



**TÜRKİYE CUMHURİYETİ  
ANKARA ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**



**YENİ ANTİVİRAL MOLEKÜLLERİN TARANMASI İÇİN  
HEPATİT DELTA VİRÜSÜNÜN REPLİKE OLABİLDİĞİ  
HÜCRE KÜLTÜR SİSTEMİNİN OLUŞTURULMASI**

**İnci ÇELİK**

**DİSİPLİNLERARASI HEPATOLOJİ ANABİLİM DALI  
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN  
Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI**

**2011- ANKARA**

## İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iii
Önsöz	vii
Simgeler ve Kısaltmalar	viii
Şekiller	xii
Çizelgeler	xiii
<b>1. GİRİŞ</b>	<b>1</b>
1.1. Hepatit Delta Virüsü	1
1.2. HDV Genotiplerinin Sınıflandırması ve Epidemiyolojisi	1
1.2.1. Genotiplerin Klinik ve Virolojik Önemi	2
1.3. HDV Virion Yapısı	2
1.4. HDV RNA	4
1.5. Hücreye Giriş	5
1.5.1. HDV-HBV Etkileşimi	6
1.6. HDV Replikasyon Mekanizması	7
1.7. Hepatit D Antijeni	9
1.7.1. RNA Bağlanma Bölgesi (RBD)	11
1.7.2. "Coiled-Coil Dizisi" (CCS)	11
1.7.3. Nükleer Lokalizasyon Sinyali (NLS)	12
1.7.4. Virüs Paketlenme Sinyali (VAS)	12
1.7.5. Hepatit D Antijeninin Replikasyondaki Rolü	12
1.8. RNA Düzenlenmesi (Editing)	13
1.8.1. Genotipik Varyasyonlar	14
1.8.2. Düzenlenme Mekanizmasının Kontrolü	15
1.9. Post-Translasyonel Modifikasyonlar	15
1.9.1. İzoprenilasyon	16
1.9.2. Fosforilasyon	16
1.9.3. Metilasyon	16

1.9.4. Asetilasyon	16
1.9.5. Sumolasyon	17
1.10. Klinik Tanı	17
1.11. Tedavi	18
1.11.1. İnterferon	18
1.11.2. Pegile İnterferon	19
1.11.3. Nükleozit Analogları	19
1.11.4. Deoksintükleoitit Analogları	19
1.11.5. Birleşik Tedavi	20
1.11.6. Yeni Yöntemler	20
1.11.6.1. RNAi (RNA interference)	20
1.11.6.2. Prenilasyon İnhibitörleri	21
1.12. Hücre Kültürü	21
1.12.1. Kökenlerine Göre Hücre Kültürleri	22
1.12.1.1. Primer (Birincil) Hücre Kültürleri	22
1.12.1.2. Sekonder Veya Diploid Hücre Kültürleri	23
1.12.1.3. Sürekli Veya Heteroploid Hücre Kültürleri	23
1.12.2. Hücre Kültürü Şekilleri	23
1.12.2.1. Tek Tabaka Hücre Kültürleri	23
1.12.2.2. Süspansiyon Hücre Kültürleri	23
1.12.3. Hücre Kültürü Besiyerleri	24
1.12.3.1. Hücre Üretme Besiyerleri	24
1.12.3.2. Virüs Üretme Besiyerleri	24
1.12.4. Kültürde Virüsün Üremesi	24
1.12.5. İnterferens	26
1.13. HDV Çalışmalarında Kullanılan Hücre Kültür Sistemleri	27
1.14. Amaç	28
<b>2. GEREÇ ve YÖNTEMLER</b>	<b>29</b>
2.1. Gereçler	29
2.1.1. Hücre Kültür Hattı	29

2.1.2. Primer ve Problar	29
2.1.3. Kimyasal Maddeler	29
2.1.4. Tampon ve Çözeltiler	30
2.1.5. Enzimler	30
2.1.4. Kullanılan Cihazlar	31
2.1.5. Kullanılan Kitler	31
2.2. Yöntemler	31
2.2.1. Bakteride Plazmit Üretilmesi	31
2.2.2. Plazmit DNA İzolasyonu	32
2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi	32
2.2.4. Plazmit Delta PCR Yöntemi	33
2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi	34
2.2.6. Huh-7 Hücrelerin Transfeksiyon İçin Sayımı ve Ekimi	34
2.2.7. İçerisinde Delta Olan Plazmitlerin Huh-7 Hücrelerine Transfeksiyonu	35
2.2.8. Hücre Kültüründen Örnek Toplanması	36
2.2.9. Total RNA İzolasyonu	36
2.2.10. DNaz ile Muamele	37
2.2.11. Real-Time RT PCR	37
2.2.12. Konvansiyonel PCR	38
2.2.13. Agaroz Jel Elektroforezi	40
<b>3. BULGULAR</b>	<b>41</b>
3.1. Bakteride Plazmit Üretilmesi	41
3.2. Plazmit Delta PCR Yöntemi	41
3.3. Plazmitin İçerisinde Bulunan Delta'nın Genom Dizisi	42
3.4. İçerisinde Delta Olan Plazmitlerin ve GFP'lerin Huh-7 Hücrelerine Birlikte Transfeksiyonu	42
3.5. Real-Time RT PCR	43
3.6. Konvansiyonel PCR	44
<b>4. TARTIŞMA</b>	<b>46</b>

<b>5. SONUÇ VE ÖNERİLER</b>	48
<b>ÖZET</b>	49
<b>SUMMARY</b>	50
<b>KAYNAKLAR</b>	51
<b>ÖZGEÇMİŞ</b>	55

## ÖNSÖZ

Bu çalışma Ankara Üniversitesi Disiplinlerarası Hepatoloji Enstitüsü'nde yapılmıştır. Çalışmada yeni antiviral moleküllerin taranması için hepatit Delta virüsünün replike olabildiği hücre kültür sisteminin oluşturulması amaçlanmıştır. Yapılan deneyler sonucunda elde edilen bulgularda kültür sisteminde hepatit Delta virüsü replikasyonu gözlemlenmiştir.

Çalışmamda benden desteklerini esirgemeyen ve yol gösteren danışmanım Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI'ya,

Bu süreç boyunca bana destek olan laboratuvar arkadaşlarım Dr. Ersin KARATAYLI ve Miray AKGÜÇ'e,

Ankara hayatımı, ev hayatımı, laboratuvar hayatımı kısaca tüm hayatımı mutlulukla paylaştığım, tüm zamanlarımızı tebessümle hatırladığım, hep dostum olarak kalacak ve onun gibi bir dost daha bulamayacağım Duygu KOYUNCU'ya,

Hayatıma geç giren ama hep var olacak olan, en zor zamanlarımda bile yüzümü güldürebilen canım arkadaşım Burak ÇELİK'e,

Herşeyim Ural Tolga SEYHAN'a,

Son olarak da, benim annem olduğu için ne kadar şanslı olduğumu hatırladığım canım annem Fatma ÇELİK'e,

Her zaman her kararında bana destek olan ve onun biricik kızı olduğumu bana hiç unutturmayan canım babam Alkan ÇELİK'e,

Dünyada onun gibi bir kardeşe sahip olmanın ne demek olduğunu bir tek benim bildiğim, uzakta olsa bile her an yanımda olan, bana verdiği emeği hiçbir zaman ödeyemeyeceğim, bütün diplomalarımın diğer sahibi canım abim Ayhan ÇELİK'e

Teşekkürü bir borç bilirim.

## SİMGELER VE KISALTMALAR

A	Adenin
aa	Amino asit
ADAR	Adenozin Deaminaz
$\alpha$	Alfa
ALT	Alanin Aminotransferaz (karaciğer enzimi)
Anti-HBc	Hepatit B Virüsünün Çekirdek (Core) Antijenine Karşı Antikor
Anti-HD	Delta Antikoru
C	Sitozin
C	Sistein
°C	Santigrat Derece
CCS	Coiled-coil Dizisi
cDNA	Komplementer DNA
CHC	Klatrin Zayıf Zincir
CHD	Kronik Hepatit Delta
CO <sub>2</sub>	Karbondioksit
CPE	Hücre kültüründe görülen sitopatik etki
DEPC-su	Dietil Pirokrabonat ile muamele edilmiş su
dH <sub>2</sub> O	Distile Su
DMEM	Dulbecco's MEM (Besiyeri)
DNA	Deoksiribonükleik Asit
DNaz	Deoksiribonükleaz
dNTP	Deoksiribonükleotit Trifosfat

E.coli	Escherichia coli Bakterisi
EDTA	Etilen Diamin Tetra Asetik Asit
ELISA	Enzim İlintili İmmün Test
FBS	Fetal Bovin Serum
G	Guanin
g	Gram
GFP	Yeşil Florasan Protein
HBsAg (L,M,S)	Hepatit B Yüzey Antijeni (Büyük, Orta, Küçük)
HBV	Hepatit B Virüsü
HCC	Karaciğer Kanseri
HCV	Hepatit C Virüsü
HDAg	Hepatit Delta Antijeni
HDV	Hepatit Delta Virüsü
HLH	Heliks-Loop-Heliks
Huh-7-6	İnsan Hepatom Karaciğer Hücresi Hattı
IFN	İnterferon
IgG	Bakteri ve viral enfeksiyonlara karşı koruyan antikor
IgM	Yeni karşılaşılan enfeksiyonda ilk yapılan antikor
LB Broth	Luria-Bertani Broth (Besiyeri)
LC	Karaciğer Sirozu
L-HDAg	Büyük Hepatit D Antijeni
M	Molarite
µl	Mikrolitre
mg	Miligram
MgCl <sub>2</sub>	Magnezyum Klorür
ml	Mililitre



mRNA	Mesajcı RNA
nm	nanometre
NLS	Nükleer Lokalizasyon Sinyali
PBS	“Phosphate Buffered Saline”
Peg-IFN	Pegile İnterferon
pH	Hidrojenin Gücü (Asitlik veya bazlık derecesini belirtir)
PCR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
pSVL	Bir çeşit Ekspresyon Vektörü
RBD	RNA Bağlanma Bölgesi
Real-Time RT-PCR	Gerçek Zamanlı Ters-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIA	Radyoimmün Test
RNA	Ribonukleik Asit
RNAi	RNA İnterferans
RNP	Ribonukleoprotein (RNA ve proteinden oluşan bileşik)
RNaz	Ribonükleaz
Rpm	Dakikadaki Devir Sayısı
RT-PCR	Ters-Transkriptaz Polimeraz Zincir Reaksiyonu
s	Saniye
S-HDAg	Küçük Hepatit D Antijeni
SUMO	“Small ubiquitin-like modifier”
SVR	Devamlı Virolojik Yanıt
T	Timin
TAE	Tris Asetik Asit EDTA Tamponu
U	Urasil
UNG	Urasil N Glikolaz

UV	Ultra Viyole Işını
VAS	Virüs Paketlenme Sinyali
W	Triptofan

## ŞEKİLLER

<b>Şekil 1.1,</b> HDV Virionu	3
<b>Şekil 1.2,</b> HDV Virionu	3
<b>Şekil 1.3,</b> HDV RNA'lar; genomik RNA, anri genomik RNA ve mRNA	5
<b>Şekil 1.4,</b> S-HBsAg'nin membran ile etkileşimi	6
<b>Şekil 1.5,</b> Tomurcuklanma işlemi için model	7
<b>Şekil 1.6,</b> HDV replikasyonu ve replikasyonun farklı bölgesel lokalizasyonu	8
<b>Şekil 1.7,</b> HDV'nin Replikasyon Döngüsü	9
<b>Şekil 1.8,</b> HDV antijenomik RNA düzenlenmesi (editing)	10
<b>Şekil 1.9,</b> Delta Antijenleri ve üzerinde meydana gelen post-translasyonel modifikasyonlar	11
<b>Şekil 1.10,</b> RNA düzenlenme mekanizması	14
<b>Şekil 1.11,</b> Genotip 1 ve 3'te amber/W düzenlenmesi için gerekli olan RNA yapıları	15
<b>Şekil 1.12,</b> Fibroblastik hücreler (solda), Epitel hücreleri (sağda)	22
<b>Şekil 1.13,</b> Hücre kültüründe plak oluşumu	26
<b>Şekil 3.1,</b> İzole edilmiş plazmitlerin Delta plazmitlerinin ve GFP'lerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi	41
<b>Şekil 3.2,</b> Delta PCR'ları yapılmış olan plazmitlerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi	42
<b>Şekil 3.3,</b> Kontrol plazmiti GFP'lerin hücre kültüründe mikroskop altında görünümü	43
<b>Şekil 3.4,</b> Hücre kültüründen toplanan örneklerden elde edilmiş total RNA'ların delta PCR'larının %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (FuGENE HD Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)	44
<b>Şekil 3.5,</b> Hücre kültüründen toplanan örneklerden elde edilmiş total RNA'ların delta PCR'larının %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)	45

## ÇİZELGELER

<b>Çizelge 2.1,</b> Çalışma için kullanılan primer ve problemlerin dizileri	29
<b>Çizelge 2.2,</b> HDV Real-Time RT PCR Reaksiyon Koşulları	38
<b>Çizelge 3.1,</b> RT-PCR Sonuçları (FuGENE HD Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)	43
<b>Çizelge 3.2,</b> RT-PCR Sonuçları (X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)	44

## 1. GİRİŞ

### 1.1. Hepatit Delta Virüsü

Hepatit delta virüsü ilk olarak 1977'de tanımlanmıştır (Rizzetto ve ark., 1977). Hepatit delta virüsü hastalık oluşturmak için hepatit B virüsü zarf proteinlerini kullanan viral bir ajandır. Dolayısıyla HDV için hastalık oluşturmaya yardımcı virüs (helper virus) hepatit B virüsüdür (Rizzetto ve ark., 1980). Günümüzde yaklaşık 400 milyon insan kronik HBV ile enfektedir, bu insanların %10'u ise hem hepatit D hem de hepatit B virüsleri ile enfektedir (Gaeta ve ark., 2000). Tedavi olanakları sınırlı bir hastalıktır ve bu gün geçerli olan tek tedavi İnterferon-a olarak kabul edilmektedir (Sonsuz, 2002).

HDV enfeksiyonunda ağır hasta tablolarıyla karşılaşıldığından ve etkin tedavi yönteminin sınırlı olmasından dolayı yeni tedavi yöntemlerinin hızla araştırılması ve geliştirilmesi gerekmektedir.

### 1.2. HDV Genotiplerinin Sınıflandırması ve Epidemiyolojisi

HDV'nin tüm dünyada tanımlanmış 8 farklı genotipi bulunmaktadır (Frederic ve ark., 2006). HDV'nin genetik çeşitliliği izolatların coğrafi orijinleriyle bağlantılıdır. HDV genetik çeşitliliği hastaların bölgesel orijinleri ile bağlantılıdır. Genotip 1 Kuzey Amerika, Avrupa, Afrika, doğu ve batı Asya ve Kuzey Pasifik'te görülmektedir (Niro ve ark., 1977; Zhang ve ark., 1996; Shakil ve ark., 1997). Genotip 2 hastaları Japonya, Tayvan ve Rusya'da gözlemlenmiştir (Imazeki ve ark., 1991; Lee ve ark., 1996; Ivaniushina ve ark., 2001). HDV-3 Amazonlarda (Casey ve ark., 1993), HDV-4 Tayvan ve Japonya'da (Wu ve ark., 1998; Sakugawa ve ark., 1999; Watanabe ve ark., 2003), HDV-5, HDV-6, HDV-7 ve HDV-8 ise Afrika'da görülmektedir (Frederic ve ark., 2006).

Türkiye’de yapılan çalışmalara göre ise HDV hastalarının hepsi genotip 1’ dahildir (Bozdayı ve ark., 2004; Altuđlu ve ark., 2007).

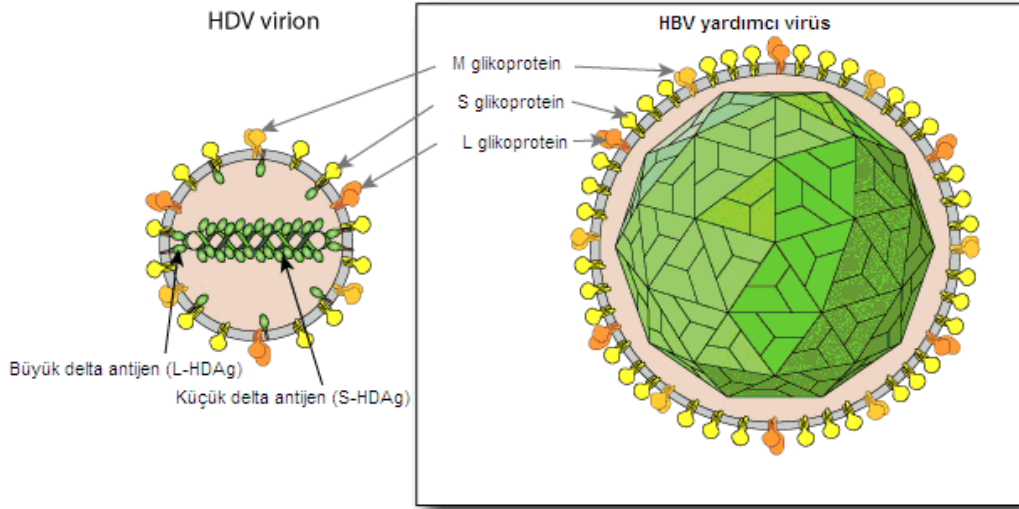
### **1.2.1. Genotiplerin Klinik ve Virolojik Önemi**

HDV genotiplerinin HDV enfeksiyonunu etkilediği bilinmektedir. Genotip 1 hastaları genellikle agresif hepatitlerle veya karaciğer sirozu (LC) yada karaciğer kanseri (HCC) gibi hastalıklarla ilişkili olan gruptur. Genotip 2 ise genotip 1’e göre daha ılımlı sonuçları olan hasta grubudur. Genotip 3 ise şiddetli hepatit formlarıyla ilişkili hasta grubudur (Hsieh ve ark., 2006).

HDV genotipleri arasında L-HDAg’nin C-terminal ucu genotip 1 ve diğer genotipler arasında %74 değişkenlik göstermektedir. Bu bölge virion paketlenmesinden sorumlu olduğu için bu değişkenlik HDV moleküllerinin birleşmesini etkilemekte, dolayısıyla virüsün patojenitesini etkilemektedir (Hughes ve ark., 2011).

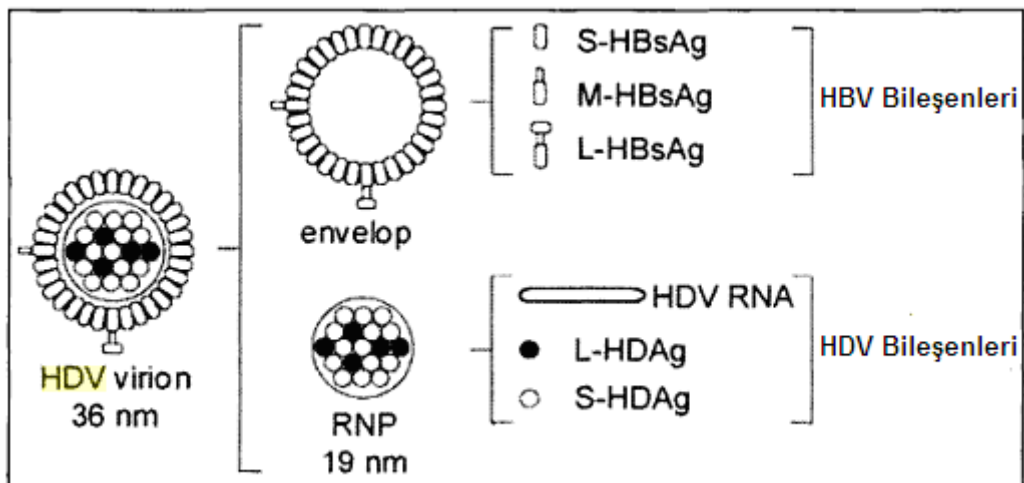
### **1.3. HDV Virion Yapısı**

HDV virionu yaklaşık 36 nm çapındadır ve kimerik bir yapı göstermektedir. HDV genomunun yapısı hayvansal virüsler arasında tekdir. Genom yaklaşık 1700 nükleotit uzunluğunda tek zincirli RNA genomudur ve sıradışı ikincil bir yapıya sahiptir (Rizzetto ve ark., 1980; Lai, 1995). Elektroporatik analizler HDV RNA’nın doğal ve denaturasyon koşullarında dairesel olduğunu göstermiştir, fizyolojik koşullarda ise dallanmış çubuk şeklinde olduğu kabul edilmektedir. Bu düşünceler de ilk HDV izolatının klonlanmasındaki ve dizi analizindeki sonuçlarla tutarlılık içerisindedir. Bilgisayar analizleri ile %70 üzerindeki bazın çubuk benzeri çift zincirli yapı için bir araya geldikleri tahmin edilmektedir (Şekil 1.1) (Polish ve ark., 1993).



Şekil 1.1, HDV Virionu (Delta Virus, 2009)

Hepatit delta virüsü HBV virüsünün zarf proteinlerini kullanan bir ajandır, hücre içerisine girdiğinde replike olur ve birçok delta proteinini ribonukleoprotein (RNP) oluşturmak üzere bir araya getirir. Zarf proteinleri HBV yüzey proteinlerinden, RNP ise HDV spesifik elementlerden oluşmaktadır. Delta proteini hepatit delta antijeni (HDAg) oluşturmak üzere katlanmıştır ve küçük (S-HDAg), büyük (L-HDAg) olmak üzere iki formda bulunmaktadır. L-HDAg S-HDAg'den 19 aminoasit daha uzundur. RNP'ler ise daireseldir ve 19nm çapındadır. HDV zarfı ise S-HBsAg, M-HBsAg ve L-HBsAg yüzey antijenlerinden oluşmaktadır ve bu proteinler HBV'de 4:1:1, HDV'de ise 95:5:1 oranında bulunmaktadır (Şekil 1.2) (Gerin ve ark., 2001; Ganem ve ark., 2001).



Şekil 1.2, HDV Virionu

Genom üzerinde HDağ proteini kodlayan açık okuma pencereleri bulunmaktadır. Zarf proteinleri kodlama yeteneği yoktur. Dolayısıyla HBV zarf proteinlerini kullanmaktadır ve bunları RNP'lerin hücre dışına çıkması işleminde kullanır (Ganem ve ark., 2001; Lai, 2003).

HDV virion oluşumu iki aşamalıdır; RNP birleşmesi (nükleusta) ve viral zarfın oluşması (IC membran). HDV RNP'yi oluşturan delta proteinleri genomik RNA ile etkileşerek HDV RNP kompleksini oluşturur. Daha sonra bu kompleks zarf proteinleri ile paketlenerek sitoplazmaya geçer. L-HDağ proteinin C ucunda bulunan CXXX sinyali (C=sistein, X=herhangi bir aminoasit) etkilidir. Bu farnesil grup RNP'nin ER membranına bağlanmasını sağlar ve burada zarf proteinleri ile paketlenme gerçekleşir (Glen ve ark., 1992).

#### **1.4. HDV RNA**

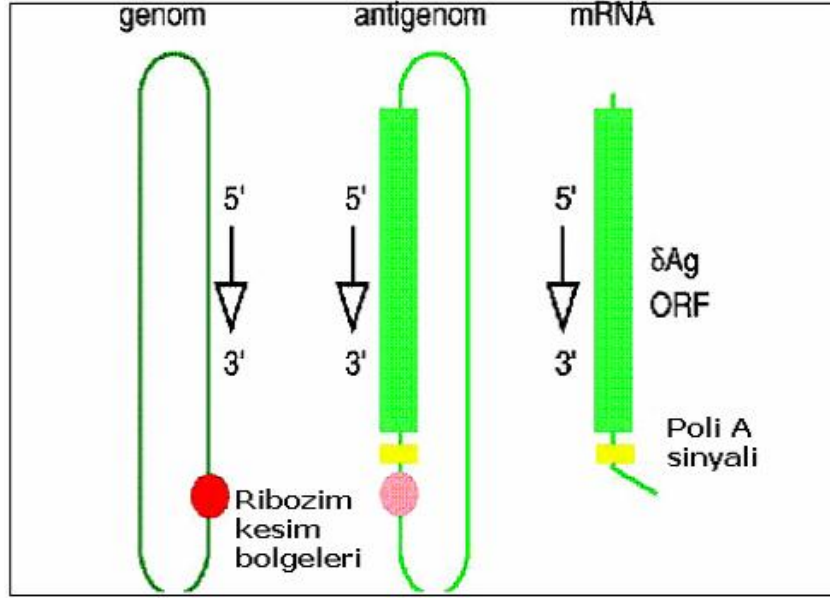
HDV replikasyonu sırasında 3 farklı RNA molekülü oluşmaktadır; genom (~300 000 kopya), antijenom (~30 000 kopya) ve mRNA (~600 kopya). Çalışmalar RNA'ların farklı hücresel bölgelerde hücre polimerazlar sayesinde oluştuğunu göstermektedir(Şekil 1.3).

Genom dairesel negatif tek zincirli RNA'dır ve hayvansal virüsler arasındaki tek dairesel RNA'dır.

Antijenom genoma tamamıyla komplementerdir ve replikasyon sırasında RNA'dan RNA sentezi ile nükleolusta oluşmaktadır. HDağ'yi kodlayan bir tane açık okuma çerçevesi içermektedir. Hem genomik hem de antijenomik RNA'da 85 nükleotitlik bir bölge ribozim görevi görmektedir ve HDV RNA'yı dairesel RNA'yı oluşturmak üzere birleşecek olan monomere bölme görevi yapmaktadır (Pascarella ve Negro, 2010).



mRNA ise HDVAg sentezini yönetmektedir. 800 nükleotit uzunluğunda lineer RNA'dır. Bu RNA 5'cap yapısına ve 3'-poly(A) kuyruğuna sahiptir (Nie ve ark., 2004).



Şekil 1.3, HDV RNA'lar; genomik RNA, anrigenomik RNA ve mRNA

### 1.5. Hücreye Giriş

HDV'nin hücreye girişindeki HDV reseptörleri ve mekanizması hala bilinmemektedir. Ancak HDV ve HBV aynı zarf proteinlerini kullanmaktadır, dolayısıyla hücreye giriş mekanizması olarak da benzerlik gösterdikleri tahmin edilmektedir.

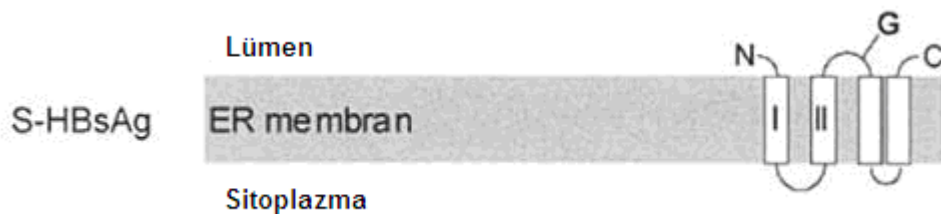
Virüslerin en klasik giriş mekanizmalarından biri klatriin aracılı endositik yolaktır (clathrin-mediated endocytic pathway). Influenza virüsü gibi bazı virüsler endozomlara reseptörleri ile birlikte endositozlanmaktadır. Hepatit delta antijeni de, klatriin zayıf zinciri (CHC) ile spesifik olarak etkileşebildiğinden dolayı klatriin adaptör proteini olarak tanımlanabilir. HDV birleşmesi, CHC düzenlenmesinden sonra azalmasına rağmen azalmaktadır, ancak aynı etki HBV için geçerli değildir. Buradan da aynı zarf proteinlerini kullanan bu iki virüsün birleşme ve çıkış mekanizmaları farklı olabilir. Aynı zamanda hücreye giriş verimliliği HDV için

genotiplere ve CHC ile etkileşim yeteneğine de bağlıdır. Örneğin genotip 1'in verimliliği 2 ve 3'ten daha fazladır (Pascarella ve Negro, 2010).

Virüs hücreye girdikten sonra kaplamasız (uncoated) hale gelmektedir ve HDAg'deki sinyal nükleokapsitten nükleusa geçmektedir. Delta antijeninin RNA polimeraz aktivitesi yoktur, dolayısıyla virüs konak RNA polimerazlarını kullanmaktadır (Xia ve ark., 1992).

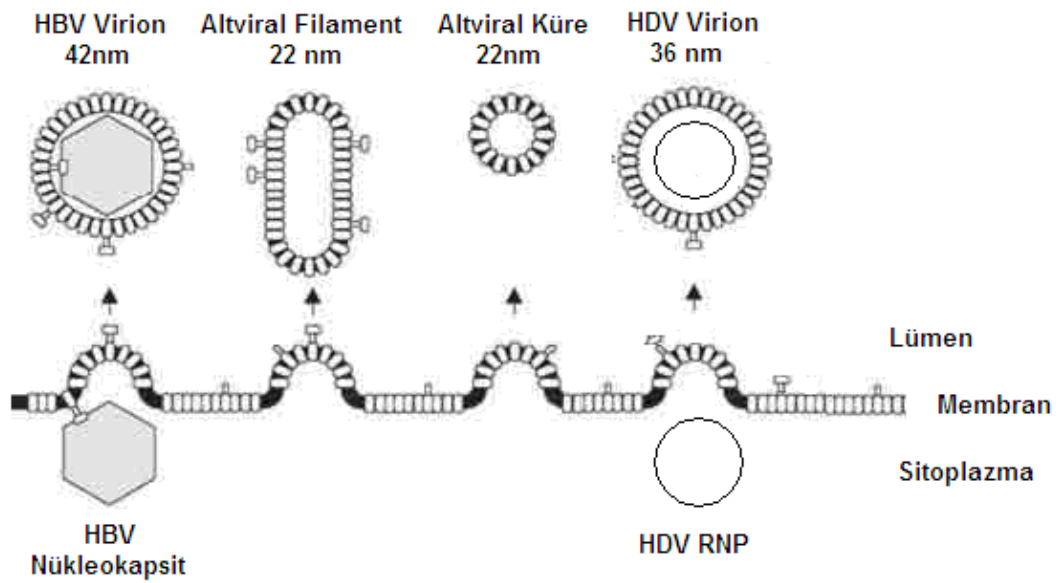
### 1.5.1. HDV-HBV Etkileşimi

HDV-HBV etkileşimi HBV tarafından geliştirilmiş bir işlemdir. Tomurcuklanma membranının iç yüzeyinde (IC) gerçekleşmektedir ve virüs proteinleri tarafından kontrol edilmektedir. Bunlardan S-HBsAg proteini tomurcuklanma için gerekli enerjiyi sağlar. S-HBsAg integral proteindir ve N-ucundan lipid membrana bağlıdır. Hidrofobik C ucu ise 2 alfa-heliks oluşturmaktadır (Şekil 1.4) (Ganem ve ark., 2001; Lai, 2003).



Şekil 1.4, S-HBsAg'nin membran ile etkileşimi

HBV zarf proteinleri IC mebranda spontan bir şekilde tomurcuk oluşturmaktadır, sadece S-HBsAg proteini varsa küresel viral partikül, nükleokapsit yokluğunda L-HBsAg varsa iplik şeklinde viral partikül, HBV nükleokapsit varlığında L-HBsAg varsa HBV virionu, HDV RNP varsa ise HDV virion oluşmaktadır (Glenn ve ark., 1992; Taylor, 2003).



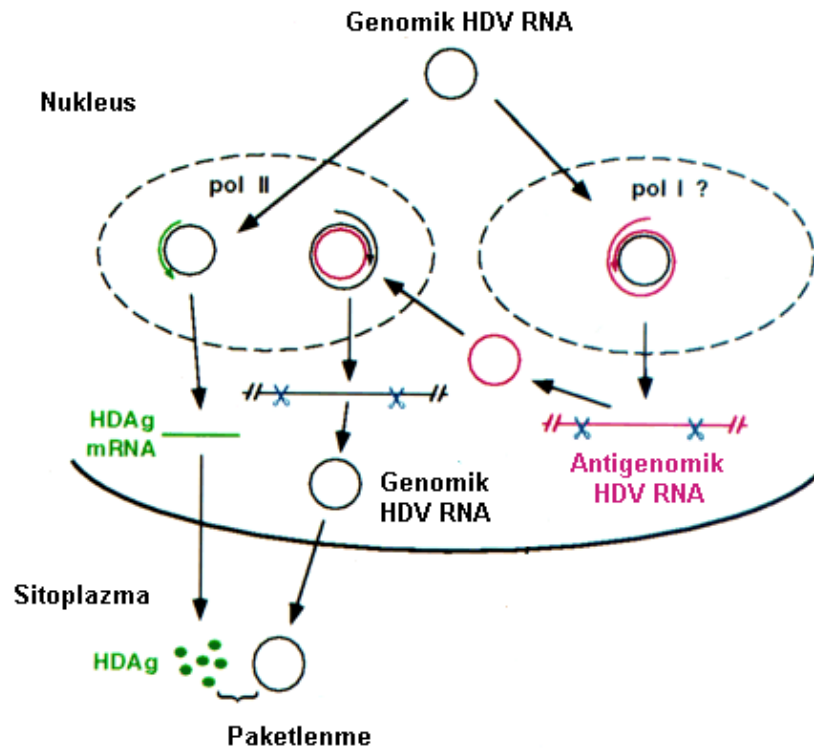
HBV zarf proteinleri: S-HBsAg (□), M-HBsAg (◻), L-HBsAg (◻)

Şekil 1.5, Tomurcuklanma işlemi için model

## 1.6. HDV Replikasyon Mekanizması

HDV replikasyonu HBV'den bağımsız bir işlemdir. İlk çalışmalarda RNA polimeraz II'nin HDV replikasyonunda rol aldığı bulunmuştur ancak sonraki çalışmalar RNA polimeraz I ve III'ün de HDV RNA ile etkileşime girdiğini göstermiştir (Greco-Stewart ve ark., 2009). Hücre içerisini girdikten sonra HDV RNP'ler HDAg sayesinde nükleusa geçmektedir ve burada transkripsiyon S-HDAg'nin HDV RNA'ya bağlanmasıyla aktive olmaktadır (Chou ve ark., 1998). HDV RNA hücrel RNA polimerazlar sayesinde replike olmaktadır (The Biology of HDV, 2009.) Replikasyon "double-rolling circle mekanizması" ile gerçekleşmektedir. RNA genomu "rolling circle mekanizması" ile multimerik antigenomik moleküle sentezlenmektedir. Antigenomik transkript antigenomik ribozimin otokatalitik kesilmesi ile kesilmekte ve hücrel ligazlar sayesinde dairesel kalıp oluşturmak üzere birleşmektedir. Antigenomik RNA'dan genomik RNA oluşumu da aynı mekanizma ile gerçekleşmektedir. Daha sonra oluşan genomik RNA'lar yeni viral partiküllerle etkileşmekte veya antigenomik RNA sentezi için tekrar kalıp görevi

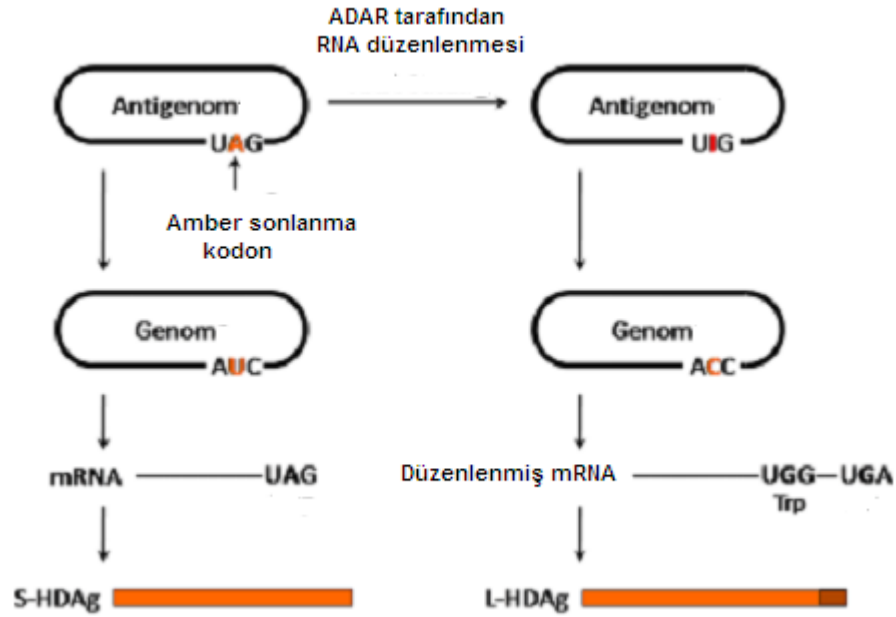




Şekil 1.7, HDV'nin Replikasyon Döngüsü

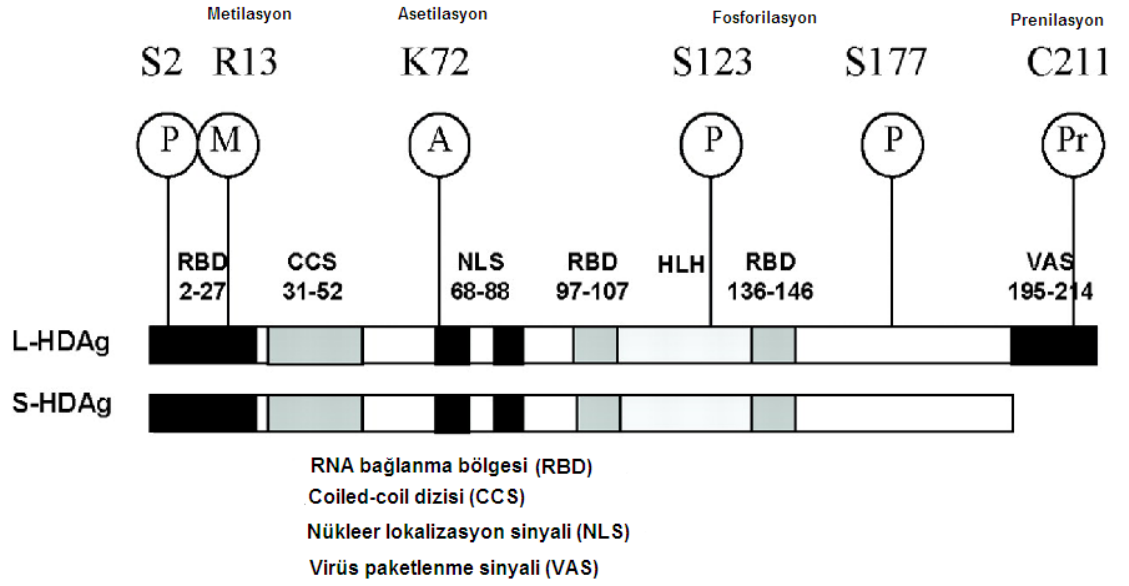
### 1.7. Hepatit D Antijeni

HDV antigenomu üzerinde tek bir okuma çerçevesi penceresi bulunmuştur ve bunun transkripsiyonu hücresel polimeraz II tarafından gerçekleştirilmektedir. Sonuçta 800 nükleotitlik mRNA molekülü sentezlenir ve bu mRNA'dan translasyon ile delta antijenin küçük formu olan S-HDAg üretilir. HDV replikasyonu sırasında RNA düzenleme mekanizması antigenom molekülünde gerçekleşir ve adenozin deaminaz RNA üzerinde değişime neden olur (ADAR). Bu değişim amber durdurucu kodon UAG'yi UGG triptofan kodonuna çevirir ve 5' ucuna cap eklenir, böylece ve 800 nükleotitlik poliadenillenmiş mRNA'ya oluşur (Taylor, 2003). Bu değişim ise okuma çerçevesi penceresini 19 aminoasit uzamaktadır ve böylece 214 aminoasitlik delta antijenin geniş formu modifiye olmuş bu mRNA'dan (L-HDAg) üretilmektedir (Şekil 1.8). Bu iki delta antijeni dizi olarak aynıdır sadece L-HDAg'nin karboksil ucunda 19 tane fazla aminoasit bulunmaktadır.



Şekil 1.8, HDV antigenomik RNA düzenlenmesi (editing)

Bu delta antijenleri yapı ve dizi olarak benzer olsa da HDV replikasyonunda farklı roller üstlenmektedir. S-HDAg replikasyonun başlaması için gereklidir. Bu konuyla ilgili birçok çalışma yapılmıştır ve bazı çalışmalar bu proteinin RNA şaperonları gibi davranarak ve HDV ribozimleri tarafından gerçekleştirilen kesimleme ve birleşmeyi kolaylaştırdığı teorisini desteklemektedir (Jeng ve ark., 1996; Huang ve Wu, 1998). L-HDAg ise HDV replikasyonunu trans etki eden (trans-acting) baskılama mekanizması ile inhibe etmektedir. L-HDAg virion paketlenmesinde önemli rol oynamaktadır (The Biology of HDV, 2009).



Şekil 1.9, Delta Antijenleri ve üzerinde meydana gelen post-translasyonel modifikasyonlar

### 1.7.1. RNA Bağlanma Bölgesi (RBD)

HDAG içerisinde birçok RNA bağlanma bölgesi bulunmaktadır. İlk tanımlanan RBD proteinin ortasında bulunmaktadır ve diğer RNA bağlanma proteinlerinde olduğu gibi arjinin açısından zengin bir bölgedir. Bir diğer RBD ise proteinin N-terminal bölgesinde (aa 2–27) bulunmaktadır. Çalışmalar bu bölgelerin HDV RNA-HDAG bağlanmasında etkili olduğunu göstermiştir (Lai, 2003).

### 1.7.2. “Coiled-Coil” Dizisi (CCS)

Bu motif de N-terminal bölgesinde yer almaktadır (aa 31–52). Bu bölge proteinin oligomerizasyonundan sorumludur. Protein oligomerizasyonu küçük ve büyük delta antijenin çeşitli fonksiyonları için gereklidir; küçük delta antijenin replikasyondaki trans etkili fonksiyonu, büyük delta antijenin ise replikasyondaki baskılama fonksiyonu için (Lai, 2003).

### **1.7.3. Nükleer Lokalizasyon Sinyali (NLS)**

HDAg'nin hücre içerisindeki hedefinden sorumludur. HDAg HDV RNA'yı nükleusa taşır ve burada replikasyon gerçekleşir. HDV RNA nükleer lokalizasyon sinyaline sahip olmadığından son lokalizasyonu HDV RNA ile kompleks oluşturan HDAg'nin özellikleri tarafından belirlenmektedir. HDAg'de bulunan arjinin zengin bölgenin silinmesi HDV RNA'nın sitoplazmada birikmesine yol açmıştır, dolayısıyla bu etkileşim lokalizasyon için gereklidir (Lai, 2003). Bu 3 bölge farklı genotipler arasında benzerlik göstermektedir.

### **1.7.4. Virüs Paketlenme Sinyali (VAS)**

Bu bölge ise sadece L-HDAg'de bulunmaktadır ve genotipler arasında çok değişkenlik gösteren bir bölgedir. Bu bölge genotip spesifik bir bölgedir. HDV partiküllerinin birleşmesi için kritik basamak olan L-HDAg'nin HBsAg ile etkileşimi için gereklidir. Bu bölgede 211. aminoasitte prenilasyon olmaktadır ve sonucunda prenilasyon motifi olarak bilinen motif oluşmaktadır (CXXX) (Lai, 2003).

### **1.7.5. Hepatit D Antijeninin Replikasyondaki Rolü**

S ve L-HDAg proteinlerinin her ikisi de HDV replikasyon döngüsünde önemli rol üstlenmektedir.

S-HDAg HDV replikasyonunun başlaması için gerekli proteindir. HDV RNA hücreye transfekte edilirken S-HDAg'yi kodlayan mRNA veya rekombinant HDAg proteiniyle birlikte transfeksiyonu yapılmazsa RNA replikasyonu gerçekleşmemektedir. Bu sisteme alternatif olarak ise S-HDAg'yi eksperese eden RNA veya cDNA transfeksiyonu yapılmaktadır. Bu çalışmalar HDAg'nin HDV RNA dizisini tanıdığı fikrini desteklemektedir. Ancak bu mekanizma tam olarak anlaşılammıştır ve bununla ilgili bazı muhtemel senaryolar öne sürülmektedir.



Birinci senaryoda HDAG transkripsiyon faktörü olarak görev almaktadır. HDAG bir nükleer proteindir, “coiled-coil” ve HLH (helix loop helix) bölgeleri içermektedir ve prolin, glisin zengin bölgeleri içermektedir ki bu özellikler DNA-bağımlı transkripsiyon faktörlerinin karakteristik özellikleridir. Ayrıca HDAG nükleer protein B23 ve birçok diğer nükleer transkripsiyon faktörleriyle etkileşimindedir; B23 fazla ekspresyonu HDV RNA sentezini destekleyen bir mekanizmadır. İkinci senaryoda HDAG HDV RNA’ya bağlanmakta ve HDV RNA’da yapısal değişikliğe neden olmaktadır. Bu değişiklik sonrasında HDV RNA doğal DNA promotor dizisi gibi davranmakta ve hücrel DNA bağımlı RNA polimerazlar tarafından tanınmaktadır. Üçüncü senaryoda HDAG direkt olarak replikasyonda görev almamakta, HDV RNA’nın nükleusa geçişinde taşıyıcı olarak rol almaktadır.

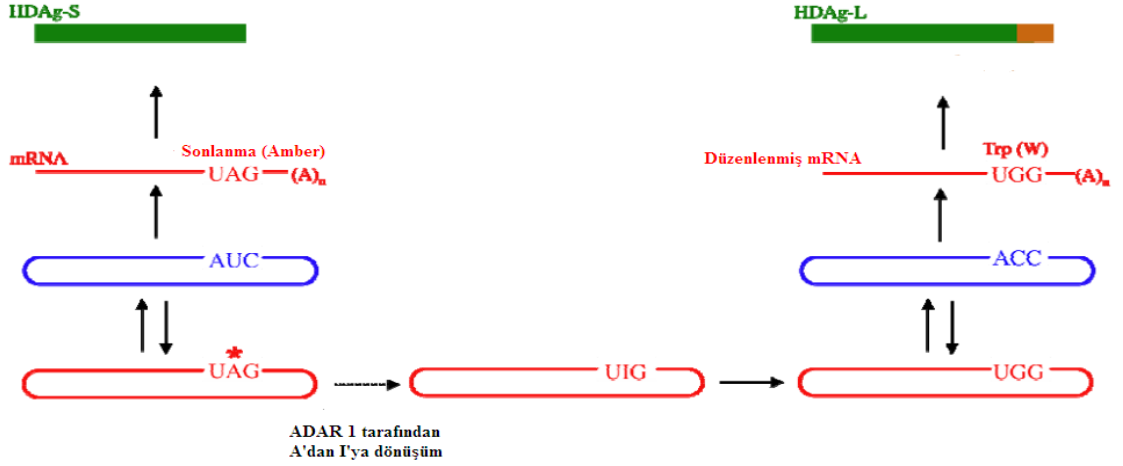
L-HDAG ise HDV virion partiküllerinin birleşmesinde rol almaktadır. C-terminal bölgesindeki 19 aminoasitlik bölge virüs birleşme sinyali açısından yeterli ve gereklidir. 211. aminoasitteki prenilasyon bu mekanizma için gereklidir, bu işlem L-HDAG ve HBsAg arasındaki etkileşimi kolaylaştırmaktadır.

HDAG RNA şaperon aktivitesi göstermektedir. Bu protein ribozim-aktif RNA konformasyonunun oluşumunu desteklemektedir, bunu sonucunda HDV RNA replikasyonu desteklenmektedir (Lai, 2003).

### **1.8. RNA Düzenlenmesi (Editing)**

RNA düzenlenmesi kabaca RNA dizisi üzerindeki bölge-spesifik değişimler olarak tanımlanabilir. İlk olarak 1980’lerin sonunda kullanılan bu terim mitokondriyal mRNA’lar üzerinde U bazının eklenmeleri veya çıkarılmaları için kullanılmıştır. Daha sonra ise mRNA’nın kodlama kapasitesinde değişikliğe yol açan nükleotit değişimleri için kullanılmıştır. Memeli hücrelerinde 2 çeşit düzenleme mekanizması vardır; C’den U’ya, A’dan I’ya dönüşüm. HDV’nin kullandığı tip adenozin deaminasyonudur. Bu mekanizmada adenozin amino grubunun yerini keto oksijen alıyor. Dolayısıyla amber durdurucu kodondaki adenozin inozine dönüşmekte ve

durdurucu kodon triptofan kodonuna dönüşmektedir. Böylece açık okuma penceresi 19 aminoasit uzamakta ve L-HDAg oluşmaktadır. Bu değişim amberden tiptofana olduğundan (W), düzenlenmenin olduğu bölgeye amber/W bölgesi denmektedir.



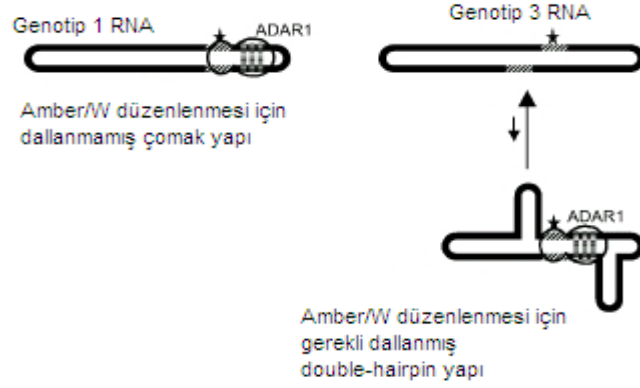
Şekil 1.10, RNA düzenleme mekanizması

Memeli hücrelerinde düzenleme mekanizması ile ilgili iki gen tanımlanmıştır; ADAR1 ve ADAR2. Her iki molekülde HDV RNA'yı amber/W bölgesinden düzenlemektedir. Ancak çalışmalar ADAR1'in replikasyon sırasındaki bu düzenleme mekanizmasından sorumlu olduğunu göstermiştir. Mekanizmanın modeline göre antigenomik RNA'daki amber/W bölgesi hücresel RNA adenzin deaminaz tarafından düzenlenmekte ve böylece A I'ya dönülmektedir. Daha sonra bu değişime uğramış RNA amber/W bölgesinde C içeren genomik RNA sentezi için kalıp görevi görmektedir. Bu genomda UGG triptofan kodonu içeren mRNA sentezinde kalıp RNA olarak kullanılmakta ve böylece bu mRNA'dan L-HDAg kodlanmaktadır.

### 1.8.1. Genotipik Varyasyonlar

L-HDAg içerisinde bulunan amber/W bölgesi ve C-terminal ucu genotipler arasında farklı özellikler göstermektedir. Genotip 1'de düzenleme için gerekli olan yapı dallanmamış çomak (unbranched-rod) yapısındaki HDV RNA'nın bir parçasıdır ve bu amber/W bölgesi genotip 1'ler arasında çok korunmuş bir bölgedir. Dolayısıyla bu yapı düzenleme mekanizması için uygun bir yapıdır. Genotip 3'te ise amber/W bölgesi yapısal olarak değişik olduğundan düzenleme mekanizması için substrat

görevi görmemektedir. Bu yapı “double-hairpin” olarak ifade edilmekte, daha sonra düzenlenme için dallanmamış çomak yapısına dönüşmektedir.



Şekil 1.11, Genotip 1 ve 3'te amber/W düzenlenmesi için gerekli olan RNA yapıları

### 1.8.2. Düzenleme Mekanizmasının Kontrolü

HDV amber/W bölgesinde meydana gelen düzenlenme mekanizmasını kontrol etmek zorundadır, çünkü bu işlem sonrasında oluşan L-HDAg virion oluşumu için gereklidir ancak aynı zamanda virüsün replikasyonunu da inhibe etmektedir. Bu işlemi kontrol etmek RNA yapısı, HDAg, RNA replikasyonu gibi birçok viral yapıya ve fonksiyona bağlıdır. Kontrol mekanizmasında HDV'nin ADAR üzerine bir etkisi yoktur, ADAR1 seviyesi HDV replikasyonundan etkilenmemektedir (Casey, 2003).

### 1.9. Post-translasyonel Modifikasyonlar

Yapılan çalışmalarda hepatit D antijeni için bazı post-translasyonel modifikasyonlar gözlemlenmiştir. Bu modifikasyonlar virüsün hayat döngüsündeki dengeyi belirlemekte ve yeni ilaç tasarımlarında etkili bir hedef varlığı göstermektedirler (Hughes ve ark., 2011).

### **1.9.1. İzoprenilasyon**

L-HDAg'nin içerdiği CXXX kutusu izoprenilasyon için substrat görevindedir ve bu modifikasyon replikasyonun inhibisyonunu desteklemekte ve viral partikül oluşumunu sağlamaktadır. Prenillenmiş L-HDAg molekülü lipofilik bir moleküldür ve L-HDAg ile HBV zarf proteinleri arasındaki etkileşimi sağlamaktadır.

### **1.9.2. Fosforilasyon**

HDAg'nin her iki formu da fosforillenmektedir ancak L-HDAg S-HDAg'ye göre 6 kat daha fazla fosforillenmektedir. S-HDAg serin ve teronin dizilerinden fosforillenirken, L-HDAg sadece serin dizinden fosforillenmektedir. S-HDAg'deki serin 2 fosforillenmesi HDV replikasyonunu artırmaktadır. HDAg fosforillenmesi RNA replikasyonu için önemlidir çünkü RNA-bağlanma aktivitesine aracılık etmektedir.

### **1.9.3. Metilasyon**

S-HDAg metilasyonu RNA bağlanma bölgesinde meydana gelmektedir. Burada meydana gelen mutasyonlar veya metilasyon inhibitörleri sonucunda HDV RNA replikasyonunda inhibisyon gözlemlenmiştir. HDAg nükleusta yapısal form oluşturma yeteneğini yitirmekte ve sitoplazmada lokalize olmaktadır.

### **1.9.4. Asetilasyon**

Asetilasyon ise HDV replikasyon mekanizmasını HDAg'nin nükleer lokalizasyonunu düzenleyerek etkilemektedir. Lisinin (72) alanininle yer değiştirmesi viral RNA birikimini azaltmakta ve L-HDAg'nin erken oluşumunu indüklemektedir.

### 1.9.5. Sumolasyon

Yeni tanımlanmış bir post-translayonel modifikasyondur. S-HDAg fazla lizin dizilerinden dolayı SUMO 1 (small ubiquitin-like modifier 1) hedef proteindir. S-HDAg ve SUMO1 birleşimi sonucunda HDV genomik RNA ve mRNA sentezi artmakta, antijenomik RNA sentezinde değişiklik olmamaktadır (Pascarella ve Negro, 2010).

### 1.10. Klinik Tanı

HDV hastalarında anti-HDV antikor gelişimi tüm bireylerde meydana geldiği için HBsAg pozitif olan tüm hastalarda anti-HDV IgG antikorunu test edilmelidir. Anti-HDV antikorunu testlerinin yokluğunda HDV RNA tespiti yeterli olmayabilir çünkü genom dizilerindeki varyasyondan dolayı HDV RNA testlerinde yanlış negatif sonuçlar alınabilmektedir. Bazı laboratuvarlar kantitatif testler yapmaktadır ancak serumdaki HDV RNA konsantrasyonu hastalığın aktivitesi veya karaciğer fibrozunun evresiyle bağlantılı ilerlemeyebilir. Dolayısıyla HDV RNA için uluslararası bir standart gerekmektedir (Hughes ve ark., 2011).

HDV'nin klinik tanısı için serumda 3 tane HDV spesifik belirteç vardır; HDV RNA, HDAg ve anti-HDV. HDV RNA serumda moleküler hibridizasyon veya RT-PCR yöntemi ile tespit edilebilir. Serum HDAg ise 2 farklı yöntemle tespit edilebilir; ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay) ve RIA (radioimmunoassay). Anti-HDV IgM ve IgG antikorları da aynı HDAg gibi ELISA ve RIA yöntemi ile tespit edilmektedir (Pascarella ve Negro, 2010).

Ayrıca HDV enfeksiyonunun 3 durumunda (akut HBV/HDV koenfeksiyonu, akut HDV süperenfeksiyonu, HDV kronik enfeksiyonu) belirteçler arasındaki farklılıklar olmaktadır. HBV-HDV koenfeksiyonu ile HDV süperenfeksiyonu ile aynı karakteristikleri göstermektedir. HDV RNA HDV enfeksiyonunun akut fazı için en

erken ve hassas belirteçtir ve hastaların %90'ında bulunmaktadır. Kronik HDV enfeksiyonunda HDAg anti-HD ile kompleks oluşturmakta ve böylece HDAg ELISA gibi testler için tespit edilemez duruma gelmektedir. Dolayısıyla bu teknik hassas olmasına rağmen rutin tespitler için uygulanması zor hale gelmektedir (Pascarella ve Negro, 2010).

Önerilen tanı yöntemi ise IgM anti-HBc için test yapılmalı ve HDV belirteçlerinden anti-HD antikorları ile doğrulanmalıdır (Hsieh ve ark., 2006). Eğer istenirse tanı karaciğerdeki HDAg'lerin immunohistokimyasal boyaması ile doğrulanabilir.

## **1.11. Tedavi**

### **1.11.1. İnterferon**

HDV bağlantılı kronik hepatit tedavisi zor bir hastalıktır. IFN (interferon) kronik hepatit delta hastaları için hala tek tedavi yöntemi olarak kabul edilmektedir. IFN tedavisi cevap farklılık göstermektedir. Cevap oranı genellikle IFN dozuyla orantılıdır. İnterferon tedavisinin sonunda HDV RNA negatifliği ve ALT değerinin normalizasyonu yüksek doz alan gruplarda %71, düşük doz alan gruplarda ise %36 ve %29'dur (Hsieh ve ark., 2006).

Ancak IFN- $\alpha$  tedavisinin nötropeni, anemi, yorgunluk ve depresyon gibi birçok yan etkisi bulunmaktadır. Standart IFN- $\alpha$  tedavisinin yerini son zamanlarda pegile formu (Peg- IFN- $\alpha$ ) almaya başlamıştır (Pascarella ve Negro, 2010).

### 1.11.2. Pegile İnterferon

İlaç sektörünün gelişimiyle birlikte son zamanlarda geliştirilen pegile interferon (PEG-IFN) geleneksel interferonlara göre daha iyi bir etki göstermektedir (Hsieh ve ark., 2006). Yine de Peg- IFN- $\alpha$  kronik hepatit D hastalarını tedavi etmede yeterli olamamaktadır. Yapılan çalışmalarda sadece %21 hasta RNA negatifliği göstermiş ve %26'sında biyokimyasal cevap gözlemlenmiştir (Pascarella ve Negro, 2010).

### 1.11.3. Nükleozit Analogları

Bir nükleozit analogu olan ribavirin RNA virüsleri üzerinde etkili olmaktadır. Ribavirinin HDV genom replikasyonunun inhibisyonunda etkili olduğu *in vitro* olarak gösterilmiştir ancak *in vivo* bu sonuçlar alınamamıştır. ALT seviyesinde bir değişim gözlenmemiştir ve HDV RNA, IgM anti-HDV durumları olduğu gibi kalmıştır (Hsieh ve ark., 2006).

### 1.11.4. Deoksinükleoitit Analogları

Deoksinükleoitit analogları HBsAg üretimini baskılayarak HDV replikasyonunun inhibisyonunda kullanılmaktadır. Lamivudin HBV DNA replikasyonunu inhibe etmektedir ancak 1 yıl boyunca bu ilacı kullanan hiçbir CHD hastasında hastalığın gelişiminde, karaciğer histolojisinde veya HDV RNA seviyelerinde olumlu bir gelişme olmamıştır (Lau ve ark., 1999). Daha sonra yapılmış bir çalışmada %8 HDV hastasında SVR görülmüştür, dolayısıyla lamivudin tedavisi HDV üzerinde etkili olabilir ancak son çalışmalar lamivudin dirençli HBV mutantlarının HDV salınımını desteklediğini göstermiştir. Genel anlamda deoksinükleoitit analoglarının kullanımını çalışmalar desteklememektedir (Hsieh ve ark., 2006).

### **1.11.5. Birleşik Tedavi**

Hepatit D virüsü HCV gibi hepatotropik RNA virüsü olduğundan HCV tedavisinde kullanılan PEG-IFN ve ribavirin birlikte tedavisi HDV için de potansiyel bir tedavi olabileceği düşünülmüş ancak ribavirinin ek bir etkisi olmadığı görülmüştür (Niro ve ark., 2006).

Lamivudin ve yüksek doz IFN birleşik tedavisi de HDV üzerinde başarılı olmamıştır (Hsieh ve ark., 2006).

### **1.11.6. Yeni Yöntemler**

#### **1.11.6.1. RNAi (RNA interference)**

RNAi viral enfeksiyonlara özellikle de viral hepatitlere karşı kullanılmaktadır. Hücre kültüründe HDV RNA'nın 3 çeşidinden sadece mRNA'ya karşı başarılı sonuçlar elde edilmiştir. Dolayısıyla diğer iki RNA'nın (genomik ve antigenomik) siRNA'lara (small interfering RNA) dirençli olduğu düşünülmektedir ki bu da bu RNA'ların nukleusta lokalize olmalarından kaynaklanmaktadır. Nukleusta siRNA degradasyonlarına karşı ulaşılamaz hale gelmektedirler (Chang ve Taylor, 2003). Ayrıca "endonuclease dicer" %100 veya %100'e çok yakın çift zincirli RNA'ları kesebilmektedir. Dolayısıyla HDV genomik ve antigenomik RNA'ların kısmi çift zincirli yapısından dolayı kesim aktivitelerine karşı da dirençli olmaktadır (Chang ve ark., 2003).



### 1.11.6.2. Prenilasyon İnhibitörleri

Önceki çalışmalar L-HDAg'nin prenilasyonunun virüs birleşmesi için gerekli olan bir post-translasyonel modifikasyon olduğunu göstermiştir. Hepatit D virüsü için prenilasyon inhibitörleri 2 mekanizmaya sahiptir; viral proteinlerin prenilasyonunun inhibisyonu ve virüs tarafından kullanılan hücresel yolların inhibisyonu. Hayvan modelleri prenilasyon inhibitörlerinin HDV viremisini temizlemede çok etkili olduğunu göstermiştir. Böylece virüsün replikasyon işlevlerinde kritik adımları etkileyen moleküler olarak tasarlanmış ilaçların, HDV tedavisinde daha umut vaat edeceği düşünülmektedir (Hsieh ve ark., 2006).

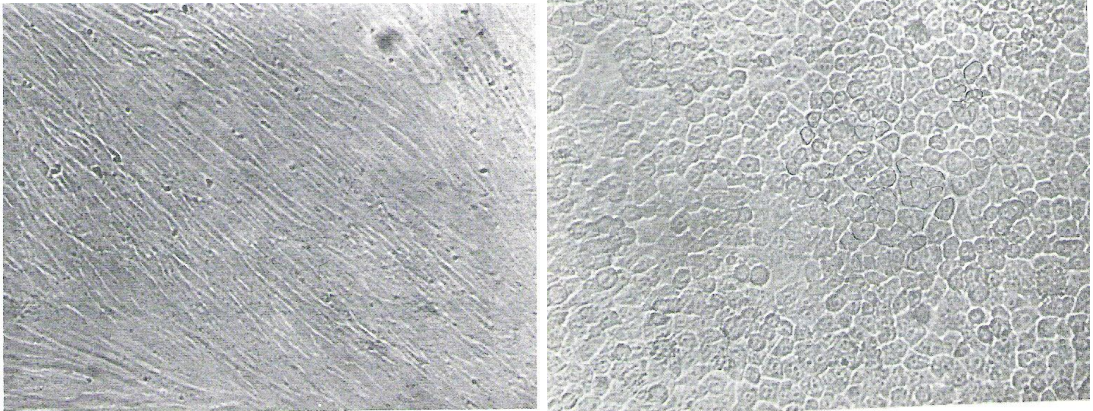
### 1.12. Hücre Kültürü

Canlı organ ve dokulardaki hücrelerin izole edilerek laboratuvar koşullarında üretilme ve çoğaltılmalarına hücre kültürü adı verilir. Hücrelerin kontrollü şartlar altında yetiştirilmesi sürecidir (Çiçek ve Bilgiç, 2006).

Kültürün temeli uygun bir canlıdan alınmış yaşayan hücreler ve bu hücrelerin yaşama ve üremesini sağlayan besleyici nitelikteki fizyolojik sıvıdır.

Hücre kaynağı olarak üreme özelliği güçlü olan organ ve dokular seçilir. Bu organlar insan ve hayvan embriyosuna ait amnion, deri, kas, bağırsak, akciğer, böbrek, testis, uterus, tonsilla, konjunktiva, karaciğer, maymun böbreği ve insanlara ait kötü huylu tümör dokusudur. Bunlar önce parçalanarak tek tek hücrelere ayrılırlar. Bu hücreler çeşitli tuzlar, tampon maddeleri, amino-asitler, vitaminler, dana veya at serumu içeren besleyici sıvılarda süspanse ederek steril tüp veya şişelere koyulur. Bu hücre süspanasyonu 36°C'de bekletildiğinde hücreler kabın çeperine yapışarak ürerler. Üreme sonucunda oluşan yapıya hücre kültürü denir (Poyraz).

Canlı hücrelerin üremek için gösterdiği en önemli özellik, katı bir yüzeye tutunmasıdır. Bu nedenle kültürdeki hücreler, hücre kültürü şişesinin yüzeyine tutunarak üremeye başlarlar. Üreyen hücreler yan yana dizilerek tek tabaka oluştururlar. Belirli süre inkübe edildikten sonra tek tabaka haline gelen hücre kültürleri ekim için hazır hale gelmiş olurlar. Tek tabaka hücre kültürleri virüslerin üretilmesi ve oluşturduğu sitopatik etkinin tanımlanması yönünden iyi bir inceleme sistemidir. Başta embriyonik dokulardan olmak üzere, bazı dokulardan elde edilen hücreler ilk üretildiklerinde birbirine paralel, iğ şeklinde, uçları sivri, ortaları şişkin görünümde dizilim gösterirler. Bu tür hücrelere fibroblast hücre adı verilir. Bazı dokulardan alınan hücreler bal peteği şeklinde dizilirler. Bu tür hücrelere epitel hücreleri adı verilir. Diğer bazı dokulardan alınan hücreler ise epitel hücrelerine benzeyen görünümde dizilirler. Bu hücreler tam epitel hücreleri olmadığı için, bu hücrelere epiteloid ya da epitelial hücreler adı verilir (Poyraz).



Şekil 1.12, Fibroblastik hücreler (solda), Epitel hücreleri (sağda)

### 1.12.1. Kökenlerine Göre Hücre Kültürleri

#### 1.12.1.1. Primer (Birincil) Hücre Kültürleri

Direkt olarak organ ve dokulardan alınan parçalardan hazırlanan hücre kültürleridir. Bunların yalnızca 1 veya 2 pasajları yapılabilmektedir. *In-vitro* koşullarda pasajları kısıtlı olup, bir kaç pasajdan sonra üreyebilme yeteneklerini kaybederler.

### **1.12.1.2. Sekonder veya Diploid Hücre Kültürleri**

Primer hücre kültürlerinde üreyen hücrelerin alınarak tekrar tripsin ile ayrıştırılması ve yeniden besleyici ortamlara konularak üretilmesiyle hazırlanırlar. Bu yapılan işleme pasaj adı verilir. Bu tür kültürlerin genellikle 40-50 defa pasajı yapılabilir.

### **1.12.1.3. Sürekli veya Heteroploid Hücre Kültürleri**

Teorik olarak sonsuz pasajları yapılabilir. Genellikle habis tümörlerden elde edilirler. Laboratuvar koşullarında değişime uğrarlar ve kromozom sayıları sabit değildir (Çiçek ve Bilgiç, 2006).

## **1.12.2. Hücre Kültürü Şekilleri**

### **1.12.2.1. Tek Tabaka Hücre Kültürleri**

Hücre kültürü içerisine konulan hücrelerin hareket ettirilmeden inkübe edilmesiyle hazırlanırlar. Hareketsiz olan kültürdeki hücreler, kültür şişesinin yüzeyine yapışarak üremeye devam ederler. Bu sayede bir süre sonra tek tabaka halinde yüzeyi kaplarlar. Sabit tipte inkübasyon sırasında kültür hiç karıştırılmaz. Bu durumda hücreler kültür şişesinin bir yüzeyine yapışırlar. Döner tipte ise kültür şişesi hafif bir şekilde döndürülerek inkübe edilirler. Bu sayede hücreler silindirik şekilde olan şişenin tüm yüzeyine yapışarak ürerler.

### **1.12.2.2. Süspansiyon Hücre Kültürleri**

Kültür şişesi içerisine ekim yapıldıktan sonra, hücrelerin yüzeye yapışmasını engellemek için, hücre kültürleri inkübasyon sırasında mekanik olarak karıştırılır. Bu

sayede üreyen hücreler sıvı içinde süspansiyon halinde bulunurlar. Buna bağılı olarak da hücreler bol miktarda üreme fırsatı yakalarlar. Bu tür kültürler genellikle antijen ve aşı hazırlanmasında kullanılır.

### **1.12.3. Hücre Kültürü Besiyerleri**

#### **1.12.3.1. Hücre Üretme Besiyerleri**

Bu besiyerleri doğal ve sentetik maddelerin belirli oranlarda karıştırılmasıyla hazırlanırlar. Hücrelerin çabuk üremesini aktive etmek için azami düzeyde besleyici madde içerirler. Hücre üremesi maksimum düzeye geldiğinde, ya da hücreler tek tabaka halinde ürediğinde bu besiyeri dökülerek hücre kültürüne virüs ekimi yapılır.

#### **1.12.3.2. Virüs Üretme Besiyerleri**

Hücre kültürlerine virüs ekimi yapıldıktan sonra, kültür içerisine virüs üretme besiyerinden bir miktar ilave edilir. Bu besiyerinin özelliğı hücrelerin üremesini aktive etmeyen, yalnızca hücrelerin canlılıklarını sürdürmesini sağlayan nitelikte olmasıdır. Bu yüzden bu tür besiyerleri daha az besleyici maddeler içerirler.

Besiyerlerinin esasını tamponlanmış fizyolojik tuzlu su oluşturur. Bu sıvı içerisinde anorganik maddeler, vitaminler, enzimler, plazma ve diğere besleyici maddeler bulunur. Ayrıca bakteri ve mantar üremesini engellemek için besiyeri içerisine antimikrobikler katılır.

#### **1.12.4. Kültürde Virüsün Üremesi**

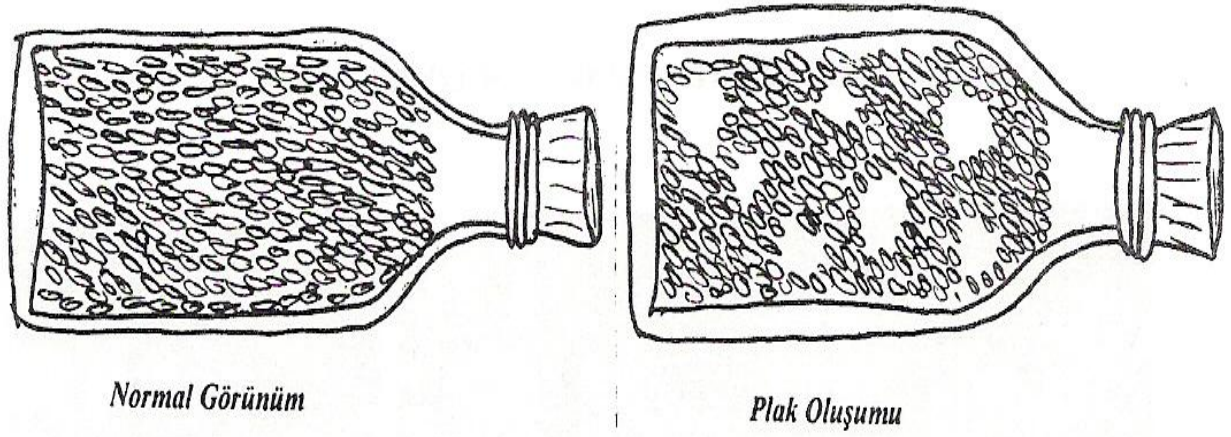
Tek tabaka olmuş hücre kültürleri üzerine virüs ekildikten sonra, virüsün inkübasyon süresine uygun olarak belirli bir süre inkübe edilir. Bu süre sonunda kültürde virüs

üreyip üremediğinin araştırılması gerekir. Kùltürlerde virüs üremesi çeşitli belirtilere bakılarak anlaşılır.

Virüs ile enfekte olan hücrelerde, virüs üremesine bağılı olarak hücrelerin morfolojik yapılarının bozulması, balonlaşması, buldukları yüzeyden hücre kültürü sıvısına dökülmesi, nekrozlaşması ve erimesi gibi görünümlere sitopatik etki adı verilmekte olup kısaca CPE olarak gösterilir (Poyraz).

Hücre kültürlerinde canlı hücrelerin metabolik faaliyetlerine ve artıklarına bağılı olarak besiyerinin başlangıçta nötr olan pH'sı asit tarafa doğru kayar. pH' nın değışimi ise besiyeri içerisine katılan pH indikatörü ile anlaşılır. PH asit tarafa kaydığı zaman besiyerinin pembe olan rengi sarıya dönüşür. Hücre kültürü içerisinde virüs ürettiği zaman, hücrelerin metabolik faaliyetleri durduğu için besiyerinin pH' sı değışmeden kalır. Bu durumda pembe olan besiyerinin rengi değışmez. Yani besiyerinin rengi değışirse virüs üremesi yok, değışmezse virüs üremesi var anlamına gelir.

Tam tabaka olmuş hücre kültürlerine virüs ekildikten sonra, üzerine agar kaplanacak olursa, içerisinde virüs bulunan hücreler etrafında sınırlı bir virüs çoğalması olmaktadır. Enfekte hücrelerin patlamasıyla ortama dökülen virüsler yalnızca kendi çevrelerindeki hücreleri enfekte ederler. Bu durum ise sınırlı hücre erimesine bağılı olarak şeffaf yuvarlak alanların oluşmasına yol açar. Bu şeffaf alanlara plak adı verilmekte olup, gözle görülebilirler. Sağlam hücrelerin bulunduğu alanlar ise bulanık olarak görülür. Agar kaplanmadığı durumlarda dökülen virüsler hücre sıvısına karışarak ortamdaki tüm hücreleri enfekte edeceği için, bu şekilde plak oluşumu gözlenmez. Plak oluşumu yalnızca kültürde CPE yapan virüs üremesi durumunda meydana gelir.



Şekil 1.13, Hücre kültüründe plak oluşumu

Bazı virüslerin hücre kültürlerinde üremesi sırasında, hücre içerisinde inklüzyon cisimciği adı verilen yapılar oluşur. Oluşan inklüzyon cisimciklerini direkt olarak hücre kültüründe görmek mümkün değildir. Bu yüzden hücre kültürlerinden alınan örnek sitolojik yöntemlerle boyanıp, ışık mikroskopunda incelenir. Hücre içinde gerek sitoplazmada, gerekse nükleusta inklüzyon cisimciği olup olmadığı araştırılır. Bazı virüsler girdikleri hücre içinde çekirdekte (herpes, papova, adenovirüsler gibi), sitoplazmada (kuduz, çiçek vb) veya bazıları hem çekirdek hem de sitoplazmada (kızamık, influenza vb) çoğu kez asit boyalar ile boyanıp ışık mikroskopu ile görülebilen cisimler yaparlar. İnküzyon cisimcikleri adı verilen bu cisimcikler bazı virüsler için virüslerin gelişme bölgesi, bazı virüs enfeksiyonlarında virüslerden oluşan kümeler veya herpesvirüslerde olduğu gibi virüslerin üremesinden geriye kalan artık maddelerdir.

### 1.12.5. İnterferens

CPE yapmayan virüslerin tanısına yönelik uygulanan bir deneydir. CPE yapmayan virüs üreme ihtimali olan hücre kültürlerine, inkübasyon süresi sonunda virüs üreyip ümediğini anlamak için, CPE yaptığı kesin olarak bilinen başka bir virüs ekilir. Bir süre inkübe edildikten sonra hücre kültüründe CPE olup olmadığı araştırılır. Eğer CPE görülmezse önceki virüs, sonradan ekilen virüsün üremesine engel olduğu anlamına gelir. CPE oluşumu gözlenirse kültürde önceden virüs üremesi olmadığı

anlaşılır. Yani CPE pozitifse virüs üremesi yok, CPE negatifse virüs üremesi vardır. Bilinen antikorlar kullanılarak çeşitli serolojik deneylerle hücre kültürü sıvısında viral antijenlerin olup olmadığı araştırılır (Poyraz).

### **1.13. HDV Çalışmalarında Kullanılan Hücre Kültür Sistemleri**

Kullanılan hücreler genellikle Huh-7 hücreleri, insan embriyonik böbrek hücreleri, Huh-6 hücreleri ve COS7 hücreleridir. Kullanılan besiyerleri ise Fetal serum ve genetisin ile zenginleştirilmiş modifiye Dulbecco besiyeri, Fetal bovin, penisilin, streptomisin, L-glutamat ile zenginleştirilmiş DMEM besiyeridir.

HDV için kullanılan hücre kültür sistemleri incelenecek olursa 2 tip hücre kültür sistemine rastlanmaktadır.

İlk sistemde HDV genomunun 1-2 veya 3'lü tekrarına sahip plazmitler hücrelere transfekte edilmekte ve plazmit üzerinden HDV RNA'lar çoğalmaktadır (Kuo ve ark., 1989, Macnaughton ve ark., 1993). Bu işlem için öncelikle cDNA kütüphaneleri oluşturulmaktadır. HDV enfekte dağ sıçanlarından (woodchuck) elde edilmiş RNA'lar kütüphaneleri oluşturmak için kullanılmaktadır. Daha sonra bu cDNA'lar plazmit içerisine klonlanmaktadır. Klonlama işleminde ise öncelikle tek HDV cDNA dizisi plazmit içerisine sokulmakta, daha sonra plazmit üzerinde kesimleme enzimleriyle kesimler (digestion) yapılarak ve eklemelerle (insertions) 2 veya 3 tane HDV cDNA'sını art arda içeren plazmit elde edilmektedir (Kuo ve ark., 1989). Bunun için Kuo ve arkadaşları pSVL ekspresyon vektörünü kullanmışlardır ve bu pSVL (D3) plazmiti diğer birçok araştırmacı tarafından kullanılmaktadır (Gudima ve ark., 2004; Pugnale ve ark., 2009). Daha sonra bu plazmit seçilen hücrelere transfeksiyon kimyasalları yardımı ile veya elektroporasyon yöntemi ile transfekte edilmekte, hücrelerden HDV RNA oluşumu gözlenip gözlenmediğinin araştırılması amacıyla total RNA izolasyonu yapılmaktadır. HDV RNA Northern veya Western analizleri, RT-PCR reaksiyonu için kullanılmaktadır. Ayrıca hücreler HDAg'nin varlığını gözlemek için immunoflorasan yöntemle boyanmaktadır.

İkinci sistemde ise HDV RNA'nın *in vitro* transkripsiyonu yapılarak delta antijenini kodlayan mRNA ile birlikte hücrelere transfekte edilmektedir (Glenn ve ark., 1990). Bu işlem için daha önce oluşturulmuş HDV dizisi içeren plazmit kesim enzimleriyle lineer hale getirilmektedir. Genomik ve antigenomik RNA'lar T7 promotor ve sonlandırıcı (terminater) bölgelerini içeren plazmitler *in vitro* transkripsiyon yöntemi ile üretilmektedir. Aynı zamanda delta proteini kodlayan mRNA'larda üretilmektedir. Daha sonra HDV RNA'lar delta proteinin kodlayan mRNA'larla birlikte hücrelere kotransfeksiyonları yapılmaktadır. Total RNA izolasyonu ve HDV varlığını gözlemlemek için yapılan testler ise diğer sistemle aynıdır (Guadima ve ark., 2004).

Bu sistemlerden farklı olarak Chang ve arkadaşları TET kontrolünde HDV replikasyonunu 1 yıl düşük seviyede koruyan bir hücre kültür sistemi geliştirmişlerdir. Bu sistemde hücre hattı 2 tane plazmit ile transfekte edilmektedir. HDV genom replikasyonu RNA transfeksiyonu ile başlamaktadır. Gen ekspresyonu TET kontrolü altında olduğundan TET yokluğunda ortamda düşük seviyede HDAg ve HDV RNA oluşmaktadır. Bu durum da HDV replikasyonunun 1 yıl boyunca korunması gibi bir avantaj sağlamaktadır. Ortama TET eklendiği durumda ise HDV RNA dramatik bir şekilde artmakta ve buna paralel olarak HDAg oranında da artış meydana gelmektedir (Chang ve ark., 2005).

#### **1.14. Amaç**

Hücre kültür sistemleri HDV hayat döngüsünün araştırılmasında, hastalığın oluşum mekanizmalarının veya tedavi yöntemlerinin araştırılmasında sık kullanılan yöntemdir. Hepatit Delta virüsünün replikasyonunun gerçekleştiği hücre kültür sistemi oluşturmak bu çalışmadaki öncelikli amaçtır. Eğer başarılı replikasyon oranları gözlemlenirse, oluşturulan bu sistemin çeşitli antivirallerin virüs replikasyonunun üzerindeki etkinliğinin araştırılması amacıyla kullanılması amaçlanmaktadır.



## 2. GEREÇ ve YÖNTEMLER

### 2.1. Gereçler

#### 2.1.1. Hücre Kültür Hattı

Hepatit Delta virüsü için Huh-7 hücreleri kullanılmıştır. Huh-7 hücre kültür hattı %1 L-Glutamin, %1 penisilin/streptomisin, %10 fetal bovin serum (FBS) ile zenginleştirilmiş DMEM ile büyütülmüştür. Hücreler 37C'de %5 CO<sub>2</sub> içeren inkübatörde çoğaltılmıştır.

#### 2.1.2. Primer ve Problar

Çizelge 2.1, Çalışma için kullanılan primer ve probların dizileri

Primer 5413	5' GCC CAG GTC GGA CCG CGA GGA GGT 3'
Primer 8276	5' ACA AGG AGA GGC AGG ATC ACC GAC 3'
Primer 5414	5' GAG ATG CCA TGC CGA CCC GAA GAG 3'
Primer 5415	5' GAA GGA AGG CCC TCG AGA ACA AGA 3'
J-İ	5' GGT GGA GAT GCC ATG CGG 3'
J-G	5' CAG TGA ATA AAG CGG GTT TCC A 3'
J-Prob	5' CCC GAA GAG GAA AGA AGG ACG CGA GAC G 3' (5' FAM, 3' TAMRA işaretli)

#### 2.1.3. Kimyasal Maddeler

Agaroz	Vivantis, Malezya
Amfisilin	Applichem, Almanya
Dulbecco's MEM	Biochrom, Almanya
DMSO	Applichem, Almanya
dNTP	Fermentas, Avrupa
Etanol	Kimetsan, Türkiye
Fetal Bovin Serum (FBS)	Biochrom, Almanya
FuGENE HD Transfection Reagent	Roche, Almanya

İzopropanol	Applichem, Almanya
Incubation Buffer for AMV	Roche, Almanya
Kloroform	Applichem, Almanya
LB Agar-Powder	Applichem, Almanya
L-Glutamin	Biochrom, Almanya
MgCl <sub>2</sub>	Fermentas, Avrupa
Optimem	GIBCO, Amerika
PBS-Dulbecco	Biochrom, Almanya
Penisilin/Streptomisin	Sigma-Aldrich, İngiltere
RNaz içermeyen su	
Taq Buffer with KCl	Fermentas, Avrupa
Triphan Blue	Biological Industries, İsrail
Tripsin EDTA	Biochrom, Almanya
Trizol	Invitrogen, Amerika
X-treme Gene HP DNA Transfection Reagent	Roche, Almanya

#### 2.1.4. Tampon ve Çözeltiler

##### Agaroz Jel Yükleme Tamponu (6X):

%0,05 Bromofenol mavi, %15 Fikol, %0,05 Ksilen Siyanol

##### Tris Asetik Asit EDTA Tamponu (TAE) (5X):

0,2 M Tris base, 0,09 M Glasiyal asetik asit, 0,05 M EDTA

#### 2.1.5. Enzimler

DNaz I	Macherey-Nagel, Almanya
Taq DNA Polimeraz	Fermentas, Avrupa
Reverse Transcriptase AMV	Roche, Almanya
rTth DNA Polimeraz	Applied Biosystems, Amerika

### 2.1.6. Kullanılan Cihazlar

ABI PRISM 310 Genetic Analyzer	Perkin Elmer, Amerika
Çeker Ocak	clanLAF
Hassas Terazî	Sartorius, Almanya
Jel Görüntüleme Sistemi	Obitek, Türkiye
Karbondiyoksitli İnkübatör	Sanyo, Avrupa
Kuru Blok	Techne, İngiltere
Light Cycler 480 Real-time PCR Cihazı	Roche, Almanya
Mikrodalga	Arçelik, Türkiye
Nanodrop	ACTGene, Amerika
pH metre	Mettler Toledo, İsviçre
Soğutmalı Santrifüj	Hettich, Almanya
Su Banyosu	Memmert, Avrupa
Thermal Cycler PCR Cihazı	Eppendorf, Almanya
Vorteks	Nüve, Türkiye

### 2.1.7. Kullanılan Kitler

Nucleospin Plasmid	Macherey Nagel, Almanya
High Pure Viral RNA Kit	Roche, Almanya
Taqman EZ-RT PCR Core Reagent	Applied Biosystems, Amerika
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Amerika

## 2.2. Yöntemler

### 2.2.1. Bakteride Plazmit Üretilmesi

1. 50 ml sıvı besiyerine (LB Broth) 50 mg amfisilin eklendi
2. Besiyeri 15 ml'lik falkonlara 5 ml olacak şekilde dağıtıldı.

3. —80 °C’de dobdurulmuş bakteri stoğundan pipetin ucuna alınarak besiyerine ekim yapıldı.
4. Bakteriler 1 gece 37 °C’de karıştırıcıda büyütüldü.

### **2.2.2. Plazmit DNA İzolasyonu**

1. Falkonların içerisindeki pipet ucu çıkarıldı ve *E.coli* LB besiyeri 5000 rpm’de 20 dakika santrifüj edildi.
2. Süpernatant atıldı.
3. Pelet 250 µl A1 tamponu içerisinde çözüldü.
4. Üzerine 250 µl A2 tamponu eklendi ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
5. 300 µl A3 tamponu da eklenerek 11000 rpm’de 10 dakika santrifüj edildi.
6. Süpernatant silikalı tüplere aktarıldı ve 1 dakika 11000 rpm’de santrifüj edildi.
7. 600 µl A4 tamponu eklendi ve 1 dakika 11000 rpm’de santrifüj edildi.
8. Tüpler 2 dakika 11000 rpm’de boş çevrildi.
9. Silikalı tüpler eppendorf tüplerine aktarıldı ve 50 µl su eklendi.
10. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi.
11. 11000 rpm’de 1 dakika santrifüj edildi.

### **2.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi (%1’lik)**

1. 35 ml 1X TAE tamponu içerisine 0,35 g agaroz eklendi.
2. Karışım mikrodalgada ısıtıldı ve içerisine etidyum bromid eklendi.
3. Jel donduktan sonra yükleme yapıldı ve 100V’da jel yürütüldü.
4. UV altında plazmitler gözlemlendi.

#### 2.2.4. Plazmit Delta PCR Yöntemi

İzolasyonu yapılan plazmitlerin hepatit delta virüsünün cDNA'sını içerip içermediklerini kontrol amacıyla Nested-PCR yöntemi ile PCR'ları yapıldı.

##### I. Tur PCR Reaksiyonu:

- İleri primer (10 pmol) : 2 $\mu$ l
- Geri primer (10 pmol) : 2 $\mu$ l
- 10X Taq Tampon : 5 $\mu$ l
- dNTP (2 mM) : 5 $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> : 3 $\mu$ l
- Taq DNA polimeraz : 0,5 $\mu$ l
- dH<sub>2</sub>O : 27,5 $\mu$ l
- Plazmit : 5 $\mu$ l

##### I. Tur PCR Reaksiyon Koşulları:

- 95 °C 5 dakika
- |            |   |          |
|------------|---|----------|
| 95 °C 30 s | } | 35 Döngü |
| 60 °C 30 s |   |          |
| 58 °C 30 s |   |          |
| 56 °C 30 s |   |          |
| 72 °C 30 s |   |          |
- 72 °C 7 dakika

##### II. Tur PCR Reaksiyonu:

- İleri primer (10 pmol) : 2 $\mu$ l
- Geri primer (10 pmol) : 2 $\mu$ l
- 10X Taq Tampon : 5 $\mu$ l
- dNTP (2 mM) : 5 $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> : 3 $\mu$ l
- Taq DNA polimeraz : 0,5 $\mu$ l
- dH<sub>2</sub>O : 29,5 $\mu$ l
- Kalıp DNA : 3 $\mu$ l

## II. Tur PCR Reaksiyon Koşulları:

94 °C 5 dakika	
94 °C 30 s	} 30 Döngü
60 °C 30 s	
72 °C 1 dakika	
72 °C 7 dakika	

### 2.2.5. Agaroz Jel Elektroforezi

1. % 1'lik agaroz jel hazırlandı.
2. Delta PCR'ları yapılan plazmitlerden içlerinde delta olanlar görüntülendi.

### 2.2.6. Huh-7 Hücrelerin Transfeksiyon İçin Sayımı ve Ekimi

1. Flaskların içerisindeki besiyeri atıldı.
2. PBS ile yıkama yapıldı.
3. Tripsin-EDTA eklendi ve tüm yüzeye yayıldı.
4. Tripsin-EDTA atıldıktan sonra flasklar 37 °C'de bir süre bekletildi (yaklaşık 2dakika).
5. Hücrelerin yüzeyden kalktığı gözlemlendi ve içerisine besiyeri eklenerek, al-ver ve duvara çarpıtırma yöntemi ile toplu hale gelmiş hücrelerin birbirinden ayrılması sağlandı.
6. Eppendorf tüpüne 12,5 µl hücre 12,5 µl triphan blue eklendi.
7. Hücre sayımı yapılacak olan hemositometre alkolle temizlendi ve üzeri lamla kapatılarak, arada kalan bölgeye triphan blue ile boyanmış hücreler koyuldu.
8. Mikroskopta canlı hücrelerin sayımı yapıldı. (Canlı hücreler şeffaf, cansız hücreler mavi renkte olanlar).
9. Hücre sayımı yapılırken hep aynı 4 karedeki hücrelerin sayımı yapıldı.
10. Sayım yapıldıktan sonra hesaplamalar yapılarak hücreler ekildi.

6 kuyucuklu tabak için her kuyuya 2 ml besiyeri,  $5 \times 10^5$  hücre ekildi.

24 kuyucuklu tabak için her kuyuya 500  $\mu$ l besiyeri,  $5 \times 10^4$  hücre ekildi.

Hesaplamalar için ise aşağıdaki formül kullanıldı;

$5 \times 10^4 \times 2 \times$  hücre sayısı

$\div$  (dilüsyon oranı)

### 2.2.7. İçerisinde Delta Olan Plazmitlerin Huh-7 Hücrelerine Transfeksiyonu

Kuyulara ekilen hücelere eklenmek üzere transfeksiyon karışımı hazırlandı.

Kompleks için:

1. Eppendorf tüpüne optimum besiyeri eklendi (karışımı 100  $\mu$ l'ye tamamlayacak şekilde)
2. GFP 0,1  $\mu$ g olacak şekilde besiyerinin ortasına eklendi, karışım birazcık çalkalandı.
3. Delta plazmiti 2  $\mu$ g olacak şekilde besiyerinin ortasına eklendi, karışım birazcık çalkalandı.
4. FuGENE HD Transfection Reagent 5  $\mu$ l olacak şekilde karışımın ortasına eklendi, karışım birazcık çalkalandı.
5. Karışım 15–20 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Karışım hücelere zarar vermeden hücrelerin tam ortasına bırakıldı.
7. Transfekte edilmiş hücreler inkübatöre kaldırıldı.

Aynı şekilde X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent için de bir karışım hazırlandı.

1. Eppendorf tüpüne 100  $\mu$ l optimum besiyeri eklendi.
2. GFP 0,1  $\mu$ g olacak şekilde besiyerinin ortasına eklendi, karışım birazcık çalkalandı.
3. Delta plazmiti 1  $\mu$ g olacak şekilde besiyerinin ortasına eklendi, karışım birazcık çalkalandı.
4. FuGENE HD Transfection Reagent 4  $\mu$ l olacak şekilde karışımın ortasına eklendi, karışım birazcık çalkalandı.

5. Karışım 30 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi.
6. Karışım hücrelere zarar vermeden hücrelerin bulunduğu kuyuya damla damla dağıtıldı.
7. Transfekte edilmiş hücreler inkübatöre kaldırıldı.

### 2.2.8. Hücre Kültüründen Örnek Toplanması

Ekimi ve transfeksiyonu yapılmış hücrelerden her gün örnekler toplanarak virüs replikasyon oranları gün gün taranmıştır. Örnek toplama işlemi Trizol kullanılarak yapılmıştır.

1. Besiyeri kuyulardan çekildi ve atıldı.
2. Kuyulara Trizol eklenerek pipetle al-ver işlemi yapıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübe edildi (6 kuyucuklu tabaklar için 1ml Trizol, 24 kuyucuklu tabaklar için 250 µl Trizol kullanıldı).
3. İnkübasyondan sonra örnekler eppendorf tüplerine alındı.
4. Örnekler çalışılacaksa hemen izolasyon işlemine geçildi.
5. Daha sonra izolasyonu yapılacak örnekler ise -80 °C’de saklandı.

### 2.2.9. Total RNA İzolasyonu

Total RNA izolasyonu Molecular Research Center’den alınmıştır. Aşağıdaki miktarlar 6 kuyucuklu tabak için geçerlidir. 24 kuyucuklu tabakta ise bu miktarların ¼ oranları kullanılmaktadır.

1. Trizol ile toplanan hücrelere 200 µl kloroform eklendi, 15 s vortekslendi, 2-15 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12000 rpm’de 4 °C’de 15 dakika santrifüj edildi.
2. Üstte kalan sıvı faz (aqueous) yeni eppendorf tüpüne alındı, üzerine 500 µl izopropanol eklendi, 5-10 s vortekslendi, 5-10 dakika oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 12000 rpm’de 4-25 °C’de 8 dakika santrifüj edildi.



3. Süpernatant atıldı, pellet 1ml %75'lik etanolle yıkandı. 7500 rpm'de 4-25 °C'de 5 dakika santrifüj edildi.
4. Etanol uzaklaştırıldı, pelletler 3-5 dakika kurutuldu.
5. 100 µl Rnaz içermeyen su eklenerek 55-°60 C'de 10-15 dakika bekletildi.
6. RNA'lar çalışılmak üzere -80 °C'de saklandı.

### 2.2.10. DNaz ile Muamele

DNaz ile muamele için kullanılan örnek miktarları:

- RNA : 1 µg :
- 10X DNaz I reaksiyon tamponu : 1 µl
- DNaz I : 1 µl
- DEPC-su : 10 µl'ye tamamlandı

Oda sıcaklığında 15 dakika inkübe edildi. Daha sonra DNaz I inaktivasyonu için her örneğe 1 µl 25 mM EDTA solüsyonu eklendi ve 10 dakika 65 °C'de ısıtıldı. RNA örnekleri amplifikasyona hazır hale getirildi.

### 2.2.11. Real-Time RT PCR

HDV Real-Time PCR EZ-Taqman kiti kullanılarak yapılmaktadır ve bu sistem laboratuvarımızda doptimize edilmiştir.

PCR Reaksiyonu:

- dH<sub>2</sub>O : 2,6µl
- EZ-Taqman Tamponu : 2,5µl
- Mangan : 1,5µl
- dATP : 0,4µl
- dGTP : 0,4µl
- dUTP : 0,4µl
- dCTP : 0,4µl
- primer (J-ileri)(10 pmol) : 0,5µl

- primer (J-geri)(10 pmol) : 0,5µl
- prob (J)(5 pmol) : 0,5µl
- UNG : 0,1µl
- rTth DNA polimeraz : 0,25µl
- RNA : 2,5µl

**Çizelge 2.2, HDV Real-Time RT PCR Reaksiyon Koşulları**

		40 Döngü		
UNG Aktivasyonu	Ters Transkripsiyon	UNG İnhibisyonu	Denaturasyon	Bağlanma/Uzama
50 °C 2 dakika	60 °C 30 dakika	95 °C 5 dakika	94°C 20 saniye	60 °C 1 dakika

### 2.2.12. Konvansiyonel PCR

Konvansiyonel PCR’da ise Reverse-Transcriptase PCR yapılmaktadır. Öncelikle RNA’lardan komplementer DNA (cDNA) üretilmekte, daha sonra Nested-PCR yapılarak DNA’lar çoğaltılmaktadır.

cDNA Reaksiyonu:

- Geri primer (10 pmol) : 2µl
- dNTP (2 mM) : 4µl
- AMV RT Tampon : 4µl
- dH<sub>2</sub>O : 4,8µl
- AMV Reverse Transcriptase : 0,2µl
- RNA : 5µl

cDNA Reaksiyon Koşulları:

42 °C’de 1,5 saat

I. Tur PCR Reaksiyonu:

- İleri primer (10 pmol) : 2µl
- Geri primer (10 pmol) : 2µl

- 10X Taq Tampon : 5 $\mu$ l
- dNTP (2 mM) : 5 $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> : 3 $\mu$ l
- Taq DNA polimeraz : 0,5 $\mu$ l
- dH<sub>2</sub>O : 27,5 $\mu$ l
- cDNA : 5 $\mu$ l

I. Tur PCR Reaksiyon Koşulları:

95 °C 5 dakika

95 °C 30 s	}	35 Döngü
60 °C 30 s		
58 °C 30 s		
56 °C 30 s		
72 °C 30 s		

72 °C 7 dakika

II. Tur PCR Reaksiyonu:

- İleri primer (10 pmol) : 2 $\mu$ l
- Geri primer (10 pmol) : 2 $\mu$ l
- 10X Taq Tampon : 5 $\mu$ l
- dNTP (2 mM) : 5 $\mu$ l
- MgCl<sub>2</sub> : 3 $\mu$ l
- Taq DNA polimeraz : 0,5 $\mu$ l
- dH<sub>2</sub>O : 29,5 $\mu$ l
- Kalıp DNA : 3 $\mu$ l

II. Tur PCR Reaksiyon Koşulları:

94 °C 5 dakika

94 °C 30 s	}	30 Döngü
60 °C 30 s		
72 °C 1 dakika		

72 °C 7 dakika

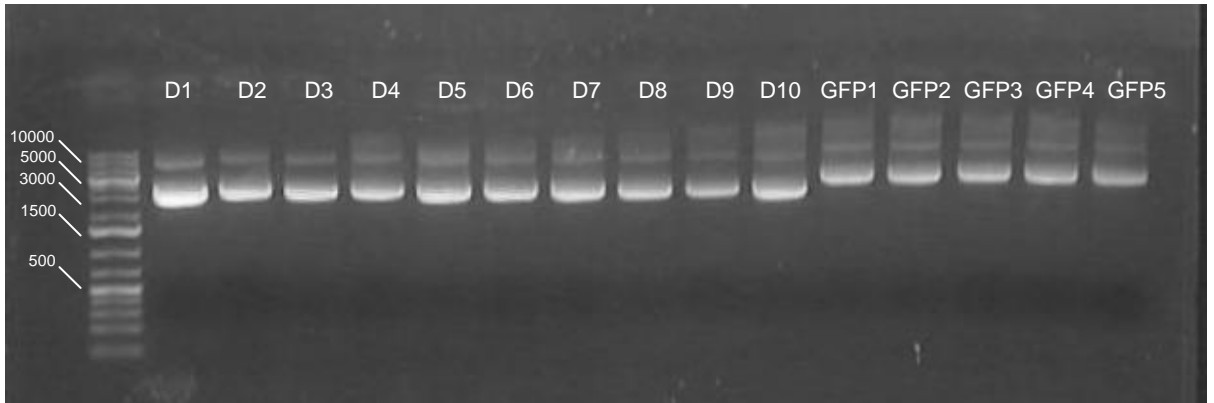
### **2.2.13. Agaroz Jel Elektroforezi**

1. % 1'lik agaroz jel hazırlandı.
2. Delta PCR'ları yapılan hücre kültür örneklerinden hücre içerisine girip replike olan hepatit delta virüsleri görüntüledi.

### 3. BULGULAR

#### 3.1. Bakteride Plazmit Üretimi

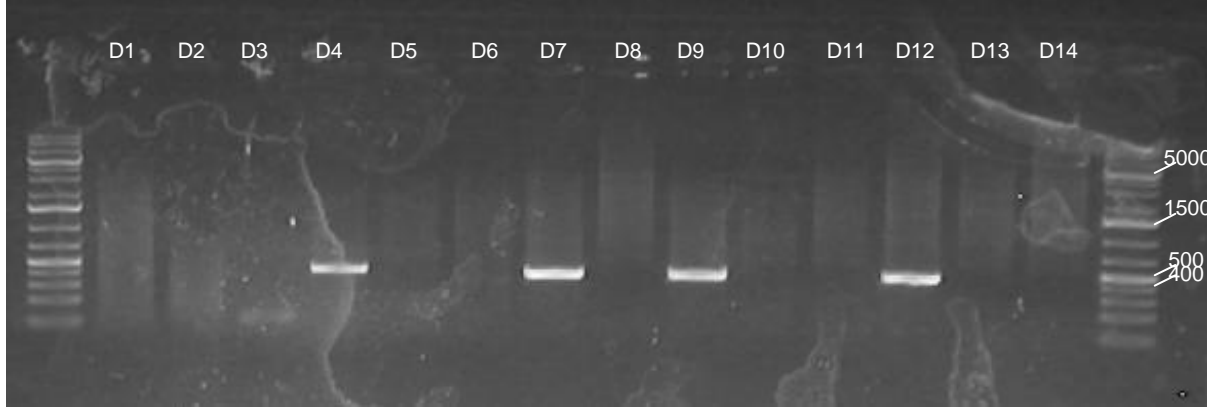
Bakteride çoğaltılan plazmitler izole edilmiş ve izole edilen plazmitler jelde görüntülenmiştir (Şekil 3.1). Daha sonra bu plazmitlerin yoğunlukları nanodrop ile ölçülmüştür. Ayrıca kontrol plazmiti olarak kullanılacak olan GFP üreten plazmitlerde aynı yöntemle büyütülüp, izole edilmiştir.



Şekil 3.1, İzole edilmiş plazmitlerin Delta plazmitlerinin ve GFP'lerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

#### 3.2. Plazmit Delta PCR Yöntemi

İzole edilmiş plazmitlerin nested-PCR yöntemi ile amplifikasyonu yapılmış ve böylece içlerinde delta cDNA'sını içeren plazmitlerin PCR'ları pozitif çıkmıştır (Şekil 3.2). Bu plazmitler hücre kültüründe transfeksiyon yapılmak üzere +4 C'de saklanmıştır.



Şekil 3.2, Delta PCR'ları yapılmış olan plazmitlerin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi

### 3.3. Plazmitin İçerisinde Bulunan Delta'nın Genom Dizisi

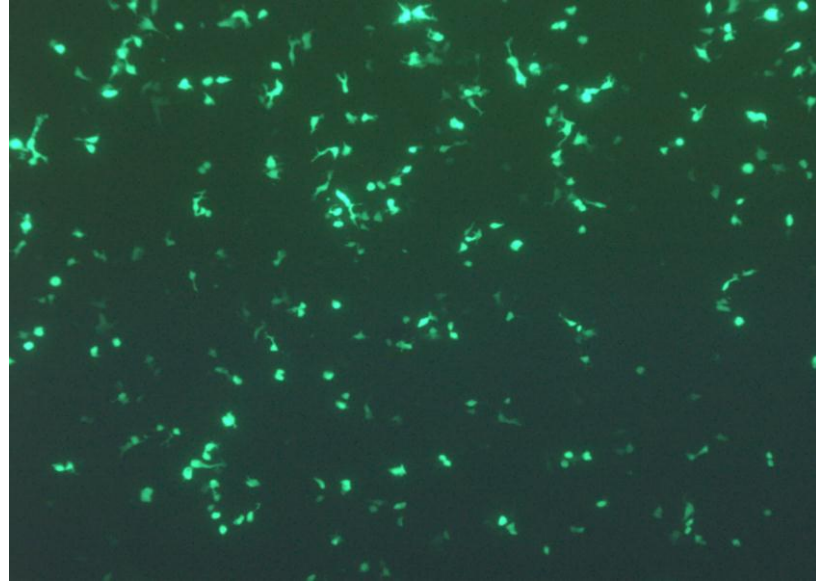
```

TCACCTCCAGAGGACCCCTTCAGCGAACAGAAGAGTCTTCAGGATCAGGAGTAAGACCA
TAGCGATGGGGGAGATGCTAGGAGTTAGAGGAGACCGAAGCGAGGAGGAAAGCAAAG
AAAGCAACGGGGCTAGTCGGCAGGTGTTCCGCCCCCGAGAGGGGAAGAGTGAGGCTTA
TCCCGGGGAACCTCGGCGTATCGTCCCCACATAGCAGCTCCCGAGCCCCCTCCTAAAATGA
CCGGAGGTGGAGCTTGGAGCGCGAGGGGACCCAGCGGAGCCATGGGATGCCCTTCCCGA
TTCCGTCCATCCCCACCCGAGAGGGTTCGCCAGGAATGGCGGGACCCCACTCAACTGG
GGTCCGCGTTCATCCTTTCTTACCTGATGGCCGGCATGGTCCCAGCCTGCTCGCTGGCGC
CGGCTGGGCAACATTCCGAGGGGACCGTCCCCTCGGTAATGGCGAATGGGACCCAGAAA
TCTCTCTAGATTCCAGAGAGAATCGAGAGAAAACCTGGCTCTCCCTTAGCCATCCGAGAG
GGACGTCTGTCCTCCTTCGGATGCCAGGTTCGGACCCGCGAGGAGGTGGAGATGCCATGC
CGACCCGAAGAGGAAAGAAGGACGCGAGACGCAAACCCGTGAGTGGATAACCCGTTTATT
CACTGGGGTTCGACAACTCTGGGGAGAGAAGGGAGGATCGGATGGGAAGAGTATATCCTA
TGGAATCCCTGAGTCCCCCTCGTGTCCAGCCCATCCCCGTGTCTGTGGAAGGGGGACTC
CGGACGCCTTGCATGCTGGGGACGAAGCCGCCCCCGGGCGCTCCCCTCTGTCCACCTTC
GAGGGGGTTCACACCTCCAGTCGACGGGCCGGCTACTCTTCTTTCCCTTCTCTCGTCTTCC
TCGGTCAACCTCTTGAGTTCCTTCTTCTCCTCCCTGCTGAGGTTCTTCCCTCCTCC

```

### 3.4. İçerisinde Delta Olan Plazmitlerin ve GFP'lerin Huh-7 Hücrelerine Birlikte Transfeksiyonu

Hücreler ekildikten sonra transfeksiyonları FuGENE HD Transfection Reagent kullanılarak yapılmıştır. Kontrol plazmidi olan GFP'ler transfeksiyon yapıldıktan 48-72 saat sonra mikroskop altında görüntülenmiştir (Şekil 3.3). Böylece plazmitlerin hücre içerisine başarı ile girdikleri anlaşılmıştır.



Şekil 3.3, Kontrol plazmiti GFP'lerin hücre kültüründe mikroskop altında görünümü

Ayrıca hücreler ekildikten sonra transfeksiyonları X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent kullanılarak yapılmıştır ve burada da GFP'ler kontrol plazmiti olarak kullanılmıştır.

### 3.5. Real-Time RT PCR

Hücre kültüründen belirli günlerde toplanan örneklerin Trizol kimyasalı yöntemi ile total RNA izolasyonları yapılmış, daha sonra bu RNA'ların HDV Real-Time RT PCR'ları yapılmıştır (Tablo 3.1 ve 3.2).

Çizelge 3.1, RT-PCR Sonuçları (FuGENE HD Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)

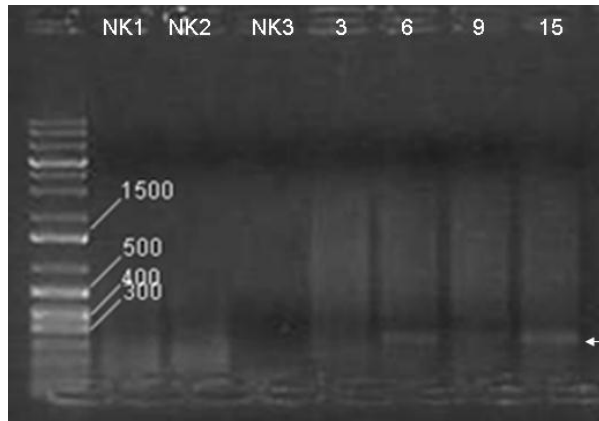
3.gün	$1,0 \times 10^2$ kopya/ml
6.gün	$1,5 \times 10^4$ kopya/ml
9.gün	$6,5 \times 10^3$ kopya/ml
13.gün	$3,1 \times 10^3$ kopya/ml
15.gün	$7,1 \times 10^3$ kopya/ml

**Çizelge 3.2,** RT-PCR Sonuçları (X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)

2. gün	$3,7 \times 10^2$ kopya/ml
3.gün	$6,7 \times 10^2$ kopya/ml
4.gün	$7,3 \times 10^2$ kopya/ml
5.gün	$1,4 \times 10^3$ kopya/ml
6.gün	$5,4 \times 10^2$ kopya/ml
7.gün	$5,0 \times 10^2$ kopya/ml
8.gün	$5,3 \times 10^2$ kopya/ml
9.gün	$3,7 \times 10^2$ kopya/ml
10.gün	$2,9 \times 10^2$ kopya/ml
11.gün	$8,7 \times 10^1$ kopya/ml
12.gün	$1,3 \times 10^2$ kopya/ml
13. gün	$1,7 \times 10^2$ kopya/ml

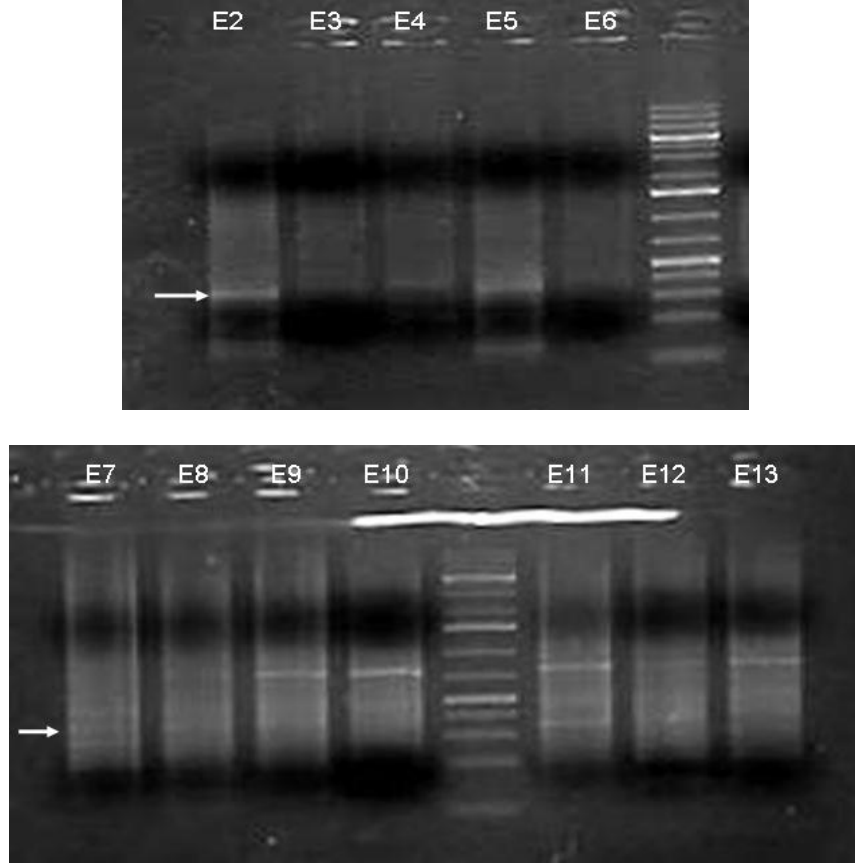
### 3.6. Konvansiyonel PCR

Hücre kültüründen belirli günlerde toplanan örneklerin Trizol kimyasalı yöntemi ile total RNA izolasyonları yapılmış, daha sonra bu RNA'lerden cDNA elde edilmiş, bunların da nested-PCR yöntemi ile amplifikasyonu yapılmıştır (Şekil 3.4, 3.5).



**Şekil 3.4,** Hücre kültüründen toplanan örneklerden elde edilmiş total RNA'ların delta PCR'larının %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (FuGENE HD Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)





**Şekil 3.5,** Hücre kültüründen toplanan örneklerden elde edilmiş total RNA'ların delta PCR'lerinin %1'lik agaroz jelde görüntülenmesi (X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent kullanılarak yapılan deney)

#### 4. TARTIŞMA

Hepatit Delta virüsü hücre kültür sistemleri virüsün yaşam döngüsünün araştırılmasında, hücreye giriş, replikasyon, hücreden çıkış gibi adımlarda gerçekleşen mekanizmaların moleküler olarak araştırılmasında, hastalık oluştuğunda meydana gelen fizyolojik durumların incelenmesinde ve antiviral tedavi yöntemlerinin gelişimi için çeşitli ilaç ve ilaç bileşenlerinin denenmesinde kullanılmaktadır. Bunun için HDV cDNA'sını içeren plazmit veya HDV RNA ile birlikte delta antijenini kodlayan mRNA transfeksiyonu yapılmaktadır. Bu çalışmada kullanılan sistemde ise HDV cDNA'sını içeren plazmit hücreye gönderilmektedir. Hücreye transfeksiyon için ise kimyasal yöntem kullanılmaktadır. Bu çalışmada Roche markasının iki farklı ürünü transfeksiyon için kullanılmıştır. Öncelikle FuGENE HD Transfection Reagent kullanılarak deney optimizasyonu sağlanmıştır. Kitin protokolünde kullanılan oranlar sırasıyla denenmiştir; 3:2, 4:2, 5:2, 6:2, 7:2, 8:2, 9:2, 10:2,11:2, 12:2. Burada DNA miktarı hep sabit kalmış (2 µg/µl), transfeksiyon kimyasalı ise yukarıdaki oranlarda denenmiştir. Yüksek replikasyon oranları için önerilen ekstra 9–12 arasındaki oranlarda da çalışılmıştır ve HDV replikasyonu 5:2 oranında gözlemlenmiştir. Daha sonra bu oran tekrarlanmış ve hücreler belirli gün aralıklarıyla toplanarak total RNA izolasyonları yapılmış, elde edilen RNA'lardan RT-PCR ve Real-time RT-PCR deneyleri yapılmıştır. Total RNA izolasyonu için Trizol kimyasalı yöntemi (Molecular Research Center) kullanılmış, aynı zamanda viral RNA izolasyonu da denenmiştir. Daha sonra Trizol kimyasalı ile izolasyon yönteminin kullanılması karşılaştırılmıştır. İzolasyondan sonra işlem sırasında alınmış olabilecek DNA'lardan kurtulma amacı ile DNaz ile muamele işlemi yapılmıştır çünkü var olan DNA'lar Real-time RT-PCR deneyini etkileyebilmektedir. Ayrıca hücre kültürüne transfekte edilmiş olan ve hücreler toplanırken yıkama sırasında arta kalmış olan plazmitlerden kurtulma amacı ile de bu DNaz ile muamele işlemi yapılmaktadır. Muamele işlemi bittikten sonra PCR ile üretilen DNA'ları da parçalayabilme etkisi olduğundan dolayı bu DNaz'lar inaktif hale getirilmiştir. Tüm bu işlemlerden sonra PCR deneyleri yapılmıştır.

Sonuçlar karşılaştırıldığında virüs kopya sayısına en çok ( $1,5 \times 10^4$  kopya/ml ) 6. günden alınan örneklerde rastlanmıştır. Daha sonra deney tekrarlamak için aynı malzemedan istenmiş ancak firma FuGENE HD Transfection Reagent yerine onun bir sonraki versiyonu X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent üretmeye başladığından deney bu malzeme ile tekrar optimize edilmiştir. Burada ise yine kitin önerdiği şekilde farklı oranlar denemiştir; 1:1, 2:1, 3:1, 4:1, 5:1, 6:1. HDV replikasyonu bu deneyde 4:1 oranında gözlemlenmiş ve bu oranda deney tekrarlanarak, hücre kültüründen her gün örnekler toplanmıştır. Bu örneklerden total RNA izolasyonları yapılmış ve daha sonra aynı şekilde RT-PCR ve Real-time RT-PCR deneyleri yapılmıştır. Sonuçlar incelendiğinde ise virüs kopya sayısına en çok ( $1,4 \times 10^3$  kopya/ml) 5. günden alınan örneklerde rastlanmıştır. Her iki deneyin de sonuçları incelendiğinde FuGENE HD Transfection Reagent ile yapılan ilk deneyde daha yüksek virüs kopya sayısı gözlenmiştir. Ancak bu sayı da antiviral ilaçların çalışabilmesi için yeterli bir kopya sayısı değildir. Daha sonra kullanılan X-treme GENE HP DNA Transfection Reagent ile yapılan deneylerde virüs kopya sayısı çok düşmüştür. Buna sebep olarak kimyasal gösterilebilir ancak hücrelerin uzun süre pasajlanması ve plazmitlerin stoklarından çıkarılarak tekrar elde edilmelerindeki süreçlerde de deneysel hatalar meydana gelmiş olabilir. Transfeksiyon esnasında birçok farklı oran ve inkübasyon sürelerini denemesine rağmen her iki kimyasal için de virüs kopya sayısı yüksek oranda elde edilememiştir.

Sonuçlara bakıldığında yeni bir transfeksiyon yöntemi veya kimyasalının denemesinden önce, genç hücre hattı ile ve yeniden tasarlanmış plazmit ile deney baştan optimize edilmelidir. Böylece daha yüksek oranlarda virüs replikasyonu elde edilebilir ve böylece sistem üzerinde antiviral denemeleri yapılabilir.

## 5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Deneyin sonuçları incelendiğinde virüs replikasyonu sistemde gözlemlenmiştir ancak bu oran istenilen miktarda olmamıştır. Farklı kimyasallar denendiği için yeni bir deney tasarlandığında öncelikle plazmit baştan üretilmeli ve HDV cDNA'nın 3'lü kopyasını içermesi gerekmektedir çünkü replikasyonun artırılması için makaleler tarafından önerilen 3'lü kopyaya sahip plazmitlerdir. Aynı zamanda farklı hücre hatlarında deney oranları denenebilir, böylece HDV'nin yaşadığı *in vitro* ortam uygun şekilde sağlanarak belki replikasyon oranı artırılabilir. Böylece istenilen sistem elde edilmiş ve antiviral denemeleri için uygun ortam sağlanmış olur.

## ÖZET

### **Yeni Antiviral Moleküllerin Taranması İçin Hepatit Delta Virüsünün Replikasyon Olabildiği Hücre Kültür Sisteminin Oluşturulması**

Bu çalışmada yeni antiviral moleküllerin taranması için Hepatit delta virüsünün replikasyon olabildiği hücre kültür sisteminin oluşturulması amaçlanmaktadır. Bunun için öncelikle hücre kültür sistemi için yaygın olarak kullanılan Huh-7 hücre hattı seçilmiş ve bu hücreler kültürde büyütülmüştür. Daha sonra transfeksiyona hazır hale gelen Huh-7 hücrelerine, HDV cDNA'sını içeren plazmit kimyasal yöntem kullanılarak transfekte edilmiştir. Transfeksiyonda pozitif kontrol olarak GFP kullanılmıştır ve HDV plazmiti ile GFP transfeksiyonu birlikte yapılmaktadır. GFP ışınları transfeksiyonun başarılı olduğu anlamına gelmektedir. Daha sonra hücre kültür sisteminden örnekler toplanıp, trizol kimyasalı yöntemi ile total RNA izolasyonu yapılmıştır. Bu örneklerden HDV Real-Time RT PCR yöntemi ile virüs kopya sayısı belirlenmiş ve HDV genomunun replikasyon oranına bakılmıştır. Real-Time RT PCR ve konvansiyonel PCR sonuçları incelendiğinde sistemde virüs replikasyonu gözlemlenmiştir, ancak istenilen yükseklikte kopya sayısı elde edilememiştir. Replikasyonun en çok olduğu günler ise 5. ve 6. günler olarak görülmüştür. Bu sistem ileri aşamalarda virüs üzerinde ilaç etkileşimlerinin gözlemlenmesi amacıyla kullanılabilir, ancak ilaç etkileşimlerini incelemek için virüs kopya sayısı yükseltilmelidir.

**Anahtar Sözcükler:** Hepatit delta virüsü, HDV Real-Time RT PCR, Huh-7, hücre kültürü, replikasyon.

## SUMMARY

### **Development of a Novel Cell Culture System For Hepatitis Delta Virus Genome Replication to Study New Antiviral Agents**

The aim of this study is development of a novel cell culture system for hepatitis delta virus genome replication to study new antiviral agents. Firstly, common Huh-7 cell line was selected and they were cultured. After cultivation, plasmid wich contains HDV cDNA sequence and GFP were cotransfected into the cell line chemically. Transfection was accepted succesful by controling GFP under fluorecence microscopy. After controling, samples were collected from cell culture and total RNA was extracted with Tri Reagent method. Total RNAs were amplified by Real-Time RT PCR and conventional PCR methods. According to Real-Time RT PCR results, HDV could replicate in system, but the viral load copy was not enuough for studying antiviral agents. The highest viral load was seen in 5. and 6. days. This system is using for studying antiviral agents-virus interaction, but viral load must be increased.

**Key words:** Cell culture, hepatitis delta virus, HDV Real-Time RT PCR, Huh-7, replication.

## 5. KAYNAKLAR

- ALTUGLU, I., OZACAR, T., SERTOZ, R. Y., ERENZOY, S. (2007). Hepatitis delta virus (HDV) genotypes in patients with chronic hepatitis: molecular epidemiology of HDV in Turkey. *Int J Infect Dis.* **11**: 58-62
- BEHZADIAN, F., SABAHI, F., SADEGHIZADEH, M., MAGHSOUDI, CHAHOOKI, F., KARIMI, M. (2007). In vitro replication of HDV using a new construct containing a cDNA dimer of HDV genome. *Intervirology.* **50**: 387-93.
- BOZDAYI, A. M., ASLAN, N., BOZDAYI, G., TURKYILMAZ, A. R., SENGEZER, T., WEND, U., ERKAN, O., AYDEMİR, F., ZAKIRHODJAEV, S., ORUCOV, S., BOZKAYA, H., GERLICH, W., KARAYALCIN, S., YURDAYDIN, C., UZUNALIMOGLU, O. (2004). Molecular epidemiology of hepatitis B, C, and D viruses in Turkish patients. *Arch Virol.* **149**: 2115–2129.
- CASEY, J. L., (2003). Hepatitis Delta Virus RNA Editing. *Hepatitis Delta Virus.* HANDA, H., YAMAGUCHI, Y.
- CASEY, J. L., BROWN, T. L., COLAN, E. J., WIGNALL, F. S., GERIN, J. L. (1993). A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci USA.* **323**: 508-514.
- CHANG, J., GUADIMA, S. O., TARN, C., NIE, X., TAYLOR, J. M. (2005). Development of a novel system to study hdv genome replication. *J Virol.* **79**: 8182-8.
- CHANG, J., GUDIMA, S. O., TAYLOR, J. M. (2005). Evolution of hepatitis delta virus RNA genome following long-term replication in cell culture. *J Virol.* **79**: 13310-6.
- CHANG, J., PROVOST, P., TAYLOR, J. M. (2003). Resistance of human hepatitis delta virus RNAs to dicer activity. *J Virol.* **77**: 11910-7.
- CHANG, J., TAYLOR, J. M. (2003). Susceptibility of human hepatitis delta virus RNAs to small interfering RNA action. *J Virol.* **77**: 9728-31.
- CHOU, H. C., HSIEH, T. Y., SHEU, G. T., LAI, M.M. (1998). Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J Virol.* **72**: 1684-90.
- ÇİÇEK, C., BİLGİÇ, A. (2006). Klinik Viroloji Laboratuvarında Uzmanlık Öğrencisine Verilen Hücre Kültürü Eğitim Programı: Bir Model, *İnfeksiyon Dergisi.* **20**: 231-241.

- FREDERIC, L. G., ELYANNE, G., MARIE, P. R., JEAN, S., JEAN, C. T., EMMANUEL, G., PAUL, D. (2006). Eight Major Clade for hepatitis delta virus. *Emerging Infectious Diseases*. **12**: 1447-1450.
- GAETA, G. B., STROFFOLINI, T., CHIARAMONTE, M., ASCIONE, T., STORNAIUOLO, G., LOBELLO, S., SAGNELLI, E., BRUNETTO, M. R., RIZZETTO, M. (2000). Chronic hepatitis D: a vanishing disease? An Italian multicenter study. *Hepatology*. **32**: 824-827.
- GANEM, D., SCHNEIDER, R. (2001). Hepadnaviridae: The viruses and their replication. *Virology*. 2923-2969.
- GERIN, J. L., L, C. J., PURCELL, R. H. (2001). Hepatitis Delta virus. *Virology*. 3037-3050.
- GLENN, J. S., TAYLOR, J. M., WHITE, J. M. (1990). In vitro synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cell. *J. Virol.* **64**: 104-7.
- GLENN, J. S., WATSON, J. A., HAVEL, C. M., WHITE, J. M. (1992). Identification of a prenylation site in delta virus large antigen. *Science*. **256**: 1331-1333.
- GRECO-STEWART, V. S., SCHISSEL, E., PELCHAT, M. (2009). The hepatitis delta virus RNA genome interacts with the human RNA polymerase I and III. *Virology*. **386**: 12-15.
- GUDIMA, S. O., CHANG, J., TAYLOR, J. M. (2004). Features affecting the ability of hepatitis delta virus RNAs to initiate RNA-directed RNA synthesis. *J Virol.* **78**: 5737-44.
- GUADIMA, S.O., CHANG, J., TAYLOR, J.M. (2005). Reconstitution in cultured cells of replicating HDV RNA from pairs of less than full-length RNAs. *RNA* **1**: 90-8.
- HSIEH, T. H., LIU, C. J., CHEN, D. S., CHEN, P. J. (2006). Natural course and treatment of hepatitis d virus infection. *Formos Med Assoc.* Vol **105-11**: 871.
- HUANG, Z. S., WU, H. N. (1998). Identification and characterization of the RNA chaperone activity of hepatitis delta antigen peptides. *J Biol. Chem.* **273**: 26455-461.
- HUGHES, S. A., WEDEMEYER, H., HARRISON, P. M. (2011). Hepatitis delta virus. *Lancet*. **378**: 74.
- IMAZEKI, F., OMATA, M., OHTO, M. (1991). Complete nucleotide sequence of hepatitis delta virus RNA in Japan. *Nucleic Acids Res.* **19**: 5439-5440.
- Internet Scientific Publications. The Biology of HDV. Erişim: [[http://www.ispub.com/journal/the\\_internet\\_journal\\_of\\_tropical\\_medicine/volume\\_1\\_number\\_2\\_62/article\\_printable/developments\\_in\\_hepatitis\\_delta\\_research.html](http://www.ispub.com/journal/the_internet_journal_of_tropical_medicine/volume_1_number_2_62/article_printable/developments_in_hepatitis_delta_research.html)]. Erişim Tarihi: 01.06.2011
- IVANIUSHINA, V., RADJEF, N., ALEXEEVA, M., GAULT, E., SEMENOV, S., SALHI, M., KISELEV, O., DENY, P. (2001). Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia. Russia *J Gen Virol.* **82**: 2709-2718.



- JENG, K. S., SU, P. Y., LAI, M. M. (1996). Hepatitis delta antigen enhances the ribozyme activities of hepatitis delta virus RNA in vivo. *J Virol.* **70**: 4205-4209.
- KUO, M. Y. P., CHAO, M., TAYLOR, J. (1989). Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J Virol.* **63**: 1945-50.
- LAI, M. M. (1995). The molecular biology of hepatitis delta virus. *Annu Rev Biochem.* **64**: 259-286.
- LAI, M. M., (2003). Hepatitis Delta antigen: Biochemical properties and functional roles in HDV replication. *Hepatitis Delta Virus*. HANDA, H., YAMAGUCHI, Y.
- LAU, D. T., DOO, E., PARK, Y., KLEINER, D. E., SCHMID, P., KUHNS, M.C., HOOFNAGLE, J. H. (1999). Lamivudine for chronic delta hepatitis. *Hepatology.* **30**: 546-549.
- LEE, C. M., CHANGCHIEN, C. S., CHUNG, J. C., LIAW, Y. F. (1996). Characterization of a new genotype II hepatitis delta virus from Taiwan. *J Med Virol.* **49**: 145-154.
- MACNAUGHTON, T. B., SHI, S. T., MODAHL, L. E., LAI, M. M. C. (2002). Rolling Circle Replication of hepatitis delta virusRNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J of Virol.* **76**: 3920-3927.
- MACNAUGHTON, T. B., WANG, Y. J., LAI, M. M. C. (1993). Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavages. *J Virol.* **67**: 2228-34.
- NIE, X., CHANG, J., TAYLOR, J. M. (2004). Alternative processing of hepatitis delta virus antigenomic RNA transcripts. *J. Virol.* **78**: 4517-4524.
- NIRO, G. A., CIANCIO, A., GAETA, G. B., SMEDILE, A., MARRONE, A., OLIVERO, A., STANZIONE, M., DAVID, E., BRANCACCIO, G., FONTANA, R., PERRI, F., ANDRIULLI, A., RIZZETTO, M. (2006). Pegylated interferon alpha-2b as monotherapy or in combination with ribavirin in chronic hepatitis delta. *Hepatology.* **44**: 713-20.
- NIRO, G. A., SMEDILE, A., ANDRIULLI, A., RIZZETTO, M., GERIN, J. L., CASEY, J. L. (1997). The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. *Hepatology.* **25**: 728-734.
- PASCARELLA, S., NEGRO, F. (2010). Hepatitis D Virus: an update. *Liver International.* 1478-3223.
- POLISH, L. B., GLLAGHER, M., FIELDS H. A., HADLER, S. C. (1993). Delta Hepatitis: Molecular Biology and Clinical and Epidemiological Features. *Clinical Microbiology Reviews.* Vol **6**. No 3.
- POYRAZ, Ö. Virüslerin Üretilmeleri. Erişim: [tipedu.cumhuriyet.edu.tr/Donem3/Mikrop/viruslerin\_uretilmeleri.ppt]. Erişim Tarihi: 01.06.2011

- PUGNALE, P., PAZIENZA, V., GUILLOUX, K., NEGRO, F. (2009). Hepatitis Delta Virus inhibits alpha interferon signaling. *Hepatology*. **49**: 398-406.
- RIZZETTO, M., CANESE, M. G., ARICÒ, S., CRIVELLI, O., TREPO, C., BONINO, F., VERME, G. (1977). Immunofluorescence detection of a new antigen-antibody system associated to the hepatitis B virus in the liver and in the serum of HBsAg carriers. *Gut*. **18**: 997-1003.
- RIZZETTO, M., HOYER, B., CANESE, M. G., SHIH, J. W. K., PURCELL, R. H., GERIN, J. L. (1980). 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, USA*. **77**: 6124-6128.
- SAKUGAWA, H., NAKASONE, H., NAKAYOSHI, T., KAWAKAMI, Y., MIYAZATO, S., KINJO, F., SAITO, A., MA, S. P., HOTTA, H., KINOSHITA, M. (2003). Hepatitis delta virus genotype IIb predominates in an endemic area, Okinawa, Japan. *J Med Virol*. **58**: 366-372.
- SHAKIL, A. O., HADZIYANNIS, S., HOOFNAGLE, J. H., DI BISCEGLIE, A. M., GERIN, J. L., CASEY, J. L. (1997). Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta virus genotype I. *Virology*. **234**: 160-167.
- SONSUZ, A. (2002). Kronik Hepatit B ve Delta. İ.Ü. Cerrahpaşa Tıp Fakültesi Sürekli Tıp Eğitimi Etkinlikleri: Sempozyum Dizisi. No **28**: 67-68.
- Swiss Institute of Bioinformatics. Delta Virus. Erişim: [[http://www.expasy.ch/viralzone/all\\_by\\_species/175.html](http://www.expasy.ch/viralzone/all_by_species/175.html)]. Erişim Tarihi: 01.06.2011
- TAYLOR, J. M. (2003). Replication of human hepatitis delta virus: Recent developments. *Trends Microbiol*. **11**: 185-190.
- WATANABE, H., NAGAYAMA, K., ENOMOTO, N., CHINZEI, R., YAMASHITO, T., IZUMI, N., YATSUHASHI, H., NAKANO, T., ROBERTSON, B. H., NAKASONE, H., SAKUGAWA, H., WATANABE, M. (2003). Chronic hepatitis delta virus infection with genotype IIb variant is correlated with progressive liver disease. *J Gen Virol*. **84**: 3275-3289.
- WU, J. C., CHIANG, T. Y., SHEEN, I. J. (1998). Characterization and phylogenetic analysis of a novel hepatitis D virus strain discovered by restriction fragment length polymorphism analysis. *J Gen Virol*. **79**: 1105-1113.
- XIA, Y. P., YEH, C. T., OU, J. H., LAI, M. M. (1992). Characterization of nuclear targeting signal of hepatitis delta antigen: nuclear transport as a protein complex. *J Virol*. **66**: 914-921.
- ZHANG, Y. Y., TSEGA, E., HANSSON, B. G. (1996). Phylogenetic analysis of hepatitis D viruses indicating a new genotype I subgroup among African isolates. *Journal of Clinical Microbiology*. **34**: 3023-3030.

## ÖZGEÇMİŞ

- Adı Soyadı** : İnci ÇELİK  
**Doğum Yeri** : Afyon  
**Doğum Tarihi** : 02.10.1985  
**Uyruğu** : TC  
**Medeni Durumu** : Bekar  
**Adres** : 1.Dedeefendi Sokak No:70/13 Kurtuluş ANKARA  
**Telefon** : 0546 451 5880  
**Eğitimi**
- Yüksek Lisans** :Ankara Üniversitesi, Sağlık Bilimleri Enstitüsü-  
Hepatoloji Enstitüsü  
**Lisans** : İstanbul Teknik Üniversitesi, Moleküler Biyoloji ve  
Genetik, 2008  
**Lise** : Manavgat Anadolu Lisesi, 2003
- Yabancı Dil** : İngilizce, 2010 ÜDS-86  
**Mesleki Deneyim** :
- Ankara Üniversitesi, Tıp Fakültesi, Hepatoloji Enstitüsü (2009-2011)
  - Ref-gen Biyoteknoloji Ltd. Şti. (Ocak-Ağustos 2009)
  - Bio-tek 987 Medikal Cihazlar Sistem Ltd. Şti (Ağustos-Aralık 2008)
- Projeler** :
- Bioremediation of Textile Dyes- İTÜ Lisans Bitirme Projesi
  - FMF Strip Assay- Refgen TEYDEB Projesi
  - Complete Genome Sequences and Phylogenetic Analysis of Hepatitis Delta Viruses Isolated From Nine Turkish Patients –Ankara Üniversitesi Hepatoloji Enstitüsü
- Kongreler-Seminerler** :
- 1. Moleküler Biyoloji ve Genetik Öğrenci Kongresi “Biyomimetik” Çalıştayı, İstanbul (8-11 Eylül 2007)
  - 20. Ulusal Biyokimya Kongresi, Kapadokya (29 Ekim- 1 Kasım 2008)
  - Immundiagnostik ([www.immundiagnostik.com](http://www.immundiagnostik.com)) Distribütör Günleri, Bensheim-Almanya (17-18 Kasım 2008 )

- Medica 2008, Dusseldorf-Almanya (19-22 Kasım 2008 )
- Hepatoloji Sempozyumu (9-11 Nisan 2009)
- ESCV (European Society of Clinical Virology) Sempozyumu (27-30 Ekim 2010)
- EASL Monothematic Conference: Delta Hepatitis-İstanbul (24-26 Eylül 2010)
- Ankara Biyoteknoloji Günleri (8-10 Kasım 2010)
- Ulusal Hepatoloji Kongresi (1-5 Haziran 2011)