

## OKÜLT HEPATİT B VİRUS ENFEKSİYONU: VİROLOJİK VE MOLEKÜLER MEKANİZMALAR

## OCCULT HEPATITIS B VIRUS INFECTION: VIROLOGIC AND MOLECULAR MECHANISMS

Cakal B.<sup>1</sup>

1İstanbul Üniversitesi Deneysel Tıp Araştırma Enstitüsü Çapa-Fatih/İstanbul

### ÖZET

Okült Hepatitis B Virus (HBV) enfeksiyonu (Occult HBV infection; OBI) serum HBV DNA statüsü dikkate alınmaksızın mevcut serolojik testler ile HBV yüzey antijeni (HBsAg) negatif tespit edilen bireylerin karaciğerinde HBV genomunun uzun süreli persistan varlığı olarak tanımlanır. OBI'nin Hepatoselüler karsinoma (HSK) riski ile kronik karaciğer hastalığının (KKH) progresyonunun artmasına sebep olabilen önemli bir risk faktörü olduğu hipotez edilmektedir. OBI virüse ve infekte konağa ait faktörler ile çevresel faktörlerin zemininde gelişen genetik, epigenetik ve immünolojik mekanizmaların karşılıklı etkileşimi ile şekillenen, kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri içerisinde muhtemelen safhalarından biri olarak değerlendirilmesine karşın, HBV enfeksiyonunun bu özgün formuna neden olan mekanizmalar henüz tam olarak belirlenememiştir. Bu derlemede OBI'nin virolojik özellikleri ve moleküler mekanizmalarının aydınlatılmasına yönelik bilimsel literatürün irdelenmesi amaçlanmıştır.

### SUMMARY

Occult hepatitis B infection (OBI) defines to the long-term persistence of HBV DNA in the liver (with detectable or undetectable HBV DNA in the serum) of individuals testing hepatitis B surface antigen (HBsAg) negative by currently available assays. OBI infection has been hypothesized to be a significant risk factor contribution to the progression of chronic liver diseases with increased risk for hepatocellular carcinoma (HCC) with may lead to an increased progression of liver diseases. OBI can be considered as the possible a phase in the natural history of chronic HBV infection that the host's immune surveillance and epigenetic mechanisms are likely involved nevertheless, the mechanisms leading to its occurrence remain relatively poorly understood. The purpose of this review is examine to scientific literature about which is related molecular mechanisms of OBI

## GİRİŞ

Dünya Sağlık Örgütü (WHO) verilerine göre insan kanserojenleri arasında birinci grupta, en önemli onkojenik etkenler arasında ise ilk sıralarda yer alan HBV ile Dünya nüfusunun yaklaşık üçte birinin serolojik veriler uyarınca enfekte olduğu, 240 milyondan fazla kişinin ise Hepatit B yüzey (Surface/S) antijeni taşıyıcısı olduğu, ayrıca her yıl akut ve kronik Hepatit B (KHB) enfeksiyonu ile ilişkili 780.000'den fazla insanın yaşamını yitirdiği rapor edilmektedir (1-3). HBV enfeksiyonları klinik yönü ile akut veya kronik viral enfeksiyondan kısa süre sonra hastanın ölümü ile sonlanan fulminan hepatiti de içeren subklinik fatal formlara kadar uzanan geniş bir yelpazede sonuçlanabilmektedir. HBV enfeksiyonları HBsAg içeren immünizasyon yolu ile genellikle önlenemez olmasına karşın, KHB enfeksiyonları tüm dünyada önemli bir halk sağlığı problemi olmaya devam etmektedir. (4-7). Kronik HBV taşıyıcılarında primer hepatoselüler karsinoma (PHK) rölatif riskinin enfekte olmayan bireylere göre yaklaşık olarak 100 kat daha fazla olduğu tahmin edilmektedir. (8,9). Her yıl rapor edilen son dönem karaciğer hastalığı ve HSK vakalarının % 60'ının, karaciğer nakillerinin ise % 5- 10'nin kronik HBV enfeksiyonu ile ilişkili olduğu rapor edilmektedir (10). Günümüzde HBV enfeksiyonunun tedavisinde Tip 1 interferon ve nükleot(z)it analoglarını içeren iki terapötik yaklaşım mevcuttur. Buna karşın bu terapötiklerin sitoplazmik formdaki HBV'nin genomik replikasyonunu inhibe edebilmesine karşın viral transkripsiyon için şablon ve viral persistanlığın sürdürülmesinde kritik öneme sahip virüsün nüklear genomik formu olan kovalent kapalı sirküler DNA (covalently closed circular DNA; cccDNA) üzerine direkt etkilerinin olmaması, uzun süreli ve açık uçlu tedavi gereksinimleri nedeniyle terapötik etkinlikleri oldukça sınırlı olması kronik HBV

enfeksiyonlarının tedavisine ilişkin en önemli sorun olarak güncelliğini korumaktadır. Nihayetinde bu epidemiyolojik ve bilimsel veriler temelinde kronik HBV enfeksiyonunun karaciğer kanseri etiopatogenezinde rol alan önemli risk faktörlerinden biri olduğu genel kabul görmektedir (11).

HBV enfeksiyonunun tanısı genellikle sirkülasyondaki HBsAg'nin serolojik identifikasyonuna dayanır. KHB enfeksiyonunda spontan serum HBsAg kaybı nadir olup daha çok interferon ve/ya nükleot(z)id analogları ile tedavi edilen hastalarda gözlemlenir (12). Serumda tespit edilebilir düzeylerde süregelen HBsAg varlığı KHB enfeksiyonunun temel serolojik belirtici olmasına karşın, HBsAg seroklirensi HBV eradikasyonuna delalet etmeyebilir. Yakın geçmişte daha duyarlı HBV DNA tanı yöntemlerinin uygulanmaya başlaması ile HBsAg negatif HBV enfeksiyonlarının varlığı belirlenmiştir. Bu özel durum okült HBV enfeksiyonu olarak adlandırılmaktadır. OBİ enfeksiyonu ile ilişkili ilk gözlem ve veriler 1970 yıllardan beri tanımlanmasına karşın, HBsAg negatif KHB enfeksiyonlu hastaların karaciğer biyopsi örneklerinde HBV genomunun varlığının araştırılmasına yönelik büyük hasta serilerini içeren bir çalışmanın OBİ'nin kronik HCV'li hastalarda siroz progresyonunu hızlandırıcı yönde katkıda bulunduğu ve okült virüsün genellikle HBsAg sentezi ve viral replikasyonu engelleyici yönde mutasyon taşımadığına yönelik bulgu ve verilerinin 1999 yılında The New England Journal of Medicine'de yayınlanması sonrası hepatoloji alanında önemli bir araştırma konusu olmaya başlamıştır (13-15). Sonraki yıllarda yapılan çalışmalarda ise OBİ'nin viral ve klinik özelliklerine dair veriler hızla artmaya başlamıştır. OBİ mevcut serolojik testler ile HBsAg negatif saptanan bireylerde serum HBV DNA statüsü dikkate alınmaksızın karaciğer dokusunda HBV DNA'nın persistan varlığı olarak

tanımlanır (16-18). OBİ'li bireylerde serum HBV DNA düzeyleri (<200 IU/ml) HBsAg pozitif KHB enfeksiyonları ile karşılaştırıldığında oldukça düşük hatta saptanamaz düzeylerde olmasına karşın karaciğer dokusunda replikatif formda HBV DNA saptanabilmektedir (16).

OBİ klinik açıdan; okült virüsün kan transfüzyonu, doğum, hemodiyaliz ve ortotopik karaciğer gibi organ transplantasyonu yolu ile bulaşını takiben alıcıda tipik yeni HBV enfeksiyonuna neden olabilmesi, immünsüpresyon koşullarında OBİ reaktivasyonu ve takiben HBV ilişkili (akut ve fulminan hepatit) karaciğer hastalıkları, özellikle HCV pozitif bireylerde siroz yönünde kronik karaciğer hastalıklarının progresyonu üzerine etkisi ile özellikle pozitif persistan HBsAg'ni olanlara benzer şekilde HSK için artan bir risk faktörü olduğu yönünde hipotez uyarınca yoğun bir tartışma ve araştırma konusudur (16,19,20). OBİ özellikle HBsAg seroprevalansının yüksek olduğu bölgelerde başta kronik HCV enfeksiyonu olmak üzere, kriptojenik hepatit, HSK, kronik ve fulminan hepatitli hastalarda önemli oranlarda tanımlanmaktadır (21-23).

### **HBV Enfeksiyonunun Virolojik Özellikleri**

HBV viral kapsid içerisinde pregenomik RNA'nın ters (revers) transkripsiyonu aracılığı ile özgün replikasyona, organ tropizmine ve benzer genomik organizasyona sahip seçimli enfeksiyon konağı memeliler olan orthohepadnavirus cinsi ile konağı kuşlar olan avi-hepadnavirus cinslerini içeren hepatotropik DNA virüslerinden Hepadnaviridae ailesinin prototipik bir üyesi olup, 42 nm çapında, sferik şekilli, kısmen çift zincirli ve şimdiye kadar bilinen hayvan virüsleri içinde en küçük genoma sahip bir DNA virüsüdür (24,25). Viral genom, kapsid içinde yaklaşık olarak 3200 bp içeren, tipik olarak gevşek sirküler, kısmen çift zincirli

DNA (Relaxed circular; RcDNA) şeklinde ve terminal ucunda kovalent olarak bağlanmış bulunan viral polimeraz proteinini içerecek şekilde organize olmuştur. HBV genomu kısmen birbiri ile örtüşen sırasıyla yüzey (PreS/S), kor (PreC/C) polimeraz (P) ve X'den oluşan 4 adet açık okuma çerçevesi (open-reading frames; ORF) içerir. PreS/S ORF üç viral yüzey proteinini (PreS1; large, PreS2; middle PreS; small) kodlamakta; PreC/C ORF kor antijeni (HBcAg) ve yapısal olmayan salgısal olarak bilinen e-antijenini (HBeAg) kodlamakta; P ORF DNA polimeraz, revers transkriptaz ve RNaz H aktivitesine sahip viral polimerazı ve protein priming reaksiyonu için gerekli terminal proteini kodlar; X ORF ise kesin olarak bilinmemekle birlikte in vivo viral replikasyon için gerekli olan düzenleyici X proteinini kodlar. (26,27)

*HBV viral yaşam döngüsü özetle;* 1-Virüs henüz yeni tanımlanan PreS1'e spesifik hepatosit yüzeyinde yer alan Heparan sulphate proteoglycans (HSPGs), Sodium taurocholate cotransporting polypeptide (NTCP) reseptörleri aracılığı ve endositoz yolu ile hücre içine transfer olduktan sonra, endozom içinde viral kapsitten sıyrılır ve nükleer membrana tranportu gerçekleşir, 2-Kesin olarak bilinmemekle birlikte konak tamir mekanizmaları aracılığı ile RcDNA'nın tüm viral transkriptler için şablon görevi yapan kovalent kapalı sirküler DNA'ya (covalently closed circular DNA; cccDNA) dönüşümü sağlanır, 3-cccDNA'nın hücre RNA polimerazlar, karaciğerce zenginleştirilmiş transkripsiyon faktörleri, prekor/kor, büyük yüzey antijen, major yüzey antijen ve X geni promotörleri ve ayrıca düzenleyici diziler aracılığı transkripsiyonu sonrası sırasıyla prekor/pregenomik (3.5 kb) ve subgenomik (2.4 kb, 2.1 kb ve 0.7 kb'lik) mRNA'ların sentezi gerçekleştirilir (28-30). 4-HBV'nin replikasyon stratejisi için nükleer cccDNA'dan transkribe olan 3.5-kb'lik pregenomik RNA kritik öneme

sahiptir. Bu RNA; kor polipeptid (nükleokapsit antijen, HBcAg) ve HBV DNA polimeraz kodlamanın yanında viral yaşam döngüsünde replikasyon kalıbı olarak ek fonksiyona sahiptir (31). 5- Bu RNA ve HBV DNA polimeraz ürünü, olgunlaşmamış (immatür) kor partiküllerini oluşturmak üzere HBcAg/P21 polipeptitleri tarafından sitoplazmada enkapside edilir, 6- HBV DNA polimerazın, revers transkriptaz ve RNaz H aktivitesi, 3.5-kb'lik pregenomik RNA'yı enfeksiyöz Dane partiküllerinde bulunan yaklaşık 3.2 kb'lik kısmi (parsiyel) çift iplikli HBV genomuna dönüştürür (32). 7- Virüs partiküllerinin birleşmesi için son adım uygun bir dizi oluşturan zarf antijen molekül (HBsAg) grubuyla olgun (matür) kor partikülünün endoplazmik retikulum membranı içerisindeki ilişkisini içerir, 8- Yüzey antijen grubu endoplazmik retikulumun lümenine doğru filizlenerek matür kor partikülünü sarar (33). 9- Sentezi tamamlanan virion hücreden endoplazmik retikulum ve golgi aparatı yolağını izleyerek salgılanır, 10- RcdNA'yı içeren nükleokapsid ile çevrili olgun virionların bir kısmı ise hem persistan enfeksiyon için temel rezarvuvar niteliğine sahip hemde pregenomik (3.5 kb) ve subgenomik viral transkriptlerin sentezi için kalıp görevi üstlenen cccDNA havuzunu oluşturmak üzere tekrar hepatositlerin nükleosuna geri dönmesi ile dışarıdan aşılması zor viral yaşam döngüsü böylece tamamlanır (34).

### **OBİ'nin moleküler mekanizmaları**

HBsAg HBV enfeksiyonunun kontrolü ile klinik seyrinin belirlenmesi amacıyla kullanılan serolojik bir markıdır. Mevcut serolojik testler ile dolaşımda HBsAg varlığına rağmen HBsAg negatifliği akut enfeksiyonun erken safhasında düşük miktardaki antijen sentezinden veya replikasyona rağmen virüsün moleküler yapısındaki değişimlerden kaynaklanabilir ve bu iki durum viremiye rağmen test sonucunun yanlış negatifliğine, buna karşın aktif bir enfeksiyon ve replikasyon

varlığına rağmen sekresyonunun bloke olması nedeniyle HBsAg'nin dolaşımda gerçekten bulunmaması ise enfeksiyonun kontrolü açısından yanlış tanımlaya neden olabilir (35,36). Okült enfeksiyonun moleküler temeli HBV'e özgü viral yaşam siklusu ile HBV cccDNA'nın enfekte hepatositlerin nükleusunda kromatize serbest epizomal formda stabil olarak hepatosit yarılanma ömrü süresince persistan varlığı ile yakından ilişkili olup, bu durum HBsAg serokonversiyonuna rağmen HBV enfeksiyonunun süresiz devamına imkan sağlar (37,38). Nihayetinde cccDNA'nın hepatositlerin yarılanma ömrü süresince uzun dönemli ve persistan varlığı, var olan HBV enfeksiyonunun konak immün sistemi tarafından güçlü bir şekilde süprese edilse bile yaşam boyu devam edebilme olasılığına işaret eder. HBV viral kapsid içerisinde pregenomik RNA'sının ters (revers) transkripsiyonu aracılığı ile replike olmakta, retrovirüslere benzer şekilde konak genomuna integre olabilmektedir. Viral DNA'nın kısmen ve parçalı olacak şekilde konak genomuna integrasyonunun viral replikasyon döngüsünde rolü yoktur. İntegre HBV DNA enfekte bireyin karaciğer hücrelerinde HBsAg statüsünden (pozitif yada negatif) bağımsız olarak yaşam boyu kalıcı olabilir. OBİ replikasyon yeterliliğine sahip HBV'nin epizomal ve tüm viral genomun intrahepatik persistanlığı ile ilişkili olduğu için, HBsAg negatif vakalarda integre viral DNA'nın varlığı okült enfeksiyon olarak tanımlanmaz (39). OBİ vakalarının çoğunda anti HBV antikorları pozitif saptanmasına karşın (Anti-HBc ve/ya Anti-HBs antikorları sırasıyla kor ve HBsAg'lerine karşı) vakaların %20'den fazlasında tüm HBV markerleri negatif saptanabilmektedir(40). Dolayısıyla OBİ statüsü serolojik olarak seropozitif (Anti-HBc ve/ya Anti-HBs pozitif) ve seronegatif (Anti-HBc ve Anti-HBs negatif birey) olarak sınıflandırabilmekte ve serolojik olarak ayırt edilebilmektedir. Seropozitif

OBİ'lerde HBsAg seroklirensi ya akut enfeksiyonun rezülasyonundan hemen sonra ya da aşıkâr kronik HBV enfeksiyonundan yıllar ya da onyıllar sonrası oluşabilmektedir (41). Buna karşın seronegatif OBİ vakalarında ya zamanla anti-HBV antikoları kaybolabilmekte ya da "woodchuck hepatitis virus" (hepadnavirus, WHV) ile infekte woodchuck (dağ sıçanları) hayvan modellerinde tanımlandığı gibi inoküle olan enfekte virion sayısının düşüklüğü nedeniyle enfeksiyonun başlangıcından itibaren HBV antikoları negatif olarak saptanabilmektedir (42,43).

OBİ vakaların bir kısmında viral yüzey ve polimeraz genlerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu sırasıyla yüzey kaçış mutasyonları ve replikasyon defekti ile karakterize iken vakaların önemli bir kısmında ise viral transkripsiyon ve replikasyon aktivitesi konak savunma mekanizmaları tarafından güçlü bir şekilde baskılanan replikasyon kapasitesine sahip virüslerle ilişkilidir. Buna karşın bu süpresyon yeterli ve sürekli olmadığında düşük düzeyde replikasyon ve transkripsiyonel aktivasyonun uzun süre kalıcı olabileceği, ayrıca olası bazı tersinir özel koşulların da viral replikasyonu ve tipik HBsAg pozitif aşıkâr HBV enfeksiyonunu teşvik edebileceği öne sürülmektedir. Özetle OBİ statüsü virüse ait faktörler (mutasyonlar) ile HBV replikasyonu ve gen ekspresyonunun güçlü bir şekilde süpresyonuna neden olabilen konak immün denetim mekanizmalarındaki aksaklıklar ve viral biyosentezin regülasyonunda rol alan epigenetik mekanizmaları içeren konak faktörleri ile ilişkilendirilmektedir (39,44).

### **Viral Faktörler**

**Mutasyonlar:** Serumda saptanabilir düzeyde HBsAg olmamasına karşın intrahepatik düzeyde serbest epizomal HBV DNA varlığı vakaların bir kısmında viral genomda meydana gelen mutasyonlar

(nokta, delesyon ve insersiyon) ile ilişkili olabilmektedir. HBV'nin kompleks genom organizasyonu ile genlerin kodlanan ve düzenleyici bölgelerinde meydana gelen mutasyonlar viral dinamiği şekillendirilebilmektedir. HBV'nin RNA bağımlı DNA polimeraz/revers transkriptaz enziminin hata düzeltme mekanizmasının olmaması viral genomda potansiyel olarak her replikasyon siklusunda ve her nükleotit pozisyonunda mutasyonların oluşmasına neden olabilmektedir. HBV'nin tahmini mutasyon oranı  $>2.10^{-4}$  baz değişimi/bölge/yıldır. Bu mutasyon oranı diğer DNA viruslarından 100 kat daha fazladır (45). *Mutasyonların neden olabileceği öne sürülen HBsAg negatifliği ile karakterize OBİ'nin moleküler mekanizmaları:* 1-Mevcut ticari testler ile saptanamayacak düzeyde antijenik olarak modifiye HBsAg sentezi (S protein antijenitesinin kaybı), 2-HBsAg sentezinin inhibasyonu; a) X-ORF'de Delesyonlar/mutasyonlar b) Polimeraz domain/'a' determinat mutasyonları c) HBV/HCV Koenfeksiyonu, 3-HBsAg sekresyonunun engellenmesi; a) Kor ve zarf proteinlerinin etkileşim domainlerinde mutasyon b) HBV zarf geni düzenleyici elementlerini içeren mutasyonlar c) Viral RNA'nın kırılması (Splicing) d) S protein glikozilasyon alanları ile ilişkili mutasyonlar ve ayrıca 4-Düşük viremi ile ilişkilendirilmektedir (46-51).

### **S protein antijenitesinde kayıp**

*HBsAg 'a' determinantında mutasyonlar;* HBsAg immünojen özelliğe sahip en az 3 hidrofilik ve 2 hidrofobik domanin içeren 226 aminoasitlik (aa) bir proteindir. 2.hidrofilik bölgede yer alan 99-169 aa'leri arasındaki majör hidrofilik bölgenin (MHR) içerisinde disülfid köprüleri ile bağlı 5 sistein residüsünden oluşan 'a' determinanı (124-147 aa) HBsAg'nin konfirmasyonundan ve kararlılığından sorumlu olması yanında immünojenitesi nedeniyle de HBsAg'ye spesifik antikolar ve immün hücreler için en kritik tanıma

bölgesi olup, 124 ve 137 ile 139-147 aa rezidüleri arasında disülfid bağları ile oluşturulan iki adet domain içerir (52-54). HBsAg'nin 'a'determinantının üçüncül yapısının belirlenmesinde kritik öneme sahip G145R, L141E, ile 124, 137, 139, 147 ve 149 aa pozisyonlarındaki sisteinlerin serinle yer değiştirdiği ve ayrıca 103, 118, 120, 170, 213. aa'ler gibi klasik 'a' determinantı dışındaki aa rezidülerinde meydana gelen varyasyonların/mutasyonların, viral yüzey proteinin antijenik konformasyonunun ve immünolojik özellikleri ile özellikle serolojik tanı amacıyla kullanılan spesifik anti-HBs antikörlerinin tanıdığı immüdominant bölgelerin (epitop) değişmesine neden olarak, mevcut ticari serolojik testler ile tanımlanamayan yalancı HBsAg negatifliğine yol açabildiği gösterilmiştir (55-61). MHR'nin 'a'determinantının ilk domaini (aa 124-137) içerisinde gerçekleşen nokta mutasyonları daha çok bağışık olmayan OBI'li bireylerden elde edilen izolatlarda saptanmasına karşın ikincil domainde saptanan nokta mutasyonlar ise sıklıkla immünprofilaksi sonrası tanımlanan OBI'li hastaların izolatlarında tanımlanmaktadır (62). MHR bölgesindeki mutasyon sıklığı OBI'li hastalarda HBsAg pozitif hastalar ile karşılaştırıldığında daha yüksek frekansda saptanmasına karşın bu mutasyonların direkt olarak OBI ile ilişkilendirilmesi henüz tartışmalıdır (63).

### **HBsAg sentezinin inhibasyonu**

*X-ORF'de Delesyonlar/mutasyonlar:* Dolaşımda tespit edilemeyen HBsAg belirtildiği üzere viral yüzey proteininin antijenitesinin kaybına neden olan mutasyonlara ek olarak HBsAg sentezi ve viral replikasyonu inhibe edebilen mekanizmalarla da ilişkili olabilmektedir. Bu açıdan kor promotör ve enhancerler gibi düzenleyici elementler için transkripsiyonel aktivatör olarak kabul edilen 154 aa'lik X proteinini kodlayan X ORF'de meydana gelen delesyonların ve DR2 içerisinde

meydana gelen nokta mutasyonların, X proteininin viral replikasyon, kor ve HBsAg sentezi ile ilişkili transaktivatör fonksiyonunun aksamasına neden olarak, tespit edilebilir düzeyde HBV DNA ve replikasyon varlığına rağmen HBsAg ve HBcAg sentezinin süpresyonu, negatif serolojik tanımlamaya yol açabilmektedir (64-67).

*Polimeraz domain/ 'a' determinat mutasyonları:* HBV genomunda yer alan genlerin çakışması viruse son derece efektif bir genomik organizasyon imkanı tanımasına karşın bu özgün yapının istenmeyen olumsuz etkileri de olabilmektedir. Örneğin S geninin P geni ile ya da tersine P geninin S geni ile örtüştüğü bölgelerde meydana gelen mutasyonlar sırasıyla viral replikasyon kapasitesi ve HBsAg yapısında varyasyonlara, sonucunda ise HBsAg sentezinin azalmasına neden olabilmektedir (68). Bu duruma sıklıkla kendiliğinden (spontan) veya tedavi amacıyla kullanılan viral replikasyon inhibitörlerinin seçimli baskısı sonucu oluşan mutasyonlar nedeniyle rastlanılabilmektedir (48).

*Koenfeksiyon:* HBV ve HCV koenfeksiyonu etkenlerin bulaş yollarının ortak olması nedeniyle özellikle enfeksiyonun endemik olduğu bölgeler ile diyaliz hastalarında daha sık tespit edilir. Dolaşımda tespit edilebilir HCV'ye karşın HBsAg seronegatifliğinde HCV kor proteinle ilişkili viral interferans mekanizmasının kritik öneme sahiptir. HCV kor proteininin bu etkisini; HBx protein ile etkileşmesi sonucu HBV gen ekspresyonunu inhibe ederek ve HBV kapsidasyon sürecinde kritik öneme sahip pregenomik RNA'nın 5' ucunda yer alan paketleme sinyali  $\epsilon$ 'nin HBV kor proteinine bağlanmasına müdahil olarak viral kapsid oluşumunu engellemesi yolu ile gerçekleştirebildiği öne sürülmesine karşın, in vitro ko-transenfeksiyon modelleri henüz başarı ile uygulanmadığı için bu süpresyonun ve iki virüs arasındaki

interferansın OBİ üzerindeki rolü ve mekanizması henüz tam olarak anlaşılabilmiş değildir (69-72). HIV pozitif bireylerde aşkar ya da okült HBV koinfeksiyonları sıklıkla gösterilmesine karşın HBV aktivitesi üzerinde HIV'in nihai rolü henüz bilinmemektedir. Ayrıca transgenik fare modellerinde *Schistosoma mansoni*'nin HBV replikasyonunu güçlü bir şekilde süprese ettiği gösterilmesine karşın bu süpresyona ilişkin mekanizmalar da henüz net olarak aydınlatılamamıştır (73).

### **HBsAg sekresyonunun engellenmesi**

*Kor ve zarf proteinlerinin etkileşim domainlerinde mutasyon;* hücre içi alıkonulma nedeniyle sirkulasyonda tespit edilemeyen HBsAg negatifliği mutasyonlar ile ilişkili gerçek negatiflik olarak tanımlanır (48). Viral yüzey proteini, T ve B hücrelerine spesifik epitoplara içeren domainlere ek olarak viral kurgulanma sürecinde zarf ve kor proteinler arasındaki etkileşimde belirleyici olan sitozolik bir döngü üzerinde lokalize olması nedeniyle de viral sekresyon ve morfogenezde rol oynayan 56-80. aa rezidülerinden oluşan ayrı bir domain içerir (74). Özellikle bu domainin arjinin içeren 73,78 ve 79 nolu aminoasitlerinin alanin veya lösin yönünde değişikliğine neden olan mutasyonların domainin elektrik yükünde ve S protein topolojisinde değişime yol açarak, virusun zarf ve kor proteinleri arasındaki etkileşimi engellediği, nihayetinde bu durumun viral ve subviral partiküllerin morfogenezini ve sekresyonunu olumsuz etkileyebileceği gösterilmiştir (75). Benzer olarak domainin 60, 65 ve 69. aa pozisyonlarında meydana gelen mutasyonların da zarf ve kor proteinleri arasındaki viral kurgu ve sekresyon için gerekli etkileşimi olumsuz etkileyebileceği, M75T mutasyonunun ise HBsAg'nin perinükleer alanda birikmesine yol açarak yüzey proteininin sekresyonuna engel olabildiği, son olarak L77R mutasyonunun da ayrıca viral kurgu için kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir (76-78).

*HBV zarf geni düzenleyici elementlerini içeren mutasyonlar:* HBV yüzey proteinlerinin sentezinden sorumlu zarf geninin 2.4 ve 2.1 kb'lik mRNA'larının transkripsiyonu Pre-S geninin kodlayıcı bölgesi içerisinde yer alan S ve Pre-S promotorları (P<sub>Sp</sub> ve P<sub>S</sub>) tarafından kontrol edilir. Pre-S promotor bölgesi içinde meydana gelen özellikle delesyon mutasyonları, S geninin fonksiyon dışı kalmasına, viral replikasyon varlığına ve hücre içi alıkonulmaya rağmen, HBsAg transkripsiyonun engellenmesine, dolayısıyla HBsAg sentezinin ve sekresyonunun azalmasına neden olabilmektedir (79,80). HBV kurgusu ve sekresyonunda büyük ve küçük yüzey proteinlerinin oranı kritik belirleyicidir. Küçük yüzey proteininin sentezinin azalması büyük yüzey proteininin ER'da birikmesine, büyük yüzey proteininin fazla ekspresyonu ise küçük yüzey proteininin hücre içerisinde kalmasına sebep olarak HBsAg sekresyonunun ve serumdaki miktarının azalmasına neden olabilmektedir (81,82). Büyük ve küçük S proteini arasındaki uyumsuzluk pre-S promotor ile S promotor aktivitesini kontrol eden cis-element olarak adlandırılan CCAAT elementi üzerinde meydana gelen mutasyonlar sonucu oluşabilmekte, keza bu mutasyonlar transkripsiyonun aktivasyonu için gerekli özellikle karaciğerce zenginleştirilmiş transkripsiyon faktörlerinin promotor içerisindeki düzenleyici elementlere bağlanmasını engelleyerek promotor aktivitesinin azalmasına ve nihayetinde iki yüzey proteini arasındaki dengenin bozulması sonucu viral ve subviral partiküllerin hücre içerisinde kalarak birikmesine neden olabilmektedir (83,84). OBİ'de özellikle Pre-S/S gen bölgesinde meydana gelen delesyon mutasyonları sıklıkla rapor edilmekte, PreS/S promotorlarını da kapsayan bu delesyonların zarf proteinlerinin ekspresyonlarını ve RNA kırılmalarını etkileyebileceği gösterilmiştir (85). Bu açıdan genellikle

Pre-S1 bölgesinde tanımlanan 183 bp'lik (nt3019-3201 veya nt2983-3167) delesyonları içeren OBİ'li hastalara ait HBV izolatlarının, hücre hatlarına transenfeksiyonu ile yapılan in vitro fonksiyonel analizlerinde belirtilen delesyonların viral replikasyona rağmen HBsAg ve viral sekresyonu engelleyebildiği gösterilmiştir (49).

*Viral RNA'nın kırılması (Splicing):* mRNA'nın transkripsiyon sonrası kırılma (splicing) işlemi, HBsAg ekspresyonunu ve sekresyonunu etkileyen önemli moleküler mekanizmalardan biri olup, HBV genomunun 450-500 nt'leri arasındaki genom bölgesinin kırılmaya uygun sekans dizisi içerdiği dolayısıyla bu bölgede gerçekleşen kırılmaların sirkülasyonda tanımlanamayan HBsAg negatifliği ile ilişkili olabileceği, özellikle de 462-492 nt'ler arasındaki 30 nt'lik bölgenin küçük S proteininin sentezi için gerekli 2.1 kb'lik mRNA transkriptinin translasyonu için kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir (86). Bu açıdan S geni tarafından transkribe edilen mRNA'nın 5' ucuna yakın G458A mutasyonunun Pre-S2 ve S mRNA'larının kırılmasını engelleyebildiği, dolayısıyla posttranskripsiyonel bir mekanizma olarak kırılmanın HBsAg ekspresyonu, S geni mRNA'sının dışarı salınımında ve RNA katlanmasında önemli rol oynadığı öne sürülmektedir (87).

*Yüzey (Surface; S) protein glikozilasyon alanları ile ilişkili mutasyonlar:* N-bağımlı glikozilasyon proteinlerin olgunlaşması ve fonksiyonları için gerekli posttranskripsiyonel bir süreçtir. Bu açıdan HBV yüzey proteinleri de S domaininin 146. pozisyonunda N-bağımlı glikozilasyon yüzeyi içerirler. N-bağımlı glikozilasyonun HBV'deki rolü henüz tam olarak belirlenemese de bu bölgede meydana gelen mutasyonların HBsAg sentezi ve stabilitesini etkilemeksizin glikozilasyon kaybı ile ilişkili virüs sekresyonu ve dolaşımdaki HBsAg negatifliği ile ilişkili olabileceği öne sürülmektedir (88,89).

T123N ve K160N mutasyonlarının da HBsAg antijenitesinin azalmasına ek olarak viral replikasyonu etkilemeksizin viral sekresyon ve kurguyu etkileyebilen bir glikozilasyon yüzeyi oluşturabildiği ayrıca K122I ve A159G ile M133T ve T131N mutasyonlarının da HBsAg'nin glikozilasyonu ve nihayetinde HBsAg'nin biyolojik özellikleri ve sekresyonu ile ilişkili olabildiği belirtilmektedir (47,90). HBV transenfekte hücre kültür ortamına glikozilasyon inhibitörlerinin eklenmesi ile yapılan bir çalışmada viral S proteininin glikozile formlarının azaldığı ve proteinin hücre içerisinde kaldığı gösterilmiştir (91). Buna karşın subviral partikül sekresyonunun N-glikozilasyondan bağımsız olması viral sekresyon üzerinde glikozilasyonun rolünü çelişkili kılmaktadır (92).

Mutasyonların OBİ'nin oluşmasında rolünün aydınlatılması amacıyla, OBİ'li hastaların doku ve serum örneklerinden elde edilen daha sıklıkla PreS/S mutasyonlarını içeren viral varyantların yönlendirilmiş mutagenез (site-directed mutagenesis) ile plazmide klon olarak HBsAg'nin antijenitesi, immünojenitesi ile viral sekresyon ve replikasyonun değerlendirilebildiği in vivo ve invitro yapılan fonksiyonel düzeydeki sınırlı çalışmalardan elde edilen veriler, mutasyonların tek başına OBİ'nin oluşmasında katkısı ve rolünün henüz açık olmadığı yönündedir (93). Özetle HBV'nin yüzey genleri ve özellikle PreS geninin "a" determinantını içerisinde tespit edilen mutasyonlar sıklıkla OBİ ile ilişkilendirilen kritik öneme sahip mutasyonlar olarak belirtilmesine karşın, bazı OBİ vakalarında bu bölgelerde mutasyon tespit edilmemesi ya da OBİ ile HBsAg pozitif kronik HBV enfeksiyonlu gruplar arasındaki mutasyon oranlarının istatistiksel olarak farklı olmadığına dair veriler OBİ'ye spesifik patolojik bir mutasyon paterninden söz edilmesini güçleştirdiği öne sürülmesine karşın PreS/S geni mutasyonlarının



OBİ'nin presantasyonu ve hastalığın progresyonu ile ilişkili olabileceği de vurgulanmaktadır (94).

### **Yeni edinilen enfeksiyon sonrası düşük viremi ilişkili HBsAg negatifliği**

Transfüzyon aracılı HBV enfeksiyonunun bulaş riski günümüzde analitik duyarlılığı yüksek tanı testlerinin kullanımına paralel olarak önemli ölçüde azalmasına rağmen tam olarak sıfırlanamamıştır. Bunun önemli nedenlerinden biri serokonversiyon öncesi dönemde dolaşımdaki HBsAg konsantrasyonunun testlerin analitik duyarlılığından daha düşük seviyelerde bulunmasıdır. HBV enfeksiyonunun inkübasyon periyodu 28-180 gün arasında değişmekte olup, kullanılan test ve metota bağlı olarak enfeksiyon sonrası HBsAg'nin tespit edilebilmesi için geçen süre ortalama 59 gündür. Enfeksiyon sonrası dönemde dolaşımda tespit edilebilir düzeydeki HBV viral yük ile HBsAg arasında linear bir korelasyon mevcut olup HBsAg tanısı için gerekli serum viral yük miktarının 100-1000 IU/ml düzeyinde olması gerektiği tahmin edilmektedir (95). Dolayısıyla HBV enfeksiyonu sonrası HBsAg negatifliği viremi düzeyinin belirleyici olabildiği enfeksiyonun pencere dönemi ile tanı amacıyla kullanılan laboruvar test ve metotlarının analitik duyarlılığı ve ayrıca viral genotipler ile de ilişkili olabilmektedir.

### **Konak İlişkili Faktörler**

#### ***İmmünolojik faktörler***

*Viral replikasyonun süpresyonu (düşük viremi ile karakterize tipik OBİ);* HBV tüm genomuna yönelik yapılan bir sekans analizi çalışmasında, OBİ vakalarında kontrol grubu ile karşılaştırıldığında daha yüksek oranlarda mutasyon sıklığı ve çeşitliliği saptandığı, tanımlanan mutasyonların ise HBV replikasyon ve promotör aktivisinde azalma, kusurlu HBsAg sentezi ve prematür gen sonlanmasına neden olabilen nokta

mutasyonları ile sekans delesyonlarını içerdiği, sonuç olarak OBİ statüsünün oluşmasında özgün ya da ayırıcı bir mutasyon paterninden ziyade çoklu mutasyonların belirleyici olduğu vurgulanmıştır (96). Ayrıca tanımlanan mutasyonların çoğu OBİ'ye özgün olmayıp bilindiği üzere yüksek viral yük içeren aşikar HBV enfeksiyonlu hastalarda da saptanabilmektedir (97). OBİ vakalarının büyük çoğunluğunda HBV genomunun replikasyon aktivitesi tam olup, HBsAg pozitif HBV enfeksiyonlu bireylerden elde edilen izolatların genetik heterojenitesine benzerdir (93). Ek olarak OBİ'li bireylerin karaciğerinden elde edilen HBV izolatlarının in-vitro ortamda transkripsiyon, replikasyon ve protein sentezini gerçekleştirebildikleri ve tüm viral transkriptlerin moleküler yöntemler ile saptanabildiğine dair veriler konağın karaciğer mikroçevresinin OBİ statüsünün oluşmasında kritik rolünü destekler niteliktedir (98,99).

Düşük viremi nedeniyle HBsAg negatifliği esasen viral yaşam siklusunun özgünlüğü ile ilişkili olup bu durum, HBV enfeksiyonu bir kez oluştuğunda yaşam boyu sürebileceğine ve klinik iyileşmenin enfeksiyonun tamamen eradikasyonundan ziyade viral replikasyonu kontrol eden immün yanıtın varlığına işaret eder (38,100,101). Keza rutin klinik pratikte de gözlemlendiği üzere hematolojik malignansiler ile kemoterapi, immünoterapi ve benzeri tüm immünsüpresyon koşullarının; aşikar kronik aktif HBV enfeksiyonunun HBsAg ve hatta HBeAg pozitifliği ile karakterize serolojik profilinin tekrar görünebildiği HBV reaktivasyonları ile benzer olarak etkin profilaksi yapılmayan OBİ pozitif donörden yapılan karaciğer transplantasyonu sonrası HBV naif alıcıda tipik Hepatit B gelişimine neden olabildiğidir (44,102). Dolayısıyla bu veriler indirekt olmasına karşın, konak immün denetim mekanizmalarının HBV replikasyonunun ve transkripsiyonun

süpresyonunda kritik rol oynadığı buna karşın bu süpresyonun etkisinin sınırsız ve sürekli olmamasının ise düşük düzeyde viral transkripsiyon ve replikasyonun uzun süreler kalıcı olmasına ve ayrıca tersinir bazı özel durumlarda viral replikasyon ve HBsAg pozitifliği ile karakterize aşkar enfeksiyonun gelişmesine imkan tanıyabileceği öne sürülmektedir (39). Dolayısıyla OBI'nin viral replikasyon ve transkripsiyonun süpresyonundan sorumlu konak faktörleri ile ilişkili olduğu, HBV biyosentezinin süpresyonunun oluşmasında ve sürdürülmesinde ise epigenetik faktörler ile birlikte konak immün yanıtının temel belirleyiciler olduğu öngörülmekle birlikte muhtemelen diğer çevresel etkenlerin de bu süreçte rol oynayabileceği hipotez edilmektedir(44).

Okült enfeksiyon süresince virüs mevcut laboratuvar tanı yöntemleri ile belirlenemeyen az miktarda antijen sentezleme kapasitesine sahip olmasına karşın yinede bu durumun yeterli ve etkin HBV'e spesifik T hücre yanıtlarının oluşabilmesine imkan sağlayabildiği, keza akut enfeksiyonunun iyileşmesinden yıllar sonra HBV antijenlerine karşı spesifik uzun süreli bellek T hücrelerin varlığının bu gözlemleri doğruladığı belirtilmektedir (103,104). OBI'li bireylerde virüse spesifik T hücre yanıtları çok çeşitlilik gösterebilmektedir. Anti-HBc antikoru pozitif ve negatif bireyler arasında HBV spesifik T hücre yanıt profilinin farklılık gösterdiği, seropozitif ve negatif OBI'li bireylerin HBV spesifik T hücre yanıt frekansının ise benzer olmasına karşın in vitro büyüme ve gelişme ile HBV'e spesifik T hücrelerince sentezlenen IFN-gama düzeylerinin seronegatif grupta daha zayıf olduğu tespit edilmiştir (105,106). Bu veriler düşük doz ( $< 10^3$ ) woodchuck hepatitis viruse (WHV) maruz kalan woodchuck'larda persistan enfeksiyon varlığına karşın HBV serum markerlerinin yokluğu ile karakterize koruyucu immünitinin gelişmediği "woodchuck"

primer okült enfeksiyon modelini desteklemekte olup, sonuç olarak etkin nitelikteki bellek T hücre yanıtlarının gelişmesi için enfeksiyon etkenin inokulum dozunun önemli olduğuna işaret etmektedir (107).

OBI'li vakalarda HBV spesifik kantitatif Th1 yanıtlarının inaktif HBV taşıyıcılarına ve daha öncesi HBV rezülosyonu saptanan hastalara göre daha güçlü olduğu dolayısıyla konak immün sisteminin HBV replikasyonunu güçlü bir şekilde süprese edebildiği ve nihayetinde bu verilerin düşük viral yük ve HBsAg negatifliği karakterize OBI statüsünü destekler nitelikte olduğu belirtilmektedir (105). HBV immünoopatogeneze ilişkin verilerden hareketle aşkar kronik HBV enfeksiyonunda anti-viral T hücre yanıtlarındaki fonksiyonel kayıp, fonksiyonel bellek T hücrelerinin oluşmasını engelleyebilen yüksek antijen yüküne sürekli maruz kalmayı da içeren farklı mekanizmalar aracılığı ile gerçekleştirilmektedir. Okült enfeksiyon da ise virüs hızla efektör hücrelere farklılaşabilme etkinliğine sahip olan santral/bellek T hücrelerinin efektör fonksiyonu aracılığı ile sıkıca kontrol edilir (39). Özellikle HIV enfekte bireylerde azalan CD4, IL-8, IL-10, IP-10, sFas sFasL gibi sitokin ekspresyon düzeyleri ile tip1 interferon yanıtlarının da HBV aktivitesi ile ilişkili olduğunu gösteren veriler, edinsel immüniteye ek olarak doğal immünite ve ayrıca apoptaz mekanizmalarının da OBI reaktivasyonlarında kritik rolünü destekler niteliktedir (108,109). Ek olarak İnsan lökosit antijenleri (HLA) ve IL-10 promotör polimorfizmi ile serum IL-10 düzeylerinin de HBV enfeksiyonuna karşı koruyucu immünitinin oluşması ve OBI varlığı ile korelasyon gösterdiği, sağlıklı grub ile karşılaştırıldığında OBI'li grupta HLA-A2 ekspresyon düzeylerinin daha yüksek, IL-10 düzeylerinin ise daha az, IL-10 promotörleri arasında da polimorfik

farklılıkların olduğu gösterilmiştir (110-112).

### **Epigenetik modifikasyonlar:**

Son yıllarda elde edilen bilimsel veriler epigenetik mekanizmaların HBV biyosentezinin regülasyonunda önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir (113-116). HBV transkripsiyonu virüsün viral yaşam döngüsündeki en temel ve en kritik basamaklardan biridir. HBV biyosentezinin regülasyonunda viral faktörler ile transkripsiyon faktörleri, ko-regülatörler, epigenetik faktörler gibi konağa ait hücrel transkripsiyon mekanizmaları ve faktörlerinin karşılıklı etkileşimi ve dinamiği belirleyicidir (117,118). Enfekte bireyin genomunda minikromozom (epizomal) formda bulunan HBV cccDNA'nın fonksiyonunun, viral transkripsiyonu ve replikasyonu kontrol eden epigenetik modifikasyonlara açık olması, HBsAg ve diğer viral proteinlerin ekspresyon düzeyini etkileyebilmektedir (119). HBV transkripsiyonu ve biyosentezinin regülasyonu karaciğerde zenginleştirilen nükleer reseptörler; Forkhead box protein A1, A2, A3/Hepatosit nükleer faktör 3  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$  (FoxA1/HNF3 $\alpha$ , FoxA2/HNF3 $\beta$ , FoxA3/HNF3 $\gamma$ ), Hepatosit nükleer faktör 4 $\alpha$  (HNF4 $\alpha$ ), Hepatosit nükleer faktör 3 $\alpha$  (HNF3 $\alpha$ ), Peroksizom proliferator ile aktive edilen reseptör  $\alpha$  (PPAR $\alpha$ ), Retinoid X reseptör  $\alpha$  (RXR $\alpha$ ), Farnesoid X reseptör (FXR $\alpha$ ), Karaciğer reseptör homolog 1(LRH1), östrojen ilişkili reseptör  $\alpha$  ve  $\gamma$  (ERR $\alpha$ ,  $\gamma$ ), ile Spesifik protein 1 (Sp1) ve CAAT/enhancer bağlanan protein (C/EBP) ile diğer koregülatör ve epigenetik faktörler tarafından düzenlenir (120-123). Histon kompozisyonu ve modifikasyonlarına neden olabilen asetilasyon, metilasyon, fosforilasyon, ubiquitinasyon ve sumolasyon gibi epigenetik mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşebilen kromatin dinamiğindeki değişimler özellikle HBV enfeksiyonunun üretken ve latent formları ile her iki form arasındaki

aşamalarda virüsün transkripsiyon ve replikasyon düzeylerinde değişimlere neden olarak enfeksiyonun doğal seyrini ve sonuçlarını etkileyebilmektedirler (124).

Bu açıdan benzer şekilde Herpes virüsleri ile Epstein-Barr virus gibi DNA virüslerinin latent dönemdeki transkripsiyonel aktivitesinin epigenetik mekanizmaların sıkı kontrolü altında olduğu bilinmektedir (125). HBV cccDNA'nın infekte hepatositlerde histon ve histon dışı proteinlerden oluşan nükleozomlar aracılığı ile stabil minikromozom formunda paketlenmesi, konak hücre kromatinlerine benzer şekilde genlerin regülasyonunda kritik öneme sahip post-tranlasyonel histon kuyrukları modifikasyonları ve ATP bağımlı epigenetik mekanizmalar aracılığı ile gerçekleşen kromatin yeniden düzenlenmesinde rol alan enzimatik aktiviteye maruz kalmasına sebep olur (126). Dolayısıyla cccDNA'nın transkripsiyonel aktivitesinin de konağın hücrel transkripsiyonel makinelerine bağımlı olabildiği ve histon proteinlerinin post-tranlasyonel modifikasyonlarının hücrel transkripsiyonun dinamiğinin belirlenmesinde olduğu gibi viral transkripsiyonun dinamiğinin belirlenmesinde de kritik öneme sahip olduğu belirtilmektedir (116,127,128). Kromatin immünopresipitasyon (ChIP) yöntemi ile gerçekleştirilen analizlerde; H3/H4 histonları ve viral kor proteini ile CREB, ATF, STAT1 ve STAT2 gibi transkripsiyon faktörleri ve yukarıda belirtildiği gibi histon asetilasyonuna neden olabilen asetilaz/deasetilaz gibi kromatin modifiye edici enzimlerin HBV cccDNA'ya bağlanabildiği, viral transkripsiyon ve replikasyonu regüle edebildikleri gösterilmiştir (129-131). Dolayısıyla infekte bireyin hepatositlerinin epigenetik dinamiği virüsün biyolojik dinamiğinde de belirleyici olabilmektedir. Bu açıdan hepatositlerde histon asetil transferazların (PCAF and p300/CBP) varlığı ve ekspresyon düzeyine bağlı olarak

in vitro HBV transkripsiyon ve replikasyon düzeyleri artmasına karşın histon deasetilazların ise HBV biyosentez düzeylerinin azalmasına neden olabildiği gösterilmiştir (129).

Post-translasyonel histon modifikasyonlarının HBV cccDNA minikromozonun transkripsiyonel regülasyonundaki rolünün belirlenmesi amacıyla cccDNA'nın CHIP-seq yöntemi ile analizin yapıldığı bir çalışmada H3K4me3, H3K27ac, ve H3K122ac içeren epigenetik modifikasyonların transkripsiyonel yönden aktif cccDNA ile ilişkili olduğu, IFN- $\alpha$  uygulanan primer hepatosit hücrelerinde H3K4me3, H3K27ac ve özellikle H3K122ac ile HBV mRNA düzeylerinin azaldığı, ek olarak p300/CBP'e spesifik bir inhibitör olarak C646 kullanıldığında da doza bağımlı olarak HBV transkripsiyon düzeylerinin azaldığı dolayısıyla bu verilerin cccDNA transkripsiyonunun regülasyonunda doğal immün yanıtların ve epigenetik modifikasyonların kritik rol oynadığı ve viral transkripsiyonu hedef alan kronik HBV enfeksiyonun antiviral tedavi stratejisi kapsamında alternatif yeni terapötik hedefler olabileceği hipotez edilmektedir (116). HBV minikromozom üzerindeki belirtilen epigenetik modifikasyonların etkinliği; siRNA aracılığı PCAF ekspresyonunun inhibasyonu ilişkili viral transkripsiyon ve replikasyon düzeylerinde azalma buna karşın trichostatin, nicotinamid ve valproat (valproik asit) gibi deasetilazların varlığında ise cccDNA ilişkili H4'ün hiperasetilasyonu ve artan viral replikasyonun varlığına yönelik çalışmalarda da gösterilmiştir (44). Bu açıdan bipolar bozukluğun tedavisinde antikonvülsan olarak kullanılan trichostatin ve nicotinamid gibi sınıf I ve III histon deasetilaz inhibitörlerinden valproat kullanımının, EBV ve HHV-8 gibi latent DNA virüslerinin reaktivasyonuna neden olabildiğinin gösterilmesi, özellikle HBV'nin H3 ve H4 (histon) ilişkili

kromatin asetilasyon statüsünün viral transkripsiyon ve replikasyon düzeylerini etkilemesine dair yukarıdaki veri ve gözlemleri destekleyen ilginç bir örnek olarak gösterilebilir (132,133). Glioblastoma nedeni ile radyasyon ve eş zamanlı temozolomid ile konvülsiyon profilaksisi amacıyla valproik asit tedavisi uygulanan 65 yaşındaki Japon kadın hastada fatal seyreden HBV reaktivasyonunun saptanması da bu açıdan ayrıca dikkate değer bir klinik vaka olarak değerlendirilmektedir (134).

IFN $\alpha$ 'nın cccDNA-histon kompleksinde hem hipoasetilasyona neden olarak hemde transkripsiyonel represör kompleks üzerinden HBV replikasyonunu inhibe edebildiğine dair veriler, OBI vakalarında viral minikromozomun yapı ve organizasyonunun hepatositlerde epizomal formda bulunan HBV süpresyonunun varlığı ve sürdürülmesinde belirleyici rol oynadığını destekler niteliktedir (135). Histon kuyruklarının post-translasyonel modifikasyonlarına ek olarak HBV genomundaki CpG zengin bölgelerin metilasyonu da HBV'nin biyosentezinin regülasyonunda önemli bir role sahip olup, viral genomda var olan CpG adalarının hipermetilasyon düzeyleri ile cccDNA, viral yük ve HBsAg düzeyleri arasında negatif bir korelasyonun mevcut olduğu belirlenmiştir (136,137). İn vitro düzeyde metillenmiş HBV DNA'nın HepG2 hücrelerine transenfeksiyonu sonucu azalmış mRNA ekspresyon düzeylerinin gösterilmesi bu gözlemleri destekler niteliktedir (138). Kronik HBV enfeksiyonlu hastaların karaciğer biyopsi örneklerinden yapılan çalışmalarda, HBV cccDNA histonları ile ilişkili asetilasyon düzeyi ise viral yük miktarı ile paralellik gösterir (129). Dolayısıyla HBV cccDNA'nın hipermetilasyonunun ve hipoasetilasyon statüsünün dolaşımdaki viral protein düzeylerindeki azalmayı desteklediği öngörülebilmektedir. Ayrıca epi-miRNA olarak adlandırılan mi-RNA'ların

transkripsiyon sonrası mRNA degradasyonuna veya tranlasyon sürecinin regülasyonuna ilişkin direkt etkilerinin de HBV biyosentez düzeylerini etkileyebildiği ve bu etkinin HBV ilişkili karaciğer patolojilerinden de sorumlu olabileceği ileri sürülmektedir (139-141). Hücrel miRNA'lar HBV mRNA ekspresyon düzeyini etkileyebilmekte, bu açıdan miRNA-122, 199a-3p, 210, 20a ve 92a'nın HBV biyosentezini olumsuz yönde regüle edebildiği, bunlardan miRNA 199a-3p ve 210'nun ise sırasıyla yüzey geninin kodlayıcı ve pre-S1 bölgelerine spontan bağlanarak, HBsAg ekspresyonunu direkt olarak süprese edebildiği, ek olarak miRNA 372/373'de viral transkripsiyonun regülasyonunda kritik öneme sahip transkripsiyon faktörlerinden CREB'in fosforilasyonunda rol olan PRKACB ve NFIB'yi baskılayarak, promotor ilişkili fonksiyonunu indirekt olarak engelleyebildiği dolayısıyla HBV biyosentezini olumsuz yönde etkileyebildiği gösterilmiştir (142-146).

## SONUÇ:

OBİ kronik HBV enfeksiyonunun doğal seyri içerisinde yer alan ayrı bir faz olarak değerlendirilmesine karşın, HBV enfeksiyonunun bu özgün formu ile ilişkili olduğu hipotez edilen karaciğer hastalıklarının patogeneğinde rol alan moleküler mekanizmalar henüz tam olarak aydınlatılamamıştır. Buna karşın mevcut bilimsel veriler viral faktörlerden ziyade viral replikasyonu kontrol eden immünolojik, viral transkripsiyonu düzenleyen epigenetik değişimleri içeren konak ilişkili çoklu faktörlerin OBİ'nin oluşması ve progresyonunda kritik belirleyiciler olduğu yönündedir. Dolayısıyla virüs ve konak arasındaki viral süpresyona yönelik karşılıklı dengenin immünolojik, epigenetik ve diğer faktörler sebebiyle viral replikasyon yönünde bozulması OBİ'nin patogeneğinde belirleyici olabilmektedir. OBİ rutin klinik pratikteki önemi yönüyle de tartışılmaya

devam edilmekle birlikte günümüzde ve yakın gelecekte immünolojik ve epigenetik mekanizmaların aydınlatılmasına imkan veren duyarlılığı yüksek moleküler tanı metotlarının rutin ve araştırmaya yönelik uygulamalarda daha fazla kullanılmaya başlaması, OBİ'de viral ve konak faktörleri arasındaki dinamik dengenin moleküler mekanizmaları ile klinik öneminin anlaşılmasına dair daha fazla verinin elde edilmesine imkan sağlayacaktır. Sonuç olarak; OBİ'nin moleküler mekanizmalarını aydınlatılmasına yönelik bilimsel çalışmaların, Dünya genelinde 20'de 1 oranında karşılaşılan ve her yıl yaklaşık bir milyon insanın yaşamını yitirmesine sebep olabilen kronik HBV enfeksiyonunun tedavisinde daha etkin terapötiklerin geliştirilmesine yönelik bilimsel çalışmalara da katkı sağlayacağı öngörülebilir.

## KAYNAKLAR

1. Lavanchy, D. Hepatitis B. Virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures. *J. Viral Hepat.* 2004; 11: 97–107.
2. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/> erişim 12 Ocak 2015
3. World Health Organization. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs297/en/> (erişim 12 Ocak 2015)
4. Szmunn W, Stevens CE, Harley EJ, Zang EA, Oleszko WR, William DC, et al. Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States. *N Engl J Med.* 1980; 303:833-41.
5. Francis DP, Hadler SC, Thompson SE, Maynard JE, Ostrow DG, Altman N, et al. The prevention of hepatitis B with vaccine: report of the Centers for Disease Control multi-center efficacy trial among homosexual men. *Ann Intern Med.* 1982; 97:362-6.

6. Crosnier J, Jungers P, Courouc, AM, Laplanche A, Benhamou E, Degos F, et al. Randomised placebocontrolled trial of hepatitis B surface antigen vaccine in French haemodialysis units: I, medical staff. *Lancet*. 1981; 1:455-9.
7. Tiollais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature*. 1985; 17:489-95.
8. Beasley RP, Hwang LY, Lin CC, Chien CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus – A prospective study of 22707 men in Taiwan. *Lancet*. 1981; 2:1129-33.
9. Beasley RP. Hepatitis B virus: The major etiology of hepatocellular carcinoma. *Cancer*. 1988; 61:1942-56.
10. Lai CL, Ratzu V, Yuen MF, Poynard T. Viral hepatitis B. *Lancet* .2003; 62: 2089–2094.
11. Shi J, Zhu L, Liu S, Xie WF. A metaanalysis of case-control studies on the combined effect of hepatitis B and C virus infections in causing hepatocellular carcinoma in China. *Br J Cancer*. 2005; 92: 607–612.
12. Fattovich G, Giustina G, Sanchez-Tapias J, Quero C, Mas A, et al. Delayed clearance of serum HBsAg in compensated cirrhosis B: relation to interferon alpha therapy and disease prognosis. European Concerted Action on Viral Hepatitis (EUROHEP). *Am J Gastroenterol*. 1998; 93: 896–900.
13. Wands JR, Chura CM, Roll FJ, Maddrey WC. Serial studies of hepatitis-associated antigen and antibody in patients receiving antitumor chemotherapy for myeloproliferative and lymphoproliferative disorders. *Gastroenterology* 1975; 68:105-112.
14. Hoofnagle JH, Seeff LB, Bales ZB, Zimmerman HJ. Type B hepatitis after transfusion with blood containing antibody to hepatitis B core antigen. *N Engl J Med*. 1978; 298:1379-83.
15. Cacciola I, Pollicino T, Squadrito G, Cerenzia G, Orlando ME, Raimondo G. Occult hepatitis B virus infection in patients with chronic hepatitis C liver disease. *N Engl J Med*. 1999; 341: 22-6.
16. Raimondo G, Allain JP, Brunetto MR, Buendia MA, Chen DS, Colombo M, et al. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2008; 49: 652-7.
17. Pollicino T, Saitta C. Occult hepatitis B virus and hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*. 2014; 20(20): 5951-61.
18. European Association For The Study Of The Liver. EASL clinical practice guidelines: Management of chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2012; 57:167-85.
19. Pollicino T, Saitta C, Raimondo G. Hepatocellular carcinoma: the point of view of the hepatitis B virus. *Carcinogenesis* 2011; 32: 1122-32.
20. De Mitri MS, Cassini R, Bernardi M. Hepatitis B virus-related hepatocarcinogenesis: molecular oncogenic potential of clear or occult infections. *Eur J Cancer*. 2010; 46:2178–86.
21. Fang Y, Shang Q-L, Liu J-Y, Li D, Xu W-Z, Teng X, et al. Prevalence of occult hepatitis B virus infection among hepatopathy patients and healthy people in China. *J Infect*. 2009; 58: 383–8.
22. Brechot C, Thiers V, Kremsdorf D, Nalpas B, Pol S, Paterlini-Bréchet P. Persistent hepatitis B virus infection in subjects without hepatitis B surface antigen: clinically significant or purely “occult”? *Hepatology*. 2001; 34(1):194–203.
23. Ohba K, Kubo S, Tamori A, Hirohashi K, Tanaka H, Shuto T, et al. Previous or occult hepatitis B virus infection in hepatitis B surface antigen negative and anti-hepatitis C negative patients with hepatocellular carcinoma. *Surg Today*. 2004; 34 (10):842–8.

- 
24. Will H, Reiser W, Weimer T, Pfaff E, Buscher M, Sprengle R, et al. Replication strategy of human hepatitis B virus. *J Virol.* 1987; 61:904-11.
  25. Nassal M. Hepatitis B viruses: reverse transcription a different way. *Virus Res.* 2008; 134: 235-49.
  26. Block TM, Guo H, Guo JT. Molecular virology of hepatitis B virus for clinicians. *Clin Liver Dis.* 2007; 11:685-706.
  27. Locarnini S, Zoulim F. Molecular genetics of HBV infection *Antivir Ther.* 2010; 15 Suppl 3:3-14.
  28. Yan H, Zhong G, Xu G, He W, Jing Z, Gao Z, et al. Sodium taurocholate cotransporting polypeptide is a functional receptor for human hepatitis B and D virus. *Elife.* 2014; 2014; 3:e05570.
  29. Schaller, H., and M. Fischer. Transcriptional control of hepadnavirus gene expression. *Curr. Top Microbiol Immunol.* 1991; 168:21-39.
  30. Yen, T S B. Regulation of hepatitis B virus gene expression. *Semin Virol.* 1993; 4:33-42.
  31. Summers J, Mason WS. Replication of the genome of a hepatitis B-like virus by reverse transcription of an RNA intermediate. *Cell.* 1982; 29: 403-15.
  32. Raney AK, Johnson JL, Palmer CNA, McLachlan A. Members of the nuclear receptor superfamily regulate transcription from the hepatitis B virus nucleocapsid promoter. *J Virol.* 1997; 71:1058-71.
  33. Zhou S, Standring DN. Hepatitis B virus capsid particles are assembled from core-protein dimer precursors. *PNAS.* 1992; 89:10046-50.
  34. Juergen Beck, Michael Nassal Hepatitis B virus replication *World J Gastroenterol.* 2007; 13(1): 48-64.
  35. Weber B. Genetic variability of the S gene of hepatitis B virus: clinical and diagnostic impact. *J Clin Virol.* 2005; 32:102-12.
  36. Chaudhuri V, Tayal R, Nayak B, Acharya SK, Panda S K. Occult hepatitis B virus infection in chronic liver disease: fulllength genome and analysis of mutant surface promoter. *Gastroenterology.* 2004; 127(5):1356–71.
  37. Mason AL, Xu L, Guo L, Kuhns M, Perrillo RP. Molecular basis for persistent hepatitis B virus infection in the liver after clearance of serum hepatitis B surface antigen. *Hepatology.* 1998; 27:1736-42.
  38. Zoulim F. New insight on hepatitis B virus persistence from the study of intrahepatic viral cccDNA. *J Hepatol.* 2005; 42:302-308.
  39. Teresa Pollicino, Giovanni Raimondo. Occult Hepatitis B Infection. *Journal of Hepatology* 2014; 61:688-9.
  40. Squadrito G, Trépo C, Villa E, Will H, Zanetti AR, Zoulim F. Statements from the Taormina expert meeting on occult hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2008; 49:652-7.
  41. Torbenson M, Thomas DL. Occult hepatitis B. *Lancet Infect Dis.* 2002; 2:479-86.
  42. Mulrooney-Cousins PM, Michalak TI. Persistent occult hepatitis B virus infection: experimental findings and clinical implications. *World J Gastroenterol.* 2007; 13:5682-6.
  43. Michalak TI, Mulrooney PM, Coffin CS. Low doses of hepadnavirus induce infection of the lymphatic system that does not engage the liver. *J Virol.* 2004; 78:1730–8.
  44. Raimondo G, Caccamo G, Filomia R, Pollicino T Occult HBV infection. *Semin Immunopathol.* 2013; 35:39–52.
  45. Zoulim F, Locarnini S. Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues. *Gastroenterology.* 2009; 137:1593–1608.
  46. Samal J, Kandpal M, Vivekanandan P. Molecular mechanisms underlying occult hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev.* 2012; 25:142-63.

- 
47. Hui-Lan Zhu, Xu Li, Jun Li, Zhen-Hua Zhang Genetic variation of occult hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2016; 22(13):3531-46.
  48. R. A. A. Pondé Molecular mechanisms underlying HBsAg negativity in occult HBV infection. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 2015; 34:1709–31.
  49. Fang Y, Teng X, Xu W, Li D, Zhao H, Fu L, et al. Molecular Characterization and Functional Analysis of Occult Hepatitis B Virus Infection in Chinese Patients Infected With Genotype C. *J Med Virol.* 2009; 81:826–35.
  50. Candotti D, Lin CK, Belkhiri D, Sakuldamrongpanich T, Biswas S, et al. Occult hepatitis B infection in blood donors from South East Asia: molecular characterisation and potential mechanisms of occurrence. *Gut.* 2012; 61:1744–53.
  51. Allain JP, Belkhiri D, Vermeulen M, Crookes R, Cable R, et al. Characterization of occult hepatitis B virus strains in South African blood donors. *Hepatology.* 2009; 49: 1868–76.
  52. Seeger C, Mason W Hepatitis B virus biology. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000; 64(1):51–68.
  53. Weber B. The diagnostic and clinical impact of the genetic variability of the s gene of hepatitis B virus. *J LabMed.* 2004; 28(1):56–69.
  54. Carman WF. The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus. *J Viral Hepat.* 1997; 4(11):11–20.
  55. Seddigh-Tonekaboni S, Waters JA, Jeffers S, Gehrke R, Ofenloch B, Horsch A, et al. Effect of variation in the common “a” determinant on the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *J Med Virol.* 2000; 60:113–21.
  56. Waters J, Kennedy M, Voet P, Hauser P, Petre J, Carman W, Thomas H Loss of the common ‘a’ determinant of hepatitis B surface antigen by a vaccine-induced escape mutant. *J Clin Invest.* 1992; 90:2543–47.
  57. Ma Q, Wang Y. Comprehensive analysis of the prevalence of hepatitis B virus escape mutations in the major hydrophilic region of surface antigen. *J Med Virol.* 2012; 84:198–206.
  58. Bruce S, Murray K. Mutations of some critical amino acid residues in the hepatitis B virus surface antigen. *J Med Virol.* 1995; 46:157–61.
  59. Antoni B, Rodriguez-Crespo I, Gomez-Gutierrez J, Nieto M, Peterson D, Avilanes F. Site-directed mutagenesis of cysteine residues of hepatitis B surface antigen. Analysis of two single mutants and the double mutant. *Eur J Biochem.* 1994; 222:121–27.
  60. Tian Y, Xu Y, Zhang Z, Meng Z, Qin L, Lu M, Yang D. The amino acid residues at positions 120 to 123 are crucial for the antigenicity of hepatitis B surface antigen. *J Clin Microbiol.* 2007; 45(9):2971-8.
  61. Osioy C Detection of HBsAg mutants. *J Med Virol.* 2006; 78:48–51.
  62. Carman WF, Zanetti AR, Karayiannis P, Waters J, Manzillo G, Tanzi E, et al. Vaccine-induced escape mutant of hepatitis B virus. *Lancet* 1990; 336: 325-9.
  63. Huang CH, Yuan Q, Chen PJ, Zhang YL, Chen CR, Zheng QB, et al. Influence of mutations in hepatitis B virus surface protein on viral antigenicity and phenotype in occult HBV strains from blood donors. *Journal of Hepatology.* 2012; 57:720–9.
  64. Uchida T, Shimojima S, Gotoh K, Shikata T, Mima S. Pathology of livers infected with “silent” hepatitis B virus mutant. *Liver.* 1994; 14:251–6.
  65. Fukuda R, Ishimura N, Kushiyama Y, Moriyama N, Ishihara S, Chowdhury A, et al. Hepatitis B virus with X gene mutation is associated with the majority of serologically “silent” non-B, non-C chronic hepatitis. *Microbiol Immunol.* 1996; 40:481–8.



66. Tang H, Oishi N, Kaneko S, Murakami S. Molecular functions and biological roles of hepatitis B virus x protein. *Cancer Sci.* 2006; 97(10):977–83.
67. Wei Y, Neuveut C, Tiollais P, Buendia MA. Molecular biology of the hepatitis B virus and role of the X gene. *Pathol Biol.* 2010; 58(4):267–72.
68. Weinberger KM, Bauer T, Böhm S, Jilg W. High genetic variability of the group-specific a-determinant of hepatitis B virus surface antigen (HBsAg) and the corresponding fragment of the viral polymerase in chronic virus carriers lacking detectable HBsAg in serum. *J Gen Virol.* 2000; 81:1165–74
69. Chen SY, Kao CF, Chen CM, Shih CM, Hsu MJ, Chao CH, et al. Mechanisms for inhibition of hepatitis B virus gene expression and replication by hepatitis C virus core protein. *J Biol Chem.* 2003; 278:591–607
70. Lusida MI, Sakugawa H, Motroko N-F, Muluanto S, Handajani R, Boediwarsono SPB, Genotype and subtype analyses of hepatitis B virus (HBV) and possible co-infection of HBV and hepatitis c virus (HCV) or hepatitis D virus (HDV) in blood donors, patients with chronic liver disease and patients on hemodialysis in Surabaya, Indonesia. *Microbiol Immunol.* 2003; 47(12):969–75.
71. Raimondo G, Cacciamo G, Saitta C. Hepatitis B virus and hepatitis C virus co-infection: additive players in chronic liver disease? *Ann Hepatol.* 2005; 4:100–106 48.
72. Bellecave P, Gouttenoire J, Gajer M, Brass V, Koutsoudakis G, Blum HE, et al. Hepatitis B and C virus coinfection: a novel model system reveals the absence of direct viral interference. *Hepatology.* 2009; 50:46–55.
73. McClary H, Koch R, Chisari FV, Guidotti LG. Inhibition of hepatitis B virus replication during schistosoma mansoni infection in transgenic mice. *J Exp Med.* 2000; 92:289–94.
74. Tan WS, Dyson MR, Murray K. Two distinct segments of the hepatitis B virus surface antigen contribute synergistically to its association with the viral core particles. *J Mol Biol.* 1999; 286:797–808
75. Loffler-Mary H, Dumortier J, Klentsch-Zimmer C, Prange R. Hepatitis B virus assembly is sensitive to changes in the cytosolic S loop of the envelope proteins. *Virology.* 2000; 270:358–67
76. Mangold CT, Streeck RE. Mutational analysis of the cysteine residues in the hepatitis B virus small envelope protein. *J Virol.* 1993; 67:4588–97.
77. Biswas S, Candotti D, Allain J-P Specific amino acid substitutions in the S protein prevent its excretion in vitro and may contribute to occult hepatitis B virus infection. *J Virol.* 2013 87(14): 7882–92.
78. Chua PK, Wang RY, Lin MH, Masuda T, Suk FM, Shih C. Reduced secretion of virions and hepatitis B virus (HBV) surface antigen of a naturally occurring HBV variant correlates with the accumulation of the small S envelope protein in the endoplasmic reticulum and Golgi apparatus. *J Virol* 2005; 79:13483–96.
79. Melegari M, Pier PS, Wands JR. The small envelope protein is required for secretions of a naturally occurring hepatitis B virus mutant with pre-S1 deleted. *J Virol.* 1997; 7(71):5449–54.
80. Bock C, Tillmann H, Manns M, Trautwein C. The pre-S region determines the intracellular localization and appearance of hepatitis B virus. *Hepatology.* 1999; 30(2):517–25.
81. Ou JH, Rutter WJ (1987) Regulation of secretion of the hepatitis B virus major surface antigen by the preS-1 protein. *J Virol* 61:782–6.
82. Sengupta S, Rehman S, Durgapal H, Acharya S, Panda S. Role of surface promoter mutations in hepatitis B

- surface antigen production and secretion in occult hepatitis B virus infection. *J Med Virol.* 2007; 79:220–8.
83. Zhou D-X, Yen TS. The hepatitis B virus S promoter comprises a CCAAT motif and two initiation regions. *J Biol Chem.* 1991; 226(34):23416–21
  84. Lu CC, Yen TS. Activation of the hepatitis B virus s promoter by transcription factor NF-Y via a CCAAT element. *Virology.* 1996; 225:387–394.
  85. Baumert T, Kock J, Blum H. A novel target of hepatitis B virus mutations: splicing of surface RNA. *Hepatology.* 2005; 45(1):21–4.
  86. Zu Putlitz J, Tong S, Wands JR. A short region in the genome of hepatitis B virus is critical for maintenance of high transcript levels. *Virology.* 1999; 254(2):245–256.
  87. Hass M, Hannoun C, Kalinina T, Sommer G, Manegold C, Günther S. Functional analysis of hepatitis B virus reactivating in hepatitis B surface antigen-negative individuals. *Hepatology.* 2005; 42:93-103.
  88. Schmitt S, Glebe D, Tolle T, Lochnit G, Linder D, Geyer R, Gerlich W. Structure of pre-S2 N- and O-linked glycans in surface proteins from different genotypes of hepatitis B virus. *J Gen Virol.* 2004; 85:2045–53.
  89. Ito K, Qin Y, Guarnieri M, Garcia T, Kwei K, Mizokami M, et al. Impairment of hepatitis B virus virion secretion by single-amino-acid substitutions in the small envelope protein and rescue by a novel glycosylation site. *J Virol.* 2010; 84(24):12850–61.
  90. Wu C, Zhang X, Tian Y, Song J, Yang D, Roggendorf M, et al. Biological significance of amino acid substitutions in hepatitis B surface antigen (HBsAg) for glycosylation, secretion, antigenicity and immunogenicity of HBsAg and hepatitis B virus replication. *J Gen Virol* 2010; 91: 483-92.
  91. Lu X, Mehta A, Dwek R, Butters T, Block T. Evidence that N-linked glycosylation is necessary for hepatitis B virus secretion. *Virology.* 1995; 213:660–5.
  92. Mehta A, Lu X, Block T, Blumberg B, Dwek R. Hepatitis B virus (HBV) envelope glycoproteins vary drastically in their sensitivity to glycan processing: evidence that alteration of a single Nlinked glycosylation site can regulate HBV secretion. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1997; 94:1822–27.
  93. Pollicino T, Raffa G, Costantino L, Lisa A, Campello C, Squadrito G, et al. Molecular and functional analysis of occult hepatitis B virus isolates from patients with hepatocellular carcinoma. *Hepatology.* 2007; 45: 277-85.
  94. Chen J, Liu Y, Zhao J, Xu Z, Chen R, Si L, et al. Characterization of Novel Hepatitis B Virus PreS/S-Gene Mutations in a Patient with Occult Hepatitis B Virus Infection. *PLoS One.* 2016; 16;11(5):e0155654.
  95. Gerlich W, Glebe D, Schuttler C. Deficiencies in the standardization and sensitivity of diagnostic tests for hepatitis B virus. *J Viral Hepat.* 2007; 14(1):16–21.
  96. Huang F-Y, Wong D K-H, Seto W-K, Zhang A-Y, Lee C-K, Lin C-K, et al. Sequence Variations of Full-Length Hepatitis B Virus Genomes in Chinese Patients with HBsAg-Negative Hepatitis B Infection. *PLoS ONE.* 2014; 9(6): e99028.
  97. Pollicino T, Amaddeo G, Restuccia A, Raffa, G, Alibrandi A, Cutroneo G, et al. Impact of hepatitis B virus (HBV) preS/S genomic variability on HBV surface antigen and HBV DNA serum levels. *Hepatology.* 2012; 56(2):434-43.
  98. Wong DK, Huang FY, Lai CL, Poon RT, Seto WK, Fung J, et al. Occult hepatitis B infection and HBV replicative activity in patients with

- cryptogenic cause of hepatocellular carcinoma. *Hepatology*. 2011; 54: 829-36.
99. Wong DK, Yuen MF, Poon RT, Yuen JC, Fung J, Lai CL. Quantification of hepatitis B virus covalently closed circular DNA in patients with hepatocellular carcinoma. *J Hepatol*. 2006; 45: 553-9.
  100. Caruntu F, Molagic V. CccDNA persistence during natural evolution of chronic HBV infection. *Rom J Gastroentero*. 2005; 114:373-7.
  101. Rapicetta M, Ferrari C, Levrero M. Viral determinants and host immune responses in the pathogenesis of HBV infection. *J Med Virol*. 2002; 67:454-7.
  102. Kwak M-S, Kim Y S. Occult hepatitis B virus infection *World J Hepatol*. 2014; 6(12): 860-9.
  103. Rehmann B, Ferrari C, Pasquinelli C, Chisari FV. The hepatitis B virus persists for decades after patients' recovery from acute viral hepatitis despite active maintenance of a cytotoxic T-lymphocyte response. *Nat Med*. 1996; 2: 1104-08.
  104. Penna A, Artini M, Cavalli A, Levrero M, Bertoletti A, Pilli M, et al. Long-lasting memory T cell responses following self-limited acute hepatitis B. *J Clin Invest*. 1996; 98:1185-94.
  105. Bes M, Vargas V, Piron M, Casamitjana N, Esteban JI, Vilanova N, et al. PT cell responses and viral variability in blood donation candidates with occult hepatitis B infection. *J Hepatol*. 2012; 56:765-74.
  106. Zerbini A, Pilli M, Boni C, Fiscicaro P, Penna A, Di et al. The characteristics of the cell-mediated immune response identify different profiles of occult hepatitis B virus infection. *Gastroenterology*. 2008; 134: 1470-81.
  107. Coffin CS, Pham TN, Mulrooney PM, Churchill ND, Michalak TI. Persistence of isolated antibodies to woodchuck hepatitis virus core antigen is indicative of occult infection. *Hepatology*. 2004; 40: 1053-61.
  108. Martin CM, Welge JA, Shire NJ, ShataMT, Sherman KE, Blackard JT. Cytokine expression during chronic versus occult hepatitis B virus infection in HIV co-infected individuals. *Cytokine*. 2009; 47:194-8.
  109. Guidotti LG, Chisari FV. Noncytolytic control of viral infections by the innate and adaptive immune response. *Annu Rev Immunol*. 2001; 19:65-91.
  110. Askari A, Hassanshahi GH, Ghalebi SR, Jafarzadeh A, Mohit M, Hajghani M, et al. Intensity of HLA-A2 Expression Significantly Decreased in Occult Hepatitis B Infection. *Jundishapur J Microbiol* 2014; 7(6): e10298.
  111. Arababadi MK, Pourfathollah AA, Jafarzadeh A, Hassanshahi G. Serum Levels of IL-10 and IL-17A in Occult HBV-Infected South-East Iranian Patients. *Hepat Mon*. 2010; 10: 31-5.
  112. Ahmadabadi BN, Hassanshahi G, Arababadi MK, Leanza C, Kennedy D. The IL-10 promoter polymorphism at position -592 is correlated with susceptibility to occult HBV infection. *Inflammation*. 2012; 35: 818-21.
  113. Koumbi L, Karayiannis P. The Epigenetic Control of Hepatitis B Virus Modulates the Outcome of Infection. *Frontiers in Microbiology*. 2016; 6:1491-501.
  114. Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M, Methylation Regulates Hepatitis B Viral Protein Expression. *J Infect Dis*. 2009; 199(9): 1286-91.
  115. Zhang Y, Mao R, Yan R, Cai D, Zhang Y, Zhu H, et al. Transcription of Hepatitis B Virus Covalently Closed Circular DNA Is Regulated by CpG Methylation during Chronic Infection. *PLOS ONE* 2014; 9 : e110442-48.
  116. Tropberger P, Mercier A, Robinson M, Zhong W, Ganem D.E, and Holdorf M. Mapping of histone modifications in episomal HBV cccDNA uncovers an

- unusual chromatin organization amenable to epigenetic manipulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2015; 112(42): e5715-24.
117. Quasdorff M and U. Protzer Control of hepatitis B virus at the level of transcription. *J Vir Hepat*. 2010; 17: 527–36.
118. Bar-Yishay I, Shaul Y, Shlomai A. Hepatocyte metabolic signalling pathways and regulation of hepatitis B virus expression. *Liver Int*. 2011; 31:282–90.
119. Vivekanandan P, Kannangai R, Ray SC, Thomas D, Torbenson M. Comprehensive genetic and epigenetic analysis of occult hepatitis B from liver tissue samples. *Clin Infect Dis*. 2008; 46:1227–36.
120. Reese VC, Ondracek CR, Rushing CN, Li L, Oropeza CE, McLachlan A. Multiple nuclear receptors may regulate hepatitis B virus biosynthesis during development *Int Biochem Cell Biol*. 2009; 43:230-7.
121. Li L, Oropeza CE, Sainz JB, Uprichard SL, Gonzalez FJ, McLachlan A. Developmental regulation of hepatitis B virus biosynthesis by hepatocyte nuclear factor 4a. *PLoS ONE*, 2009; 4: e5489.96.
122. Tang H, McLachlan A. Transcriptional regulation of hepatitis B virus by nuclear hormone receptors is a critical determinant of viral tropism. *PNAS*. 2001; 98: 1841-6.
123. Guidotti LG, Eggers CM, Raney AK, Chi SY, Peters JM, Gonzalez FJ, et al. In vivo regulation of hepatitis B virus replication by peroxisome proliferators. *J Virol*. 1999; 73: 10377-86.
124. Lieberman PM. Chromatin organization and virus gene expression. *J Cell Physiol*. 2008; 216: 295-302.
125. Takacs M, Banati F, Koroknai A, Segesdi J, Salamon D, Wolf H, Niller HH, Minarovits J. Epigenetic regulation of latent Epstein-Barr virus promoters. *Biochim Biophys Acta*. 2010; 1799:228-35.
126. Levrero M, Pollicino T, Petersen J, Belloni L, Raimondo G, Dandri M. Control of cccDNA function in hepatitis B virus infection. *J Hepatol*. 2009; 51:581–92.
127. Rall LB, Standing DN, Laub O, Rutter WJ. Transcription of hepatitis B virus by RNA polymerase II. *Mol Cell Biol*. 1983; 3(10):1766–73.
128. Voss TC, Hager GL Dynamic regulation of transcriptional states by chromatin and transcription factors. *Nat Rev Genet*. 2014; 15(2):69–81.
129. Pollicino T, Belloni L, Raffa G, Pediconi N, Squadrito G, Raimondo G, Levrero M. Hepatitis B virus replication is regulated by the acetylation status of hepatitis B virus cccDNA bound H3 and H4 histones. *Gastroenterology*. 2006; 130:823–37.
130. Werle-Lapostolle B, Bowden S, Locarnini S, Wursthorn K, Petersen J, Lau G, et al. Persistence of cccDNA during the natural history of chronic hepatitis B and decline during adefovir dipivoxil therapy. *Gastroenterology*. 2004; 126:1750–8.
131. Belloni L, Pollicino T, De NF, Guerrieri F, Raffa G, Fanciulli M, et al. Nuclear HBx binds the HBV minichromosome and modifies the epigenetic regulation of cccDNA function. *Proc Natl Acad Sci USA*: (2009; 106:19975–79.
132. Ritchie D, Piekarz RL, Blombery P, Karai LJ, Pittaluga S, Jaffe ES. Et al. Reactivation of DNA viruses in association with histone deacetylase inhibitor therapy: a case series report. *Haematologica*. 2009; 94: 1618-22.
133. Feng WH, Kenney SC. Valproic acid enhances the efficacy of chemotherapy in EBV-positive tumors by increasing lytic viral gene expression. *Cancer Res*. 2006; 66:8762–69.
134. Grewal J, Dellinger CA, Yung WK. Fatal reactivation of hepatitis B with

- 
- temozolomide. *N Engl J Med.* 2007; 356:1591-92.
135. Belloni L, Allweiss L, Guerrieri F, Pediconi N, Volz T, Pollicino T, IFN- $\alpha$  inhibits HBV transcription and replication by targeting the epigenetic regulation of the nuclear cccDNA minichromosome. *J Clin Invest.* 2012; 122(2):529-37.
136. Kim J, Lee W, Park SH, Hwang YS, Jeong JH, Kim SH. Replicative activity of hepatitis B virus is negatively associated with methylation of covalently closed circular DNA in advanced hepatitis B virus infection. *Intervirology.* 2011; 54:316-25.
137. Kaur P, Paliwal A, Durantel D, Hainaut P, Scoazec JY, Zoulim F, et al. DNA methylation of hepatitis B virus (HBV) genome associated with the development of hepatocellular carcinoma and occult HBV infection. *J Infect Dis.* 2010; 202: 700-04.
138. Vivekanandan P, Thomas D, Torbenson M. Methylation regulates hepatitis B viral protein expression. *J Infect Dis.* 2009; 199:1286-91.
139. Iorio MV, Piovani C, Croce CM. Interplay between microRNAs and the epigenetic machinery: an intricate network. *Biochim Biophys Acta.* 2010; 1799:694-701.
140. Szabo G, Bala S. MicroRNAs in liver disease. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol.* 2013; 10(9):542-52.
141. Mizuguchi Y, Takizawa T, Uchida E. Host cellular microRNA involvement in the control of hepatitis B virus gene expression and replication. *World J Hepatol.* 2015; 7(4):696-702.
142. Zhang GL, Li YX, Zheng SQ, Liu M, Li X, Tang H. Suppression of hepatitis B virus replication by microRNA-199a-3p and microRNA-210. *Antivir Res.* 2010; 88:169-175.
143. Potenza N, Papa U, Mosca N, Zerbini F, Nobile V, Russo A. Human microRNA hsa-miR-125a-5p interferes with expression of hepatitis B virus surface antigen. *Nucleic Acids Res.* 2011; 39:5157-63.
144. Guo H, Liu H, Mitchelson K, Rao H, Luo M, Xie L. MicroRNAs-372/373 promote the expression of hepatitis B virus through the targeting of nuclear factor I/B. *Hepatology.* 2011; 54:808-19.
145. Wang J, Liu X, Wu H, Ni P, Gu Z, Qiao Y, et al. CREB up-regulates long non-coding RNA, HULC expression through interaction with microRNA-372 in liver cancer. *Nucleic Acids Res.* 2010; 38:5366-83.
146. Kim BK, Lim SO, Park YG. Requirement of the cyclic adenosine monophosphate response element-binding protein for hepatitis B virus replication. *Hepatology.* 2008; 48:361-73.