

T. C.
FIRAT ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT B VİRÜSÜ
HBcAg GENİNİN KLONLANMASI
ve ÖKARYOTİK HÜCRELERDE AÇIKLANMASI

T.C. YÜKSEKÖĞRETİM KURULU
DOKÜMANTASYON MERKEZİ

DOKTORA TEZİ

T 107773

107773

Araş. Gör. Yasemin BULUT
Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji Ve Klinik Mikrobiyoloji A. B.D.

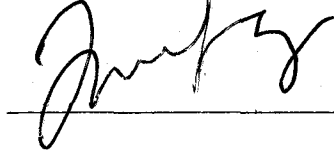
ELAZIĞ- 2001

ONAY SAYFASI

.....5.....

Prof. Dr. Nazir DUMANLI
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü ✓

Bu tez Doktora Tezi standartlarına uygun bulunmuştur.



Prof. Dr. Mustafa YILMAZ
Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji A.B.D. Başkanı

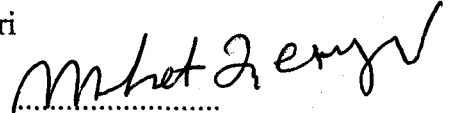
Tez tarafımdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ

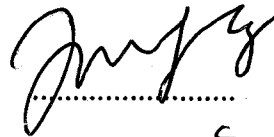
Danışman

Doktora sınavı jüri üyeleri

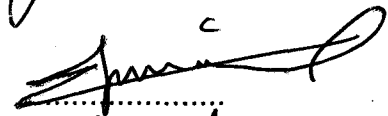
Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ



Prof. Dr. Mustafa YILMAZ



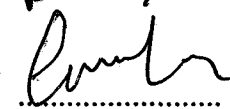
Prof. Dr. Fatih KÖKSAL



Prof. Dr. Ömer METE



Doç. Dr. Zülal AŞÇI-TORAMAN



İTHAF

Bu çalışma, eğitimimde emeği geçenlere ve ülkemin, her Őeyin en güzeline layık, fedakr insanlarına ihtaf edilmiştir.

TEŞEKKÜR

Öncelikle, hocam Prof. Dr. Mehmet Ziya DOYMAZ'a her zaman yararlandığım bilgisinden, Anabilim Dalı hocalarım Prof. Dr. Mustafa YILMAZ, Doç. Dr. Zülal AŐCI ve Yrd. Doç. Dr. Ahmet KİZİRGİL'e konuyu çalışırken sağladıkları imkanlardan, eşim Yrd. Doç. Dr. Hakan BULUT'a her türlü fedakârlığından, değerli elemanımız Biyolog Serhat ÖZDEMİR'e yardımlarından ve Fırat Üniversitesi Araştırma Fonu (FÜNAF)'na sağladığı finansmandan dolayı teşekkür ederim.



İÇİNDEKİLER

	Sayfa
1. ÖZET	1
2. ABSTRACT	2
3. GİRİŞ	4
3.1. Hepatit B Virüsü	5
3.1.1. Virüsün Genel Özellikleri	6
3.2.2. Genom Yapısı	7
3.2.3. Virüs Proteinleri	
3.2.3.1. Yüzey Proteinleri	10
3.2.3.2. Polimeraz Proteini	15
3.2.3.3. X Proteini	16
3.2.3.4. Kor Proteinleri	17
4. GEREÇ ve YÖNTEM	
4.1. Plazmitler	
4.1.1. pUC19 plazmiti	25
4.1.2. pcDNA3 plazmiti	25
4.2. Serumdan HBV DNA'sının izolasyonu	26
4.3. HBcAg gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması	27
4.4. HBcAg geninin jelde saflaştırılması	28
4.5. DNA miktarının ölçülmesi	28
4.6. HBcAg geninin restriksiyon enzimleriyle kesimi	29
4.7. Kompetan <i>E. coli</i> hücrelerinin hazırlanması	29

4.8. pUC 19 plazmitinin <i>E. coli</i> 'ye transformasyonu	30
4.9. Plazmit DNA'sının İzolasyonu	31
4.10. Rekombinant pHbc-1 plazmitinin oluşturulması	32
4.11. Rekombinant pHbc-1 plazmitinin seçimi	32
4.12. Rekombinant pHbc-1 plazmitinin izolasyonu	33
4.13. Rekombinant pcDNA-Hbc plazmitinin oluşturulması	33
4.14. Rekombinant pcDNA-Hbc ile Vero hücrelerinin transfeksiyonu	34
4.15. Transfekte Vero hücrelerinden DNA izolasyonu ve PCR	36
4.16. Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması	37
4.17. Sodyum dodesil sülfat-Poliakrilamid jel elektroforez	37
4.18. Western Immunoblot Deneyi	38
5. BULGULAR	
5.1. HBcAg'nin pUC19'da klonlanması	44
5.2. HBcAg'nin pcDNA3'te klonlanması ve açıklanması	44
6. TARTIŞMA	50
7. KAYNAKLAR	55
8. ÖZGEÇMİŞ	68

ŞEKİLLER LİSTESİ

Sayfa

- Şekil 1.** Hepatit B virüs infekte kişilerin serumundan izole edilen DNA'nın HBcAg primerleri kullanılarak yapılan PCR ile çoğaltılan HBcAg geninin % 2 agaroz jelde görüntülenmesi. 40
- Şekil 2.** Rekombinant plazmit pHbc-1 DNA'sının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi. 41
- Şekil 3.** Rekombinant plazmit pHbc-1 DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı ve HBcAg primerleri ile gerçekleştirilen PCR'da çoğaltılan ürünün % 2'lik agaroz jelde gösterimi. 42
- Şekil 4.** PCR'da çoğaltılan 550 bp'lik gen kısmının *MspI* restriksiyon enzimiyle kesimi. 43
- Şekil 5.** Rekombinant pcDNA-HBc'nin oluşturulması. 44
- Şekil 6.** Rekombinant pcDNA-HBc'da HBcAg geninin varlığının restriksiyon enzimi kesimiyle doğrulanması. 45
- Şekil 7.** Rekombinant pcDNA-HBc plazmiti ile transfeke ve genetisine dirençli Vero hücreleri. 46
- Şekil 8.** Vero-HBc hücrelerinde HBcAg geninin varlığının PCR ile belirlenmesi. 47
- Şekil 9.** Vero-HBc hücre proteinlerinin Western Immunoblot metoduyla çalışılması. 49

KISALTMALAR LİSTESİ

Akr/Bis: Akrilamid/Bisakrilamid

bç: Baz çifti

CTLs: Sitotoksik T lenfositleri

DNA: Deoksiribonükleik asit

DME/F-12: Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12

dH₂O: Distile su

ELISA: Enzime Bağlı İmmunosorbent Deneyi

E. coli: *Escherichia coli*

FCS: Fötal Buzacağı Serumu

HBV: Hepatit B virüsü

HBcAg: Hepatit B virüsü kor antijeni

HBeAg: Hepatit B virüsü e antijeni

HBsAg: Hepatit B virüsü yüzey antijeni

HIV: İnsan immün yetmezlik virüsü

IPTG: Isopropyl β -D thiogalactopyranoside

kb: Kilobaz

kbç: Kilobaz çifti

kDa: Kilodalton

LB: Lurie-Bertani besi yeri

LHBs: Yüzeyin büyük proteini

MHBs: Yüzeyin orta proteini

M: Molarite

MW: Moleküler ağırlık

μ l: Mikrolitre

μ m: Mikrometre

nm: Nanometre

OD: Optik dansite

ORF: Açık okuma bölgesi

PBS: Fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su

PCR: Polimeraz zincir tepkimesi

Poly-HSA: Polimerize edilmiş insan serum albümini

RE: Restriksiyon endonükleaz enzimi

mRNA: Mesajcı ribonükleik asit

SHBs: Yüzeyi küçük proteini

SDS-PAGE: Sodyum Dodesil Sülfat–Poliakrilamid Jel Elektroforez

SV-40: Simianvirüs 40

TE: Tris-EDTA

TEMED: N, N, N', N'-tetrametiletülenamin

Vero: Afrika Yeşil Maymun Böbrek Hücresi

X-Gal: 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside

1. ÖZET

Bu çalışmada, hepatit B virüsünün kor antijeni (HBcAg) geninin *Escherichia coli* (*E. coli*)'de klonlanması ve HBcAg proteinin ökaryotik hücrelerde açıklanması rapor edilmiştir. Çalışmada, öncelikle, HBcAg geni, hepatit B virüsle infekte hasta serumundan izole edilen DNA'dan polimeraz zincir tepkimesiyle (PCR) çoğaltıldı ve pUC19 plazmitine yerleştirildi. Elde edilen rekombinant plazmit (pHBc-1) *E. coli* hücrelerinin transformasyonunda kullanıldı. pHBc-1 plazmiti içindeki HBcAg geninin varlığı PCR ve enzim sindirme deneyleri ile doğrulandı. Daha sonra, rekombinant plazmit klonlarından *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle uzaklaştırılan HBcAg geni, ökaryotik ekspresyon plazmiti olan, pcDNA3 içine yerleştirildi. Oluşturulan rekombinant plazmit, pcDNA-HBc, içindeki HBcAg geninin varlığı yine restriksiyon enzim sindirimi deneyi ile test edildi. Daha sonra, pcDNA-HBc, ökaryotik Vero hücrelerine transfekte edildi ve pcDNA-HBc plazmitini istikrarlı bir şekilde taşıyan hücre hatları, Vero-HBc, genetin içeren kültür vasatında seçildi. Vero-HBc hücrelerinde HBcAg proteinin açıklanması Western Immunoblot deneyi ile test edildi. Immunoblotlamada Vero-HBc hücrelerinde 21 kilodalton (kDa) büyüklüğünde HBcAg proteini belirlendi.

Sonuç olarak, bu çalışmada günümüzün en ciddi sağlık sorunlarından birini oluşturan hepatit B virüsünün kor antijenini şifreleyen gen klonlanarak ökaryotik hücrelerde açıklanmıştır. Bir viral proteini şifreleyen genin izolasyonundan ekspresyonuna kadar olan aşamaları içeren çalışma, bu alanda ülkemizdeki ilklerden birini temsil etmektedir.

2. ABSTRACT

In the present study, cloning of (HBcAg) gene in *Escherichia coli* and expression of the gene in eukaryotic cells are reported. Hepatitis B virus (HBV) core antigen gene was amplified from the sera of HBV infected patients in a polymerase chain reaction (PCR) and placed into pUC19 plasmid. The resulting recombinant plasmid, termed pHBc-1, was used in transformation of *E. coli* cells. The presence of HBcAg in pHBc-1, was confirmed by both PCR and restriction enzyme digestion, which has only single restriction site in HBcAg coding sequence. Later, HBcAg gene was excised from pHBc-1 and inserted into a eukaryotic expression vector pcDNA3. Again, the placement of HBcAg gene in the resulting plasmid pcDNA-HBc was tested with restriction enzyme digestion. For this purpose, *EcoR* I and *Hind*III enzymes which were also utilized in the insertion of the gene into the plasmid in the first place, were used. Afterwards, pcDNA-HBc was transfected into Vero cells. Cells stably transfected with pcDNA-HBc plasmid (Vero-HBc) were selected in geneticin containing culture medium. The presence of HBcAg gene in Vero-HBc cells were again confirmed with PCR assay. Additionally, the expression of HBcAg gene by Vero-HBc cells were tested in Western Immunoblotting assay. The result of immunoblotting assay demonstrated that, Vero-HBc cells indeed express a 21 kDa protein reacting with anti-HBcAg antibody.

In conclusion, in the present study, it was shown that HBcAg gene of hepatitis B virus, one of the most serious health hazards of modern day world, was cloned in *E. coli* and expressed in Vero cells. The expressed HBcAg seems to have authentic antigenic properties as determined by Western Immunoblotting assay.

This study represent one of the early experiments in this country in which a viral gene was isolated, cloned and expressed. It appears that this study will provide valuable reagents for carrying in depth investigations about the function and immunogenicity of one of the most interesting proteins of HBV.



3. GİRİŞ

Hepatit B virüsü (HBV) akut, kronik hepatit ve siroza sebep olan önemli bir viral patojendir. Ayrıca, kronik hepatit B virüs enfeksiyonu ile hepatosellüler karsinomanın insidansı arasındaki güçlü epidemiyolojik ilişki nedeniyle de, HBV en yaygın kanser etkenlerinden birisi olarak bilinmektedir. Yaklaşık 300 milyon kişinin kronik taşıyıcı olduğu ve her yıl binlerce insanın bu virüs sebebiyle hayatını kaybettiği kabul edilmektedir (41).

Hepatit B virüsünün varlığı uzun yıllardır bilinmesine rağmen, virüsün replikasyon stratejisinin anlaşılması, virüs yapı unsurlarının teşhis ve tedavi amaçlı üretilmeleri moleküler biyolojideki, özellikle rekombinant DNA teknolojisindeki, gelişmelerden sonra mümkün olmuştur (35, 50, 60, 90).

Rekombinant DNA teknolojisi mikrobiyolojide mikroorganizmanın belirlenen gen parçasının kolaylıkla çoğaltılmasına, çalışılmasına ve bu gen parçasının açıkladığı proteinin üretilmesine imkan sağlamaktadır. Geleneksel izolasyon ve saflaştırma yöntemleriyle sağlanan proteinlere kıyasla, bu yöntemle proteinlerin üretimleri ucuz ve kolaydır (1, 7, 8, 12, 93). Bu nedenle, test kitlerinin hazırlanmasında ve enfeksiyonlara karşı immünizasyonda kullanılan proteinlerin bu teknolojiyle üretimi yaygınlaşmıştır.

Hepatit B virüsüne karşı koruyucu amaçlı aşılama ve konakçıda şekillenen virüs özgül antikorlarının belirlenmesinde öncelikli hedef protein virüsün yüzey antijenidir (HBsAg). Ancak, enfekte karaciğer hücrelerinden sentez edilen HBcAg proteininin ve bu proteine karşı konakçıda şekillenen immün yanıtının virüsün patogenezi belirleyen önemli determinantlardan biri olduğu son yıllardaki çalışmalarla ortaya konmuştur (6, 87, 92).

Hepatit B virüs kor proteininin T-hücre bağımsız antikor yanıt oluşturan iyi bir immünizan olduğu bilinmekte ve bu proteine karşı şekillenen T hücre yanıtının virüsün karaciğerden temizlenmesindeki etkinliği kabul edilmektedir. Ancak, bazı olgularda HBcAg'ye karşı oluşan T hücre yanıtının immünopatojenezden sorumlu olduğu da ifade edilmektedir (6, 17, 91). Ayrıca, birlikte konakçıya sunulduğu diğer proteinlere karşı immün yanıtı artıran ideal bir taşıyıcı molekül olduğunun belirlenmesi, HBcAg proteininin hem HBV hem de diğer mikroorganizmalara karşı daha etkin aşılarda hazırlanmasına yönelik çalışmalarda kullanımına sebep olmuştur (39, 49, 53, 74, 79, 100).

3.1. Hepatit B Virüsü

Viral hepatitler yüzyılı aşkın bir süredir tanımlanmış ve epidemiyolojik verilere göre uzun yıllar tip A ve B (serum hepatit) olarak sınıflandırılmıştır. Ancak, viral enfeksiyona sebep olan viral ajanlar yıllar sonra belirlenmiştir. Bugün hepatit B virüsü (HBV); karaciğer hastalıklarına sebep olan ve bu nedenle hepatit virüsleri olarak isimlendirilen grubun en önemli üyesi olarak kabul edilmektedir (41).

Hepatit B virüsün yüzey antijeninin (HBsAg) serum hepatitli (tip B hepatit) kişilerde keşfinden bugüne kadar yapılan epidemiyolojik çalışmalar, HBV enfeksiyonunun tüm dünyada yaygın olduğunu göstermiştir. Ayrıca, yapılan bu çalışmalar kronik HBV enfekte bireylerde hepatosellüler karsinoma (HCC) riskinin, enfeksiyonu taşımayan kişilere kıyasla, 200 kat daha yüksek olduğunu ortaya koymuştur.

Gerek virüsün sebep olduğu infeksiyonun yaygınlığı gerekse oluşturduğu hastalık tablosu nedeniyle, HBV Dünya Sağlık Organizasyonu (WHO) tarafından halk sağlığını tehdit eden en önemli infeksiyon ajanlarından birisi olarak kabul edilmektedir (20, 41).

3.1.1. Virüsün Genel Özellikleri

Hepatit B virüsünün HBsAg proteininin belirlenmesinden sonra yapılan çalışmalar virüsün morfolojisinin belirlenmesi ve taksonomisinin yapılmasına yönelmiştir. Ancak, 1980'li yıllara gelinceye kadar virüs hakkında sınırlı bilgiler edinilmiştir. Bunun başlıca nedenleri arasında bu virüs için deneysel hayvan modelinin oluşturulamaması ve virüsün hücre kültürlerinde üretilmemesidir. İlerleyen yıllarda bu virüse morfolojik olarak benzerlik gösteren, ağaçkakan, yer sincabı ve ördeklerde doğal infeksiyona neden olan başka virüsler de belirlenmiştir. Hem bu virüslerle yapılan deneysel çalışmalar hem de 1980'li yıllardan sonra biyoteknoloji ve moleküler biyolojideki hızlı gelişmeler, HBV'nin morfolojisi ve biyolojisinin anlaşılmasına imkan tanımıştır (20, 60).

Hepatit B virüsü *Hepadnaviridae* ailesinin *Orthohepadnavirus* cinsinde yer almaktadır (76). Virüsle infekte insan serumlarının elektronmikroskopik bakışında morfolojileri birbirinden farklı olan üç tip partikül belirlenmiştir. Bu partiküllerden birincisi infektif özelliği olan, küresel şekilli, nükleik asit içeren ve yaklaşık 42 nanometre (nm) çapındaki olgun HBV virionlarıdır (Dane partikülü). İkinci partikül yaklaşık 22 nm çapında, nükleik asit içermeyen ve infektif olmayan küresel yapılardır. Sonuncu partikül ise nükleik asit içermeyen ve yaklaşık 20 nm çapında olan tübüler yapılardır.

Bu son partiküller özellikle HBV replikasyonunun olduğu kişilerin serumlarında belirlenmekte ve HBsAg partikülleri adı verilmektedir (60, 94).

Olgun hepatit B virionu kısmen çift iplikli DNA'yı çevreleyen 27 nm çapında nükleokapsid ile 7 nm kalınlıkta zarftan oluşmuştur. Viral zarfın yapısını, virüsün S gen bölgesi tarafından sentez edilen 3 farklı moleküler ağırlıkta ve yapıdaki polipeptit oluşturmaktadır (60).

Olgun HBV'nin deterjanlarla parçalanması sonucunda ortaya çıkan 27 nm çapındaki özyapıyı (nükleokapsid) ise C geninin ikinci AUG kodonundan başlayarak açıklatılan HBcAg proteini şekillendirmektedir (41, 60, 96).

3.2.2. Genom Yapısı

Hepatit B virüsü, 3200 nükleotit uzunluğunda negatif anlamlı sarmalla 1700-2800 nükleotit uzunluğunda pozitif anlamlı sarmaldan oluşan, kısmen çift sarmallı sirküler bir DNA'ya sahiptir. Virüs replikasyonu aşamasında kısa olan pozitif sarmal virion yapısında bulunan DNA polimeraz enzimiyle uzatılmakta ve böylece yaklaşık 3200 nükleotitten oluşan çift sarmal DNA oluşmaktadır (41, 50, 60).

Hepatit B virüs genomunun diğer pek çok virüse kıyasla daha az sayıda nükleotitten oluşması, virüsün genom diziliminin belirlenmesini kolaylaştırmıştır. Yapılan nükleotit dizilim analizi neticesinde, HBV genomunun negatif anlamlı sarmalın üzerinde en az 4 tane açık okuma bölgesi (open reading frames, ORF) belirlenmiştir (41, 60). Bu ORF'lerde ise virüsün kor (core; C), zarf (surface; S), polimeraz (P) ve X proteinlerinin sentez için dizilimlerin bulunduğu ortaya konmuştur.

Hücrel RNA polimeraz II tarafından virüsün negatif sarmalına komplementer ve büyüklükleri 3.4, 2.4, 2.1 ve 0.7 kilobaz (kb) olan 4 adet işlenmemiş mRNA kopyalanmaktadır. En uzun olan 3.4 kb'lik transkript hem yeni viron DNA'larının üretilmesi için kalıp görevi görmekte hem de HBcAg, HBeAg ve polimeraz proteinlerinin sentezini temin etmektedir. Diğer transkriptlerden 2.4 ve 2.1 kb'lik transkriptler tarafından pre-S1, pre-S2 ve S proteinleri sentez edilmektedir. En kısa transkriptten ise X proteini açıklanmaktadır. (41, 60).

Son yıllarda yapılan çalışmalarda HBV genomu üzerinde belirlenen 4 ORF'ye ilave ORF5 ve ORF6 olarak isimlendirilen başka ORF'ler de belirlenmiştir. Bunlardan ORF5 yine negatif sarmalın üzerinde bulunurken, ORF6 pozitif sarmalın üzerindedir (50).

Hepatit B virüs genomunun en belirgin özelliği üst üste gelen ORF'ye sahip olmasıdır. Bu ise aynı dizilimden birden farklı proteinin açıklanmasına imkan sağlamaktadır. Bu nedenle, HBV genomu aynı nükleotit uzunluğuna sahip olan virüslerle kıyaslandığında daha çok sayıda protein açıklanmaktadır (50, 60).

Hepatit B virüsü genomunda replikasyonda görev alan 3 tane önemli *cis*-acting element bulunmaktadır. Bunlardan ilk ikisi direkt tekrar (DR) elementleridir. Bunlar DR1 ve DR2 olarak isimlendirilmektedir. Direkt tekrar element 1, pre-kor ORF içerisinde bulunmakta ve negatif sarmalın sentezi için başlangıç bölgesini meydana getirmektedir. *Cis*-elementlerden DR2 de pre-core ORF'de bulunmaktadır (60). Bu ise pozitif sarmalın sentezinin başlangıç bölgesidir. Yaklaşık 10-12 nükleotitten oluşan bu bölgeler viral DNA'ların 5' uçlarını bir arada tutarak viral genomun yapısal bütünlüğünü sağlamaktadırlar.

Son *cis*-acting element retrovirüslerin 5'-unique bölgesine benzerliğinden dolayı "U5-like" olarak isimlendirilmekte ve fonksiyonel olarak DR1 ile benzerlik göstermektedir (50).

Hepatit B virüs genomunda bulunan nükleotitlerden bir kısmı ise sinyal elementleri olarak fonksiyon görmektedir (50, 60). Bunlardan ilki 4 adet promotor (pre-S 1, S-, X- ve pre-C promotor) sinyalidir. 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 (Enh 1 ve 2)'lerdir. Bu elementler, promotorlarla birlikte ORF'lerin transkripsiyonlarını düzenlemektedirler. Viral genom yapısında yukardaki elementlere ilave olarak, S geni içerisinde bulunan ve Enh 1'le bağlantılı olarak glukokortikoid hormonu varlığında gen açıklanmasını 4-5 kat artıran farklı bir sinyal elementi (Glikokortikoid cevap elementi; GRE) bulunmaktadır. Başka bir sinyal elementiyse pol-A ekleme sinyalidir. Bu sinyal dizilimi 44 nükleotitten oluşur ve C-ORF içinde yer almaktadır. Hepatit B virüs transkriplerinin tamamı yalnızca tek tip pol-A ekleme sinyali kullanmaktadır ve bu nedenle tüm transkriplerin 3' ucu benzer dizilime sahiptir.

Moleküler düzeyde yapılan çalışmaların ilerlemesi sonucu HBV genomlarındaki farklılıklar tespit edilmiş ve nükleotit benzerliklerine bakılarak, % 90 oranında birbirine benzeyen HBV suşları aynı gruba konmuştur. Bu gruplandırmaya göre, A'dan F'ye kadar değişen 6 farklı genotip ortaya çıkarılmıştır. Ayrıca, HBsAg subtipleri arasında genotip düzeyde farklılığın % 4 olduğu belirlenmiştir (56, 86).

3.2.3. Virüs Proteinleri

3.2.3.1. Yüzey Proteinleri

Hepatit B virüsünün S gen bölgesi tarafından yüzey proteinleri kodlanmaktadır. Bu proteinler hem Dane partiküllerinde hem de 22 nm'lik küresel ve 20 nm'lik tübüler partiküllerde bulunmaktadır. Önceleri S geninin tek bir protein kodladığı düşünülmüştür. Fakat, jel elektroforez tekniğiyle bu genin ağırlıkları birbirinden farklı 6 adet polipeptiti (3 temel proteinin glikozile formlarıyla birlikte) sentezlediği gösterilmiştir. Bir genden farklı proteinlerin sentez edilmesi bu gen üzerindeki farklı translasyon başlangıç kodonundan kaynaklanmaktadır. Üç farklı bölgeden oluşan S geninde 2850-3174. nükleotitler arasında pre-S1 bölgesi bulunmakta ve bu bölge tarafından 108 amino asitten oluşan polipeptit sentez edilmektedir. Yüzey geni içerisinde bulunan ikinci bölge 3174-157. nükleotitlerin oluşturduğu pre-S2 bölgesidir ve 55 amino asitten oluşan polipeptite ait dizilim bulunmaktadır. Yüzey geni içerisinde son bölge ise 157-833. nükleotitler arasındaki dizilim olup, bu bölge tarafından 226 amino asitten oluşan polipeptit açıklanmaktadır. Bu 3 gen bölgesinin başlangıç dizilimleri farklı fakat 3' uçları ortaktır (20, 36, 94).

Translasyonun pre-S1'den başlaması neticesinde 390 amino asitten oluşan ve 40 kDa moleküler ağırlıkta olan S geninin tamamına ait protein sentez edilmektedir. Sentezlenen bu protein yüzeyin büyük proteini olarak (large yüzey proteini; LHBs) isimlendirilmektedir. Bu proteininin glikozile formu 42 kDa olup, en fazla Dane partiküllerinde ver almakta ve virionun hedef hücreye bağlanmasında rolü bulunmaktadır (50).

Bilinen kesin bir reseptör belirlenememiş olmasına karşın 21. ve 47. amino asitlerin hepatositlerin yüzeyine tutunmasında önemli olduğu tespit edilmiştir. Dane partiküllerin oluşmasında ve salınmasında LHBs proteini kesinlikle gereklidir. Ayrıca, semptomatik olmayan HBsAg taşıyıcılarında düşük düzeyde ve devamlı üretilen LHBs proteininin hepatosellüler lezyonun oluşmasına ve hepatosellüler karsinomaya neden olabileceği düşünülmektedir. Large proteinin aminoterminal ucunda glisin amino asitlerine bağlı bir miristik asit bulunduğundan, hücreden tek başına salınamamaktadır (36, 41, 50).

Hepatit B virüsünün S geninin 2. translasyon başlangıç diziliminden başlayarak sentez edilen protein ise virüsün Pre-S2 ve S gen bölgesine ait nükleotitlerce kodlanmaktadır. Sentez edilen bu protein yaklaşık 35 kDa moleküler ağırlıktadır ve 280 amino asitten oluşan yüzeyin orta proteindir (medium yüzey protein; MHBs). Medium yüzey proteinin glikozile formu 36 kDa'dır. Bu proteinin 133-139. amino asitler arasındaki bölgesi gruba özgü epitop taşırken, 137-143. amino asitler arasındaki bölgesi ise tipe özgü epitoplar bulunmaktadır. Bu protein, üretiminin olmadığı durumda HBsAg içerisinde yer almamaktadır. Bundan dolayı pre-S2'nin varlığı viral replikasyonun göstergesi olarak değerlendirilmemektedir. Medium proteini de LHBs proteini gibi enfeksiyonun erken döneminde ortaya çıkmakta ve bunlara karşı oluşan antikorların tespiti iyileşme belirtisi olarak kabul edilmektedir. Bu protein hepatositlere bağlanmada önemlidir. Pre-S2 proteini albümine bağlanmadığı halde gluteraldehitle polimerize edilmiş insan serum albüminine (poly-HSA) bağlanabilmektedir. poly-HSA albüminin normalde insan serumunda bulunmamasına karşın hepatositlerin yüzeyinde bulunmaktadır.

Bu proteinin hepatositlere tutunmasında önemli bir diğer reseptör ise pre-S2 glikandır (5, 36).

Hepatit B virüsünün pre-S bölgelerinden sentez edilen proteinler (Pre-S1 ve pre-S2) hidrofilik amino asitlerden oluşmuşlardır ve lipit zardan dışarı doğru çıkıntı yapmışlardır. Bu nedenle, bu proteinlere karşı oluşan antikor yanıt virüse karşı korunmada oldukça önemlidir ve bunların hedef hücre reseptörlerine bağlanma proteinleri olarak da görev yaptıkları düşünülmektedir (5).

Virüsün S geni üzerindeki 3. translasyon başlangıç dizilimi olan S'den başlayan sentezle birlikte 24 kDa moleküler ağırlıkta, yüzeyin küçük proteini (small yüzey protein; SHBs) oluşmaktadır. Bu proteinin glikozile olmuş formu ise 27 kDa moleküler ağırlıktadır. Proteinin her iki formu özellikle 20 nm'lik viral partiküllerin yapısında lipid membrana gömülü olarak fazla miktarda bulunmaktadır. Bu partiküller infekte plazmada elde edilerek uzun yıllar aşı olarak kullanılmışlardır (36).

Yüzeyin küçük proteinini oluşturan amino asitlerin bazı bölgelerindeki dizilim farklılıklarına göre HBsAg üzerinde en az 5 antijenik determinant bulunmaktadır. Bunlar; a, d/y ve w/r olarak isimlendirilmektedir. Tüm subtiplerde "a" determinantı ortak olup, 124-147. amino asitler arasında kalan hidrofilik bir bölgede yer almaktadır. Bu bölgeye karşı oluşan antikorlar HBV'nin hepatositlere bağlanmasını engellemekte ve tüm subtiplere karşı etkili bir aşının oluşmasını sağlamaktadır. Hepatit B virüsünün S geni üzerinde bulunan bu determinantın yapısında bulunan sistein amino asidinin disülfid bağlarıyla oluşturduğu bir köprü ve 124 ile 147. amino asitleri çevreleyen iki ilmik sayesinde çok iyi bir şekilde korunmaktadır.

Virionun dış yüzeyinde yer alan “a” determinanti doğal infeksiyon veya aşılardan sonra oluşan anti-HBsAg antikorlarının büyük kısmına bağlanabilmektedir (2, 76, 10).

Yüzey gen bölgesi içerisinde yer alan 2. bir determinant ise d/y ve w/r'dir. S proteinin 122. amino asidinde lizin varsa “d”, arjinin varsa “y” determinanti oluşmaktadır. Ayrıca, proteinin 160. amino asidinde arjinin bulunması “r” determinantını lizin bulunması ise “w” determinantını işaret etmektedir. Bu determinantlar arasında “w” antijenik çeşitlilik göstermekte ve tüm “w” determinantlarında lizin bulunmasına karşın 4 farklı “w” subtipi (adw, ard, ayw vw ayr) tespit edilmektedir. Subtiplerle yapılan son çalışmalara göre, toplam 9 adet değişik HBsAg subtipi (ayw1, ayw2, ayw3, ayr, ayr1, adw1, adw2, adw3, adw4) olduğu açıklanmıştır. Ayrıca, “x” ve “g” yeni determinantları bulunmuştur (10, 76).

HBsAg subtipleri arasında biyolojik farklılıklar olmamasına karşın, dünyadaki dağılımları arasında bölgelere göre farklılıklar gösterilmiştir. Bundan dolayı, epidemiyolojik çalışmalarda HBsAg subtiplerinin belirlenmesi infeksiyon kaynağının tespit edilmesinde ve toplumdaki yayılışının takibinde fayda sağlamaktadır (2, 76).

Subtiplere göre HBsAg fenotipleri farklı bir coğrafik dağılım gösterse de farklılıklar HBV infeksiyonunun seyri üzerine her hangi bir etki yapmamaktadır. Bunun nedeni bilinen tüm subtiplerde “a” determinanti ortak olması ve bir subtype karşı oluşan antikor cevabının diğer subtype karşı da koruyuculuğudur. Ancak, mutasyon “a” determinantından meydana gelirse bilinen subtiplere karşı oluşan koruma ortadan kalkmaktadır. Bu determinantta meydana gelen en önemli mutasyon 145. amino asitte glisin arjinine dönüşmesidir.

Bu mutasyon sonucunda ise immün yanıtta kaçan virüsler (escape virus) oluşmaktadır. Yüzey geninde şekillenen diğer mutasyonlar da 137, 142, 144, 146. amino asitlerde meydana gelebilmektedir. Bu mutasyonlarda virüsün antijenik yapısı değişmediğinden ilk zamanlarda önemsenmemiştir. Ancak, daha sonraları, özellikle, karaciğer transplantasyonu yapılan hastalarda bu mutasyonların re-infeksiyona sebep olduğu anlaşılmıştır (36).

Hepatit B virüsünün S proteinine ait mutantlarını taşıyan kişilerde ya tek başına HBV DNA pozitifliği ya da anti-HBsAg pozitifliğiyle HBsAg birlikteliği gibi az rastlanır serolojik sonuçlar çıkmaktadır. Yüzey proteinlerinin mutasyonları, daha az olmakla birlikte, pre-S1 ve pre-S2 bölgelerinde de bir dizilimin silinmesi, yer değiştirmesi veya değişmesi şeklinde ortaya çıkmaktadır. Anti-HBsAg ve HBsAg'nin birlikte pozitif olduğu kronik hepatitli hastalarda pre-S2 bölgesinde 9-22 amino asitler arasındaki amino asitlerin bir kısmının görülmediği ve "a" determinantında 2 amino asitin yer değiştirdiği gösterilmiştir. Ayrıca, Pre-S2 mutasyonlu HBV varyantlarına özellikle fulminant ve kronik hepatitli olgularda daha sık rastlandığı tespit edilmiştir. Şayet, pre-S2 başlangıç kodonunda bir mutasyon olursa sonuçta MHBs proteinini sentezleyemeyen yeni bir defektif HBV varyantı oluşmaktadır (52, 82).

Akut HBV enfeksiyonunda sıklıkla Pre-S1 bölgesi mutantları şekillenebilmektedir. Bu mutasyonun 183. bç'de bir delesyon şekillendirmesi, pre-S1'deki T ve B hücreleri tanıyan epitoplara ortadan kaldırarak ve bu durum virüsün yok edilme ihtimalini sonlandıracaktır (52, 82).

3.2.3.2. Polimeraz Proteini

Hepatit B virüsünün yapısında rastlanan diğer bir protein de polimeraz (P) proteindir. Virüs partiküllerinde HBV polimeraz proteinlerinin elde edilmesindeki başarısızlık nedeniyle yakın zamana kadar bu protein hakkında çok az bilgi edinilmiştir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalar neticesinde HBV partiküllerinde rastlanan 70-90 kDa'lık proteinin 3.4'lik viral transkrip tarafından sentez edildiği ve polimeraz aktivitesine sahip olduğu gösterilmiştir. Ayrıca, bu proteinin retrovirüslerin polimeraz protein geniyle ortak dizilime sahip olduğu ve retrovirüs polimeraz proteiniyle benzer fonksiyonu gerçekleştirdiği belirlenmiştir. Bu proteinin tersine transkripsiyon (reverse transkripsiyon), endonükleaz (RNaseH) ve DNA polimeraz fonksiyonları bulunmaktadır (20, 76).

Hepatit B virüs çoğalmasında, retrovirüslerde olduğu gibi, tersine transkripsiyon mekanizması kullanılmaktadır. Bu mekanizmada 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 amino asitinin valin ya da izolösin amino asitlerinin birine değiştiği görülmüştür. Fansiklovir verilen hastalarda ise YMDD mutasyonundan ziyade revers transkriptaz geninin 508 ve 515. nükleotitlerinde mutasyonu görülmüştür. Ayrıca, immün sistemi baskılanmış hasta serumlarında yüksek titrede bu mutasyona sahip virüsler belirlenmiştir (32).

3.2.3.3. X Proteini

Bu protein 154 amino asitten oluşmuştur ve viral genomun 1376 ile 1838. nükleotitleri arasındaki bölge tarafından kodlanmaktadır. Rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak gerçekleştirilen deneylerle bu proteinin HBV'nin enhancer elementlerinin *trans*-aktivasyonunu sağladığı belirlenmiştir. Ayrıca, X geninde mutasyon ve delesyon çalışmalarında elde edilen verilerin de bu görüşü destekler nitelikte olduğu ifade edilmiştir. Ancak, fonksiyonunu yalnızca hepatositlerde gerçekleştirmesi, bu proteinin hepatosit faktörleriyle birlikte hareket ettiğini akla getirmektedir. Son yıllarda gerçekleştirilen çalışmalarla bu proteinin bazı virüsler (İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü tip 1; HIV-1 ve Simianvirüs 40; SV-40) ile hücre sel faktörler (β -interferon geni) için enhancer elementi görevi gördüğü saptanmıştır. Ayrıca, bu proteinin tümör baskı geni ürününün işlevini bozduğu belirlenmiştir ve bu nedenle X proteininin HCC'nin şekillenmesinde etkin olduğu düşünülmektedir (62).

X proteini HBV genlerini *trans*-aktive ettiğinden ve virüsün kor promotörü ve enhancer II , DR1 ve DR2 elementleri X gen bölgesinin içinde olduğundan, bu bölgede meydana gelen mutasyonlar oldukça önemli görülmektedir (50).

Bu gene ait ORF'de ortaya çıkan herhangi bir nokta mutasyonu veya delesyonu viral gen açıklanması 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 (20).

X bölgesindeki mutasyonlar, HBV'nin replikasyonu sırasında uzun veya kısa zincirin sentezinde önemli olan DR dizilimlerinde delesyonlar şeklinde olabilmektedir.

Ayrıca, mutasyonlar X-ORF'nin 3' ucunda olursa kor promotorunun yapısı bozulmaktadır. Ancak, bu mutanta sahip virüs X promotorunu kullanarak kor proteini sentez edebilmektedir (89).

Delesyonlar X bölgesinin orta kısmından başlayarak polimeraz ORF'nin 3' ucunu içine alacak bölgeye doğru uzarsa polimeraz geninin kısmi delesyonu olmaktadır. Kronik HBV enfeksiyonlu, HCC'li, fulminant hepatitli ve ilerlemiş siroz hastalarında X geni 130. (AAG'nin ATG'ye) ve 131. (GTC'nin ATC'ye) amino asitlerini kodlayan bölgelerinde nokta mutasyonları görülmüştür. Bu iki mutasyon da transkripsiyon için gerekli olan enhancer II ve kor promotor bölgesi içinde yer almaktadır. X geni mutantları anti-HBcAg negatif veya yüksek düzeyde virüs belirlenmiş hastalarda, diyalize girenlerde ve sık kan transfüzyonu yapılanlarda ortaya konmuştur (62, 89).

3.2.3.4. Kor Proteinleri

Hepatit B virüsünün C geni yaklaşık olarak 640 nükleotit uzunluğundadır ve virüsün 1816-2452. nükleotitleri arasında bulunmaktadır. Hepatit B virüsünün C-ORF bölgesinden antijenik ve fiziksel özellikleri birbirinden farklı olan iki adet protein sentez edilmektedir (13, 70, 96). Bu genin pre-C bölgesinde bulunan ilk AUG kodonundan başlayarak virüsün HBeAg proteini sentezlenmektedir (31). Bu yaklaşık olarak 212 amino asit uzunluğunda ve 25 kilodalton (kDa) büyüklüğünde prekürsör bir proteindir. Genomun pre-C bölgesince açıklatılan amino ucundaki 29 amino asitlik sinyal peptidleri sayesinde, bu protein endoplazmik retikuluma gitmektedir ve burada kesime uğramaktadır. Endoplazmik retikulumdaki kesintide, protein sinyal peptitlerinin 19 amino asitini kaybetmektedir.

Sinyal bölgesinden geriye kalan 10 amino asit ise bu proteinin kor partiküllerine dahil olmasını engellemekte ve salgısal protein olmasını sağlamaktadır. Salınan bu protein 15-18 kDa büyüklüktedir. Yeni virionların yapısına katılmayan ve HBV replikasyonu için gerekli olmayan bu proteinin fonksiyonu bugün için bilinmemektedir. Ancak, bu proteinin konakçıdaki immun yanıtın regülasyonunu sağladığına dair veriler elde edilmiştir (13, 33, 77).

Yüksek düzeyde HBsAg taşıyan HBV infekte kişilerin serumlarında bol miktarda HBeAg de bulunduğu belirlenmiştir. Bu nedenle, HBeAg proteini aktif HBV replikasyonunun tespitinde uygun bir marker olarak düşünülmüş ve infeksiyonun seyrinin anlaşılmasında uzun yıllar güvenilir bir parametre olarak kullanılmıştır. Ancak, HBV mutantlarının belirlenmesiyle birlikte klinik seyrin takibinde bu proteinin güvenilirliği azalmıştır (20, 76).

Virüsün HBeAg genin mutantları, HBV infekte kişilerin serumlarında hibridizasyon teknikleriyle fazla miktarda viral DNA'ya rastlanmasına rağmen aynı serumların HBeAg yönünden negatif olduğunun belirlenmesiyle anlaşılmıştır. Mutasyon için 10 hassas bölge belirlenmiş olmasına rağmen, pre-C genindeki en sık mutasyon 1896. nükleotitte meydana gelmektedir. Bu mutasyon neticesinde bölge içerisinde stop kodonu oluşmaktadır. Mutasyonun şekillenmesinden 1896. nükleotitteki guanin yerine adenin gelmesi sorumludur ve bu nokta mutasyonu neticesinde normalde triptofan amino asiti kodonu (TGG) olan 28. kodon stop kodonuna (TAG) dönüşmektedir. Bu mutasyon, HBeAg proteini sentezleme yeteneğinde olmayan varyant virüslerin oluşumuyla karakterizedir. Bu nokta mutasyonu HBcAg başlangıç bölgesini etkilemediğinden, varyant virüsler HBcAg sentezlemeye devam etmektedirler.

Oluşan varyant virüslerin sitotoksik cevaptan kaçışları belirlendiğinde, bu mutasyon virüsün patogeneğinde önemli olarak kabul edilmektedir (36, 43).

Stop kodonu oluşmasından başka, bir HBeAg mutanı da 1899. nükleotitdeki guanin yerine adenin nükleotitinin gelmesidir. Değişim pre-C promotor bölgesinin içinde olması nedeniyle, bu mutasyon hem HBeAg'nin üretimini hem de viral replikasyonu etkileyebilmektedir (10, 43).

Yukarıdaki mutasyonlara ilave olarak, sık şekillenen mutasyonlarından biri de kor promotor bölgesi içindeki 1762-1764. nükleotitlerden oluşan değişimlerdir. Bu mutasyon ile birlikte viral replikasyonun hızlandığı ve buna bağlı olarak da karaciğer tahribatının arttığı kaydedilmiştir. Şiddetli karaciğer tahribatında bu mutant virüse karşı daha güçlü interferon yanıtının da etkili olduğu belirtilmiştir (43, 10).

Hepatit B virüsünün HBeAg geninin mutasyonlarının varlığı semptomatik HBV taşıyıcılarında, kronik hepatit B olgularında, ciddi karaciğer tahribatı olan hastalarda ve fulminant hepatit olgularında belirlenmiştir (10).

Viral C geni tarafından sentezlenen diğer bir protein de aynı transkriptin ikinci AUG kodonundan açıklanmaya başlanan yaklaşık olarak 183 amino asit uzunluğunda ve 22 kDa büyüklükte HBcAg proteindir. Bu protein virüs genomunun 1903-2452. nükleotitleri arasındaki dizilim tarafından sentez edilmektedir (40, 98). Sentez edilen bu proteinin 5' ucunda arjininden zengin 34 amino asitlik bir dizilim bulunmaktadır. Bu dizilim sayesinde, bu protein ile viral DNA güçlü bir bağlantı oluşturmaktadır. Ayrıca, HBeAg proteinden farklı olarak, ön kısmından 29 amino asitlik sinyal peptid bulundurmadığından, bu protein endoplazmik retikuluma gidememekte ve sitoplazmada kalmaktadır (9, 72).

Bundan dolayı, bu protein salgısal olmayan partikül yapılarını oluşturmakta, kanda serbest halde belirlenmemekte ve yalnızca virionda içsel bir yapı unsuru olarak bulunmaktadır (72, 96). Bu proteinin kor partikül yapısını oluşturması, kendine ait bir birleşme kapasitesinden kaynaklanmaktadır (19, 34, 83).

İnfekte karaciğer hücrelerinden saflaştırılan HBcAg partiküllerinin ve HBV vironundaki korlarının protein kinaz ve proteaz aktivitesine sahip oldukları tespit edilmiştir (64).

Aynı ORF bölgesinden açıklanmaları ve ortak amino asit dizilimlerine sahip olmalarına rağmen antijenik olarak HBeAg ve HBcAg'nin farklılıklar göstermesinin önemli iki nedeni bulunmaktadır (57, 70). İlki, kanda serbest halde bulunan HBeAg'deki HBcAg spesifik polipeptitlerin serum albümin ve α -antitripsin immunoglobulinleri tarafından örtülmesidir. Diğer sebep ise, HBcAg proteinin kor partiküllerini oluştururken şekillendirdiği protein yapısı nedeniyle, bu protein üzerindeki HBeAg'ye özgül antijenik determinantların maskelenmesidir. Bu iki nedenle *in vivo* ve *in vitro* ortamlarda, iki protein arasında çapraz reaksiyon şekillenmemektedir (57, 98).

Hepatit B virüsü kor proteininin en belirgin özelliklerinden birisi immünojenik bir protein olmasıdır (49). Bakteri hücrelerinden üretilen veya infekte karaciğer hücrelerinde saflaştırılan HBcAg proteinleriyle subünit aşılama neticesinde şempanzelerin HBV enfeksiyonlarından korundukları belirlenmiştir. İnternal bir antijen olması nedeniyle bu korunmanın HBcAg'ye özgül antikorlardan değil, oluşan güçlü hücrel immün yanıtta kaynaklandığı belirlenmiştir (15, 27).

Benzer çalışmalar sonucunda, HBcAg proteininin gerek T hücreye bağımlı gerekse T hücreden bağımsız olarak humoral immün yanıt şekillendirebilen iyi bir immünojen olduğu anlaşılmıştır (6, 15, 17, 69). Bu nedenle, HBV infekte kişilerde HBcAg'ye özgül sıvısal ve hücreyel etkin bir immün yanıt gelişmektedir. Bu proteine karşı şekillenen özellikle T hücre yanıtının HBV infekte bireylerde infekte hücrelerin temizlenmesinde önemli olduğu belirlenmiştir (47). Ayrıca, HBcAg özgül T hücre yanıtının HBsAg özgül immün yanıtı güçlendirdiği ve bu nedenle HBcAg immün yanıtının özellikle S antijenine karşı antikor sentezinin gelişmediği bireylerde oldukça önemli olduğu belirlenmiştir. Ancak, HBcAg T hücre yanıtın infeksiyonlardaki immünopatogenezin de sorumlusu olduğuyula ilgili bulgulara rastlanmaktadır (15, 17, 48).

Hepatit B virüsün Pre-C bölgesindeki mutasyonlarının belirlenmesinden sonra devam eden çalışmalarla, benzer mutasyonlar C bölgesinde de belirlenmiştir. Kor bölgesinde meydana gelen mutasyonların büyük kısmı T ve B hücre epitoplarını kodlayan bölgelerde meydana geldiği gösterilmiş ve bunların HBV infeksiyonunun seyrine etkidiği belirlenmiştir. Bunlardan en önemlisi sitotoksik T lenfosit (CTL) epitopunu oluşturan 18-27. amino asitler arasında kalan bölgeye ait mutasyonlardır. Bu mutasyon neticesinde CD8⁺ CTL'lerden kaçan mutant virüsler oluşmaktadır. Benzer etkili bir diğer mutasyon da C bölgesinde yardımcı T hücre epitopunu kodlayan nükleotide meydana gelmektedir. Bu mutasyon CD4⁺ T hücre cevabından kaçan virüslerin üretilmesine sebep olmaktadır. En çok Akdeniz ülkelerinde görülmesi nedeniyle, bu mutasyonun konağa ait faktörlere bağılı olarak şekillendiği düşünülmektedir.

Kor gen bölgesi mutasyonları pre-C mutasyonlarıyla birlikte şekillenebileceği gibi ayrı olarak da oluşabilmektedir. Özellikle kor promotorunda meydana gelen mutasyonlar yalnızca HBcAg proteinini değil, kor, pre-kor ve polimeraz mRNA'larının ve bunların açıkladığı proteinlerin miktarını etkilemesi nedeniyle klinik açıdan önemli kabul edilmektedir.

Bugün HBcAg ile ilgili bilinenlerin pek çoğu, bu proteine ait gen kısmının klonlanması ve açıklanması çalışmaları neticesinde ortaya konmuştur. Hepatiti B virüsünün kor geninin klonlanması ve açıklanması ilk olarak Pasek ve ark. tarafından gerçekleştirilmiştir (59). İlk çalışmada, gen kaynağı olarak pürifiye HBV DNA'ları kullanılmıştır. Restriksiyon enzimlerle kesilen viral DNA'ları bulunduran rekombinant plazmitlerin transforme edildiği *E. coli* hücrelerinde HBcAg ve HBsAg geninin klonlandığı ve açıklanıldığı bildirilmiştir. Aynı çalışmada, iki genin nükleotid dizilimi belirlenmiş ve HBcAg proteininin DNA'ya bağlanma özelliği gösterilmiştir. İlk olarak *E. coli*'den klonlanan ve açıklanan HBcAg geni, bu çalışmadan kısa bir süre sonra, insan hücre kültürlerinde de açıklanmıştır. Hirschman ve ark. tarafında gerçekleştirilen bu çalışmada da gen kaynağı olarak pürifiye HBV DNA'sı kullanılmıştır (29). Viral DNA *EcoRI* enzimiyle kesildikten sonra pBR322 plazmidi içerisine yerleştirilmiş ve *E. coli*'de 3200 bp uzunluğunda HBV DNA'sı klonlanmıştır. Elde edilen rekombinant plazmitlerin transfekte edildiği HeLa hücre kültürlerinde, HBsAg ile HBcAg proteinlerine ilave olarak, 42 ve 20 nm çapındaki viral partiküllerin de üretildiği gösterilmiştir (29). Rekombinant DNA teknolojisindeki gelişmelere paralel olarak, ilerleyen yıllarda, HBcAg klonlanması ve açıklanması çalışmalarında daha etkin plazmitlerin kullanımı bildirilmiştir (80).

Ayrıca, HBcAg geni taşıyan modifiye rekombinant plazmitlerle transfekte edilen insan hücre kültürlerinde HBcAg geninin açıklanmasının düzenlenmesi çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Bu çalışma, HBV enfeksiyonunda hepatit ve karaciğer kanserinin gelişmesinin anlaşılmasında model oluşturmuştur (103). Hepatit B virüsünün kor geninin mayalarda açıklanması neticesinde, bu gen bölgesi içerisinde iki farklı translasyon başlangıç kodunu bulduğu ve bunun neticesinde değişik moleküler ağırlığa sahip iki proteinin sentez edildiği gösterilmiştir. Sentez edilen 183 amino asitlik proteinin virüsün kor yapısının oluşumunda sorumlu olduğu bildirilmiştir (51). Hepatit B virüsünün kor proteinlerine yönelik benzer bir çalışmada, pre-C gen bölgesinde sentez edilen amino asitlerin hidrofobik özellikte olduğu ve bunun ise salgısal bir protein oluşumuna sebep olduğu anlaşılmıştır (58).

İlk yıllarda HBcAg geni ve proteininin anlaşılmasına yönelik elde edilen rekombinant DNA parçaları, HBcAg proteininin etkin aşılarda oluşturulmasında değerli bir taşıyıcı molekül olduğunun belirlenmesinden sonra, aşı geliştirme çalışmalarında kullanılmaya başlanmıştır. Öncü çalışmalar pek çok mikroorganizmaya karşı etkin subünit aşılarda geliştirilmesi amacıyla gerçekleştirilmiştir. Bu amaçla, HBcAg geni ve buna gen füzyonu yöntemiyle eklenen diğer genin birlikte açıklanacağı hibrid proteinlerin ideal subünit aşılarda oldukları belirlenmiştir (6). Çalışmalarda, HBcAg proteini ile birlikte açıklanılan insan immün yetmezlik virüsünün (HIV) zarf proteinine (80), Food and Mouth Disease (Şap hastalığı) virüsünün epitoplarına (17) karşı güçlü immün yanıtlar gösterilmiştir.

Rekombinant DNA'ların injekte edildiği farelerde açıklatılan proteinlere karşı immün yanıtın gösterildiği ilk çalışmanın yayınlanması, pek çok mikroorganizmaya karşı rekombinant DNA aşı geliştirme çalışmalarının başlamasına öncülük etmiştir. Hepatit B virüsüne yönelik bir çok benzer çalışmalarda da HBcAg proteini yalnız olarak ya da HBsAg proteiniyle birlikte kullanılmıştır (66). Ayrıca, rekombinant DNA'larla HBcAg proteini HBV'den farklı mikroorganizmaların proteinleriyle birlikte de açıklatılmıştır (42).

Bu çalışmada, öncelikle, HBV'nin HBcAg gen bölgesini içeren rekombinant plazmitin oluşturulması ve bu plazmitin *E. coli*'de klonlanması, daha sonra, klonlanan rekombinant DNA'dan izole edilen HBcAg geninin ökaryotik ekspresyon vektörüne yerleştirilmesi ve bu vektörle transfekte hücrelerde HBcAg proteininin açıklatılması amaçlanmıştır. Böylelikle, önemli bir insan patojeni olan hepatiti B virüsünün önemli bir geni moleküler düzeyde analiz edilebilecektir. Bu genin açıklatılmasıyla elde edilebilecek HBcAg protein diagnostik amaçlardan, HBV'ye karşı oluşan immün yanıtın diseksiyonuna kadar pek çok konuda kullanılabilir. Ayrıca yukarıda da belirtildiği gibi alternatif aşı yaklaşımlarında HBcAg'nin ökaryotik açıklama vektörüne yerleştirilmiş versiyonlarının kullanımı ihtimalleri araştırılabilir.

4. GEREÇ ve YÖNTEM

4.1. Plazmitler

4.1.1. *pUC19* plazmiti

Bu plazmit yabancı genlerin *E. coli* hücrelerinde klonlanması için sıklıkla kullanılan 2686 baz çifti uzunluğunda taşıyıcı DNA olup pBR322 plazmitinden derive edilmiştir. Plazmitin yapısında ampisiline dayanıklılık geni yanı sıra prokaryotik sistemde replikasyonu için origin ve transkripsiyonu için promotor bölgeleri bulunmaktadır. Plazmitin içerdiği diğer önemli bölge de *E. coli*'in Lac Z genidir (Lac Z'). Lac Z'genin bir parçası plazmitin origin bölgesiyle yabancı genin yerleştirildiği bölgedir. Bu nedenle, yabancı genin bu bölgeye yerleşmesi bu genin aktivitesinin kaybolmasına ve rekombinant plazmiti içeren *E. coli* hücrelerinin antibiyotiğe ilave fenotipik seçimine imkan tanımaktadır.

4.1.2. *pcDNA3* plazmiti

Ökaryotik hücrelerde doğrudan açıklanan ve transfekte hücrelerde stabil olarak kalan, 5.4 kilobaz çifti (kbç) uzunluğunda bir vektördür (Invitrogen Corporation, Madison, WI, USA). Bu plazmit, pRc/CMV plazmitinden derive edilmiştir. Bu plazmitin yapısında bulunan sitomegalovirüs (CMV) promotoru plazmite yerleştirilen yabancı genin memeli hücrelerinde yüksek oranda sentezini temin etmektedir. Yine plazmitin yapısındaki SV40 origin bölgesi, transfekte edilen hücrelerin çekirdeğinde episomal olarak doğrudan replikasyonunu sağlamaktadır. Bu vektördeki neomisine dayanıklılık geni neomisin, kanamisin ve genetisin içeren ortamlarda plazmitle transfekte memeli hücrelerin seçilmesinde kullanılmaktadır.

pCDNA3 sıklıkla ökaryotik ekspresyon vektörü olarak kullanılmakta ve bu özelliğiyle bilinmektedir. Ancak, plazmitin yapısında ampisiline dayanıklılık geni, ColE1 orijini, T7 ve Sp6 promotörü bulunmakta ve bu nedenle de plazmit *E. coli*'de çoğalmakta ve açıklanmaktadır.

4.2. Serumdan HBV DNA'sının izolasyonu

Bu çalışmada, başlangıç materyali olarak Fırat Üniversitesi Araştırma-Uygulama Hastanesine başvuran, ELISA ve rutin PCR taramaları sonucunda HBV enfekte olduğu belirlenen bireylerin serumundan özütlenen HBV DNA'sı kullanıldı.

Bu amaçla; 1.5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine 100 µl HBV hasta serumu ve 500 µl K-tamponu (20 mM Tris pH 8.0, 150 mM NaCl, 10 mM EDTA, %0,2 SDS ve 10 mg/ml pronase) ilave edildi (4). Tüpler 37 °C'de 2 saat bekletildi. Bu süre sonunda tüplerin içindeki karışıma, eşit miktarda fenol-kloroform (fenol-kloroform-isoamilalkol 25:24:1; Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) eklendi. Tüpler 30 sn. karıştırıcıda tutuldu. Tüplerin 12.000 rpm'de 15 dak. santrifüjünden sonra, üst sıvı yeni bir tüpe aktarıldı. Üstüne 1/10 volümde 3 M sodyum-asetat pH 5.4, 2.5 volüm mutlak etanol eklendi ve karıştırılma işlemi tekrarlandı. Karışım - 20 °C'de 1 gece bekletildi. Santrifüjden sonra, dip kısmına çöken DNA peletinin üzerine % 70 soğuk etanol ilave edildi. Santrifüj tekrarlandı ve üst sıvı dikkatlice uzaklaştırıldı. Tüpün dibindeki pelet DNA oda ısısında kurutuldu. Elde edilen DNA 50 µl steril dH₂O ile sulandırıldı ve PCR'da çoğaltılma işlemine kadar -20 °C'ye saklandı.

4.3. HBcAg gen bölgesinin PCR ile çoğaltılması

Oligonükleotit primerler, daha önce yayınlanmış çalışmanın verileri kullanılarak (30), HBcAg gen kısmının başlangıç-bitiş nükleotitlerine *EcoRI* ve *HindIII* enzim tanıma bölgeleri ile memeli hücrelerde genin translasyon etkinliğini artırmak için primer 1 (P1)'in 5' ucuna ATG başlangıç kodonundan önce Kozak dizilimi (*ACC*) eklenmesiyle oluşturuldu (38).

İzole edilen HBV DNA'nın 10 µl'si ile 40 µl PCR karışımı (50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8.3 ve 1,5 mM MgCl₂ içinde 2 U *Taq* DNA polimeraz, *HindIII* tanıma bölgesini içeren 20 pmol P1 5'-GGA AGC TTA CCA TGG ACA TTG ACC CT-3' ve *EcoRI* tanıma bölgesini bulunduran 20 pmol P2- 5'-GGG AAT TCC TAA CAT TGG GAT TC-3' ve 200 µM dNTP) aynı tüpte reaksiyona sokuldu (3). HBcAg geni, 95 °C'de 1,5 dak.'lık ön ısıtmadan sonra, 95 °C'de 30 sn, 46 °C'de 30 sn ve 72 °C'de 30 sn'lik 32 döngüden oluşan PCR işlemi ile çoğaltıldı. Çoğaltılan PCR ürününü görüntülemek için 50 ml Tris-asetat / EDTA elektroforez tamponu (TAE; 0,04 M Tris-asetat, 0,001 M EDTA) içinde 1 gr agaroz (Promega Co. Madison, WI, USA) katılarak kaynatıldı (67). Yaklaşık 60 °C'ye soğutulduktan sonra eriyiğe 0,5 µg/ml oranında etidyum bromid ilave edilerek agaroz jel donduruldu ve örnekler jele 6X yükleme tamponu (% 0,25 bromfenol mavisi, % 0,25 ksilen kayanol F F ve % 30 gliserol) kullanılarak yüklendi. Daha sonra, 150 V doğru akımda, 30 dak. elektroforez işlemi gerçekleştirildi. Agaroz jele UV ışık kaynağında bakılarak beklenen ağırlıktaki HBcAg gen parçası belirlendi.

4.4. HBcAg geninin jelde saflaştırılması

PCR ile çoğaltılan HBcAg geni % 0.5 agaroz jelden ticari pürifikasyon kitiyle (Wizard PCR Preps DNA Purification System, Promega Co. Madison, WI, USA) saflaştırıldı. Kısaca, jelden keskin bir bistürü yardımıyla uzaklaştırılan DNA parçası 1,5 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Üzerine 1 ml resin ilave edilip 65 °C'deki su banyosuna taşındı ve 1 dak. beklendi. Bu süre sonunda jel ve resin karışımı oda ısısına alındı ve 10 dak. bu ısıda tutuldu. Tüpteki içerik enjektöre çekildi ve enjektörün ucu kolona takıldı. Enjektör pistonu itilerek içeriğin kolondan geçmesi ve resinle beraber bağlı DNA'nın tutulması sağlandı. Kolona 2 ml isopropanol ilave edilip, piston itilerek resin-DNA yıkandı. Kolona 200 µl dH₂O eklendi. Kolon mikrosantrifüj tüpüne yerleştirildi ve 7000 rpm'de 1 dak. santrifüj edildi. Mikrosantrifüj tüpe toplanan DNA 50 µl steril dH₂O ile sulandırıldı. Bu süspansiyondaki DNA miktarı spektrofotometrede (Jasco V-530, Japonya) ölçüldü ve DNA -20 °C'ye kaldırıldı.

4.5. DNA miktarının ölçülmesi

Steril dH₂O'da sulandırılan DNA miktarı spektrofotometrede 260 nm dalga boylarında ölçüldü. Bunun için, 10 µl alınan örnekler dH₂O ile 500 µl'ye tamamlandı ve spektrofotometrede Optik Dansite (OD)₂₆₀: 1 değeri çift sarmal DNA için 50 µg/ml miktarına eş tutularak numunedeki DNA miktarı belirlendi (67).

4.6. HBcAg geninin restriksiyon enzimleriyle kesimi

Jelde saflaştırılan ve ölçümü yapılan HBcAg geni *EcoRI-HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesildi. Enzim kesimi için steril mikrosantrifüj tüpüne 79 µl DNA solüsyonu, 10 µl 10X restriksiyon enzim solüsyonu (25 mM tris-asetat pH 7.8, 100 mM potasyum asetat, 10 mM magmezyum asetat ve 1 mM dithiothreitol) ve 10 Unite/µl konsantrasyondaki *EcoRI* (Promega Co. Madison, WI, USA) ve *HindIII* (Promega Co. Madison, WI, USA) enzimlerinin her birinden 5 µl ile 1 µl bovine serum albümin (10 mg/ml konsantrasyondaki 100X BSA) ilave edildi. Kesim için, karışım 37 °C'de 1 gece bekletildi. Enzimle kesilmiş DNA, ligasyon işlemine kadar – 20 °C'de saklandı (67).

4.7. Kompetan *E. coli* hücrelerinin hazırlanması

Bu çalışmada kompetan hücre olarak *E. coli* DH5α suşu kullanıldı. Bu hücreler öncelikle Lurie-Bertani (LB) agar pleytine (1 lt dH₂O'da 10 gr Bakto-tryptone, 5 gr Bacto-yeast extract, 10 gr NaCl ve 5 gr agar eritildi ve pH'sını 7.4'e ayarlamak için 5 M NaOH'den 200 µl ilave edildi. Besi yeri otoklavda steril edilip, pleytlere döküldü) ekildi. Pleyt 37 °C'de 16-18 saat bekletildi. Bu süre sonunda üreyen ve yaklaşık 1 mm çapında olan bir koloniden özeyle hücreler alındı. Hücreler 5 ml LB sıvı besi yerine (1 lt dH₂O'da 10 gr Bakto-tryptone, 5 gr Bacto-yeast extract, 10 gr NaCl eritildi, otoklavda steril edildi ve kullanılıncaya kadar + 4 °C'de saklandı) ekildi. Bu işlemden iki saat sonra, ekim yapılan bu besi yeri önceden 37 °C'de ısıtılmış 100 ml'lik LB sıvı besi yerine aktarıldı. Üç saat sonra, besi yerinde hücrelerin üreme miktarlarını tespit etmek için 20 dak.'da bir spektrofotometrede OD₆₀₀'deki absorbans değeri belirlendi.

Absorbans değeri 0,6 olunca, besi yeri içinde üremiş olan bakteriler 15 ml'lik soğuk santrifüj tüplerine aktarıldı ve 4 °C'de 3000 rpm'de 15 dak. santrifüj edildi. Santrifüj sonunda üst sıvı döküldü ve dipte kalan pelet hücre 33 ml steril RF 1 çözeltisi (100 mM rubidyum klorid, 50 mM mangan klorit, 30 mM potasyum asetat, 30 mM kalsiyum klorid ve % 15 gliserol) içinde resüspanse edildi. Hücreler 20 dak. buz üstünde tutuldu. Bu süre sonunda, bakteri hücreleri + 4 °C'de 3.000 rpm'de, 15 dak. santrifüjle çöktürüldü. Üst sıvı döküldü ve hücreler 5 ml RF 2 çözeltisi (10 mM MOPS, 10 mm RbCl, % 75 CaCl₂·2H₂O ve % 15 gliserol) içinde resüspanse edildi. Hücreler 15 dak. buz üzerinde bekletildi. Daha sonra, 1,5 ml'lik steril mikrosantrifüj tüplerine 200 µl olarak dağıtılarak hazırlanan kompetan *E. coli* hücreleri – 80 °C'de mutlak etanolde donduruldu ve transformasyonda kullanılıncaya kadar – 80 °C'de saklandı (67).

4.8. pUC 19 plazmitinin *E. coli*'ye transformasyonu

Kompetan *E. coli* hücrelere 5 µg/ml konsantrasyondaki pUC19 plazmitinden 10 µl eklendi. Transformasyon için tüpler 30 dak. buz üzerinde bırakıldı. Bu süreyi takiben, hücreler önce 90 saniye 42 °C'de ve sonra 2 dak. buz kabında bekletildi. Daha sonra, 800 µl LB sıvı besi yeri eklendi ve 37 °C'de 1 saat karıştırıcı üzerinde tutuldu. Bu sürenin sonunda hücreler 60 µg/ml ampisilin içeren LB katı besi yerine ekildi ve 37 °C'de 1 gece inkube edildi (67). Hücrelerde çoğalan pUC19 plazmit DNA'sı izole edildi.

4.9. Plazmit DNA'sının İzolasyonu

Ampisilin içeren LB katı besi yerinde *E. coli*'nin DH5- α suşuna transforme edilen pUC19 plazmit DNA'sını izole etmek için, bu pleytden alınan bir koloni 30 ml LB sıvı besi yerine ekildi. Besi yeri, OD₆₀₀'deki absorbans değeri 0,6 oluncaya kadar, karıştırıcı üzerinde (300 siklus/dak.) 37 °C'de tutuldu. Bu absorbans değerine ulaştıktan sonra, 30 ml ampisilinli sıvı besi yerinde üreyen bakteriler 37 °C'deki 500 ml'lik ampisilin içeren LB sıvı besi yerine aktarıldı. Besi yeri karıştırıcı üzerinde 37 °C'de OD₆₀₀'deki absorbans değeri 0,4 oluncaya kadar bekletildi. Bu değer elde edilince, plazmit DNA'sının alkali liziz yöntemiyle izole edilmesine geçildi (67). Bunun için; LB ampisilin besi yerinde çoğaltılan pUC19 transforme bakteri hücreleri 15 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı ve tüpler 3.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Üst sıvı döküldükten sonra hücrelerin üzerine 1 ml STE çözeltisi (0,1 M NaCl, 10 mM Tris.Cl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0) eklenerek, hücreler resüspanse edildi. Karışım mikrosantrifüj tüplerine aktarılıp, 12.000 rpm'de 5 dak. santrifüj edildi. Üst sıvı döküldü ve hücrelerin üzerine 100 μ l soğutulmuş Solüsyon I (dH₂O'da 50 mM glukoz, 25 mM Tris-Cl pH 8.0 ve 10 mM EDTA pH 8.0 içeren ve otoklavda steril edilen eriyik) ekleyip, hızlı bir şekilde süspanse edildi. Süspanسیون buz üstünde 5 dak. bekletildi. Daha sonra tüplere 200 μ l taze hazırlanan soğuk Solüsyon II (dH₂O'da 0.2 N NaOH ile % 1 sodyum dodesil sülfat içeren eriyik) eklendi. Hiç beklemeden, tüplere son olarak 150 μ l Solüsyon III (dH₂O'da 3 M potasyum asetat ve % 10 glasiyel asetik asit içeren eriyik) bırakıldı ve karıştırma işlemi tekrarlandı. Tüp buz üzerinde 5 dak. beklendi. Santrifüj işlemi tekralandı. Üst sıvı temiz bir tüpe aktarıldıktan sonra, üzerine 5 μ l DNAase/free pankreatik RNAase (10 μ g/ml konsantrasyona sahip stok solüsyondan) ilave edilip, 37 °C'de 1 saat beklendi.

Bu sürenin sonunda, plazmit DNA'sı fenol-kloroform ve etanol kullanılarak izole edildi. Elde edilen plazmit DNA'lar 200 µl steril dH₂O'da sulandırıldı. Plazmit DNA'sının miktarı spektrofotometrede ölçüldü. Ölçümden sonra, plazmit DNA'sı *EcoRI* ve *HindIII* restriksiyon enzimleriyle kesildi, agaroz jelde yaklaşık 2630 bp uzunluğundaki DNA parçası pürifiye edildi ve DNA -20 °C'de saklandı.

4.10. Rekombinant pHbc-1 plazmitinin oluşturulması

Aynı enzimlerle kesilen 5 µl HBcAg (0,1 µg) geni (insert) ile 5 µl pürifiye plazmit DNA (0,1 µg)'sı (vektör) mikrosantrifüj tüpünde birleştirildi. Vektör ve insert karışımı 45 °C'ye taşındı ve bu ısıda 5 dak. bekletildi. Üzerine 2 µl 10X bakteriofaj T4 DNA ligaz tamponu (200 mM Tris.Cl pH 7.6, 50 mM MgCl₂, 50 mM dithiotreitol ve 500 µg/ml sığır serum albümini, Promega Corporation, Madison, WI, USA), 1 µl bakteriofaj T4 DNA ligaz (3 Unit/µl) (Promega Corporation, Madison, WI, USA) enzimi, 1 µl 5 mM ATP ve 6 µl nükleaz free su eklendi. Ligasyon için 16 °C'de 12 saat beklendi.

4.11. Rekombinant pHbc-1 plazmitinin seçimi

Ligasyon ürünleri *E. coli* DH5α hücrelerine daha önce belirtilen metotla transforme edildi. Transforme hücrelerin seleksiyonu, 60 µg/ml ampisilinli LB agar besi yerinde gerçekleştirildi (67).

Rekombinant plazmiti içeren hücrelerin doğrudan seçimi Isopropyl β-D thiogalactopyranoside (IPTG) ve 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β-D-galactopyranoside (X-gal) içeren agar besi yerinde gerçekleştirildi.

Bu amaçla, önce 40 µl X-gal solüsyonu (20 mg/ml konsantrasyondaki solüsyondan, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) ve daha sonra 4 µl IPTG solüsyonu (200 mg/ml konsantrasyondaki solüsyondan, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) ampisilinli katı besi yerine yayıldı ve 37 °C'de 15 dak. beklendi. Besi yerine 100 µl transformasyondan alınan *E. coli* hücreleri ekildi. Pleyt 37 °C'de 16 saat bekletildi ve bu süre sonunda görülen beyaz koloniler rekombinant pHbc-1 plazmit DNA'sının izolasyonunda kullanıldı.

4.12. Rekombinant pHbc-1 plazmitinin izolasyonu

Yukarıda elde edilen beyaz koloniler alınarak, her biri ampisilin içeren 10 ml LB sıvı besi yerine ekildi. Üreyen hücrelerden plazmit DNA'sı alkali liziz metodu ile izole edildi. Bu DNA'nın *EcoRI* ve *HindIII* kısıtlayıcı enzim analizleri yapıldı ve % 1,5'lik agaroz jelde görüntülendi. Ayrıca, elde edilen plazmit pHbc-1 DNA'sının HBcAg genine sahip olduğu, bu gene spesifik primerlerle yapılan PCR ve PCR ürününün *MspI* restriksiyon enzim kesim analiziyle de doğrulandı.

4.13. Rekombinant pcDNA-HBc plazmitinin oluşturulması

Rekombinant pcDNA-HBc plazmitinin oluşturulması aşağıda tarif edilmiştir. Kısaca; 550 bç HBcAg geni rekombinant pHbc-1 plazmitinden *EcoRI-HindIII* enzimlerle kesildi. Bu gen kısmı % 1,5'lük agaroz jelden pürifiye edildi. Ökaryotik ekspresyon vektörü olarak seçilen pcDNA3 plazmiti *E. coli* hücrelerinde çoğaltıldı ve agaroz jelde izole edildi (67). Yukarıdaki enzimlerle pcDNA3 DNA'sı kesildi ve yaklaşık 5350 bç uzunluğundaki kesim ürünü agaroz jelde pürifiye edildi.

Pürifiye edilen pcDNA3 DNA'sının multiple klonlama bölgesine HBcAg geni faj T4 ligaz enzimi kullanılarak yerleştirildi. Ligasyon ürünleri *E. coli*'nin DH5α hücrelerine transforme edildi. Transforme hücreler ampisilin içeren LB agar besi yerinde seçildi. Seçilen klonlardan HBcAg geninin varlığı restriksiyon enzim kesim analizi ve PCR ile doğrulandı. Hepatiti B virüsünün HBcAg genini içeren klonlardan elde edilen rekombinant plazmit, pcDNA-HBc olarak isimlendirildi.

4.14. Rekombinant pcDNA-HBc ile Vero hücrelerinin transfeksiyonu

Bu çalışmada transfeksiyon amacıyla Afrika Yeşil Maymun Hücreleri (Vero) kullanıldı. Hücreler 25 cm²'lik hücre üretme kablalarında, % 10 fetal buzağı serumu (FCS), 100 µg/ml streptomisin ve 100 IU/ml penisilin içeren Dulbecco's Modified Eagle's Medium Nutrient Mixture F-12 (DME/F-12, Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) hücre üretme vasatı içinde üretildi (21).

Rekombinant pcDNA-HBc ile Vero hücrelerinin transfeksiyonu kalsiyum fosfat (CaPO₄) çöktürme yöntemine göre yapıldı (67). Kısaca; 0,1X TE (10 mM Tris.Cl pH 8.0 ve 0,1 M EDTA pH 8.0) içerisinde 40 µg/ml rekombinant pcDNA-HBc DNA'sı sulandırıldı. Bu çözeltiden steril mikrosantrifüj tüpüne 20 µl bırakıldı ve bunun üzerine 250 µl 2X HBS (100 ml toplam hacimde 280 mM NaCl, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄.2H₂O, 12 mM dekstroz ve 50 mM HEPES içeren eriyik hazırlandı. 0,5 N NaOH ile eriyiğin pH'sı 7'ye ayarlandı. Bu eriyik 0,22 µm'lik membran filtrelerde süzülerek steril edildi ve 5 ml'lik miktarlarda - 20 °C'ye kaldırıldı) ilave edildi. Üzerine yavaş yavaş 0,2 M steril CaCl₂'den 30 µl ilave edildi. Oda ısısında 30 dak. beklemeyi takiben dibe çöken çökelti pipetle dağıtıldı.

Tek tabaka oluşturan Vero hücreleri üstündeki hücre üretme vasatı döküldü ve kaba 0,5 ml CaPO₄-DNA solüsyonu eklendi. Daha sonra, hücreler oda ısısında 15 dak. inkube edildi ve üzerine 5ml hücre üretme vasatı ilave edildi. Hücreler % 5 CO₂ içeren 37 °C'deki etüve kaldırıldı ve 4 saat inkube edildi. Transfeksiyonun 4. saatinde, hücrenin yüzeyi iki kez fosfatla tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (PBS; 1 lt dH₂O'da 8 gr NaCl, 0,2 gr KCl, 1,15 gr Na₂PHO₄ ve 1,15 gr KH₂PO₄ çözdürüldü ve bu çözelti otoklavda steril edildi) ile yıkandı. Hücrelerin üstüne genetisin (SIGMA Chemical Co. St. Louis. Mo. USA) içeren seçici vasat (400 µg/ml genetisin disülfat içeren hücre üretme vasatı) ilave edildi. pcDNA3 transfeksiyonu için aynı işlemler tekrarlandı. Hücrelerdeki değişimler günlük olarak mikroskopta incelendi ve 3 günde bir seçici vasat yenilendi. Transfeksiyonun 5. gününden itibaren seleksiyona dayanamayan hücrelerin kültür kabı yüzeyinden ayrılmaya başladıkları görüldü. Bu ayrılma 10. günde tamamlandı. Transfeksiyonun 11. gününde seleksiyona dayanan hücrelerin kolonileri belirlendi ve vasattaki genetisin miktarı 200 µg/ml'ye düşürüldü. Transfeksiyonun 13. gününde hücre kolonileri gözle görülür hale geldi. Transfeksiyondan yaklaşık 1 ay sonra hücrelerin tek tabaka oluşturduğu görüldü. Bu hücreler buldukları kabın yüzeyinden tripsin-EDTA solüsyonu (1 lt DME/F-12 vasatı içinde 2 gr tripsin ve 0.2 gr Na-EDTA çözdürüldü. Bu solüsyon 0,45 µl'lik membran filtrelerde süzüldü) kullanılarak kaldırıldı. Santrifüjle çöktürülen hücreler 3 adet 25 cm²'lik hücre kültür kaplarına geçildi. Bu kaplardan biri PCR'da, biri de Western Immunoblot çalışmasında kullanıldı. Diğer kaptaki hücreler % 10 dimetil sülfoksit, % 40 FCS ve % 50 DME-F12 içeren 3 ml solüsyon içinde sulandırıldı (21).

Hücreler, 1,5 ml'lik hücre dondurma viyallerine birer ml aktarıldı ve etanol içinde – 20 °C'de 2 saat bekletilerek donduruldu ve - 80 °C'de 3 saat ek beklemeden sonra – 196 °C'ye kaldırıldı.

4.15. Transfekte Vero hücrelerinden DNA izolasyonu ve PCR

pcDNA3 ve rekombinant pcDNA-HBc transfekte Vero hücrelerinde (Vero-pcDNA3 ve Vero-HBc) DNA'nın izolasyonu genomik DNA izolasyon kiti (Wizard™ Genomik DNA Purification System, Promega Co. Madison, WI, ABD) kullanılarak gerçekleştirildi. Kısaca, tripsin-EDTA solüsyonu ile transfekte tek tabaka hücreler kaldırıldıktan sonra 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücreler 3.000 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Tüpteki üst sıvı döküldü ve hücre – 80 °C'de 30 dak. bekletildi. Daha sonra, 95 °C'de 5 dak. tutuldu. Bu işlemleri takiben, pelet hücrenin üstüne 600 µl Nuclei Lysis solüsyonu ilave edildi. Bu karışım mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı ve üzerine 3 µl RNase (10 mg/ml) solüsyonu eklendi. Tüp bir kaç kez çalkalandı ve 37 °C'de, 30 dak. inkube edildi. Bu süre sonunda 200 µl Protein Presipitasyon Solüsyonu eklendi ve 30 sn. vortekslendi. Santrifüj işlemini takiben, üst sıvıdaki DNA dikkatlice alındı ve içinde 600 µl isopropanol bulunan temiz tüpe aktarıldı. Tüpteki karışım dikkatlice sallandı ve santrifüj tekrar edildi. Üst sıvı uzaklaştırıldı ve DNA peleti üzerine 600 µl % 70'lik etanol eklendi ve santrifüj işlemi tekrar edildi. Üst sıvı dikkatlice uzaklaştırıldıktan sonra tüp ters çevrildi ve pelet DNA oda ısısında kurutuldu. Daha sonra, DNA 50 µl steril dH₂O'da resüspanse edildi. Elde edilen DNA ve HBcAg'ye özgül primerler kullanılarak PCR kuruldu. PCR ürünleri % 2 agaroz jelde etidyum bromid boyamayla, daha önce tarif edildiği gibi, görüntülendi.

4.16. *Transfekte Vero hücrelerinin parçalanması*

Tek tabaka oluşturan Vero-pcDNA3 ve Vero-HBc kabındaki üst sıvı döküldü. Kabın yüzeyi steril PBS ile 2 defa yıkandı. Kaba 5 ml PBS ilave edildi ve hücreler steril bir kazıyıcıyla kaldırıldı. Kaptaki içerik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1200 rpm'de 10 dak. santrifüj edildi. Çöken pelet hücrelerin üstüne 200 µl jel yükleme solüsyonu (% 0,2 sodyum dodesil sülfat; SDS, 125 mM Tris-HCl pH 6.8, % 10 gliserol, % 0,2 2-merkaptoetanol ve % 0,002 bromfenol mavisi içeren solüsyon) eklendi. Yukarıdaki işlemler 25 cm² hücre kültür kabında tek tabak oluşturan Vero hücreleri için de tekrarlandı. Örnekler kaynar suda 5 dak. tutuldu (26).

4.17. *Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez*

Sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforez (SDS-PAGE) için esas itibariyle daha önce tarif edilen prosedür takip edildi (25). Bu amaçla yığılmalı ve çözdürücü SDS-PAGE yöntemi kullanıldı. Kısaca, elektroforez için önce % 5'lik yığılmalı jel eriyiği (5 ml eriyik için; 0.85 ml % 30'luk akrilamid -bisakrilamid (Akr./Bis.) , 0,65 ml 1 M Tris pH 6.8, 50 µl % 10 SDS, 50 µl % 10 amonyum persülfat ve 3.4 ml dH₂O içeren karışıma en son olarak 5 µl N, N, N', N'-tetrametiletülenamin (TEMED) eklendi) hazırlandı. Eriyik, bekletilmeksizin, 12x14 cm ebadındaki cam tabakalar arasına döküldü, üzerine 5 ml bütanol ilave edildikten eriyiğin polimerize olması beklendi. Yığılmalı jel polimerize olduktan sonra, bütanol döküldü ve jelin yüzeyi dH₂O ile yıkandı. Cam tabakalar arasına tarak yerleştirildi.

Daha sonra, % 15 çözdürücü jel eriyiği (30 ml eriyik için; 15 ml % 30'luk Akr./Bis, 7.5 ml 1.5 M Tris pH 8.8, 0.25 ml % 10 SDS, 0.25 ml % 10 amonyum persülfat ve 7 ml dH₂O içeren karışıma son olarak 12 µl TEMED eklendi) hazırlandı. Eriyik, bekletilmeksizin, yığılmalı jelin üzerine döküldü. Jel tam olarak polimerize olduktan sonra, tarak çıkarıldı ve cam tabaka elektroforez tankına yerleştirildi. Elektroforez tankının alt ve üst hazneleri tris-glisin elektroforez çözeltisiyle (dH₂O içinde 25 mM Tris, 250 mM glisin pH 8.3 ve % 0.1 SDS) dolduruldu. Jeldeki farklı tarak kuyucuklarına jel yükleme solüsyonunda parçalanmış 20 µl Vero-HBc ve Vero-pcDNA3 hücre lizatları ve boyalı protein molekül ağırlık markeri (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) yüklendi. Elektroforez cihazının anot ve katot kabloları güç kaynağına bağlandı. Elektroforez işlemi 200 Volt'da, 4 saatte gerçekleştirildi.

4.18. Western Immunoblot Deneyi

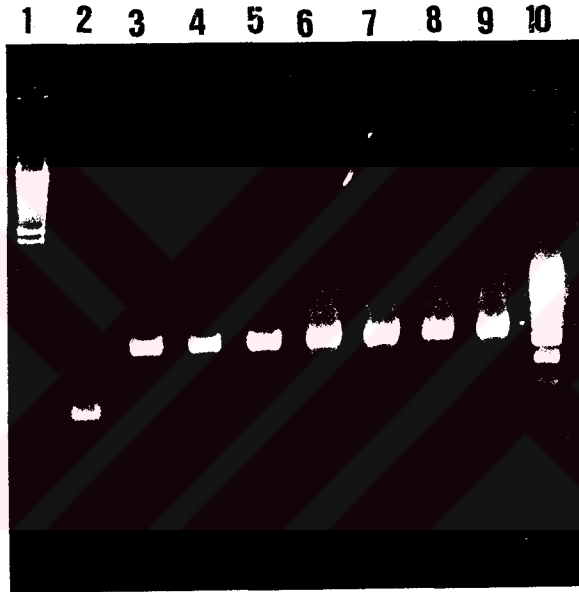
Elektroforez işleminden sonra, jeldeki örneklerin nitroselüloz membrana transferi daha önce belirtildiği gibi gerçekleştirildi (26). Kısaca; jel ile aynı ölçülerde 3 adet Whatmann 3 MM kurutma kağıdı ve bir adet nitroselüloz membran kesildi. Kurutma kağıtların her biri anot tamponu 1 (0,3 M Tris pH 10.4, % 20 metanol), anot tamponu 2 (0,025 M Tris pH 10.4, % 20 metanol) ve katot tamponu (0,025 M Tris pH 9.4, % 20 metanol) bulunan kaplarda nitroselüloz membran ise distile su kabında 10 dak. bekletildi. Transfer işlemi Semi-Dry sisteminde (IMM-Semi-Dry Blotter, W.E.P., Comp., Seattle, WA., U.S.A.) 0,3 Amperde, 45 dak. sürede gerçekleştirildi.

Transfer işlemi bitiminde nitroselüloz membran % 5 yağsız süt tozu içeren PBS'de 2 saat bekletildi. Bloklama sonrası membran, birer kuyucuk Vero-HBc ve Vero-pcDNA3 örneği bulunacak şekilde kesildi. Membranlar % 0,01 tween 20 içeren PBS ile yıkandı. İmmunodeteksiyon aşamasında primer serum olarak; ticari ELISA kiti (Abbott Murex, Wiesbaden, Germany) HBcAg pozitif kontrol serumu ve HBcAg pozitif infekte insan serumu kullanıldı. Serumlar 10 ml % 0,01 tween 20 içeren PBS'de 1/20 oranında sulandırıldı. Membranlar, bu serum örneklerinin bulunduğu kaplarda 37 °C'de 1 saat bekletildi ve 5 kez 10 dak. süreyle yıkandı. Yıkamayı takiben, membranlar PBS-tween 20'de 1/3000 oranında sulandırılan biyotinle işaretli anti-human IgG (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) eriyiğinde 37 °C'de 1 saat bekletildi ve yıkamalar tekrarlandı. Membranların bulunduğu kaplara 10 ml PBS-tween 20'de 1/3000 oranında sulandırılan avidinle işaretli at turpu peroksidaz enzimi eriyiği (Sigma Chemical Co., St. Louis, Mo. USA) ilave edildi. İnkubasyon ve yıkamalar tekrarlandı. Membranlar, en son olarak, karanlık ortamda kromojen-substrat eriyiğinde (0,05 M Tris pH 7.6 içerisinde 0,5 mg/ml diaminobenzidine ve % 0,003 H₂O₂ içeren eriyik renkli kaplarda taze olarak hazırlandı) 15 dak. tutuldu ve dH₂O dolu bir kaptaki yıkayıp, kurutuldu.

5. BULGULAR

5.1. HBcAg'nin pUC19'da klonlanması

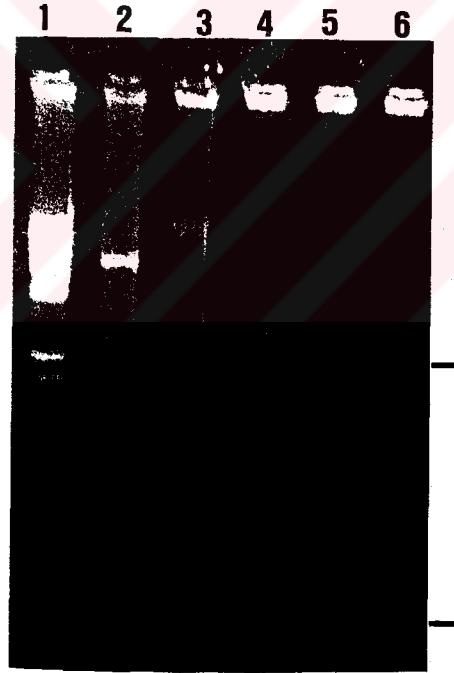
Hepatit B virüsü ile infekte kişilerin serumundan izole edilen DNA'nın PCR'ı neticesinde yaklaşık 550 bç uzunluğunda HBcAg geni çoğaltılmış ve bu gen parçası % 2 agaroz jelde etidyum bromidle boyamada belirlenmiştir (Şekil 1). Çalışmada, PCR'ın kontrolü amacıyla, HBV'nin HBsAg gen kısmına özgül primerlerle gerçekleştirilen amplifikasyon neticesinde 259 bç'lik bir gen parçası elde edilmiştir.



Şekil 1. Hepatit B virüsü ile infekte kişilerin serumundan izole edilen DNA'nın HBcAg primerleri kullanılarak yapılan PCR ile çoğaltılan HBcAg gen parçasının % 2 agaroz jelde görüntülenmesi. Lambda DNA-*Hind*III (hat 1) ve 100 bç'lik DNA merdiven markerleri (hat 10), 259 bç'lik HBsAg gen parçası (hat 2) ve 550 bç'lik HBcAg geni (hat 3-9).

Hepatit B ile infekte bireylerin serum örneklerinden PCR ile çoğaltılan HBcAg gen kısmının pUC19 plazmit vektöre yerleştirildiği ve klonlanan

rekombinant plazmit DNA'sının HBcAg genine sahip olduğu restriksiyon enzim analizi (Şekil 2) ile doğrulanmıştır. Rekombinant plazmit pHbc-1 DNA'sının *EcoRI*, *HindIII* ve *EcoRI-HindIII* restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimlerinden sonraki elektroforez motifleri Şekil 2'de gösterilmiştir. Normal uzunluğu 2686 bp olan pUC 19 (hat 2) içine yaklaşık 550 bp uzunluğunda (hat 6) HBcAg gen bölgesi yerleştirildiğinde yaklaşık 3250 bp uzunluğunda rekombinant plazmit pHbc-1 (hat 3) elde edilmiştir. pHbc-1, *HindIII* (hat 4), *EcoRI* (hat 5) ve *EcoRI-HindIII* enzimleriyle (hat 6) kesilmiştir. Çift kesim analizleri sonucunda 550 bp'lik HBcAg geni tespit edilmiştir.



Şekil 2. Rekombinant plazmit pHbc-1 DNA'sının *HindIII* (hat 4), *EcoRI* (hat 5) ve *EcoRI-HindIII* (hat 6) restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesim analizleri ile pUC 19 (hat 2), rekombinant plazmit pHbc-1 (hat 3) ve Lambda DNA-*HindIII* ağırlık markeri (hat 1) elektroforez motifleri.

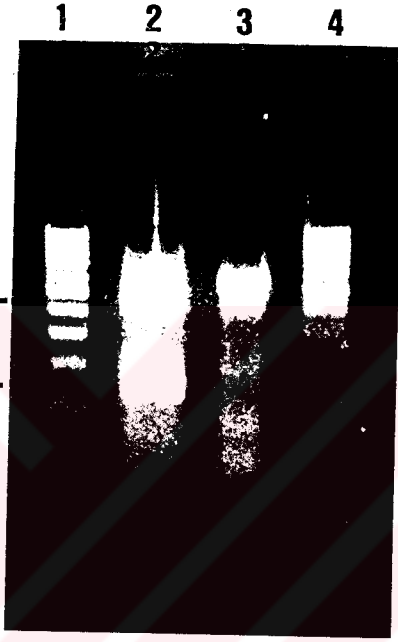
Klonlanan gen parçasının HBcAg geni olduğunun tespiti için rekombinant plazmit pHbc-1 DNA'sının kalıp görevi yaptığı ve HBcAg primerlerinin kullanıldığı PCR'la doğrulama yöntemi gerçekleştirilmiştir. Bu deneyde beklenildiği gibi 550 bç uzunluğunda HBcAg geni agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 3, hat 2-6).



Şekil 3. Rekombinant plazmit pHbc-1 DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı ve HBcAg primerleri ile gerçekleştirilen PCR'da çoğaltılan ürünün % 2'lik agaroz jelde gösterimi. 100 bç'lik DNA merdiven marker (hat 1 ve 8), pozitif PCR ürünü (hat 2-6) ve pozitif kontrol olarak kullanılan 259 bç'lik HBsAg gen parçası (hat 7).

Ek bir doğrulama deneyi olarak, rekombinant plazmit pHbc-1 DNA'sının kalıp olarak kullanıldığı PCR'da çoğaltılan ve HBcAg geni olarak kabul edilen parçanın *MspI* restriksiyon enzim ile kesimi gerçekleştirilmiştir (Şekil 4, hat 2).

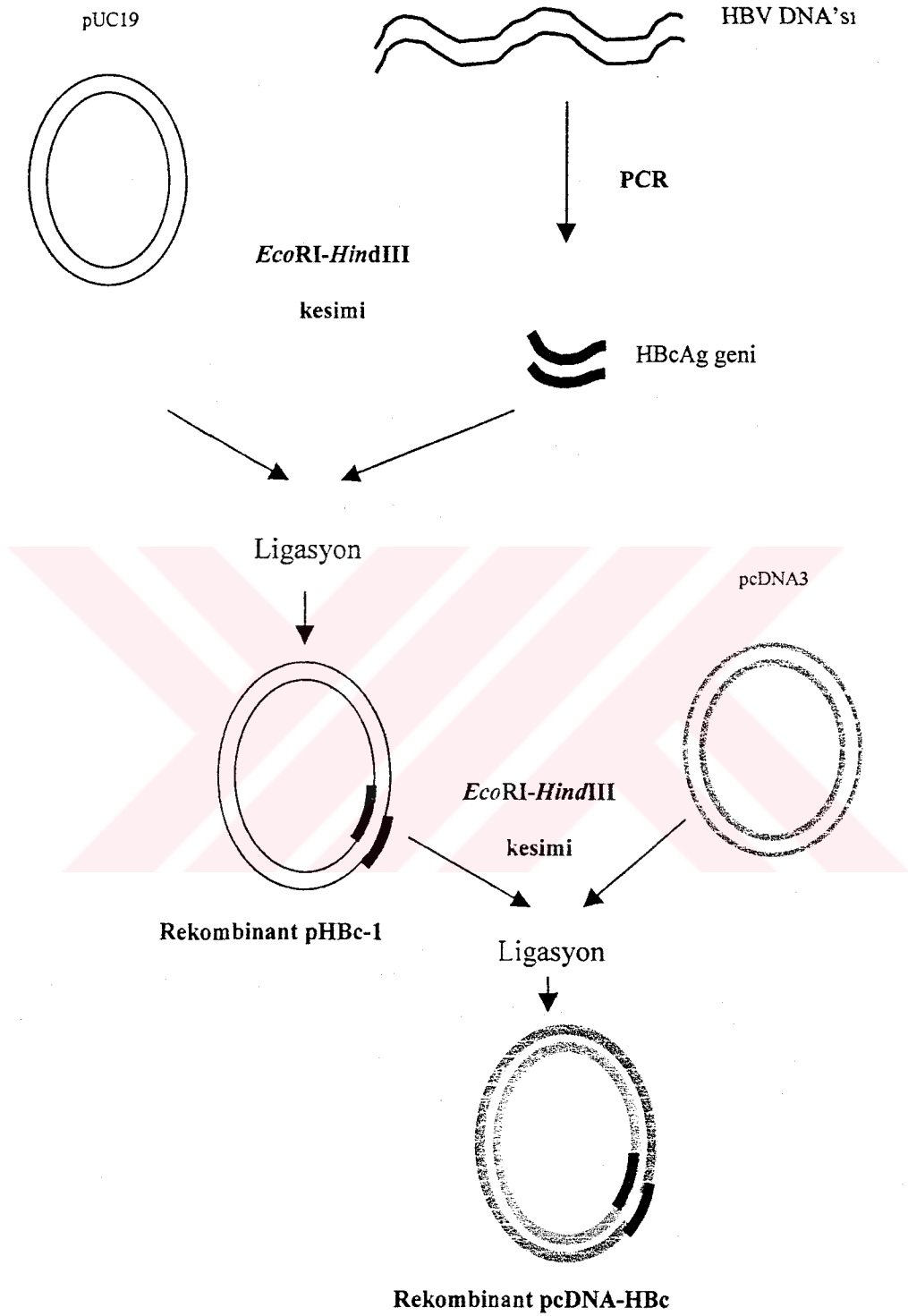
Hedef gen bölgesinin nükleotit dizilimi tek bir *MspI* tanıma bölgesi içerdiği için, enzim kesimi neticesinde beklenildiği gibi, 120 ve 430 bp'lik iki farklı uzunlukta DNA elde edilmiştir.



Şekil 4. PCR'da çoğaltılan 550 bp'lik gen kısmının *MspI* restriksiyon enzimiyle kesimi. 100 bp'lik DNA merdiven marker (hat 1 ve 4), PCR ürünü (hat 3) ve *MspI* enzimiyle kesilen PCR ürünü (hat 2).

5.2. HBcAg'nin pcDNA3'te klonlanması ve açıklanması

Hepatit B virüs kor geninin pcDNA3'te klonlanması ve rekombinant pcDNA-HBc'nin oluşturulması aşağıda şematize edilmiştir (Şekil 5).



Şekil 5. Rekombinant pcDNA-HBc'nin oluşturulması.

pcDNA3 içinde HBcAg'nin klonlanmasından sonra elde edilen rekombinant pcDNA-HBc'da HBcAg geninin bulunduğunun doğrulanması için gerçekleştirilen restriksiyon enzimlerle kesim deneyinde elde edilen gen parçaları agaroz jelde gösterilmiştir (Şekil 6).

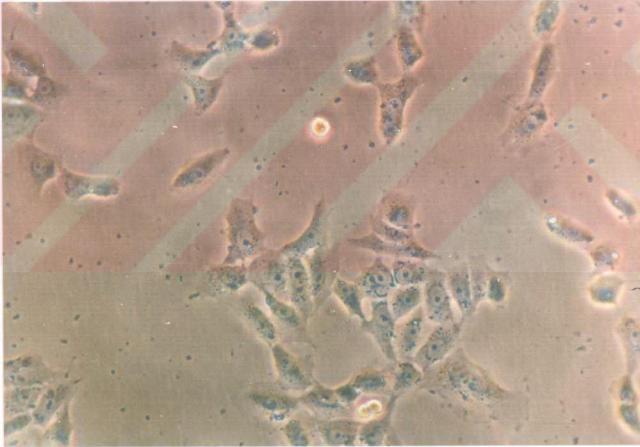
Bu görüntüleme; genom uzunluğu 5.4 kb'lık pcDNA3 (hat 7) ile HBcAg geninin bu plazmite yerleştirilmesinden sonra elde edilen yaklaşık 5.9 kb'lık rekombinant pcDNA-HBc (hat 5 ve 6) DNA'sı belirlenmiştir. Ayrıca, rekombinant pcDNA-HBc'nin *EcoRI-HindIII* enzimleriyle kesimi (hat 2) ile 550 bp'lık HBcAg geninin varlığı doğrulanmıştır.



Şekil 6. Rekombinant pcDNA-HBc'da HBcAg geninin varlığının restriksiyon enzimlerle kesimi ile doğrulanması. pcDNA3 (hat 7), pcDNA-HBc (hat 5 ve 6), rekombinant pcDNA-HBc'nin *EcoRI* (hat 3), *HindIII* (hat 4) ve *EcoRI-HindIII* enzimleriyle kesimi (hat 2) ve Lambda DNA-*HindIII* ağırlık markeri (hat 1 ve 8) .

Transfeksiyonun 5. günündeki mikroskopik bakıda, Vero-HBc ve Vero-pcDNA3 hücrelerinin büyük kısmının genetsin içeren vasatında seleksiyona dayanamadıkları ve parçalanmaya başladıkları belirlenmiştir. Parçalanmaların 10. güne kadar devam ettiği, kalan hücrelerin ise 13. gününde gözle görülür koloniler oluşturduğu görülmüştür (Şekil 7).

Transfeksiyondan yaklaşık 1 ay sonra ise hücrelerin 25 cm² hücre üretme kaplarında tek tabaka oluşturdukları gözlenmiştir. Aynı vasat ortamında üretilen Vero hücrelerinin ise transfeksiyonu 10. gününde tamamen parçalandıkları kaydedilmiştir.



Şekil 7. Rekombinant pcDNA-HBc plazmiti ile transfekte ve genetsine dirençli Vero hücreleri (100x).

Çalışmada Vero-HBc hücrelerin genetik direnç kazanmaları, genetik dirençlilik geni ile birlikte pcDNA-HBc plazmitinin taşıdığı HBcAg genini de genetik yapılarına entegre ettikleri varsayılmıştır. Ancak, bu durumun doğrulanmasının yapılmasına gerek duyulmuştur. Bu amaçla transfekte hücrelerden genomik DNA izole edilmiş ve bu DNA kalıp olarak kullanılarak PCR düzenlenmiştir. Hepatit B virüsünün kor geninin varlığının belirlenmesi amacıyla gerçekleştirilen PCR'da, pcDNA-HBc ile transfekte Vero hücrelerinde yaklaşık 550 bç'lik HBcAg geni agaroz jelde belirlenmiştir (Şekil 8).



Şekil 8. Rekombinant pcDNA-HBc ile transfekte Vero hücrelerinde HBcAg geninin varlığının belirlenmesi. 100 bç'lik DNA merdiven markeri (hat 4), pozitif kontrol 259 bç'lik HBsAg gen parçası (hat 1), Vero-pcDNA (hat 2) ve Vero-HBc (hat 3) DNA'sıyla gerçekleştirilen PCR ürünleri.

Vero-HBc hücrelerinin HBcAg gen parçasına sahip oldukları anlaşıldıktan sonra, bu genin hücrelerde açıklanıp, açıklanmadığı önem kazanmıştır. Vero-HBc hücrelerinde HBcAg'nin açıklanmasının belirlenmesi amacıyla Western Immunoblot deneyi en direkt test yöntemi olarak seçilmiştir. Bu amaçla, hücre lizatları önce % 15'lik agaroz jelde elektroforez edilmiş daha sonra membrana transfer edilmiştir.

Vero-pcDNA3 ve Vero-HBc proteinleri aktarılan nitrosellüloz membranların immunodeteksiyonu neticesinde, Vero-HBc kuyucuklarında hem ELISA kit antikorlarıyla hem de HBcAg pozitif HBV hasta serumuyla özgül yanıt veren yaklaşık 21 kDa ağırlığında proteinin varlığı belirlenmiştir (Şekil 9).



Şekil 9. Vero-HBc hücre proteinlerinin Westernblot Immunoblot metoduyla çalışılması. Vero-HBc ve Vero-pcDNA3 lizatlarının ELISA kiti HBcAg pozitif kontrol serumu (A) ve HBcAg pozitif insan serumuyla (B) immunodeteksiyonu. Vero-HBc (hat 1 ve 3), Vero-pcDNA3 (hat 2 ve 4) lizatları ve boyalı protein ağırlık markeri (Bu çalışmada kullanılan boyalı markerin elektroforezinde 205 ve 116 kDa büyüklükteki proteinlerin çözücü jele geçmedikleri belirlenmiştir. Ayrıca, 66 ve 20 kDa'lık boyalı protein markerleri ise çözücü jelde görülmüş fakat nitrosellüloz membranda görüntülenememiştir. ►; 45 kDa; ovalbümin, —; 29 kDa; karbonik anhidrat, -; 20 kDa; Tripsin inhibitörü)

6. TARTIŞMA

Bu çalışma iki aşamada gerçekleştirildi. Çalışmanın ilk aşamasında rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak pUC19 plazmitine yerleştirilen HBcAg gen bölgesi *E. coli* hücrelerinde klonlandı. Çalışmanın ikinci aşamasında ise HBcAg geninin yerleştirildiği ökaryotik plazmit DNA'sı kullanılarak *in vitro* hücre kültür sisteminde HBcAg proteini açıklatıldı. Rekombinant pcDNA-HBc tansfekte hücrelerden açıklatılan yaklaşık 21 kDa ağırlığında HBcAg proteininin varlığı Western Immunoblotla belirlendi.

Duyarlı konakçı spektrumunun insan ve şempanzelerle sınırlı olması nedeniyle, HBV replikasyonunun, genom yapısının ve nükleotit diziliminin anlaşılmasına yönelik çalışmalarda klonlanmış HBV DNA'sı sıklıkla kullanılmıştır (29, 59, 63, 68, 85, 101). Kor geninin klonlanması ve bu genin kodladığı proteinlerin açıklanması amacıyla prokaryotik, ökaryotik ve maya hücrelerinin konakçı olarak kullanımı bildirilmiştir (6, 14, 22, 33, 37, 75, 97).

Hepatit B virüsü kor geni ilk olarak Pasek ve ark. tarafından klonlanmış ve *E. coli* hücrelerinde açıklatılmıştır (59). Bu çalışmada, RE'lerle kesilmiş HBV DNA parçalarının bazılarında sahip rekombinant plazmitleri bulunduran transforme *E. coli* hücrelerinde salgısal olmayan ve 21 kDa ağırlığında bir protein belirlenmiştir. Daha sonraki yıllarda gerçekleştirilen benzer bir çalışmada *E. coli*'de, açıklatılan 21 kDa'lık proteinin yapısının ve immünojenik özelliğinin HBcAg ile benzerliği gösterilmiştir (63). Hepatit B virüsü kor partiküllerinin yabancı proteinlerin veya epitopik bölgelerin immün sisteme etkin bir şekilde sunumu için ideal taşıyıcı molekül oldukları belirlenmiştir (73, 84, 92).

Bu nedenle, yabancı proteinler yada polipeptitler HBV kor partikülünün oluşumunu engellemeyecek bir dizilimle kor proteininin amino ve karboksil uçlarına ya da internal bölgelerine yerleştirilerek birlikte açıklanmışlardır (73, 84). Bu şekilde elde edilen füzyon veya hibrid proteinlere karşı T bağımlı ve bağımsız güçlü immün yanıtlar belirlenmiştir (11, 80). Örneğin, insan immün yetmezlik virüs 1 (human immunodeficiency virus 1; HIV-1)'in zarf proteinlerini taşıyan HBcAg partikülleriyle immünize edilen fareler, HIV proteinlerine karşı güçlü immün yanıt geliştirmişlerdir (80). Yine HBcAg partikülleriyle birlikte verilen foot-and-mouth disease (Şap Hastalığı; hayvanların ayak ve ağız hastalığı) virüsünün 19 amino asitlik polipeptite karşı farelerde şekillenen immün yanıtın, aynı polipeptitin yalnız olarak immünizasyonuna kıyasla, 100 kat daha güçlü olduğu gösterilmiştir. (17). Benzer yaklaşımla elde edilen HBcAg partiküllerinin üzerindeki insan papillomavirüs tip 16'nın E7 epitopuna (87) ve insan rhinovirüs proteinlerine (11) karşı immünize edilen farelerde T ve B hücre yanıtı belirlenmiştir. Yalnız subunit aşılarda değil aynı zamanda HBcAg partikülünü ve yabancı proteini birlikte açıklayan rekombinant plazmitlerin kullanıldığı genetik tabanlı aşılarda da HBcAg proteininin etkin aşılarda geliştirmede kullanılabileceği anlaşılmıştır (42). Örneğin, genetik immünizasyon sonucunda HBcAg partikülleriyle birlikte açıklanan *Streptococcus pneumoniae*'nin polipeptidine, bu polipeptitin yalnız olarak verilmesiyle kıyaslandığında, oldukça güçlü immün yanıt kaydedilmiştir (42).

Hepatit B virüsünün HBcAg geninin klonlanması ve ökaryotik hücrelerde açıklanması amacıyla gerçekleştirdiğimiz bu çalışmada DNA kaynağı olarak klinik numunedan elde edilen DNA kullanılmıştır.

Moleküler klonlama çalışmalarının ilk yıllarında gen kaynağı olarak klinik numunelerde izole edilen viral DNA'lar sıklıkla kullanılmıştır. Benzer yaklaşımlar özellikle klinik seyir ile gen mutasyonlarının ilişkisinin anlaşılmasına yönelik klonlama çalışmalarında geçerliliğini korumaktadır (3, 16, 17, 39, 46). Ancak, son yıllarda gerçekleştirilen çalışmada HBcAg geni için DNA kaynağı olarak HBV'nin tüm genlerini içeren daha önce klonlanmış rekombinant DNA'lar tercih edilmektedir (53, 80). Bu çalışmalarda seçilen primerlere ve füzyon gen yapısına bağlı olarak 550-580 bp uzunluğunda HBcAg geni belirlenmiştir.

Mevcut çalışmada klonlama vektörü olarak pUC19 plazmit vektörü kullanılmıştır. pUC19 plazmitinin etkin bir klonlama vektörü olduğu belirtilmiştir (16, 67). Ayrıca, pUC19 plazmitinin prokaryotik hücrelerde ekspresyon vektörü olduğu belirtilmiştir (67). Bu çalışmada HBcAg geni, bu plazmitin klonlama bölgesi içerisine ters oryantasyondan yerleştirilmiştir. Bu nedenle, HBcAg proteininin sentezi gerçekleşmemiş, bu plazmit yalnızca klonlama vektörü olarak kullanılmıştır.

Prokaryotik hücrelerde HBcAg geni içeren rekombinant plazmitlerle gerçekleştirilen transformasyon çalışmalarında, HBcAg proteinlerinin bu hücrelerde salgısal olmayan partiküler formda açıklandıkları gösterilmiştir. Bu nedenle, SDS-PAGE analizi ve immunoblot deneyleri bakteri hücre lizatları kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmalarda, rekombinant plazmitlerle transforme hücrelerde 20-22 kDa büyüklükte HBcAg proteininin sentezlendiği ortaya konmuştur (19, 53, 72, 73, 78, 80).

Ökaryotik hücrelerde HBcAg proteinin açıklanmasına yönelik önceki çalışmalarda viral promotor ve enhancerlara sahip farklı plazmit vektörleri kullanılmıştır (33, 64, 101, 102).

Bu amaçla, adenovirüsün enhancer elementini ve geç promotörünü bulunduran pMLP plazmiti (33), SV-40 erken promotörlerine sahip pECE plazmiti (102), adenovirüs geç promotörlerini ve SV-40 enhancer elementini içeren pAdvPC plazmiti (64) ve sitomegalovirüs erken promotörlerini bulunduran pCMV plazmidini (101) kullanımı bildirilmiştir. Bu çalışmalarda, rekombinant plazmitlerin transfeksiyonu amacıyla kalsiyum fosfat yönteminin kullanımı genellikle tercih edilmiştir (33, 64, 85, 102). Transfekte hücrelerin seçiminde ise genetsin seleksiyonunun başarılı olduğu bildirilmiştir (24, 85, 95, 101). Bu çalışmalarda, HBcAg rekombinantları ile in vitro hücre kültürlerinin transfeksiyonu neticesinde, hücrelerde kor antijeni üretildiği belirlenmiştir. Aynı çalışmalarda, transfekte hücrelerde kor antijeninin büyük oranda sitoplazmada biriktiği az bir kısmının ise nükleus membranında belirlendiği kaydedilmiştir. Bu nedenle, Western Immunoblot çalışmalarında hücre lizatları kullanılmış ve bu deneylerde HBcAg proteinine özgül 20-22 kDa büyüklüğünde proteine karşı immun tepkime belirlenmiştir (33, 85, 101).

Gerek SDS, gerekse Western Immunoblot deneylerinde özellikle deterjanların etkisiyle, kaynatma ve blotlama aşamalarında pek çok proteinin yapısal özelliklerinin bozulduğu ve buna bağlı olarak, bu proteinlere karşı özgül immun yanıtın kaybolduğu bildirilmiştir (25, 26). Hepatit B virüsünün HBcAg proteininin yukarıdaki faktöre duyarlı olduğu ifade edilmiştir (57). Ancak, redükleyici olmayan şartlar altında (proteinlerin, merkaptoethanol içermeyen protein yükleme solüsyonu içinde, kaynatma yapılmaksızın, 60 °C'de 20 dak. tutulduktan sonra elektroforezinin yapılması) gerçekleştirilen SDS-PAGE analizde, HBcAg partiküllerinin monomerlerine ayrılmadığı ve bu nedenle jele geçmediği belirlenmiştir (19).

Bu nedenle, HBcAg protein sentezinin analizi çalışmalarında, redükleyici şartlarda proteinlerin işlenmesinden sonra elektroforezi ve Western Immunoblot'ı gerçekleştirilmiştir (19, 33, 72, 73, 85, 101).

Ülkemizde HBV'ye yönelik yapılan çalışmalar çoğunlukla tanısal amaçlıdır. Gerçekleştirilen serolojik testlerde ve PCR taramalarında, HBV'nin ülkemizde oldukça yaygın bir infeksiyon olduğu görülmüştür (4). Gerekliliği göz ardı edilmemekle birlikte, serolojik testler ve PCR taramalarıyla elde edilen veriler virüsün epidemiyolojisini ve kimi durumlarda hastalığın seyirini anlamadan ileri gidememektedir. Son yıllarda, ülkemizde Hepatit B virüsün yapısal unsurlarının anlaşılmasına, proteinlerinin tanısal ve tedavi amaçlı üretilmesine yönelik moleküler çalışmalar görülmeye başlamıştır (99). Ancak, bu çalışmaların sayısının yetersiz olduğu, içerik olarak daha ileri düzeylere taşınması ve bu konuda da hızlı adımlar atılması gerekliliği, makalede verilen kaynaklarla kıyas edilince görülebilmektedir. Bu çalışmada, HBV'ünün HBcAg geninin klonlanması ve açıklanması başarılmıştır. Bu bakımda ülkemizde bu konuda öncü çalışmalardan biri olma özelliğine sahiptir. Ancak, gerek rekombinat DNA teknolojisiyle üretilen HBcAg proteininin tanısal, tedavi ve teşhis amaçlı kullanımı, gerekse oluşturulan pcDNA-HBc plazmitinin genetik tabanlı HBcAg aşısı olarak test için çalışmanın devamında fayda görülmektedir.

7- KAYNAKLAR

- 1- Aggarwal, A. K. 1995. Structure and function of restriction endonucleases. *Curr Opin Struct Biol.* 5; 11-19.
- 2- Arauz-Ruiz, P., Norder, H., Visona, K. A. ve Magnius, L. O. 1997. Molecular epidemiology of hepatitis B virus in Central America reflected in the genetic variability of small gene. *J Infect Dis.* 176; 851-858.
- 3- Arens, M. 1999. Methods for subtyping and molecular comparison of human viral genomes. *J Clin Microbiol.* 12; 612-626.
- 4- Aşçı, Z., Akbulut, A., Doymaz, M. Z., Felek, S. ve Kılıç, S. 1996. Serumda Hepatit B virüs DNA'sının PCR ile belirlenmesi ve serolojik parametrelerle kıyaslanması. *Viral Hepatit Derg.* 2; 6-9.
- 5- Badur, S. 1994. Hepatit B Virüsü (HBV): Moleküler viroloji ve serolojik tanı. "Viral Hepatit" adlı kitaptan (Ed. K. Kılıçtuğay). Nobel Tıp Kitapevleri Ltd. Sti, İstanbul. 65-90.
- 6- Beesley, K. M., Francis, M. J., Clarke, B. E., Beesley, J. E., Dopping-Hepenstal, P. J., Clare, J. J., Brown, F. ve Romanos, M. A. 1990. Expression in yeast of amino-terminal peptide fusions to hepatitis B core antigen and their immunological properties. *Biotechnology (N Y)* 8; 644-649.
- 7- Belfort, M. ve Roberts, R. J. 1997. Homing endonucleases: keeping the house in order. *Nuc Acids Res.* 25; 3379-3384.
- 8- Blakesley, R. W. 1987. Restriction endonuclease: cleavage, ligation and sensitivity. *Gene Amplif. Anal.* 5; 51-102.

- 9- Bock, C.T., Schwinn, S., Schroder, C. H., Velhagen, I. ve Zentgraf, H. 1996. Localization of hepatitis B virus core protein and viral DNA at the nuclear membrane. *Virus Genes* 12; 53-63.
- 10- Brawn, J. L., Carman, W. F. ve Thomas, H. C. 1992. The clinical significance of molecular variation within the hepatitis B virus genome. *Hepatology*. 15; 144-148.
- 11- Brown, A. L., Francis, M. J., Hastings, G. Z., Parry, N. R., Barnett, P. V., Rowlands, D. J. ve Clarke, B. E. 1991. Foreign epitopes in immunodominant regions of hepatitis B core particles are highly immunogenic and conformationally restricted. *Vaccine* 9; 595-601.
- 12- Brown, T. A. 1986. "Gene Cloning; An Introduction" adlı kitaptan. Chapman & Hall, Londra, UK.
- 13- Buckwold, V. E., Xu, Z., Chen, M., Yen, T.S. ve Ou, J. H. 1996. Effects of a naturally occurring mutation in the hepatitis B virus basal core promoter on precore gene expression and viral replication. *J Virol*. 70; 5845-5851.
- 14- Burrell, C. J., MacKay, P., Greenaway, P. J., Hofscheider, P. H. ve Murray, K. 1979. Expression in *Escherichia coli* of hepatitis B virus DNA sequences cloned in plasmid pBR322. *Nature*. 279; 43-47.
- 15- Chisari, F. V. 1997. Cytotoxic T cells and viral hepatitis. *J Clin Invest*. 99; 1472-1477.
- 16- Chuang, W., Omato, M., Ehato, T., Yokosuka, O. ve Ohto, M. 1993. Concentrating missense mutations in core gene of hepatitis B virus. *Digestive Disease and Sciences*. 38; 594-600.

- 17- Fiordalisi, G., Cariani, E., Mantero, G. et al. 1990. High genomic variability in the pre-C region of hepatitis B virus in anti-HBe, HBV DNA-positive chronic hepatitis. *J Med Virol.* 31; 297-300.
- 18- Francis MJ, Hastings GZ, Brown AL, Grace KG, Rowlands DJ, Brown F, Clarke BE. 1990. Immunological properties of hepatitis B core antigen fusion proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87; 2545-2549.
- 19- Gallina, A., Bonelli, F., Zentilin, L., Rindi, G., Muttini, M. ve Milanesi, G. 1989. A recombinant hepatitis B core antigen polypeptide with the protamine-like domain deleted self-assembles into capsid particles but fails to bind nucleic acids. *J Virol.* 63; 4645-4652.
- 20- Ganem, D. 1996. Hepadnaviridae and their replication. "Fields Virology" adlı kitaptan. (Eds: B. N. Fields, D. M. Knipe ve P. M. Howley). Raven Press, New York. 2703-2737.
- 21- George, V. G., Hierholzer, J. C. ve Ades, E. W. 1996. Cell culture. "Virology Methods Manual" adlı kitaptan. (Ed: B. WJ. Mahy, ve H. O. Kangro). Academic Press, San Diego. 3-9.
- 22- Gholson, C.F., Siddiqui, A. ve Vierling, J. M. 1990. Cell surface expression of hepatitis B surface and core antigens in transfected rat fibroblast cell lines. *Gastroenterology* 98; 968-675.
- 23- Gough, N. 1983. Core and E antigen synthesis in rodent cells transformed with hepatitis B virus DNA is associated with greater than genome length viral messenger RNAs. *J Mol Biol.* 165; 683-699.

- 24- Gough, N. M. ve Murray, K. 1982. Expression of the hepatitis B virus surface, core and E antigen genes by stable rat and mouse cell lines. *J Mol Biol.* 16; 243-67.
- 25- Harlow, E. ve Lane, D. 1988. Electrophoresis. "Antibodies" adlı kitaptan. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 635-656.
- 26- Harlow, E. ve Lane, D. 1988. Immunoblotting. "Antibodies" adlı kitaptan. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York. 471-504.
- 27- Heise, T., Guidotti, L. G., Cavanaugh, V. J. ve Chisari, F. V. 1999. Hepatitis B virus RNA-binding proteins associated with cytokine-induced clearance of viral RNA from the liver of transgenic mice. *J Virol.* 73; 474-481.
- 28- Hilditch, C. M., Rogers, L. J. ve Bishop, D. H. 1990. Physicochemical analysis of the hepatitis B virus core antigen produced by a baculovirus expression vector. *J Gen Virol.* 71; 2755-2759.
- 29- Hirschman, S. Z., Price, P., Garfinkel, E., Christman, J. ve Acs, G. 1980. Expression of cloned hepatitis B virus DNA in human cell cultures. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 77; 5507-5511.
- 30- Horikita, M. Ç., Itoh, S., Yamamoto, K., Shibayama, T., Tsuda, F. ve Okamoto, H. 1994. Differences in the entire nucleotide sequence between hepatitis B virus genomes from carriers positive for antibody to hepatitis B e antigen with and without active disease. *J Med Virol.* 44; 96-103.
- 31- Inada, T., Misumi, Y., Seno, M., Kanezaki, S., Shibata, Y., Oka, Y. ve Onda, H. 1989. Synthesis of hepatitis B virus e antigen in *E. coli*. *Virus Res.* 14; 27-47.

- 32- Jardi, R., Buti, M., Rodriguez-Frias, F. et al. 1999. Rapid detection of lamivudine-resistant hepatitis B virus polymerase gene variants. *J Virol Methods*. 83; 181-187.
- 33- Jean-Jean, O., Levrero, M., Will H., Perricaudet, M. ve Rossignol, J. M. 1989. Expression mechanism of the hepatitis B virus (HBV) C gene and biosynthesis of HBe antigen. *Virology* 170; 99-106.
- 34- Jeng, K. S., Hu, C. P. ve Chang, C. M. 1991. Differential formation of disulfide linkages in the core antigen of extracellular and intracellular hepatitis B virus core particles. *J Virol*. 65; 3924-3927.
- 35- Junker, M., Galle, P. ve Schaller, H. 1987. Expression and replication of the hepatitis B virus genome under foreign promoter control. *Nucleic Acids Res.* 15; 10117-10132.
- 36- Kıyan, M. 2001. Hepatit B virüsü. "Viral Hepatit" adlı kitaptan. (Eds. K. Kılıçtuğay ve S. Badur). *Viral Hepatitle Savaşım Derneği, İstanbul*. 86- 120.
- 37- Kniskern, P. J., Hagopian, A., Montgomery, D. L., Burke, P., Dunn, N. R., Hofmann, K. J., Miller, W. J. ve Ellis, R. W. 1986. Unusually high-level expression of a foreign gene (hepatitis B virus core antigen) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Gene*. 46; 135-141.
- 38- Kozak, M. 1989. Model for translation: An update. *J Cell Biol*. 108; 229-241.
- 39- Kunke, D., Broucek, J., Kutinova, L., Nemeckova, S., Ludvikova, V., Strnad, I., Kramosil, J., Nemcova, J., Schramlova, J. ve Simonova, V. 1993. Vaccinia virus recombinants co-expressing hepatitis B virus surface and core antigens. *Virology*. 195; 132-139.

- 40- Lanford, R. E., Notvall, L. M., Dreesman, G. R., Harrison, C. R., Lockwood, D. ve Burk. K. H. 1987. Expression and characterization of hepatitis B virus precore-core antigen in *E. coli*. *Viral Immunol.* 1; 97-109.
- 41- Lau, J. N. L. ve Wright, T. L. 1993. Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B. *Lancet.* 342; 1335-1344.
- 42- Lesinski, G. B., Smithson, S. L., Srivastava, N., Chen, D., Widera, G. ve Westerink, M. A. 2001. A DNA vaccine encoding a peptide mimic of *Streptococcus pneumoniae* serotype 4 capsular polysaccharide induces specific anti-carbohydrate antibodies in Balb/c mice. *Vaccine* 19; 1717-1726.
- 43- Li, J. S., Tong, S. P., Wen, Y. M., Vitvitski, L. ve Zhang, Q. 1993. Hepatitis B virus genotype A rarely circulates as an HBe minus mutant: possible contribution of a single nucleotide in the precore region. *J Virol.* 67; 5402-10.
- 44- Maassen, A., Rehfeldt, A., Kiessig, S., Ladhoff, A., Hohne, W. E. ve Meisel, H. 1994. Comparison of three different recombinant hepatitis B virus core particles expressed in *Escherichia coli*. *Arch Virol.* 135; 131-42.
- 45- MacKay, P., Lees, J. ve Murray, K. 1981. The conversion of hepatitis B core antigen synthesized in *E. coli* into e antigen. *J Med Virol.* 8; 237-243.
- 46- Melegari, M., Jung, M. C., Schneider, R. et al. 1991. Conserved core protein sequences in hepatitis B virus infected patients without anti-HBc. *J Hepatol.* 13; 187-191.
- 47- Milich, D. R., Jones, J. E., Hughes, J. L., Maruyama, T., Price, J., Melhado, I. ve Jirik, F. 1994. Extrathymic expression of the intracellular hepatitis B core antigen results in T cell tolerance in transgenic mice. *J Immunol.* 152; 455-466.

- 48- Milich, D. R., McLachlan, A., Moriarty, A. ve Thornton, G. B. 1987. Immune response to hepatitis B virus core antigen (HBcAg): Localization of T cell recognition sites within HBcAg/HBeAg. *J Immunol.* 139; 1223-1231.
- 49- Milich, D. R., Peterson, D. L., Zheng, J., Hughes, J. L., Wirtz, R., ve Schödel, F. 1995. The hepatitis nucleocapsid as a vaccine carrier moiety. *Ann N Y Acad Sci.* 754; 187-201.
- 50- Miller, R. H., Kaneko, S., Chung, C. T., Girones, R. ve Purcell R. H. 1989. Compact organization of hepatitis B virus genome. *Hepatology.* 9; 322-327.
- 51- Miyanohara, A., Imamura, T., Araki, M., Sugawara, K., Ohtomo, N. ve Matsubara, K. 1986. Expression of hepatitis B virus core antigen gene in *Saccharomyces cerevisiae*: synthesis of two polypeptides translated from different initiation codons. *J Virol.* 59; 176-180.
- 52- Murray, N. E. 2000. Type I restriction systems: Sophisticated molecular machines. *Microbiol Mol Biol Rev.* 64; 412-434.
- 53- Naito, M., Ishii, K., Nakamura, Y., Kobayashi, M., Takada, S. ve Koike, K. 1997. Simple method for efficient production of hepatitis B virus core antigen in *Escherichia coli*. *Res Virol.* 148; 299-305.
- 54- Nemeckova, S., Sroller, V., Kunke, D., Krystofova, J. ve Kutinova, L. 1996. Hepatitis B virus core-preS2 particles expressed by recombinant vaccinia virus. *Acta Virol.* 40; 273-279.
- 55- Ogata, N., Zanetti, A. R., Yu, M., Miller, R. H. ve Purcell, R. H. 1997. Infectivity and pathogenicity in chimpanzees of surface gene mutant of hepatitis B virus that emerged in a vaccinated infant. *J Infect Dis.* 175; 511-523.

- 56- Ohba, K., Mizokomi, M., Ohno, T., Suzuki, T., Orito, E. et al. 1995. Between serotype and genotypes of hepatitis B virus; Genetic classification of HBV by use of surface gene. *Virus Res.* 38; 25-34.
- 57- Ohori, H., Yamaki, M., Onodera, S., Yamada, E. ve Ishida, N. 1980. Antigenic conversion from HBcAg to HBeAg by degradation of hepatitis B core particles. *Intervirology* 13;74-82.
- 58- Ou, J. H., Laub, O. ve Rutter, W. J. 1986. Hepatitis B virus gene function: the precore region targets the core antigen to cellular membranes and causes the secretion of the e antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 83; 1578-1582.
- 59- Pasek, M., Goto, T., Gilbert, W., Zink, B., Shaller, H., Patricia, M., Leadbetter, G. ve Murray, K. 1979. Hepatitis B virus genes and their expression in *E. coli*. *Nature.* 282; 575-579.
- 60- Pugh, J. C. ve Bassendine, M. F. 1990. Molecular biology of hepadnavirus replication. *British Medical Bulletin.* 46; 329-353.
- 61- Roberts, R. J. ve Macelis, D. 1991. Restriction enzymes and their isoschizomers. *Nucleic Acids Res.* 25; 2077-2109.
- 62- Robinson, W. S. 1991. *Hepadnaviridae* and their replication. "Fundamental Virology" adlı kitaptan. (Eds. B. N. Fields ve D. M. Knipe). Raven Press, New York. 989-1021.
- 63- Roggendorf, M., Deinhardt, F., Zachoval, R. ve von der Helm, K. 1983. Comparison of hepatitis B core antigens derived from human liver or synthesized in *Escherichia coli* and evaluation of their use in diagnostic assays for anti-HBc IgM. *J Virol Methods* 6; 61-70.

- 64- Roossinck, M. J. ve Siddiqui, A. 1987. *In vivo* phosphorylation and protein analysis of hepatitis B virus core antigen. *J Virol.* 61; 955-961.
- 65- Roossinck, M. J., Jameel, S., Loukin, S. H. ve Siddiqui, A. 1986. Expression of hepatitis B viral core region in mammalian cells. *Mol Cell Biol.* 6; 1393-1400.
- 66- Sallberg, M., Hughes, J., Javadian, A., Ronlov, G., Hultgren, C. et al. 1998. Genetic immunization of chimpanzees chronically infected with the hepatitis B virus, using a recombinant retroviral vector encoding the hepatitis B virus core antigen. *Hum Gene Ther.* 9; 1719-1729.
- 67- Sambrook, J., Fritsch, E. F. ve Maniatis, T. 1989. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- 68- Scaglioni, P. P., Melegari, M. ve Wands, J. R. 1997. Posttranscriptional regulation of hepatitis B virus replication by the precore protein. *J Virol.* 71; 345-353.
- 69- Schlicht, H. J. ve Schaller, H. 1989. The secretory core protein of human hepatitis B virus is expressed on the cell surface. *J Virol.* 63; 5399-5404.
- 70- Schlicht, H. J. ve Wasenauer, G. 1991. The quaternary structure, antigenicity, and aggregational behavior of the secretory core protein of human hepatitis B virus are determined by its signal sequence. *J Virol.* 65; 6817-6825.
- 71- Schlicht, H. J., Wasenauer, G. ve Kock, J. 1993. Molecular basis of the diversity of hepatitis B virus core-gene products. *Arch Virol Suppl.* 8; 43-52.
- 72- Schödel, F., Moriarty, A. M., Peterson D. L. et al. 1992. The position of heterologous epitopes inserted in hepatitis B virus core particles determines their immunogenicity. *J Virol.* 66; 106-114.

- 73- Schödel, F., Peterson, D., Zheng, J., Jones, J. E., Hughes, J. L. ve Milich, D.R. 1993. Structure of hepatitis B virus core and e-antigen. A single precore amino acid prevents nucleocapsid assembly. *J Biol Chem.* 268; 1332-1337.
- 74- Schödel, F., Peterson, D., Hughes, J. ve Milich, D. R. 1993. Avirulent *Salmonella* expressing hybrid hepatitis B virus core / pre-S genes for oral vaccination. *Vaccine* 11; 143-147.
- 75- Schroder, R., Maassen, A., Lippoldt, A., Borner, T., von Baehr, R. ve Dobrowolski, P. 1991. Expression of the core antigen gene of hepatitis B virus (HBV) in *Acetobacter methanolicus* using broad-host-range vectors. *Appl Microbiol Biotechnol.* 35; 631-637.
- 76- Seeger, C. ve Mason, W. S. 2000. Hepatitis B virus biology. *Microbiol and Mol Biol.* 64; 51-68.
- 77- Serrano, M. A. ve Hirschman, S. Z. 1984. Properties of hepatitis B e antigen synthesized by rat cells transfected with circular viral DNA. *J Gen Virol.* 65; 1373-1383.
- 78- Shirai, M., Watanabe, S. ve Nishioka, M. 1990. Synthesis of hepatitis B virus core antigen polypeptide in *E. coli* using pKK223-3 plasmid, a vector for expression, with tac promoter. *Japan J Exp Med.* 60; 97-103.
- 79- Singh, M., Cattaneo, R. ve Billeter, M. A. 1999. A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. *J Virol.* 73; 4823-4828.
- 80- Stahl, S. J. ve Murray, K. 1989. Immunogenicity of peptide fusions to hepatitis B virus core antigen. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86; 6283-6287.

- 81- Stahl, S., MacKay, P., Magazin, M., Bruce, S. A. ve Murray, K. 1982. Hepatitis B virus core antigen: synthesis in *Escherichia coli* and application in diagnosis. Proc Natl Acad Sci USA. 79; 1606-1160.
- 82- Sunyach, C., Chassot, S., Jamard, C., Koy, A., Trepo, C. ve Cova, L. 1997. In vivo selection of duck hepatitis B pre-S variants which escape from neutralization. Virology 234; 291-299.
- 83- Takahash, K., Imai, M., Nomura, M., Oinuma, A., Machida, A., Funatsu, G., Miyakawa Y. ve Mayumi, M. 1981. Demonstration of the immunogenicity of hepatitis B core antigen in a hepatitis B e antigen polypeptide (P19). J Gen Virol. 57; 325-330.
- 84- Takehara, K., Ireland, D. ve Bishop, D. H. 1988. Co-expression of the hepatitis B surface and core antigens using baculovirus multiple expression vectors. J Gen Virol. 69; 2763-2777.
- 85- Takeshima, H., Namiki, M., Inokoshi, J., Lee, T., Abe, A., Suzuki, Y. ve Omura S. 1989. Stable expression of hepatitis B virus genome in a primate kidney cell. Arch Virol. 109; 35-49.
- 86- Telanta, P-F. S., Poggio, G. P., Lopez, J. L., Gonzalez, J., Lembery, A. ve Capos, R. H. 1997. Increased prevalences of genotype F hepatitis B virus isolation in Buenos Aires, Argentina. J Clin Microbiol. 35; 1873-1875.
- 87- Tindle, R. W., Herd, K., Londono, P., Fernando, G. J, Chatfield, S. N., Malcolm, K. ve Dougan, G. 1994. Chimeric hepatitis B core antigen particles containing B- and Th-epitopes of human papillomavirus type 16 E7 protein induce specific antibody and T-helper responses in immunised mice. Virology 200; 547-557.

- 88- Touze, A., Enogat, N., Buisson, Y. ve Coursaget, P. 1999. Baculovirus expression of chimeric hepatitis B virus core particles with hepatitis E virus epitopes and their use in a hepatitis E immunoassay. *J Clin Microbiol.* 37; 438-441.
- 89- Uchida, T., Saitoh, T. ve Shinzawa, H. 1997. Mutations of the X region of hepatitis B virus and their clinical implication. *Pathol Int.* 47; 183-93.
- 90- Waisman, A., Aloni, Y. ve Laub, O. 1990. *In vitro* regulation of human hepatitis B virus core gene transcription. *Virology* 177; 737-744.
- 91- Wakita, T., Kakumu, S., Tsutsumi, Y. et al. 1990. Gamma-interferon production in response to hepatitis B core protein and its synthetic peptides in patients with chronic hepatitis B virus infection. *Digestion* 47; 149-155.
- 92- Waters, J. A., Pignatelli, M., Brown, D. et al. 1987. The immune response to hepatitis B virus. *Postgraduate Medical Journal* 63; 51-56.
- 93- Watson, D. J., Gilman, M., Witkowski, J. ve Zoller, M. 1992. Methods of creating recombinant DNA molecules. "Recombinant DNA" adlı kitaptan. Scientific American Books, New York. 63-75.
- 94- White, D. O. ve Fenner, F. J. 1994. "Properties of *Hepadnaviridae*, Medical Virology, 4th Edition" adlı kitaptan. Academic Press, San Diego. 359-364.
- 95- Will, H., Cattaneo, R., Pfaff, E., Kuhn, C., Roggendorf, M. ve Schaller, H. 1984. Expression of hepatitis B antigens with a simian virus 40 vector. *J Virol.* 50; 335-342.
- 96- Wingfield, P.T., Stahl, S.J., Williams, R. W. ve Steven, A. C. 1995. Hepatitis core antigen produced in *Escherichia coli*: subunit composition, conformational analysis, and *in vitro* capsid assembly. *Biochemistry* 18; 4919-4932.

- 97- Wizemann, H. ve von Brunn, A. 1999. Purification of *E. coli*-expressed HIS-tagged hepatitis B core antigen by Ni²⁺ chelate affinity chromatography. *J Virol Methods* 77; 189-197.
- 98- Yamaki, M., Ohori, H., Onodera, S., Ishida, N. ve Maeda, H. 1982. Circular dichroism and biochemical properties of the hepatitis B virus core antigen. *Biochim Biophys Acta.* 706; 165-173.
- 99- Yapar, M., Güney, Ç., Başustaoğlu, A. ve Kubar, A. 2001. Hepatit B “e” antijen gen bölgesinin *Escherichia coli*’de ekspresyonu. *Mikrobiol Bült.* 35; 273-278.
- 100- Ye, W. W., Mason, B. B., Chengalvala, M., Cheng, S. M., Zandle, G., Lubeck, M.D., Lee, S.G., Mizutani, S., Davis, A. R. ve Hung, P. P. 1991. Co-expression of hepatitis B virus antigens by a non-defective adenovirus vaccine vector. *Arch Virol.* 118; 11-27.
- 101- Yeh, C. T. ve Ou J. H. 1991. Phosphorylation of hepatitis B virus precore and core proteins. *J Virol.* 65; 2327-2331.
- 102- Yeh, C.T., Wong, S.W., Fung, Y. K. ve Ou, J. H. 1993. Cell cycle regulation of nuclear localization of hepatitis B virus core protein. *Proc Natl Acad Sci USA.* 90; 6459-6466.
- 103- Yoakum, G. H., Korba, B. E., Lechner, J. F., Tokiwa, T., Gazdar, A. F., Seeley, T., Siegel, M., Leeman, L., Autrup, H. ve Harris, C. C. 1983. High-frequency transfection and cytopathology of the hepatitis B virus core antigen gene in human cells. *Science* 222; 385-389.

8. ÖZGEÇMİŞ

Doğum Tarihi; 16. 09. 1973

Doğum Yeri; Ankara

Mezun Olduğu Lise; Keçiören Lisesi, Ankara

Üniversiteye Giriş Tarihi; 1990

Bitirdiği Fakülte; Ankara Üniversitesi, Veteriner Fakültesi

Üniversiteden Mezuniyet Tarihi; 1995

Doktora Başlama Tarihi; 1996, Şubat

Doktora Programı; Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Tıp Mikrobiyoloji

