

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**“EPSTEİN-BARR VİRÜS (EBV)” GENOMUNUN
PERİFERİK KANDAN PCR ve REAL-TIME PCR
İLE GÖSTERİLMESİ VE TİPLENDİRİLMESİ**

Deniz TAMER

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nejat AKAR**

2006-ANKARA

**TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**“EPSTEİN-BARR VİRÜS (EBV)” GENOMUNUN
PERİFERİK KANDAN PCR ve REAL-TIME PCR
İLE GÖSTERİLMESİ VE TİPLENDİRİLMESİ**

Deniz TAMER

**ÇOCUK SAĞLIĞI VE HASTALIKLARI ANABİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN
Prof. Dr. Nejat AKAR**

Bu tez, Ankara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Müdürlüğü
Tarafından 20040809174 Proje Numarası ile desteklenmiştir.

2006-ANKARA

İÇİNDEKİLER

İçindekiler	ii
Önsöz	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v
Şekiller	vii
Tablolar	viii
Diziler	ix
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
1.1. Genel Bilgiler	2
1.1.1. Onkojenik Virüsler ve Herpesvirüs Ailesi	2
1.1.2. Epstein-Barr Virüs (EBV)	3
1.1.3. EBV Latent Proteinleri	5
1.1.4. EBV Latent Proteinlerinin Fonksiyonları	8
1.1.4.1. EBNA1	8
1.1.4.2. EBNA2	9
1.1.4.3. EBNA3 Ailesi	9
1.1.4.4. EBNA-LP	10
1.1.4.5. LMP1	10
1.1.4.6. LMP2	13
1.1.5. EBV'nin Enfeksiyon Mekanizması	15
1.1.5.1 B-Hücrelerinin EBV ile Enfeksiyonu	15
1.1.5.2 Epitelyal Hücrelerin EBV ile Enfeksiyonu	17
1.1.5.3 EBV'nin Patogenez ve Patolojisi	17
1.1.5.3.1. Enfeksiyöz Mononükleoz (EMN)	17
1.1.5.3.2. Burkitt Lenfoma (BL)	18
1.1.5.3.3. Farklılaşmamış (Undiferansiye) Nazofarengeal Karsinoma (NK)	19
1.1.5.3.4. İmmün Yetersizlik Zemininde Lenfoproliferatif Hastalık	20
1.1.5.3.5. Hodgkin Hastalığı (HD)	21

1.1.5.3.6. T-Hücre Lenfomaları	22
1.1.6. EBV ile İlişkili Tümörlerde Viral Gen Ekspresyonu	23
1.1.7. EBV Soylarının Varyasyonları ve Virüs ile İlişkili Tümörler	24
1.2. MOLEKÜLER TEKNİKLER	25
1.2.1. DNA Ekstraksiyonu	25
1.2.2. Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	25
1.2.3. Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)	26
1.2.4 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesim	27
2. MATERYAL VE YÖNTEM	28
2.1 Materyal	28
2.2 Kullanılan Yöntemler	29
2.2.1 DNA İzolasyonu	29
2.2.1.1 Periferik Kandan DNA izolasyonu	29
2.2.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PCR=Real Time PCR)	30
2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)	31
2.2.3.1 EBNA3C geni, 95 bç.lik Delesyon Bölgesi Amplifikasyonu	31
2.2.4 Agaroze Jel Elektroforezi ile PCR Ürünlerinin İncelenmesi	33
2.2.5 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Muamelesi	34
2.2.5.1 EBNA3C Tip Tayininin BamHI Enzimi ile Netleştirilmesi	34
2.2.5.2 Çalışmanın Akış Şeması	34
3. BULGULAR	35
4. TARTIŞMA	39
5. SONUÇLAR VE ÖNERİLER	43
ÖZET	44
SUMMARY	45
KAYNAKLAR	46

ÖNSÖZ

Moleküler tanı yöntemlerini öğrenebileceğim en uygun yer olduğunu düşündüğüm Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı'nın tüm olanaklarını kullanmamı sağlayan; aynı zamanda bilgisini hiçbir zaman esirgemeyen değerli hocam Prof. Dr. Nejat AKAR'a;

Tez çalışmam sırasında her türlü konuda bana yardımcı olan değerli hocam Doç. Dr. Nurdan Taçyıldız'a; bilgilerini bizlerle paylaşan değerli hocam Doç. Dr. Mustafa Tekin'e;

Tecrübeleri ve bilgileriyle bizlerden desteğini esirgemeyen, dostluğuna da her zaman ihtiyaç duyacağım Uzman Biyolog Ece AKAR'a;

Kendisinden çok şey öğrendiğim dostum Uzman Dr. Zeynep Ceren KARAHAN'a; birlikte çalışmaktan her zaman büyük mutluluk ve gurur duyduğum, sadece çalışma arkadaşları değil hayatım boyunca yanımda olacaklarına inandığım dostlarım Uzman Biyolog Duygu DUMAN'a, Uzman Biyolog Ayşenur ÖZTÜRK'e, Uzman Biyolog Buket DEMİR'e, Uzman Biyolog Tuğba ARICAN'a; Tekniker arkadaşlarım Ahmet HANULUK ve Kadir SİPAHİ'ye;

Maddi-manevi her türlü desteği veren, bu zor günlerinde dahi hep yanımda olduklarını bildiğim ve her zaman aynı şekilde devam etmesini umduğum babam Orhan TAMER ve annem Selma TAMER'e; gösterdiği sabır, anlayış ve destek için hayat arkadaşım Özgür TOPDAĞI'na teşekkür ederim.

SİMGELER VE KISALTMALAR

A	:Adenin bazı
Ala	:Alanin aminoasiti
ALL	: Akut lenfoblastik lösemi
AML	: Akut myelositer lösemi
BCR	:B-hücre reseptörü
bç	:Baz Çifti
BL	:Burkitt Lenfoma
C	:Sitozin bazı
CMV	:Citomegalovirüs
Csk	:C-terminal src Kinaz
CTL	:Sitotoksik T-lenfosit
ddH ₂ O	:Deiyonize su
DNA	:Deoksiribonükleik asit
dNTP	:Deoksiribonükleotid Trifosfat
EBER	:EBV Kodlayan RNA
EBNA	:EBV Nükleer Antijeni
EBNA-LP	:EBNA Lider Proteini
EBV	:Epstein-Barr Virüs
EDTA	:Etilendiamintetraasetik asit
EMN	:Enfeksiyöz Mononükleoz
g	:Gram
G	:Guanin bazı
Gly	:Glisin aminoasiti
HD	:Hodgkin Hastalığı
HHV	:Human Herpes Virüs
HPV	:Human Papilloma Virüs
HSV	:Herpes Simpleks Virüs
Ig	:İmmünglobulin

IL-6	:İnterlökin-6
ITAM	:İmmüno Reseptör Tirozin Bazlı Aktivasyon Motifi
Lat	:Latency (latentlik)
LCL	:Lenfoblastoid Hücre Serileri
LMP	:Latent Membran Protein
M	:Molar
Mg ⁺⁺	:Magnezyum iyonu
MgCl ₂	:Magnezyum Klorür
ml	:Mililitre
mM	:Milimolar
µl	:Mikrolitre
µg	:Mikrogram
NHL	:Non-Hodgkin Lenfoma
NK	: Nazofarengeal Karsinoma :
PCR	:Polimeraz Zincir Reaksiyonu
PTK	:Protein Tirozin Kinaz
PTLD	:Post-transplant Lenfoproliferatif Bozukluklar
RE	:Restriksiyon endonükleaz
RMS	: Rabdomyosarkom
RNA	:Ribonükleik asit
SDS	:Sodyum Dodesil Sülfat
T	:Timin bazı
TBE	:Tris-HCl, Borik asit, EDTA
TE	:Tris-EDTA
TNFR	:Tümör Nekrozis Faktör Reseptörü
TRADD	:TNFR ile ilişkili Ölüm Domain Proteini
UNPC	:Farklılaşmamış Nazofarengeal Karsinoma
VCA	:EBV kapsit antijeni
VZV	:Varisella Zoster Virüs
XLA	:X'e bağlı gammaglobulinemia

ŞEKİLLER

Şekil 1. Epstein-Barr Virüs (EBV) genom haritası

Şekil 2. Sağlıklı virüs Taşıyıcılarında Epstein-Barr (EBV) Enfeksiyonu

Şekil 3. EBNA3C geninin PCR ile çoğaltılması sonucu oluşan 153 ve 246
bp'lik PCR ürünü

Şekil 4: Gerçek zamanlı PCR ve EBNA3C PCR ile elde edilen EBV sonuçları

TABLÖLAR

Tablo 1. Herpesvirüslerin sınıflandırılması

Tablo 2. Çalışmamızda yer alan pediatrik onkoloji olgularının bulguları ve tanıları

DİZİLER

Dizi 1. EBNA 3C geninin PCR ile çoğaltılan 246 bç'lik bölümü.

1. GİRİŞ VE AMAÇ

Herpes virüsler, yaygın görülen hastalıklara neden olması bakımından önemli virüs aileleri arasında yer alırlar. Bu ailenin bir üyesi olan Epstein-Barr Virüs (EBV); bir çok onkolojik hastalığın patogenezinde rol oynamaktadır. İnsanlarda kansere neden olan bu virüs, moleküler yapısı bakımından da ilginçtir. Teknoloji geliştikçe, geçmişte anlaşılması imkansız olduğu düşünülen birçok hastalığın tanısı-patogenezin aydınlatılması günümüzde mümkün olmaktadır.

Bu tez çalışmasının amacı; çocukluk çağı malign hastalıklarından özellikle Burkitt Lenfoma, Hodgkin Lenfoma ve Lösemide (lenfoid malign hastalıklar grubu) etyolojik ajan olabilecek tümör virüslerinden EBV'nin periferik kan örneklerinden saptamak için yeni bir teknoloji olan "Real-Time PCR" ile klasik PCR tekniğinin karşılaştırılması olarak belirlenmiştir. Bu doğrultuda malign hastalıklı çocukların perifer kanlarından elde edilen DNA örnekleriyle çalışılmıştır.

Bugüne kadar ülkemizde yapılan EBV genom çalışmaları tümör dokusunda gerçekleştirildiğinden; periferik kan örneğinde çalışmanın yapılması ayrıca önem kazanmaktadır. Tümör dokusu haricinde hem ülkemizde hem de literatürde bu sorunun ilk kez yanıtlanacak olması açısından önemlidir.

1.1 GENEL BİLGİLER

1.1.1 Onkojenik Virüsler ve Herpesvirüs Ailesi

Onkojenik virüsler sadece hastalık ve kanser etkeni olarak değil, hücrede transformasyona eşlik eden hücresel ve moleküler değişikliklerin anlaşılmasını sağlayan model sistemler olarak da kanser araştırmalarında büyük önem taşımaktadırlar. İnsan kanserleri ile ilişkili virüsler 4 ana grup altında toplanmaktadır. Bunlar; Papova virüsler, Herpes virüsler, Hepadna virüsler ve Retrovirüsler'dir. RNA tümör virüsleri ile ilgili çalışmalar, neoplazide hücresel onkogenlerin önemini ortaya çıkarmıştır. DNA tümör virüslerinin hücresel tümör supresör genler için de önemli rol oynadığı gösterilmiştir. Herpes virüsler, yaygın görülen hastalıklara neden olması bakımından önemli virüs aileleri arasında yer alırlar. Herpes virüsler çekirdekte replike olan, kapsidli, zarflı DNA virüsleridir. Tüm omurgalıları enfekte edebilme yeteneğine sahiptir (Brooks G.F. ve ark., 1989).

Herpes virüsler; doku tropizmi, patojenite ve kültür koşullarındaki davranışlarına göre üç alt aileye ayrılırlar:

- **Alfaherpesvirüsler (sitolitik)**: Nörotropik, replikasyon döngüsü hızlı, yaygın konak ve hücre yelpazesi olan virüslerdir. Kliniği oral Herpes olan HSV-1, kliniği genital Herpes olan HSV-2 ve kliniği suçiçeği ve zona olan VZV (Varisella Zoster Virüs) bu grup altında yer almaktadır.

- **Betaherpesvirüsler (sitomegalik)**: Genom büyüklüğü ve yapısı farklı, daha yavaş replike olan, glandüler hücreler ve/veya lenfoid doku hücrelerinden oluşan ve hücre tutulum aralığı daha kısıtlı olan virüslerdir. Kliniği retinit olan CMV (sitomegalovirüs), kliniği *Exanthema subitum* olan Roseola virüs bu grubun üyeleridir.

- **Gammaherpesvirüsler(lenfoproliferatif):**

Alfaherpesvirüslere göre daha yavaş replike olurlar. Lenfoid doku hücrelerinden oluşur ve hücre tutulum aralığı kısıtlı olan virüslerdir. Kliniği Kaposi's Sarkoma olan HHV-8 ve kliniği Mononükleoz ve Lenfoma olan EBV (Epstein-Barr Virüs) bu gruba ait örnekler olarak gösterilebilir (Tablo 1).

Tablo 1. Herpes virüslerin sınıflandırılması

ALTFAMİLYA	BİYOLOJİK ÖZELLİKLER			GENUS	ÖRNEKLER	
	Gelişim	Sitopatoloji	Latent Enfeksiyonlar		Resmi İsim	Genel İsim
Alfaherpesvirinae	Kısa	Sitolitik	Nöronlar	Simpleksvirüs	HHV-1, HHV-2	HSV-1, HSV-2
				Varisellavirüs	HHV-3	VZV
Betaherpesvirinae	Uzun	Sitomegalik	Böbrekler	Sitomegalovirüs	HHV-5	CMV
		Lenfo-proliferatif	Lenfoid Doku	Roseolavirüs	HHV-6, HHV-7	HHV-6, HHV-7
Gammaherpesvirinae	Değişken	Lenfo-proliferatif	Lenfoid Doku	Lenfokriptovirüs	HHV-4	EBV
				Radinovirüs	HHV-8	KS

1.1.2 Epstein-Barr Virüs (EBV)

EBV, Lympocryptovirüs genusunun bir üyesidir. Bu virüsler, Gammaherpesvirüs ailesiyle yakın ilişkili üyelerdir. Gen organizasyonu ve genomik yapı bakımından birbirleriyle aynı yapıdadır. EBV genomu yaklaşık 172 kb uzunluğunda çizgisel çift iplikçikli DNA'dan oluşur ve EBV genom bölgeleri, genomun BamHI restriksiyon endonükleaz haritasındaki pozisyonuna bağlı olarak açıklanır.

EBV oral geçişlidir ve enfekte virüs, Enfeksiyöz Mononükleoz (EMN) hastalarının oral sekresyonlarından, immünolojik olarak baskılanmış bireylerden ve sağlıklı EBV seropozitif bireylerden tayin edilebilir (Yao Q.Y.

ve ark., 1985). EBV'nin tek hedef hücresi B-lenfositlerdir. İnsan B-lenfositleri EBV ile enfekte olduğunda sürekli hücre kültürleri elde edilebilir. Hücreler virüs tarafından ölümsüzleştirilir. Enfeksiyonun başlaması için önce B-hücre yüzeyinde yer alan ve aynı zamanda C3d kompleman komponentininde reseptörü olan virüs reseptörüne bağlanır (CR2=CD21). EBV, lenfositte latent döneme girer. Bu dönemde tam bir viral replikasyon olmaz (Brooks G.F. ve ark., 1989).

EBV, B-hücrelerine majör glikoprotein gp350/220'nin kompleman reseptör ile etkileşimi sonucu nüfuz eder. EBV'nin B hücrelerine girişi aynı zamanda viral glikoproteinler olan gp25 (gL), gp42/38 ve gp85 (gH) içermektedir. Bu kompleks EBV ve MHC classII molekülleri arasındaki etkileşime arabuluculuk eder. Aynı zamanda MHC classII B-hücrelerine virüs girişinde ko-reseptör olarak görev yapmaktadır (Knox P.G., Young L.S. ve ark., 1995).

CD21'in çapraz bağlanması B-hücrelerini aktive eder. Bu bağlanma olayından sonra oluşan ilk etkiler Lck aktivasyonu ve Ca^{+2} mobilizasyonudur. Bunu, artan mRNA sentezi, homotipik hücre adezyonu, blast transformasyonu, yüzey CD23 ekspresyonu ve IL-6 oluşumu takip eder. Viral genomun kapsidsiz olması nükleusa transferi; Wp promotorundan sirkülasyon ve transkripsiyonu, bütün latent genlerin ekspresyonunu sağlayan kaskatı başlatır. EBV nükleer antijeni (EBNA) lider proteini (EBNA-LP) ve EBNA2 tayin edilen ilk proteinlerdir. Bunlar hücre döngüsünün erken G1 fazına yeterli hazırlığı yapmaktadır. EBV ile enfekte hücreler (EBV⁺), yüksek hücre yoğunluğuna ve B-hücre gelişiminde başı çeken sitokinlerin üretilmesine dayanan bir tarzdadır. Daha sonra EBV⁺ hücreler daha hızlı gelişen ve otokrin gelişme mekanizmasında daha az bağımsız olan hücelere dönüşürler. Virüs, in vivo enfeksiyonu takiben, hafıza B-hücreleri içinde latent enfeksiyon oluşturur ve bu olay latent genlerin sınırlı ekspresyonu ile kendisini gösterir (Murray P.G. ve Young L.S., 2001).

EBV'nin B-hücrelerini ölümsüzleştirebilme yeteneği oldukça yüksektir. Virüs hücre yüzeyine tutunduktan sonra hücreler, hücre döngüsüne girmek üzere aktive edilir. Bu sırada bazı viral genler eksprese olur ve hücreler devamlı ve kontrolsüz bir şekilde çoğalma özelliği kazanır. Lineer olan EBV genomu bir halka oluşturur ve çoğalır. Viral DNA'nın çoğu, enfekte hücrelerde sirküler epizomlar halinde varlığını sürdürürken, bazıları hücre genomuna entegre olur. EBV ile enfekte olan B-hücreleri, immünglobulin üretimi gibi bazı farklılaşmış fonksiyonları dışa vurur. Aynı zamanda B-hücre aktivasyon ürünleri de (CD23 gibi) eksprese olur. İmmortalize hücrelerde en az 10 viral gen ürününün eksprese olduğu gösterilmiştir (Kieff E. ve ark., 1996).

Ölümsüzleşen B-hücre populasyonundaki hücrelerin çok azı (<%10) viral partikülleri serbestleştirir. Latentlik duraklatılabilir ve EBV genomu, çeşitli uyaranlar sonucunda aktive olarak replikasyona başlayabilir. Bu uyaranlar arasında, hücrelerin in-vitro kültürü ve kimyasal indükleyici ajanlar yer alır. Konağa bağlı değişkenler iyi anlaşılabilmiş değildir. Ancak bunlar da latentlikten viral senteze geçiş hızını belirlerler (Brooks G.F. ve ark., 1989).

1.1.3 EBV Latent Proteinleri

Kronik virüs taşıyıcılarının periferik kan lenfositleri kültüre alındığında, spontan olarak EBV'ye dönüşen az miktarda EBV⁺ B-hücrelerin düzenli olarak geliştiği gözlenmektedir. Bunlar lenfoblastoid hücre serileri (LCL) olarak bilinen ölümsüz hücre serileridir (Rickinson A.B. ve ark., 1984).

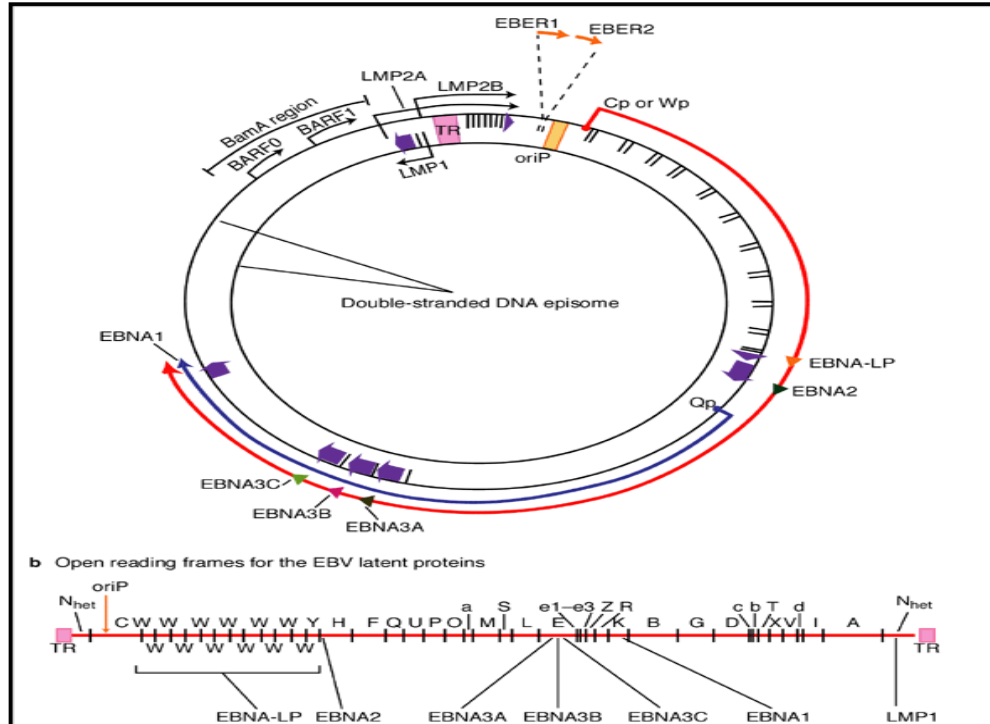
Eksprese oldukları viral siklus fazına göre EBV antijenleri 3 sınıfa ayrılır.

- **Latent faz antijenleri:** Latent olarak enfekte olan hücrelerde sentezlenen antijenlerdir. EBNA ve LMP'ler bu gruba dahildir. Bu antijenlerin ekspresyonu, EBV genomunun varlığını gösterir. Değişmeksizin eksprese olanlar sadece EBNA1 olup, EBNA1 viral epizomlarının devamlılığı için gereklidir. Diğer latent faz antijenlerinin ekspresyonu, farklı hücrelerde regüle edilebilir. LMP2 ekspresyonu, latentlikte reaktivasyonu engeller.
- **Erken antijenler:** Yapısal olmayan proteinlerdir. Bunların sentezi viral DNA replikasyonuna bağımlı değildir. Bu antijenlerin ekspresyonu, prodüktif viral replikasyonun başladığını gösterir.
- **Gec antijenler:** Viral kapsid (kapsid antijen) ve zarfın (membran antijen) yapısal komponentleridir. Özellikle prodüktif viral enfeksiyon geçiren hücrelerde üretilir (Brooks ve ark, 1989).

Lenfoblastoid hücre serilerindeki her hücre, dairesel ekstrakromozomal viral DNA'nın birçok kopyasına sahiptir. Bu hücreler, 6 nükleer antijen içeren birçok latent protein taşımaktadır. Bu proteinler; EBNA 1,2,3a,3b,3c ve EBNA-LP'dir. Ayrıca 3 adet latent membran protein içerirler; bunlar LMP 1,2a ve 2b'dir (Kieff, 1996). Aynı zamanda viral genomun BamHI-A bölgesinden transkriptler tayin edilmiştir (Murray ve Young, 2001). Latent proteinlere ek olarak, LCL'ler bol miktarda kodlama yapmayan RNA'ların ekspresyonunu gerçekleştirirler (EBER 1,2). Bu transkriptlerin fonksiyonları tam olarak belli olmamakla birlikte, tüm latent EBV enfeksiyonlarında eksprese olduğuna ve tümörlerdeki EBV tayininde mükemmel rol oynadığına inanılmaktadır (Murray ve Young, 2001). Farklı EBNA'lar mRNA'lar tarafından kodlanırlar. Bu mRNA'lar aynı uzunluktaki primer transkriplerin farklı şekilde bölünmelerinden oluşturulurlar. Bu

transkriptler, genomun BamHI-C ve W bölgelerinde birbirine yakın lokalize olan 2 promotorun (Cp veya Wp) birinden eksprese olurlar. B-hücre enfeksiyonunda Wp'den Cp'ye bir değişiklik oluşur. EBV genomunun BamHI-N bölgesinde sol yöne doğru LMP1, sağ yöne doğru LMP2B olmak üzere farklı promotorlardan LMP transkriptleri eksprese olur (Speck ve Strominger, 1989). Latent EBV gen ekspresyonunun bu paterni EBV enfeksiyonunun "Latency III (Lat III)" formu olarak adlandırılır. Bu lenfoblastoid hücre serileri ve birçok post-transplant lenfomalar için karakteristiktir (Murray ve Young, 2001).

EBV latentliğinin en az iki başka formu daha gözlenmektedir. Lat I, Burkitt's Lenfoma (BL) için karakteristiktir. Bunda EBNA1, EBER'ler ve BamA transkriptleri görülmüştür. Lat II, EBV'ye bağlı Hodgkin Hastalığında (HD) ve farklılaşmamış Nazofarengeal Karsinoma'da (UNPC) gözlenir. EBER'ler, EBNA1 ve BamA transkriptleri LMP1 ve LMP2 ile birlikte eksprese olmaktadır. Lat I ve Lat II'de EBNA1, Wp yada Cp yerine Qp promotorundan transkribe olmaktadır (Murray ve Young, 2001).



Şekil 1. Epstein-Barr Virüs (EBV) genom haritası

1.1.4 EBV Latent Proteinlerinin Fonksiyonları

B-hücrelerinin EBV tarafından transformasyonu, çeşitli latent gen ürünlerinin koordine hareketlerini içermektedir. Tümörlerdeki EBV gen ekspresyonunun sınırlandırılmış modellerinin ispatıyla bu proteinlerin fonksiyonları daha fazla ilgi çekmeye başlamıştır (Murray ve Young, 2001).

1.1.4.1 EBNA1

EBNA1, epizomal EBV genomunun korunumu ve replikasyonu için gerekli olan ve DNA bağlayan bir proteindir. Bu fonksiyon, EBNA1'in viral replikasyonun plazmid orijini olan "oriP"ye bağlanmasıyla kazanılmıştır (Kieff, 1996). EBNA1 aynı zamanda Qp'nin kendi ekspresyonunu ters yönde ayarlamak için aşağı doğru olan iki bölgesi ile etkileşir (Nonkwelo ve ark., 1996). EBNA 1 transkripsiyonal bir transaktivatör olarak hareket ederek Cp ve LMP 1 promotorunu regüle eder (Kieff, 1996).

EBNA1 proteini, farklı EBV izolatlarında farklı büyüklüğe sahip glisin-glisin-alanin (Gly-Gly-Ala) tekrar dizileri içerir (Kieff, 1996). Bu tekrar alanı sınırlandırılmış MHC class 1'in cis etkili inhibitörüdür ve antijen sürecini ubiquitin-proteozom kaskadı yolu ile inhibe ederek fonksiyonu açığa çıkarır (Levitskaya ve ark., 1995). EBNA 1 oluşturan peptidlerdeki hata hedef hücrelerde eksprese olduğunda inefektif CD8⁺ T-hücrelerinin EBNA1 cevabı ile sonuçlanır (Wilson ve ark., 1996).

Yapılan bir çalışmada, transgenik farelerdeki B-hücrelerinde EBNA1 ekspresyonu B-hücre lenfomasiyla sonuçlandığı gösterilmiştir. Bu da onkogeneziste EBNA1'in direkt rolü olabileceğini öne sürmektedir (Wilson, Bell ve Levine, 1996).

1.1.4.2 EBNA2

EBNA2, hem hücresel hem de viral genler için bir transkripsiyonel aktivatördür; LMP1 ve LMP2 kadar iyi bir şekilde CD21 ve CD23 içeren belirli B-hücre antijenlerinin ekspresyonunu regüle eder (Kieff, 1996). EBNA2 aynı zamanda Cp promotorunu transaktive eder. Bunu B-hücre enfeksiyonunda erken dönemde gözlenen Wp'nin Cp'ye dönüşümünü indükleyerek gerçekleştirir. EBNA2, aynı zamanda bir çok yerde bulunan ve DNA bağlayan bir protein olan RBP-Jk ile etkileşir (Grossman ve ark., 1994). Ayrıca c-myc onkogeni de EBNA2'nin transkripsiyonel hedefidir. Bu, EBV'nin indüklediği B-hücre proliferasyonunda önemli olan bir etkidir (Kaiser ve ark., 1999).

1.1.4.3 EBNA3 Ailesi

Rekombinant EBV ile yapılan çalışmalar, in vitro B-hücre transformasyonunda EBNA3A ve EBNA3C gerekliken, EBNA3B'nin zorunlu olmadığını göstermiştir (Robertson, 1997). EBNA3C hem hücresel (CD 21) hem de viral (LMP1) gen ekspresyonunun regülasyonunu indükleyebilir (Allday ve Farrell, 1994) ve Cp promotorunu baskı altında tutabilir (Radkov ve ark., 1997). Transformasyonu desteklemek için retinoblastoma proteini pRb ile etkileşebilir (Parker ve ark., 1996). Transformasyon için zorunlu olmasına rağmen EBNA 3B, vimentin ve CD40'ın ekspresyonunu indüklemektedir (Silins ve Sculley, 1994). EBNA3 proteinleri RBP-Jk transkripsiyon faktörleriyle ilişkide bulunurlar ve RBP-Jk, aynı kökten gelen Jk dizileri ve EBNA2'ye bağlanmalarını transaktivasyona arabuluculuk eden EBNA2'yi baskılayarak aksatır. Bundan dolayı EBNA2 ve EBNA3 proteinleri, RBP-Jk aktivitesini kesin olarak kontrol etmek amacıyla birlikte çalışırlar. Bunu aynı kökten gelen Jk dizileri içeren hücresel ve viral promotorların ekspresyonunu regüle ederek yaparlar. Son zamanlarda EBNA3C'nin, insan histon deasetilaz-1 ile

etkileştiği gösterilmiştir. Bu enzim, Cp'nin RBP-Jk tarafından transkripsiyonel olarak baskılanmasına katkıda bulunmaktadır (Radkov ve ark., 1999).

1.1.4.4 EBNA-LP

EBNA-LP, her bir EBNA mRNA'larının öncüleri tarafından kodlanır ve bir miktar EBV izolatı tarafından saklanan BamHIW tekrarlar miktarına dayanan değişik büyüklükte bir protein kodlar. EBNA-LP in vitro B-hücre transformasyonu için kesin olarak gerekli olmamasına rağmen lenfoblastoid hücre serilerinin verimli gelişebilmesi için gereklidir (Allan ve ark., 1992). EBNA-LP ve EBNA2'nin primer B-hücrelerine dönüşümü, siklin D2 ekspresyonunun regülasyonu tarafından G₀'ın G₁'e dönüşümünü uyarır (Sinclair ve ark., 1994). EBNA-LP aynı zamanda EBNA2 ile birleşerek EBNA2'nin LMP1 içeren transkripsiyonel hedeflerini regüle eder (Rickinson, 1997). EBNA-LP'nin pRb ile birlikte lenfoblastoid hücre serilerinde lokalize olduğu gösterilmiştir ve in vitro biyokimyasal çalışmalar, EBNA-LP'nin hem pRb hem de p53 ile ilişkisi olduğunu kanıtlamıştır (Szekely ve ark., 1993). Fakat bu ilişki lenfoblastoid hücre serilerinde doğrulanmamıştır ve human papillomavirüsteki (HPV) durumdan farklı olarak kodlanan E6/E7 ve adenovirüs E1 proteinlerinde EBNA-LP ekspresyonunun pRb ve p53 kaskadlarının regülasyonunda bir etkisi yoktur (Wilson ve ark, 1996).

1.1.4.5 LMP1

LMP1'in fonksiyonunda en az dört adet kaskad bulunmaktadır. Bunlar NF-kB, JNK/AP-1, p38/MAPK ve JAK/STAT'dır. LMP'in C-terminalinde en az iki aktive eden bölge bulunur. Bunlar CTAR1 ve CTAR2'dir (C-terminal'i aktive eden bölgeler 1 ve 2). CTAR1 membrana

proksimal olarak lokalizedir (aminoasit 351-386) ve EBV⁺ B-hücrelerinin uzun dönem gelişimi için gereklidir (Izumi ve Kieff, 1997).

LMP1'in lenfositlerdeki ekspresyonu, transkripsiyon faktörü NF-kB'nin aktivasyonu ve anti-apoptotik bir gen olan bcl-2 ve A20 geninin ekspresyonunun denetlenmesi gibi çeşitli hücresel değişiklikleri indüklemektedir (Laherty ve ark., 1992; Rowe ve ark., 1994). Transkripsiyon faktörü NF-kB'nin aktivasyonu doğrusal olmayan hücre sinyalindeki LMP1'in önemindeki ilk belirtidir. Hem CTAR1, hem de CTAR2, NF-kB'yi bağımsız olarak aktive edebilir (Huen ve ark., 1995). CTAR2, NF-kB aktivasyonuna arabuluculuk yapan LMP1'in büyük çoğunluğunun (%70-80) tümör nekrosiz faktörü reseptörü (TNFR) ile ilişkili ölüm domain proteini (TRADD) ile etkileşimini açıklar. Geri kalan NF-kB aktivasyonuna arabuluculuk yapan LMP1'in %20-30'u CTAR1 P²⁰⁴XQ²⁰⁶XT²⁰⁸ motifinden elde edilir. Bu motif TNF ile ilişkili birçok faktörle etkileşmektedir (Devergne ve ark., 1996).

LMP1, JNK (c-Jun N-terminal kinaz) kaskadını yalnızca CTAR2 yolu ile aktive eder (Eliopoulos ve ark., 1999). Oysa p38/MAPK kaskadının aktivasyonunda hem CTAR1 hem de CTAR2 arabuluculuk etmektedir. LMP1'in C-terminalindeki 33 baz çiftlik tekrara sahip proline zengin bir dizi Janus kinaz 3 (JAK3)'ün aktivasyonuna arabuluculuk eder (Gires ve ark., 1999).

LMP1'in plazma membranı içindeki agregasyonu için kritik bir önkoşuldur ve transmembran domeynlerin instrinsik bir özelliği olarak ortaya çıkar (Gires ve ark., 1997). LMP1, lipid yığınlarında zenginleştirilmiştir ve hücre iskeletiyle ilişkidir. Transmembran domeynleri, LMP1'i lipid yığınlarına yönlendirmekten sorumludur, oysa LMP1'in TRAF molekülleriyle etkileşimi LMP1'in hücre iskeletiyle ilişkisi için önemlidir (Higuchi, Izumi ve Kieff, 2001). LMP1 ve TNFR ailesi arasındaki en önemli fark; LMP aktive edilmiş bir reseptör olarak fonksiyon

gösterir ve bundan dolayı bir ekstraselüler ligantın bağlanmasında uygun değildir. Ekstraselüler ve CD2, CD4 transmembran bölümlerinden meydana gelen kimerik molekül deneyleri ya da sinir büyüme faktör reseptörü (NGFR)'nün LMP1'in C-terminaline yapışması, LMP işaretlenmesi sadece kimerizmin ligant bağlama ya da antikoru indükleyen agregasyonu tarafından ortaya çıkarıldığını göstermiştir (Gires ve ark., 1997). Aksine, CD40 sitoplazmik kuyruğu, LMP1'in transmembran domeynlerine ve N-terminaline bağlandığında aktif olarak geri verilmektedir (Hatzivassiliou ve ark., 1998).

Çinli ya da Tayvanlı Farklılaşmamış Nazofarengeal Karsinoma (UNPC) hastalarından elde edilen, LMP1 kodlayan EBV izolatlarının klonlanması ve dizilmesiyle bir çok mutasyon tanımlanmıştır. Bu ilk eksonda, Xho1 restriksiyon alanında kayba yol açan nokta mutasyonunu içeren prototip B95.8 türünden kaynaklanır. Bu prototip, CTAR2'nin üstünde C-terminalinde 30 baz çiftlik bir delesyon ve çok sayıda nokta mutasyonu içermektedir (Hu ve ark., 1991). Bu del LMP1 varyantları in vitro koşullarda artmış tümörijenite göstermektedir (Li, Chang ve Liu, 1996).

Sung ve arkadaşlarının (1998) yapmış olduğu bir çalışma ile EBV'nin iki soyu belirtilmiştir. Bu soylar Çin 1 ve 2 olarak Güney Çin'in endemik bölgelerindeki sıklığa göre bildirilmiştir. Soylar sırasıyla, Xho1 polimorfizmi ve 30 bç'lik delesyon içermektedir. Yine Japonya'daki viral izolatlar da karboksi terminaldeki 30 bç'lik delesyonun yüksek prevalansını rapor etmişlerdir (Itakura ve ark., 1996). Ülkemizde ise 69 bç'lik bir delesyonun sık olarak bulunduğu Burkitt Lenfomalı olgularda bildirilmiştir (Taçyıldız ve ark., 1998). Ayrıca, Malezyalı nasofarengeal karsinoma hastalarında LMP1'in analizi çalışmaları gerçekleştirilmiş ve çifte enfeksiyonun bir kanıtı olan yüksek prevalanslı 30 bç'lik delesyon ve Xho1 polimorfizmine rastlanmıştır (Tan ve ark., 2003).

İlk çalışmalarda, delLMP1 varyantının özel olarak nasofarengeal karsinoma ile ilişkili olduğu düşünülmüştür. Ancak, daha sonra T-hücre lenfomalarında, Hodgkin hastalarında (HD), Enfeksiyöz Mononükleoz (EMN) hastalarında ve sağlıklı kontrollerden elde edilen lenfoblastoid hücre serilerinde de tespit edilmiştir. Sağlıklı virüs taşıyıcıları da bu mutasyonlara, aynı coğrafi bölgede yaşayan virüsle enfekte tümör taşıyıcıları ile benzer sıklıkta sahiptirler (Khanım ve ark., 1996), fakat HIV⁺ HD'lerle HIV⁻ HD ve pediatrik HD'lerle normal kontroller karşılaştırıldığında; bu delesyon çeşitliliğinin artan bir insidans gösterdiği görülmektedir (Santon ve Bellas, 2001).

Japonya'da yapılan bir çalışmada LMP1 geninin 30 bç'lik delesyonunun EBV ile ilişkili hastalıkların patogeneğinde önemli bir faktör olmadığı belirtilmiş, EBV Tip 1'in LMP1 geninin 30 bç'lik delesyonu ile birlikte Japon halkında görülmesinin sıkça karşılaşılan bir durum olduğu gösterilmiştir (Oshima ve ark., 1999).

Arjantin'de yapılan bir çalışmada ise sağlıklı bireylerdeki LMP1 30 bç'lik delesyon sıklığı araştırılmış ve EBV Tip 1'in predominansı rapor edilmiştir. Ayrıca bu çalışmayla sağlıklı bireylerin de çoklu enfeksiyon taşıyıcısı olabileceği kanıtlanmıştır (Correa ve ark., 2004).

1.1.4.6 LMP2

LMP'yi kodlayan gen iki farklı proteine sahiptir: LMP2A ve LMP2B. Bu proteinin yapıları aynıdır; her ikisi de 12 transmembran domeyne ve 27 aminoasitlik sitoplazmik C-terminusuna sahiptir. Ek olarak LMP2A 119 aminoasitlik sitoplazmik N-terminal domeynine sahiptir. LMP2A, latent olarak enfekte B-hücrelerinin plazma membranında parçalar halinde toplanır (Longnecker ve Kieff, 1990). Ne LMP2A ne de LMP2B, B-hücre

transformasyonu için gerekli değildir (Longnecker,2000; Fruehling ve Longnecker, 1997).

LMP2A N-terminal domeyni, iki tanesi (Y74 ve Y85) immüno reseptör tirozin bazlı aktivasyon motifi (ITAM) oluşturan 8 tirozin çökeltisine sahiptir. Fosforile edildiğinde, B-hücre reseptöründe (BCR) var olan ITAM; lenfosit proliferasyonunda ve protein tirozin kinazların (PTK) src ailesinin aktivasyonu aralığında farklılaşmasında merkezi rol oynar. LMP2A aynı zamanda bu PTK'ların fosforilasyona uğramış ITAM'leriyle etkileşir ve bu ilişki PTK aktivitesini ters yönde regüle eder (Fruehling ve Longnecker, 1997). Bundan dolayı LMP2A ITAM, BCR'nin uyardığı Ca^{+2} seferberliğini, tirozin fosforilasyonunu ve B-hücrelerindeki EBV litik döngüsünün aktivasyonunu bloke etmekle sorumlu olarak gösterilmektedir (Miller ve ark., 1995).

Transgenik farelerin B-hücrelerindeki LMP2A ekspresyonu, normal B-hücre gelişimini ortadan kaldırır. Bunu periferik lenfoid organ kolonileri oluşturmak için immünglobülin negatif hücrelere izin vererek gerçekleştirir. Bu, LMP2A'nın proliferasyonu ve BCR'nin sinyalleşmesinin yokluğunda B hücrelerin hayatta kalmasını sağladığını göstermektedir (Caldwell ve ark., 1998). Birlikte ele alındığında bu veriler LMP2'nin, EBV latentliğinin muhafazası için gerekli B-hücre gelişiminin normal programı modifiye ettiğini ve EBV litik döngüsünün uygunsuz aktivasyonunu engellediğini destekler.

LMP2B'nin LMP2A fonksiyonunu regüle eden hafifletici bir rolü olduğu ileri sürülmüştür (Scholle, Longnecker ve Raab-Traub, 1999). Epitelyal hücre hattında LMP2A'nın adezyona bağlı tirozin fosforilasyonunu kanıtlamaktadır. Bu src kinaz aktivitesinin negatif regülatörü olan C-terminal src kinaza (Csk) arabuluculuk eden bir etkidir. Ayrıca, LMP2A epitelyal hücreleri transforme edebilir. Bu etkiye LMP2A,

fosfoinozotid 3-kinaz-Akt kaskadının aktivasyonu ile bir miktar aracılık etmektedir (Sholle, Bendt ve Raab-Traub, 2000).

1.1.5 EBV'nin Enfeksiyon Mekanizması

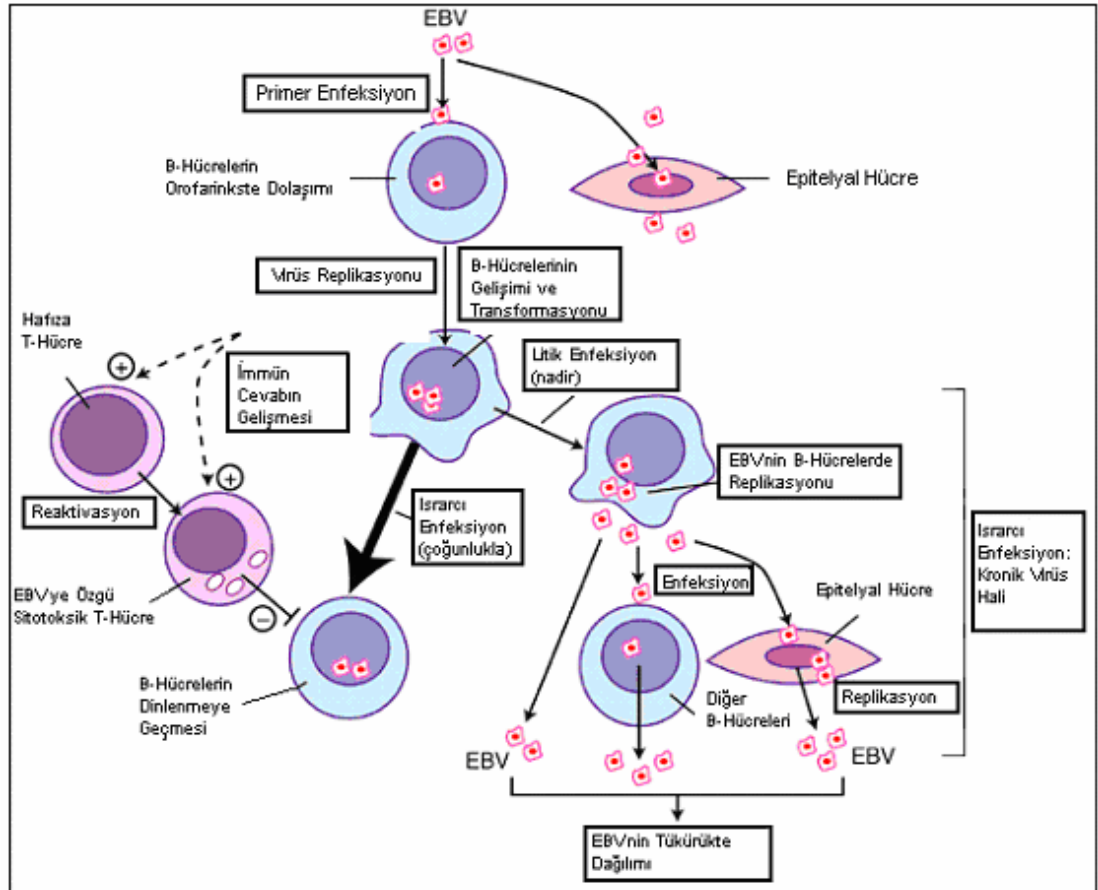
1.1.5.1 B-Hücrelerinin EBV ile Enfeksiyonu

Birçok kanıt B-hücrelerinin EBV'nin devamında rol oynadığını ispatlamaktadır (Murray ve Young, 2001). Esasında, uzun dönem asiklovir tedavisi olarak virüs replikasyonunu elimine etmeyi amaçlayan tedavi; orofarinksten virüs salgılanmasını önlemekte fakat B-hücrelerindeki latent enfeksiyonu etkilememektedir. Asiklovirin etki mekanizması; asiklovirin trifosfata dönüşmesi ve daha sonra deoksiguanozinle yarışarak viral DNA polimeraz için viral replikasyonla rekabet etmesi şeklinde gerçekleşmektedir. Tedavi kesiminde, virüs tedavi öncesi düzeyinde orofarengeal sekresyonlarda tayin edilebilmektedir. Ayrıca kemik iliği transplantasyonundan önce ve sonra donör-alıcı çiftindeki EBV üzerine yapılan çalışmalar, alıcı EBV'sinin soylarının orofarinksten yok olduğunu ve donöre yerleştiğini göstermiştir. Bu da kemik iliği B-hücrelerinin EBV'yi muhafaza ettiğini göstermektedir. X'e bağlı gammaglobulinemia (XLA)'ya sahip olan hastaların olgun B-hücreleri eksiktir. Bunlar EBV enfeksiyonundan korunurlar (Young, 1999).

EBV, periferik kanın içinde IgD⁻ hafıza B-hücreleri havuzunda bulunur. Bu hücrelerde EBV gen ekspresyonu LMP2A ve muhtemelen EBNA1 ile sınırlanmıştır (Babcock ve ark., 1998). Son çalışmalar, sağlıklı tonsillerin alt kümesinin olgunlaşmamış EBV⁺ (IgD⁺) B-hücreleri ihtiva ettiğini göstermektedir. Bu hücreler Lat III eksprese eder ve aktive edilmiş fenotip gösterirler. Yani direkt olarak enfekte olmuşlardır (Joseph, Babcock ve Thorley-Lawson, 2000). Bu hücreler muhtemelen ya virüse özgü

sitotoksik T-lenfositler (CTL) tarafından elimine edilmiştir, ya da daha sonra tonsilden ayrılan IgD hafıza B-hücrelerine farklılaşmışlardır. Bu hafıza B-hücrelerinin bir kısmı mukozal lenfoid dokulardan geçerek plazma hücrelerine dönüşerek, litik döngüye girebilirler. Fakat bir kısmı yine de hücre döngüsünde var olur ve periferel havuzu, enfekte hafıza hücreleriyle tekrar doldururlar (Şekil 2).

EBV gen ekspresyonunun Lat II modeli aynı zamanda tonsiler hafıza B-hücrelerinde ve merkezi germinal B-hücrelerinde de tespit edilmiştir (Babcock ve Thorley-Lawson, 2000).



Şekil 2. Sağlıklı virüs Taşıyıcılarında Epstein-Barr (EBV) Enfeksiyonu

1.1.5.2 Epitelyal Hücrelerin EBV ile Enfeksiyonu

Epitelyal hücreler genellikle CD21 eksprese etmezler. EBV bu dokulara başka hücresel reseptörlerden girer. Çeşitli insan epitelyal hücreleri in vitro olarak ya yüksek titre virüs süpernatantının direkt temasıyla ya da Burkitt's Lenfoma'daki (BL) Akata hücre hattı gibi EBV üreten hücrelerle karıştırılmış kültürlerle enfekte olabilir. Akata hücre hattı, EBV enfeksiyonunun bir modelidir ve epitelyal dokuların içinde veya litik olarak enfekte B-hücrelerine yakın olan epitelyal dokulara aşırı yatkınlıkları sayesinde enfekte olabilmektedir. Son zamanlarda yapılan çalışmalar; MHC class II'den yoksun epitelyal hücreler tarafından yapılan virüsün (E-EBV) yüksek seviyede gp42 içerdiğini ve B-hücrelerde yapılan virüslerle (B-EBV) karşılaştırıldığında B-hücreler için daha enfektif olduğunu göstermiştir (Murray ve Young, 2001). Bu veriler, epitelyal dokuların primer EBV enfeksiyonunun, B-hücrelerinin kısmi tropizmini içeren virüsün üretimine rehberlik ettiğini öne sürmektedir. Bu olay, bu bölgedeki ısrarcı enfeksiyonu tespit etmeyi kolaylaştırmaktadır. Epitele yakın B-hücreleri tarafından üretilen virüsün bir süre sonra tükürüğe salınmasıyla epitelyal hücreler daha hızlı enfekte olmaktadır.

1.1.5.3 EBV'nin Patogenez ve Patolojisi

1.1.5.3.1 Enfeksiyöz Mononükleoz (EMN)

EMN'de EBV bulaşı tükürük ile olur ve ilk enfeksiyon orofarinkste başlar. Viral replikasyon, farinksin epitel hücreleri ve tükürük bezlerinde gerçekleşir. Çoğu kişide, enfeksiyondan haftalar-aylar sonraya dek düşük düzeyde virüs salgınır. Epitel hücrelerinde replikasyonu takiben virüs, B lenfoid hücreleri enfekte eder ve burada latent evrede varlığını devam ettirir. Normal bireylerde, virüsle enfekte olan hücrelerin çoğu elimine edilir, ancak az sayıda enfekte lenfosit, ömür boyu varlığını devam ettirir. EBV ile

enfekte B-hücreleri immünglobulin sentezler. Sıklıkla sentezlenen IgA ve IgG'dir, nadiren IgM de sentezlenir. Mononükleoz, B hücrelerinin poliklonal transformasyonudur. Otoantikor oluşumu, hastalık için tipiktir. Klasik antikor, koyun eritrositlerindeki antijenlerle reaksiyon veren heterofil antikorlardır. EBV enfeksiyonu, enfekte olmayan birçok B-hücresinin aktivasyonuna neden olur. Bu B-hücreleri, otoantikorları kaynağı olabilir. EBV latent enfeksiyonunun reaktivasyonu mümkün olmakla beraber nadirdir. Tükürükte virüs düzeylerinin yükselmesiyle kendini gösterir. İmmünsüpresif ilaçlarla tedavi, enfeksiyonu reaktifte edebilir ve bu reaktivasyon bazen ağır sonuçlar doğurabilir (Oshima ve ark, 1999).

1.1.5.3.2 Burkitt Lenfoma (BL)

EBV ile ilişkili tümörler arasında ilk dikkat çeken klinik ve epidemiyolojik özellikleri bakımından Burkitt Lenfomadır. BL'nin endemik tabir edilen ya da yüksek insidansa sahip formu Ekvatoryal Afrika ve Papua Yeni Gine ile sınırlandırılmıştır. Burada yıllık insidans 100.000 çocukta yaklaşık 5-10 vakadır ve *Plasmodium falciparum*'un endemik olduğu alanlar ile çakışır. Bunun tersine, BL'nin sporadik vakaları dünya çapında ortaya çıkar fakat daha düşük sıklıktadır. BL'nin endemik ve sporadik formları aynı zamanda EBV ile ilişkileri bakımından da farklılık göstermektedir. Esasında yüksek indisanlı bölgelerde bulunan bütün BL tümörleri EBV⁺ olmasına rağmen sporadik BL tümörlerinin sadece %15'i virüs taşımaktadır. Ek olarak, endemik sıtmanın dışında kalan bölgelerdeki ortalama insidansa sahip Cezayir ve Mısır gibi belirgin alanlar EBV⁺ tümörlerinin artmış oranlarıyla ilişkili yüksek sayıda vakaya sahiptir. BL aynı zamanda, AIDS'in klinik olarak ortaya çıkmasından önce sıklıkla ortaya çıkan HIV enfeksiyonunun bir sonucu olarak da gözlenir. Bu AIDS ile birlikte görülen BL vakalarının sadece %30-40'ı EBV enfeksiyonu ile ilişkilidir. Coğrafik bölgeye ya da AIDS ilişkisine bakmaksızın, hemen tüm BL tümörleri de; c-myc proto-onkogen bölgesinde olan, kromozom 8'in

uzun kolundaki kromozomal translokasyonu t(8:24) veya immünglobülin ağır-zincir gen bölgesindeki kromozom 14'deki translokasyonudur t(8:14). Bunların dışında daha az sıklıkta görülen immünglobülin hafif-zincir gen bölgesindeki kromozom 2 t(8:2) veya 22'de görülen translokasyondur t(8:22). Bu translokasyon, c-myc onkogeninin regüle edilmemiş ekspresyonu ile sonuçlanmaktadır (Murray ve Young, 2001).

Burkitt Lenfoma patogenezinde EBV'nin tam rolü tespit edilmektedir. EBV enfeksiyonunun başlangıç B-hücrelerinin proliferasyonundan önce geldiğini gösteren monoklonal EBV epizomları virüs pozitif BL biyopsilerinde tespit edilmiştir (Neri ve ark., 1991). BL'nin germinal merkezdeki B hücrelerinin proliferasyonunu stimüle etmekle görevli olan endemik sıtma ve kronik HIV enfeksiyonu gibi risk faktörlerinin etkisiyle desteklenir. Bu hücreler aynı zamanda immünglobülin genlerinin somatik mutasyona uğraması için de programlanmıştır. Bu ise EBV enfeksiyonu ve germinal merkez proliferasyonunun stimülasyonu ile birlikte c-myc translokasyonu taşıyan B-hücrelerin jenerasyonu ve seleksiyonundan sorumlu olabilir. Sporadik BL'deki EBV içeriğinin daha önceki raporlarda gösterildiğinden daha büyük olduğunu ileri sürmektedirler. Bu yüzden tamamlanmış defektif EBV genomları; EBNA1 ekspresyonu olmaksızın, Amerika Birleşik Devletleri'ndeki bazı sporadik BL tümörlerinde tespit edilmiştir (Razzouk ve ark., 1996).

1.1.5.3.3 Farklılaşmamış (Undiferansiye) Nazofarengeal Karsinoma (NK)

EBV varlığı ile tümör ilişkisi en iyi NK'da gösterilmiştir. EBV ve NK arasındaki bağ 1966 yılında serolojik çalışmaların ışığı altında ileri sürülmüştür. Daha sonra, in situ hibridizasyon ve antikomplement immünofloresans assay kullanılarak NK'daki tümör hücrelerinde EBV DNA ve EBNA kompleksinin bulunmasıyla da ispat edilmiştir (Murray ve Young,

2001). NK dokularından Southern Blot DNA hibridizasyonu, viral genomların monoklonal özelliğini açığa çıkarmıştır. Bu özellik; EBV enfeksiyonunun malignant hücre popülasyonunun klonal genişlemesinden daha önce var olduğunu göstermektedir (Murray ve Young, 2001).

NK, özellikle Çin ve Güneydoğu Asya'da 100.000 vakada 20-30 gibi bir sıklığa sahiptir. Sıklık oranları Çinlilerde (özellikle Güney Çinli erkeklerde) nerede yaşadıklarına bakmaksızın yüksektir. Bu genetik özellik ek olarak; diete özgü komponentler gibi çevresel faktörlerin de NK'nın etiyolojisinde önemli olduğu düşünülmektedir. Kapsamlı serolojik veriler, yüksek sıklıklı alanlarda özellikle EBV kapsit antijeni (VCA) ve early antijenlere özgü IgA antikorları olmak üzere yükselmiş EBV'ye özgü antikor titrelerini tanımlamıştır. Bu da tanı ve tedavinin etkinliğini izlemek açısından önemini gündeme getirmiştir (Murray ve Young, 2001).

1.1.5.3.4 İmmün Yetersizlik Zemininde Lenfoproliferatif Hastalık

Transplant cerrahi için iatrogenik immünosupresyondan sonra meydana gelen lenfoproliferasyonlar ortak olarak “post-transplant lenfoproliferatif bozukluklar (PTLD)” olarak bilinirler. X'e bağlı lenfoproliferatif sendrom ve Wiscott-Aldrich sendromu gibi belirgin kalıtılmış immüno yetersizlik sendromlarına sahip hastalarda benzer tümörler gözlenmektedir. Bunlar sıklıkla B-hücre orijinlidir ve atipik poliklonal B-hücre proliferasyonlarından köken alan lezyonlar şeklinde kendilerini göstermektedirler. Bunlar genellikle immünsupresyonun azaltılması ya da durdurulmasını takiben gerilerler. Ancak bazıları agresif monomorfik non-Hodgkin lenfomaya (NHL) dönüşebilirler.

Solid organ naklini takiben meydana gelen çoğu lenfoproliferasyonlar konakçı hücre kökenlidir. Oysa kemik iliği transplantasyonundan sonra oluşanlar sıklıkla donör hücrelerden oluşur. Bir çok tümör genellikle gastrointestinal sistem ya da allograft organın kendisi gibi ektranodal lokalizasyonlarda multifokal lezyonlar olarak kendini gösterir. PTLD insidansı ve klinik bulguları, organ transplantasyonlularla ve immün süpresyonun devamlılığı ve kullanılan ajanların sayı ve dozajıyla farklılık göstermektedir. Trasplant yapılan organdaki PTLD'nin yüksek sıklığı, nakildeki kronik antijen stimülasyonunun, bu lezyonların patogeneğinde önemli olabileceğini gösterir (Johannessen, Ashgar ve Crawford, 2000).

Çoğu PTLD vakaları EBV⁺ tir ve gen ekspresyonunun Lat III paternini gösterir (Young ve ark., 1989). Bu yüzden bir çok vakada, in vitro ölümsüzleştirilmiş lenfoblastoid hücre serilerine karşılık olarak PTLD'ler in vivo ortaya çıkarlar. Yani bunlar primer olarak EBV tarafından yönlendirilirler. Fakat bazen Lat I ve Lat II'de de görülür ve PTLD'nin EBV⁺ T-hücreli tümörler gösterilmiştir. Bu EBV⁺ tümörler monomorfik olma eğilimindedir ve daha agresiftirler (Nelson ve ark., 2000).

1.1.5.3.5 Hodgkin Hastalığı (HD)

1966 yılının başlarında MacMahon bir enfeksiyon ajanının Hodgkin Hastalığı (HD)'na sebep olabileceğini ileri sürmüştür. Bu ajanın EBV olabileceğine dair ilk kanıt ise diğer lenfoma hastalarında EBV antijenlerine karşı oluşan yüksek antikor titrelerinin tespitidir. Ayrıca bu yüksek seviyeler HD'nin bir kaç yıldaki gelişiminden önce gelmektedir. Ek olarak bireylerde Enfeksiyöz Mononükleaz (EMN) geçmişli HD'nin gelişimindeki relatif riski 2,0 ve 5,0 arasında sınırlandığı gösterilmiştir. Human herpes virüs 6 gibi diğer herpes virüslere karşı oluşan antikor titreleri de serumlarda artmıştır. EBV Viral Kapsid Antijenine karşı oluşan

artmış antikor titreleri, EBV'nin HD'deki patogenezdaki rolünü açıklayamaz (Murray ve Young, 2001).

EBV ile ilişkili HD'de viral genomlar tümör hücrelerinin enfeksiyonunun klonal genişlemeden önce ortaya çıktığını gösteren monoklonal formda bulunurlar. EBV normal olarak HD sırasında sürekli ve aynı zamanda HD'nin tümör dokusunun bir çok yerinde de bulunmaktadır (Nerurkar ve ark., 2000). Bulunulan coğrafi bölgeye ek olarak, EBV'nin HD ile ilişkisi aynı zamanda subtip, cinsiyete, etnik kökene ve yaşa göre de çeşitlilik göstermektedir. HD, yılda 1-3/10000 gibi nispeten düşük bir insidansa sahip olmasına rağmen, bu tümör coğrafik olarak sınırlandırılmamaktadır (Flavell ve Murray, 2000).

1.1.5.3.6 T-Hücre Lenfomaları

EBV, T-hücre Lenfomalarının bir kısmı ile ilişkili bulunmuştur. Özellikle; Japon, Çinli, Perulu, Avrupalı ve Amerikalı hastalarda ortaya çıkan sinonazal T-hücre lenfomalarında EBV genomları çok yüksek sıklıkta saptanmıştır. Bu tümörler; T-hücre antijenlerinden, Natural Killer (NK) hücre ekspresyonundan ve T-hücre reseptörünün yeniden ayarlanmasından yoksun olan fenotipik ve genotipik özellikler göstermektedirler. EBV⁺, T-hücre lenfomalarında virüsün tümör hücrelerinin sadece %5-50'lik kısmında belirlenebilmektedir. Bu durum, EBV enfeksiyonunun tümör gelişiminin alt kümesi olarak ortaya çıktığını göstermektedir (Niedobitek ve Young, 1997). T-hücre lenfomalarının nüksetmesi ve ilerlemesi ile birlikte artış gösteren EBV⁺ tümör hücrelerindeki oranın belgelenmesi, virüsün transforme olmuş T-hücrelerine ek bir gelişim ya da yaşamsal avantaj sağlayabilme ihtimalini göstermektedir (Murray ve Young, 2001).

EBV ile ilişkili T-hücre lenfomalarının bir çoğu ektranodaldır ve sitotoksik bir fenotipe sahiptir. Bu da bu tümörlerin EBV⁺ hücrelerin virüse özgü CTL'ler tarafından öldürülmesiyle CTL'lerin EBV enfeksiyonunu takiben meydana gelebileceğini göstermektedir. EBV⁺ B-hücrelerinin sıklıkla bazı EBV⁻ T-hücre lenfomalarında görülebilmesi ve buna ek olarak EBV⁺ lenfositlerin aksine, bazı NK ve HD tümörlerinde de tespit edilebilmesidir. Bu hücrelerin Lat III fenotipi gösterdiği belirtilmiş ve bu durumda da neoplastik T-hücrelerinin varlığının, EBV'nin indüklediği B-hücre transformasyonu için bir uyarıcı olabileceği bildirilmiştir. Bundan başka bir olasılık da, T-hücre lenfomalarında bulunan EBV B-hücrelerinin neoplastik T-hücre gelişimine katkıda bulunabileceğidir (Niedobitek ve ark., 2000).

1.1.6 EBV ile İlişkili Tümörlerde Viral Gen Ekspresyonu

BL tümör biyopsi hücreleri ve erken pasaj BL hücre hatları, viral gen ekspresyonunun Lat I paternini göstermektedir. Bu, diğer EBNA ve LMP proteinlerinin yokluğunda, EBER transkripsiyonu ve EBNA1'in seçici ekspresyonu ile karakterizedir. Bunu Cp ve Wp promotorlarından ziyade Qp promotorundan transkripsiyonla gerçekleştirir. Kültürde ise; BL hücreleri lenfoblastoid hücre serilerinde gözlenen multiselüler agregatların aksine, yayılmış hücre örtüsü şeklinde gelişmektedirler. Ayrıca BL hücreleri, CD10 (CALLA) ve CD77 (BLA)'nin ekspresyonu ile karakterize edilen farklı hücre yüzey fenotipi göstermektedir. Buna rağmen lenfoblastoid hücre serilerinde düzenli olarak yüksek düzeyde eksprese olan adezyon molekülleri ve hücrel aktivasyon antijenlerinin ekspresyonları ya çok azdır ya da hiç yoktur (Gregory ve ark, 1990).

1.1.7 EBV Tipleri ve Virüs ile İlişkili Tümörler

Orijinal olarak A ve B şeklinde refere edilen fakat günümüzde Tip 1 ve 2 olarak tabir edilen iki tip EBV izolatu bulunmaktadır. Bunlar EBV genomunun çoğunluğunda özdeş olmakla birlikte, EBNA-LP, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B ve EBNA3C'yi kodlayan latent genlerin alt kümelerinde allelik polimorfizm göstermektedirler. Diğer bir deyişle lokusa dayanan %50-80 dizi homolojisine sahiptirler (Sample ve ark., 1990). Yapılan sero-epidemiyolojik çalışmalar ve virüs izolasyonu, Tip 1 virüs izolatlarının birçok Batı ülkesinde çoğunlukta olduğunu göstermektedir. Oysa Ekvatoryal Afrika, Yeni Gine ve olası belirgin diğer bölgelerde her iki tipin de yaygın olduğu belirtilmiştir (Young ve ark., 1987).

Yapılan in vitro çalışmalar, Tip 1 izolatlarının B-hücre transformasyonunu gerçekleştirmede Tip 2'ye göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Özellikle erken pasajlarda Tip 2 virüsü tarafından transforme olan lenfoblastoid hücre serileri daha yavaş gelişim göstermektedir. EBV Tip1 ve Tip 2 arasındaki bu genel farka ek olarak aynı zamanda her virüs tipinde minör heterojenite vardır. Bu, EBNA proteinlerinin büyüklükleri arasındaki varyasyonlarla çok kolay ayırt edilebilmektedir. Bu farklar, transplant donörlerden alıcılara transplantasyonlarda ve aile içi geçişlerde virüs naklinin kopyasını çıkarmak için kullanılmaktadır. Bir çok sağlıklı birey sadece bir virüs tipiyle enfekte olmasına rağmen, sağlıklı virüs taşıyıcılarının bir bölümünde ikili EBV tiplerini taşıdığını göstermektedir (Brooks ve ark., 2000). Özellikle immünoljik olarak baskılanmış bir çok hastada farklı EBV tipleri birlikte görülebilmektedir.

1.2 MOLEKÜLER TEKNİKLER

1.2.1 DNA Ekstraksiyonu

DNA, kan örnekleri ve Lenf nodu biyopsilerinden fenol/kloroform ekstraksiyon yöntemi ve etanol çöktürmesi ile elde edilmiştir.

1.2.2 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR); DNA'nın hedeflenen bölgesine özgü DNA parçasının, bu bölgeyi içine alan bir çift sentetik primer kullanılarak in vitro koşullarda çoğaltılması esasına dayanmaktadır. PCR ile hedeflenen DNA 106-1012 adet kopyaya sahip olmaktadır. Hedef bölgenin PCR tekniği ile çoğaltılabilmesi için tepkime karışımında; çoğaltılması hedeflenen DNA örneği, hedeflenen bölgeye özgü-bölgeyi sınırlayan-bir çift sentetik primer, bu DNA primerlerine bağlanan ve bunlara 3' ucundan nükleotidleri ekleyerek sentez yapacak olan yüksek ısıya dayanıklı DNA polimeraz, sentezde kullanılacak olan deoksinükleotidler (dNTP'ler; A, G, C, T), polimerazın çalışabilmesi için uygun pH ve iyon koşullarını (Mg^{++}) sağlayan tampon karışımı gerekmektedir (Akar, 1999).

PCR reaksiyonu ile çoğaltılacak olan DNA'nın tek zincirli hale gelebilmesi için DNA, 90-95°C'de yaklaşık 5 dakika süreyle yüksek ısıya maruz bırakılır (denatürasyon). Sıcaklık 50 ile 70°C arasında bir değere düşürülür; bu sayede primerler tek zincirli hale getirilen DNA'ya bağlanabilirler. Bu primerler sentetik oligonükleotidlerdir (15-30 nükleotid uzunluğunda) ve çoğaltılacak olan DNA parçasının uçlarındaki tamamlayıcı dizilere özgül olarak bağlanırlar (hibridizasyon). DNA polimerazı ısıya dayanıklı bir formu (Taq polimeraz) reaksiyon karışımına

eklenir ve ortamdaki dNTP'lerin de bağlanmasıyla DNA sentezi 70-75°C arasındaki sıcaklıklarda gerçekleşir (polimerizasyon ve çift iplikli DNA'ların sentezi). Bu üç adım bir PCR döngüsünü oluşturur ve bu döngüler belirli sayıda tekrarlanır (Öner, 2002).

PCR tekniği tek veya çift iplikli DNA'yı, RNA'yı hedef olarak kullanabilir. Bu teknik çok az miktarda DNA örneği ile çalışma imkanı da sağlayabilmektedir ve PCR tekniği ile moleküler tekniklerin kullanıldığı laboratuvar tanısında büyük bir hız ve kesinlik kazanılmıştır (Akar, 1999).

1.2.3 Gerçek Zamanlı PCR (Real Time PCR)

Gerçek zamanlı PCR sistemi, polimeraz zincir reaksiyonu sonuçlarına ulaşmak için harcanan zamanı azaltmaktadır. Ayrıca kullanıcının PCR ürünlerinin amplifikasyonunu aynı zamanda, eş zamanlı olarak görüntülemesine olanak sağlamaktadır. Sistemin özellikleri, tek bir reaksiyondan elde edilen bilginin miktarını en üst seviyeye çıkarabilmek üzere geliştirilmiştir. Bu şekilde sistemi kantitatif PCR için aşırı derecede güçlü bir cihaz haline dönüştürmektedir. Sistem, gen ekspresyonunun miktarını belirleme, tek nükleotid polimorfizmlerinin tayini, yeni hastalıkların hedeflerini belirleme gibi olanaklar sağlamaktadır. Ayrıca polimeraz zincir reaksiyonunu kısa sürede tamamlamak için yeni bir hızlı ısı döngüsü kullanmaktadır. Çok yönlüdür. Deneyimizin esnek dizaynı için farklı flüoresan formatlarını kullanabilir, aynı anda birçok renk tespit edebilmektedir. PCR ürünlerini yeni erime eğrisi analiz programları kullanarak yeni sınırları araştırmamıza yardımcı olarak daha önceden ulaşılabilenin aksine daha zengin bir bilgiye sahip olabilmeye olanak sağlamaktadır. RT-PCR, üstün kopyalama yeteneği, hassasiyet ve dinamik alan gibi performans sağlamaktadır. PCR uygulamalarında optimum performansa ulaşabilmek için geliştirilmiştir (Roche, Molecular Biochemicals Light Cyler System).

1.2.4 Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Kesim

PCR ürünlerinin incelenmesinde farklı moleküler teknikler kullanılmaktadır. Bunlardan sıklıkla kullanılanlardan birisi, PCR ürünlerinin restriksiyon endonükleaz (RE) enzimleri ile muamele edilerek incelenmesidir (Sambrook ve ark., 1989). Restriksiyon endonükleazlar, çift zincirli sarmal DNA moleküllerinde özel nükleotid dizilerini tanıyan ve DNA'nın her iki zincirini kesen enzimlerdir. Bu enzimler DNA'ya özgü kısa dizileri tanır ve çift sarmallı DNA'nın her iki zincirindeki fosfodiester bağına keserek DNA'yı iki parçaya ayırırlar. Kesme işlemini tanıma yerinde veya tanıma yerinin dışında başka bir özel dizide gerçekleştirilir. Kesim sonucunda küt ve yapışkan uçlu DNA parçaları oluşur (Akar, 1998).

Restriksiyon endonükleazlar bakterilerden izole edilirler. Bakteriye dışarıdan giren bazı özel gen veya işaretleyicileri taşıyan genetik materyalleri ayırıştırarak mutasyonlara engel oldukları ve türlerin genetik yönden stabilitesini korudukları için bu ismi almışlardır (Öner, 2002).

DNA'daki gen değişimleri, bir restriksiyon enzimi kesme bölgesinin yok olmasına ya da yeniden oluşmasına neden oluyorsa kolaylıkla saptanabilirler. DNA, bu enzimlerle kesildiğinde farklı uzunlukta parçalar oluşur ve analizlerde değişik pozisyonlarda görülürler. RE kesimlemesi ile oluşturulan bu parça uzunluklarındaki farklılıklar, kesim parçacıkları uzunluk polimorfizmi (RFLP=Restriction Fragment Length Polymorphism) olarak adlandırılır (Akar, 1999).

2. MATERYAL VE YÖNTEM

2.1 Materyal

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Moleküler Genetik Bilim Dalı Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Pediatrik yaş grubundaki 44 olguya ait örneklerin tümü Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları Anabilim Dalı, Pediatrik Onkoloji Bilim Dalı tarafından gönderilmiştir.

Bu çalışma, Ankara Üniversitesi “Bilimsel Araştırma Projeleri” kapsamında desteklenmiştir.

Hasta grubunda; 3’ü Hodgkin, 18’i Hodgkin dışı olmak üzere 21 adet lenfomalı hasta örneği mevcuttur. Bu 18 Hodgkin dışı lenfomalı hastanın 11’i Burkitt Lenfoma (BL), 7’si Burkitt Dışı Lenfoma’dır.

Lösemi tanısıyla gönderilen 8 adet hasta örneği bulunmaktadır. Bu hastaların 4’ü akut lenfoblastik lösemi (ALL), 4’ü akut myelositer lösemi (AML) tanısı almıştır.

Ayrıca Solid tümör tanısı alan 11 hasta örneği mevcuttur. Bu tümörler; Nöroblastom (n:1), Retinoblastom (n:3), Rabdomyosarkom (n:4), Wilms Tümörü (n:1), Nörofibromatoz Shwanoma (n:1) ve Timik Karsinom’dur (n:1).

İki Eozinofilik Granülom ve iki Lenfoproliferatif Hastalık tanısı almış hastalara ait örnekler de çalışmaya dahil edilmiştir.

Çalışma grubunun yaş aralığı 0-18'dir. Cinsiyet dağılımı ise 25 erkek (%56,8), 19 kız (%43,2) olarak belirlenmiştir.

Bu çalışmada tüm bireylerden ve/veya ailesinden bilgilendirilmiş onam formu imzalatılarak izin alınmıştır.

2.2 Kullanılan Yöntemler

2.2.1 DNA İzolasyonu

2.2.1.1 Periferik Kandan DNA izolasyonu

Çalışma grubunu oluşturan hastalardan 1ml 0,5 M Etilendiamintetraasetikası (EDTA) (Sigma, ABD) tüp içerisine 9 ml periferik kan örneği alınmıştır. Alınan kan örneği falkon tüp içerisinde 25 ml RBC (Red Blood Cell) Lizis solüsyonu {155 mM Amonyum Klorid (AppliChem, Almanya); 10 mM Sodyum Bikarbonat (Merck, Almanya); 0,5 mM EDTA (AppliChem, Almanya)} ile çalkalanarak 20 dakika buzda bekletilmiştir. Soğutmalı santrifüjde (Hettich, Almanya) +4°C'de 4000 rpm'de 20 dakika santrifüj edildikten sonra süpernatant dökülerek, pellet üzerine tekrar 25 ml RBC Lizis solüsyonu eklenmiştir. Bu işlem tüm eritrositler giderilene kadar tekrarlanmıştır. Dipte kalan lökositler üzerine 1000 µl RBC Lizis solüsyonu eklenerek, bu karışımın 800 µl'si ependorf tüpüne alınarak stok olarak saklanmıştır. Geriye kalan 200 µl'lik karışım ependorf tüpüne alınarak, üzerine 20 µg/ml olacak şekilde Proteinaz K enzimi (MBI Fermentas, Litvanya), son konsantrasyon %0,5 olacak şekilde %10'luk Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) (Merck, Almanya), lökosit hacminin 2,5 katı olacak şekilde nükleaz solüsyonu {10 mM Trisklorid (Amresco, ABD) pH:8; 100 mM Sodyum Klorid (Merck, Almanya), 1 mM EDTA (AppliChem, Almanya) pH: 8} bir gece 56°C'de sıcak su banyosunda

(Kotterman, Almanya) bekletilmiştir. İkinci gün 1:1 oranında Fenol/Kloroform { Fenol (Merck, Almanya), Kloroform (Merck, Almanya), İzooamilalkol (Merck, Almanya) } eklenerek 10 dakika çalkalanmıştır. Buz içerisinde 20 dk bekletilerek +4 °C 4000 rpm’de 20 dk santrifüj edilmiştir. İki faza ayrılan karışımın üst kısmı başka bir ependorf tüpüne alınarak üzerine toplam hacmin 1/10’u kadar 3 M Sodyum Asetat (Sigma, ABD) ve toplam hacmin 2 katı kadar %95’lik alkol (Tekel, Türkiye) eklenmiştir. Ependorf tüpü alt-üst edilerek DNA görünür hale getirildikten sonra -20 °C’de bir gece bekletilmiştir. Üçüncü gün +4 °C 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürülmüştür. Süpernatant dökülerek tüpe 500 µl %70’lik alkol eklenir ve +4 °C 4000 rpm’de 20 dakika santrifüj edilmiştir. Santrifüj sonunda alkol dökülmüş ve tüp kurutulmaya bırakılmıştır. Kurutulduktan sonra tüp içerisine Tris-EDTA (10 mM TrisHCl, 1 mM EDTA) solüsyonu eklenip 37 °C’de bir gece bekletilerek DNA’nın çözülmesi sağlanmıştır. İzole edilen DNA +4 °C’de saklanmıştır.

2.2.2 Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PCR=Real Time PCR)

Bu çalışmada Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu (RT PCR) yöntemi kullanılarak, EBV virüs genomunun amplifikasyonu LightCycler EBV Kantifikasyon Kiti (Roche, Almanya) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Kit, LightCycler EBV Reaksiyon karışımı “a” ve “b” den oluşan kullanıma hazır ‘Hot-Start’ reaksiyon karışımını (‘Fast-Start’ Taq polimeraz, reaksiyon tamponu ve dNTP –dTTP yerine dUTP– karışımından oluşur.) ve EBV DNA’sına özgü LightCycler EBV tespit karışımını (kullanıma hazır primer ve hibridizasyon probu karışımından oluşur.) içinde bulundurmaktadır.

LightCycler EBV Kantifikasyon Kiti aynı zamanda standart bir eksternal eğri oluşturabilmek için kullanıma hazır farklı konsantrasyonlarda 5 adet EBV DNA solüsyon standartları seti içermektedir.

PCR reaksiyonunun sıcaklık şartları; 95°C'de 10 dk başlangıç denatürasyonu, 45 siklus 95°C'de 10 sn denatürasyon, 55°C'de 15 sn hibridizasyon, 72°C'de 15 sn uzama ve 40°C'de 1 dk erime eğrisi olarak gerçekleştirilmiştir (Roche Diagnostics, Almanya). EBV DNA standartları olarak tanımlanan set, eksternal bir standart eğrisi oluşturmak için kullanılmıştır. Bu, LightCycler software tarafından otomatik olarak yapılmıştır. Bu eğri, normal örneklerin kesin kantifikasyonunun tayin edilmesini sağlamıştır. PCR ürünleri, sistemde bulunan software programı aracılığıyla kantifikasyon ve erime eğrileri grafikleri olarak iki ayrı şekilde görüntülenmiş ve incelenmiştir.

2.2.3 Polimeraz Zincir Reaksiyonu (PCR)

2.2.3.1 EBNA3C geni, 95 bç.lik Delesyon Bölgesi Amplifikasyonu

Tüm örnekler klasik PCR yöntemi kullanılarak ayrıca çoğaltılmıştır. Bu yöntem aynı zamanda, EBV⁺ bulunan örneklerin tiplendirilmesi için de uygulanmıştır. Bu yöntem kullanılarak çoğaltılan bölgeler Tip 1 için 153, Tip 2 için 246 bç. uzunluğundadır. Çoğaltmak istediğimiz bölgeyi sınırlamak için kullanılan primer dizisi aşağıdaki gibidir. EBNA 3C geni için kullanılan primer seti: F: 5'AGAAGGGGAGCGTGTGTTGT 3'
R: 5' GGCTCGTTTTTGACGTCGGC 3' şeklindedir.

Dizi 1. EBNA 3C geninin PCR ile çoğaltılan 246 bç'lik bölümü. Primerler koyu olarak belirtilmiştir.

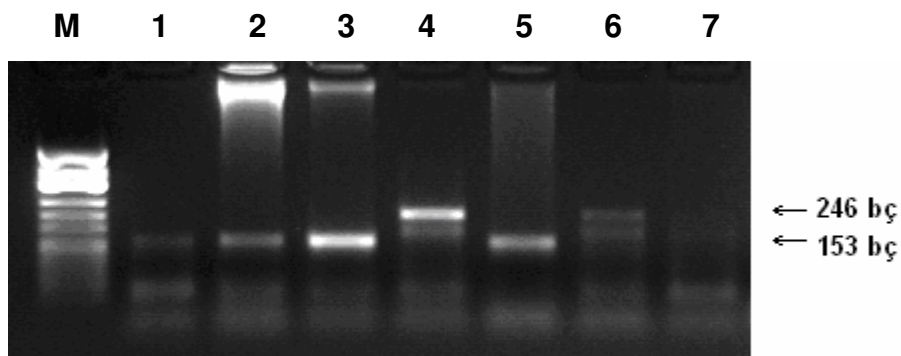
```
aagaagcacagagcaccctgaaaggccgggcccttccaaacaaccatcagagcccgtggagcccgccca
cacaaccccagcggggagggtcaacggtgattctccacgaaccacctcgagagcccgaagctgtttccttaag
cctccgccaccaccttcccggaggagaaggggagcgtgtgtttgtatatgacgatgatatcatagagggtattg
atgttgaaaccaccgaagaggagacgacgtcaatgcaaagacagcctccgctcgggcaacaaccgcccc
ccccgtgatttctaccgggagtgccatgtcttcagtcacacggatccatcagtaacacagccaagtaagccac
atcggaacctcaagacggatttcaacgttcaggccgacgtcaaaaacgagccatgcctccccagtgagt
cctctgacgctgggcctcctccaccaggcctcgtgtcatggcgctcctccaccgggcctcgtgtcatggcgac
tcctccaccgggcctcgtgacatggcgctcctccaccgggcctcgtgacatggcgctcctccaccgggcct
cgtgacatggcgctc
```

Reaksiyonun gerçekleşebilmesi için gerekli olan PCR komponentleri; son konsantrasyon 2mM olacak şekilde, dATP, dGTP, dTTP, dCTP (Fermentas, Litvanya), 1 ünite Taq DNA Polimeraz (Fermentas, Litvanya), 25mM MgCl₂, %10 konsantrasyon DMSO ile son hacim 50µl olacak şekilde deiyonize su (ddH₂O) ile tamamlanarak polimeraz zincir reaksiyonu gerçekleştirilmiştir.

Polimeraz zincir reaksiyonu sıcaklık şartları; 94°C'de 1 dk başlangıç denatürasyonu, 13 siklus boyunca 94°C'de 30 sn denatürasyon, 56°C'de 30 sn hibridizasyon, 72°C'de 30 sn uzama, 13 siklus boyunca 94°C'de 30 sn denatürasyon, 55°C'de 30 sn hibridizasyon, 72°C'de 30 sn uzama, 13 siklus boyunca 94°C'de 30 sn denatürasyon, 54°C'de 30 sn hibridizasyon, 72°C'de 30 sn uzama ve 72°C'de 10 dk son uzama olarak belirlenmiştir (Biometra,Almanya).

2.2.4 Agaroz Jel Elektroforezi ile PCR Ürünlerinin İncelenmesi

Agaroz (Applichem, Almanya), EBNA-3C geninin PCR ürünleri için 1,5 g/75 ml (%2) olacak şekilde tartılır. Üzerine 1X TBE (Tris-HCl, Borik Asit, EDTA) solüsyonu eklenir. 1X TBE solüsyonu 5X TBE solüsyonundan su ile 1/5 oranında seyreltilerek hazırlanır. 5X TBE solüsyonu, Trisma® (Sigma, ABD) 54g, Borik Asit (Applichem, Almanya) 27,5g, 0,5M EDTA (Sigma, ABD) 20ml alınıp, tüm hacim deiyonize su ile (ddH₂O) 1 litreye tamamlanarak hazırlanır. Agaroz istenilen yüzdede hazırlandıktan sonra mikrodalga fırında (Arçelik, Türkiye) kaynatılır. İçine (%0,5'lik stoktan) 2µl Etidyum Bromide (Sigma, ABD) ilave edilerek iyice karıştırıldıktan sonra jel tabağına (Owl Scientific, ABD) dökülür. Agarozun donması için yaklaşık 30 dk beklenir. PCR ürünlerinin 1/5'i (yaklaşık 10µl) jele yüklenir. Ayrıca, PCR ürünlerinin değerlendirilebilmesi ve reaksiyonun istenilen uzunluktaki doğru bölgeyi çoğalttığını görebilmek için marker (ΦX174 DNA/HinI Marker, 10 Fermentas, Litvanya) PCR ürünleriyle birlikte 5µl olarak yüklenir. 75-100V akımda 20-30 dk yürütülür (Biometra, Almanya) ultraviyole ışıktaki (Spectrolin, ABD) incelenir ve Image Analyser (Alpha Imager, ABD) programında fotoğraflanır (Şekil 3).



Şekil 3: EBNA3C geninin PCR ile çoğaltılması sonucu oluşan 153 ve 246 bp'lik PCR ürünü

M: ΦX174 DNA/HinI Marker

1-2-3-5-7. sıra: EBV Tip1 bireyler (153 bp)

4-6. sıra: EBV Tip2 bireyler (246 bp)

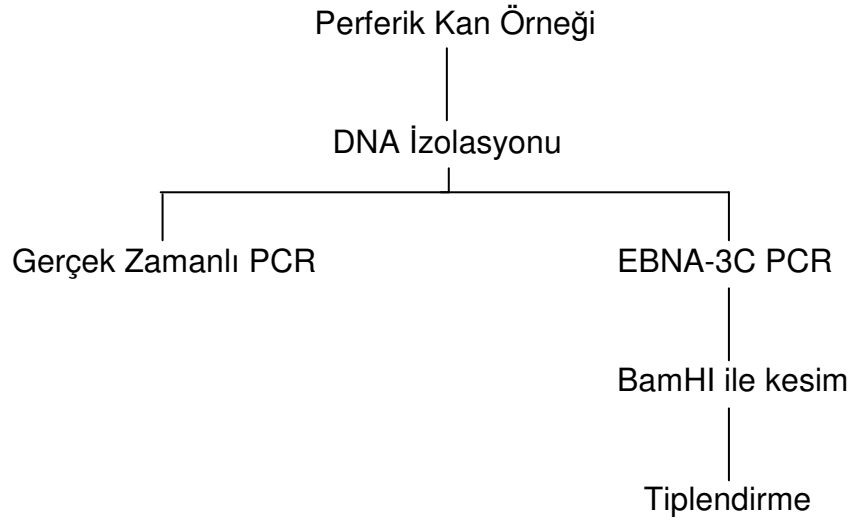
2.2.5 PCR Ürünlerinin Restriksiyon Endonükleaz Enzimleriyle Muamelesi

2.2.5.1 EBNA3C Tip Tayininin BamHI Enzimi ile Netleştirilmesi

PCR sonrası elde edilen 153-246 bp'lık ürünlerin agaroz jelde reaksiyonun yürüdüğü tespit edildikten sonra BamHI (5'G↓GATCC3') restriksiyon endonükleaz enzimi (Biolabs, ABD) ile kesilerek 3C tip tayini için kesinleştirilir.

2.2.6.2 Çalışmanın Akış Şeması

Çalışmanın başlangıç aşamasından itibaren akış şeması şu şekilde belirlenmiştir.



3. BULGULAR

Pediyatrik Onkoloji Bilim Dalı'ndan gelen toplam 44 olguda gerçek zamanlı PCR EBNA3C 93 bç'lik ve LMP1 30 bç'lik delesyon bölgesi PCR yöntemi ile araştırılmıştır.

Çalışma grubuna dahil olan toplam 44 adet hastanın gerçek zamanlı PCR yöntemi ile EBV(+) sonucuna sahip birey sayısı 19'dur (%43,18). EBNA3C ile yapılan deneylerde ise 7 olguda sonuç elde edlimiştir (%15,9) (Tablo 2).

EBNA3C Tip 1'e sahip 3 (%15,7), EBNA3C Tip 2'ye sahip 3 (%15,7) ve her iki EBV Tip'ine de sahip 1 (%5,3) birey bulunmuştur; tipi belirlenemeyen birey sayısı ise 12'dir (%63,2) (Tablo 2).

Labaratuarımızda çalışılmış olan örneklerin LightCycler ve klasik PCR sonuçları; EBV Tip'ine sahip hastalar ve bunların tanıları Tablo 2'de gösterilmiştir.

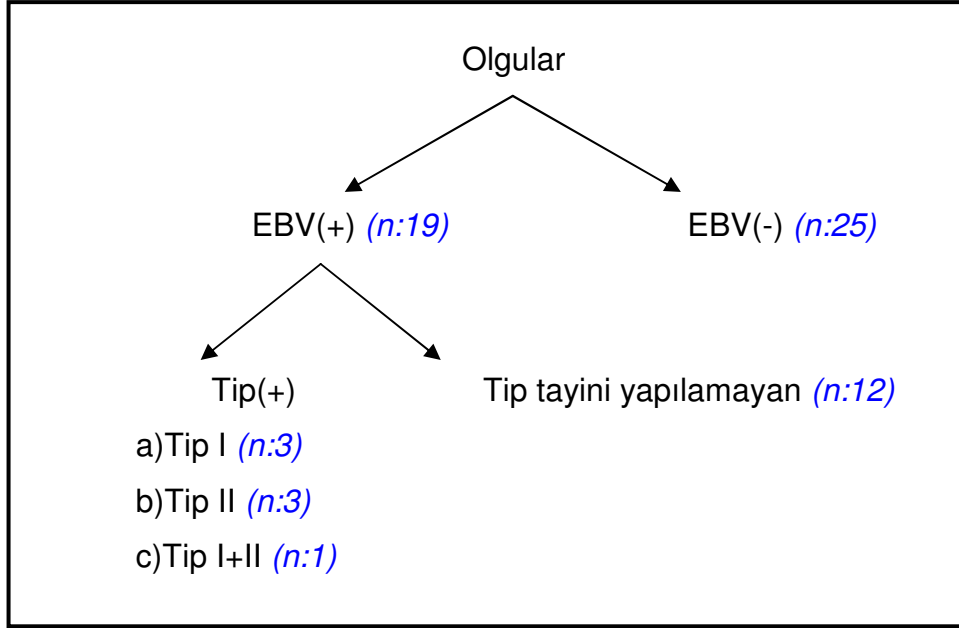
2 Burkitt Lenfomalı ve 1 akut myelositer lösemili hastada EBNA3C Tip 1; non-Hodgkin lenfoma, Hodgkin lenfoma ve rabdomyosarkomlu birer hastada ise EBNA 3C Tip 2 bulunmuştur. Lenfoproliferatif hastalıklı bir olguda ise EBV'nin her iki tipini de rastlanmıştır.

Tablo 2: Çalışmamızda yer alan pediatrik onkoloji olgularının bulguları ve tanıları

Örnekler	Light Cycler Sonuçları	Tiplendirme	Tanı
1. Örnek	+	Tip 1	BL
2. Örnek	+	Tip 1	BL
3. Örnek	+	Tip 1	AML
4. Örnek	+	Tip 2	NHL
5. Örnek	+	Tip 2	HL
6. Örnek	+	Tip 2	RMS
7. Örnek	+	Tip 1+2	Lenfoproliferatif Hastalık
8. Örnek	+	-	BL
9. Örnek	+	-	BL
10. Örnek	+	-	BL
11. Örnek	+	-	NHL
12. Örnek	+	-	HL
13. Örnek	+	-	HL
14. Örnek	+	-	ALL
15. Örnek	+	-	RMS
16. Örnek	+	-	Retinoblastom
17. Örnek	+	-	Nöroblastom
18. Örnek	+	-	Lenfoproliferatif Hastalık
19. Örnek	+	-	Nörofibromatozi Shwanoma
20. Örnek	-	-	BL
21. Örnek	-	-	BL
22. Örnek	-	-	BL
23. Örnek	-	-	BL
24. Örnek	-	-	BL

Örnekler	Light Cycler Sonuçları	Tiplendirme	Tanı
25. Örnek	-	-	BL
26. Örnek	-	-	NHL
27. Örnek	-	-	NHL
28. Örnek	-	-	NHL
29. Örnek	-	-	NHL
30. Örnek	-	-	NHL
31. Örnek	-	-	ALL
32. Örnek	-	-	ALL
33. Örnek	-	-	ALL
34. Örnek	-	-	AML
35. Örnek	-	-	AML
36. Örnek	-	-	AML
37. Örnek	-	-	RMS
38. Örnek	-	-	RMS
39. Örnek	-	-	Retinoblastom
40. Örnek	-	-	Retinoblastom
41. Örnek	-	-	Eozinofilik Granülom
42. Örnek	-	-	Eozinofilik Granülom
43. Örnek	-	-	Wilms Tümörü
44. Örnek	-	-	Timik Karsinom

Şekil 4: Gerçek zamanlı PCR ve EBNA3C PCR ile elde edilen EBV sonuçları



4.TARTIŞMA

EBV, insan B lenfositlerinde latent enfeksiyona neden olan ve bu hücreleri transforme ederek in vitro sınırsız büyüme yeteneği kazanmasına neden olan bir insan herpes virüsüdür. Latent enfeksiyon süresince, viral gen ekspresyonu, (EBV nükleer antijeni) EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP olmak üzere 6 adet nükleer protein ve LMP (latent membran protein) olmak üzere bir integral membran proteini ile sınırlıdır. Bu proteinlerin ekspresyonu, EBV genomunun varlığını gösterir (Sample ve Kieff, 1990).

Orijinal olarak A ve B şeklinde refere edilen fakat günümüzde Tip 1 ve 2 olarak tabir edilen iki tip EBV izolatu bulunmaktadır. Bunlar EBV genomunun çoğunluğunda özdeş olmakla birlikte, EBNA-LP, EBNA2, EBNA3A, EBNA3B ve EBNA3C'yi kodlayan latent genlerin alt kümelerinde allelik polimorfizm göstermektedirler. Diğer bir deyişle lokusa dayanan %50-80 dizi homolojisine sahiptirler (Sample ve ark., 1990). Yapılan sero-epidemiolojik çalışmalar ve virüs izolasyonu, Tip 1 virüs izolatlarının birçok Batı ülkesinde çoğunlukta olduğunu göstermektedir. Oysa Ekvatoryal Afrika, Yeni Gine ve olası belirgin diğer bölgelerde her iki tipin de yaygın olduğu belirtilmiştir (Young ve ark., 1987).

Yapılan in vitro çalışmalar, Tip 1 izolatlarının B-hücre transformasyonunu gerçekleştirmede Tip 2'ye göre daha etkili olduğunu göstermiştir. Özellikle erken pasajlarda Tip 2 virüsü tarafından transforme olan lenfoblastoid hücre serileri daha yavaş gelişim göstermektedir. EBV Tip1 ve Tip 2 arasındaki bu genel farka ek olarak aynı zamanda her virüs tipinde minör heterojenite vardır. Bu, EBNA proteinlerinin büyüklükleri arasındaki varyasyonlarla çok kolay ayırt edilebilmektedir. Bu farklar, transplant donörlerden alıcılara transplantasyonlarda ve aile içi geçişlerde virüs naklinin kopyasını çıkarmak için kullanılmaktadır. Bir çok sağlıklı birey sadece bir virüs tipiyle enfekte olmasına rağmen, sağlıklı virüs

taşıyıcılarının bir bölümünde ikili EBV tiplerini taşıdığını göstermektedir (Brooks ve ark., 2000). Özellikle immünoljik olarak baskılanmış bir çok hastada farklı EBV tipleri birlikte görülebilmektedir.

Sample ve arkadaşları, AG876 EBV-2 EBNA-3 kodlayıcı bölgesinin DNA dizisini belirlemiş ve EBV-1 ile EBV-2 izolatlarının EBNA-3 genlerindeki farklılığın bulunması için bilinen B95-8 EBV-1 EBNA-3 sekansları ile karşılaştırılmıştır. B95-8 ve AG876 EBV izolatlarının EBNA-3A, -3B ve -3C genleri için sırasıyla 90 ve %84, 88 ve %80, 81 ve %72 oranında nükleotid ve aminoasit benzerliğine sahip olduğunu göstermişlerdir (Sample ve ark., 1990).

Bu çalışmada; 44 pediatrik maligniteli olgunun periferik kan örneklerinde EBV genomu gerçek zamanlı PCR ve EBNA3C geninin 95 bç.lık delesyon bölgesi PCR yöntemiyle periferik kan örneğinden çalışılarak, aynı zamanda tiplendirmede de kullanılmıştır.

44 bireylik hasta grubunda; yaş aralığı 0-18 olan, 3'ü Hodgkin, 18'i Hodgkin dışı olmak üzere 21 adet lenfomalı hasta mevcuttur. Lösemi tanısıyla kliniğimize gelen 8 adet hasta bulunmaktadır. Bu hastaların 4'ü ALL, 4'ü AML tanısı almıştır. Solid tümör tanısı alan 11 hastanın yanı sıra 2 adet Eozinofilik Granülom ve 2 adet Lenfoproliferatif Hastalık tanısı almış hastalar ile çalışma grubumuz oluşturulmuştur.

Real Time PCR ile 44 olgunun 19'u pozitif olarak bulunmuş, bu olgulardan 7 tanesinde EBNA3C PCR ile Tip1'e sahip 3 (%15,7), Tip2'ye sahip 3 (%15,7) ve her iki EBV Tipi'ne de sahip 1 (%5,3) birey bulunmuştur. EBNA3C Tip 1'e, 2 Burkitt Lenfomalı ve 1 akut myelositer lösemili hastada; Tip 2'ye, non-Hodgkin lenfoma, Hodgkin lenfoma ve rabdomyosarkomlu birer hastada, EBV'nin her iki tipine ise Lenfoproliferatif hastalıklı bir olguda rastlanmıştır.

Bu çalışma, Real Time PCR ile yapılan ve EBNA3C PCR ile karşılaştırılan ilk çalışmadır. Çalışma sonucunda periferik kan örneğinden EBV genomunun belirlenmesinde Real Time PCR, EBNA3C PCR tekniğine göre daha duyarlıdır. Ancak daha duyarlı hale getirilebilmesi için ısı-zaman faktörlerinde denemelerin yapılması gereklidir.

Goldschmidts ve ark. HIV-SSS lenfomada EBV tip2'nin daha fazla olduğunu ve bunun da immün yetmezlikle ilişkili olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Goldschmidts ve ark., 1992). Türk BL'li hastalarda Çavdar ve ark. bir olguda EBV tip 2 saptamışlar ve bu tipin bulunmasının immün yetmezlikle ilişkisi olabileceğini ileri sürmüşlerdir (Çavdar ve ark., 1993). Bu çalışmada ise, 4 hastada tip 2 EBV bulunmuştur (HD, NHL, RMS ve lenfoproliferatif sendromu). Bu olguların sosyoekonomik düzeyi ve diğer tip-1'leri taşıyan hastalarla karşılaştırılmaları yanı sıra EBV tiplemesiyle klinik bulgular arasında ilişki kurulması uygun olacaktır.

EBV-ilişkili hastalığı bulunan Japonlar'da, LMP-1 geninin ve EBV'nin TipA ve TipB olmak üzere iki majör tipinin analizi yapılmış ve hastaların çoğunda, hastalığı taşıyan ya da taşımasının, EBV ile birlikte 30 baz çiftlik delesyonu ve LMP-1 geninde pek çok nokta mutasyonunu taşıdığı belirlenmiştir. Fakat, EBV Tip A ile birlikte görülen LMP-1 genindeki 30 baz çiftlik delesyonun EBV-ilişkili hastalıkla bağlantılı olmayıp, Asya toplumuna özgü olduğu sonucuna varmışlardır (Oshima ve ark., 1999).

BL'li olguların 5'i (+); 6 olgu ise (-) olarak bulunmuştur. Çavdar ve ark. ile Taçyıldız ve ark. yapmış oldukları BL çalışmalarından farklılığın nedeni bu çalışmanın periferik kan örneklerinden yapılırken; daha önceki çalışmaların tümör dokusu üzerinde yapılmasına bağlı olabilir (Çavdar ve ark., 1992; Taçyıldız ve ark., 1998).

İki çalışmada 10-15 yıl önceki hasta grubuna dayanmaktadır. BL'de sosyoekonomik düzeyin yükselmesiyle EBV pozitifliği azalmaktadır. Bu iki görüş, BL'li olguların klinik bulgularla desteklenmesi veya ekarte edilmesini gerektirmektedir.

Lenfoproliferatif hastalık tanısıyla gelen hastada iki tipin birlikte olması, kliniğe yansımaları açısından önem kazanmaktadır.

AML ve RMS'de belirlenmesi, periferik kandaki EBV genomunun pozitifliğine bağlıdır. Ancak diğer EBV genomunun pozitifliği beklenen hastalarda negatif olarak elde edilmesi, RT-PCR'ın yönteminin yeterince güçlü olmamasına bağlı olabilir. Yöntemin ısı-zaman etkenlerinin kontrol edilmesi gerekmektedir.

RT-PCR, üstün kopyalama yeteneği, hassasiyet ve dinamik alan gibi performans sağlamaktadır. Bu çalışma ile bu analizin Real-Time PCR'la yapılacak olması da rutin incelemelerin özgünlüğünü arttırabilecektir.

5.SONUÇLAR VE ÖNERİLER

1. RT-PCR, EBNA 3C'ye göre daha duyarlı olarak görülmektedir.
2. Bu çalışmada EBV (+) olması beklenen BL hasta grubunda beklenenden daha az pozitifliği olması bu çalışmanın periferik kan örneğinden yapılıyor olmasına, daha önceki çalışmaların tümör hücrelerinden yapıyor olmasına bağlı olabilir.
3. Tip 1 ve Tip 2 saptanan hastaların klinik bulgularının dökümüyle ilginç sonuçlara varılabilir.

ÖZET

“EPSTEİN-BARR VİRÜS (EBV)” GENOMUNUN PERİFERİK KANDAN PCR ve REAL-TIME PCR İLE GÖSTERİLMESİ VE TİPLENDİRİLMESİ

EBV, insan B lenfositlerinde latent enfeksiyona neden olan ve bu hücreleri transforme ederek in vitro sınırsız büyüme yeteneği kazanmasına neden olan bir insan herpes virüsüdür. Latent enfeksiyon süresince, viral gen ekspresyonu, (EBV nükleer antijeni) EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP olmak üzere 6 adet nükleer protein ve LMP (latent membran protein) olmak üzere bir integral membran proteini ile sınırlıdır. Bu proteinlerin ekspresyonu, EBV genomunun varlığını gösterir. Bu çalışmada; 44 pediatik maligniteli olgunun periferik kan örneklerinde EBV genomu gerçek zamanlı PCR ve EBNA3C geninin 95 bp'lik delesyon bölgesi PCR yöntemiyle çalışılmıştır ve aynı zamanda tiplendirmede de kullanılmıştır.

Bu çalışmada, hasta grubumuzda; yaş aralığı 0-18 olan, 3'ü Hodgkin, 18'i Hodgkin dışı olmak üzere 21 adet lenfomalı hasta mevcuttur. Çalışma sonucunda; gerçek zamanlı PCR ile EBV (+) olduğu bulunmuştur. Hastalarda delesyon dağılımına bakıldığında, EBNA3C Tip1'e sahip 3 (%15,7) EBNA3C Tip2'ye sahip 3 (%15,7) ve her iki EBV Tip'ine de sahip 1 (%5,3) birey bulunmuştur. EBNA 3C ile tipi belirlenemeyen örnek sayısı ise 12'dir (%63,2). RT-PCR, EBNA 3C'ye göre daha duyarlı olduğu görülmektedir. EBV (+) olması beklenen BL hasta grubunda beklenenden daha az pozitifliğin olması, diğer çalışmaların aksine bu çalışmanın periferik kan örneğinden yapılıyor olmasına bağlı olabilir. Daha spesifik sonuçlar için, daha geniş bir hasta grubuyla çalışılmalıdır.

Anahtar sözcükler: EBV, EBNA-3C, LMP-1, RT-PCR

SUMMARY

Epstein-Barr Virus (EBV) Genom Typing Detecting With Real Time PCR at the Peripheral Blood Mono-Nuclear Cells of Children With Malignant Disease

Epstein-Barr virus (EBV) is a human herpes virus that establishes latent infection in human B lymphocytes and growth-transforms these cells so that they can proliferate indefinitely in vitro. Viral gene expression during latent infection is limited to six nuclear proteins (EBV nuclear antigen) EBNA-1, EBNA-2, EBNA-3A, EBNA-3B, EBNA-3C, EBNA-LP and one integral membrane protein, latent membrane protein (LMP) (Sample and Kieff., 1990). The expression of these antigens show the existence of EBV genome. In this study, Real-time PCR and 95-bp deletion in the EBNA3C gene methods were used for the detection of EBV genome in peripheral blood cells of 44 children with malignant disease and the datas from EBNA3C deletion analyze were used to define the types of EBV.

In our study of the 44 patients, there was 21 lymphoma patients, with 3 Hodgkin and 18 non-Hodgkin's disease age range was between 0-18. 19 of the samples were EBV(+) with RT-PCR. However only 7 of them were EBV (+) by EBNA-3C PCR. Of these 3 patients with EBNA3C Type1 (15,7%), 3 patients with EBNA3C Type2 (15,7%) and 1 patients with both Type 1 and Type 2 (5,3%). EBNA3C PCR method was not able to detect EBV in 12 samples (63,2%). RT-PCR seems more spesific than EBNA3C PCR. EBV positivity difference between previous studies and this study probably lies on the fact that this study performed with peripheral blood samples, hence the others with cancer tissue.

Key Words: EBV, EBNA-3C, LMP-1, RT-PCR

KAYNAKLAR

- AKAR, N., Prof. Dr. (1999). Klinik Moleküler Patolojiye Giriş (Genişletilmiş İkinci Baskı). Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Antip A.Ş. Yayınları.
- ALLAN, G.J., INMAN, G.J., PARKER, B.D., ROWE, D.T., FARREL, P.J. (1992). Cell growth effects of Epstein-Barr virus leader protein. *J. Gen. Virol.* **73**: 1547-1551.
- ALLDAY, M.J. VE FARRELL, P.J. (1994). Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA3C/6 expression maintains the level of latent membrane protein 1 in G1-arrested cells. *J. Virol.* **68**: 3491-3498.
- BABCOCK, G.J., DECKER, L.L., VOLK, M., THORLEY-LAWSON, D.A. (1998). EBV persistence in memory B cells in vivo. *Immunity* **9**: 395-404.
- BABCOCK, G.J. VE THORLEY-LAWSON, D.A. (2000). Tonsillar memory B cells, latently infected with Epstein-Barr virus, Express the restricted pattern of latent genes previously found only in Epstein-Barr virus-associated tumors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **97**: 12250-12255.
- BONNET, M., GUINEBRETIÈRE, J.M., KREMMER, E., GRUNEWALD, V., BENHAMOU, E., CONTESSO, G., JOAB, I. (1999). Detection of Epstein-Barr virus in invasive breast cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **91**: 1376-1381.
- BROOKS, G.F., BULTEL, J.S., MORSE, S.A. (1989). Jawetz, Melnick, and Adelberg's Medical Microbiology. 21st Ed. Connecticut: Appleton and Lange Chapter 43.
- BROOKS, J.M., CROOM-CARTER, D.S., LEESE, A.M., TIERNEY, R.J., HABESHAU, G., RICKINSON, A.B. (2000). Cytotoxic T-lymphocyte responses to a polymorphic Epstein-Barr virus epitope identify healthy carriers with coresident viral strains. *J. Virol.* **74**: 1801-1809.
- CALDWELL, R.G., WILSON, J.B., ANDERSON, S.J., LONGNECKER, R. (1998). Epstein-Barr virus LMP2A drives B cell development and survival in the absence of normal B cell receptor signals. *Immunity* **9**: 405-411.
- CAVDAR, AO., GOZDASOGLU, S., YAVUZ, G., BABACAN, E., UNAL, E., ULUOGLU, O., YUCESAN, S., MAGRATH, IT., AKAR, N. (1993). Burkitt's Lymphoma Between African and American Types in Turkish Children: Clinical, Viral (EBV) and Molecular Studies. *Medical and Pediatric Oncology* **21**: 36-42.
- CORREA, R.M., FELLNER, M.D., ALONÍO, L.V., DURAND, K., TEYSSIE, A.R., PÍCCONÍ, M.A. (2004). Epstein-Barr virus (EBV) in healthy carriers: Distribution

of genotypes and 30 bp deletion in latent membrane protein-1 (LMP-1) oncogene. *J. Med. Virol.* **73**: 583-588.

- DEACON, E.M., PALLESEN, G., NIEDOBITEK, G., CROCKER, J., BROOKS, L., RICKINSON, A.B., YOUNG, L.S. (1993). Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease: transcriptional analysis of virus latency in the malignant cells. *J. Exp. Med.* **177**: 339-349.

- DEVERGNE, O., HATZIVASSILIOU, E., IZUMI, K.M., KAYE, K.M., KLEIJNEN, M.F., KIEFF, E., MOSIALOS, G. (1996). Association of TRAF1, TRAF2, and TRAF3 with an Epstein-Barr virus LMP1 domain important for B-lymphocyte transformation: role in NF-kappaB activation. *Mol. Cell Biol.* **16**: 7098-7108.

- ELIOPOULOS, A.G., GALLAGHER, N.J., BLAKE, S.M., DAWSON, C.W., YOUNG, L.S. (1999). Activation of the p38 mitogen-activated protein kinase pathway by Epstein-Barr virus-encoded latent membrane protein 1 coregulates interleukin-6 and interleukin-8 production. *J. Biol. Chem.* **274**: 16085-16096.

- FLAVELL, K.J., MURRAY, P.G. (2000). Hodgkin's disease and the Epstein-Barr virus. *Mol. Pathol.* **53**: 262-269.

- FRUEHLING, S., LONGNECKER, R. (1997). The immunoreceptor tyrosine-based Activation motif of Epstein-Barr virus LMP2A is essential for blocking BCR-mediated signal transduction. *Virology* **235**: 241-251.

- GİRES, O., ZİMBER-STROBL, U., GONNELLA, R., UEFFİNG, M., MARSCHALL, G., ZEİDLER, R., PİCH, D., HAMMERSCHMİDT, W. (1997). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus mimics a constitutively active receptor molecule. *Embo. J.* **16**: 6131-6140.

- GİRES, O., KOHLHUBER, F., KİLGER, E., BAUMANN, M., KİESER, A., KÄISER, C., ZEİDLER, R., SCHEFFER, B., UEFFİNG, M., HAMMERSCHMİDT, W. (1999). Latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus interacts with JAK3 and activates STAT proteins. *Embo. J.* **18**: 3064-3073.

- GOLDSCHMIDTS, W.L., BHATIA, K., JOHNSON, J., AKAR, N., GUITERREZ, M.I., SHIBATA, D., CAROLAN, M., LEVINE, A., MAGRATH, I.T. (1992) Epstein Barr virus Genotypes in AIDS Associated Lymphomas are similar to those in Endemic Burkitt's Lymphomas. *Leukemia.* **6**: 875.

- GREGORY, C.D., ROWE, M., RICKINSON, A.B. (1990) Different Epstein-Barr virus-B cell interactions in phenotypically distinct clones of a Burkitt's lymphoma cell line. *J Gen Virol.* **71**: 1481-1495.

- GROSSMAN, S.R., JOHANNSEN, E., TONG, X., YALAMANCHILI, R., KIEFF, E. (1994). The Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 transactivator is directed to

response elements by the J kappa recombination signal binding protein. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**: 7568-7572.

- HAMMERSCHMIDT, W., SUGDEN, B. (1989). Genetic analysis of immortalizing functions of Epstein-Barr virus in human B lymphocytes. *Nature* **340**: 393-397.

- HATZIVASSILIOU, E., MILLER, W.E., RAAB-TRAUB, N., KIEFF, E., MOSIALOS, G. (1998). A fusion of the EBV latent membrane protein-1 (LMP1) transmembrane domains to the CD40 cytoplasmic domain is similar to LMP1 in constitutive Activation of epidermal growth factor receptor expression, nuclear factor-kappa B, and stress-activated protein kinase. *J. Immunol.* **160**: 1116-1121.

- HIGUCHI, M., IZUMI, K.M., KIEFF, E. (2001). Epstein-Barr virus latent-infection membrane proteins are palmitoylated and raft-associated: protein 1 binds to the cytoskeleton through TNF receptor cytoplasmic factors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **98**: 4675-7680.

- HSU, J.L., GLASER, S.L. (2000). Epstein-Barr virus-associated malignancies: epidemiologic patterns and etiologic implications. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* **34**: 27-53.

- HU, L.F., ZABAROVSKY, E.R., CHEN, F., CAO, S.L., ERNBERG, I., KLEIN, G., WINBERG, G. (1991). Isolation and sequencing of the Epstein-Barr virus BNLF-1 gene (LMP1) from a Chinese nasopharyngeal carcinoma. *J. Gen. Virol.* **72**: 2399-2409.

- HUEN, D.S., HENDERSON, S.A., CROOM-CARTER, D., ROWE, M. (1995). The Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 (LMP-1) mediates activation of NF-kappa B and cell surface phenotype via two effector regions in its carboxy-terminal cytoplasmic domain. *Oncogene* **10**: 549-560.

- ITAKURA, O., YAMADA, S., NARITA, M., KIKUTA, H. (1996). High prevalence of a 30-base pair deletion and single-base mutations within the carboxy terminal end of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus in the Japanese population. *Oncogene* **13**: 1549-1553.

- IZUMI, K.M., KIEFF, E.D. (1997). The Epstein-Barr virus oncogene product latent membrane protein 1 engages the tumor necrosis factor receptor-associated death domain protein to mediate B lymphocyte growth transformation and activate NF-kappaB. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**: 12592-12597.

- JOHANNESSEN, I., ASHGAR, M., CRAWFORD, D.H. (2000). Essential role for T cells in human B-cell lymphoproliferative disease development in severe combined immunodeficient mice. *Br. J. Hematol.* **109**: 600-610.

- JOSEPH, A.M., BABCOCK, G.J., THORLEY-LAWSON, D.A. (2000). Cells expressing the Epstein-Barr virus growth program are present in and restricted to the naive B-cell subset of healthy tonsils. *J. Virol.* **74**: 9964-9971.

- KAİSER, C., LAUX, G., EİCK, D., JOCHNER, N., BORNKAMM, G.W., KEMPKES, B. (1999). The proto-oncogene c-myc is a direct target gene of Epstein-Barr virus nuclear antigen 2. *J. Virol.* **73**: 4481-4484.
- KHANİM, F., YAO, Q.Y., NİEDOBİTEK, G., SİHOTA, S., RİCKİNSON, A.B., YOUNG, L.S. (1996). Analysis of Epstein-Barr virus gene polymorphisms in normal donors and in virus-associated tumors from different geographic locations. *Blood* **88**: 3491-3501.
- KLUG, WS., CUMMINGS, MR. (2000). Genetik Kavramlar, 6. Baskı. USA: Prentice Hall (Türkçe Çeviri: Prof. Dr. Cihan Öner, Ankara).
- KNOX P.G., YOUNG L.S. (1995). Epstein-Barr virus infection of CR2-transfected epithelial cells reveals the presence of MHC class II on the virion. *Virology* **213**:147-157.
- LAHERTY, C., HU, H., OPIPARİ, A., WANG, F., DİXİT, V. (1992). The Epstein-Barr virus LMP1 gene product induces A20 zinc finger protein expression by activating nuclear factor, κ B. *J. Biol. Chem.* **267**: 24157-24160.
- LEVİTSKAYA, J., CORAM, M., LEVİTSKY, V., IMREH, S., STEİGERWALD-MULLEN, P.M., KLEİN, G., KURİLLA, M.G., MASUCCI, M.G. (1995). Inhibition of antigen processing by the internal repeat region of the Epstein-Barr virus nuclear antigen-1. *Nature* **375**: 685-688.
- Lİ, S.N., CHANG, Y.S., LİU, S.T. (1996). Effect of a 10-aminoacid deletion on the oncogenic activity of latent membrane protein 1 of Epstein-Barr virus. *Oncogene* **12**: 2129-2135.
- LONGNECKER, R. (2000). Epstein-Barr virus latency: LMP2, a regulator or means for Epstein-Barr virus persistence?. *Adv. Cancer Res.* **79**: 175-200.
- LONGNECKER, R., KİEFF, E. (1990). A second Epstein-Barr virus membrane protein (LMP2) is expressed in latent infection and colocalizes with LMP1. *J. Virol.* **64**: 2319-2326.
- MIDGLEY RS., BELL AI., MCGEOCH DJ., RICKINSON AB. (2003). Latent gene sequencing reveals familial relationships along Chinese Epstein-Barr virus strains and evidence for positive selection of A11 epitope changes. *J Virol.* **77(21)**: 11517-30.
- MEIJER, C.J., JİWA, N.M., DUKERS, D.F., OUDEJANS, J.J., DE BRUİN, P.C., WALBOOMERS, J.M., VAN DEN BRULE, A.J. (1996). Epstein-Barr virus and human T-cell lymphomas. *Semin. Cancer Biol.* **7**: 191-196.
- MİLLER, C.L., BURKHARDT, A.L., LEE, J.H., STEALEY, B., LONGNECKER, R., BOLEN, J.B., KİEFF, E. (1995). Integral membrane protein 2 of Epstein-Barr

virus regulates reactivation from latency through dominant negative effects on protein-tyrosine kinases. *Immunity* **2**: 155-166.

- MURRAY, P.G., YOUNG, L.S. (2001). Epstein-Barr virus infection: Basis of malignancy and potential for therapy. *Expert Rev. Mol. Med.* **2001**: 1-20.

- NELSON, B.P., NELSON, B.P., NALESNIK, M.A., BAHLER, D.W., LOCKER, J., FUNG, J.J., SWERDLOW, S.H. (2000). Epstein-Barr virus-negative post-transplant lymphoproliferative disorders: a distinct entity?. *Am. J. Surg. Pathol.* **24**: 375-385.

- NERI, A., BARRIGA, F., INGHIRAMI, G., KNOWLES, D.M., NEEQUAYE, J., MAGRATH, I.T., DALLA-FAVERA, R. (1991). Epstein-Barr virus infection precedes clonal expansion in Burkitt's and acquired immunodeficiency syndrome-associated lymphoma. *Blood* **77**: 1092-1095.

- NERURKAR, A.Y., VIJAYAN, P., SRINIVAS, V., SOMAN, C.S., DINSHAW, K.A., ADVANI, S.H., MAGRATH, I., BHATIA, K., NARESH, K.N. (2000). Discrepancies in Epstein-Barr virus association at presentation and relapse of classical Hodgkin's disease: impact on pathogenesis. *Ann. Oncol.* **11**: 475-478.

- NIEDOBITEK, G., AGATHANGGELOU, A., STEVEN, N., YOUNG, L.S. (2000). Epstein-Barr virus (EBV) in infectious mononucleosis: detection of the virus in tonsillar B lymphocytes but not in desquamated oropharyngeal epithelial cells. *Mol. Pathol.* **53**:37-42.

- NIEDOBITEK, G., YOUNG, L.S., HERBST, H. (1997). Epstein-Barr virus infection and the pathogenesis of malignant lymphomas. *Cancer Surv.***30**:143-62.

- NONKWELLO, C., SKINNER, J., BELL, A., RICKINSON, A., SAMPLE, J. (1996). Transcription start sites downstream of the Epstein-Barr virus (EBV) Fp promoter in early-passage Burkitt lymphoma cells define a fourth promoter for expression of the EBV EBNA-1 protein. *J. Virol.* **70**: 623-627.

- OSHIMA, M., AZUMA, H., OKUNO, A. (1999). High prevalence of Epstein-Barr virus type A strain with the 30 b.p. deletion of the latent membrane protein-1 gene in Japanese population. *Pediatrics International* **41**: 490-495.

- PARKER, G.A., CROOK, T., BAÏN, M., SARA, E.A., FARRELL, P.J., ALLDAY, M.J. (1996). Epstein-Barr virus nuclear antigen (EBNA)3C is an immortalizing oncoprotein with similar properties to adenovirus E1A and papillomavirus E7. *Oncogene* **13**: 2541-2549.

- RADKOV, S.A., BAÏN, M., FARRELL, P.J., WEST, M., ROWE, M., ALLDAY, M.J. (1997). Epstein-Barr virus EBNA3C represses Cp, the major promoter for EBNA expression, but has no effect on the promoter of the cell gene CD21. *J. Virol.* **71**: 8552-8562.
- RADKOV, S.A., TOUITOU, R., BREHM, A., ROWE, M., WEST, M., KOUZARIDES, T., ALLDAY, M.J. (1999). Epstein-Barr virus nuclear antigen 3C interacts with histone deacetylase to repress transcription. *J. Virol.* **73**: 5688-5697.
- RAZZOUK, B.I., SRINIVAS, S., SAMPLE, C.E., SINGH, V., SIXBEY, J.W. (1996). Epstein-Barr virus DNA recombination and loss in sporadic Burkitt's lymphoma. *J. Infect. Dis.* **173**: 529-535.
- RICKINSON, A., NITSCHKE, F., BELL, A. (1997). Epstein-Barr virus leader protein enhances EBNA-2-mediated transactivation of latent membrane protein 1 expression: a role for the W1W2 repeat domain. *J Virol.* **71(9)**: 6619-28.
- RICKINSON, A.B., ROWE, M., HART, I.J., YAO, Q.Y., HENDERSON, L.E., RABIN, H., EPSTEIN, M.A. (1984). T-cell mediated regression of "spontaneous" and of Epstein-Barr virus induced B-cell transformation in vitro: studies with cyclosporin A. *Cell Immunol.* **87**:646-658.
- Roche, Molecular Biochemicals Light Cycler System. Mannheim, Almanyà
- ROWE, M., PENG-PILLON, M., HUEN, D., HARDY, R., CROOM-CARTER, D., LUNDGREN, E., RICKINSON, A.B. (1994). Upregulation of bcl-2 by the Epstein-Barr virus latent membrane protein LMP1: a B-cell specific response that is delayed relative to NF- κ B Activation and to induction to cell surface markers. *J. Virol.* **68**: 5602-5612.
- SAMPLE J., KIEFF E. (1990). Transcription of the Epstein-Barr Virus Genome during Latency in Growth-Transformed Lymphocytes. *J. Virol.* **64(4)**: 1667-1674.
- SAMPLE, J., YOUNG, L., MARTIN, B., CHATMAN, T., KIEFF, E., RICKINSON, A., KIEFF, E. (1990). Epstein-Barr virus types 1 and 2 differ in their EBNA-3A, EBNA-3B, and EBNA-3C genes. *J. Virol.* **64**: 4084-4092.
- SANTON, A., BELLAS, C. (2001). Deletions within the Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 oncogene in adult ordinary, HIV-associated and pediatric Hodgkin's disease. *Leuk. Lymphoma* **40**: 235-242.
- SCHOLLE, F., LONGNECKER, R., RAAB-TRAUB, N. (1999). Epithelial cell adhesion to extracellular matrix proteins induces tyrosine phosphorylation of the Epstein-Barr virus latent membrane protein 2: a role for C-terminal Src kinase. *J. Virol.* **73**: 4767-4775.

- SHOLLE, F., BENDT, K.M., RAAB-TRAUB, N. (2000). Epstein-Barr virus LMP2A transforms epithelial cells, inhibits cell differentiation, and activates Akt. *J. Virol.* **74**: 10681-10689.
- SILINS, S.L., SCULLEY, T.B. (1994). Modulation of vimentin, the CD40 activation antigen and Burkitt's lymphoma antigen (CD77) by the Epstein-Barr virus nuclear antigen EBNA-4. *Virology* **202**: 16-24.
- SINCLAIR, A.J., PALMERO, I., PETERS, G., FARRELL, P.J. (1994). EBNA-2 and EBNA-LP cooperate to cause G0 to G1 transition during immortalization of resting human B lymphocytes by Epstein-Barr virus. *Embo. J.* **13**: 3321-3328.
- SPECK, S.H and STROMINGER, J.L. (1989). Transcription of Epstein-Barr virus in latently infected, growth-transformed lymphocytes. *Adv Viral Oncol.* **8**:133-150
- STARATSCHEK-JOX, A., KOTKOWSKI, S., BELGE, G., RUDIGER, T., BULLERDIEK, J., DIEHL, V., WOLF, J. (2000). Detection of Epstein-Barr virus in Hodgkin-Reed-Sternberg cells: no evidence for the persistence of integrated viral fragments in Latent membrane protein-1 (LMP-1)-negative classical Hodgkin's disease. *Am. J. Pathol.* **156**: 209-216.
- SUGAWARA, Y., MIZUGAKI, Y., UCHIDA, T., TORII, T., IMAI, S., MAKUUCHI, M., TAKADA, K. (1999). Detection of Epstein-Barr virus (EBV) in hepatocellular carcinoma tissue: a novel EBV latency characterized by the absence of EBV-encoded small RNA expression. *Virology* **256**: 196-202.
- SUNG, N.S., EDWARDS, R.H., SEILLER-MOISEWITSH, F., PERKINS A.G., ZENG, Y., RAAB-TRAUB, N. (1998). Epstein-Barr virus strain variation in nasopharyngeal carcinoma from the endemic and non-endemic regions of China. *Int. J. Can.* **76**: 207-215.
- SZEKELY, L., SELIVANOVA, G., MAGNUSSON, K.P., KLEIN, G., WIMAN, K.G. (1993). EBNA-5, an Epstein-Barr virus-encoded nuclear antigen, binds to the retinoblastoma and p53 proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 5455-5459.
- TAÇYILDIZ, N., ÇAVDAR, A.O., ERTEM, U., OKSAL, A., KUTLUAY, L., ULUOĞLU, O., LİN, J.C. (1998). Unusually high frequency of a 69-bp deletion within the carboxy terminus of the LMP-1 oncogene of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma of Turkish children. *Leukemia* **12**: 1796-1805.
- TAKADA, K. (2000). Epstein-Barr virus and gastric carcinoma. *Mol. Pathol.* **53**: 255-261.
- TAMAKI H., BYRON KS., SULLIVAN JL., SOMASUNDARAN M. (1997). Detection and differentiation of Epstein-Barr virus strains by in situ polymerase chain reaction. *Mol Cell Probes.* **11(3)**: 237-41

- TAN, E.L., PEH, S.C., SAM, C.K. (2003). Analyses of Epstein-Barr virus latent membrane protein-1 in Malaysian nasopharyngeal carcinoma: High prevalence of 30-bp deletion, Xho-1 polymorphism and evidence of dual infections. *J. Med. Virol.* **69**: 251-257.
- WILSON, J.B., BELL, J.L., LEVINE, A.J. (1996). Expression of Epstein-Barr virus nuclear antigen-1 induces B cell neoplasia in transgenic mice. *Embo. J.* **15**: 3117-3126.
- YAN-CHIN TAI., LIAN-HUA KIM., SUAT-CHENG PEH. (2004). High Frequency of EBV association and 30-bp deletion in the LMP-1 gene in CD56⁺ lymphomas of the upper aerodigestive tract. *Pathology International.* **54**: 158-166
- YAO, Q.Y., RICKINSON, A.B., EPSTEIN, M.A. (1985). A re-examination of the Epstein-Barr virus carrier state in healthy seropositive individuals. *Int. J. Cancer* **35**: 35-42.
- YOUNG, L.S. (1999). Epstein-Barr virus infection and persistence: a B-cell marriage in sickness and in health. *Lancet* **354**: 1141-1142.
- YOUNG, L.S., YAO, Q.Y., ROONEY, C.M., SCULLEY, T.B., MOSS, D.J., RUPANI, H., LAUX, G., BORNKAMM, G.W., RICKINSON, A.B. (1987). New type B isolates of Epstein-Barr virus from Burkitt's lymphoma and from normal individuals in endemic areas. *J. Gen. Virol.* **68**: 2853-2862.
- YOUNG, L., ALFIERI, C., HENNESSY, K., EVANS, H., O'HARA, C., ANDERSON, K.C., RITZ, J., SHAPIRO, R.S., RICKINSON, A., KIEFF, E. (1989). Expression of Epstein-Barr virus transformation-associated genes in tissues of patients with EBV lymphoproliferative disease. *N. Engl. J. Med.* **321**: 1080-1085.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı ve Soyadı : **Deniz Tamer**
Doğum yeri, tarihi : Ankara,31.05.1978
Uyruğu : T.C.
Medeni Durumu : Bekar
Adres : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi İbn-i Sina
Hastanesi Hematoloji Laboratuvarı 06100
Sıhhiye Ankara
Telefon (Cep) : (532) 346 12 19
E-mail : tamerd78@yahoo.com

EĞİTİM GEÇMİŞİ

2003 – 2005 Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D.
Pediatrik Moleküler Genetik B.D.
Tezli Yüksek Lisans
1995-2002 Ankara Üniversitesi Fen Fakültesi
Biyoloji Bölümü
Lisans
1991-1995 Özel Arı Lisesi

YABANCI DİLLER

Çok iyi derece İngilizce, orta derece Almanca bilgisi;

MESLEKİ DENEYİMİ

2003-halen Ankara Üniversitesi
Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları A.B.D.
Pediatrik Moleküler Genetik B.D.
Tez Çalışması
2002 29 Mayıs Hastanesi Laboratuvarı
8 ay gönüllü

2001 Düzen Laboratuvarlar Grubu
Hormonlar Bölümü

Staj(30 iş günü)

2000 Çağ Hastanesi
Danışma Görevlisi

3 ay gönüllü

KONGRE ve KONFERANSLAR

2005 42. Türkiye Pediatri Kongresi

2004 3. Ulusal Moleküler ve Tanısal Mikrobiyoloji Kongresi Katılım
Sertifikası

2003 Beckman Coulter CEQ 8000 Model Sekans Cihazı Eğitim
Programı

2003 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 2. Ankara
Biyoteknoloji Günleri

2003 SSK Ankara Eğitim Hastanesi 1. Bahar Sempozyumu

2002 Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü 1. Ankara
Biyoteknoloji Günleri

YAYINLAR

Karahan ZC, Mumcuoglu I, Guriz H, Tamer D, Balaban N, Aysev D,
Akar N (2006). PCR evaluation of false-positive signals from two
automated blood-culture systems. *J. Med. Microbiol.* **55**: 53-7.

DİĞER GEREKLİ BİLGİLER

Çok iyi derece İngilizce, orta derece Almanca bilgisi;

MS Office uygulamaları (Word, Excel, Outlook, PowerPoint);

B Sınıfı sürücü belgesi (Aktif araç kullanımı)