

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

PROGRAMI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kronik delta hepatitli hastalarda, HDV RNA tüm genomunun interferon tedavisi süresince,  
“ultra deep sequencing” yöntemiyle analizi

Camran NASSIRI

Danışman Öğretim Üyesi  
Prof.Dr. A.Mithat BOZDAYI

Şubat

2016

ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ

PROGRAMI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

Kronik delta hepatitli hastalarda ,HDV RNA tüm genomunun interferon tedavisi süresince,  
“ultra deep sequencing” yöntemiyle analizi

Camran NASSIRI

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr. A.Mithat BOZDAYI

Şubat

2016

## ETİK BEYAN

Bu tez çalışmasının; akademik kural ve etik ilkelere bağılı kalınarak hazırlandığını, çalışmada yararlanılan ve bu çalışma ürünü olmayan bütün bilgiler için kaynak yayınlara atıfta bulunulmuş olduğunu beyan ederim.

Camran NASSIRI

İmzası

## ONAY

Prof. Dr. A.Mithat BOZDAYI danışmanlığında Camran NASSIRI tarafından hazırlanan bu çalışma 05/02/2016 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Biyoteknoloji Anabilim Dalı'nda Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Başkan: Prof. Dr.A.Mithat BOZDAYI

İmza:

Üye: Prof. Dr.Fikret ŞAHİN

İmza:

Üye: Doç. Dr.Ersin KARATAYLI

İmza:

Yukarıdaki sonucu onaylarım.

Prof. Dr. Aykut ÖZKUL

Enstitü Müdürü

## ÖZET

### Yüksek Lisans Tezi

Kronik delta hepatitli hastalarda, HDV RNA tüm genomunun interferon tedavisi süresince, “ultra deep sequencing” yöntemiyle analizi

Camran NASSIRI

Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü

Danışman: Prof.Dr. A.Mithat BOZDAYI

Hepatit Delta Virüsünün yol açtığı Delta hepatiti en hızlı ilerleyen ve en saldırgan viral hepatit olarak tanımlanmaktadır. Kronik HDV enfeksiyonunun tedavisi çok sınırlıdır ve çoğunlukla ilerleyen siroz ve artan mortalite oranlarıyla karakterizedir. Enfeksiyonun spesifik bir tedavisi yoktur ve bu amaçla interferon kullanılmaktadır. Çalışmamızda HDV ile enfekte hastaların tedavilerinin takibi sürecinde alınan farklı serum örneklerinden elde edilen Hepatit Delta virüs havuzundaki viral varyantların yüksek duyarlılıkla tespit edilmesi amaçlanmıştır. Böylece tedavi öncesi, sırası ve/veya sonrasındaki viral varyasyon profillerinin belirlenebilmesi, ayrıca viral tedavi altındaki evrimsel sürecin araştırılması amaçlanmıştır. Ortaya çıkan varyasyon profilleri ile hastalardaki klinik seyrin karşılaştırılması ile varyasyonlarla hastalık arasında ilişki araştırmak da çalışmanın bir diğer amacıdır. Bu amaçla çalışmada Roche GS Junior 454 “Ultradeep Pyrosequencing” (UDPS) sistemi kullanılmıştır. HDV viral genomu 5 farklı amplifikasyonla, çoğaltılan fragmanlar örtüşecek şekilde tüm genom olarak çoğaltılmıştır. Çalışma süresince toplam 11 hastanın farklı tarihlerdeki 32 adet serum örneğinde dizileme yapılmıştır. Tedaviye yanıt verenler ile yanıt vermeyen veya nükseden hastalardaki varyasyonlar karşılaştırıldığında 267, 269, 270, 569, 928 ve 929 nolu pozisyonlarda farklılıklar gözlenmiştir. Tedaviye yanıt verenler ile nüks edenler tek başına karşılaştırıldığında ise bu nükleotidlere ek olarak 227 ve 750. nükleotidlerde de anlamlı farklılıklar gözlenmiştir. Ayrıca her 3 grup karşılaştırıldığında viral genomun 425-430 numaralı bazlarını içeren bölgede patern şeklinde farklılık gözlenmiştir. Bu konuda yapılacak daha geniş kapsamlı

alışmalar, tespit edilen varyantların HDV enfeksiyonlarında ve tedavisindeki önemi ve klinik anlamının aydınlatılmasına katkı sağlayabilir.

2016, 99 sayfa

**Anahtar kelimeler:** Hepatit D Virüs, Ultra deep Pyrosequencing, Yeni nesil sekanslama, interferon, genetik heterojenite



## ABSTRACT

MSc Thesis

The Analysis of HDV full genome RNA using “Ultra deep Sequencing” method, in  
Chronic Hepatitis Delta patients, during interferon treatment

Camran Nassiri

Ankara University Biotechnology Institute

Supervisor: Prof.Dr. A. Mithat Bozdayı

Delta hepatitis is defined as the most aggressive and progressive viral hepatitis, which is caused by Hepatitis Delta Virus. Treatment of chronic HDV infection is usually very limited and the disease is usually characterized by progressive cirrhosis and increased rate of mortality. There is no specific treatment for the infection and interferon is used for this purpose. The aim of the current study is sensitive detection of viral variants within the hepatitis delta virus pool of different follow-up serum samples obtained from the interferon treated patients infected by HDV. By this means, it is aimed to detect viral variation profile prior to, during and after the treatment and to investigate the evolutionary process under viral treatment. Another purpose of the present study is to investigate the relationship between variation patterns and the disease by comparing the variation profiles and clinical course of the disease in patients. Roche GS Junior 454 "Ultra Deep pyrosequencing" (UDPs) system is used for this purpose. The entire HDV viral genome was amplified with 5 different overlapping fragments. During the study, HDV genomes from sera of 11 patients with a total of 32 different dates were sequenced. Differences were observed in positions 267, 269, 270, 569, 928 and 929, when variations in responders, non-responders and relapsers were compared. Two additional significant differences in positions 227 and 750 were observed, when it came to the comparison of responder vs. relapser patients. In addition, comparing 3 groups together has revealed a variation pattern with significant differences in the region covering 425-430 positions on HDV genome. Further studies may contribute in elucidation of clinical significance and the importance of detected variants in HDV infection and treatment.

2016, 99 pages

**Keywords:** Hepatitis D Virus, Ultra deep Pyrosequencing, Next Generation Sequencing, Interferon, Quasispecies





## TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca bana her türlü desteği sağlayan, tez çalışmalarında bilgisiyle ve önerileriyle beni yönlendiren ve laboratuvar imkânlarından yararlanmamı sağlayan değerli tez danışmanım Sayın Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI'ya,

Tez çalışmalarım süresince bana engin bilgileriyle katkıda bulunan ve tezin her aşamasında yardımlarını esirgemeyen değerli hocalarım Sayın Doç.Dr. Ersin KARATAYLI ve Yrd.Doç.Dr. Senem Ceren ÖZEN KARATAYLI'ya,

Tez çalışmamın deneysel aşaması için her türlü imkan ve olanakları bana açan Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü Merkez Laboratuvarı çalışanlarına,

Eğitim hayatım süresince gösterdikleri destek, anlayış ve hoşgörü için sevgili annem, babam ve eşim Esra NASSIRI'ye sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

Camran NASSIRI

Ankara, Şubat 2016

## İÇİNDEKİLER

<b>ETİK BEYAN</b> .....	<b>i</b>
<b>ÖZET</b> .....	<b>iii</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>v</b>
<b>TEŞEKKÜR</b> .....	<b>vii</b>
<b>İÇİNDEKİLER</b> .....	<b>viii</b>
<b>SEKİLLER DİZİNİ</b> .....	<b>xiv</b>
<b>ÇİZELGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xvi</b>
<b>SİMGELER DİZİNİ</b> .....	<b>xviii</b>
<b>1. GİRİŞ</b> .....	<b>1</b>
<b>2. KURAMSAL TEMELLER</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1. HEPATİT DELTA VİRÜSÜ</b> .....	<b>3</b>
2.1.1. EPİDEMİYOLOJİ .....	3
2.1.2. VİRAL HETEROJENİTE .....	4
2.1.3. VİRİYON YAPISI .....	4
2.1.4. GENOM YAPISI .....	6
2.1.5. PATOJENİSİTE .....	7
2.1.6. DELTA ANTİJENLERİ .....	8
2.1.6.1. HDAG-S Fonksiyonu .....	10
2.1.6.2. HDAG-L Fonksiyonu .....	10
2.1.7. COĞRAFİ DAĞILIM .....	10
2.1.8. GENETİK HETEROJENİTE (QUASISPECIES) .....	11

2.1.9. HDV TEDAVİSİ.....	12
2.1.9.1. İnterferon.....	12
2.1.9.2. Pegile İnterferon.....	12
2.1.9.3. Nükleozit Analogları.....	12
2.1.9.4. Deoksinükleoitit Analogları.....	13
2.1.9.5. Birleşik Tedavi.....	13
2.1.10. YENİ TEDAVİ YÖNTEMLERİ .....	13
2.1.10.1. RNAi (RNA interferans).....	13
2.1.10.2. Prenilasyon İnhibitörleri .....	14
2.1.11. TEDAVİYE YANIT .....	14
2.1.11.1. Biyokimyasal yanıt .....	14
2.1.11.2. Virolojik yanıt.....	14
2.1.11.3. Histolojik yanıt .....	15
<b>2.2. YENİ NESİL SEKANSLAMA.....</b>	<b>16</b>
<b><u>3. GEREKÇE VE AMAC.....</u></b>	<b><u>18</u></b>
<b><u>4. MATERYAL VE YÖNTEM.....</u></b>	<b><u>19</u></b>
<b>4.1. MATERYAL .....</b>	<b>19</b>
4.1.1. KİMYASALLAR.....	19
4.1.2. STANDART TAMPON, ÇÖZELTİLER VE ENZİM KİTLERİ.....	20
4.1.3. SEKANSLAMADA KULLANILMIŞ KİTLER VE CİHAZLAR .....	20
4.1.4. PRİMERLER .....	22
4.1.5. “ FÜZYON PRİMER” TASARLAMASI .....	22

<b>4.2. YÖNTEM.....</b>	<b>26</b>
4.2.1. GÖNÜLLÜ NİTELİĞİ (YAŞ, CİNSİYET, HASTALIK, ARAŞTIRMAYA KATILACAK KİŞİ SAYISI VB.) .....	26
4.2.1.1. Araştırmaya Dâhil Olma Kriterleri .....	26
4.2.1.2. Araştırmaya Dâhil Olmama Kriterleri .....	26
4.2.2. HASTA SERUMUNDAN VİRAL RNA EKSTRAKSİYONU.....	28
4.2.3. HDV-RNA’NIN TÜM GENOMUNUN RT-PZR İLE ÇOĞALTILMASI.....	28
4.2.4. RT-PZR İLE ÇOĞALTILAN GEN BÖLGELERİN PZR YAPILARAK ÇİFT ZİNCİR DNA ÜRETİLMESİ .....	29
4.2.5. PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JELDE YÜRÜTÜLMESİ .....	30
4.2.6. PZR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI .....	30
4.2.7. AMPLİKON HAZIRLIĞI (PZR) .....	30
4.2.8. PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JELDE YÜRÜTÜLMESİ .....	32
4.2.9. KÜTÜPHANE SAFLAŞTIRILMASI .....	32
4.2.9.1. Kütüphane Miktar Tayini.....	34
4.2.9.2. Standart Eğri .....	35
4.2.9.3. Deney .....	35
4.2.9.4. Amplikon Seyreltilmesi ve Havuz Oluşturma .....	37
4.2.10. EMPZR AMPLİFİKASYONU .....	37
4.2.10.1. Başlamadan Önce.....	37
4.2.10.2. emPZR Amplifikasyonunda Kullanılacak Kütüphane Miktarının Tayini .....	37
4.2.11. KİTLERİN VE EMÜLSİYON YAĞININ HAZIRLIĞI.....	38
4.2.11.1. Kit hazırlığı .....	38

4.2.11.2. Mock Karışımı ve Ön Emülsiyon Hazırlığı.....	38
4.2.11.3. Live Amp Mix A ve B 'nin hazırlığı .....	38
4.2.11.4. DNA Kütüphanesinin kelepçelenmesi.....	39
4.2.11.5. Emulsifikasyon .....	40
4.2.12. AMPLİFİKASYON .....	40
4.2.12.1. Emülsiyonların dağıtımı .....	40
4.2.12.2. Amplifikasyon reaksiyonu .....	40
4.2.13. BONCUK GERİ KAZANIMI.....	41
4.2.13.1. Vakum destekli emülsiyon kırımı.....	41
4.2.13.2. Emülsiyon toplaması ve ilk yıkamalar.....	42
4.2.13.3. Boncuk yıkaması ve geri kazanımı .....	43
4.2.14. DNA KÜTÜPHANESİ BONCUK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ .....	43
4.2.14.1. Zenginleştirme Hazırlığı.....	43
4.2.14.2. Zenginleştirme Boncuklarının Hazırlığı .....	44
4.2.14.3. DNA Taşıyan Boncukların Zenginleştirilmesi .....	44
4.2.14.4. Zenginleştirilmiş DNA Boncuklarının Toplanması.....	45
4.2.15. DİZİLEME PRİMERLERİNİN BAĞLANMASI.....	45
4.2.16. GSJUNIOR BONCUK SAYICI .....	45
4.2.17. DİZİLEME METODU .....	46
4.2.17.1. BAŞLAMADAN ÖNCE .....	47
4.2.17.2. Ön Yıkama .....	47
4.2.17.3. PicoTiter plaka Cihazının Hazırlığı .....	47

4.2.17.3.1. Boncuk Tamponu 2 (BB2)' nin Hazırlığı .....	47
4.2.17.3.2. PicoTiter plaka Ve Boncuk Yükleme Cihazlarının Hazırlığı .....	47
4.2.17.4. Boncukların Hazırlığı .....	49
4.2.17.5. Kontrol boncuklar XLTF eklenerek DNA boncuklarının hazırlanması .....	49
4.2.17.6. Paketleme Boncukların Hazırlanması.....	49
4.2.17.7. Enzim Boncuklarının ve PPIase Boncuklarının hazırlanması .....	50
4.2.17.8. DNA Boncukları ve Paketleme Boncukları Karışımının Hazırlanması .....	50
4.2.17.9. Boncuk Tabakalarının Yüklmesi Ve Cihazın Başlatılması.....	51
4.2.17.10. İlk Boncuk Tabakasının Yüklmesi: Enzim Boncuk Pre-Layer.....	51
4.2.17.11. Tampon Cb'nin Hazırlığı.....	51
4.2.17.12. İkinci Boncuk Tabakasının Yüklmesi: DNA Ve paketleme Boncukları .....	52
4.2.17.13. GSJunior Cihazının Başlatılması .....	52
4.2.17.14. Üçüncü Boncuk Tabakasının Yüklmesi: Enzim Boncuk sonraki tabaka.....	52
4.2.17.15. GSJunior PTP Kartuşunun Hazırlığı.....	52
4.2.17.16. Dördüncü Boncuk Tabakasının Yüklmesi: Ppiase Boncuklar .....	53
4.2.18. DİZİLEME SÜRECİ .....	53
4.2.18.1. Süreç İçin Parametre Ve Yazıların Ayarlanması.....	53
4.2.18.2. PTP Cihazının GSJunior'a Yüklmesi .....	54
<b><u>5. ARASTIRMA BULGULARI.....</u></b>	<b>55</b>
<b>5.1. AMPLİKONLARIN AGAROS JELDE YÜRÜTÜLMESİ.....</b>	<b>55</b>
<b>5.2. SEKANS DİZİLERİN OKUMA SAYISI .....</b>	<b>55</b>

<b>5.3. SEKANS VERİLERİNİN İNCELENMESİ .....</b>	<b>55</b>
5.3.1. OKUMALARDAN “KONSENSUS” DİZİ OLUŞTURULMASI.....	58
5.3.2. ÖRNEK BAŞINA TÜM GENOM OLUŞTURULMASI .....	58
5.3.3. TÜM GENOMLARIN ALT ALTA DİZİLMESİ.....	58
5.3.4. NÜKSETMİŞ VE YANIT VERMEMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KİYASLANMASI .....	59
5.3.5. NÜKSETMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KİYASLANMASI .....	60
5.3.6. DİĞER PATTERNLER.....	61
5.3.7. NÜKSETMİŞ HASTALARIN YANIT VERMEYEN HASTALARLA KARŞILAŞTIRILMASI.....	61
<b><u>6. TARTIŞMA VE SONUC.....</u></b>	<b>63</b>
<b><u>7. KAYNAKLAR .....</u></b>	<b>67</b>
<b><u>8. EKLER.....</u></b>	<b>75</b>
8.1. EK1:TÜM GENOM ALT ALTA DİZİLMESİ VE NOKTA MUTASYONLARI .....	75
<b><u>9. ÖZGEÇMİŞ.....</u></b>	<b>97</b>

## ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1 HBV yüzey proteinleri, pre-S1, pre-S2 ve S açık okuma bölgesi şematik gösterimi(24) .....	6
Şekil 2.2 Hepatit delta virüsünün RNA genomu; A: delta ribozim motifleri ( $\delta Rz$ ) ve ilgili kırılma bölgeleri gösterilmiştir(37) B: Tahmin edilen HDV ikincil yapısı(28) .....	7
Şekil 2.3 <i>delta</i> ribozim yapısı; A: karmaşık, iç içe, çifte yalancı ilmikli (double pseudoknot) ve B: HDV ribozim şematik kristal yapısı(51) .....	8
Şekil 2.4 Antigenomik HDV RNA biçimlenmesi(53) .....	9
Şekil 2.5 Hepatit delta antijenleri yapısal düzeni(61).....	10
Şekil 2.6 HDV enfeksiyonu ve ilgili genotiplerin coğrafik dağılımı(77).....	11
Şekil 4.1 GSJunior teknolojisinde kullanılan primerlerin şematik gösterimi (my454.com)23	
Şekil 4.2 “Temel” Amplikon dizileme için füzyon primerlerin Bileşenleri (my454.com) .	23
Şekil 4.3 primerlerin ve önemli genlerin HDV genomu üzerindeki yerini gösteren şematik resim (SnapGene software, GSL Biotech; www.snapgene.com).....	25
Şekil 4.4 Standart eğrinin R2 değerinin en az 0.98 olduğu doğrulandı.....	36
Şekil 4.5 emülsiyon PZR tüplerinin sağlıklı (A,B) ve hatalı (C) görünümü (my454.com) 42	
Şekil 4.6 emülsiyon kırma ve boncuk geri kazanımı sisteminin şematik gösterimi (my454.com) .....	42
Şekil 4.7 GSJunior Boncuk sayıcı v2 yan (A) ve ön (B) görünümü (my454.com).....	46
Şekil 4.8 PTP'nin BDD cihazının üzerine montajı (my454.com).....	48
Şekil 4.9 PTP'nin yüklenmesi (my454.com) .....	48



Şekil 5.1 Çoğaltılmış amplikonların doğrulanması için PZR ürünlerinin 1X agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve QX174 DNA Marker.....	55
Şekil 5.2 kütüphane okuma uzunluklarını ve okuma kalitesini gösteren grafik ve değerleri .....	58
Şekil 5.3 267, 269, 270, 569, 928 ve 929 numaralı nükleotidlerin nüksetmiş ve yanıt vermemiş hastaların, yanıt vermiş hastalarla karşılaştırılması .....	60
Şekil 5.4 227, 267, 269,270, 569, 750, 928 ve 929 numaralı nükleotidlerin nüksetmiş hastaların, yanıt vermiş hastalarla karşılaştırılması.....	61
Şekil 5.5 425. nükleotid ile 430. nükleotid arasında farklı örnekler arasında çeşitli patternler görülmektedir. ....	62
Şekil 6.1 202 nükleotid nokta polimorfizmi.....	66
Şekil 8.1 Tüm genom dizilerinin işaretleme rehberi .....	75

## ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 4.1 Kullanılmış kimyasallar .....	19
Çizelge 4.2 Kullanılmış standart tampon ve çözeltiler.....	20
Çizelge 4.3 Enzim kitleri.....	20
Çizelge 4.4 Sekanslamada Kullanılmış Kitler Ve Cihazlar.....	21
Çizelge 4.5 RT-PZR ve PZR’de Kullanılmış primerler .....	22
Çizelge 4.6 Kullanılmış “Fusion” primerlerin kalıba özgün dizini .....	24
Çizelge 4.7 “Füzyon” primerlerde Kullanılmış “MID”lerin dizini .....	25
Çizelge 4.8 Kriterlere uygun olarak seçilmiş hastaların farklı tarihlerdeki viral yükleri... 27	
Çizelge 4.9 RT-PZR reaksiyon karışımı.....	29
Çizelge 4.10 PZR reaksiyon karışımı .....	29
Çizelge 4.11 PZR döngü sayısı ve süreleri.....	30
Çizelge 4.12 PZR reaksiyon karışımı .....	31
Çizelge 4.13 PZR döngü sayısı ve süreleri.....	32
Çizelge 4.14 standart eğrisi için 8 kademeli DNA derişimi .....	35
Çizelge 4.15 florsan ölçümü için Roche 480 cihazında kullanılan program.....	36
Çizelge 4.16 “Live Amp” A ve “Live Amp” B karışımları hazırlanması .....	39
Çizelge 4.17 emulsyon PZR sıcaklık ve süreleri.....	41
Çizelge 4.18 Boncuk tabakaları.....	49

Çizelge 4.19 ön ve sonraki tabakalar için enzim boncukların hazırlanışı ..... 50

Çizelge 5.1 amplikon bazında okuma sayıları..... 56



## SİMGELER DİZİNİ

$\mu$ l	Mikrolitre
$\mu$ M	Mikromolar
ALT	Alanin Aminotransferaz
BDD	Boncuk yükleme aparatı
bç	Baz çifti
ddH <sub>2</sub> O	Çift distile su
dk	Dakika
DMSO	Dimetil sülfoksit
DNA	Deoksiribonükleik asit
EB	Etidium bromide
SDS	sodyum dodesil sulfat
HDAg	Hepatit Delta Antijen
HBV	Hepatit Beta Virüsü
HCV	Hepatit C Virüsü
HDV	Hepatit Delta Virüsü
IFN	İnterferon
KHD	Kronik Hepatit Delta
MID	“Multiplex identifier”
MPC	Mıknatıslı Parça Toplayıcı
PEG-IFN	Pegile İnterferon
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu

RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA interferans
RNP	Ribonükleoprotein
RPM	Tur/Dakika
sn	Saniye
SVR	Kalıcı viral yanıt
TE	Tris EDTA
UTTD	“Ultra Turrax Tube Drive”





## 1. GİRİŞ

Delta hepatiti en hızlı ilerleyen ve en saldırgan viral hepatit olarak tanımlanmaktadır. AIDS'e yol açan HIV virüsünden çok daha bulaşıcı olmasına karşın, hepatit D'nin tedavi imkânları diğer viral hepatitlere göre çok daha sınırlıdır.

Delta hepatitine, karaciğerde iltihaba yol açan Hepatit Delta Virüsü (HDV) neden olur. HDV enfeksiyonuna daha sıklıkla orta Afrika, orta doğu ve orta-güney Amerika bölgelerinde rastlanılmaktadır. Avustralya, Amerika Birleşik Devletleri ve Avrupa'nın çoğu ülkesinde az sıklıkta görülmektedir. Gelişmiş ülkelerde D hepatitine çoğunlukla uyuşturucu bağımlılarında rastlanır. Dünyada ve Türkiye'de sıklığı giderek azalmaktadır. Bu azalma hepatit B aşısının giderek daha yaygın kullanılmasına ve buna bağlı olarak hepatit B enfeksiyon sıklığının azalmasına da bir ölçüde bağlıdır. Belirtildiği gibi ülkemizde HDV enfeksiyonu görülme sıklığı azalmasına rağmen özellikle doğu ve güneydoğu bölgelerimizde hala sık görülmekte ve önemini korumaktadır. Delta virüsü defektif bir RNA virüsüdür ve çoğalmak için hepatit B virüsüne (HBV) ihtiyaç duymaktadır. HBV ile enfekte olmamış bir insanı etkileyemez ancak HBV ile aynı anda insan vücuduna girebilir veya HBV enfeksiyonu mevcut olan bir insan tarafından sonradan alınıp bir süperenfeksiyona yol açabilir.

HBV ve HDV birlikteliğinde gözlenen enfeksiyon sadece HBV varlığında gözlenen enfeksiyona oranla daha sık olarak hızlı ilerleyen (fulminan) karaciğer yetmezliğine dönüşebilir (%2-20). HDV süper-enfeksiyonlarında kronik HBV hepatiti gelişme sıklığı azalırken, çoğu hastada kronik HDV enfeksiyonları ortaya çıkmaktadır ve bu kronik HDV enfeksiyonlarında daha sık ve ciddi karaciğer hastalıkları ve karaciğer sirozu ortaya çıkmaktadır. Nadir olarak bir grup hastada daha iyi seyretmekle beraber, yine nadir de olsa bazı kişilerde HDV'ye bağlı koruyucu bağışıklık gelişebilmektedir.

HDV bir kişiden diğerine, enfekte olmuş kan ve kan ürünlerinin kullanımı, hasta kişiler tarafından kullanılmış enjektörlerin tekrar kullanımı ile veya HDV ile enfekte olmuş kişi ile cinsel temas nedeni ile geçebilir. HDV'nin aile içi bulaşı da bildirilmiştir(1).

Tüm bunlar göz önüne alındığında, önemli bir sağlık sorunu olan HDV enfeksiyonlarının araştırılması, virüsün genom yapısının incelenmesi, viral genomda ortaya çıkan varyasyonların klinik açıdan önemlerinin belirlenmesi ve bu hastalığın tedavisinde kullanılacak ilaçların araştırılması HBV ve HDV ile mücadelede büyük önem arz etmektedir.





## 2. KURAMSAL TEMELLER

### 2.1. HEPATİT DELTA VİRÜSÜ

Hepatit delta virüsü (HDV) bilinen en küçük insan RNA virüsüdür. HDV, kronik hepatit B hastalarında yeni bir antijenin varlığını gösteren Rizzetto ve ark. (1977) tarafından keşfedildi. *Delta* olarak adlandırılan bu antijenin, daha sonra infeksiyöz ve defektif bir faktör ile bağlantılı olduğu gösterildi. Bu faktör bulaşabilmek için hepatit B virüs enfeksiyonlarında ortaya çıkan hepatit B yüzey antijenine (HBsAg) ihtiyaç duymakta olup ve HBsAg-pozitif hastaların karaciğer hastalığının seyrini şiddetlendirmektedir(2).

Hepatit B virüsünün (HBV) bir uydusu olarak kabul edilmesine rağmen, HDV genomu HBV genomu ile nükleotid dizisini açısından hiçbir benzerlik göstermemekte ve HBV'den bağımsız olarak replike olabilmektedir. HDV'nin genom yapısı ve replikasyon mekanizması bitki viroid benzetmesine rağmen, *Deltaviridae* olarak adlandırılan farklı bir cins olarak sınıflandırılmıştır.

#### 2.1.1. EPIDEMIOLOJİ

HDV dünya üzerinde yaygın olup, yaygınlık oranlarının farklı olmasına rağmen dağılımı HBV'ye benzememektedir (3). HDV, Akdeniz ülkeleri, Ortadoğu, orta Afrika ve güney Amerika'nın kuzey bölgelerinde oldukça endemiktir. Dünya sağlık örgütü (WHO;2008) dünyada yaklaşık 350 milyon kişinin kronik HBV enfeksiyonu taşıdığını tahmin etmiştir. Bunlar arasında, yaklaşık 20 milyon kişinin aynı zamanda HDV enfeksiyonu taşıdığı tahmin edilmektedir (4).

HDV, enfekte kandan cinsel veya perkütanöz temasla aktarılmaktadır. Bir bireye HBV ve HDV aynı zamanda bulaşabilir. Bu durum ko-enfeksiyon olarak tanımlanır. Süper-enfeksiyon ise bir HBV taşıyıcısına HDV virüsü bulaşma durumudur (5). Genellikle ko-enfeksiyon, akut hepatitin gelişmesine sebep olur ve bu vakaların yaklaşık %2 sinde kronik hepatit gelişebilir. Buna karşılık süper-enfeksiyon önceden var olan B hepatitinin prognozunu kötüleştirerek, şiddetli akut hepatitin gelişmesine sebep olur. Var olan HBV enfeksiyonu HDV'nin düzenli bir şekilde birikmesine müsaade edip hastaların %90'ında hızlı ilerleyen hepatite sebep olur. HDV'den kaynaklanan aktif, kronik hepatitlerde genelde

karaciğer sirozu gelişmektedir (6) ve bu durum hepatoselüler karsinoma riskini 3 kat, ölüm riskini ise 2 kat arttırmaktadır (7). Hâlihazırda karaciğer nakli, son aşamada olan HDV karaciğer hastalığının tedavisinde kullanılabilen tek seçenektir (5). Buna ek olarak, uzun süreli yüksek doz *interferon alpha* tedavisinin kronik hepatit D hastalığının seyrinde iyileşmeye neden olduğu gösterilmiştir (8, 9). HDV virüsüne karşı herhangi bir aşı geliştirilmediyse de hepatit B aşılması dolaylı olarak HDV virüsüne karşı da koruma sağlayabilir.

### 2.1.2. VIRAL HETEROJENİTE

HDV RNA genomu çok değişken olup aynı genotipte, nükleik asit dizisi açısından %16'ya kadar değişkenlik gösterebilir. Tek bir hastada bile virüs birbirine yakın 'quasispecies'lerden oluşan bir havuz şeklindedir(10). Bu çeşitlilik kısmen RNA polimeraz'ın hata düzeltme yeteneğinin olmamasından kaynaklanmaktadır. RNA polimerazın HDV'nin kodlanmayan bölgesinde hata yapma sıklığı her replikasyon için yaklaşık  $3,52 \times 10^{-3}$  baz değişikliğidir. Bu değer HDV genomunun kodlayan bölgesinde, sinonim değişimlerde  $1,49 \times 10^{-3}$  ve sinonim olmayan değişimlerde  $0,67 \times 10^{-3}$  bazdır(11). Fakat heterojenite, genomun kodlayan bölgesinin hepsinde aynı değildir. Ribozim dizini ve HDAg'nin RNA bağlanma bölgesi yüksek seviyede korunmuş olmasına rağmen, C ucunda bulunan büyük HDAg çok değişkendir. Geçmişte HDV genotiplemesi karaciğer dokusunun immuno-histokimyasal analizi veya PZR ürününün Sınırlayıcı Enzim Parça Uzunluk Çeşitliliği analiziyle elde edilmekte ve virüsün dünya genelinde üç ana genotipten oluştuğu bilinmekteydi(12). Sekanslama ve moleküler filogenetik ağacı analizi, HDV'nin en az 8 farklı genotipten oluştuğu, bunların da dördünün özellikle Afrika kaynaklı olduğu saptanmıştır(4, 13).

### 2.1.3. VIRYON YAPISI

HDV viryon üretmek ve aktarmak için HBV virüsüne ihtiyaç duymaktadır. HDV parçacığı HBV kökenli bir kılıf ve ayrıca RNA genomu ve hepatit delta antijeni (HDAg) içeren bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksinden oluşmaktadır(14). HBV kökenli kılıf glikozile edilmiş ve glikozile edilmemiş formlarında mevcut olan üç viral proteinden oluşmaktadır. Bu proteinler küçük (S), orta (M) ve büyük (L) olarak adlandırılmıştır ve üç ayrı başlangıç kodonu ve ortak bir stop kodonunun kullanılmasıyla üretilmektedir (15). Bitişik açık

okuma bölgesi Pre-S1, Pre-S2 ve S olmak üzere üç bölgeden oluşmaktadır (şekil 2.1.). S bölgesi S (yüzey) proteinini kodlamakta olup hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) içermektedir. M proteini pre-S2 ve S bölgeleri tarafından ve L proteini her üç bölge tarafından kodlanmaktadır. Bir HBV hastasının serumu üç proteinin yaklaşık eşmolar miktarda bulunduğu olgun HBV partikülleri içermektedir. Buna ilaveten viryon miktarının 1000 ila 1000000 katında 22 nm çapındaki subviral partiküller içermektedir(15). Bu subviral parçacıklar yalnızca yüzey proteinden oluşmakta olup viral nükleik asit içermediğinden, infeksiyöz değildir. HDV, bu HBV parçacıklarını kullanarak kendi genomunu kılıflandırmaktadır. Bir HDV parçacığının kılıfı başlıca S protein olmak üzere %5 M proteini ve %1 L proteininden oluşmaktadır(16). S proteinin HDV parçacığı birleşmesi için yeterli olmasına rağmen; sadece S veya S ile M proteini içeren parçacıklar infeksiyöz değildir (17). Sureau ve ark. (1993), L proteinin de infeksiyöz için önemli olduğunu, HDV enfeksiyonuna duyarlı *in vitro* hücre kültüründe, sadece her üç (S, M ve L) proteinle kaplanan parçacıkların infeksiyöz olduğunu göstererek ispat etmiştir. Bu buluşa dayanarak, L proteinin reseptöre bağlanmak için gerekli olduğu düşünülmektedir. Sonraki çalışmalar HBV ve HDV virionlarının HepaRG hücre kültürlerini enfekte etmek için L protein içerisinde çok korunmuş pre-S1 dizinine ihtiyaç duyduğunu göstermiştir(18). Bu bulgular HBV ve HDV'nin aynı yöntemle hücreye girdiklerini önermesine rağmen virüsün hücreye girişinden sorumlu olan reseptör henüz tanımlanmamıştır.

Virion içindeki RNP kompleksinin UV çapraz bağlama, denge kütle santrifügasyon ve immuno-presipitasyon yöntemleriyle delta antijen ve genomik RNA'dan oluştuğu ve her HDV genomuna karşılık yaklaşık 70 HDAg proteinin üretildiği gösterilmiştir (14). Daha sonra niceleyici analizler bir HDV parçacığının içindeki HDAg molaritesinin HDV RNA'nın yaklaşık 200 katı olduğunu göstermiştir (19). Elektron mikroskobu ile de HDV parçacığının  $18,7 \pm 2,5$  nm çapındaki küresel çekirdek yapısı gösterilmiştir (14). Günümüze kadar HDV RNA'nın anti-genomik zinciri, virüs parçacığında bulunmamıştır (20). HDV parçacığı oluşumu HDAg'nin büyük formu (HDAg-L) ile HBsAg'nın doğrudan etkileşimi aracılığıyla gerçekleşmektedir (21). Bu iki protein virüs parçacığı oluşumu için gerekli ve yeterlidir; hepatositlere her iki proteini kodlayan plazmidler birlikte transfekte edildiğinde HDAg-L içeren HBsAg parçacıkları ortaya çıkmıştır. Başka bir HDV bileşenine parçacık oluşumu için gerek duyulmamaktadır (22). HDAg'nin küçük formunun

(HDAg-S) parçacık oluşumu için gerekli olmamasına rağmen, paketleme etkinliğini arttırmakta rol aldığı olduğu gösterilmiştir (22, 23).



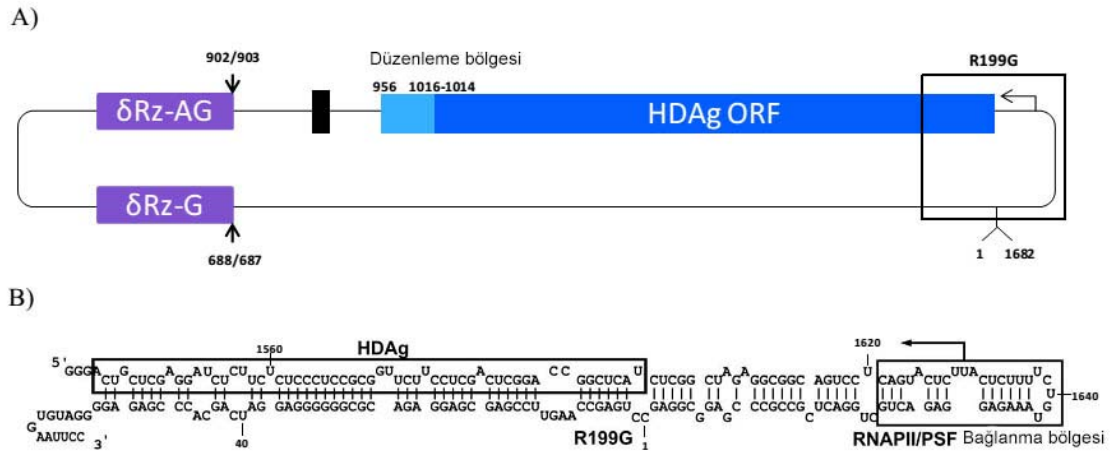
Şekil 2.1 HBV yüzey proteinleri, pre-S1, pre-S2 ve S açık okuma bölgesi şematik gösterimi(24)

#### 2.1.4. GENOM YAPISI

HDV genomu kısa (yaklaşık 1700 baz) negatif zincirli halkasal bir RNA molekülünden oluşmaktadır (şekil 2.2). Bu genomun tek tanınmış ürünü *delta* antijenidir (HDAg). HDAg'nın iki önemli formu, anti-genomik RNA zincirinin özel düzenlemesi sonucu üretilmektedir (25). Açık okuma bölgesinin aşağı yönünde bir poliadenilasyon sinyali yer almaktadır (26). RNA genomun %70'i kendi kendine eşleşebilir özelliktedir. Bu özellik dallanmamış çomak benzeri bir yapıya sahip olmasını sağlamaktadır (27). Bu yapıdan oluşan iki sap-ilmik bölgesinin RNA promotör elemanlarını içerdiği düşünülmektedir (28-30). HDV genomu yapısal olarak hayvan virüslerinden fazla bitki virüs ve viroidlere benzemektedir.

HDV RNA, replikasyon için gerekli olan yapısal ve fonksiyonel özellikleri taşımaktadır. Genom ve anti-genom, her biri delta ribozim olarak adlandırılan fonksiyonel bir ribozim bölgesi içermektedir (şekil 2.3.). Bu bölge karmaşık, iç içe, çifte yalancı ilmikli (double pseudoknot) bir yapıyı benimseyerek (31), belirli bölgelerde kendi kesimlenmesini sağlamaktadır (32-35). Delta ribozimin deney ortamında kendine bağlanmaya (ligasyon) maruz kaldığı gösterildiyse de (36), bu reaksiyon yetersiz kalmaktadır ve parçalanmış iki

RNA'nın uçlarına kısmen komplementer olan sabitleyici bir RNA'ya bağlanmasına ihtiyaç duyulmaktadır.



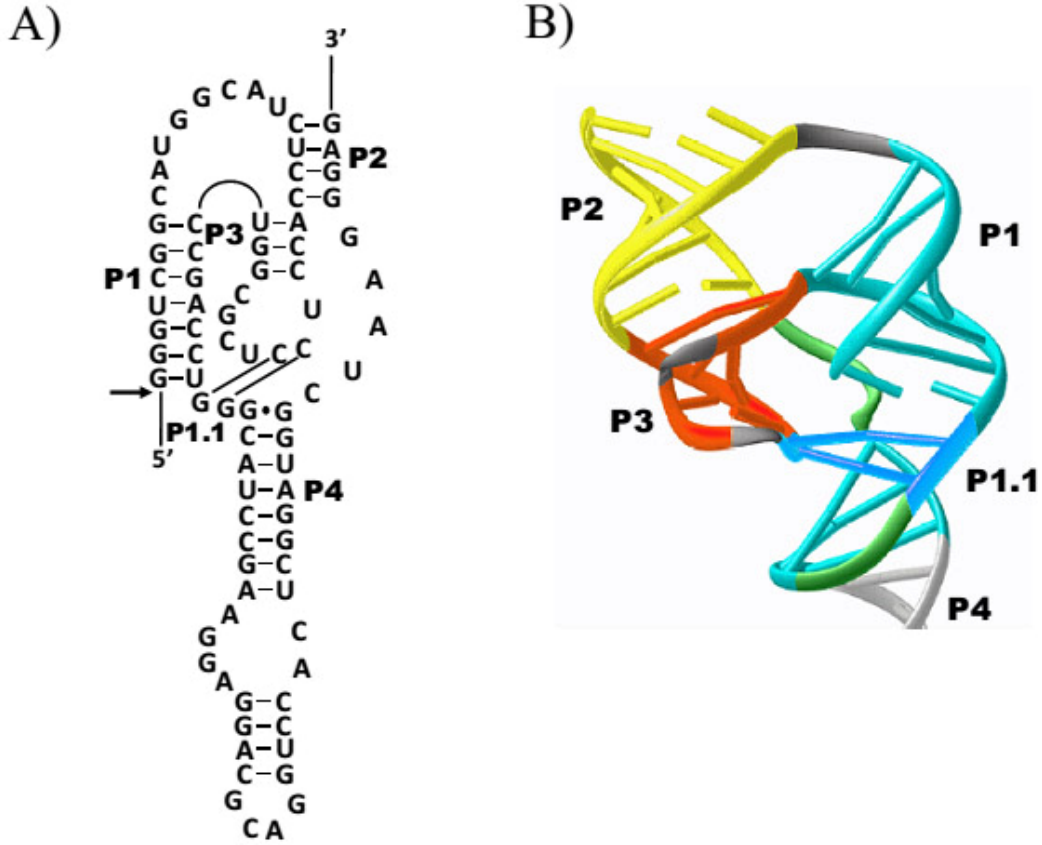
Şekil 2.2 Hepatit delta virüsünün RNA genomu; A: delta ribozim motifleri ( $\delta R_z$ ) ve ilgili kırılma bölgeleri gösterilmiştir(37) B: Tahmin edilen HDV ikincil yapısı(28)

Müteakip bir araştırmada aynı substratın *in vivo*, *in vitro* ve *Echerichia coli*'de denenerek, ligasyonun sırf konakçı hücrede gerçekleştiğini göstermiştir (38). Yakın zamana kadar kendi kendini kesimleyen bu motiflerin HDV'ye özgü olduğu düşünülmekteydi. Ancak birkaç HDV benzeri ribozim virüsleri, bakteriler, bitkiler ve memeliler dâhil olmak üzere birçok organizmada daha sonra tanımlanmıştır(39-41).

### 2.1.5. PATOJENISITE

HDV'nin patojenitesi halen çok az anlaşılmıştır. HDAg'nin HeLa ve HepG2 hücrelerindeki ifadesinin geniş hücre ölümüyle sonuçlandığı rapor edilmiştir. Bu da HDAg'nin sitotoksik olabileceğini önemektedir (42). Başka bir araştırmada HDAg varlığında DNA değil, RNA'nın sentezinin azalması görülmüştür (43). Rekombinat *Baculovirus* ile enfekte edilmiş *Spodoptera frugiperda* böcek hücrelerinde HDAg aşırı ifade edildiğinde, hücre döngüsünün HDAg'ye bağlı olarak durdurulduğu gösterilmiştir (44). Transgenik *C. Elegans* kullanılan başka bir araştırmada HDAg'yi ifade eden kurtlarda büyümenin yavaşlaması gözlemlenmiştir (45). Bunun tersine hücre kültürlerinde(46) ve transgenik farede(47) HDAg'nin beraberinde sitopatik etkinin görülmediği başka araştırmalar da mevcuttur. Wang ve ark. tarafından yürütülen bir başka

çalışmada, delta antijen ifadesinin dışında HDV RNA replikasyonunun sitopatik etkilerinden sorumlu olduğu önerilmiştir(48). Bunun tersine, başka bir araştırmada, HDV RNA replikasyonunun transgenik farelerde sınırlı hücre hasarına sebep olduğu gösterilmiştir(49). Wang ve ark.(2001) ve diğerleri(50) HDV replikasyonunun hücre kültüründe hücre çoğalması ve yaşam kabiliyetini azalttığını fakat apoptosisin direkt olarak tetiklenmediğini gözlemlemişlerdir.

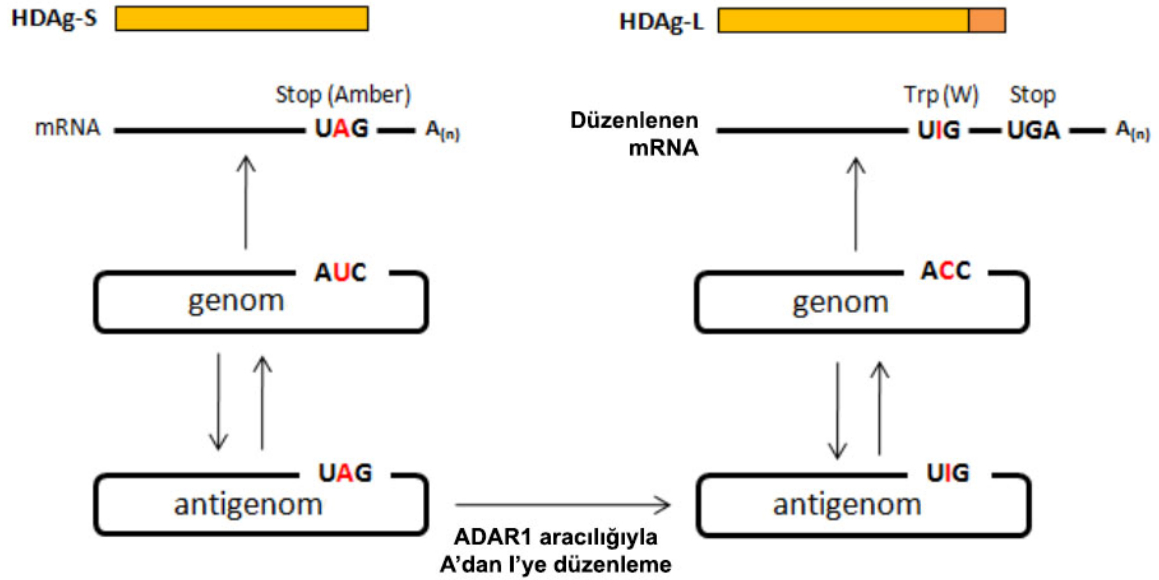


Şekil 2.3 *delta* ribozim yapısı; A: karmaşık, iç içe, çifte yalancı ilmikli (double pseudoknot) ve B: HDV ribozim şematik kristal yapısı(51)

#### 2.1.6. DELTA ANTIJENLERİ

HDV genomu iki viral protein (HDAg'ler) kodlayan tek bir açık okuma bölgesi içermektedir. Bu iki protein aynı diziyeye sahip olmaktadır ancak büyük HDAg (HDAg-L) C ucunda 19 fazla amino asit içermektedir, buda küçük HDAg (HDAg-S) geninin stop kodonunun RNA biçimlemesinde triptofan'a dönüşmesinden kaynaklanmaktadır (Şekil 2.4). Bu biçimlenme bölgesi amber/W bölgesi olarak tanımlanmaktadır. HDAg-L daha

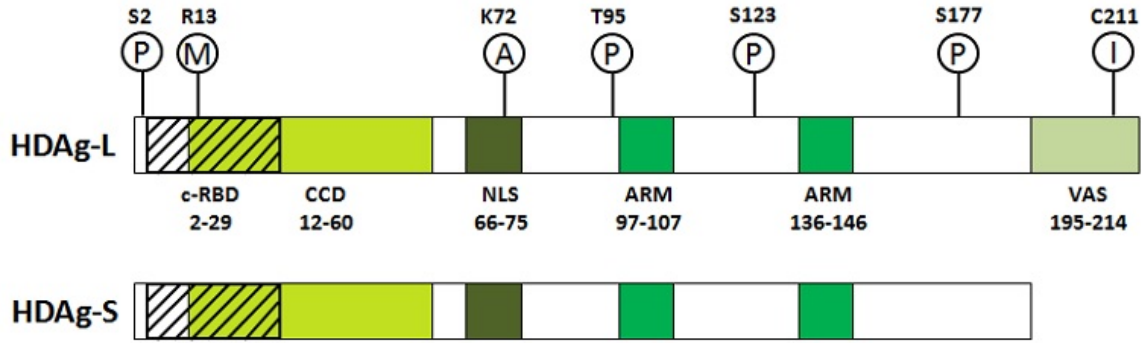
sonra enfeksiyon sırasında üretilmektedir. Amber/W bölgesinin yapısal olarak biçimlendirilmek için uygun olmayan bir konumda olmasından dolayı etkili biçimlenme hücre içerisinde önemli miktarda antigenomik HDV RNA toplandığında gerçekleşmektedir(52).



Şekil 2.4 Antigenomik HDV RNA biçimlenmesi(53)

Birçok yapısal alan HDAg'de tanımlanmıştır (şekil 2.5). N ucunda (12-60. Amino asit) HDAg oligomerizasyonunu sağlayan sarmal bir yapı bulunmaktadır(54).. Bu bölgenin nokta odaklı mutagenesi HDAg'lerin dimer oluşturma yeteneğini azaltmaktadır(54).. HDAg, iki arjinin zengin motiften (ARM) oluşan RNA bağlanma bölgesini (RBD) (97-107. Ve 136-146. amino asit) ve N ucunda bulunan (2-29. amino asit) bir kapalı (cryptic) RNA bağlanma bölgesi (RBD) içermektedir. Bu motiflerin spesifik bir şekilde HDV RNA'ya bağlandıkları laboratuvar ortamında gösterilmiştir(55). HDAg üzerindeki RBD'lerin HDAg-HDV RNA etkileşiminin HDV RNA'nın hücre çekirdeği içerisine aktarılması için zaruri olduğu gösterilmiştir(56). Mutasyon analizleri ayrıca HDAg'nın RNA'ya bağlanma yeteneğinin virüs RNA paketlenmesi için önemli olduğunu ve en azından ilk ARM motifinin bu aktivite için gerekli olduğunu göstermiştir. Zira bu motif mutasyona uğradığında RNA paketlemesi etkisiz hale gelmektedir(23). Ayrıca HDAg üzerindeki kapalı RNA bağlanma bölgesinin laboratuvar ortamında nükleik asit şaperonu olarak delta ribozimin aktivitesini düzenlediği gösterilmiştir. HDAg'nın bu aktivitesi büyük RBD'ye ihtiyaç duymamaktadır(57).

HDAg üzerindeki karboksil ucundaki 19 amino asit, büyük izoforma özgün olup, izoprenilasyon bölgesi(58, 59) ve bir çekirdek ihraç sinyalinin (NES)(60) oluşan virüs toplama sinyalini (VAS; 195.-214. amino asit) içermektedir.



Şekil 2.5 Hepatit delta antijenleri yapısal düzeni(61)

### 2.1.6.1. HDAg-S Fonksiyonu

Büyük ve küçük HDAg'leri benzer fonksiyonel bölgeler içermesine rağmen, her protein HDV yaşam döngüsünde farklı fonksiyonlara sahiptir. HDAg-S'nin hücre kültüründe HDV'nin birikimi için zorunlu olduğu görülmüştür. HDAg-S kodlayan bölgede mutasyona uğrayan HDV genomu, replikasyona başlayamamaktadır(32). Ayrıca RNA bağlanma bölgesi vasıtasıyla HDAg-S ve HDV RNA arasındaki direkt etkileşimin, viral replikasyonun aktivasyonu için gerekli olduğu görülmüştür(62, 63).

### 2.1.6.2. HDAg-L Fonksiyonu

HDAg-L'nin bir replikasyon inhibitörü olduğu rapor edilmiştir. HDAg-L replikasyon başlangıcında bir plazmitten ifade edildiğinde, baskın bir şekilde HDAg-S'nin trans-aktivasyon aktivitesini engellemektedir(64, 65). HDAg-L'nin sarmal bölgesinin mutasyona uğraması engelleyici fonksiyona müdahale etmektedir(22, 66). HDAg-L'nin direkt olarak sarmal bölge üzerinden HDAg-S'ye bağlanarak HDV replikasyonunu engellediği öngörülmektedir(67).

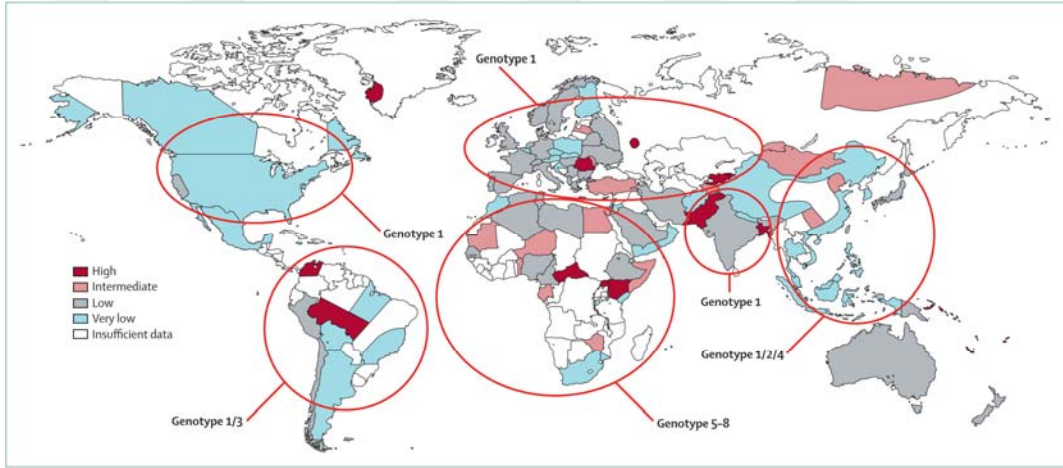
### 2.1.7. COĞRAFI DAĞILIM

Dünya üzerinde 350 milyon HBV taşıyıcısından, 15 milyondan fazlası HDV enfeksiyonu belirtilerini göstermektedir(5). Bilindiği üzere HDV taşıyıcılığının yüksek olduğu endemik



bölgeler merkez Afrika, Afrika boynuzu, Amazon havzası, doğu ve Akdeniz Avrupa, Ortadoğu ve Asya'nın bazı bölgeleridir(68). HDV enfeksiyonu oranları genel olarak HBV enfeksiyonunun endemik olduğu bölgelerde yüksek seviyelerdedir ancak örnek olarak HDV ko-enfeksiyonunun Vietnam ve Endonezya'da yaygın olmaması gibi istisnalar da bulunmaktadır(69, 70).

HDV genotip 1 dünya çapında yaygındır(71), hâlbuki genotip 2 (daha önce genotip 2a olarak tanımlanan) Japonya, Tayvan ve Rusya'nın Yakutistan bölgesinde bulunmaktadır(72, 73). En değişken genotip olan genotip 3 amazon havzasında yaygındır(74). Genotip 4 (daha önce 2b olarak tanımlanan) Tayvan ve Japonya'da bulunmaktadır(75, 76). HDV genotip 5-8 kuzey Avrupa ve göç edenler dahil Afrika asıllı kişilerde görülmektedir(4, 13).



Şekil 2.6 HDV enfeksiyonu ve ilgili genotiplerin coğrafik dağılımı(77)

Araştırmalar son otuz yılda HDV prevalansının İtalya, İspanya, Tayvan ve Türkiye'de azaldığını göstermiştir(78-80). HBV aşı programları bu bölgelerdeki HDV azalmasında etkin bir rol oynamıştır. Virüs ve onun aktarma yolları hakkında artan bilinç de önlemlerin alınmasında yararlı olmuştur (örneğin kullanılmış iğne ve şırıngalar ve diğer tıbbi malzemenin atılması).

#### 2.1.8. GENETİK HETEROJENİTE (QUASISPECIES)

Bir kronik hepatit Delta (KHD) hastasında HDV RNA genomları birbirine yakından alakalı fakat çok az farklı nükleotid diziler içeren bir RNA molekülü topluluğundan oluşmaktadır. Buna genetik heterojenite (türümsü) veya "quasispecies" denir(72, 81). KHD

hastaların klinik tedavileri sürecinde HDV Quasispecies'lerinde değişimler ve belli başlı baskın türlerin diğerlerinin yerine geçmesi görölmüştür ve bunun da virüsün konakçının bağışıklık sisteminin saldırısından kaçmasında ve dolayısıyla hastalığın nüksetmesine yol açmasında önemli bir rol oynadığı düşünölmektedir(82, 83). Böyle bir seçilimin hastalık seyrine olan etkileri hala net olarak bilinmemektedir.

## **2.1.9. HDV TEDAVISI**

### **2.1.9.1. İnterferon**

HDV kaynaklı kronik hepatit tedavisi zor olan bir hastalıktır. Günümüzde kronik hepatit delta (KHD) hastaları için IFN (interferon) tek tedavi metodu olarak görölmektedir. IFN tedavisinde, farklı yanıtlar görölebilmektedir. Yanıt oranı genellikle IFN dozuyla orantılıdır. İnterferon tedavisi tamamlandığında HDV RNA negatifliği ve ALT değerinin normalizasyonu yüksek doz tedavisi alan gruplarda %71, düşük doz tedavisi alan gruplarda ise %36 ve %29'dur (84).

Fakat IFN- $\alpha$  tedavisinde anemi, yorgunluk, nötropeni ve depresyon dahil birçok yan etki görölmektedir. Son zamanlarda Standart IFN- $\alpha$  tedavisi yerine pegile interferon formu (Peg- IFN- $\alpha$ ) kullanılmaya başlanmıştır (85).

### **2.1.9.2. Pegile İnterferon**

İlaç sektöründeki ilerlemeler sayesinde, son zamanlarda geliştirilen pegile interferonun (PEG-IFN) geleneksel interferonlara göre daha iyi bir etki gösterdiği görölmüştür (Hsieh ve ark., 2006). Buna rağmen Peg-IFN- $\alpha$ , kronik hepatit D hastalarının tedavisinde yeterli olmamıştır. Yürütölen araştırmalarda RNA negatifliği hastaların yalnız %21'inde görölmüş ve %26'sında biyokimyasal yanıt tespit edilmiştir(85).

### **2.1.9.3. Nökleozit Analogları**

Bir nökleozit analogu olarak bilinen Ribavirin'in, RNA virüsleri üzerinde etkili olduğu görölmüştür. Ribavirinin HDV genom replikasyonunun üzerinde inhibisyon etkisi olduğu *in vitro* olarak gözlemlenmiştir ancak bu sonuçlar *in vivo* olarak alınamamıştır. ALT düzeyinde bir farklılık gözlenmemiştir ve HDV RNA, IgM anti-HDV seviyeleri sabit kalmıştır(84).

#### **2.1.9.4. Deoksinükleotit Analogları**

Deoksinükleotit analogları HBsAg üretimini inhibe ederek HDV replikasyonunun baskılanmasında kullanılmaktadır. Lamivudin HBV DNA replikasyonunu baskılamaktadır fakat 1 yıl süreyle bu ilacı kullanan hiçbir KHD hastasında, hastalığın ilerlemesinde, karaciğer histolojisinde veya HDV RNA düzeylerinde olumlu bir gelişme saptanmamıştır(86). İlerleyen bir zamanda yapılan bir araştırmada, HDV hastalarının %8'inde kalıcı viral yanıt (SVR) saptanmıştır, dolayısıyla lamivudin tedavisinin HDV üzerinde kısmi de olsa etkili olduğu görülmüştür fakat son çalışmalar lamivudin dirençli HBV mutantlarının HDV salınımını desteklediğini göstermiştir. Genel itibariyle yapılan araştırmalar, deoksinükleotit analoglarının kullanımını desteklememektedir (28).

#### **2.1.9.5. Birleşik Tedavi**

Hepatit Delta virüsünün HCV gibi bir hepatotropik RNA virüsü olması sebebiyle, HCV tedavisinde kullanılan PEG-IFN ve ribavirin ikilisinin HDV için de potansiyel bir tedavi yöntemi olabileceği düşünülmüş fakat bu birleşik tedavinin başarısı da düşük düzeyde kalmıştır(87).

Lamivudin ve yüksek doz IFN kullanılarak uygulanan tedavi yöntemi de HDV üzerinde olumlu sonuçlar göstermemiştir (84).

### **2.1.10. YENİ TEDAVİ YÖNTEMLERİ**

#### **2.1.10.1. RNAi (RNA interferans)**

RNAi tedavisi viral hepatitler başta olmak üzere, viral yangılarda da kullanılmaktadır. Üç çeşit HDV RNA'dan sadece mRNA'ya karşı olumlu sonuçlar elde edildiği, hücre kültüründe gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu durum, diğer iki RNA'nın (genomik ve antigenomik) siRNA'lara (small interfering RNA) dirençli olduğunu göstermektedir ki bunun sebebi de bu RNA'ların nukleusta sınırlandırılmış olmalarıdır. Bu da nukleusta siRNA degradasyonlarına karşı ulaşılamaz hale gelmelerine neden olmaktadır(88). Ayrıca "dicer" endonukleaz çift zincirli RNA'ların %100'ünü veya %100'e yakını kesebilmektedir. Bu yüzden HDV genomik ve antigenomik RNA'lar, kısmi çift zincirli yapılarından dolayı kesim işlemlerine karşı da dirençli olabilmektedirler (89).

### **2.1.10.2. Prenilasyon İnhibitörleri**

Önceki araştırmalar L-HDAG'nin prenilasyonunun virüs birleşmesi için gerekli olan bir post-translasyonel modifikasyon olduğunu göstermiştir(21, 90). Hepatit D virüsü için geliştirilen prenilasyon inhibitörleri iki mekanizmaya sahiptir; viral proteinlerin prenilasyonunun baskılanması ve virüs tarafından kullanılan hücresel yolakların baskılanması. Hayvan modellerinde görüldüğü üzere prenilasyon inhibitörleri HDV viremisini temizlemede çok etkili olmuştur. Böylece virüsün replikasyon işlevlerinde kritik aşamaları etkileyen moleküler olarak tasarlanmış ilaçların, HDV tedavisinde daha olumlu sonuçlar doğurabileceği düşünölmektedir (84).

### **2.1.11. TEDAVIYE YANIT**

Tedavide öncelikle biyokimyasal ve virolojik yanıtlar değerlendirilmelidir. Başarılı Kronik hepatit D tedavisinde beklenen seyir sırasıyla HDV RNA, anti HDV, HBsAg kaybı ve antiHBs pozitifleşmesidir. Ancak bu hedefe varılması oldukça güçtür. Transaminazlar bir ay arayla izlenmelidir. Virolojik yanıtta ise altıncı ayda bakılmalıdır. Birinci yılın sonunda biyokimyasal ve virolojik olarak yanıt alınamayan hastalarda siroz ve son dönem karaciğer yetmezliğine ilerlemesi hızlı olmaktadır. Yanıt veren hastaların kriterleri aşağıda belirtilmiştir ancak bu kriterlerin gerçekleşmediği hastalara “yanıt vermeyen” veya “Non-responder” ayrıca ilk aşamada tedavi sonucu iyileşmiş, daha sonra hastalık belirtileri tekrar kötüye giden hastalara nüksetmiş veya “Relapser” denmektedir.

#### **2.1.11.1. Biyokimyasal yanıt**

Serumda ALT düzeyinin normalleşmesi, Tam yanıt ve bu düzeyin başlangıç değerlerinin yarısına düşmesi, Kısmi yanıt olarak tanımlanmaktadır.

#### **2.1.11.2. Virolojik yanıt**

HDV-RNA'nın saptanamayabilir düzeye inmesi, Tam yanıt ve başlangıç seviyesine göre en az bir logaritma azalması Kısmi yanıt olarak tanımlanmaktadır.

### **2.1.11.3.Histolojik yanıt**

İnflamasyon ve fibrozda azalma, nekroinflamatuvar skorda iki ve üzerinde azalma olarak tanımlanmaktadır.



## 2.2. YENİ NESİL SEKANSLAMA

Genetik değişkenlik, tüm RNA virüslerinde olduğu gibi HDV'nin de karakteristik bir özelliğidir. Sonuç olarak, HDV konak hücrede yüksek varyasyon göstermektedir, bu da birbirine çok yakın ama aynı zamanda genetik olarak özgün varyantlar havuzunu oluşturmaktadır (quasispecies).

Son zamanlara kadar çoğu viral genom projesi, sanger sekanslama yöntemine dayanarak uygulanmıştır. Bunun paralelinde son yıllarda yüksek verimli sekanslama tekniklerin gelişmesi, yeni nesil sekanslama teknolojisinin ticarileşmesine ve yaygın olarak kabul görmesine sebep olmuştur. Haziran 2008'de üç yeni nesil platform sağlayıcısı, Roche/454 Life Sciences (GS20, FLX, LXR); Illumina/Solexa (Illumina G2) ve Applied Biosystems (SOLID) olarak yüksek verimli sekanslama cihazlarını ticari bir şekilde piyasaya sürmüşlerdir. Bu cihazların farklı nesilleri çeşitli performans seviyeleriyle üretilmiştir(91). 454 life sciences firması (şuanda Roche Diagnostics'e bağlı olarak) pirosekanslamayı ticari olarak geliştirmiştir ve bu çalışmada da yüksek verimli sekanslama için "454 sekanslama" kullanılmıştır.

Yeni nesil DNA pirosekanslamayla (bu çalışmada 454 sekanslama) kıyasla 3. Nesil platformlar şimdi gün ışığına çıkmakta olup daha uzun okuma uzunluğu sunmaktadırlar. Birinci nesil cihaz veya genome sequencer 20 (GS20) 100 çift baz ve her koşuda 30-60 Mb okuma göstermekteydi. 454-FLX ve 454-LXR platformlar sırasıyla ikinci ve üçüncü nesil cihazları içermektedir. 454-FLX 2006 yılında piyasaya sürüldü ve 250 bç okuma ve her koşuda yaklaşık 150Mb okuma kapasitesine sahipti. 454-XLR 2008 yılında piyasaya sürüldü ve 350 bç okuma ve her koşuda yaklaşık 400Mb okuma kapasitesi vardı. GSJunior, 2009 yılında 454-FLX'in masaüstü sürümü olarak piyasaya sürüldü ve 400 bç okuma ve her koşuda yaklaşık 35Mb okuma göstermekteydi.

454 sekanslama aracılığıyla üretilen görece "uzun" okumalar, diğer "kısa okuma" yeni nesil teknolojiler ürünlerine kıyasla karmaşık hedeflerde daha sık ve net haritalamaya yer vermektedir. Geçen on yılda tek zincir bağlanma proteini (SSBP) dâhil rekombinant enzimlerin ilavesi gibi pirosekanslama biyokimya düzeltmeleri sebebiyle sekans okuma uzunlukları iyileştirilmiştir(92, 93). Cihazın içindeki mikroakışkanlar teknolojilerindeki gelişme, sekanslama reaksiyon döngüsünün hızını arttırmaktadır. Bu yüzden ikinci ve

üçüncü nesil sekanslamalarda birim zamanda daha fazla döngü yapılmaktadır. Ayrıca 454 teknolojide her koşudaki yüksek okuma sayısı, sanger sekanslamaya kıyasla daha derin bir kapsama sunmaktadır.

454 sekanslamada tek bir deneyden çok sayıda okuma elde edilmektedir. Örneğin, Roche GSJunior pirosekanslamanın tek bir koşusundan 700000 üzerinde okuma elde edilebilir. Bu sekanslama yönteminin derinliği, birçok hastadan alınan örneklerin paralel bir şekilde işleme kapasitesi anlamına gelmektedir. Bununla birlikte sekanslama okumaları dikkatlice yorumlanması gerekmektedir, zira elde edilen verilerin analizi, konvansiyonel, daha düşük maliyetli Sanger sekanslama tekniğine göre daha zor ve hata yapmaya daha açıktır(94). Pirosekanslamanın konakçı organizmanın içindeki popülasyonun doğru sayımını kaydedilmesini engelleyen başka bir faktör ise sekanslama koşu öncesi PZR amplifikasyonundan kaynaklanan sekanslama yeniden örneklemesidir(95).

Bu çalışmada kullanılan GSJunior sekanslama sistemi ile ilgili detaylı bilgiler için materyal ve yöntem bölümünde verilmiştir.

### 3. GEREKÇE VE AMAÇ

HDV, defektif bir RNA virüsüdür ve yalnızca Hepatit B enfeksiyonu olan bireylerde enfeksiyon yapabilmektedir. Kronik HBV-HDV enfeksiyonu, çoğunlukla siroza ilerler ve bu tip enfeksiyonlar için mortalite oranı tek başına kronik HBV enfeksiyonundan daha yüksektir. HDV enfeksiyonu için spesifik bir tedavi yoktur. Kronik HDV enfeksiyonu tedavisinde günümüzde kullanılan ilaç interferondur. Çalışmamızda HDV ile enfekte 13 farklı hastada, her hasta için, hastaların tedavilerinin takibi sürecinde her 6 ayda bir (tedavinin 0., 24. ve 48. haftaları) alınan farklı serum örneklerinden elde edilen Hepatit Delta virüs havuzundaki viral varyantların yüksek duyarlılıkla tespit edilmesi amaçlanmıştır. Böylece kronik HDV enfeksiyonu olan hastaların tedavi öncesi, tedavi sırasında ve/veya tedavi sonrası varyasyon profilleri belirlenebilmesi, ayrıca HDV enfeksiyonunun tedavi altındaki evrimsel sürecinin araştırılması amaçlanmıştır. Elde edilen veriler ile hastaların sergiledikleri farklı klinik tabloların araştırılması da çalışmanın amaçları arasındadır.

HIV ve HBV gibi virüslerin viral popülasyonda seyrek halde bulunan viral varyantların ve ilaç direnç mutasyonlarını taşıyan viral varyantların tespiti için son zamanlarda yapılan birkaç çalışmada “Ultradeep Pyrosequencing” (UDPS) yöntemi kullanılmıştır.(8-13) Bu teknoloji henüz çok yeni olduğu için, aynı yöntem ile HDV için yapılan bir çalışma henüz rapor edilmemiştir. Projemizde ise aynı yöntemin hepatit delta virüsünün tüm genomundaki varyasyonların taranması için farklı hastaların tedavi süreçleri boyunca farklı zamanlarda alınan serum örneklerinden elde edilen HDV genomları için kullanılacaktır. Dolayısıyla bu teknoloji dünyada ilk defa bizim projemizde HDV için kullanılacaktır. Projemiz, HDV'nin tedavi öncesi ve sürecindeki örneklerden elde edilecek veriler ile, HDV viral havuzunun uygulanan tedaviden dolayı oluşan selektif baskı altında nasıl bir evrimsel süreçten geçtiğinin araştırılması açısından önemlidir. DNA dizi analizi yönteminde çığır açan bu yeni teknoloji ile elde edilecek bilgilerin hastaların klinik tabloları ile karşılaştırılması ile HDV enfeksiyonlarının tedavisinde uygulanacak yeni yöntemlere ışık tutması ve/veya hali hazırda uygulanan tedavi yöntemlerinin iyileştirilmesinde kullanılabileceği öngörülmektedir.



## 4. MATERYAL VE YÖNTEM

### 4.1. MATERYAL

#### 4.1.1. KİMYASALLAR

Bu araştırmada kullanılmış kimyasalların üretici firması ve menşei ülkeler aşağıda gösterilmektedir (Çizelge 4.1.)

Çizelge 4.1 Kullanılmış kimyasallar

Kimyasal	Menşei
Agaroz	Quantum Biotechnologies, ABD
Borik Asit	Merck, Frankfurt, Almanya
Bromofenol Mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Sigma, Almanya
Etidyum Bromür	Sigma, Almanya
Mutlak Etanol	Dateks, Türkiye
Proteinaz K	Sigma, Almanya
SDS	Sigma, Almanya
Tris HCl	Sigma, Almanya
dNTP'ler	Dateks, Türkiye
PBS	Biochrom, Almanya
DMSO	Applichem, Almanya
Gliserol	Sigma, ABD

#### 4.1.2. STANDART TAMPON, ÇÖZELTİLER VE ENZİM KİTLERİ

Bu araştırmada kullanılmış standart tampon ve çözeltiler aşağıda gösterilmektedir (Çizelge 4.2.). Ayrıca araştırmada kullanılmış Enzim kitlerin üretici firması ve menşei ülkeler Çizelge 4.3.'de gösterilmektedir.

Çizelge 4.2 Kullanılmış standart tampon ve çözeltiler

Standart Tampon ve Çözelti	İçerik
TAE tamponu (5X) (1l)	24,2 g Tris-Baz, 5,7 ml Asetik asit, 10 ml 0,5M EDTA (pH 8), ddH <sub>2</sub> O ile 1000 ml'ye tamamlandı.
Silika	3M GSCN, 1,2g silika, 0,1g Tris, 60 µl Hcl, 100 ml'ye tamamlayana kadar dH <sub>2</sub> O eklenir.

Çizelge 4.3 Enzim kitleri

Enzim kiti	Menşei
High Pure Viral RNA Kit	Roche, Mannheim, Almanya
Reverse Transcriptase AMV	Roche, Mannheim, Almanya
Taq DNA polimeraz	Fermantaz, Türkiye
FastStart High Fidelity PZR System	Roche, Mannheim, Almanya

#### 4.1.3. SEKANSLAMADA KULLANILMIŞ KİTLER VE CİHAZLAR

Sekanslamada Kullanılmış Kitler Ve Cihazlar Çizelge 4.4'te gösterilmektedir .

Çizelge 4.4 Sekanslamada Kullanılmış Kitler Ve Cihazlar

Ürün adı		Katalog No.
GS FLX Titanium Rapid Library Preparation Kit (Shared with GS FLX System)	1 Kit (12 kütüphane hazırlanması için)	05608228001
GS FLX Titanium Rapid Library MID Adaptors (Shared with GS FLX System)	1 Kit (96 kütüphane hazırlanması için)	05619211001
GS FLX Titanium Library Paired End Adaptors (Shared with GS FLX System)	1 Kit (10 deney için)	05463343001
GSJunior Titanium emPZR Kit (Lib-L)	1 Kit (1 emulsyon PZR için)	05996481001
GSJunior Titanium emPZR Kit (Lib-A)	1 Kit (1 emulsyon PZR için)	05996520001
GSJunior Titanium Sequencing Kit	1 Kit (1 sekans için)	05996554001
GSJunior Titanium PicoTiter plaka Kit	1 plaka	05996619001
GSJunior Titanium Control Bead Kit	1 Kit (1 sekans için)	05996643001
GSJunior Maintenance Wash Kit	1 Kit (1 bakım yıkama)	05889111001
GSJunior Sipper Maintenance Kit	1 Kit (10 tüp ile birlikte)	05954070001
GSJunior Preventative Maintenance Kit	1 Kit	05898765001
GSJunior Titanium Sequencing Buffers Kit	1 Kit	06627846001
GSJunior Reagent Decapping Tool	Cihaz	06593020001
GSJunior emPZR Bead CounterV2	Cihaz	06594662001
GSJunior Bead Deposition Device	Cihaz	05996473001

Çizelge 4.4 (devam)

GSJunior BDD Counterweight Kit	1 Kit	05889103001
GSJunior sistem	Enstrüman, bilgisayar ve aksesuar	05922160001
IKA Turrax	Cihaz	05943353001

#### 4.1.4. PRIMERLER

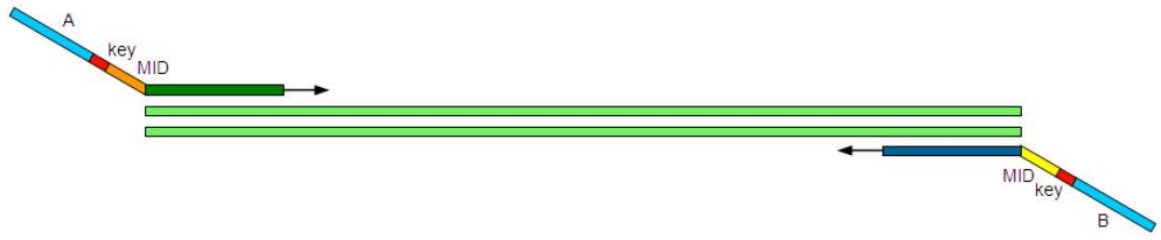
Bu araştırmada kullanılmış RT-PZR ve PZR’de Kullanılmış primerler, çalışmanın yürütüldüğü labratuvarın HDV örneklerine yönelik kullanılan rutin tahlillerin primerlerin arasından seçilmiş ancak nested PZR kapsama bölgesi gereği, ileri ve geri primerler farklı çift primerlerden seçilip ve  $\Delta G$  değerleri analizi yapılarak kapsama ve bağlanma açısından uygun olan primerler kullanılmıştır. Bu primerlerin dizin ve listesi Çizelge 4.5’de gösterilmektedir.

Çizelge 4.5 RT-PZR ve PZR’de Kullanılmış primerler

Primerler	DNA Dizisi (5’→3’)	Referans
HDV(D3) F	ACGAGTGAGGCTTATCCCGG	Rutin çalışmalar
HDV(E4) R	GAAGGAAGGCCCTCAAGAACAAGA	
HDV(1160) F	GCGGGCCGGCTACTCTTCTTT	
HDV(430) R	CTAGCCCCGTTGCTTTCTTTGCTTT	
HDV(720) F	GGCGCCGGCTGGGCAACATTCCGA	
HDV(710) R	GGAGGCTGGGACCATGCCGGCCA	

#### 4.1.5. “ FÜZYON PRIMER” TASARLAMASI

Çalışma kapsamında yaklaşık 1,7 kb olan HDV RNA’nın tamamının 5 farklı amplifikasyonla çoğaltılmıştır. GS-FLX junior cihazı ile deney tasarımı yapılabilmesi için yönteme uygun primerlerin (füzyon primerleri) tasarlanması gerekmektedir (Şekil 4.1.).



Şekil 4.1 GSJunior teknolojisinde kullanılan primerlerin şematik gösterimi (my454.com)

Bu PZR amplifikasyonunda, GS-FLX titanium primerleri (A ve B), TCAG bazlarından oluşan anahtar (key) dizisi farklı örneklerin aynı anda multipleks yapılmasında kullanılan MID (multipleks identifier) dizileri ve Hepatit Delta virüsünün genomuna spesifik diziden oluşan, füzyon primerleri tasarlanmıştır. Bu füzyon primerlerinin bileşenleri daha detaylı bir şekilde şekil 4.2. 'de gösterilmiştir.

**Forward Primer (primer A):**

5'-CGTATCGCCTCCCTCGCGCCATCAG-MID-kalıba özgün dizin-3'

**Reverse Primer (primer B):**

5'-CTATGCGCCTTGCCAGCCCGCTCAG-MID-kalıba özgün dizin-3'

Şekil 4.2 “Temel” Amplikon dizileme için füzyon primerlerin Bileşenleri (my454.com)

Bu çalışmada tasarlanan füzyon primerlerin HDV genomuna spesifik dizini aşağıda gösterilmektedir (Çizelge 4.6.).

Aynı anda çoklu örneklerin tek seferde çalışılması sistem içerisinde füzyon primerlerinin içindeki MID dizilerinin farklı hastalar için farklı MID dizileri kullanılması ile mümkün kılınmıştır. GS-FLX sistemi için kullanılan 14 adet MID dizisi çizelge 4.7.'de gösterilmiştir. Tasarlanan primerlerin HDV genomu üzerindeki yerleşimi ve amplikonların uzunluğu, bunun yanında HDAg-L ve HDAg-S ve Ribozim genlerinin konumu şekil 4.3.'te belirlenmiştir.

Bir füzyon primerinin uzunluğu yaklaşık 50-60 baz kadar olmaktadır. Dolayısıyla primer içindeki GC oranının ayarlanması, primerlerin kendi üzerlerine katlanması veya birbirleriyle dimer oluşturmaması için oldukça gelişmiş bir primer tasarım programı gerekmektedir.

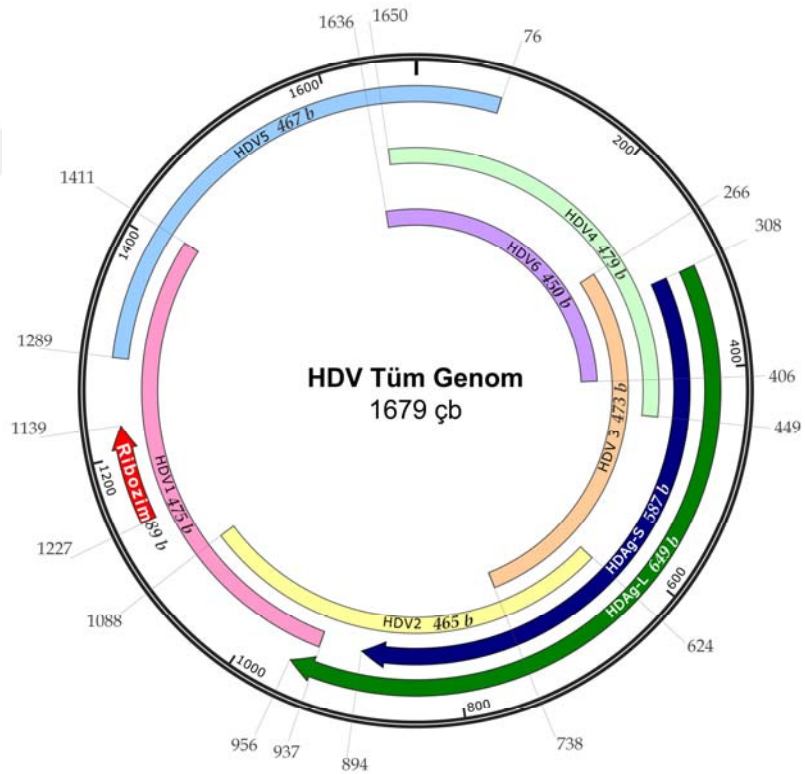
Çizelge 4.6 Kullanılmış “Fusion” primerlerin kalıba özgün dizini

Primerler	DNA Dizisi (5'→3')	Referans
HDV1F	TCGTCCCCACATAGCAGA	Kendi tasarımımız
HDV1R	GAGTTGTCGAACCCAGTGAA	
HDV2F	TCCCTTAGCCATCCGAGT	
HDV2R	AGGCCCTCGAGAACAAGA	
HDV3F	ACTCTTCTTTCCCTTCTCTCGT	
HDV3R	GAAAAGAGTAAGAGCACTGAGGAT	
HDV4F	TGTCGTCCTCAAGTTTCTTGATTTT	
HDV4R	CCCGGAGTGCTTTCCAAA	
HDV5F	TGGAGACATCCTGGAAGGG	
HDV5R	GATGGACGGAATCGGGAG	
HDV6F	GTCCCTCTCGAGTTCCTCT	
HDV6R	CTCTCAACCCTTCGGCC	

Bu işlem için “Roche Diagnostic”ın IDT DNA (integrated DNA technology) firması ile anlaşarak geliştirilen “fusion primer design tool” programı kullanılmıştır (<http://eu.idtdna.com/scitools/applications/fusionprimers/>). Hepatit delta virüsünün tüm genomundan bu program kullanılarak her örnek için farklı bir MID ile 6 farklı amplifikasyon (12 farklı primer) tasarlanmıştır. Ancak bu primer çiftlerinin biri alternatif olarak tasarlanmış ve aynı bölgede elde edilen ampikonlar için kullanılmamıştır. Tasarlanan primerler ile PZR optimizasyon çalışmaları yapılmıştır.

Çizelge 4.7 “Füzyon” primerlerde Kullanılmış “MID”lerin dizini

MID	Dizin	MID	Dizin
MID1	ACGAGTGCGT	MID11	TGATACGTCT
MID2	ATCAGACACG	MID13	CATAGTAGTG
MID4	AGCACTGTAG	MID14	CGAGAGATAC
MID5	ACGCTCGACA	MID15	ATACGACGTA
MID6	ATATCGCGAG	MID16	TCACGTACTA
MID7	CGTGTCTCTA	MID17	CGTCTAGTAC
MID8	CTCGCGTGTC	MID18	TCTACGTAGC



Şekil 4.3 primerlerin ve önemli genlerin HDV genomu üzerindeki yerini gösteren şematik resim (SnapGene software, GSL Biotech; www.snapgene.com)

## 4.2. YÖNTEM

### 4.2.1. GÖNÜLLÜ NİTELİĞİ (YAŞ, CİNSİYET, HASTALIK, ARAŞTIRMAYA KATILACAK KİŞİ SAYISI VB.)

Çalışmamızda gönüllü olur formunu kabul ederek imzalayan bireylerden, HDV ile enfekte 13 farklı hastadan serum örnekleri alınmıştır. Bu hastalar Ankara Üniversitesi Etik kurulunun 08.06.2009 tarihli ve 153-4845 sayılı kararına dayanarak ML22364 protokol numaralı çalışmanın kapsamına alınan hastalardan seçilmiştir. Her hasta için, hastaların tedavilerinin takibi sürecinde her 6 ayda bir (tedavinin 0., 6., 12., 24. ayları) alınan 4 farklı serum örnekleri çalışmada kullanılmıştır. Çalışmada cinsiyette herhangi bir kısıtlama koyulmazken, yaş sınırı yasalara uygun belirlenmiştir.

#### 4.2.1.1. Araştırmaya Dâhil Olma Kriterleri

- En az 6 aydır HbsAg ve anti delta (+) olma,
- ALT'nin normalin üst sınırından yüksek ve 10 mislinden düşük olması,
- Tarama Vizitinde HDV-RNA pozitifliği,
- Kompanse karaciğer hastalığı,
- Hastalar 18-65 yaş arası olmalı

#### 4.2.1.2. Araştırmaya Dâhil Olmama Kriterleri

- Dekompanse karaciğer sirozu,
- Hepatosellüler karsinom varlığı,
- Başka karaciğer hastalığı varlığı,
- HCV ve HCV RNA pozitifliği,
- HIV pozitifliği,
- Ciddi yandaş hastalık



İnterferon tedavisine alınan ve tedaviye farklı cevaplar veren hastalar çizelge 4.8'de gösterildiği gibi araştırmaya dahil edilmiştir.

Çizelge 4.8 Kriterlere uygun olarak seçilmiş hastaların farklı tarihlerdeki viral yükleri

	Hasta	Başlangıç HDV-RNA (kopya/ml)	24.Hafta HDV-RNA (kopya/ml)	48.Hafta HDV-RNA (kopya/ml)	96.Hafta HDV-RNA (kopya/ml)
RESPONDER (Yanıt Veren)	MG	$5.68 \times 10^5$	$3.51 \times 10^5$	$2.72 \times 10^4$	<300
	MC	$1.81 \times 10^6$	<300	$1.04 \times 10^4$	negatif
	MY	$9.53 \times 10^4$	negatif	negatif	negatif
	RC	$3.76 \times 10^5$	negatif	negatif	negatif
	HA	$7.69 \times 10^4$	negatif	negatif	negatif
RELAPSER (Nüksetmiş)	BG	$1.02 \times 10^4$	$2.00 \times 10^4$	$2.19 \times 10^3$	<300
	MB	$1.59 \times 10^5$	$1.15 \times 10^3$	negatif	negatif
	EK	$3.10 \times 10^4$	$5.95 \times 10^4$	$3.07 \times 10^3$	negatif
	KK	$8.02 \times 10^4$	negatif	negatif	<300
NON-RESPONDER (Yanıt Vermeyen)	FO	$8.10 \times 10^6$	$5.85 \times 10^5$	$2.31 \times 10^6$	$2.68 \times 10^6$
	FOC	$9.92 \times 10^4$	$1.85 \times 10^4$	$2.58 \times 10^4$	$7.45 \times 10^4$
	MA	$1.54 \times 10^6$	$2.14 \times 10^6$	$1.93 \times 10^5$	$1.91 \times 10^6$
	YS	$1.06 \times 10^6$	$2.05 \times 10^5$	$3.72 \times 10^4$	$1.58 \times 10^5$

#### 4.2.2. HASTA SERUMUNDAN VIRAL RNA EKSTRAKSİYONU

Serumdan HDV RNA izolasyonu üretici firmanın “High Pure Viral RNA” (Roche, Indianapolis, USA) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek yapıldı:

- 1) 200 µl serum örneği, 400 µl poli-A içeren bağlama tamponu (binding buffer) bir ependorf tüpüne koyulur.
- 2) Karışım karıştırılarak toplama tüpüne (high pure collection tube) aktarılır.
- 3) 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- 4) Filtreden geçen sıvı atılır ve 500 µl inhibitör uzaklaştırıcı tampon (inhibitor removal buffer) eklenir.
- 5) 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilir.
- 6) Filtreden geçen sıvı atılır ve 450 µl yıkama tampon u eklenir.
- 7) 5. ve 6. basamaklar tekrarlanır.
- 8) 10 saniye maksimum hızda santrifüj edilir.
- 9) Kolon 1,5 ml’lik steril bir ependorf tüpüne aktarılır ve 50 µl elüsyon tamponu eklenir.
- 10) 8000 rpm’de 1 dakika santrifüj edilerek DNA elüe edilir.

#### 4.2.3. HDV-RNA’NIN TÜM GENOMUNUN RT-PZR İLE ÇOĞALTILMASI

Serumdan elde edilen HDV RNA’nın tüm genomunun RT-PZR ile çoğaltılması, reaksiyon karışımı 0,2 ml’lik tüplerde (Greiner Bioone, Avusturya) hazırlanmasıyla, “GeneAmp® PZR System 9700” cihazında yapıldı. RT- PZR karışımı çizelge 4.9 esas alınarak hazırlandıktan ve kalıp RNA eklendikten sonra 42°C’de 90 dakika boyunca revers transkripsiyon yapılır.

Çizelge 4.9 RT-PZR reaksiyon karışımı

Primer (10pmol)	2 µl	HDV(E4) R, HDV(430) R, HDV(710) R primerleri kullanılmaktadır
ddH <sub>2</sub> O	4,8 µl	
dNTP	4 µl	
AMV buffer	4 µl	
AMV	0,2 µl	
Kalıp RNA	5 µl	
Toplam	20 µl	

#### 4.2.4. RT-PZR İLE ÇOĞALTILAN GEN BÖLGELERİN PZR YAPILARAK ÇİFT ZİNCİR DNA ÜRETİLMESİ

RT-PZR ile elde edilen tek zincir DNA konvansiyonel PZR yapılarak ilgili bölgelerden çift zincir DNA elde edildi, reaksiyon karışımı 0,2 ml'lik tüplerde (Greiner Bioone, Avusturya) hazırlanmasıyla, "GeneAmp® PZR System 9700" cihazında yapıldı. Bu aşamada çizelge 4.10 ve çizelge 4.11 bilgileri esas alınarak PZR karışımı hazırlanıp ve ısıl döngüleyici programlandı.

Çizelge 4.10 PZR reaksiyon karışımı

Primer F (10 pmol)	2,5 µl	Enzim (5 u/µl)	0,75 µl
Primer R (10 pmol)	2,5 µl	dNTP (2mM)	5 µl
Buffer (10X)	5 µl	ddH <sub>2</sub> O	27,25 µl
Magnezyum (25mM)	2 µl	Kalıp	5 µl
Toplam	50 µl		

Çizelge 4.11 PZR döngü sayısı ve süreleri

Döngü aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	95°C	5 dk	1 X
Denatürasyon	95°C	30 sn	35 X
Bağlanma	65°C	45 sn	
Uzama	72°C	2 dk	
Nihai uzama	72°C	7 dk	1 X
Bekleme	4°C	∞	

#### 4.2.5. PZR ÜRÜNLERİNİN AGARUZ JELDE YÜRÜTÜLMESİ

Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaroz jelde yürütülerek istenilen bölgelerdeki DNA'nın amplifiye olduğu kontrol edildi. Bant elde edilemeyen amplifikasyonlarda işlemler en baştan itibaren tekrarlandı.

#### 4.2.6. PZR ÜRÜNLERİNİN SAFLAŞTIRILMASI

En son elde edilen PZR ürünleri, önceki aşamalardan kalan primer ve PZR karışımı çözeltileri içerdiğinden dolayı daha verimli bir PZR yapılabilmesi için PZR ürünü saflaştırıldı. PZR ürününün üzerine 50 µl hazırlanan silika (1 g/ml) eklendi. 4600 rpm'de 1dk santrifüj edildi. Supernatant pipetle çekilip atıldı. Peletin üzerine 50 µl, %70'lik (yeni hazırlanmış) Etanol eklenip ve karıştırıldı. 4600 rpm'de 1dakika santrifüj edildi. Supernatant pipetle çekilip atıldı. Peletin üzerine 50 µl dH<sub>2</sub>O eklendi. Daha sonra vortekslendi. Tüpün kapağı açık şekilde 37°C de 30 dakika veya 72°C de 10 dakika bekletilerek alkolün uçması sağlandı. 4600 rpm'de 1dakika santrifüj edildi. Supernatant saf DNA içermekte olup ve bir sonraki işlemlerde kullanılmaya hazır hale getirildi.

#### 4.2.7. AMPLIKON HAZIRLIĞI (PZR)

PZR ile elde edilen çift zincir DNA, MID'lerle işaretlenmiş primerler ile konvansiyonel PZR yapılarak ilgili bölgeler işaretlenerek çoğaltılır. Böylece DNA Kütüphanesi

hazırlanmış olur. Reaksiyon karışımı 0,2 ml'lik tüplerde (Greiner Bioone, Avusturya) hazırlanmasıyla, “GeneAmp® PZR System 9700” cihazında yapıldı.

PZR Master karışımı tek bir PZR tepkimesinin hacmini gösteren Çizelge 4.12'e göre hazırlandı. Miktar, deney düzeneğimizdeki PZR tepkimelerinin sayısına uygun olacak şekilde ayarlandı.

Çizelge 4.12 PZR reaksiyon karışımı

Belirteç	1 reaksiyon
ddH <sub>2</sub> O	18,75 µl
FastStart 10x Buffer	2,5 µl
dNTP mix(herbiri 10 mM)	0,5 µl
İleri primer (10 pmol)	0,5 µl
Geri primer (10 pmol)	0,5 µl
FastStart HiFi polimeraz (5U/µl)	0,25 µl
Kalıp DNA	2 µl
Toplam	25 µl

Herbir örnek ve herbir ampikon için bir PZR tepkimesi hazırlandı. Herbir ampikon için farklı ileri ve geri primerler kullanıldığı için, her amplifikasyona göre Master karışımı primerler eklenmeden hazırlanıp dağıtılarak, daha sonra tepkime tüplere ilgili MID'i içeren primerler ayrıca ilave edildi. Her sekanslama turunda 22,5 µl PZR ürünü kullanıldı. Dolayısıyla, sekanslamada yaşanabilecek hatalardan dolayı, herhangi bir aksaklığı ve tekrari engellemek için PZR karışım miktarları iki katına çıkartılarak 50 µl'ye çıkarılmış oldu.

Genomik veya plazmid DNA numuneleri uygun derişim elde edilene kadar saflaştırılır suyla sulandırılır. Genomic DNA: 5-20 ng/ µl' ye sulandırılır. Plazmid DNA: 1-2 ng/ µl' ye sulandırılır. Bu çalışmada önceki aşamadan elde edilip ve saflaştırılmış PZR ürünleri,

sulandırılmadan kalıp DNA olarak kullanılmıştır. Her bir 23 µl PZR Master karışımına 2 µl sulandırılmış kalıp DNA eklenmiştir. Tüpler ısıl döngüleyiciye yerleştirildikten sonra PZR programı çizelge 4.13 esas alınarak çalıştırılmıştır.

Çizelge 4.13 PZR döngü sayısı ve süreleri

Döngü aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94°C	3 dk	1 X
Denatürasyon	94°C	30 sn	10 X
Bağlanma	65-55°C (her döngüde-1°C)	45 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Denatürasyon	94°C	30 sn	30 X
Bağlanma	55°C	45 sn	
Uzama	72°C	45 sn	
Nihai uzama	72°C	8 dk	1 X
Bekleme	4°C	∞	

#### 4.2.8. PZR ÜRÜNLERİNİN AGARÖZ JELDE YÜRÜTÜLMESİ

Elde edilen PZR ürünleri %2'lik agaröz jelde yürütülerek istenilen bölgelerdeki DNA'nın amplifiye olduğu kontrol edildi. Bant elde edilemeyen amplifikasyonlarda işlemler tekrarlandı.

#### 4.2.9. KÜTÜPHANE SAFLAŞTIRILMASI

##### I. 96 kuyucuklu plakalar için (Aynı anda bir plakanın işleme alınması tavsiye edilir)

Isı bloğu 40 °C ye ayarlandı. 17.5 ml lik % 100 etanolü 7.5 ml lik saflaştırılmış suya ekleyerek 25 ml lik %70 etanol hazırlandı ve vortekslendi. PZR ürünlerinin olduğu plaka 900 x g de 30 saniye santrifüj edildi. 22.5 µl lik saflaştırılmış su, 96 kuyucuklu, yuvarlak

tabanlı polipropilen (PP) plakaların her bir kuyucuğuna pipetlendi. 22.5 µl lik her bir PZR ürünü, PZR plakasından PP plakasının her bir kuyucuğuna dikkatlice aktarıldı. AMPure boncuk şişesi 20 saniye veya boncuklar tamamen çözülene kadar vortekslendi. Her bir kuyucuğa 72.0 µl lik AMPure boncuk eklendi ve karışım homojenleşene kadar en az 12 kez aşağı ve yukarı pipetlenerek tamamen karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Plaka, mıknatıslı stanta yerleştirildi ve supernatan temizlenene kadar oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Plaka halen mıknatıslı stant üzerindeyken supernatant, boncuklara zarar vermeden dikkatlice çekildi ve atıldı.

Plaka, mıknatıs stanttan çıkarıldı ve her bir kuyucuğa 100 µl lik %70 etanol eklendi. Solüsyonu sulandırmak için plakaya 10 kez vuruldu. Pellet tamamen çözülmez. Bu kabul edilebilir bir durumdur. Plaka, mıknatıslı stant üzerine yerleştirildi ve 1 dakika inkübe edildi. Plaka halen mıknatıslı stant üzerindeyken temizlenmiş supernatan, boncuklara zarar vermeden dikkatlice çekildi ve atıldı. Bu işlemler tekrar edildi.

Mümkün olan miktarda supernatan atıldı. Bütün pelletler tamamen kuruyuncaya kadar, plaka ve mıknatıslı stant 40 °C ye ayarlanmış ısı bloğu üzerine birlikte yerleştirildi (10-20 dakika). Aşırı kurumayı önlemek için plakayı ısı bloğu üzerinde gereğinden fazla bırakılmadı. Plaka ısı bloğundan dikkatlice çıkarıldı. Fakat pelletlerin bu aktarım boyunca sabit kalmasını sağlamak için, plakanın mıknatıslı stant üzerinde olmasına dikkat edildi.

Her bir kuyucuğa 20 µl lik 1x TE buffer eklendi. Stanttan çıkarıldı. Plakaya, tüm pelletler çözülene kadar yavaşça dokunuldu. Plaka, mıknatıslı stanta yerleştirildi ve pellet halkasını yerinden oynatmak için dairesel bir devirimle hareket ettirildi. Bütün pelletler yayılana kadar plakaya dokunuldu. Bu hareket ile PZR ürünlerinin boncuklardan etkili bir şekilde çözülmesi sağlandı. Plaka, mıknatıslı stanta yerleştirildi ve 2 dakika inkübe edildi. Supernatant, her bir kuyucuktan yeni bir 96 kuyucuklu plakaya aktarıldı. Bu aktarım sırasında bazı kuyucuklardan pellet de aktarılabilir, bu durum kabul edilebilirdir. Plaka kapatıldı ve miktar tayin edilecek aşamaya geçilecek duruma gelene kadar -15 ila -25 °C de depolandı

## II. PZR Tüpleri için

Isı bloğunu 37 °C ye ayarlandı. Gerekli miktarda % 70 etanol hazırlanıp ( amplikon başına 400 µl) 10 ml için 3 ml saflaştırılmış suya 7 ml % 100 etanol eklendi ve vortekslendi. PZR tüpleri kısaca santifüj edildi. 22,5 µl saflaştırılmış su, 1,5 ml lik tüplere pipetlendi (amplikon başına bir tüp). Her bir PZR ürününün 22,5 µl'si, PZR tüplerinden her bir 1,5 ml lik tüplere aktarıldı. AMPure boncuk şişesi 20 saniye veya boncuklar tamamen çözülene kadar vortekslendi. Her bir tüpe, 72,0 µl AMPure boncuk eklendi ve 5 dakika vortekslenerek tamamen karıştırıldı. Oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. Tüpleri “Mıknatıslı Parça Toplayıcı” (MPC)’de yerleştirildi ve oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi. Tüpler halen MPC içindeyken, boncuklara zarar vermeyecek şekilde supernatant çekildi ve atıldı.

Tüpler MPC’den çıkarıldı ve her bir tüpe 200 µl %70 etanol eklendi. Tüpler 5 dakika vortekslendi. (Pellet tamamen temizlenmeyebilir, bu durum kabul edilebilir). Tüpler MPC’ye yerleştirildi ve 1 dakika inkübe edildi. Tüpler halen MPC içindeyken, boncuklara zarar vermeyecek şekilde supernatant çekildi ve atıldı. Bu işlemler tekrar edildi.

Mümkün olan miktarda supernatant atıldı. Açık tüpler, pellet tamamen kuruyana kadar 37 °C’ye ayarlanmış ısı bloğu üzerine yerleştirildi (yaklaşık 5 dakika). Aşırı kurumayı önlemek için tüpler ısı bloğu üzerinde gereğinden fazla bırakılmamalı. Tüpler MPC’den çıkarıldı. Her bir tüpe 10 µl 1x TE buffer eklendi. 5 saniye veya pellet tamamen çözülene kadar vortekslendi. Tüpler MPC’ye yerleştirildi ve oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüpler halen MPC içindeyken supernatant, dikkatlice yeni bir 1,5 ml’lik ependorf tüp setine aktarıldı. Saflaştırılmış amplikonlar tek tek miktar tayin edilecek aşamaya geçilecek duruma gelene kadar -15 ila -25 °C de depolandı.

### 4.2.9.1. Kütüphane Miktar Tayini

Kütüphane miktar tayini, Roche Light Cycler 480 aracılığıyla “Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit” kullanılarak yapılmıştır.



#### 4.2.9.2. Standart Eğri

PicoGreen kitindeki öngörülen standart DNA ( 100 ng/  $\mu$ l ) eritildi. 1,5 ml'lik mikrosantifüj tüpler 1'den 8'e etiketlendi ve 1x TE buffer, Tüp 1, 594  $\mu$ l ve Tüp 2-8, 300  $\mu$ l olacak şekilde bu tüplere aktarıldı.

6  $\mu$ l standart DNA 1. Tüpe aktarıldı (100x derişim: 1 ng/  $\mu$ l) ve 10 saniye vortekslendi. 300  $\mu$ l, 1. Tüpten 2. Tüpe aktarıldı ve 10 saniye vortekslendi. 300  $\mu$ l, 2. Tüpten 3. Tüpe aktarıldı ve 10 saniye vortekslendi. Bir tüpten bir sonraki tüpe 300  $\mu$ l aktararak ve 7. Tüpe kadar 10 saniye vorteksleyerek derişim serisine devam edildi. Her bir standart DNA derişiminden 100  $\mu$ l, 96 kuyucuklu, beyaz, real time plakaların 12. Sütununun her bir kuyucuğuna aktarıldı. Standart kuyucuk başına düşen DNA miktarı Çizelge 4.14'te listelenmiştir.

Çizelge 4.14 standart eğrisi için 8 kademeli DNA derişimi

Tüp #	Kuyucuk	DNA derişimi
Tüp 1	A12	100.00 ng/Kuyucuk
Tüp 2	B12	50.00 ng/Kuyucuk
Tüp 3	C12	25.00 ng/Kuyucuk
Tüp 4	D12	12.50 ng/Kuyucuk
Tüp 5	E12	6.25 ng/Kuyucuk
Tüp 6	F12	3.13 ng/Kuyucuk
Tüp 7	G12	1.56 ng/Kuyucuk
Tüp 8	H12	0.00 ng/Kuyucuk

#### 4.2.9.3. Deney

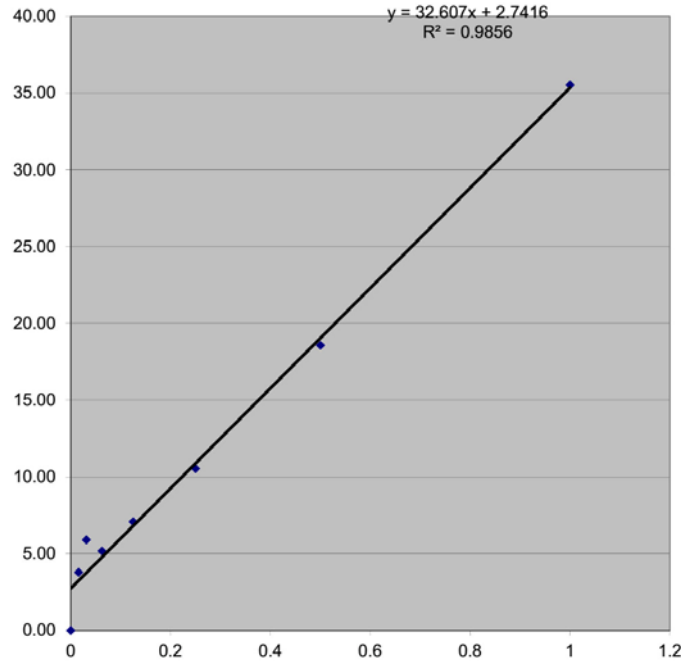
99  $\mu$ l 1x TE Buffer, her bir 96 kuyucuklu, beyaz, real time plakaların geriye kalan 88 kuyucuğuna (veya gerektiği kadar) aktarıldı. Her saflaştırılmış ampikon DNA

numunesinin 1 µl'si, real time plakaların ilgili kuyucuklarına aktarıldı. 100 µl'ye ayarlanmış çok kanallı bir pipet kullanılarak aşağı ve yukarı 4 kez pipetlenerek karıştırıldı.

Her örnek için yeni bir uç kullanıldı. Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit üreticisinin tarifi üzerine, her bir kuyucuğa 100 µl 1:200 seyreltme oranında PicoGreen eklenerek deney uygulandı. Aşağı ve yukarı 4 kez pipetleyerek dikkatlice karıştırıldı. Her kuyucuk için yeni bir uç kullanıldı. Plaka Roche 480 Real-time PZR cihazına yerleştirildi ve çizelge 4.15'te belirlendiği ayarlarla florsan ölçüm için programlandı. Florsan ölçüm değerleri işlem sonucunda bir veri dosyası olarak alındı ve önceden bu amaçla hazırlanmış excell dosyasına aktarıldı. Böylece 4.2.9.2. bölümünde bahsedilen standart DNA tüplerinin derişimi R2 değeri hesaplanarak doğrulandı (şekil 4.4).

Çizelge 4.15 florsan ölçümü için Roche 480 cihazında kullanılan program

Aşama	Döngü	Analiz modu	Sıcaklık (°C)	Edinme modu	Süre	Eğim (°C/sn.)
1	1	Erime eğrisi	20	yok	10 sn.	4,4
2	5	Ölçme	37	Tek	5 sn.	4,4
3	1	Erime eğrisi	20	yok	10 sn.	2,2



Şekil 4.4 Standart eğrinin R2 değerinin en az 0.98 olduğu doğrulandı.

#### 4.2.9.4. Amplikon Seyreltilmesi ve Havuz Oluşturma

Aşağıdaki formül kullanılarak her amplikonun molekül sayısı olarak konsantrasyonu hesaplandı.

$$\text{molekül sayısı}/\mu\text{l} = \frac{(\text{örnek konsantrasyonu; ng}/\mu\text{l}) \times 6.022 \times 10^{23}}{656.6 \times 10^9 \times \text{amplikon uzunluğu; bp}}$$

Her bir amplikon (ayrı ayrı) 1x TE Buffer'da  $1 \times 10^9$ 'a seyreltildi. Bu işlem, aşağıda hesaplanan TE hacmine 1  $\mu\text{l}$  her amplikon örneği eklenerek yapıldı.

$$\left( \frac{\text{molekül sayısı}(1. \text{adımdan})}{10^9} - 1 \right) \mu\text{l}$$

Çok sayıda amplikonun dizilimi birlikte yapılacaksa, yani PicoTiter Plakada, bu seyreltilen amplikonların her birinden eşit hacim (örn: 10  $\mu\text{l}$ ) karıştırılarak amplikon havuzu hazırlandı. Amplikon havuzu 198  $\mu\text{l}$  saflaştırılmış suya, 3. adımdaki amplikon havuzundan 2  $\mu\text{l}$  eklenerek  $10^7$  molekül sayısına seyreltildi.  $1 \times 10^9$  molekül sayılı stoklar -15 ila -25 °C'de saklanır.

#### 4.2.10. EMPZR AMPLIFIKASYONU

Bir DNA kütüphanesi örneğinin emülsiyon tabanlı klonal amplifikasyonu (emPZR amplifikasyonu), 7 temel aşama gerektirir. Bu method PZR ürünlerinin GSJunior Titanium serisi ve iki yönlü füzyon primerleri içindir (Lib-A).

##### 4.2.10.1. Başlamadan Önce

Oda sıcaklığı +15 ila + 25°C arasında olmalıdır. Birden fazla emülsiyon işlenirken, GS FLX Titanium MV emPZR Lib-A Kitinin kullanılması uygun maliyetli olacaktır. Çünkü bu kit 8 emülsiyon içerir.

##### 4.2.10.2. emPZR Amplifikasyonunda Kullanılacak Kütüphane Miktarının Tayini

Birçok amplikon kütüphanesi örneği için, kelepçe boncuk başına düşen 2 molekül DNA kütüphane girdisi, %5 ve %20 arasında bir boncuk zenginliği sağlayacak ve tatmin edici dizileme sonuçları üretecektir.

Boncuk zenginliği oranı %20'nin üzerindeyse, girdi molekülleri 3 kat azaltılır. Boncuk zenginliği oranı %5'in altındaysa, girdi moleküller 3 kat artırılır. Eğer kütüphane verimi önceki deneyimlerden tahmin edilebiliyorsa, boncuk başına düşen önceden saptanmış DNA molekül sayısı kullanılabilir.

#### **4.2.11. KITLERİN VE EMÜLSİYON YAĞININ HAZIRLIĞI**

##### **4.2.11.1. Kit hazırlığı**

“emPZR” kit kutusu açıldı ve Enzim Karışımı ve “PPIase” tüpleri hariç kit bileşenleri oda sıcaklığında eritildi. Enzim Karışımı ve PPIase tüpleri -15 ila - 25°C arasında saklanmalıdır. Eritildikten sonra 5 saniye vortekslendi. Çözölmeye yardımcı olması için “Aditif” tüpü 55°C'de 5 dakika vortekslendi ve ısıtıldı. Eğer hala çökelti kalıyorsa, tüp merkezkaç yapıldı ve supernatant kullanıldı. Enzimler de dâhil bütün kit bileşenleri mini santrifüjde 10 saniye döndürüldü. Enzimler, -15 ila - 25°C sıcaklığa bekletildi. Diğer kitler oda sıcaklığında bırakıldı.

##### **4.2.11.2. Mock Karışımı ve Ön Emülsiyon Hazırlığı**

Emülsiyon yağı tüpü, maksimum vorteks kuvvetlice vortekslendi ve tüm içerik (4 ml) “Turrax” karıştırma tüpüne döküldü. 1,72 ml saflaştırılmış suya 430 µl “Mock” Karışımı eklenerek 1x “Mock” karışımı hazırlandı. Karıştırmak için vortekslendi. 2,0 ml 1x “Mock” karışımı, emülsiyon yağının olduğu “Turrax” karıştırma tüpüne eklendi. “Ultra Turrax Tube Drive” (UTTD), 4000 rpm'de 5 dakika ayarlandı. Karıştırma tüpü UTTD'ye yerleştirildi ve emülsiyonu karıştırmak için UTTD çalıştırıldı. İşlem bittiğinde, karıştırma tüpü UTTD'den çıkarıldı.

##### **4.2.11.3. Live Amp Mix A ve B 'nin hazırlığı**

“Live Amp” A karışımı ve “Live Amp” B karışımı, Çizelge 4.16'e göre 2 ayrı tüpte hazırlanır. Kitler, Çizelgede listelendiği sırayla eklenmelidir. “Live Amp” A ve B karışımları, 5 saniye vortekslendi ve buz içinde saklandı.

Çizelge 4.16 “Live Amp” A ve “Live Amp” B karışımları hazırlanması

“Live Amp” A karışımı		“Live Amp” B karışımı	
Belirteç	Hacim (µl)	Belirteç	Hacim (µl)
ddH <sub>2</sub> O	205	ddH <sub>2</sub> O	205
additif	260	additif	260
AMP mix	135	AMP mix	135
Amp Primer A	40	Amp Primer B	40
Enzim mix	35	Enzim mix	35
PPiase	1	PPiase	1
<b>Toplam</b>	<b>676</b>	<b>Toplam</b>	<b>676</b>

#### 4.2.11.4. DNA Kütüphanesinin kelepçelenmesi

Kelepçeleme boncukları: Kelepçeleme boncuk A ve B karıştırmamalıdır. Kelepçeleme boncuk A sadece “Live Amp” A ile; Kelepçeleme boncuk B sadece “Live Amp” B ile karıştırıldı.

0,5 ml Yıkama Tamponu, 4,5 ml saflaştırılmış suyla karıştırıldı ve 1x Yıkama Tamponu hazırlandı. 1 ml 1x yıkama Tamponu her iki kelepçeleme boncuk tüpüne eklendi ve vortekslendi. Kelepçeleme boncuklar, tüpler 10 saniye döndürülerek, 180° çevrilerek ve tekrar 10 saniye döndürülerek, mini santifüjde çöktüldü (döndür-çevir-döndür). Boncuk pelletlerine zarar vermeden, supernatanlar dikkatlice çekildi ve atıldı. Kelepçeleme boncuklar bir kez daha 1 ml 1x yıkama tamponu ile yıkandı. Boncuklar, tekrar çözülmek için vortekslendi, döndür-çevir-döndür yapıldı ve supernatant atıldı. Amplikon DNA kütüphanesinden ayrılan bir parça çoğaltılmak üzere çözüldü. Gerekli DNA kütüphanesinin hacmi aşağıdaki denklem kullanılarak hesaplandı.

$$\text{tüp başına düşen } \mu\text{l DNA kütüphanesi} = \frac{\text{Boncuk başına gerekli molekül} \times 5 \text{ milyon boncuk}}{\text{Kütüphane derişimi (molekül sayısı/}\mu\text{l)}}$$

Örneğin:

$$5 \mu\text{l kütüphane} = \frac{\text{boncuk başına 2 molekül} \times 5 \text{ milyon boncuk}}{2 \text{ milyon molekül}/\mu\text{l}}$$

Eğer gerekirse, eklenecek hacim, 5  $\mu\text{l}$  ve 30  $\mu\text{l}$  arasında olacak şekilde bir kütüphane seyreltisi hazırlandı. Hesaplanan Amplikon DNA kütüphanesi hacmi, yıkanan Caprute Boncuk A tüpüne eklendi. Aynı hesaplanan Amplikon DNA kütüphanesi hacmi, Kelepçeleme Boncuk B tüpüne eklendi. Tüpler, 5 saniye vortekslendi.

#### **4.2.11.5. Emulsifikasyon**

600  $\mu\text{l}$  Live Amp B karışımı, kelepçelenmiş B kütüphanesine eklendi. Vortekslendi ve tüm içerik Turrax karıştırma tüpüne aktarıldı. UTDD 2000 rpm'de 5 dakikaya ayarlandı. Karıştırma tüpü UTDD'ye yerleştirildi ve emülsiyonu karıştırmak için UTDD çalıştırıldı. 600  $\mu\text{l}$  Live Amp Mix A, kelepçelenmiş A kütüphanesine eklendi. Vortekslendi ve tüm içerik ilk adımda olduğu gibi aynı Turrax karıştırma tüpüne aktarıldı. Karıştırma tüpü UTDD'ye yerleştirildi ve son emülsiyonu yapmak üzere UTDD çalıştırıldı. İşlem bittiğinde, karıştırma tüpü UTDD'den çıkarıldı.

#### **4.2.12. AMPLIFIKASYON**

##### **4.2.12.1. Emülsiyonların dağıtımı**

Combitip pipet kullanılarak, 100  $\mu\text{l}$  emülsiyon 96 kuyucuklu tabakaya, hava çekmemeye özen göstererek yavaşça çekilerek dağıtıldı. Bütün kuyucukların düzgün bir şekilde kapatıldığından emin olarak, kuyucukları kapatıldı.

##### **4.2.12.2. Amplifikasyon reaksiyonu**

Palaka ısı döngüleyiciye yerleştirildi ve cihaz açık konumdayken amplifikasyon programı başlatıldı. Programın (çizelge 4.17) tamamlanması yaklaşık 6 saat sürdü.

Çizelge 4.17 emülsiyon PZR sıcaklık ve süreleri

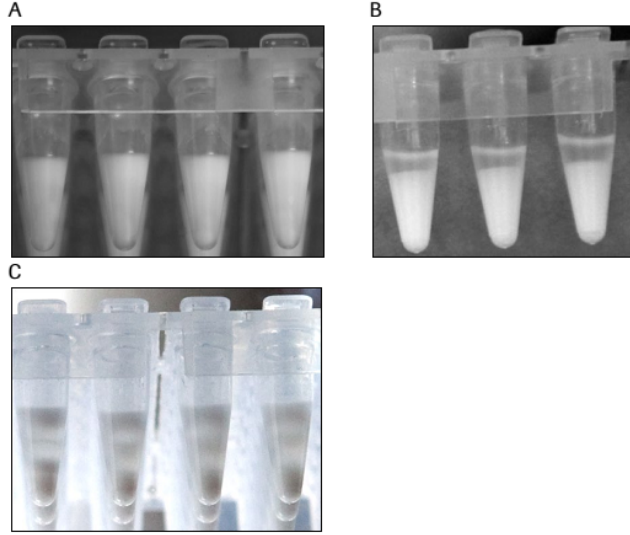
Döngü aşaması	Sıcaklık	Süre	Döngü sayısı
İlk Denatürasyon	94°C	4 dk	1 X
Denatürasyon	94°C	30 sn	50 X
Bağlanma	58°C	4,5 dk	
Uzama	68°C	30 sn	
Bekleme	1°C	∞	1 X

emülsiyon PZR bittiğinde plakalardaki kuyucuklara yan taraftan bakılır, boncuklar homojen olduğu takdirde PZR'nın bu aşamaya kadar geçerli olduğunu gösterir (şekil 4.4 A,B), ancak boncuklarda kırık ve parçalanma görülürse PZR'nın hatalı olduğunu göstermektedir (şekil 4.5 C).

#### **4.2.13. BONCUK GERİ KAZANIMI**

##### **4.2.13.1. Vakum destekli emülsiyon kırımı**

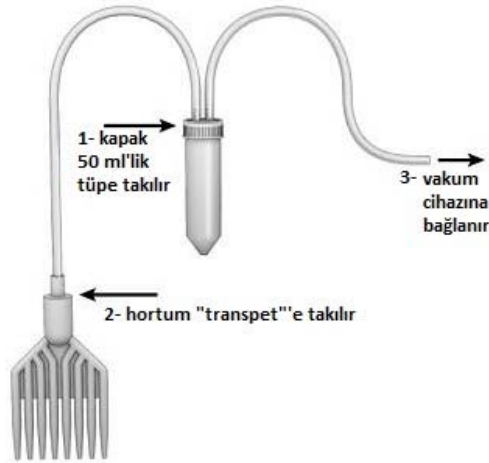
GSJunior Titanium emPZR Yağı ve Breaking Kit aspiratörün altına koyuldu. 50 ml'lik falkon tüp, GSJunior Titanium yağı ve kırma kit'ten alınan kapağa bağlandı. 50 ml'lik tüpün kapağı saklanır. Mavi bağlayıcı, "transpet" in (emici tarak) üst girişine sokuldu. Hortumun diğer ucu vakum cihazına bağlandı (şekil 4.5).



Şekil 4.5 emülsiyon PZR tüplerinin sağlıklı (A,B) ve hatalı (C) görünümü (my454.com)

#### 4.2.13.2. Emülsiyon toplaması ve ilk yıkamalar

Vakum cihazı çalıştırıldı. Transpet uçlarının, kuyucukların diplerinde oluşturduğu yavaş, dairesel bir hareketle, emülsiyonlar tüm kuyucuklardan çekildi ve 50 ml'lik tüpte toplandı. Bütün emülsiyonlar çekildikten sonra, transpet, maksimum miktarda materyalin toplama tüpüne tahliyesini sağlamak için üst kısmı aşağı gelecek şekilde çevrildi.



Şekil 4.6 emülsiyon kırma ve boncuk geri kazanımı sisteminin şematik gösterimi (my454.com)

Kuyucuklar, kuyucuk başına 100 µl izopropanol ile iki kez durulandı. İzopropanol emildi ve transpet, maksimum miktarda materyali elde etmek için üst kısmı aşağı gelecek şekilde çevrildi. Fazladan yaklaşık 5 ml izopropanol, hortumda kalması muhtemel boncukları



toplamak için yavaşça çekildi. Vakum cihazı kapatıldı ve çoğaltılan DNA'ların bulunduğu 50 ml'lik tüp çıkarıldı ve kapatıldı. 50 ml'lik tüp, aspiratörden çıkarıldı.

#### **4.2.13.3. Boncuk yıkaması ve geri kazanımı**

Toplanan emülsiyonların olduğu tüp, vortekslendi. 35 ml hacme ulaşana kadar, izopropanol eklendi ve tekrar peleti çözmek için vortekslendi. Boncuklar, santrifüjde 930 x g 'de 5 dakika çöktüldü ve supernatant dikkatlice dışarı döküldü. 10 ml zenginleştirme tamponu eklendi ve peleti tekrar çözmek için etraflıca vortekslendi. 40 ml hacme ulaşana kadar, izopropanol eklendi ve iyice vortekslendi. Boncuklar, santrifüjde 930 x g 'de 5 dakika çöktüldü ve supernatant dikkatlice çıkarıldı. 35 ml hacme ulaşana kadar, izopropanol eklendi ve iyice vortekslendi. Boncuklar, santrifüjde 930 x g 'de 5 dakika çöktüldü ve supernatant dikkatlice çıkarıldı. 35 ml hacme ulaşana kadar, etanol eklendi ve iyice vortekslendi. Boncuklar, santrifüjde 930 x g 'de 5 dakika çöktüldü ve supernatant dikkatlice çıkarıldı. 35 ml hacme ulaşana kadar, zenginleştirme tamponu eklendi ve iyice vortekslendi. Boncuklar, santrifüjde 930 x g 'de 5 dakika çöktüldü ve 2 ml zenginleştirme tamponu kalacak şekilde supernatant dikkatlice çıkarıldı. DNA boncuk çözeltisi, 1000 µl pipet yardımıyla 1,7 ml'lik bir mikro santrifüj tüpe aktarıldı. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant atıldı. 50 ml'lik tüp 1 ml zenginleştirme tamponu ile durulanır ve kullanılan zenginleştirme tamponu 1,7 ml'lik tüpe eklendi. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant atıldı. Boncuk peleti 1 ml zenginleştirme tamponu ile etraflıca durulandı. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant atıldı.

#### **4.2.14. DNA KÜTÜPHANESİ BONCUK ZENGİNLEŞTİRİLMESİ**

##### **4.2.14.1. Zenginleştirme Hazırlığı**

Kuru Isı bloğu çalıştırın ve 65°C'ye ayarlayın. 125 µl NaOH (10 N) , 9,875 ml saflaştırılmış suda karıştırılarak erime çözeltisi hazırlandı. 1 ml erime çözeltisi 1,7 ml'lik boncuk tüpüne eklendi ve vortekslendi. Oda sıcaklığında 2 dakika inkübe edildi. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant atıldı. Bu işlem 1 kez tekrarlandı. 1 ml tavlama tamponu 1,7 ml'lik boncuk tüpüne eklendi ve vortekslendi. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant atıldı. Bu işlem 2 kez tekrarlandı. 45 µl tavlama tamponu, 15 µl Enrich Primer A ve 15 µl Enrich Primer B, 1,7 ml'lik boncuk tüpüne eklendi ve vortekslendi. Tüp, ısıtıcı bir bloğa 65°C'de 5 dakika yerleştirildi ve derhal 2

1 dakika buzda soğutulur. 1 ml zenginleştirme tamponu 1,7 ml'lik boncuk tüpüne eklendi ve vortekslendi. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant atıldı. Bu işlem 2 defa daha tekrarlandı. 1 ml Zenginleştirme Tamponu 1,7 ml'lik boncuk tüpüne eklendi ve vortekslendi. Tüp, bölüm 4.2.14.3'e (DNA taşıyan boncukların zenginleştirilmesi aşamasına) gelene kadar oda sıcaklığında bırakıldı.

#### **4.2.14.2. Zenginleştirme Boncuklarının Hazırlığı**

Kahverengi Enrichment boncuklarının olduğu tüp, içeriğini tamamen çözmek için 1 dakika vortekslendi. Tüp, Magnetic Particle Concentrator (MPC)'a yerleştirildi ve Enrichment Boncuklar çökelene kadar yaklaşık 3 dakika beklendi. zenginleştirme boncukların çekilmemesine özen göstererek, supernatant atıldı. 500 µl zenginleştirme tamponu eklendi ve vortekslendi. Enrichment Boncuklar, bir MPC kullanılarak çökeltildi. Enrichment Boncukların çekilmemesine özen göstererek, supernatant atıldı. Bu işlemler 1 kez daha tekrarlandı. Supernatant atıldıktan sonra, tüp MPC'den çıkarıldı. 80 µl zenginleştirme tamponu eklendi ve vortekslendi.

#### **4.2.14.3. DNA Taşıyan Boncukların Zenginleştirilmesi**

80 µl yıkanmış zenginleştirme boncuk, 1,7 ml'lik boncuk tüpüne eklendi ve tamamen karışması için vortekslendi. Tüp, "LabQuake"da oda sıcaklığında 5 dakika döndürülür. Tüp, MPC'ye yerleştirildi ve Enrichment Boncuklar çökelene kadar 3-5 dakika beklendi. MPC birkaç kez tersyüz edildi ve boncuklar çökelene kadar beklendi. Kahverengi zenginleştirme boncukların çekilmemesine özen göstererek; supernatant, 1000 µl bir pipet yardımıyla dikkatlice çekildi ve atıldı. Boncuklar, supernatantta gözle görünen beyaz boncuk kalmayınca kadar zenginleştirme tamponu ile aşağıda açıklandığı gibi yıkandı:

Tüpe, 1 ml zenginleştirme tamponu eklendi. Tüp, MPC'den çıkarılıp ve güzelce vortekslendi. Tüp duvarındaki boncukların mıknatısla çökeltilmesi için tüp, MPC'ye geri yerleştirildi. MPC ters çevrildi ve boncuklar çökelene kadar bekletildi. zenginleştirme boncukların çekilmemesine özen göstererek; supernatant, 1000 µl bir pipet yardımıyla dikkatlice çekilip ve atıldı. Bu işlem, beyaz DNA boncuklar artık çekilmeyene kadar 6-10 kez tekrarlandı. İsteğe bağlı olarak, supernatant toplandı ve yıkamaların bittiğini takip etmek için döndürüldü.

#### **4.2.14.4. Zenginleştirilmiş DNA Boncuklarının Toplanması**

Zenginleştirilmiş boncukların olduğu tüp MPC'den çıkarıldı ve boncuk pelet 700 µl Melt Solüsyonda tekrar çözüldü. 5 saniye vortekslendi ve zenginleştirme boncuklar çökene kadar enrichment tüpü MPC'ye yerleştirildi. Zenginleştirilmiş DNA boncuklarını içeren supernatant, yeni bir 1,7 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne aktarıldı. zenginleştirme tüpüne bir kez daha 700 µl erime solüsyon eklendi. 5 saniye vortekslendi ve zenginleştirme boncuklar çökene kadar enrichment tüpü MPC'ye yerleştirildi. Zenginleştirilmiş DNA boncuklarını içeren supernatant, 1,7 ml'lik aynı tüpe aktarıldı. zenginleştirme tüpü çıkarıldı. 1,7 ml'lik tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant çıkarıp atıldı.

1 ml Tavlamak Tamponu eklendi ve 5 saniye vortekslendi. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant çıkarıp atıldı. Bu adımlar 2 kez tekrarlandı. 100 µl tavlama tamponu eklendi ve boncuklar yeniden çözülmeye kadar vortekslendi.

#### **4.2.15. DIZILEME PRIMERLERİNİN BAĞLANMASI**

15 µl Seq Primer A ve 15 µl Seq Primer B eklendi ve vortekslendi. 1,7 ml'lik tüp, ısıtıcı bir bloğa 65°C'de 5 dakika yerleştirildi ve derhal 2 dakika buzda soğutulur. Tüp döndürülüp, çevrilip ve döndürülüp ve supernatant çıkarıp atıldı. Bu adım 2 kez tekrarlandı. 1 ml tavlama tamponu boncuk pelete eklendi ve vortekslendi. Tüp boncukları çöktürmek için döndürülüp, çevrilip ve döndürüldü. Bir GSJunior dizileme koşusu 500,000 zenginleştirilmiş boncuk girdisi gerektirir. Zenginleştirilmiş boncuk miktarı, GSJunior boncuk sayıcı kullanılarak bölüm 4.2.16'de tarif edildiği üzere hesaplanır. Boncuklar +2 ila +8 °C'de saklandı ve bir gün sonra dizilindi.

#### **4.2.16. GSJUNIOR BONCUK SAYICI**

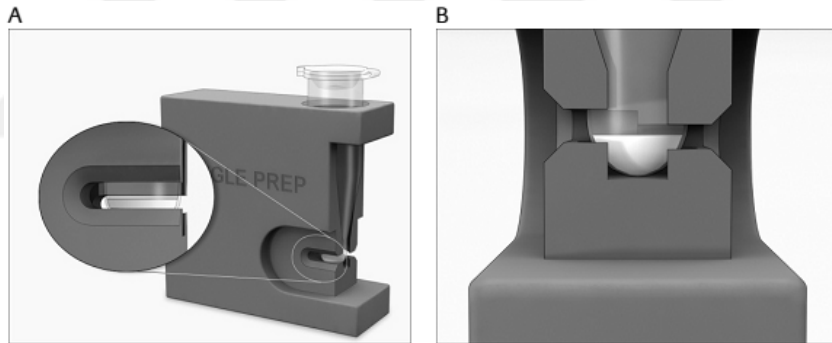
Bir GSJunior dizileme koşusu için tavsiye edilen boncuk girdisi sayısı 500,000 zenginleştirilmiş boncuktur. Zenginleştirilmiş boncuk miktarını hesaplamak için, GSJunior cihazının bir aksesuarı olan GSJunior boncuk sayıcı v2 kullanıldı. Bölüm 4.2.15. son adımdan 1,7 ml'lik tüp, GSJunior boncuk sayıcı v2 cihazına tüpün alt kısmı deliğin tabanına değecek şekilde koyuldu. Boncuk sayıcı, yan tarafta okunan "Single Prep" yazısı size bakacak şekilde göz hizasında tutuldu. Zenginleştirilmiş boncuk miktarını hesaplamak için cama bakılır. Boncuk peletin üst kısmı, cam dâhilinde olmalıdır.

Eğer boncuk peletin üst kısmı cam dâhilinde ve penceresinin alt köşesinin üstünde (500,000 boncuk) kalıyorsa (şekil 4.7 A), fazla boncuklar daha sonra kullanılmak üzere temiz bir 1,7 ml'lik mikrosantrifüj tüpüne alındı. Geri kalan 500,000 boncuk GSJunior cihazına yüklendi.

Eğer boncuk peletin üst kısmı boncuk sayıcı penceresinin alt köşesinin altında kalıyorsa (yani görünmüyorsa), hazırlık 500,000 boncuktan daha az boncuk içerir. Yine de, boncuklar değerlidir ve bu miktar da deney planı için yeterli olabilir.

Eğer boncuk peletin üst kısmı Boncuk Sayıcı penceresinin üst köşesinin üstündeyse, hazırlık başarısız olmuştur. Bu durumda boncuklar çıkarıldı ve emülsiyon süreci 3 kat daha az kütüphane örneğiyle tekrarlandı.

Pencerenin üst köşesi 2 milyon boncuk tanımlarken, alt köşesi 500,000 boncuk tanımlamaktadır. Boncuk Sayıcı'nın ön görünümü boncuk peletini görselleştirmek adına yardımcı olabilir. (şekil 4.7).



Şekil 4.7 GSJunior Boncuk sayıcı v2 yan (A) ve ön (B) görünümü (my454.com)

#### 4.2.17. DİZİLEME METODU

GSJunior Dizileme yöntemi 4 adımlık bir süreçtir:

- Cihazdaki flüidiklerin, ön yıkama Tamponu ile yıkanması. Bu aşama ilgili protokole uyarak ve gerekli kitler kullanılarak yapıldı(96).
- Boncukların hazırlanması ve Boncuk yükleme aparatına (BBD) yüklenmesi
- Cihazın çökelti ve tamponlarla başlatılması

- Dizileme sürecinin uygulanması

#### **4.2.17.1. BAŞLAMADAN ÖNCE**

Oda sıcaklığı +15 ila +25 °C arasında olmalıdır. Bütün 1,7 ml'lik tüpler silikonlanmalıdır. Çözelti ve enzim kutusundaki bileşenler eritildi. 2,0 ml'lik tüpler ve 50 ml falkon tüp çıkarıldı ve 2,0 ml'lik tüpler erimek üzere buza bırakıldı. 10 tüplük çözelti kasetinin olduğu kap oda sıcaklığında çeşme suyuyla dolduruldu. Kaset, suyun içine batırılmaz, dik tutulur ve direk güneş ışığından muhafaza edildi. 50 ml'lik tüp erimesi için kaba yerleştirildi. Kaset ve 50 ml'lik tüp periyodik bir şekilde 3 kez içerikleri karışsın diye alt-üst çevrildi. İçerik eridiğinde, çözeltilerin olduğu kaset 50 ml'lik tüp, kullanılabildiği kadar +2 ila +8 °C'ye aktarıldı. "Paketleme boncuklar" ve supleman CB'nin olduğu kutu buzdolabından alındı ve ihtiyaç olana kadar buzda saklandı.

#### **4.2.17.2. Ön Yıkama**

Cihazdaki flüidüklerin, ön yıkama tamponu ile yıkanması. Bu aşama ilgili protokole uyarak ve gerekli kitler kullanılarak yapıldı.

#### **4.2.17.3. PicoTiter plaka Cihazının Hazırlığı**

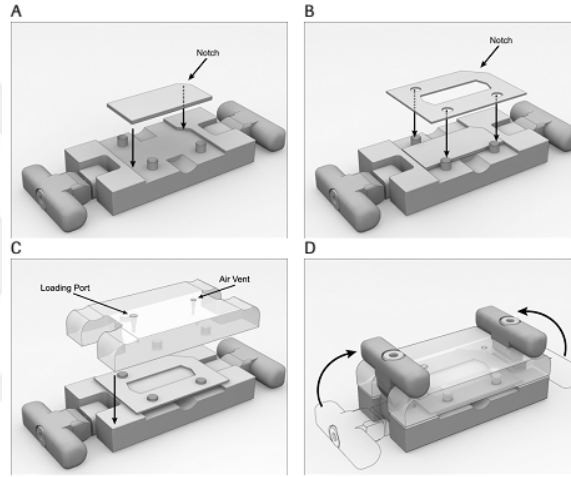
##### **4.2.17.3.1. Boncuk Tamponu 2 (BB2)' nin Hazırlığı**

6.6 ml supleman tamponu, CB şişesine eklendi. Şişe 10 kez alt üst çevrilerek içerik tamamen karıştırıldı. 50 ml'lik serolojik pipet yardımıyla 40 ml tamponu CB, 50 ml'lik temiz bir falkon tüpe aktarıldı ve buz içine yerleştirildi. "Apiraz" tüp, mikrosantrifüjde 9,300 RCF (10,000 RPM)'de 5 saniye döndürüldü.

##### **4.2.17.3.2. PicoTiter plaka Ve Boncuk Yükleme Cihazlarının Hazırlığı**

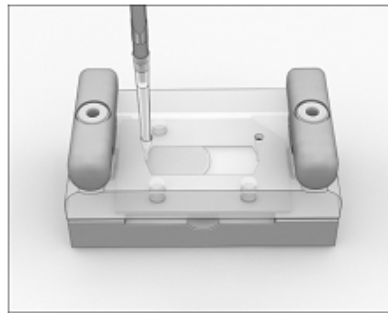
PTP plakası, GSJunior Titanium PicoTiter plaka Kitinden alındı. Cihazın yazılımına 6 haneli PTP plakası ID numarası girildi. Boncuk yükleme contası ve kartuş contası tabladan çıkarıldı. Nazikçe sallayarak 30 saniye yıkandı. Nanopure suyla iyice durulandı ve kurumaması için kâğıt havlu üzerine bırakıldı. Boncuk yükleme aparatına (BDD) yumuşak bir kıl fırça yardımıyla yıkanır. Nanopure suyla iyice durulanır ve kurumaması için kâğıt havlu üzerine bırakıldı. BDD, yıkanan conta ve PTP plakası ile beraber şekil 4.7'de açıklandığı

şekilde monte edildi. PTP plakası, yüzeyine dokunulmadan kenarlarından tutularak çıkartıldı. PTP plakası, girintili köşesi BDD'nin tabanı ile aynı hizaya gelecek şekilde BDD tabanına yerleştirildi (Şekil 4.8 A). Boncuk yükleme contasının girintili köşesi ve BDD tabanı şeklindeki gibi aynı hizaya getirildi. Yıkayıp kurutulmuş boncuk yükleme contası, PTP plakasının üst kısmına yerleştirilerek BDD tabanına sabitlendi (Şekil 4.8 B). BDD üst kısmı monte edilen BDD tabanı, PTP plakası ve conta üzerine dikkatlice yerleştirildi (Şekil 4.8 C). BDD tabanındaki pimler, BDD'nin üst kısmındaki deliklere denk gelecek şekilde hizalandı ve BDD'nin üst kısmı PTP plakasına düz bir şekilde oturtuldu. BDD'nin üst kısmından bastırıldı ve 2 mandal yukarı doğru çevrilerek montaj sıkıca sabitlendi (Şekil 4.8 D).



Şekil 4.8 PTP'nin BDD cihazının üzerine montajı (my454.com)

BDD'nin üst kısmında 2 delik vardır; geniş olan yükleme girişi, küçük olan hava giriştir. 350 µl BB2 PTP plakasına yükleme girişinden pipetlendi (Şekil 4.9) ve BDD bir santrifüjde 1,620 RCF'de 5 dakika döndürüldü. BDD, santrifüjden çıkarıldı ve masaya bırakıldı.



Şekil 4.9 PTP'nin yüklenmesi (my454.com)

#### 4.2.17.4. Boncukların Hazırlığı

GSJunior Sistemi, 4 çeşit mikropartikül (boncuk) içerir. Her boncuk türü özel bir hazırlık sürecine tabi tutulur. Aşağıdaki boncuklar, çizelge 4.18’de gösterilen sırada tabaklar şeklinde PTP plakasına yüklendi.

Çizelge 4.18 Boncuk tabakaları

Boncuk tabakası	Boncuk türü
1. tabaka	Enzim boncukları, ön tabaka
2. tabaka	DNA ve paketleme boncukları
3. tabaka	Enzim boncukları, sonraki tabaka
4. tabaka	PPiase boncukları

#### 4.2.17.5. Kontrol boncuklar XLTF eklenerek DNA boncuklarının hazırlanması

GSJunior cihazındaki bir dizileme süreci için doğru miktarda zenginleştirilmiş DNA boncuğu temin edildi. Kontrol boncuklar XLTF, boncukları toplamak için bir mikrosantrifüjde 9,300 RCF ( 10,000 RPM)’de 5 saniye döndürüldü. Boncukları yeniden çözmek için 5 kez aşağı yukarı pipetlendi. Zenginleştirilmiş DNA boncuklarına, 6 µl kontrol boncuk XLTF eklendi. Örnek DNA boncuklarının hacmi 100 µl’den fazlaysa, DNA boncukları, boncukları çözmek için bir mikrosantrifüjde 9,300 RCF ( 10,000 RPM)’de 10 saniye döndürüldü. Tüpte 100 µl kalacak şekilde yeterli miktarda supernatant çıkarıldı ve atıldı. 500 µl BB2, DNA boncuklarına eklendi, yavaşça vortekslendi ve laboratuvar döndürücüsünde, oda sıcaklığında 20 dakika inkübe edildi. 20 dakikalık inkübe işlemi boyunca, bir taraftan Paketleme Boncuklar, Enzim Boncuklar ve PPiase boncuklar hazırlandı.

#### 4.2.17.6. Paketleme Boncukların Hazırlanması

1 ml BB2, paketleme boncuk tüpüne eklendi ve yüksek hızda vortekslendi. Paketleme boncuklar 3 kez yıkanır ve her bir yıkama için 9,300 RCF ( 10,000 RPM)’de 5 dakika santrifüj yapıldı. Boncuklar, kümeleşmeleri çözmek üzere vortekslenerek, homojen bir

karışım elde edilene kadar düzgün bir şekilde yıkandı. Döndürme işleminden sonra, supernatant, boncuk peletlerine zarar vermeden dikkatli bir şekilde çıkarıldı ve atıldı. 3. yıkımdan sonra, 200µl BB2 eklendi, boncuklar yüksek hızda vortekslenerek karıştırıldı ve tüp buzda muhafaza edildi.

#### 4.2.17.7. Enzim Boncuklarının ve PPIase Boncuklarının hazırlanması

Her bir tüpe 1 ml BB2 eklendi ve orta hızda vortekslenerek karıştırıldı. Enzim Boncukları ve PPIase boncukları MPC kullanılarak 30 saniye bekledi ve çöktüldü. MPC birkaç kez alt üst edildi ve tekrar 30 saniye bekledi. Supernatantlar dikkatlice çıkarıldı ve atıldı ve tüpler MPC'den çıkarıldı. İki tür boncuk de 1 ml BB2 ile 3 kez yıkandı, vortekslendi ve boncuklar, yukarıda anlatıldığı şekilde MPC kullanılarak toplandı. 3. yıkımdan sonra, Enzim boncuklara 400 µl BB2; PPIase boncuklara de 410 µl BB2 eklendi ve boncukları karıştırmak için orta hızda vortekslendi. Tüpler buzda muhafaza edildi. Çizelge 4.19 takip edilerek, Enzim ön tabaka ve Enzim sonraki tabaka şeklinde etiketlenen 2 yeni tüp hazırlandı. Orta hızda vortekslendi ve tüpler buza yerleştirildi.

Çizelge 4.19 ön ve sonraki tabakalar için enzim boncukların hazırlanışı

Belirteç	BB2	Enzim Boncuk	Toplam hacim
Enzim,ön tabaka	300 µl	110 µl	410 µl
Enzim,sonraki tabaka	180 µl	230 µl	410 µl

#### 4.2.17.8. DNA Boncukları ve Paketleme Boncukları Karışımının Hazırlanması

DNA boncuk tüpü, laboratuvar döndürücüsünden alındı. DNA boncukları, çöktülmek üzere bir santrifüjde 9,300 RCF ( 10,000 RPM)'de 10 saniye döndürüldü. Tüpte 50 µl kalacak şekilde yeterli miktarda BB2 çıkarıldı. Polimeraz ve Polimeraz Kofaktör tüpleri, bir santrifüjde 9,300 RCF ( 10,000 RPM)'de 5 saniye döndürüldü. Aşağıdaki çözeltiler DNA boncuklarına eklendi:

40 µl Polimeraz, 20 µl Polimeraz Kofaktör, 65 µl BB2

Karışım, düşük hızda 5 saniye vortekslendi ve laboratuvar döndürücüsünde oda sıcaklığında 10 dakika inkübe edildi. İnkübasyon tamamlandığında, paketleme boncukların



olduğu tp yüksek hızda vortekslendi. 175 µl paketleme boncukları DNA karışımına eklendi, düşük hızda vortekslendi ve laboratuvar döndürücüsünde oda sıcaklığında 5 dakika inkübe edildi.

#### **4.2.17.9. Boncuk Tabakalarının Yüklenmesi Ve Cihazın Başlatılması**

Boncuklar, kurumu yapılan BDD'nin yükleme girişinden enjekte edilerek ve santrifüj yardımıyla okeltip boncukların PicoTiter plaka'in kuyucuklarının dibine yerleşmesi sağlanarak PTP plakasına yüklendi. Bu işlem her 4 tabaka için tekrarlandı;

Enzim boncuk n tabaka, DNA Ve paketleme boncukları, enzim boncuk sonraki tabaka, Ppiase boncuklar

Boncuk tabakalarının santrifüjlenmesi sırasında, tamponu CB hazırlandı, GSJunior cihazı ozeltilelerle başlatıldı ve cihaz temizlendi.

BDD'ye hava enjekte edilmemesine dikkat edildi. BDD'yi doldurmak için pürüzsüz, tek bir akıtma yapıldı. BDD taşmayacak şekilde tamamen dolduruldu. Fazla boncuk karışımı atıldı.

#### **4.2.17.10. İlk Boncuk Tabakasının Yüklenmesi: Enzim Boncuk Pre-Layer**

BB2'ile yüklenen BDD mümkün olduğunca fazlalık olan BB2, BDD'nin yükleme girişinden pipet yardımıyla dikkatlice çekildi. Enzim Boncuk n tabaka (1. Tabaka) tüpü, homojen bir karışım elde etmek amacıyla düşük hızda 5 saniye vortekslendi. Hiç vakit kaybetmeden boncuk karışımının 350 µl'si BDD'nin üst kısmındaki yükleme girişinden PTP plakasına yüklendi. Boncukların PTP plakasına eşit dağılımı, düzgün bir şekilde tek bir hareketle yapılır. BDD, 1,620 RCF (4,013 RPM)'de 5 dakika santrifüjlendi.

#### **4.2.17.11. Tampon Cb'nin Hazırlığı**

DTT tüpü yüksek hızda 5 saniye vortekslendi. Tampon CB şişesine 1 ml DTT eklendi. Substrat TW tüpü, karıştırmak için 10 kez alt üst yapıldı. Serolojik pipet kullanılarak 44 ml Substrat TW, Tampon CB'ye aktarıldı. İyice karıştırmak için şişe 10 kez alt üst edildi.

#### **4.2.17.12. İkinci Boncuk Tabakasının Yüklenmesi: DNA Ve paketleme Boncukları**

BDD, santrifüjden çıkarıldı. Bir pipet yardımıyla, fazlalık olan supernatant, BDD'nin üst kısmındaki yükleme girişinden yavaşça çıkarıldı. DNA ve paketleme boncukları karışımının olduğu tüp, döndürücüden çıkarıldı. Tüp, bir mikrosantrifüjde 9,300 RCF (10,000 RPM)'de 5 saniye döndürülür. Karıştırmak için 5 kez aşağı ve yukarı pipetlendi. Hiç vakit kaybetmeden bu karışımın 350 µl'si PTP plakasına yüklendi. BDD, 1,620 RCF (4,013 RPM)'de 10 dakika santrifüjlendi.

#### **4.2.17.13. GSJunior Cihazının Başlatılması**

Cihazın kapağı kaldırıldı ve siper manifold yukarı doğru kaldırıldı. Ön-yıkama kaseti ve şişesi çıkarıldı. Sağdaki atık şişesi boşaltıldı. Çözelti kaseti, karıştırmak için 20 kez alt üst çevrildi. Tüp kapakları dikkatlice çıkarıldı. Çözelti kaseti cihaza yerleştirildi. Tampon CB sol kısma yerleştirildi. Siper manifold, siperlerin çözelti tüplerinde ve tampon CB şişesinde battığı kontrol edilerek yavaşça indirildi. Cihazın kapağı kapatıldı. Devam butonu tıklanarak cihaz başlatıldı. Başlama işlemi tamamlanınca, ID'lerin ve barkodların girileceği ekran açıldı.

#### **4.2.17.14. Üçüncü Boncuk Tabakasının Yüklenmesi: Enzim Boncuk sonraki tabaka**

Çözelti kasetini cihaza yükledikten sonra eldivenler değiştirildi. BDD, santrifüjden çıkarıldı. Bir pipet yardımıyla, 2. tabakadaki bütün supernatant, BDD'nin üst kısmındaki yükleme girişinden yavaşça çekildi. Homojen bir karışım elde etmek için enzim boncukları sonraki tabaka orta hızda 5 saniye vortekslenildi. Hiç vakit kaybetmeden boncuk karışımının 350 µl'si BDD'nin üst kısmındaki yükleme girişinden PTP plakasına yüklendi. BDD, 1,620 RCF (4,013 RPM)'de 10 dakika santrifüjlendi.

#### **4.2.17.15. GSJunior PTP Kartuşunun Hazırlığı**

Cihazın başlatılması işlemi tamamlandıktan sonra, GSJunior Application Sequencer ekranında "Başlama tamamlanmıştır" yazısı okunacaktır. Cihazın kapağı açıldı ve kamera kapağı iki taraftaki mandallardan basılarak aşağı doğru çekilerek açıldı. Bir önceki

dizileme sürecinin PTP plakası kartuştan iki aşamada çıkarıldı; ilk önce PTP çerçevesi yaylı mandalina basılarak çerçeve kartuştan kaldırıldı, daha sonra kullanılan PTP plakası kaldırıldı. Kartuş contası temiz bir pipet ucuyla dikkatlice çekildi ve çıkarıldı. Bir temizleme mendili %50 etanol ile ıslatıldı ve kartuş yüzeyi boncuk ve çökelti tortusundan arındırılmak üzere silindi. Kartuşun havayla teması sağlanarak tamamen kurutulur. Daha önce yıkanan kartuş contası, kartuştaki yerine yerleştirildi. Bir temizleme mendili %10 Tween-20 solüsyonu ile nemlendirildi ve PTP kartuş yüzeyi silindi. Yeni bir ıslak temizleme mendili kullanılarak kamera ön camı silindi. Kamera ön camının havayla teması sağlanarak tamamen kurutuldu.

#### **4.2.17.16. Dördüncü Boncuk Tabakasının Yüklenmesi: Ppiase Boncuklar**

BDD, santrifüjden çıkarıldı. Bir pipet yardımıyla, 3. tabakadaki bütün supernatant, BDD'nin üst kısmındaki yükleme girişinden yavaşça çekildi. Homojen bir karışım elde etmek için Ppiase boncuklar orta hızda 5 saniye vortekslendi. Hiç vakit kaybetmeden boncuk karışımının 350 µl'si BDD'nin üst kısmındaki yükleme girişinden PTP plakasına yüklendi. Yükleme yapılan BDD'deki PTP plakası, 1,620 RCF (4,013 RPM)'de 5 dakika santrifüjlendi.

#### **4.2.18. DIZILEME SÜRECİ**

##### **4.2.18.1. Süreç İçin Parametre Ve Yazıların Ayarlanması**

“ID ve barkod numaralarını girin” ekranı, cihazın başlatılması tamamlandıktan sonra otomatik olarak açıldı. Bu süreçte kullanılacak PicoTiter plaka plakasının 6 haneli ID numarası girildi. Bu süreçle ilgili herhangi başka materyallerin de ürün ID ve barkod numaraları girildi. Bütün bilgiler girildikten sonra “next” butonu tıklandı. Bu işlemden sonra koşu adı ve koşu grubunun girilmesini isteyen 4. ekran açıldı. Bu koşuya özgü bir isim girildi ve koşu grup listesinden koşu grubu seçildi ve “next” butonu tıklandı. Bu işlemden sonra döngü sayısının seçileceği 5. ekran açıldı.

Bu koşu için uygun olan nükleotid döngü sayısı seçildi ve “next” butonu tıklandı. GSJunior Titanium kimyasalları kullanılarak, 200 döngü yaklaşık 500 baz üretir ( yaklaşık 9 saat 20 dakika). Bu işlemden sonra koşunun işlem türünün seçileceği 6. ekran açıldı. Bu koşu için uygun olan veri işlem şeması seçildi ve “next” butonu tıklandı. Bu koşu için “Full

processing for Amplikon libraries” (Amplikon kütüphanesi için tam işlem) şeması seçildi. Bu işlemden sonra veri yedeklemesini talep edebileceğiniz 7. ekran açılır. Bu kutucuk zaten varsayılan olarak seçilmiştir. Bu işlemden sonra koşu yorumlarının girilebileceği 8. ekran açıldı. Koşu ile ilgili yorumlar girildi ve “next” butonu tıklandı. Bu işlemden sonra koşu parametrelerinin gözden geçirilebileceği 9. Ve sonuncu ekran açıldı. Bu ekranda “proceed” butonu tıklandı ve bu işlemle GSJunior Sequencer uygulama ekranına geri dönüldü.

#### **4.2.18.2.PTP Cihazının GSJunior’a Yüklenmesi**

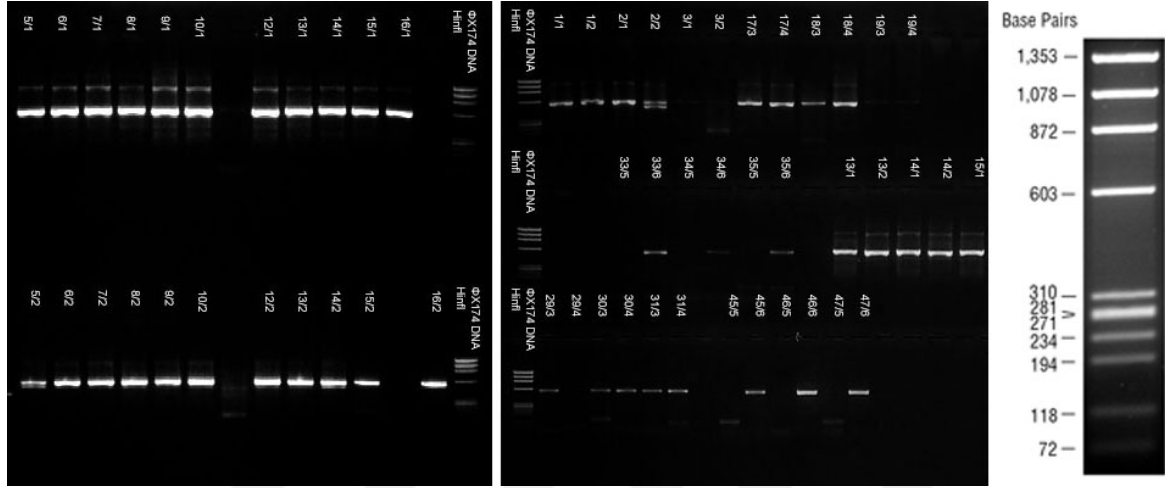
BDD, santrifüjden çıkarıldı. Bir pipet yardımıyla santrifüjlenen 4. Boncuk tabakasındaki bütün supernatant yavaşça çekildi ve BDD’nin üst kısmındaki yükleme girişinden atıldı. PTP plakası aşağıdaki şekilde BDD’den çıkarıldı:

BDD’nin mandalları aşağı indirilerek açıldı. BDD’nin üst kısmı dikkatlice çıkarıldı. Boncuk yükleme contası yavaşça kaldırıldı ve çıkarıldı. PTP plakası sadece kenarlarından tutulmasına dikkat edilerek çıkarıldı. PTP plakası, kuyucuklar aşağı bakacak şekilde alt üst çevrilerek kartuş contasının üstündeki çerçeveye yavaşça yerleştirildi. Mandalla düzgün bir şekilde sabitlendiğine emin olunarak PTP çerçevesi kapatıldı. PTP plakasının arka kısmı bir temizleme mendiliyle dikkatlice silindi. Kamera kapağı kapatıldı ve cihaz kapağı indirildi. GSJunior Sequencer uygulama ekranında “proceed” butonu tıklandı ve dizileme koşusu başlatıldı. Uygulama, koşunun gelişimini cihaz durumundan ve kamera tarafından yakalanan veri resimlerinden gözlemleyebilir. Koşu esnasında, küçük resimler uygulama ekranında görünecektir. Dizileme koşusu tamamlandığında, GSJunior uygulama ekranında “Run complete” mesajı ve “OK” butonu çıkacaktır.

## 5. ARAŞTIRMA BULGULARI

### 5.1. AMPLİKONLARIN AGARUZ JELDE YÜRÜTÜLMESİ

RNA izolasyonu ardından yapılan ters transkripsiyon ve ardından PZR aşamalarından çoğaltılmış amplikonların doğrulanması için PZR ürünleri agaroz jelde yürütülmüştür. Jel görüntülerinden örnekler şekilde (ŞEKİL 5.1) gösterilmektedir.



Şekil 5.1 Çoğaltılmış amplikonların doğrulanması için PZR ürünlerinin 1X agaroz jel elektroforezi görüntüsü ve QX174 DNA Marker

### 5.2. SEKANS DİZİLERİN OKUMA SAYISI

Örnek ve amplikon bazında yapılan okumalar GS Run Browser aracılığıyla incelendi ve okuma sayıları ve eksik veya hatalı okumalar kontrol edildi. Roche 454 sistemle birlikte bulunan Amplicon Variant Analyzer (AVA) yazılımı aracılığıyla elde edilen amplikon bazında okuma sayıları çizelge 5.1’de gösterilmiştir.

### 5.3. SEKANS VERİLERİNİN İNCELENMESİ

GSJunior sistem tarafından 3 koşuda sekansı yapılan amplikonların verileri, ham veri olarak Roche 454 sistemiyle birlikte bulunan Amplicon Variant Analyzer (AVA) yazılımı aracılığıyla işlenerek, öncelikle okuma uzunlukları ve koşu kalitesi değerlendirildi (şekil 5.2). Daha sonra füzyon PZR sırasında amplikonlara bağlanan MID ve üniversal bölgeler yazılım tarafından makaslandı ve kısa veya eksik okumalar filtrelenerek elendi.

Çizelge 5.1 amplikon bazında okuma sayıları

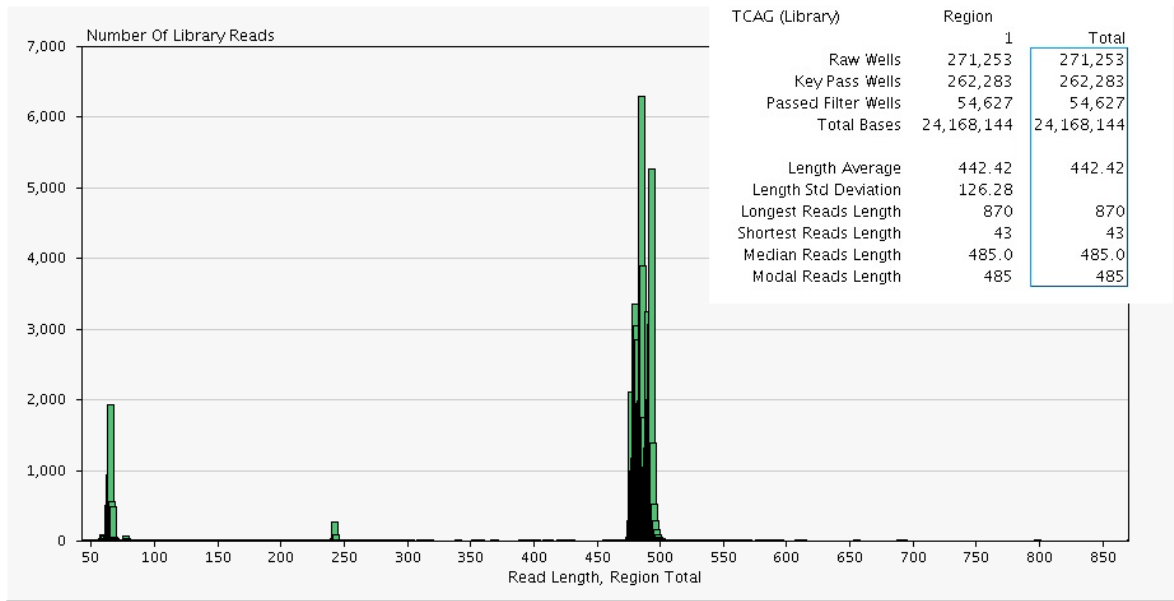
	Amplikon 1	Amplikon 2	Amplikon 3	Amplikon 4	Amplikon 5	Amplikon 6
>MG0	142	82	111	14	48	92
>MG24	164	230	94	167	40	160
>MG48	144	119	92	112	70	191
>MC48	24	-	23	23	33	-
>MY0	36	16	22	17	21	-
>RC0	27	27	16	19	9	-
>HA0	26	8	15	20	30	-
>BG0	104	79	115	200	74	59
>BG24	136	50	153	269	59	45
>BG48	53	62	83	90	76	11
>MB0	182	71	77	296	84	-
>MB24	99	53	96	325	82	-
>EK0	134	129	122	267	23	-
>EK24	77	54	86	242	67	-
>EK48	77	50	143	179	68	-
>KK0	26	-	20	39	19	-

Çizelge 5.1 (devam)

>FO0	32	115	168	84	28	42
>FO24	16	34	85	59	-	26
>FO48	48	47	30	56	4	43
>FO96	86	124	112	149	29	29
>FOC0	82	19	33	28	38	-
>FOC24	10	4	33	21	48	-
>FOC48	13	22	36	44	35	-
>FOC96	16	13	17	30	35	-
>MA0	181	228	163	129	74	122
>MA24	116	206	91	112	99	125
>MA48	206	190	32	-	85	116
>MA96	150	239	125	99	97	99
>YS0	21	23	12	10	4	-
>YS24	17	8	19	13	32	-
>YS48	26	18	12	9	13	-
>YS96	29	20	11	7	21	-

Not: Bu çalışma kapsamında elde edilen verilerin analizinin bilgisayar programlarıyla yapılabilmesi için gereken yazılımların kullanımı mümkün olmamıştır. Dolayısıyla bu analizler bu tez kapsamına alınmamıştır. Ancak bu kapsamlı analizlerin yapılabilmesi için çalışmalar devam etmektedir ve yürütülmekte olan bu çalışmaların sonucunda çıkan

sonuçlar bilimsel yayımlar aracılığıyla bilim dünyasına sunulması planlanmıştır. Dolayısıyla bu tez çalışmasında, analizler için alternatif bir yol haritası takip edilmektedir.



şekil 5.2 kütüphane okuma uzunluklarını ve okuma kalitesini gösteren grafik ve değerleri

### 5.3.1. OKUMALARDAN “KONSENSUS” DIZI OLUşTURULMASI

Elde edilen DNA dizileri hasta ve amplicon bazında fasta formatına aktarıldı. “BioEdit” yazılımı aracılığıyla okumalar alt alta dizildi (“align” edildi) ve “konsensus” dizisi oluşturuldu. Oluşturulan “konsensus” dizisi, dizinin her noktasındaki %50’sinden fazla olan nükleotidi temsil etmektedir.

### 5.3.2. ÖRNEK BAşINA TÜM GENOM OLUşTURULMASI

Her örnekten elde edilen farklı ampliconların dizisi MEGA version 6 (Tamura, Stecher, Peterson, Filipski, and Kumar 2013) kullanılarak align edildi ve örnek bazında tüm genom dizisi oluşturuldu.

### 5.3.3. TÜM GENOMLARIN ALT ALTA DIZILMESİ

Tüm genomu elde edilen örnekler fasta dosyasında MEGA version 6 aracılığıyla GenBank: HQ005370.1(97) HDV RNA tüm genomunu referans alınarak alt alta dizildi (align edildi). Alt alta getirilen dizilerde nokta mutasyonlar, delesyonlar, insersiyonlar ve inversiyonlar gösterildi. Ayrıca daha önce HDV genomlarının coğrafik dağılımıyla ilişkili olduğu



gösterilmiş ve HDAG üzerinde bulunan 202. Pozisyondaki (98) nükleotitin yüzdesi işaretlendi. Ayrıca ribozim, S-HDAG ve L-HDAG genlerin konumu ve otokatalitik kırılma bölgeleri ve hiper-değişken bölgeler belirlendi. İlgili dizi haritası EK1’de gösterilmiştir.

#### **5.3.4. NÜKSETMİŞ VE YANIT VERMEMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KIYASLANMASI**

Nüksetmiş ve yanıt vermemiş hastalar, yanıt vermiş hastalarla kıyaslandığında, ortaya çıkan nükleotid farklılıkları şekil 5.3’de gösterilmiştir. Referans dizi esas alınarak 269. nükleotitte yanıt vermiş örneklerde yoğunlukla Guanin görünürken yanıt vermemiş ve nüksetmiş örneklerde Timin görülmektedir. Benzer bir şekilde 270. nükleotitte yanıt vermiş örneklerde yoğunlukla Adenin görünürken yanıt vermemiş ve nüksetmiş örneklerde Timin görülmektedir. Benzer farklılıklar 569., 928. ve 929. nükleotidlerde görülmektedir (Şekil 5.3).

	Örnek	Hafta	hiper-değişken bölge			L-HDAg		
			267	269	270	569	928	929
					S-HDAg			
RESPONDER (Yanıt Veren)	0		100%	100%	100% A	98%	100%	100% G
	>MG	24	100%	100%	100% A	100%	100%	99% G
		48	100% A	100% T	100%	99%	100%	100% G
	>MC	48	100%	100%	100% A	100%	XXXX	XXXX
	>MY	0	100%	100%	100% A	100%	100%	100%
	>RC	0	100%	100%	100% A	100% T	100%	100%
	>HA	0	100%	93%	100% A	100%	100% A	100%
RELAPSER (Nüksetmiş)	0		100% A	100% T	100%	100% T	97% A	100% C
	>BG	24	100% A	100% T	100%	100% T	98% A	100% C
		48	100% A	100% T	100%	94% T	100% A	100% C
	>MB	0	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
	>MB	24	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
		48	100% A	100% T	100%	100% T	98% A	98% C
	>EK	24	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
	48	100% A	100% T	100%	100% T	96% A	96% C	
	>KK	0	100%	100%	100% A	80%	XXXX	XXXX
NON-RESPONDER (Yanıt Vermeyen)	0		100% A	100% T	100%	100% T	69% A	100% C
	>FO	24	XXXX	XXXX	XXXX	100% T	100% A	100% C
		48	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
		96	100% A	100% T	100%	100% T	98% A	100% C
		0	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
	>FOC	24	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
		48	100% A	97% T	100%	100% T	100% A	100% C
		96	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
		0	100% A	94% T	100%	100% T	100% A	100% C
	>MA	24	100% A	100% T	100%	96% T	99% A	98% C
		48	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
		96	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C
		0	100% A	100% T	100%	84% T	100% A	100% C
>YS	24	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C	
	48	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C	
	96	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% C	
HQ005370.1			G	G	T	A	G	T

Şekil 5.3 267, 269, 270, 569, 928 ve 929 numaralı nükleotidlerin nüksetmiş ve yanıt vermemiş hastaların, yanıt vermiş hastalarla karşılaştırılması

### 5.3.5. NÜKSETMİŞ HASTALARIN, YANIT VERMİŞ HASTALARLA KIYASLANMASI

Nüksetmiş hastaların, yanıt vermiş hastalarla kıyaslandığında, belli bölgelerde ortaya çıkmış nükleotid farklılıkları şekil 5.4'de gösterilmiştir. Referans dizi esas alınarak 5.3.5. bölümünde gösterilen nükleotidlere ilaveten 227. nükleotidde yanıt veren hastalarda çoğunlukla Sitozin görülürken nüksetmiş hastalarda çoğunlukla Timin görülmektedir.

Benzer bir şekilde 750. nükleotidde yanıt veren hastalarda çoğunlukla Guanin görülürken nüksetmiş hastalarda çoğunlukla adenin görülmektedir (Şekil 5.4).

	Örnek Hafta	hiper-değişgen bölge				L-HDAg S-HDAg			
		227	267	269	270	569	750	928	929
RESPONDER (Yanıt Veren)	0	100%	100%	100%	100% A	98%	100%	100%	100% G
	>MG 24	100%	100%	100%	100% A	100%	100%	100%	99% G
	48	100% T	100% A	100% T	100%	99%	100%	100%	100% G
	>MC 48	100%	100%	100%	100% A	100%	XXXX	XXXX	XXXX
	>MY 0	100%	100%	100%	100% A	100%	100%	100%	100%
	>RC 0	100%	100%	100%	100% A	100% T	100%	100%	100%
	>HA 0	100%	100%	93%	100% A	100%	100%	100% A	100%
RELAPSER (Nüksetmiş)	0	99% T	100% A	100% T	100%	100% T	99% A	97% A	100% C
	>BG 24	98% T	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	98% A	100% C
	48	100% T	100% A	100% T	100%	94% T	100%	100% A	100% C
	>MB 0	100% T	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% A	100% C
	>MB 24	99% T	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% A	100% C
	0	96% T	100% A	100% T	100%	100% T	92% A	98% A	98% C
	>EK 24	98% T	100% A	100% T	100%	100% T	100% A	100% A	100% C
48	98% T	100% A	100% T	100%	100% T	96% A	96% A	96% C	
>KK 0	100%	100%	100%	100% A	80%	XXXX	XXXX	XXXX	
HQ005370.1		C	G	G	T	A	G	G	T

Şekil 5.4 227, 267, 269,270, 569, 750, 928 ve 929 numaralı nükleotidlerin nüksetmiş hastaların, yanıt vermiş hastalarla karşılaştırılması

### 5.3.6. DİĞER PATTERNLER

Genom dizileri incelendiğinde 425. nükleotidden sonraki 6 nükleotid uzunluğunda bir bölgede örnekler arasında farklılık gösteren patternler görülmektedir (şekil 5.5). Yanıt veren hasta serum örneklerinin çoğunda (5/7) referans dizideki patern (CAACTG) aynen görülmekte, 2 örnekte ise bir nükleotitin değişmesiyle CAGCTG paterni görülmektedir. Ancak yanıt vermemiş örneklerin yarısında (4/8) ve nüksetmiş hastaların hemen hemen hepsinde bu paternin TCAGCA değiştiği görülmektedir.

### 5.3.7. NÜKSETMİŞ HASTALARIN YANIT VERMEYEN HASTALARLA KARŞILAŞTIRILMASI

Nüksetmiş hastalardan elde edilen tüm genom dizileri ve yanıt vermeyen hastalardan elde edilen tüm genom dizileri birbirleriyle karşılaştırıldığında (Ek 1) diziler arasında anlamlı bir farklılık bulunmamıştır.

	Örnek Hafta	hiper-değişgen bölge						Otokatalitik kırılma bölgesi			
		hiper-değişgen bölge			hiper-değişgen bölge			430	431	432	
		424	425	426	427	428	429				
RESPONDER (Yanıt Veren)	>MG	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		24	X	X	X	X	X	X	X	X	X
		48	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	>MC	48	X	X	X	X	X	X	X	X	X
	>MY	0	X	X	X	G	X	X	X	X	X
	>RC	0	X	X	X	G	X	X	X	X	X
	>HA	0	X	X	X	X	X	X	X	X	X
RELAPSER (Nüksetmiş)	>BG	0	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		24	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		48	X	DEL C	C	X	G	C	DEL G	X	X
	>MB	0	X	T	C	X	A	C	A	X	X
	>MB	24	X	T	C	X	G	C	X	X	A
		0	X	T	C	X	G	C	X	X	A
		24	X	T	C	X	G	C	X	X	A
	48	X	T	C	X	G	C	X	X	A	
>KK	0	X	X	T	X	X	X	X	X	X	
NON-RESPONDER (Yanıt Vermeyen)	>FO	0	X	X	X	G	X	X	X	X	X
		24	X	X	X	G	X	X	X	X	X
		48	X	X	X	G	X	X	X	X	X
		96	X	X	X	G	X	X	X	X	X
	>FOC	0	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		24	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		48	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		96	X	T	C	X	G	C	A	X	X
	>MA	0	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		24	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		48	X	T	C	X	G	C	A	X	X
		96	X	T	C	X	G	C	A	X	X
	>YS	0	X	X	X	G	X	X	X	X	X
	24	X	X	X	G	X	X	X	X	X	
	48	X	X	X	G	X	X	X	X	X	
	96	X	X	X	G	X	X	X	X	X	
HQ005370.1		T	C	A	A	C	T	G	G	G	

Şekil 5.5 425. nükleotid ile 430. nükleotid arasında farklı örnekler arasında çeşitli patternler görülmektedir.

## 6. TARTIŞMA VE SONUÇ

Hepatit delta virüsü 1,7 kb uzunluğunda halkasal RNA genomu içermektedir. HDV RNA replikasyonu otokatalitik kırılma ve ligasyona bağlı bir dönen halka mekanizmasıyla gerçekleşmektedir (99). Dolayısıyla sabit uzunlukta bir HDV RNA'nın oluşması için replike edilen aracı RNA'nın işlenmesi gerekmektedir. Otokatalitik kırılmaya maruz kalan en kısa RNA parçasının 117 bazdan oluştuğu gösterilmiştir(34). Bu bölge ek1'de 430-542 nolu bazlar arasında gösterilmiştir. Bu bölgenin büyük bir kısmı HDV ribozimi içermektedir.

Araştırmalar 34 nükleotid uzunluğunda olan ve bu çalışmada 430-460 arası nükleotidleri içeren bölgenin, RNA'nın oto-kırılma özelliğini kazanmasında büyük bir role sahip olduğunu göstermiştir(34). Yapılan çalışmalarda bu bölgenin başlangıcında bulunan G zengin dizideki mutasyonların otokatalitik aktiviteyi hemen hemen yok ettiğini göstermiştir(100). Şekil 5.5'te farklı hasta gruplarının farklı tarihlerdeki serum örneklerinden elde edilen dizilerde, HDV genomunun 425-430 bölgesinde tespit edilen farklı patternler gösterilmiştir. Bu bölge otokatalitik kırılma bölgesinin hemen başlangıcında bulunmaktadır. Dolayısıyla tespit edilen bu farklı paternlerin, otokatalitik aktivite üzerinde farklı etkileri olabilir. Bu yüzden bu bölgedeki farklı paternler hastaların interferon tedavisine verdiği yanıt üzerinde doğrudan bir etkiye sahip olabilir. Bu hipotezin doğrulanması için daha kapsamlı çalışmaların yapılması önem arz etmektedir.

HDV RNA genomunun üzerinde bulunan hiper-değişken bölgeler farklı coğrafik bölgelerdeki yaygın HDV tiplerinin tanımlanmasında anahtar rol oynamaktadır(101). Şekil 5.3'te belirlenmiş olan 267, 269 ve 270 nolu nükleotidler HDV RNA genomunun hiper-değişken bölge(101) olarak tanımlanan bu dizileri üzerinde bulunmaktadır. 267, 269 ve 270 nolu nükleotidler referans dizide sırasıyla G, G ve T bazları olarak görülürken, tedaviye yanıt vermiş hastalarda sırasıyla G, G ve A bazları çoğunlukla görülmektedir. Aynı pozisyonlarda tedaviye yanıt vermemiş veya nüksetmiş hastalarda sırasıyla A, T ve T çoğunlukla gözlemlenmiştir. Dolayısıyla bu varyasyonlar, tedaviye yanıt ile ilişkili olmasının yanında, enfekte olunan hepatit delta virüsünün coğrafik menşei ile de ilişkili olabilir. Ayrıca "MG" olarak tanımlanmış tedaviye yanıt vermiş hastanın tedavi sonrasındaki 0., 24., 48. Haftalarındaki serum örneklerinin incelendiğinde (Şekil 5.3)

tedavinin ileri safhalarında (48. Hafta) bu nükleotidlerin değişime uğrayarak G, G, A'dan sırasıyla A, T ve T nükleotidlerine değiştiği, ve tedaviye yanıt vermeyen veya nüks etmiş hastalara benzer bir tablo sergilediği görülmüştür. Bu durum tedavinin başlangıç haftalarında, bu pozisyonlarda G, G ve A nükleotidleri içeren virüs varyantlarının tedavi süresince seçici bir baskı altında kalarak ortadan kalktığı ve bu seçici baskıya daha dirençli olan diğer varyantların (bu pozisyonlarda A,T ve T nükleotitlerine sahip viral genomların) viral havuzda dominant hale geçtiği olarak yorumlanabilir. Dolayısıyla genom üzerindeki bu 3 noktanın interferon tedavisine yanıt ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. Diğer yanıt vermiş hastalarda (MC, MY, RC ve HA) ilerleyen haftalarda viral yükün PZR ile çoğaltılamayacak kadar azalması sebebiyle benzer bir değerlendirme yapılamamaktadır.

569, 928 ve 929 nolu nükleotidlerde de ise tedaviye yanıt vermeyen ve nüks eden hastaların tüm serum örneklerinde aynı nükleotidler (sırasıyla T, A ve C nükleotidleri) gözlenirken, tedaviye yanıt vermiş hastalarda kullanılan referans genom ile hemen hemen aynı nükleotidlere sahip viral genom dizileri elde edilmiştir (şekil 5.3). Dolayısıyla bu pozisyondaki nükleotidler doğrudan veya dolaylı olarak tedaviye verilen yanıtı etkileme yeteneğine sahip olabileceği öngörülmektedir. 569 nolu pozisyondaki nükleotid değişimi, HDV genomu üzerinde daha önce herhangi bir yapısal veya fonsiyonel görevi olduğu gösterilen bölgelerde(99-101) yer almamaktadır. Fakat 928 ve 929 nolu nükleotidler, aynı zamanda L-HDAg ve S-HDAg'yi kodlayan gen bölgesi üzerinde bulunmaktadır. Dolayısıyla bu noktadaki varyantlar, hem HDV viral genomun kendi üzerine katlanması sonrasında oluşturduğu 3 boyutlu yapının yanı sıra genomdan kodlanan proteinlerin fonksiyonlarıyla ilişkili olabilir. Örneğin, kodlanan delta antijeninde meydana gelen aminoasit değişiklikleri antijen-antikor affinitesini etkileyebilir. Benzer bir durum, şekil 5.4'de gösterilen ve sadece tedaviye cevap veren ve nüks eden hastalarda farklılık gösteren 750 nolu nükleotid için de geçerlidir. Şekil 5.4'de gösterilen 227 nolu nükleotid de ve sadece tedaviye cevap veren ve nüks eden hastalarda farklılık göstermektedir, fakat bu nokta L-HDAg ve S-HDAg'yi kodlayan bölge üzerinde değil, hiper-değişken bölge üzerindedir.

Büyük delta antijen geni üzerinde bulunan 202 nolu nükleotid, HDAg'nin çok korunmuş C-terminal ucunda bulunmaktadır. C-terminal bölgesi nükleotid dizisi açısından korunmuş

bir bölge olmasına rağmen, 202 nolu pozisyonda 2 farklı nükleotid gözlelenebilmektedir. Bu pozisyonda T bazı bulunduğu zaman TCC kodonu Serin amino asidini kodlar ancak bu baz G olduğunda, GCC kodonu Alanin amino asidini kodlamaktadır. Yapılan bir çalışmada, bu noktada meydana gelen değişikliklerin HDV genomunun coğrafik orijinini belirlemede önemli olduğu ve bu noktanın epidemiyolojik çalışmalarda HDV suşlarının coğrafik dağılımlarını belirlemede kullanılabileceği belirtilmiştir(98). Dolayısıyla 202 noktasındaki nükleotid dizisi HDV'nin farklı coğrafyalarda bulunan farklı subtipleriyle ilgili bilgi verebilmektedir. Viral enfeksiyonların tedavisinde genotip farklılıklarının tedaviye verilen yanıt üzerinde etkili olabildiği göz önüne alındığında, bu çalışmadaki örneklerde tespit edilen 202 noktasındaki varyasyonlar da incelenmiştir. Bu çalışmada antisens bir referans dizisi esas alındığından, 202 nolu nükleotid ve ilgili kodon ters komplement olarak gösterilmiştir (şekil 6.1). Çalışılan 32 örnekten, sadece 7 adedi GCC kodonunu içermektedir ve diğer örneklerde TCC olarak tespit edilmiştir. Ortaya çıkan tabloya bakıldığında, tedaviye verilen yanıtın bu kodonla ilişkili olduğunu gösteren bir seyir veya benzerlik tespit edilememiştir.

Bu çalışmada, HDV ile enfekte hastalarda interferon tedavisine verilen yanıt farklılıklarının viral genomdaki değişikliklerle ilişkili olup olmadığı araştırılmış ve 227, 267, 269, 270, 569, 750, 928, 929 ve 425-430 bölgesinde tedaviye yanıt veren, nükseden ve yanıt vermeyen hasta grupları arasında farklılıklar tespit edilmiştir. Bu konuda yapılacak daha fazla hasta sayısı ile daha geniş çaplı çalışmalar, HDV viral varyantlarıyla tedaviye yanıt arasındaki ilişkinin aydınlatılmasında önemli rol oynayacaktır. HDV'ye ait hücre kültür sistemlerinin geliştirilmesiyle tespit edilen viral varyantların öneminin *in vitro* olarak gösterilmesi de HDV tedavisinde geliştirilebilecek yeni antiviral ajanların ilaç duyarlılık testlerinin hızlı, etkili ve güvenilir bir şekilde yapılmasına imkan sağlayacaktır. Ayrıca çok büyük çapta veri sağlayan yeni nesil DNA dizi analizi teknolojilerinin bu sistemlerle beraber kullanılması bu konuda yapılan testlerdeki duyarlılığı oldukça artıracaktır.

	Örnek Hafta	L-HDAg		L-HDAg		L-HDAg
		S-HDAg	202 SİTE			
		767	768	769	770	771
RESPONDER (Yanıt Veren)	0	X	X	X	100%	X
	>MG 24	X	X	X	100%	X
	48	X	X	X	100%	X
	>MC 48	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX
	>MY 0	X	X	X	100%	X
	>RC 0	X	X	X	100% C	X
>HA 0	X	X	X	100%	X	
RELAPSER (Nüksetmiş)	0	X	X	X	100%	X
	>BG 24	X	X	X	100%	X
	48	X	X	X	100%	X
	>MB 0	X	X	X	100% C	X
	>MB 24	X	X	X	98%	X
	0	X	X	X	60% C	X
	>EK 24	X	X	X	100%	X
	48	X	X	X	70%	X
>KK 0	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	XXXXX	
NON-RESPONDER (Yanıt Vermeyen)	0	X	X	X	100%	X
	>FO 24	X	X	X	100%	X
	48	X	X	X	100%	X
	96	X	X	X	100%	X
	0	X	X	X	100%	X
	>FOC 24	X	X	X	100%	X
	48	X	X	X	100%	X
	96	X	X	X	100%	X
	0	X	X	X	90% C	X
	>MA 24	X	X	X	100% C	X
	48	X	X	X	100% C	X
	96	X	X	X	100% C	X
	0	X	X	X	100%	X
	>YS 24	X	X	X	100%	X
48	X	X	X	100%	X	
96	X	X	X	100%	X	
HQ005370.1		C	G	G	A	T

Şekil 6.1 202 nükleotid nokta polimorfizmi



## 7. KAYNAKLAR

1 Pournik O, Alavian SM, Ghalichi L, Hajibeigi B, Razavi AR, Eslami S. Lower Intrafamilial Transmission Rate of Hepatitis B in Patients With Hepatitis D Coinfection: A Data-Mining Approach. *Hepatitis monthly*. 2013 05/23

08/08/received

02/11/revised

02/18/accepted;**13**(5):e7652.

2 Rizzetto M, Hoyer B, Canese MG, Shih JW, Purcell RH, Gerin JL. delta Agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta-infected chimpanzees. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1980 Oct;**77**(10):6124-8.

3 Rizzetto M, Hadziyannis S, Hansson BG, Toukan A, and Gust I. Hepatitis delta virus infection in the world, epidemiological patterns and clinical expression. *Gastroenterol Int*. 1992;**5**:18–32.

4 Radjef N, Gordien E, Ivaniushina V, et al. Molecular Phylogenetic Analyses Indicate a Wide and Ancient Radiation of African Hepatitis Delta Virus, Suggesting a Deltavirus Genus of at Least Seven Major Clades. *Journal of Virology*. 2004;**78**(5):2537-44.

5 Farci P. Delta hepatitis: an update. *J Hepatol*. 2003;**39 Suppl 1**:S212-9.

6 Rizzetto M, Verme G, Recchia S, et al. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of the delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Intern Med*. 1983 Apr;**98**(4):437-41.

7 Fattovich G, Giustina G, Christensen E, et al. Influence of hepatitis delta virus infection on morbidity and mortality in compensated cirrhosis type B. The European Concerted Action on Viral Hepatitis (Eurohep). *Gut*. 2000 Mar;**46**(3):420-6.

8 Lau DT-Y, Kleiner DE, Park Y, di Bisceglie AM, Hoofnagle JH. Resolution of chronic delta hepatitis after 12 years of interferon alfa therapy. *Gastroenterology*. 1999;**117**(5):1229-33.

9 Farci P, Roskams T, Chessa L, et al. Long-term benefit of interferon alpha therapy of chronic hepatitis D: regression of advanced hepatic fibrosis. *Gastroenterology*. 2004 Jun;**126**(7):1740-9.

10 Deny P. Hepatitis delta virus genetic variability: from genotypes I, II, III to eight major clades? *Curr Top Microbiol Immunol*. 2006;**307**:151-71.

- 11 Krushkal J, Li WH. Substitution rates in hepatitis delta virus. *J Mol Evol.* 1995 Dec;**41**(6):721-6.
- 12 Casey JL, Brown TL, Colan EJ, Wignall FS, Gerin JL. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1993 Oct 1;**90**(19):9016-20.
- 13 Le Gal F, Gault E, Ripault MP, et al. Eighth major clade for hepatitis delta virus. *Emerg Infect Dis.* 2006 Sep;**12**(9):1447-50.
- 14 Ryu WS, Netter HJ, Bayer M, Taylor J. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol.* 1993 Jun;**67**(6):3281-7.
- 15 Ganem D, Varmus HE. The molecular biology of the hepatitis B viruses. *Annu Rev Biochem.* 1987;**56**:651-93.
- 16 Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, Gerlich WH. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol.* 1986 Jun;**58**(3):945-50.
- 17 Sureau C, Guerra B, Lanford RE. Role of the large hepatitis B virus envelope protein in infectivity of the hepatitis delta virion. *J Virol.* 1993 Jan;**67**(1):366-72.
- 18 Engelke M, Mills K, Seitz S, et al. Characterization of a hepatitis B and hepatitis delta virus receptor binding site. *Hepatology.* 2006 Apr;**43**(4):750-60.
- 19 Gudima S, Chang J, Moraleda G, Azvolinsky A, Taylor J. Parameters of Human Hepatitis Delta Virus Genome Replication: the Quantity, Quality, and Intracellular Distribution of Viral Proteins and RNA. *Journal of Virology.* 2002;**76**(8):3709-19.
- 20 Sureau C. The role of the HBV envelope proteins in the HDV replication cycle. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2006;**307**:113-31.
- 21 Hwang SB, Lai MM. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J Virol.* 1993 Dec;**67**(12):7659-62.
- 22 Chen PJ, Chang FL, Wang CJ, Lin CJ, Sung SY, Chen DS. Functional study of hepatitis delta virus large antigen in packaging and replication inhibition: role of the amino-terminal leucine zipper. *J Virol.* 1992 May;**66**(5):2853-9.
- 23 Wang HW, Chen PJ, Lee CZ, Wu HL, Chen DS. Packaging of hepatitis delta virus RNA via the RNA-binding domain of hepatitis delta antigens: different roles for the small and large delta antigens. *J Virol.* 1994 Oct;**68**(10):6363-71.
- 24 Glebe D, Urban S. Viral and cellular determinants involved in hepadnaviral entry. *World journal of gastroenterology : WJG.* 2007 Jan 7;**13**(1):22-38.
- 25 Casey JL, Gerin JL. Hepatitis D virus RNA editing: specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *J Virol.* 1995 Dec;**69**(12):7593-600.

- 26 Hsieh SY, Chao M, Coates L, Taylor J. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *J Virol.* 1990 Jul;**64**(7):3192-8.
- 27 Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature.* 1986 Oct 9-15;**323**(6088):508-14.
- 28 Abraham A, Pelchat M. Formation of an RNA polymerase II preinitiation complex on an RNA promoter derived from the hepatitis delta virus RNA genome. *Nucleic acids research.* 2008 Sep;**36**(16):5201-11.
- 29 Beard MR, MacNaughton TB, Gowans EJ. Identification and characterization of a hepatitis delta virus RNA transcriptional promoter. *J Virol.* 1996 Aug;**70**(8):4986-95.
- 30 Filipovska J, Konarska MM. Specific HDV RNA-templated transcription by pol II in vitro. *RNA.* 2000 Jan;**6**(1):41-54.
- 31 Wadkins TS, Perrotta AT, Ferre-D'Amare AR, Doudna JA, Been MD. A nested double pseudoknot is required for self-cleavage activity of both the genomic and antigenomic hepatitis delta virus ribozymes. *RNA.* 1999 Jun;**5**(6):720-7.
- 32 Kuo MY, Sharmeen L, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol.* 1988 Dec;**62**(12):4439-44.
- 33 Sharmeen L, Kuo MY, Dinter-Gottlieb G, Taylor J. Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol.* 1988 Aug;**62**(8):2674-9.
- 34 Wu HN, Lai MM. Reversible cleavage and ligation of hepatitis delta virus RNA. *Science.* 1989 Feb 3;**243**(4891):652-4.
- 35 Wu JC, Chen CL, Lee SD, Sheen IJ, Ting LP. Expression and localization of the small and large delta antigens during the replication cycle of hepatitis D virus. *Hepatology.* 1992 Nov;**16**(5):1120-7.
- 36 Sharmeen L, Kuo MY, Taylor J. Self-ligating RNA sequences on the antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol.* 1989 Mar;**63**(3):1428-30.
- 37 Beeharry Y, Pelchat M. Subversion of RNA Processing Pathways by the Hepatitis delta Virus. 2011.
- 38 Reid CE, Lazinski DW. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2000 Jan 4;**97**(1):424-9.
- 39 Salehi-Ashtiani K, Luptak A, Litovchick A, Szostak JW. A genomewide search for ribozymes reveals an HDV-like sequence in the human CPEB3 gene. *Science.* 2006 Sep 22;**313**(5794):1788-92.
- 40 Webb CH, Luptak A. HDV-like self-cleaving ribozymes. *RNA biology.* 2011 Sep-Oct;**8**(5):719-27.

- 41 Webb CH, Riccitelli NJ, Ruminski DJ, Luptak A. Widespread occurrence of self-cleaving ribozymes. *Science*. 2009 Nov 13;**326**(5955):953.
- 42 Macnaughton TB, Gowans EJ, Reinboth B, Jilbert AR, Burrell CJ. Stable expression of hepatitis delta virus antigen in a eukaryotic cell line. *J Gen Virol*. 1990 Jun;**71** ( Pt 6):1339-45.
- 43 Cole SM, Gowans EJ, Macnaughton TB, Hall PD, Burrell CJ. Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen. *Hepatology*. 1991 May;**13**(5):845-51.
- 44 Hwang SB, Park KJ. Cell cycle arrest mediated by hepatitis delta antigen. *FEBS letters*. 1999 Apr 16;**449**(1):41-4.
- 45 Lee LW, Chang TY, Lo HW, Lo SJ. Hepatitis D antigens cause growth retardation and brood-size reduction in *C. elegans*. *Front Biosci (Elite Ed)*. 2011;**3**:380-90.
- 46 Chang J, Gudima SO, Tarn C, Nie X, Taylor JM. Development of a novel system to study hepatitis delta virus genome replication. *J Virol*. 2005 Jul;**79**(13):8182-8.
- 47 Guilhot S, Huang SN, Xia YP, La Monica N, Lai MM, Chisari FV. Expression of the hepatitis delta virus large and small antigens in transgenic mice. *J Virol*. 1994 Feb;**68**(2):1052-8.
- 48 Wang D, Pearlberg J, Liu YT, Ganem D. Deleterious effects of hepatitis delta virus replication on host cell proliferation. *J Virol*. 2001 Apr;**75**(8):3600-4.
- 49 Polo JM, Jeng KS, Lim B, et al. Transgenic mice support replication of hepatitis delta virus RNA in multiple tissues, particularly in skeletal muscle. *J Virol*. 1995 Aug;**69**(8):4880-7.
- 50 Chang J, Gudima SO, Taylor JM. Evolution of hepatitis delta virus RNA genome following long-term replication in cell culture. *J Virol*. 2005 Nov;**79**(21):13310-6.
- 51 Ferré-D'Amaré AR, Zhou K, Doudna JA. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature*. 1998;**395**(6702):567-74.
- 52 Jayan GC, Casey JL. Effects of conserved RNA secondary structures on hepatitis delta virus genotype I RNA editing, replication, and virus production. *J Virol*. 2005 Sep;**79**(17):11187-93.
- 53 Chen R, Linnstaedt S, Casey J. RNA Editing and its Control in Hepatitis Delta Virus Replication. *Viruses*. 2010;**2**(1):131.
- 54 Xia YP, Lai MM. Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the trans-activating and trans-dominant inhibitory activities of the delta antigen. *J Virol*. 1992 Nov;**66**(11):6641-8.
- 55 Poisson F, Roingard P, Baillou A, et al. Characterization of RNA-binding domains of hepatitis delta antigen. *J Gen Virol*. 1993 Nov;**74** ( Pt 11):2473-8.

- 56 Chou HC, Hsieh TY, Sheu GT, Lai MM. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J Virol.* 1998 May;**72**(5):3684-90.
- 57 Wang T-C, Chao M. Molecular cloning and expression of the hepatitis delta virus genotype IIb genome. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 2003;**303**(1):357-63.
- 58 Glenn JS, Watson JA, Havel CM, White JM. Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science.* 1992 May 29;**256**(5061):1331-3.
- 59 Lee HJ, Lin CC, Chiou SH, Chang GG. Characterization of the multiple forms of duck lens delta-crystallin with endogenous argininosuccinate lyase activity. *Arch Biochem Biophys.* 1994 Oct;**314**(1):31-8.
- 60 Lee CH, Chang SC, Wu CH, Chang MF. A novel chromosome region maintenance 1-independent nuclear export signal of the large form of hepatitis delta antigen that is required for the viral assembly. *J Biol Chem.* 2001 Mar 16;**276**(11):8142-8.
- 61 Tseng C-H, Lai MM. Hepatitis Delta Virus RNA Replication. *Viruses.* 2009;**1**(3):818.
- 62 Lin JH, Chang MF, Baker SC, Govindarajan S, Lai MM. Characterization of hepatitis delta antigen: specific binding to hepatitis delta virus RNA. *J Virol.* 1990 Sep;**64**(9):4051-8.
- 63 Lee BS, Wu HN, Huang TH. The catalytic domain of human hepatitis delta virus RNA. A proton nuclear magnetic resonance study. *FEBS letters.* 1993 Jun 21;**324**(3):296-300.
- 64 Chao M, Hsieh SY, Taylor J. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J Virol.* 1990 Oct;**64**(10):5066-9.
- 65 Lee CZ, Chen PJ, Chen DS. Large hepatitis delta antigen in packaging and replication inhibition: role of the carboxyl-terminal 19 amino acids and amino-terminal sequences. *J Virol.* 1995 Sep;**69**(9):5332-6.
- 66 Chang MF, Chen CJ, Chang SC. Mutational analysis of delta antigen: effect on assembly and replication of hepatitis delta virus. *J Virol.* 1994 Feb;**68**(2):646-53.
- 67 Xia YP, Yeh CT, Ou JH, Lai MM. Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *J Virol.* 1992 Feb;**66**(2):914-21.
- 68 Rizzetto M, Ponzetto A, Forzani I. Hepatitis delta virus as a global health problem. *Vaccine.* 1990 Mar;**8 Suppl**:S10-4; discussion S21-3.
- 69 Nguyen VT, McLaws ML, Dore GJ. Highly endemic hepatitis B infection in rural Vietnam. *J Gastroenterol Hepatol.* 2007 Dec;**22**(12):2093-100.

- 70 Mulyanto, Depamede SN, Surayah K, et al. A nationwide molecular epidemiological study on hepatitis B virus in Indonesia: identification of two novel subgenotypes, B8 and C7. *Arch Virol.* 2009;**154**(7):1047-59.
- 71 Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Di Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology.* 1997 Jul 21;**234**(1):160-7.
- 72 Imazeki F, Omata M, Ohto M. Heterogeneity and evolution rates of delta virus RNA sequences. *J Virol.* 1990 Nov;**64**(11):5594-9.
- 73 Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, et al. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol.* 2001 Nov;**82**(Pt 11):2709-18.
- 74 Parana R, Kay A, Molinet F, et al. HDV genotypes in the Western Brazilian Amazon region: A preliminary report. *Am J Trop Med Hyg.* 2006 Sep;**75**(3):475-9.
- 75 Wu JC, Chiang TY, Sheen IJ. Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gen Virol.* 1998 May;**79** ( Pt 5):1105-13.
- 76 Sakugawa H, Nakasone H, Nakayoshi T, et al. Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *J Med Virol.* 1999 Aug;**58**(4):366-72.
- 77 Wedemeyer H. Hepatitis delta virus. *Lancet.* 2013.
- 78 Navascues CA, Rodriguez M, Sotorrio NG, et al. Epidemiology of hepatitis D virus infection: changes in the last 14 years. *Am J Gastroenterol.* 1995 Nov;**90**(11):1981-4.
- 79 Huo TI, Wu JC, Lin RY, Sheng WY, Chang FY, Lee SD. Decreasing hepatitis D virus infection in Taiwan: an analysis of contributory factors. *J Gastroenterol Hepatol.* 1997 Nov;**12**(11):747-51.
- 80 Degertekin H, Yalcin K, Yakut M, Yurdaydin C. Seropositivity for delta hepatitis in patients with chronic hepatitis B and liver cirrhosis in Turkey: a meta-analysis. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2008 Apr;**28**(4):494-8.
- 81 Domingo E, Martinez-Salas E, Sobrino F, et al. The quasispecies (extremely heterogeneous) nature of viral RNA genome populations: biological relevance--a review. *Gene.* 1985;**40**(1):1-8.
- 82 Wang SY, Wu JC, Chiang TY, Huang YH, Su CW, Sheen IJ. Positive selection of hepatitis delta antigen in chronic hepatitis D patients. *J Virol.* 2007 May;**81**(9):4438-44.
- 83 Wu JC, Chiang TY, Shiue WK, et al. Recombination of hepatitis D virus RNA sequences and its implications. *Mol Biol Evol.* 1999 Nov;**16**(11):1622-32.

- 84 Hsieh TH, Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Natural course and treatment of hepatitis D virus infection. *J Formos Med Assoc.* 2006 Nov;**105**(11):869-81.
- 85 Pascarella S, Negro F. Hepatitis D virus: an update. *Liver international : official journal of the International Association for the Study of the Liver.* 2011 Jan;**31**(1):7-21.
- 86 Lau DT, Doo E, Park Y, et al. Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology.* 1999 Aug;**30**(2):546-9.
- 87 Niro GA, Ciancio A, Gaeta GB, et al. Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology.* 2006 Sep;**44**(3):713-20.
- 88 Chang J, Taylor JM. Susceptibility of Human Hepatitis Delta Virus RNAs to Small Interfering RNA Action. *Journal of Virology.* 2003;**77**(17):9728-31.
- 89 Chang J, Provost P, Taylor JM. Resistance of Human Hepatitis Delta Virus RNAs to Dicer Activity. *Journal of Virology.* 2003;**77**(22):11910-7.
- 90 de Bruin W, Leenders W, Kos T, Yap SH. In vitro binding properties of the hepatitis delta antigens to the hepatitis B virus envelope proteins: potential significance for the formation of delta particles. *Virus Res.* 1994 Jan;**31**(1):27-37.
- 91 Petrosino JF, Highlander S, Luna RA, Gibbs RA, Versalovic J. Metagenomic pyrosequencing and microbial identification. *Clin Chem.* 2009 May;**55**(5):856-66.
- 92 Ronaghi M. Improved performance of pyrosequencing using single-stranded DNA-binding protein. *Anal Biochem.* 2000 Nov 15;**286**(2):282-8.
- 93 Mashayekhi F, Ronaghi M. Analysis of read length limiting factors in Pyrosequencing chemistry. *Anal Biochem.* 2007 Apr 15;**363**(2):275-87.
- 94 Eriksson N, Pachter L, Mitsuya Y, et al. Viral population estimation using pyrosequencing. *PLoS computational biology.* 2008 Apr;**4**(4):e1000074.
- 95 Jabara CB, Jones CD, Roach J, Anderson JA, Swanstrom R. Accurate sampling and deep sequencing of the HIV-1 protease gene using a Primer ID. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 2011 Dec 13;**108**(50):20166-71.
- 96 Roche. *Sequencing Method Manual; GS Junior Titanium Series.* 2010.
- 97 Celik I, Karatayli E, Cevik E, et al. Complete genome sequences and phylogenetic analysis of hepatitis delta viruses isolated from nine Turkish patients. *Archives of virology.* 2011 Dec;**156**(12):2215-20.
- 98 Le Gal F, Badur S, Hawajri NA, et al. Current hepatitis delta virus type 1 (HDV1) infections in central and eastern Turkey indicate a wide genetic diversity that is probably linked to different HDV1 origins. *Arch Virol.* 2012 Apr;**157**(4):647-59.

99 Chen PJ, Kalpana G, Goldberg J, et al. Structure and replication of the genome of the hepatitis delta virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 1986 Nov;**83**(22):8774-8.

100 Macnaughton TB, Wang YJ, Lai MM. Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. J Virol. 1993 Apr;**67**(4):2228-34.

101 Lee CM, Changchien CS, Chung JC, Liaw YF. Characterization of a new genotype II hepatitis delta virus from Taiwan. J Med Virol. 1996 Jun;**49**(2):145-54.





## 8. EKLER

### 8.1. EK1:TÜM GENOM ALT ALTA DİZİLMESİ VE NOKTA MUTASYONLARI

Tüm genomu elde edilen örnekler fasta dosyasında MEGA version 6 aracılığıyla GenBank: HQ005370.1(97) HDV RNA tüm genomunu referans alınarak align edilip, align edilen dizilerin nokta mutasyonlar, delesyon, insersyon ve inversiyonlar, ayrıca sHDAg üzerinde 202 bölgesindeki (98) nükleotidin yüzdesi işaretlenmiştir. Ayrıca Ribozim, S-HDAg ve L-HDAg genlerin konumu ve Otokatalitik kırılma bölgeleri ve hiper-değişgen bölge belirlenmiştir. İlgili işaretleme rehberi şekil 8.1’de gösterilmiştir.



Şekil 8.1 Tüm genom dizilerinin işaretleme rehberi













































Ornek Hafta	Hiper-doküman bölge			Hiper-doküman bölge			1880
	1875	1876	1877	1878	1879	1880	
HÜMS5701	T	G	C	C	G	G	G
>MG 24	X	X	X	X	X	X	INS 2
>MC 48	C	A	X	X	X	X	INS A
>MW 0	C	A	X	X	X	X	INS 2
>NC 0	C	T	X	X	X	X	INS 2
>HA 0	C	A	X	X	X	X	INS 2
>G 24	C	A	X	X	X	X	INS A
>B 48	C	A	X	X	X	X	INS 2
>MB 24	X	A	X	X	X	X	INS 2
>MB 48	X	A	X	X	X	X	INS 2
>EK 24	X	T	X	X	X	X	INS 2
>EK 48	X	A	X	X	X	X	INS A
>MK 0	C	A	X	X	X	X	INS 2
>FO 24	X	X	X	X	X	X	INS 2
>FO 48	G	X	X	X	X	X	INS A
>FO 96	G	X	X	X	X	X	INS A
>FOC 24	X	A	X	X	X	X	INS A
>FOC 48	X	A	X	X	X	X	INS A
>FOC 96	X	A	X	X	X	X	INS A
>MA 24	INV/GT	A	X	X	X	X	INS A
>MA 48	C	A	X	X	X	X	INS A
>MA 96	INV/GT	A	X	X	X	X	INS A
>YS 24	G	T	X	X	X	X	INS A
>YS 48	G	C	X	X	X	X	INS 2
>YS 96	G	C	X	X	X	X	INS 2
HÜMS5701	T	G	C	C	G	G	G

## 9. ÖZGEÇMİŞ

**Adı Soyadı: Camran NASSIRI**

**Doğum Yeri: İRAN - Ray**

**Doğum Tarihi: 16.09.1980**

**Medeni Hali: Evli**

**Yabancı Dili: İngilizce, Farsça**

### **Eğitim Durumu**

**Lise: Doktor Hashtroodi lisesi, Urmiye, İran**

**Lisans: Mikrobiyoloji Bölümü, Fen Fakültesi, Azad Üniversitesi, Zencan, İran**

### **Yayınlar**

#### **Uluslararası Kongrelerde Sunulan Bildiriler:**

- **Kabacam, G., Yakut, M., Seven, G., Karatayli, S. C., Nassiri, C., Bozkaya, H., ... & Yurdaydin, C. (2011, October). DELTA HEPATITIS MAY REQUIRE PROLONGED TREATMENT WITH INTERFERON. In Hepatology (Vol. 54, pp. 1039A-1039A). COMMERCE PLACE, 350 MAIN ST, MALDEN 02148, MA USA: WILEY-BLACKWELL.**

OCTOBER 2011

VOLUME 54, NUMBER 4 (SUPPL) - OCTOBER 2011

# Hepatology

OFFICIAL JOURNAL OF THE AMERICAN ASSOCIATION FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES

Hepatology

Official Journal of the American Association for the Study of Liver Diseases

VOLUME 54, NUMBER 4 (SUPPL) PAGES 1A-1514A

WILEY-BLACKWELL



The Liver Meeting®  
THE 62ND ANNUAL MEETING OF THE AMERICAN ASSOCIATION  
FOR THE STUDY OF LIVER DISEASES  
**2011**  
**NOVEMBER 4 - 8**  
San Francisco, CA • Moscone West





fibrosis ( $\geq 1$  point decrease in Ishak score) at Year 5, including 16/18 (88.9%) patients with cirrhosis at baseline who had histologic regression (Ishak  $< 5$ ), while 28/72 (38.9%) showed no change in fibrosis. TDF was well tolerated over the 5 year period;  $< 2\%$  of Asian patients discontinued TDF for an adverse event (AE), and Grade 2 - 4 AEs were comparable in Asians compared to the overall study population. Through Year 5,  $< 1.2\%$  of Asian patients experienced a confirmed increase of  $\geq 0.5$  mg/dL in SCr, decrease in serum PO4  $< 2.0$  mg/dL, or decrease in CrCL  $< 50$  mL/min. There were no patients with resistance detected to TDF through Year 5. Conclusions. In a subset of Asian patients, TDF remains safe and effective over a 5 year treatment period. Most patients (90%) showed overall histologic improvement; additionally, 89% of Asian patients with cirrhosis at entry have regression of histologic cirrhosis at 5 years. These data are consistent with those of the overall study population, and also support the link between long term HBV suppression with TDF and regression of fibrosis in the majority of treated patients.

## Disclosures:

Edward J. Gane - Advisory Committees or Review Panels: Roche, Pharmasset, Novartis; Management Position: Gilead

Patrick Marcellin - Consulting: Roche, Schering-Plough, Gilead, BMS, Vertex, Novartis, Tibotec, MSD, Boehringer, Abbott, Pfizer; Grant/Research Support: Roche, Schering-Plough, Gilead, Echosens; Speaking and Teaching: Roche, Schering-Plough, Gilead, BMS, Vertex, Novartis, Pharmasset, Tibotec, MSD, Abbott, Pfizer

William Sievert - Speaking and Teaching: Bristol-Myers Squibb, Merck

Huy N. Trinh - Advisory Committees or Review Panels: BMS; Grant/Research Support: BMS, Gilead, Roche; Speaking and Teaching: BMS, Gilead, Vertex; Stock Shareholder: Gilead

Mitchell L. Shiffman - Advisory Committees or Review Panels: Merck, Gilead, Globeimmune, Pfizer, Zymogenetics, Conatus, Abbott, Vertex, Bristol-Myers-Squibb, Bayer, Boehringer Ingelheim; Consulting: Roche/Genentech, Romark, Exalenz; Grant/Research Support: Roche/Genentech, Anadys, Gilead, Globeimmune, Zymogenetics, Conatus, Bristol-Myers-Squibb, Boehringer Ingelheim, Mochida; Speaking and Teaching: Roche/Genentech, Merck, Vertex, Gilead, Bristol-Myers-Squibb, Bayer

Chris N. Barnes - Employment: Gilead Sciences

Jeffrey D. Bornstein - Employment: Ocera Therapeutics, Inc.

John F. Flaherty - Employment: Gilead Sciences Inc.; Stock Shareholder: Gilead Sciences Inc.

E. Jenny Heathcote - Consulting: Axcan Pharma, Gilead Sciences, Hoffman-LaRoche, Merck, Tibotec (Johnson & Johnson); Grant/Research Support: Axcan Pharma, Boehringer Ingelheim, Bristol-Myers Squibb, Gilead Sciences, Glaxo-SmithKline, Hoffman-LaRoche, Intercept Pharma, Merck, Tibotec (Johnson & Johnson), Vertex; Speaking and Teaching: Axcan Pharma, Gilead Sciences, Hoffman-LaRoche, Merck, Tibotec (Johnson & Johnson)

The following people have nothing to disclose: Mary Kay Washington

#### 1430 DELTA HEPATITIS MAY REQUIRE PROLONGED TREATMENT WITH INTERFERON

Gokhan Kabacam<sup>1</sup>, Mustafa Yakut<sup>1</sup>, Gülseren Seven<sup>1</sup>, Senem C. Karatayli<sup>2</sup>, Camran Nassiri<sup>2</sup>, Hakan Bozkaya<sup>1</sup>, A.Mithat Bozdayi<sup>2</sup>, Ramazan Idilman<sup>1</sup>, Cihan Yurdaydin<sup>1,2</sup>; <sup>1</sup>Ankara University, Department of Gastroenterology, Ankara, Turkey; <sup>2</sup>Hepatology Institute, Ankara University, Ankara, Turkey

Introduction and aim: Interferon's are the mainstay of treatment in delta hepatitis. Aim of this study is to evaluate the effect of elongation of treatment duration on sustained virological response. Material and methods: Interferon based treatment of 83 cases of Delta Hepatitis[59(71.0%) male, 24(29.0%) female, mean age( $\pm$ SD)=47,7( $\pm$ 10,2)] were categorised as standart( $\leq 18$ mo, n=47), or long term( $> 18$ mo, n=34). Two cases were excluded because one is still on-treatment and the other was lost to follow-up. Mean duration of known HBV and HDV infection were 135 $\pm$ 67, and 98 $\pm$ 52mo. At commencement of treatment, 63(78%) of the cases had chronic hepati-

tis(CH) and 18(22%) had cirrhosis(C). ALT normalisation for at least 6 months post-treatment and undetectable HDV RNA were taken as combined sustained response criteria(CSR), and predictive factors were analysed. HDV RNA measurements were performed by in house qualitative or quantitative RT PCR. Results: Mean duration of treatment, and number of treatment episodes were 13,3 $\pm$ 2,8mo(6-18) and 1,2 $\pm$ 0,5(1-3), respectively, in the standart arm, and 45,1 $\pm$ 24,4mo(24-120) and 3,1 $\pm$ 1,6(1-7), respectively, in the prolonged treatment(p $< 0,000$ ). Prolonged treatment was given more to CH patients than to cirrhotics(OR=4,8, p=0,01). Among baseline characteristics platelet and HDV-RNA levels were different between standart, and prolonged treatment[157 $\pm$ 49 vs 184 $\pm$ 57, p=0,03 and 4.18 $\pm$ 3.28 vs 6.10 $\pm$ 2.51, p=0.04, respectively]. CSR was better in prolonged treatment arm, when the relapsed-retreated patients were taken as responders, [OR: 4.47(CI: 1.5 - 12.7), p=0.005]. Among the factors studied, only baseline GGT, and treatment duration affected the treatment response in univariate analysis (r=-0.312, p=0.006; r=0.322, p=0.005 respectively). In the multivariate analysis only treatment duration more than 18mo was significant[OR=5.18(CI: 1.61-16.66), p=0.006]. On follow-up of baseline CH cases(N=63), development of C, decompensation, HCC, and transplantation/mortality were not different between two treatment groups(p $> 0,05$ ). However, development of cirrhosis[OR=0.28(CI: 0.08-0.89), p=0.03], mortality and transplantation significantly decreased in responders[OR=0.09(CI: 0.01-0.91), p=0.03]. HBsAg clearance was seen in 8(9,9%) cases, at similar level between treatment groups(p=0,7). Conclusion: A standart 1 year or up to 18 months course of treatment with interferons is most likely not enough in the majority of patients with CDH. Prolonged treatment is necessary in cases with higher baseline viral load. In such patients, prolongation of treatment is critical for preventing complications of liver disease including cirrhosis, and death.

## Disclosures:

Hakan Bozkaya - Advisory Committees or Review Panels: Roche, Gilead, BMS; Speaking and Teaching: Roche, Gilead

Cihan Yurdaydin - Advisory Committees or Review Panels: Bristol-Myers Squibb, Roche, Novartis, Gilead, Merck

The following people have nothing to disclose: Gokhan Kabacam, Mustafa Yakut, Gülseren Seven, Senem C. Karatayli, Camran Nassiri, A.Mithat Bozdayi, Ramazan Idilman

#### 1431 BASELINE HBSAG AS PREDICTOR FOR HBSAG SEROCONVERSION IN HBEAG NEGATIVE CHRONIC HEPATITIS B PATIENTS TREATED WITH PEGINTERFERON ALFA-2A AND ADEFOVIR: FINAL RESULTS OF A PROSPECTIVE OPEN LABEL STUDY

Bart Takkenberg<sup>1</sup>, Annikki de Niet<sup>1</sup>, Hans L. Zaaijer<sup>5</sup>, Christine J. Weegink<sup>1</sup>, Valeska Terpstra<sup>2</sup>, Marcel Dijkgraaf<sup>3</sup>, Peter L. Jansen<sup>1</sup>, Vincent Rijckborst<sup>6</sup>, Harry L. Janssen<sup>6</sup>, Marcel Beld<sup>4</sup>, Hendrik W. Reesink<sup>1</sup>; <sup>1</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands; <sup>2</sup>Department of Pathology, Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands; <sup>3</sup>Clinical Research Unit, Academic Medical Center, Amsterdam, Netherlands; <sup>4</sup>KIT Biomedical Research, Royal Tropical Institute, Amsterdam, Netherlands; <sup>5</sup>Medical Microbiology and Karl Landsteiner Laboratory, Academic Medical Center, Center for Infectious Disease and Immunology (CINIMA), Amsterdam, Netherlands; <sup>6</sup>Department of Gastroenterology and Hepatology, Erasmus Medical Center, Rotterdam, Netherlands

Background and aim: To investigate baseline and on-treatment markers for prediction of HBeAg seroconversion, sustained virological response (SVR) or HbsAg seroconversion in chronic hep-