımı hazırlandı.

HBsAg geni, 95°C'de 1 dak.lık ön ısıtmayı takiben, 95°C'de 30 sn., 55°C'de 1 dak., 72°C'de 1.5 dak'lık 32 döngüden oluşan PCR işlemi ile çoğaltıldı.

Çoğaltılan HBsAg PCR ürününü görüntülemek amacıyla 50 ml Tris-asetat elektroforez tamponu (TAE;0,04 M Tris-asetat, 0,001M EDTA) içine 0,75 gr agaroz (Promega, Co, Madison, WI, ABD) konularak kaynatıldı. Yaklaşık 55°C'ye kadar soğutulduktan sonra eriyiğe 0,5ug/ml oranında etidyum bromid ilave edilerek donduruldu. Örnekler jelin kuyucuklarına 6X yükleme tamponu (%0,25 bromfenol mavisi, %30 gliserol) kullanılarak yüklendikten sonra 150 V doğru akımda, 30 dak. elektroforez işlemi uygulandı. Daha sonra agaroz jele ultraviole (UV) ışık kaynağında bakılarak beklenen büyüklükteki HBsAg gen parçası tespit edildi.

4.4. HBsAg Geninin Agaroz Jelden Saflaştırılması

PZR sonrası elde edilen HBsAg gen bölgesi %1'lik agaroz jelden Wizard pürifikasyon kiti (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega Co. Madison, WI, USA) kullanılarak saflaştırıldı. Bu amaçla, jelden bir bistüri yardımıyla kesilerek uzaklaştırılan hedef DNA parçası 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Jelin üzerine 1 ml resin ilave edilerek 65 °C'de su banyosunda 5 dak bekletildi. Erimiş haldeki jel ve resin karışımı oda ısısına alındı ve 10 dak. bu ısıda bekletildi. Daha sonra tüpteki içerik enjektöre çekildi ve enjektörün ucuna bir kolon takıldı. Enjektörün pistonu itilerek içerik kolondan geçirildi ve böylece resinle bağlı halde bulunan DNA'nın kolonda tutulması sağlandı. Enjektöre 2 ml %80 isopropanol ilave edilip piston itilerek kolondaki resin-DNA'nın yıkanması sağlandı. Enjektörün ucunda takılı bulunan kolon çıkarılarak mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 7000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi. Bu işlem sonunda, kolon yeni bir mikrosantrifüj tüpüne yerleştirilerek DNA'nın sulandırılması amacıyla üst kısmından 25µl steril dH₂O eklendi. Oda ısısında 5 dak beklendi ve 7000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi. Bu işlem sonunda mikrosantrifüj tüpünde toplanan süspansiyondaki DNA miktarı spektrofotometrede (Jasco V -530, Japonya) ölçüldü ve DNA -20 °C'de kullanılıncaya kadar muhafaza edildi.

4.5. DNA Miktarının Ölçülmesi

Sulandırılan DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm dalga boyunda ölçüldü. Bu amaçla, bir mikrosantrifüj tüpüne alınan 10µl DNA örneği dH₂O ile 500µl'ye tamamlandı. Spektrofotometrede Optik Dansite (OD)₂₆₀:1 değeri çift sarmal DNA için 50ug/ml miktarına eş tutularak numunedeki DNA miktarı belirlendi.

4.6. Kompetan E.coli Hücrelerinin Hazırlanması

Kompetan hücre hazırlamak amacıyla E.coli'nin JM109 suşu kullanıldı. Bu hücreler Lurie-Bertani (LB) agar pleytine (1 lt dH₂O'da 10 gr Bacto-tryptone, 5 gr Bacto-yeast extract, 10 gr NaCl ve 15 gr agar eritildi ve 5M NaOH'den 200µl ilave edilerek pH'sı 7.4'e ayarlandı. Otoklavda steril edilerek pleytlere döküldü) ekildi. Ekim yapılan pleyt 37°C'de 16 –18 saat bekletildi. Bu süre sonunda üreyen ve yaklaşık 1mm çapında olan bir koloniden öze yardımıyla hücreler alınarak 5 ml LB sıvı besiyerine (1 lt dH₂O'da 10 gr Bacto-tryptone, 5 gr Bacto-yeast extract, 10 gr NaCl eritildi, otoklavda steril edildi ve kullanılıncaya kadar +4°C'de saklandı) ekildi. Ekim işlemi yapılan besi yeri 37°C'de 2 saat karıştırıcıda tutuldu. Bu süre sonunda besi yeri önceden 37°C'de ısıtılmış 100ml'lik LB sıvı besi yerine aktarıldı ve karıştırıcıda tutulma işlemine devam edildi. Üç saat sonra, hücrelerin üreme miktarlarını tespit etmek amacıyla 20 dak.'da bir spektrofotometrede ölçüm yapılarak OD₆₀₀'deki absorbans değeri belirlendi. Yapılan ölçümler sonucunda absorbans değeri 0,6 olunca, besiyeri içinde üremiş olan bakteriler 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve 3.000 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Bu işlem sonunda üst sıvı döküldü ve dipte kalan pelet 33 ml steril RF 1 çözeltisi (100mM rubidyum klorid, 50 mM mangan klorit, 30 mM potasyum asetat, 30 mM kalsiyum klorid, %15 gliserol) içinde resüspanse edildi. Hücreler 20 dak. buz üzerinde tutulduktan sonra +4°C'de 3.000 rpm'de 15 dak santrifüj yapıldı. Santrifüj sonunda üst sıvı döküldü ve hücreler 5 ml RF 2 çözeltisi(10 mM MOPS, 10 mm RbCl, %75 CaCl₂.2H₂O, %15 gliserol) içinde resüspanse edildi. Hücreler buz üzerinde 15 dak. bekletildikten sonra 1,5 ml'lik santrifüj tüplerine 100 µl olarak dağıtıldı. Daha sonra bu hücreler –80°C'de

mutlak etanolde donduruldu ve tansformasyonda kullanılıncaya kadar -80 °C'de saklandı.

4.7. HBsAg Geninin pcDNA3.1/V5His- TOPO Vektörüne Yerleştirilmesi ve Kompetan E. coli'ye Transformasyonu

Jelden pürifiye edilmiş HBsAg geninin 4µl'si ile 1µl pcDNA3.1/V5His- TOPO vektöründen (invitrogen) hazırlanan karışım mikrosantrifüj tüpüne konularak oda ısısında 5 dak. ligasyon için bekletildi. Bu süre sonunda 1µl 6XTOP0 durdurma solüsyonu ilave edilerek reaksiyon sonlandırıldı. Önceden hazırlanan kompetan JM109 hücrelerinin 100µl'sine, 6µl ligasyon ürünü ilave edildikten sonra yarım saat bekletildi. Daha sonra 42°C'de 2 dak. bekletilerek hücre porlarının açılması ve transformasyonun gerçekleşmesi sağlandı. Açılan hücre porlarının tekrar kapanmasını sağlamak amacıyla hücreler +4°C'de 2 dak. bekletildi. Hücrelerin üzerine 400µl LB sıvı besi yeri ilave edilerek 37°C'de sallayıcı üzerinde 1.5 saat bırakıldı. Transforme hücreler 60ug/ml ampisilin içeren LB katı besi yerine ekildikten sonra 37°C'de 1 gece bekletildi.

4.8. Polimeraz Zincir Reaksiyonu Tarama Deneyi (PZR-T)

Transformasyonu takiben 1 gece bekleme süresinden sonra ekim yapılan pleytde çok sayıda bakteriyel koloni gözlemlendi. Bu bakteriyel kolonilerin rekombinant plazmidi içerip içermediklerini tespit etmek amacıyla PZR-T deneyi yapıldı. Bu amaçla , 0.5 ml'lik mikrosantrifüj tüplerine 2µl 10XPCR Buffer, 2µl 25mM MgCl₂, 3µl 1,25mM dNTP, 4µl 20 pmol primer1-primer2 ve 4µl steril dH₂O'dan oluşan ve toplam 15µl olan karışım bırakılır. Daha sonra bir kürdan yardımıyla pleytdeki koloniden bir miktar alınarak hazırlanan karışımın içine ilave edildi ve 95°C'de 10 dak bekletildi. Bu sürenin sonunda herbir tüpe 5µl Taq

DNA polimeraz (5u/μl 'lık Taq DNA polimeraz enziminden 1μl alındı. 24 μl steril dH₂O eklenerek sulandırıldı. Bu karışımdan 5μl kullanıldı) enzimi eklenerek reaksiyona bırakıldı. 95°C'de 5dak.'lık ön ısıtmadan sonra 94°C'de 1dak., 55°C'de 1 dak. ve 72°C'de 1 dak.'lık 25 döngüden oluşan PCR işlemi ile çoğaltıldı. Bu işlem sonunda PCR ürünlerini görüntülemek amacıyla örnekler %1.5'luk agaroz jele 6X yükleme tamponu kullanılarak yüklendi. Daha sonra 150 V doğru akımda 30 dak. elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Jele UV ışık kaynağı altında bakılarak beklenen ağırlıktaki gen parçasının varlığı tespit edildi.

4.9. Plazmit DNA'sının İzolasyonu

PZR-T deneyi ile rekombinant plazmidi içerdiği tespit edilen hücrelerden plazmid DNA'sını izole etmek için pleytten alınan bir koloni 30 ml LB sıvı besiyerine ekildi. Spektrofotometrede yapılan ölçümler sonucunda, OD₆₀₀'deki absorbans değeri 0,6 oluncaya kadar, besi yeri 37°C'de karıştırıcı üzerinde tutuldu. Bu süre sonunda 30 ml ampisilinli sıvı besi yerinde üreyen bakteriler 37°C'de önceden ısıtılmış 500 ml'lik ampisilin içeren LB sıvı besi yerine aktarıldı. Besi yeri OD₆₀₀'deki absorbans değeri 0,4 oluncaya kadar 37°C'de karıştırıcı üzerinde bekletildi. Daha sonra plazmid DNA'sının alkali liziz yöntemiyle izole edilmesi işlemi gerçekleştirildi Ampisilinli LB sıvı besi yerinde çoğaltılan ve rekombinant plazmid içeren bakteri hücreleri 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve tüpler 3.000 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Üst sıvı döküldükten sonra hücrelerin üzerine 1 ml STE çözeltisi (0,1 M NaCl , 10 mM Tris.Cl pH 8.0 ,1mm EDTA pH 8.0) eklendi ve hücreler resüspanse edildi. Karışım mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı, 12.000 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi. Santrifüj işleminden sonra üst sıvı döküldü ve hücrelerin üzerine 100μl Solüsyon

I çözeltisi (dH₂O'da 50 mM glukoz, 25mM Tris-Cl pH 8.0, 10mM EDTA içeren ve otoklavda steril edilen eriyik) eklenip resüspanse edildi ve buz üzerinde 5 dak. bekletildi. Daha sonra tüplere 200 µl taze hazırlanan soğuk Solüsyon II çözeltisi (dH₂O'da 0.2 N NaOH, %1 sodyum dodesil sülfat içeren eriyik) eklendi ve buz üzerinde 2 dak. bekletildi. Son olarak tüplere, 150 µl Solüsyon III çözeltisi (dH₂O'da 3 M potasyum asetat, %10 glasiyel asetik asit içeren eriyik) bırakıldı ve dikkatlice karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 5 dak. bekletildi. Daha sonra santrifüj işlemi tekrarlandı ve üst sıvı temiz bir tüpe aktararak üzerine 40µl DNAase enzimi içermeyen pankreatik RNAase (10mg/ml konsantrasyona sahip stok solüsyonundan) ilave edilip 37°C'de 1 saat bekletildi. Bu sürenin sonunda fenol-kloroform ve etanol aşamaları uygulanarak elde edilen rekombinant plazmit DNA'lar 50 µl steril dH₂O ile sulandırıldı. Plazmit DNA'sının miktarı spektrofotometrede ölçüldü ve kullanılıncaya kadar -20 °C'de saklandı.

4.10. Restriksiyon Enzim Kesim Deneyleri;

pcDNA3.1/V5His- TOPO vektörü içine HBsAg gen bölgesinin yerleştirildiği PZR-T deneyi ile doğrulanan ve alkali lizis metodu ile izole edilen rekombinant plazmit DNA'sı XbaI restriksiyon enzimi ile kesilerek gen bölgesinin vektör içine doğru şekilde (oryantasyonda) yerleştiğini tespit etmek amacıyla enzim kesim deneyi yapıldı. Enzim kesimi için 5µl DNA solüsyonu, 5 µl 1X restriksiyon enzim solüsyonu (33mM tris-asetat pH 7.9 10 mM magnezyum asetat, 66mM potasyum asetat ve 0.1mg/ml BSA), 10 unite/µl konsantrasyondaki XbaI enziminden 5 µl (Fermentas) ve 35µl steril dH₂O ilave edildi. Hazırlanan karışım kesim için 37°C'de 16 saat bekletildi. Kesim ürünleri %1.5 lik agaroz jele

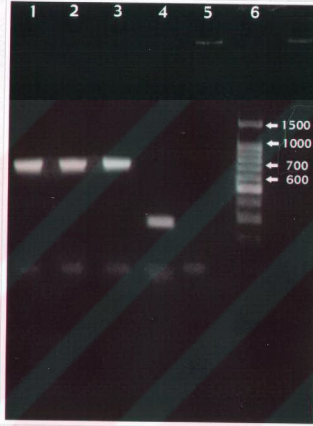
yüklendi. Elektroforez işlemi için 150 V doğru akım uygulandı. UV ışık kaynağı altında bakılarak gen bölgesinin doğru oryantasyonda yerleştiği tespit edildi.



5. BULGULAR

5.1. HBsAg'nin pcDNA3.1/V5/His-TOPO'da Klonlanması

Hepatit B virüsü ile infekte olan bireylerin serumlarından izole edilen DNA'nın PZR'ı sonucunda 681 bp uzunluğundaki HBsAg gen bölgesi çoğaltılmış ve bu gen bölgesi %1.5 agaroz jele yapılan yükleme sonucunda belirlenmiştir (Şekil 3). Çalışmada PZR'ın kontrolü amacıyla HBV'nin HBsAg gen bölgesinin 259 bp'lik bir gen bölgesini çoğaltan özgül primerler kullanılmıştır.



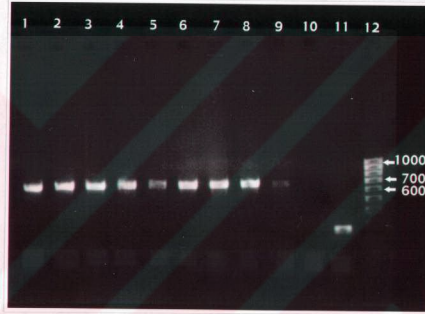
Şekil 3: Hepatit B virüsü ile infekte bireylerin kan serumlarından

izole edilen DNA'nın HBsAg gen bölgesine özgül primerler kullanılarak PZR ile çoğaltılan HBsAg gen parçasının %1.5 agaroz jelde görüntülenmesi. 681 bp'lik HBsAg geni (hat 1-3) , 259 bp'lik HBsAg gen parçası (hat 4) , negatif kontrol (hat 5) , 100 bp'lik DNA marker (hat 6).

Hepatit B virüsü ile infekte bireylerin serum örneklerinden izole edilen HBV DNA'sı kullanılarak, HBsAg gen bölgesi PZR ile çoğaltıldıktan sonra bu

bölgenin pcDNA3.1/V5/His-TOPO vektörüne yerleştirildiği PZR-T deneyi ile doğrulanmıştır.

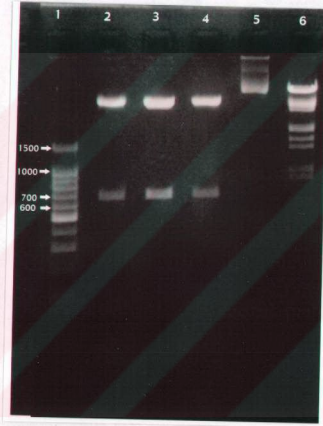
Bu amaçla ,transformasyon işlemi sonucunda elde edilen ve rekombinant plazmidi içeren bakteriyel hücre kolonilerinin kalıp olarak kullanıldığı ve PZR reaksiyonu sonucunda HBsAg gen bölgesinin gösterildiği elektroforez sonuçları şekilde gösterilmiştir (Şekil 4). PZR reaksiyonunun kontrolü amacıyla HBsAg gen bölgesinin 259 bç'lik bölgesine özgül primerler kullanılmış ve bu gen bölgeside PZR-T deneyi sonucunda tespit edilerek görüntülenmiştir .



Şekil 4; HBsAg gen bölgesine özgül primerler kullanılarak yapılan PZR-T deneyi sonucunda çoğaltılan ürünün %1.5 agaroz jelde gösterilmesi. Pozitif PZR-T ürünü (hat 1-8), pozitif kontrol olarak kullanılan 681 bç'lik HBsAg PZR ürünü (hat 9), negatif kontrol (hat10), 259 bç'lik HbsAg gen parçası (hat11), 100 bç'lik DNA marker (hat12).

Klonlama çalışmaları neticesinde, rekombinant plazmidin oluşturulduğu PZR-T deneyi ile doğrulandıktan sonra, ek bir doğrulama deneyi olarak ve ayrıca HBsAg gen bölgesinin vektör içine hangi şekilde (oryantasyonda) yerleştiğini

tespit etmek amacıyla rekombinant plazmid DNA'sı kullanılarak, XbaI restriksiyon enzimi ile kesim deneyi gerçekleştirilmiştir. HbsAg gen bölgesi ve pcDNA3.1/V5/His-TOPO vektörü nükleotit dizilimlerinde birer tane XbaI restriksiyon enzimi kesim bölgesi içerdiğinden, kesim deneyi sonucunda 632 bp'lik ve 4891 bp'lik iki farklı uzunlukta DNA parçası elde edilmiştir. Pozitif kontrol olarak pcDNA3.1/V5/His-TOPO-HBsAg rekombinant plazmid kullanıldı ve kesim deneyi sonucunda hedef gen bölgesinin doğru oryantasyonda yerleştiği tespit edilirken klonlamanın olduğuda bir kez daha ispatlanmış oldu (Şekil 5) .



Şekil 5: Rekombinant plazmidin varlığının ve hedef gen bölgesinin doğru şekilde (oryantasyonda) yerleştiğinin, XbaI restriksiyon enzimi kullanılarak yapılan kesim deneyi sonucunda %2 agaroz jelde görüntülenmesi. 100 bp'lik DNA marker (hat 1) , XbaI restriksiyon enzimiyle kesilen rekombinant plazmid DNA ürünü (hat 2-4) , pozitif kontrol olarak kullanılan rekombinant plazmid DNA'sı (hat 5) , Lambda DNA/EcoRI +Hind III ağırlık markeri (hat 6).

6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatit B virüsü, kronik hepatit, siroz ve hepatosellüler karsinomanın primer nedenlerinden biri olan ve dünyada henüz kontrol altına alınamamış en önemli hastalık ajanlarından biridir. Virüsün dünyada 450-500 milyon kronik taşıyıcısının mevcut olduğu bildirilmiştir (21,37).

Hepatit B virüs infeksiyonunun dünyadaki dağılımı coğrafik bölgelere göre farklılık göstermektedir. Bölgeler arasındaki bu farklılığı yaratan önemli etkenlerden biri ülkelerin sosyo ekonomik durumları ve bunun eğitim ve sağlık sistemlerine olan etkisidir. Kısıtlı kaynaklara sahip ülkelerde kan ve kan ürünlerinin etkin bir şekilde denetlenebilmesi önündeki en önemli engelin bu amaçla kullanılacak malzemenin satın alınması için gereken maddi kaynağın bulunmayışı olduğu belirtilmektedir.

Türkiye, Hepatit B virüs yüzey antijeni pozitifliği %2-10 arasında değişen orta düzeydeki endemik bölgede yer almaktadır. Yurdumuzda 1972'den bu yana yapılmış olan bir çok çalışmada, bölgeler arası farklar bulunmakla beraber Türkiye'deki HBsAg seroprevalansının %3,9-12,5 olduğu ve 4 milyon civarında taşıyıcı bulunduğu bildirilmektedir (39).

Bugün HBV'ne yönelik yapılan çalışmalar çoğunlukla tanısallı amaçlıdır ve bu amaca yönelik olarak serum, tükürük, asit sıvısı, semen gibi vücut sıvılarında viral antijen veya antikorların belirlenmesi için kullanılan temel ölçüm yöntemleri, serolojik-immünolojik tanı yöntemleri ile PCR (polimeraz zincir reaksiyonu) taramalarıdır.

Bu çalışmada ise rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak HBV'nün HBsAg gen bölgesi PCR tekniği ile çoğaltılmıştır. Çalışmanın ikinci aşamasında

ise çoğaltılan gen bölgesinin klonlanması amacı ile pcDNA3.1/V5/His-TOPO plazmiti kullanılmıştır.

Hepatit B virüsünün konakçı spektrumu insan ve şempanzelerle sınırlıdır. Bu nedenle HBV'nün genom yapısı, replikasyonu ve nükleotid diziliminin anlaşılmasına yönelik yapılan çalışmalarda HBV DNA'sının klonlanması yöntemi sıklıkla kullanılmıştır. Hepatit B virüsü S geninin klonlanması ve ayrıca bu genin kodladığı proteinin açıklanması amacıyla prokaryotik ve ökaryotik sistemler ile maya hücrelerinin kullanıldığı pek çok çalışma yapılmıştır. Bu amaçla ilk olarak *Escherichia coli* (E.coli) olmak üzere prokaryotik hücreler sık kullanılmıştır. Ancak bu şekilde elde edilen antijen tanınal amaçlar için uygun olsa bile aşı hazırlanmasında uygun bulunmamıştır. Çünkü ökaryotik metabolizmalarda yapılan proteinler sentez sonrası da bazı değişikliklere uğramaktadırlar. Bu değişiklikler de proteinin fonksiyon, antijenite, stabilite gibi bazı özelliklerini etkilemektedir. Bu nedenle özellikle tedavi amaçlı ürün elde edilmesinde, prokaryotik sistemler yerine mayalar ve hücre kültürleri gibi ökaryotik sistemlerde ekspresyon çalışmaları yapılmıştır. Ökaryotik sistemlerden elde edilen HBsAg'nin konak hücrelerde viral enfeksiyon sırasında yapılan HBsAg'ye daha yakın olduğu görülmüş ve elde edilen ürün aşı yapımında kullanılmıştır. Bu yöntemle üretilen birkaç aşı çeşidi mevcuttur (44).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda ise özellikle viral promotor ve enhancerlere sahip farklı vektörler kullanılmıştır. Bu amaçla Baculovirüs ve Epstein-Barr virüs tabanlı vektörlerin HBV yüzey antijeninin ekspresyonu çalışmalarında kullanımı bildirilmiştir. Ayrıca HBsAg gen bölgesinin ekspresyonu ve tanısı için farklı hücre kültürü sistemleri kullanılmıştır. Yapılan çalışmalarda böcek (*Trichoplusia*

ni) hücre kültürü ve *Drosophila Schneider*-2 hücreleri ile oluşturulan hücre kültürü sistemlerinin aynı amaçlı olarak kullanımı bildirilmiştir (8,14,16,44).

Ülkemizde de HBV'ye yönelik tanısal amaçlı gerçekleştirilen serolojik testler ve PCR taramaları bu virüsün ülkemizde oldukça yaygın bir infeksiyon ajanı olduğunu göstermiştir. Ancak virüsün yapısal unsurlarının , proteinlerinin anlaşılmasına ve tedavi amaçlı üretilmesine yönelik çalışmalar bu konuda henüz tam anlamıyla yeterli olamamaktadır.

Bu çalışmada, HBV'nün HBsAg geninin klonlanması başarılmıştır. Ülkemizde bu konuda pek çok öncü çalışma yapılmıştır. Ancak yapılan bu çalışmaları takiben en uygun ve en etkili aşı oluşturma çalışmalarının ve ayrıca ülkemizin farklı bölgelerinde en sık görülen subtipleri belirleme çalışmalarının artırılmasında fayda görülmektedir.

7. KAYNAKLAR

1. Aggarwal AK . (1995). Structure and Function of Restriction Endonucleases . Curr Opin Struct Biol. 5:11-19
2. Akan E. Genel ve Özel Viroloji . Türkiye Klinikleri Yayınevi . 411-419
3. Blumberg BS . (1997) . Hepatitis B virus , the vaccine , and the control of primary cancer of the liver . Proc Natl Acad Sci USA . 94: 7121-7125.
4. Brown AL , Francis MJ , Hastings GZ , Parry NR , Barnett PV , Rowlands DJ , Clarke BE . (1991) . Foreign epitopes in immunodominant regions of hepatitis B core particles are highly immunogenic and conformationally restricted . Vaccine . 9:595-601
5. Burrell CJ , MacKay P , Greenaway PJ , Hofschneider PH , Murray K. (1979) Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322 . Nature . 279:43-47.
6. Bulut Y. (2001). Hepatit B Virüsü HBcAg Geninin Klonlanması ve Ökaryotik Hücrelerde Açıklanması . Fırat Üniversitesi , Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD.
7. Delos S , Villar MT , Peisheng H , Peterson DL . (1991). Cloning, expression, isolation and characterization of the pre-S domains of hepatitis B surface antigen, devoid of the S protein . Biochem J . 276:411-416
8. Deml L , Schirmbeck R , Reimann J , Wolf H , Wagner R . (1999). Purification and characterization of hepatitis B virus surface antigen particles produced in *Drosophila* Schneider-2 cells. Journal of Virological Methods. 79:205-217.
9. Faktor O , Medina TD , Shaul Y. (1988). Regulation of Hepatitis B Virus S Gene Promoter in Transfected Cell Lines. Virology. 162:362-368.
10. Fan YF , Lu CC , Chen CW , Yao WJ , Wang HC , Chang TT , Lei HY , Shiau AL , Su JJ. (2001). Prevalence and Significance of Hepatitis B Virus (HBV) Pre-S Mutants in Serum and Liver at Different Replicative Stages of Chronic HBV Infection . Hepatology . 33:277-286.
11. Gallina A , Bonelli F , Zentilin L , Rindi G , Muttini M , Milanesi G . (1989). A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamin-like domain deleted self-assemble into capsid particles but fails to bind nucleic acids . J Virol . 63:4645-4652 .
12. Ganem D , (1996) . Hepadnaviridae and Their Replication . 'Fields Virology' adlı kitaptan (Eds; BN Fields , DM Knipe , PM Howley). Raven Press , New York. 2703 2737.
13. Heijink R , Paulij W , Bergen VP , Roosmalen VM , Rohm D , Eichentopf B , Muchmore E , Man R , Osterhaus A . (1999) . In vivo activity of a mixture of two human monoclonal antibodies (anti-HBS) In a chronic hepatitis B virus carrier chimpanzee. Journal of General Virology. 80:1529-1535
14. Higashihashi N , Arai Y , Enjo T , Tadashi H , Sacki Y , Katsuichi S , Sato Y , Takeda K , Takashina S , Takahashi T . (1991) . High-level expression and characterization of hepatitis B virus surface antigen in silkworm using a baculovirus vector. Journal of Virological Methods. 35:159-167.

15. Hwang GY , Wang JC , Wu CC . (1998) . Immunological characterization of two major secreted forms of recombinant hepatitis B virus e antigens . *Virus Research* . 59:203-210.
16. Jorge SAC , Hera C , Spina AMM , Moreira RC , Pinho JRR , Menck CFM . (1996) . Expression of the hepatitis B virus surface antigen in mammalian cells using an Epstein-Barr-virus-derived vector. *Journal Microbiol Biotechnol*. 46:533-537.
17. Kıyan M . (1998). HBV Enfeksiyonu "Viral Hepatit'98 " adlı kitaptan (Ed. Kılıçturgay K.) *Viral Hepatitle Savaşım Derneği*. 65-94.
18. Küttner G , Kramer A, Schmidtke G , Giesmann E , Dong L , Roggenbuck D , Scholz C , Seifert M , Stigler RD , Mergener JS , Porstmann T , Höhne W . (1999) . Characterization of neutralizing anti -pre -S1 and anti- pre-S2 (HBV) monoclonal antibodies and their fragments . *Molecular Immunology* . 36:669-683.
19. Lau JNL , Wright TL . (1993) . Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B . *Lancet* . 342: 1335-1344.
20. Lee WM , MD . (1997). Hepatitis B Virus Infection . From the Liver Division , Department of Internal Medicine , University of Texas Southwestern Medical Scholl. 337:1733-1745.
21. Mahoney FJ . (1999). Update on Diagnosis , Management , and Prevention of Hepatitis B Virus Infection. *Clinical Microbiology Reviews*. 12:351-366.
22. McLachlan A , Milich DR , Raney AK , Riggs MG , Hughes JL , Sorge J , Chisari V. (1987) . Expression of Hepatitis B Virus and Core Antigens: Influences of Pre- S and Precore Sequences . *Journal of Virology* . 61: 683-692.
23. Miller RH , Kaneko S , Chung CT , Girones R , Purcell RH . (1989) . Compact organization of hepatitis B virus genome . *Hepatology*. 9:322-327.
24. Moradpour D , Wands JR . (1995) . Understanding Hepatitis B Virus Infection. Massachusetts General Hospital Cancer Center , Charlestown MA 02129. 332:1092-1093.
25. Nakai K , Win KM , Oo SS , Arakawa Y , Abel K . (2001) Molecular Characteristic – Based Epidemiology of Hepatitis B,C,and E Viruses and GB Virus C/Hepatitis G virus in Myanmar . *Journal of Clinical Microbiology* . 39: 1536-1539.
26. Nakao K , Nakata K , Yamashita M , Tamada Y , Hamasaki K , Ishikawa H , Kato Y , Eguchi K , Ishii N. (1999) . p48 (ISGF-3) is involved in interferon –induced Suppression of Hepatitis B Virus Enhancer-I Activity . *J Biol Chem* . 274: 28075-28078.
27. Natoli G , Avantiaggiati ML , Balsano C , Marzio ED , Collepardo D , Elfassi E , Levrero M . (1992). Characterization of the Hepatitis B Vi rus preS/S Region Encoded Transcriptional Transactivator . *Virology* . 187:663-670.
28. Norder H , Courouce 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.
29. Nunez E , Wei X , Delgado C , Crespo RI , Yelamos B , Gutierrez GJ , Peterson DL , Gavilanes F . (2001) . Cloning , Expression ; and Purification of Histidine -Tagged preS Domains of Hepatitis B Virus . *Protein Expression and Purification* . 21:183-191.

30. Okamoto H , Imai M , Tsuda F , Tanaka Takeshi , Miyakawa Y , Mayumi M . (1987). Point Mutation in the S Gene OF Hepatitis B Virus for a d/y or w/r Subtypic Change IN Two Blood Donors Carrying a Surface Antigen of Compound Subtype ady or adw . Journal of Virology . 61:3030-3034.
31. Özden H . (1997) . Hepatit viruslarının moleküler biyolojisi. Viral Hepatit Dergisi. 1:1-18.
32. Petit MA , Guillaud BD , Roche B , Dussaix E , Vallee J , Feray C , Samuel D . (2001) . Residual Hepatitis B Virus Particles in Liver Transplant Recipients Receiving Lamivudine : PCR Quantitation of HBV DNA and ELISA of pre S1 Antigen . Journal of Medical Virology . 65:493-504.
33. Pugh JC , Bassendine MF . (1990) . Molecular Biology of Hepadnavirus Replication. British Medical Bulletin. 46:329-353.
34. Robinson WS . (1991) . Hepadnaviridae and Their Replication . 'Fundamental Virology' adlı kitap. (Eds. BN Fields , DM Knipe) . Raven Press , New York. 989-1021.
35. Schmitt S , Glebe D , Alving K , Talle TK , Linder M , Geyer H , Linder D , Katalinic JP , Gerlich WH , Geyer R. (1999) . Analysis of the Pre-S2N and O-Linked Glycans of the M Surface Protein From Human Hepatitis B Virus . The Journal of Biological Chemistry. 274:11945-11957.
36. Tonekaboni SS , Waters JA , Jeffers S , Gehrke R , Ofenloch B , Horsch A , Hess G , Thomas HC , Karayiannis P . (2000). Effect of Variation in the Common 'a' Determinant on the Antigenicity of Hepatitis B Surface Antigen. Journal of Medical Virology. 60:113-121.
37. Seeger C , Mason WS . (2000). Hepatitis B Virus Biology. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 64: 51-68.
38. Sommer G , Bömmel FV , Will H . (2000). Genotype-Specific Synthesis and Secretion of Spliced Hepatitis B Virus Genomes in Hepatoma Cells. Virology. 271: 371-381.
39. Tayşi BN. (1999). Hepatit B Virüs Yüzey Antijeninin (HBsAg) Saptanmasına Yönelik HBsAg –ELISA Tanı Kiti Yapılması ve Değerlendirilmesi. Gazi Üniversitesi Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Anabilim Dalı.
40. Wang PC , Hui EKW , Chiu JH , Lo SJ . (2001) . Analysis of integrated hepatitis B virus DNA and flanking cellular sequence by inverse polymerase chain reaction . Journal of Virological Methods. 92: 83-90.
41. Weber B , Bayer A , Kirch P , Schlüter V , Schliper D , Melchior W . (1999). Improved Detection of Hepatitis B Virus Surface Antigen by a New Rapid Automated Assay. Journal of Clinical Microbiology. 37:2639-2647.
42. Wu L , He JW , Yao X , Li HM , Wen YM. (1999) . A Novel Hepatitis B Virus Variant S 129 (Gln→Leu): Lack of Correlation Between Antigenicity and Immunogenicity. Journal of Medical Virology . 59:424-430.
43. Xu Z , Bruss V , Yen TSB. (1997) . Formation of Intracellular Particles by Hepatitis B Virus Large Surface Protein. Journal of Virology. 71:5487-5494.

44. Yapar M , Güney Ç , Saraçlı MA , Kılıç A , Kubar A .(2001) . HBsAg Gen Bölgesinin Böcek (*Trichipilusia ni*) Hücre Kültüründe Ekspresyonu. Flora . 6:108-113.
45. Yu MW , Shih JWK , Pettegrew HB , Byars NE , Allison AC , Chan HW . (1990) . Expression of Pre-S2 Region of Hepatitis B Surface Antigen in *Escherchia coli*. Journal of Medical Virology. 30: 7-13.

8.ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi;16.08.1978

Doğum Yeri; Elazığ

Mezun Olduğu Lise; Mehmet Akif Ersoy Lisesi

Üniversiteye Giriş Tarihi; 1996

Bitirdiği Fakülte; Fırat Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, Biyoloji Bölümü

Üniversiteden Mezuniyet Tarihi; 2000

Yüksek Lisansa Başlama Tarihi;2000, Eylül

Yüksek Lisans Programı; Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Mikrobiyoloji