

# Hepatit Virüslerinin Moleküler Biyolojisi

Dr. Ayça Arslan ERGÜL

Ankara Üniversitesi, Hepatoloji Enstitüsü, Ankara

## GİRİŞ

İnsan hepatit virüsleri, hepatit A' dan hepatit E' ye kadar, 5 ayrı virüs ailesine mensupturlar ve her birinin farklı genomik yapıları ve replikasyon stratejileri vardır. Ayrıca klinik özellikleri de farklılık gösterir. HAV ve HEV enfeksiyonları, hemen her zaman geçicidir ve esas olarak fekal-oral yoldan bulaşır. Buna karşı, HBV, HCV ve HDV enfeksiyonları geçici veya kronik olabilir ve parenteral yollarla bulaşır. Bu farklılıkların yanında ortak bazı özellikleri vardır. Birincisi, hepsi hepatositleri enfekte ederler ve burada replike olurlar. İkincisi, hepsi dinlenen hücrelerde enfeksiyona sebep olur ve replike olurlar. Sağlıklı bir karaciğerde hepatositler çok ender hücre siklusuna girer ve bölünürler. Üçüncüsü, hepatosit enfeksiyonu, genellikle, üretkendir ama sitolitik değildir.

Benzerliklerinin yanında, hepatit virüslerinin enfeksiyon ve patogenezi mekanizmaları farklılık gösterir. Birincisi, hedef hücre belirliliği aynı olmasına rağmen, hepatositlere girmek için farklı reseptörleri kullanırlar. İkincisi, kalıcı enfeksiyonu sağlamak için farklı mekanizmaları kullanabilirler. Üçüncüsü, patogenezi mekanizmaları büyük ölçüde farklılık gösterir. Virüse bağlı olarak, akut hepatit fazında, genellikle 2 ila 6 haftalık sürede pek çok hepatosit enfekte olur ve virüs kana veya safra kanalına hepatositlerden akıtılır. Bu arada, bağışıklık sistemi, hücre öldürme ve hücre iyileştirme yöntemleri ile virüsü çıkarmaya çalışır. Karaciğer hastalığına, viral proteinlerin hücreler

üzerindeki direkt etkisi veya bağışıklık sisteminin hücre öldürmesi neden olur. Bağışıklık sistemi virüsü öldürmede başarısız olursa, kronik karaciğer hastalığı başlar. Farklı hepatit virüsleri, konağın savunma sisteminden kaçmak için farklı mekanizmaları gösterirler. Dolayısıyla viral hepatit, virüs-konak ilişkisinden kaynaklanan bir dinamik süreçtir.

## HEPATİT A VIRÜSÜ

Hepatit A virüsü, yetersiz hijyen koşullarında kolaylıkla yayılan bir virüsdür. Virüsün genomik yapısı diğer picornavirüslere benzer. HAV tek iplikli, pozitif anlamlı bir RNA virüsüdür. RNA, 7.5 kilobaz büyüklüğündedir ve 5' kodlanmayan bölgesinde (yaklaşık 735 nükleotidlik) iç ribozom giriş bölgesi (IRES) bulundurulur. IRES bölgesini 2225 aminoasitlik tek bir viral poliproteini kodlayan bölge, 3' kodlanmayan bölge ve kısa bir poli A kuyruğu takip eder. IRES dizisi, viral proteinlerin translasyonu için gereklidir. Virüs tarafından kodlanmış protein, Vpg (genoma bağlı viral protein), genomun 5' ucuna kovalent halde bağlı bulunur. Bu protein viral RNA replikasyonunda görev alır. Var olan dizi analizi verilerine göre, bütün HAV izolatları 7 grup altında toplanabilirler (%15 ve %25 oranında ayrılırlar). HAV RNA dizisi, diğer viral RNA'lara oranla daha kararlıdır, kültürdeki seri virüs geçişlerinde çok düşük mutasyon frekansı göstermiştir.

**Tablo 1.** Hepatit virüsleri

Virüs	Sınıflandırma (cins, aile)	Virion yapısı	Boyut (nm)	Genom	Virüs antijenleri	Geçiş yolu	Hastalıklar	Laboratuvar tanısı
HAV	Hepatovirus (Picomaviridae)	Zarfsız, ikosa-hedral	27	7.5-kb RNA çizgisel, ss (+)	VP1-4	Oral	Akut	IgM anti-HAV
HBV	Ortho-hepadnavirus (Hepadnaviridae)	Zarflı, küresel	42	3.2-kb DNA, yuvarlak, ds/ss	HBsAg HBcAg HBeAg Polimeraz	parenteral	Akut ve kronik	Anti-HBs Anti-HBc Anti-HBe HBsAg HBeAg Polimeraz tahlili Virion DNA (PCR)
		Zarflı, boş küresel veya borusal	22 20-200	HBsAg				
HCV	Hepacivirus (Flaviviridae)	Zarflı, küresel	30-80	9.5-kb RNA çizgisel, ss (+)	Kor E1 E2	Parenteral	Akut ve kronik	Anti-HCV virion RNA (RT-PCR)
HDV	Deltavirus (satellites)	Zarflı, küresel	36	1.7-kb RNA yuvarlak, ss (-)	HDAg HBsAg	Parenteral	Akut ve kronik	IgM/IgG anti-HDAg
HEV	Calicivirus (Caliciviridae)	Zarfsız, ikosa-hedral	32-34	7.6-kb RNA çizgisel, ss (+)	Kapsid (HEV)	Oral	Akut	IgM anti-HEV (kapsid)

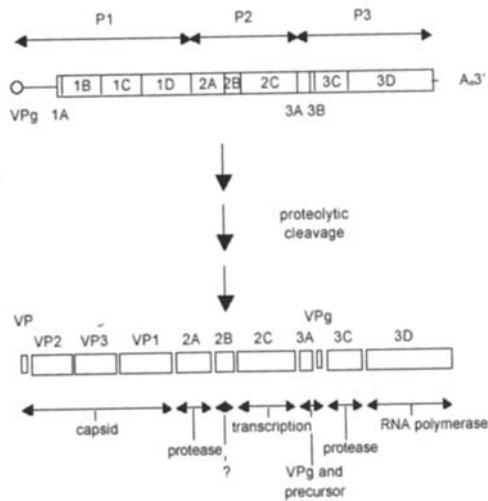
ss, tek iplik; HBcAg, hepatit B kor antijeni; HBeAg, hepatit B e antijeni; HBsAg, hepatit B yüzey antijeni; Ig, immünglobulin; RT-PCR, ters transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu; ds, çift iplik; (+), pozitif anlamlı; (-), negatif anlamlı.

HAV'ın birincil hedefi hepatositlerdir. Fakat doku kültürlerinde HAV'ın non-hepatik hücrelerde de yaşayabildiği görülmüştür. HAV verimli enfeksiyonlarında konağı öldürmez. HAV kültürde her zaman kalıcı enfeksiyon göstermesine rağmen, insanlarda kalıcı enfeksiyon gözlenmez. Tipik olarak, 2-4 haftalık inkübasyon fazı boyunca, karaciğer tarafından çok yüksek virüs üretimi olur

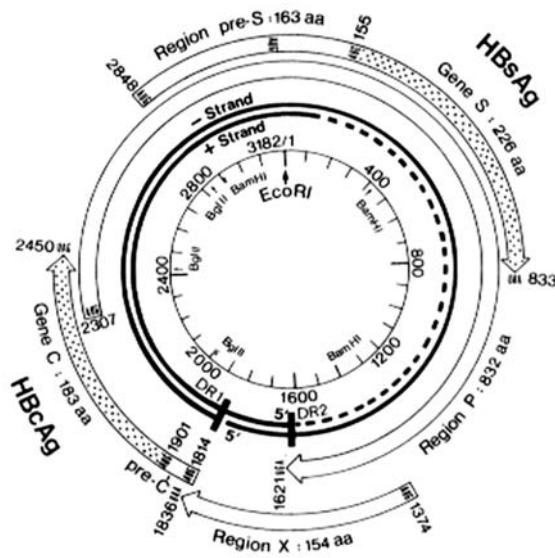
fakat karaciğer hastalığının belirtisi görülmez. Karaciğer hastalığı, iyileşme fazında, virüs üretimi çok azaldığında konağın bağışıklık sisteminin cevabının sonucu olarak görülür.

## HEPATİT B VİRÜSÜ

Hepatit B virüsü kan veya kan-türevi ürünlerle iletilir. HBV Hepadnaviridae ailesindedir. Bu ailedeki bütün virüsler 3.2 kilobaz büyüklüğünde çift-iplikli DNA bulundurulur. İki iplikte kovalent bağlı değildir. Eksi iplik tamamlanmıştır ve 9 nükleotidlik fazlalığı bulunmaktadır. Artı iplik her zaman tamamlanmamıştır ve değişken uzunluktadır, sabit bir 5' ucu bulunur fakat 3' uç değişkendir. Her iki ipliğin 5' ucu arasında kısa (HBV'de 220 baz çifti) bir yapıştıcı üst üste gelen bölüm bulunur. Her iki iplik 5' ucunda, 10-11 nükleotidlik iki direk-tekrar dizisi (DR1 ve DR2) içerirler. 17 bazlık, 5'-başlık içeren bir yapı, artı ipliğin 5' ucuna bağlıdır. Bir protein, viral RNA polimeraz, eksi ipliğin 5' ucuna kovalent olarak bağlıdır. HBV genomu, oldukça sıkı bir yapıdadır, 4 ORF (açık okuma bölgesi) içerir, her biri eksi DNA üzerinde kodlanmıştır ve birbirleri ile üst üste gelirler. Bundan başka, iki ORF çoklu proteinler kodlarlar: kor/prekor ORF iki protein üretir ( kor proteini ve

**Şekil 1:** HAV Genom Yapısı

e antijeni), S-ORF üç zarf proteini kodlar, S, M (S + preS2), ve L (S + preS2 + preS1) proteinleri. Bu proteinlerin bazıları aynı ORF'de kodlanmalarına rağmen farklı mRNA'lar tarafından üretilirler. Pol proteinini kor ve prekor proteinlerinin translasyonunda kullanılan pregenom RNA ile aynı translasyon iç başlangıcı tarafından üretilir. X mRNA sadece X proteinini üretir.



Şekil 2. HBV Genom Yapısı

HBV'nin konak hücre enfeksiyonunu takiben, viral kor parçacığı nükleusa taşınır, viral RNA serbest kalır, DNA'daki tek iplikli boşluk viral DNA polimeraz tarafından tamir edilir. Kovalent bağlı proteininin, eksi ipliğin ucundaki 9 bazlık fazlalık ve artı uçtaki RNA ayrılmasından sonra DNA tamamen çift-iplikli, kovalent kaplı dairesel (ccc) DNA'ya çevrilir. cccDNA bütün viral mRNA'lar için kalıp görevi görür. Bunlar arasında, viral DNA genomundan 120 nükleotid uzun olan pregenomik RNA da bulunur. Bütün RNA'lar aynı 3'-bitirme bölgesine sahiptir ve aynı poli-adenilasyon sinyalinin kullanılır. Bu mRNA'ların transkripsiyonu dört promotor ile sağlanır: kor/prekor, preS1, preS2/S, ve X. Bunların transkripsiyonu kor/prekor ve X promotorların üzerinde bulunan bir artıncı (enhancer) tarafından kontrol edilir; artıncı ve promotor ise genel ve karaciğer-belirli transkripsiyon faktörleri tarafından kontrol edilir. Bu durum HBV'nin neden karaciğerde replike olduğunu açıklar.

## HEPATİT C VİRÜSÜ

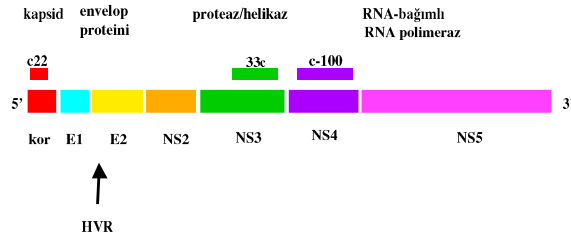
HCV, Flaviviridae ailesine ait Hepacivirus cinsindedir. Dizi analizi sonuçlarına göre, HCV 6 ana genotipe ve 11-12 subtipine ayrılır. HCV, quasispecies tanımı ile karakterize edilir. Bu, küçük nükleotid değişiklikleri ile birbirinden ayrılan RNA türlerini tanımlamada kullanılan bir terimdir. Bütün HCV izolatlan virüs partiküllerinden oluşan bir popülasyondan oluşurlar, burada bir master (pre-dominant) RNA türü ve diğer minor varyantlar bulunur. Quasispecies'lerin evrimi ve karmaşıklığı viral enfeksiyonun gelişimini belirler. HCV, 30-80 nm'lik, zarflı, küresel bir parçacıktır. 9.5 kilobazlık bir RNA genomudur. Zarf, iki zarf proteininden, E1 ve E2, oluşur, bunlar virion üzerinde uzantılar (spikes) oluştururlar. Zarfın içinde nükleokapsid bulunur ve genellikle ikosaedral şeklindedir.

Viral RNA, 3010 aminoasitlik bir polipeptidi kodlayan tek bir ORF bulundurmaktadır. Polipeptid, hücreye ait ve viral proteazlar tarafından 3-4 yapısal proteine ve 6 yapısal olmayan proteine parçalanır. RNA'nın 5'-ucunda, diğer bölgelere göre çok korunmuş olan (çeşitli virüs izolatlan arasında %30'dan fazla homoloji gösteren), 341 nükleotidlik 5'-UTR bölgesi bulunur. Bu bölge 4 stem-loop yapısı ve bir pseudoknot yapısı bulundurmaktadır ki bunlar IRES yapısını oluştururlar. IRES yapısı, HCV RNA'nın 5'-başlık yapısından bağımsız olarak translasyon mekanizmasını geliştirmesini sağlar. Bu mekanizma, anti-viral ajanlar için potansiyel hedefdir. 5'-UTR bölgesi çok korunmuş olması nedeniyle RT-PCR primer dizaynında kullanılır. RNA'nın 3'-ucunda, 200 nükleotidlik bir başka bölge, 3'-UTR, bulunur. 3'-ucun sonunda 98 nükleotidlik X bölgesi bulunur. Yeni çalışmalar, X bölgesinin tüm viral RNA'da en çok korunmuş olan bölge olduğu bulunmuştur. Şempanzelerde HCV RNA üzerinde yapılan delesyon mutasyonu çalışmalarında, değişken 3'-UTR bölgesinin değil, X bölgesi, poli-U bölgesi ve UC zengin dizilerin viral enfeksiyon ile ilişkili olduğu bulunmuştur.

HCV RNA tarafından kodlanan büyük polipeptid, selüler ve viral polimerazlar tarafından 9 veya 10 farklı proteine parçalanır. N-ucundan ilk protein, kor proteindir, virion nükleokapsidini oluşturur ve viral RNA ile kompleks oluşturur. E1 ve E2 proteinleri, zarf glikoproteinleridir ve virion yüzeyinde heterodimer oluştururlar. E2 proteini, virüsün reseptörlere bağlanması için gerekli bölgeyi bulundurmaktadır. E2, özellikle N-ucundaki iki HVR bölgesi, en fazla heterogeneite (farklılık) gösteren proteindir. E1'in fonksiyonu çok net değildir.

C-E1-E2-p7'nin birbirlerinden ve diğer proteinlerden ayrılması protein translasyonu sırasında, selülüler sinyal peptidazlar tarafından gerçekleşir. Diğer proteinler yapısal olmayan proteinlerdir yani virion yapısında yer almazlar. NS2 proteini bir metalloproteazdır, aktivitesi için Zn+2 iyonlarına ihtiyaç duyar. NS2, NS3 proteini ile birleştiğinde proteaz aktivitesi gösterir. NS2'nin bilinen tek fonksiyonu NS2 ile NS3 arasındaki bağı parçalamaktır. NS3 yine bir proteazdır (serin proteaz), geri kalan bütün bağları parçalar. NS3'ün 3'-ucunda nükleosid trifosfat (NTPaz)/helikaz aktivitesi bulunur, bu HCV translasyonu ve/ya RNA replikasyonu için önemli olabilir. NS4a, NS3 ile kompleks oluşturur ve proteaz aktivitesi için kofaktördür. NS4b ve NS5a proteinlerini fonksiyonları tam olarak bilinmemektedir. NS5a çok fosforile edilmiş bir proteindir. NS5b RNA bağımlı bir RNA polimerazdır. Viral RNA replikasyonu için gereklidir. Dolayısıyla anti-viral ajanlar için potansiyel hedeflerdir.

## Hepatit C Virüsü



Şekil 3. HCV Genom Yapısı

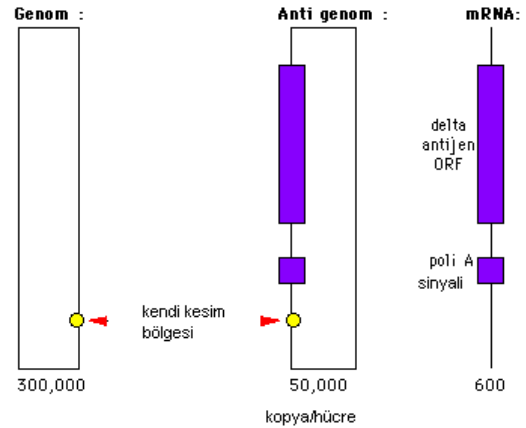
## HEPATİT D VİRÜSÜ

HDV, satelit virüs grubu olan Deltavirüs cinsinde sınıflandırılır. Geçiş için HBV'ye bağımlıdır, çünkü HDV kendi zarf proteinlerini kodlamaz. Fakat HDV diğer satelit virüslerinden farklı olarak, yardımcı virüsü HBV ile ortak sekans paylaşmaz ve HBV'nin yokluğunda replike olabilir tabii virüs partikülleri oluşmaz. HDV, 36 nm'lik küresel bir partiküldür, HBsAg'den oluşan bir zarfı vardır. Zarfın içinde HDAg ve RNA'dan oluşan nükleokapsid bulunur. HDAg, HDV tarafından kodlanan tek proteindir. Viral genom, 1.7 kilobazlık, dairesel, tek iplikli RNA'dır. Bu, insan virüsleri arasında, tek dairesel ve en küçük RNA'dır RNA'daki çoğu nükleotid, bir-biri ile komplementerdir ve intramoleküler baz çifti oluştururlar. Bu nedenle viral RNA çift iplikli gibi görünür. HDV RNA'nın kararlılığı da buradan kay-

naklanır. Viral RNA içinde küçük bir bölge (85 nükleotidlik) bir ribozim aktivitesi gösterir. RNA, protein faktörlerin yokluğunda kendini kesebilir.

HDAg'nin iki formu gözlenir: büyük formu (L-HDAg), 27 kilodalton ve küçük formu (S-HDAg) 24 kilodaltondur. Nükleokapsid oluşumundaki rolünün yanı sıra, HDAg, viral replikasyonda önemli rol oynar. S-HDAg, viral RNA replikasyonu için gereklidir, L-HDAg ise RNA replikasyonunu engeller fakat virion oluşumu için gereklidir. Kendi nükleer lokalizasyonunu belirleyen, dimerizasyon için ve RNA bağlanması için gerekli diziler içerir.

HDV, yalnız hepatositleri enfekte eder. HDV'nin zarfı HBV'nin yüzey antijenlerinden oluştuğu için, karaciğer hücrelerini enfekte etmek için HBV ile aynı reseptörleri kullanır. HDV kültür ortamında, HBV'den bağımsız olarak ve hepatik orijinli olmayan hücrelerde de replike olur. Bu da bize HDV'nin karaciğer spesifik faktörlere bağlı olmadığını gösterir.



Şekil 4. HDV Genom Yapısı

## HEPATİT E VİRÜSÜ

Calciviridae ailesine bağlıdır. 32-34 nm, zarfsız, küresel virüs parçasıdır. Viral kapsid ikosaedral yapı oluşturan düzenli kapsid proteinlerinden oluşur. Lipid zarfın yokluğu, virüs parçasının etere, kloroforma veya deterjana olan direncini açıklar. Kapsid içinde, 7.5 kilobazlık, tek iplikli, artı anlamlı, 5'-başlık yapısı ile birlikte poliadenile RNA bulunur. RNA, 3 çıkışan ORF bölgesi içerir. ORF1, 5'-ucundan 5 kilobazlık bölge, birkaç yapısal olmayan proteine ayrılan büyük bir polipeptini kodlar. Bu polipeptin, metil transferaz, papain-benzeri sistein proteaz, helikaz ve RNA bağımlı

RNA polimeraz içerir. ORF-2, RNA'nın 3'-ucunda bulunur ve kapsid proteini kodlar. Bu poliprotein HEV'in belirlenmesinde kullanılır. ORF3, diğer ikisinin arasındadır ve çakışır. 123 aminoasitlik fonksiyonu bilinmeyen immunojenik proteini kodlar. RNA'nın 5'-ucunda da 27 nükleotidlik bir uzantı bulunur.

## HEPATİT C VİRÜS RNA TESPİTİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER METOTLAR

HCV-RNA amplifikasyonu için 2 temel metodoloji geliştirilmiştir: hedef moleküllerin amplifikasyonu (cDNA-PCR, NASBA), ve hibridizasyon sinyalinin amplifikasyonu (bDNA). Tablo 1'de değişik stratejiler özetlenmiştir.

kez, otomatik bir inkübatörde tekrarlanması sonucu, primerlerle belirlenmiş olan alan çoğaltılmış olur.

HCV RNA dizisi ile ilgili yapılan çalışmalar sonucunda bu dizinin çok fazla çeşitlilik gösterdiği bulunmuştur. Bu çeşitliliğe rağmen korunan bölgelerde vardır. En çok korunmuş olan bölge, 5' UTR (kodlanmayan bölge) PCR da çoğaltılan bölgedir.

NASBA (Dizi tabanlı nükleik asit amplifikasyonu)

NASBA, amplifikasyon potansiyeli  $10^6 - 10^9$  kat olan, isotermal bir reaksiyondur. NASBA reaksiyonunda temel hedef RNA'dır. Standart reaksiyon; 3 enzim (T7 RNA-pol + RT + Rnase-H), 2 spesifik

**Tablo 2.** HCV-RNA belirlenmesinde değişik stratejiler

Test	Test prensibi	Ekstraksiyon/ izolasyon	Amplifikasyon enzimleri/ ısı	Belirleme	Kuantifikasyon yöntemi
<b>CDNA-PCR</b>	Hedef ampl.	Prot K+ fenol/kloroform+etanol Guanidin thiocyanate+fenol/kloroform + etanol Guanidin thiocyanate+ isopropanol + etanol Guanidin thiocyanate+ silika tanecekleri	RT + Taq pol veya Tth-DNA-pol/ non-isotermal	Jel + Etidium Bromide Oligomer hibridizasyonu+jel Southern Blotting + hibridizasyon	Sınırlı dilüsyon
<b>NASBA</b>	Hedef ampl.	Guanidine thiocyanate + silika tanecekleri	T7 RNA-pol + RT + Rnase-H/isotermal/tek tüp	Elektro-kemi-illuminensens	3 dahili kuantifikasyon standardı
<b>AMPLICOR</b>	Hedef ampl.	Guanidin thiocyanate+ isopropanol + etanol	Tth-DNA-pol/ Amperase/non-isotermal/tek tüp	Mikrotiter tabak hibridizasyonu ile enzim deteksiyonu	1 dahili kuantifikasyon standardı (monitor assay)
<b>bDNA</b>	Sinya lampl.	Mikrotiter tabakta lizis	Dalı DNA molekülleri	Kemi-illuminensens	Absorbe edilen ışık miktardan dışardaki bir standartla kıyaslanır

Ampl. = amplifikasyon; Prot K= proteinaz K; pol= polimeraz.

## CDNA-PCR

HCV bir RNA virusu olduğu ve PCR'da kalıp olarak DNA kullanıldığı için, HCV RNA önce cDNA'ya çevrilir. Daha sonra cDNA PCR ile çoğaltılır. PCR yönteminde reaksiyon karışımı sürekli tekrar edilen 3 aşamadan oluşur. İlk aşama, tek zincirli DNA elde etmek için DNA'nın ısı ile ayrılmasıdır (denaturasyon). İkinci aşama, DNA'nın karşılıklı ipliklerine, tamamlayıcı primer dizilerinin bağlanmasıdır (bağlanma). Son aşama her bir primerin enzim yardımı ile uzayarak yeni tamamlayıcı ipliklerin oluşmasıdır (uzama). Bu aşamaların 30-40

primer, nükleosid trifosfat ve uygun tampon koşullarını içerir.

## AMPLICOR

Amplicor testi 5 aşamadan oluşur: örnek hazırlanması, RNA'dan cDNA sentezlenmesi, cDNA molekülünden uygun primerlerle PCR amplifikasyonu, hedefe özel hazırlanmış oligonükleotid problemler ile DNA'nın hibridizasyonu, kolorimetrik belirleme ile proba bağlanmış DNA'nın ölçümü. Amplicor testi, cDNA sentezinin ve PCR amplifikasyonunun aynı tüpte gerçekleşmesini mümkün

---

kılar. Bu işlem Tth enzimi ile mümkün olmaktadır. Tth DNA polimeraz, manganez varlığında RT aktivitesi gösterir, böylece aynı tampon ortamında hem RT, hemde PCR aşamaları yapılabilir.

### **BDNA**

bDNA, spesifik DNA ve RNA tespitinde kullanılan sandviç hibridizasyon prosedürüdür. Genomik RNA, virionlardan salınır ve hemen mikrowell tabağa spesifik oligonukleotidler ile bağlanır, bunlar aynı zamanda capture problemlerinde hibridize haldedirler. bDNA molekülleri bir temel parça ve buna kovalent olarak bağlı halde pek çok ikincil parçadan oluşur. Mikrowell yapısına bDNA moleküllerinde hibridize olur. Alkalın fosfataz ile tespit edilen yapı, Semiluminesens madde eklenmesinden sonra absorbe edilen ışık ile ölçülür.

### **KAYNAKLAR**

1. Arias I. M., 2001. The liver Biology and pathology. 4. Edition. LWW
2. Reesink H. W. 1998. Hepatitis C. 2. Edition. Karger
3. <http://www.geocities.com/hbvinfo/hbvgenome1.htm>

### **HEPATİT B VİRÜS DNA TESPİTİ İÇİN KULLANILAN MOLEKÜLER METOTLAR PCR**

HBV genomunun prekor bölgesi uygun primerler ile çoğaltılır.

### **HYBRID CAPTURE SİSTEMİ (HCS)**

HCS HBV DNA , semiluminesens belirleme yöntemini kullanan bir sinyal amplifikasyon solüsyon hibridizasyon çalışmasıdır. Hedef DNA'yı içeren örnekler tüm uzunluktaki spesifik HBV RNA problemlerine (ad veya ay genotipinde) hibridize olur. RNA:DNA hibridleri, bunlara spesifik olarak hazırlanan antikorlar ile kaplanmış olan tüpe bağlanır. Sabitlenen hibridler, hibride özel hazırlanmış antikorlar ile bağlanmış olan alkaline fosfataz ile reaksiyona girer, ve semiluminesens substrat ile belirlenir.

4. <http://www.who.int/en/>

5. <http://www.virology.net>

6. <http://www.hhmi.princeton.edu>