

163987

TÜRKİYE CUMHURİYETİ
ANKARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**shRNA İLE HBV REPLİKASYONUNUN
IN VITRO OLARAK BASKILANMASI**

Handan KAYHAN

**DİSİPLİNERARASI HEPATOLOJİ ANA BİLİM DALI
YÜKSEK LİSANS TEZİ**

DANIŞMAN

Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI

2005-ANKARA

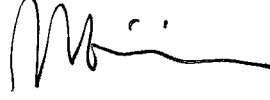
Ankara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü

Disiplinlerarası Hepatoloji Yüksek Lisans Programı

Çerçevesinde yürütülmüş olan bu çalışma, aşağıdaki jüri tarafından
Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

Tez Savunma Tarihi: 14/07/2005

Prof. Dr. Meral ÖZGÜÇ
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ




Prof. Dr. Cihan YURDAYDIN
ANKARA ÜNİVERSİTESİ



Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ



Doç. Dr. Ramazan İdilman
ANKARA ÜNİVERSİTESİ



Prof. Dr. A. Mithat BOZDAYI
ANKARA ÜNİVERSİTESİ





Aileme ve Erdem'e

İÇİNDEKİLER

Kabul ve Onay	ii
İçindekiler	iv
Simgeler ve Kısaltmalar	v,vi
Şekiller	vii
Resimler	viii
Tablolar	ix
1. GİRİŞ	1
1.1 Hepatit B Virüsü	1
1.1.1 Hepatit B Virüsünün Genom Yapısı	4
1.1.2 HBV'nin Yaşam Döngüsü	10
1.1.3 HBV genotipleri	16
1.2 RNA interferans	17
1.2.1 RNAi Mekanizmasının Tanımlanmasının Tarihsel Süreci	17
1.2.2 RNA İnterferans Mekanizması	23
1.3 HepG2.2.15 Hücre hattı	31
1.4 Transfeksiyon	33
1.5 Çalışmanın Amacı	36
2. GEREÇ VE YÖNTEM	37
2.1 Gereçler	37
2.2 Yöntemler	43
3. BULGULAR	57
4. TARTIŞMA	69
5. SONUÇ VE ÖNERİLER	77
ÖZET	78
SUMMARY	79
KAYNAKLAR	80
ÖZGEÇMİŞ	99

SİMGELER VE KISALTMALAR

bç	Baz çifti
C	Kor ("core")
cccDNA	Kapalı kovalent sirküler DNA
DHBV	Ördek hepatit virüsü
DNA	Deoksiribonükleik asit
DNaz	DNA'yı parçalayan enzim
FBS	Fetal büyükbaş hayvan serumu ("Fetal Bovine Serum")
HBcAg	Hepatit B kor antijeni
HBeAg	Hepatit B e antijeni
HBsAg	Hepatit B yüzey antijeni
HBV	Hepatit B virüsü
HepG2.2.15	Stabil HBV' ekspresyonu yapan insan hepatoblastoma hücre hattı
IFN	İnterferon
kb	Kilo baz
LHB	Büyük yüzey antijeni
MHB	Orta yüzey antijeni
mRNA	Mesajcı RNA
nt	Nükleotid.
ORF	Açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame)
P1686	HBV X geni üzerinde 1686- 1705 nükleotidler arasındaki pregenomik RNA sekanslarını hedef alan, shRNA eksprese edici plazmid.
P2228	HBV prekor geni üzerindeki 2228- 2247 nükleotidler arasındaki pregenomik RNA sekanslarını hedef alan, shRNA eksprese edici plazmid.
P765	HBV S geni üzerinde 765- 784 nükleotidler arasındaki pregenomik RNA sekanslarını hedef alan, shRNA eksprese edici plazmid.
PCR	PZR (Polimeraz zincir reaksiyonu).
PENTRY	Kanamisin direnç geni içeren bir plazmid.

PreC	Prekor ("precore")
Pregenome	Pregenomik RNA
RISC	RNA tetikli susturma kompleksi ("RNA induced silencing Comlex")
RNA	Ribonükleik asit
RNAi	RNA İnterferans
RNaz	RNA'yı parçalayan enzim.
S	Yüzey ("surface")
SHB	Küçük yüzey antijeni
shRNA	Küçük U şeklinde RNA'lar ("small hairpin RNAs")
siRNA	Küçük engelleyici RNA'lar ("small interfering RNAs")
µl, µg	Mikro litre, mikro gram



ŞEKİLLER

Şekil 1 :	Dünya'daki HBsAg prevalansı.	2
Şekil 2 :	Hepadnaviridae ailesi.	3
Şekil 3 :	HBV mRNA'ları.	5
Şekil 4 :	HBV genom organizasyonu.	6
Şekil 5 :	Kor promotor ve "enhancer" II kompleksi.	7
Şekil 6 :	HBV zarf proteinleri.	11
Şekil 7 :	HBV'nin yaşam döngüsü.	13
Şekil 8 :	HBV genomunun replikasyonu.	15
Şekil 9:	Memelilerde çift zincirli RNA sentezi yapan virüse verilen interferon yanıtı.	19
Şekil10 :	RNAi teknolojisinin gelişim süreci.	22
Şekil 11 :	siRNA (küçük engelleyici RNA molekülü).	23
Şekil 12:	RNA interferans mekanizması.	27
Şekil 13:	Plazmid-vektör aracılı RNA interferans.	29
Şekil 14:	Geçici ve kalıcı transfeksiyon seçenekleri.	35
Şekil 15:	P1686	57
Şekil 16:	P2228	59
Şekil 17:	P765	59
Şekil 18:	Tek zincirli shRNA oligonükleotidlerinin birleştirme reaksiyonu sonucu çift zincirli hale getirilmesini gösteren jel fotoğrafları.	61
Şekil 19:	Klonlama sonucu pENTRY plazmitlerin jel fotoğrafı.	62
Şekil 20:	Plazmidlerin shRNA sekanslarının klonlanmış olduğu bölgenin PZR ile çoğaltılması sonucu ortaya çıkan 311 bç.lik ürün.	62
Şekil 21:	M13 primeriyle yapılan sekans analizi.	63
Şekil 22:	P1686 ile HBV DNA inhibisyonu.	67
Şekil 23:	P2228 ile HBV DNA inhibisyonu.	67
Şekil 24:	P765 ile HBV DNA inhibisyonu.	68
Şekil 25:	P1686, P765 ve P2228 ile HBV DNA inhibisyonu.	68
Şekil 26:	Yalancı plazmid ("scrambled") ile HBV DNA inhibisyonu.	69
Şekil 27:	Tüm sonuçların karşılaştırılması.	69

RESİMLER

- Resim 1: Elektron mikroskopunda HBV'nin küresel ve tübüler yapıları. 4
- Resim 2: HepG2.2.15 hücrelerinin 5x büyütme ile mikroskop altındaki görüntüsü. 32
- Resim 3: GFP'li bir plaktan bir alanın fotoğrafı. 64



TABLolar

Tablo 1: HBV subtiplerinin Dünya'daki dağılımı.	16
Tablo 2: 2001 yılına kadar yapılan bazı RNA interferans çalışmaları.	19
Tablo 3: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler.	37
Tablo:4 HepG2 2.15 hücrelerindeki HBV <i>ayw</i> genomu.	44
Tablo 5: Transfeksiyon planı.	55
Tablo 6: Hedef HBV genom sekansının sens ve antisens zincirleri ve bunlar üzerinde yapılan değişiklikler.	60
Tablo 7: Her bir plaktaki GFP sayısı.	64
Tablo 8: Transfeksiyon sonrasında HBV DNA düzeyindeki değişiklikler.	65



1.GİRİŞ

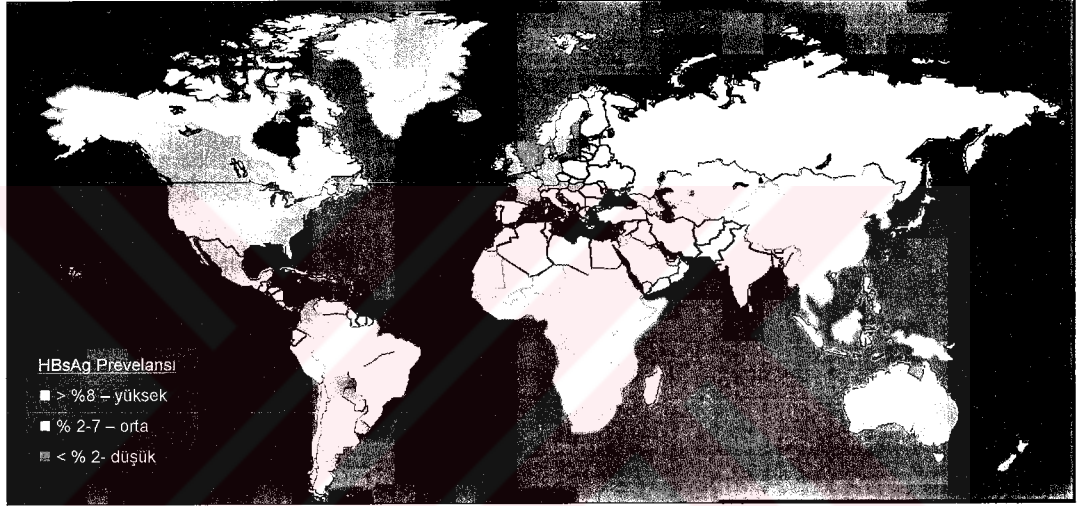
1.1. HEPATİT B VİRÜSÜ

Hepatit B virüsü (HBV) insanları enfekte eden en küçük genoma sahip virüstür. Sadece ~3200 baz büyüklüğünde, kısmen çift zincirli bir DNA molekülünden oluşan bir genomu vardır. Bu kadar küçük olan genomunu son derece akıllıca kullanır. HBV'nin genomunu bu kadar etkili kullanmasının nedeni üst üste çakışan okuma çerçevelerine (ORF) sahip olmasıdır. Kor, polimeraz ve yüzey genleri birbirlerini kapsar ve transkripsiyon yapıldığında bu genler her bir protein için tekrar okunur. HBV, böylece genomunu % 67 tekrar okuyarak replikasyon döngüsünü tamamlar (Simmonds, 2001). Bu, genomunu %67 oranında sıkıştırıp kullanabildiği anlamına gelmektedir.

Viral hepatit ilk olarak milattan önce 5. yüzyılda Hippocrates tarafından tanımlanmıştır. Tarihte özellikle savaşlar sırasında sarılık salgınları görülmüştür. Ancak bunlar Hepatit A virüsüne bağlı sarılık vakaları olabilir (Mahoney, 1999). Simmonds'a göre (2001) HBV genotiplerine ve HBV genomundaki baz değişikliği hızına dayanarak bir tahmin yapılırsa HBV 2300- 3100 yıl önce insanlarda ortaya çıkmış olabilir. Norder ve arkadaşlarının (1994) teorisine göre ise HBV 100 000 yıl önce modern insanın Afrika'dan göçüyle ortaya çıktı. Bollyky ve arkadaşlarına (1997) göre HBV Amerika'da ortaya çıktı ve son 400 yılda Avrupa'luların kolonizasyon hareketleri nedeniyle Avrupa'ya oradan da tüm Dünya'ya yayıldı.

Kan ve kan ürünleriyle bulaşan hepatit formu ilk kez 1883 yılında Lurman tarafından tanımlanmıştır (Robinson,1990) . 1965 yılında ilk defa Blumberg tarafından Hepatit B yüzey antijeni - HBsAg tanımlanmış, 1970 yılında ise Dane ve arkadaşları elektron mikroskobu altında HBV'nin üç partikülüne rastlamışlar, bunlardan 42 nm çapında olan ve bulaşıcı özellik gösteren partikülü "Dane partikülü" olarak tanımlamışlardır (Dane 1970, Purchell 1993).

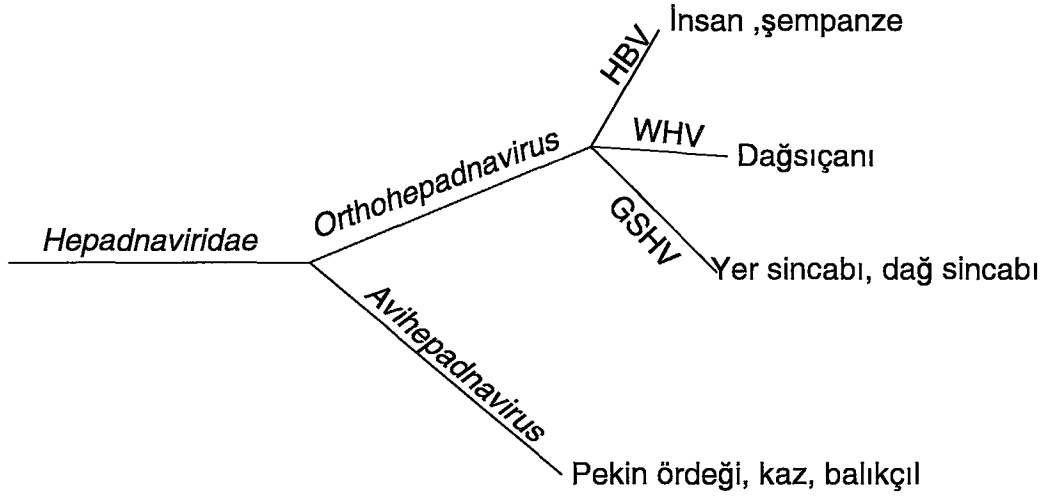
HBV enfeksiyonu bugün dünyada en yaygın enfeksiyonlardan biridir. Serolojik verilere göre dünya nüfusunun üçte biri yani yaklaşık 2 milyar insan HBV ile geçmişlerinde ya da şu anki yaşamlarında karşılaşmışlardır (Şekil 1). Her yıl yaklaşık 1 milyon HBV'ye bağlı karaciğer hastalığı, siroz veya karaciğer kanseri nedeniyle hayatını kaybetmektedir (Kane ve ark. 1995, Margolis ve ark. 1998). Şu anda kronik Hepatit B enfeksiyonuna sahip insanların sayısı 400 milyonu aşmıştır (Lee ve ark. 1997). Dünya sağlık örgütü rakamlarına göre karaciğer kanseri 530 000 vakanın %82'sinin (316 000) nedeni HBV enfeksiyonudur (WHO report, 1996).



Şekil 1: Dünya'daki HBsAg prevalansı. CDC (Centers for Disease Control and Prevention) HBV slaytlarından yararlanılmıştır.

HBV Hepadnaviridae ailesine mensup bir virüstür. Bu aile DNA virüslerini içermekle birlikte retrovirüslerle ortak bazı replikasyon özellikleri gösterirler. Hepadnaviridae ailesi Orthohepadnavirus genusu ve Avihepadnavirus genusunu kapsar. Orthohepadnavirus HBV, WHV (Woodchuck hepatitis virus) ve GSHV (Ground Squirrel hepatitis virus) memeli virüslerinden oluşur. Avihepadnavirus genusu ise pekin ördeklerini kazları ve balıkçılları (Çin, Amerika Birleşik Devletleri) enfekte eden DBHV'den (Duck hepatitis B virus) oluşur. HBV insanları ve şempanzeleri enfekte ederken (tüm Dünya), WHV Kuzey ve Güney Amerika'da Marmota monax dağ sıçanını, GSHV ise yer sincabı Spermophilus beecheyi ve arctic

yer sincabı *Spermophilus parryi* memelilerini (California, Amerika Birleşik Devletleri) enfekte eder. (Şekil 2).



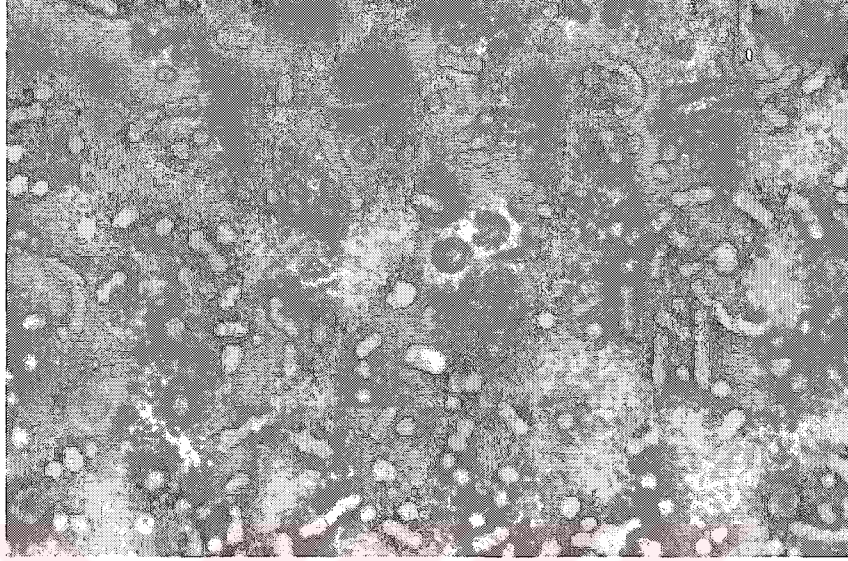
Şekil 2: Hepadnaviridae ailesi.

Hepatit B virüsü vücuda girdikten sonra belirli organlara yönelen ve replikasyonunu bu organlarda tamamlayan bir virüstür. Karaciğer ve dolayısıyla hepatositler HBV'nin ana hedefidir. Tüm Hepadnaviridae ailesi üyeleri replikasyon döngülerini hepatositlerde tamamlar. Pankreas, böbrek ve lenfoid sistemdeki bazı hücrelerde HBV enfeksiyonuna hedef olabilirler. Ancak bu hücrelerdeki viral replikasyonla ilgili veriler yeterli değildir (Seeger, Mason. 2000).

HBV'nin saflaştırılmış örnekleri elektron mikroskopunda incelendiğinde üç tip parçacığa rastlanmıştır (Robinson, 1990):

- 42 nm. (42- 47 nm.) çapında, bulaşıcı özellikte küresel Dane parçacıkları;
- 22 nm. (16- 25 nm.) çapında, içi boş, bulaşıcı özelliği olmayan küresel parçacıklar. Bunlar Dane parçacıklarından yaklaşık 10 000-1 000 000 kat fazla bulunurlar (Ganem, 1996);

- c. 22 nm. apında tübüler yapıdaki parçacık. Bu parçacık özellikle virüs replikasyonunun olduğu kişilerin serumunda bulunur ve bulaşıcı özelliğe sahip değildir (Resim 1).



Resim 1: Elektron mikroskopunda HBV'nin küresel ve tübüler yapıları. CDC (Centers for disease control and prevention) HBV slaytlarından yararlanılmıştır.

Bu üç parçacık enfekte serumda yüksek miktarda (200- 500 mg/ml) bulunan HBsAg adı verilen yüzey antijenine sahiptirler. Kanda Dane parçacıkları 10^4 - 10^9 parça/ml iken bulaşıcı olmayan parçacıklar 10^{13} parça/ml ya da daha fazladır (Robinson,1990 ve 1991) .

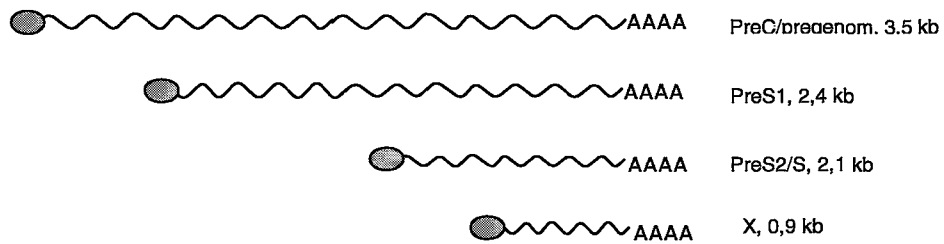
1.1.1 HEPATİT B VİRÜSÜNÜN GENOM YAPISI

HBV genomu yaklaşık 3200 baz çifti uzunluğunda kısmen çift sarmallı, sirküler bir DNA molekülüdür. HBV DNA zerindeki EcoRI restriksiyon kesim noktası genomun numaralandırılmasında referans alınır ve sıfır başlangıç noktası olarak kabul edilir. Sirküler formu 5' uçlarındaki yapışkan uçlarla sağlanır (Sattler, 1979). Moleküler ağırlığı $2,3 \times 10^6$ daltondur. G/C oranı yaklaşık % 49'dur. HBV DNA'sı olağandışı bir formdadır. Çünkü iki DNA zinciri birbirine tam simetrik değildir. DNA sarmallarından birisi 3200 nükleotid uzunluğundaki uzun zincir (L ya da negatif zincir), diğeri 1800 -2700 nükleotid uzunluğunda olan kısa zincirdir (S ya da pozitif zincir). Uzun (negatif) zincir 5'-ucuna kovalent bağlarla bağlı bir protein ve 9- 10 bazlık bir nükleotid

çıkıntısı bulundurur (Gerlich, 1980). Bu protein ve nükleotid çıkıntısı kısa zincirin tamamlanması ve cccDNA (süper kıvrımlı, kapalı, sirküler DNA) oluşumunda görev alır. Kısa (pozitif) zincir ise 5'-ucunda 18 bazlık bir oligoribonükleotid içerir. Bu oligoribonükleotid de kısa zincirin tamamlanması sırasında primer görevi görür (Lien 1986, Mahoney 1999, Ganem 1996).

Viral DNA'nın sirküler yapısı her iki zincirinde 5'-uçlarında bulunan yapışkan bölgelerin birbirine tutunmasıyla sağlanır. Bu bölgeler 11 bazlık tekrar dizilerinden oluşan DR ("direct repeats") bölgeleridir. Negatif zincirin 5'-ucundaki tekrar hattı DR1, pozitif zincirin 5'-ucundaki tekrar hattı ise DR2 olarak adlandırılır.

HBV genomundan ayrı ayrı proteinleri kodlayan 4 farklı açık okuma çerçevesinin (ORF: open reading frame) transkripsiyonu yapılır. Bunlar S proteini, C, X ve Pol ORF'leridir. Tıpkı ökaryotik mRNA'larda olduğu gibi viral transkriptler 5'-uçlarında "cap" (şapka yapısı) ve 3'-uçlarında poliadenilasyon sinyali içerirler (Şekil 3). Ancak bu ORF'leri kodlayan negatif zincirdeki nükleotid sekansları üst üste çakışan sekanslardır. Yani genler iç içe girmiştir. Bu şekilde virüs tüm ORF'ler için genomunu bir buçuk kat daha fazla okutur ve böylece genomundan normalden bir buçuk kat fazla yararlanır. Tüm mRNA'ların 3'-uçları ortak sekans içerir. Farkları, 5'-uçları ve uzunluklarıdır (Şekil 3,4).



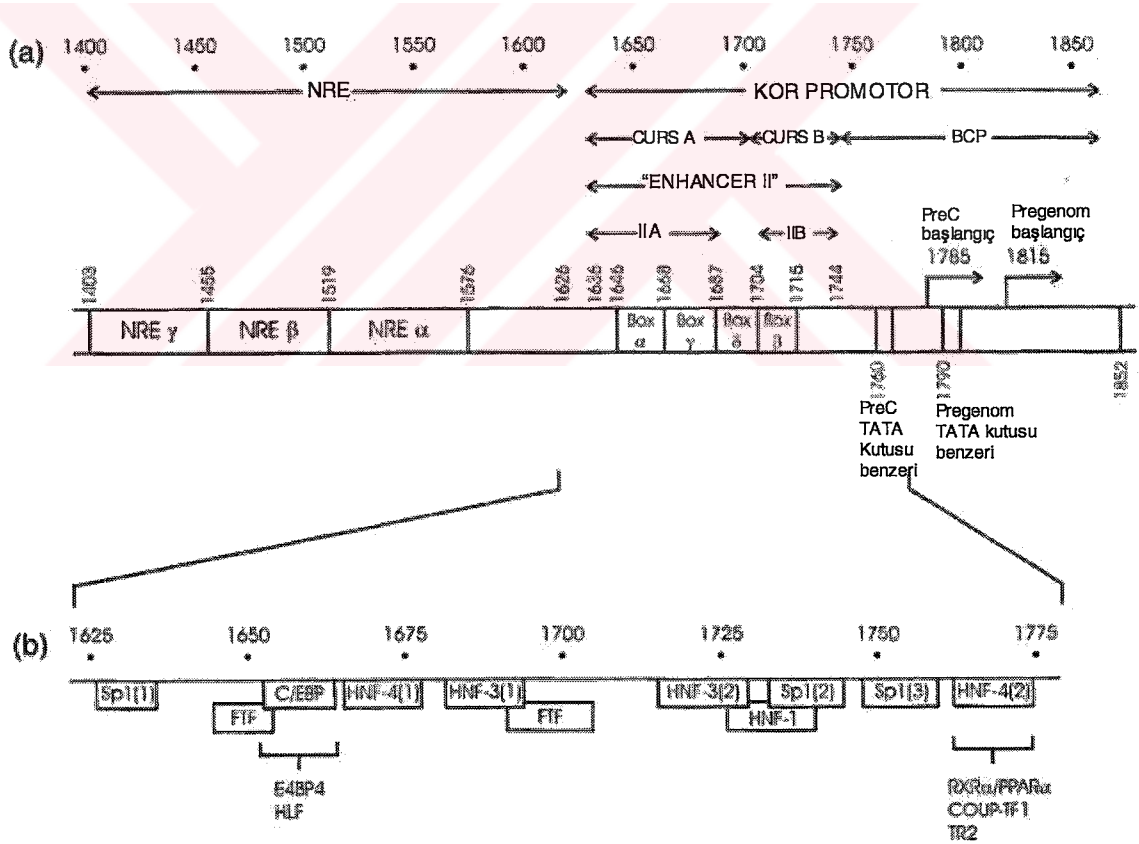
Şekil 3: HBV mRNA'ları.

HBV'de dört mRNA olmasına rağmen yedi değişik protein üretilir. 3,5 kilobazlık prekor/pregenom mRNA'sından HBeAg (PreC/C geninden), HBcAg (C geninden) ve HBV DNA polimeraz (Polimeraz geninden) proteinleri sentezlenirken bu mRNA aynı zamanda ters transkripsiyon için kalıp görevi

sekanslarına bağlanır. Bu bağlanmada transkripsiyon faktörleri de önemli görevler alır. Bu faktörler ayrıca transkripsiyonun etkin bir şekilde başlamasını sağlarlar. Sonuçta transkripsiyonun ne kadar olacağı ve dolayısıyla HBV proteinlerinin ne kadar sentezleneceği tüm bu transkripsiyon faktörlerinin, “enhancer” ve regülatör elementlerin aktivitesine bağlıdır.

HBV’de transkripsiyon dört promotarla başlatılır: preC/pregenomik (kor promotor), S1, S2 ve X promotorları:

- a) HBV kor promotor hem preC hem de pregenomik mRNA’nın transkripsiyonunu başlatır. Bu yüzden virüsün yaşam döngüsü için önemlidir. Kor promotor bazal kor promotorundan ve bir regülatör elementten oluşur. Bu regülatör element kor promotor sekansından önce gelir (Moolla, 2002) (Şekil 5).



Şekil 5: kor promotor ve “enhancer” II kompleksi. (Moolla, 2002).

a)BCP (bazal kor promotor) ve önündeki regülatör elementler (CURS, NRE).

b)HBV’nin 1625- 1775 nükleotidleri arasında, transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerleri.

BCP, cis-etki eden elementlere sahiptir (Yu ve ark. 1996). ("cis-acting elements": bir genin transkripsiyonunu kontrol eden proteinlerin bağlanabileceği yerlerdir. Bu yerler kontrol ettikleri gen kümesi ile bağlantılıdır ve genelde genlerin kodlama bölgelerinin 3' ya da 5' uçlarına yakın olurlar). cis-etki eden elementler, preC ve pregenomik RNA'nın transkripsiyon başlangıcını tam olarak yönlendirirler. BCP'nin 5' ucundaki sekans "CURS" ("core upstream regulatory sequence": kor başlangıcındaki regülatör sekans) olarak bilinir ve BCP'nin aktivitesini 200- 2000 kat artırır. "CURS", α , β , γ ve δ kutuları olarak adlandırılan bölgeleri içerir (Yuh ve ark. 1992).

Negatif regülatör element (NRE) BCP'nin hemen öncesindeki sekanslarda lokalize olmuştur. Etkili bir şekilde BCP'nin aktivitesini baskılayabilir. Üç cis-element içerir: NRE- α , NRE- β , NRE- γ . Bunların her biri bağımsız olarak hafif bir baskılama gerçekleştirebilir. Ancak sinerjistik olarak hareket ettiklerinde daha güçlü bir baskılama yapabilirler ve kor promotörü ile transkripsiyonda 11 katlık bir inhibisyon sağlarlar (Chen,1995).

- b) LHB (büyük yüzey antijeni) S1 promotörünün kontrolü altında 2,4 kb.lik HBV mRNA'sından üretilir. S1 promotörü klasik TATA-kutusu sekansını içeren tek promotördür. Diğer promotörler daha çok TATA-kutusu sekansına benzeyen yapılar içerirler. S1 promotörü, S2 promotöründen sonra gelen sekanslar tarafından baskılanır (Bulla ve ark. 1989).
- c) MHB ve SHB (orta yüzey antijeni ve küçük yüzey antijeni) S2 promotörü altından 2,1 kb.lik HBV mRNA'sından üretilirler. S2 promotörü TATA-kutusu içermez. Bu olağandışı promotör polimeraz ve yüzey (preS1) ORF'lerinin üst üste çakıştığı bölgede yer alır. Bu element bir CCAAT motifi ve birbirinde bağımsız hareket edebilen iki transkripsiyon başlangıç elementi içerir (Zhou ve ark. 1991) . CCAAT motifi sadece 2,1 kb.lik transkriptin üretimini tetiklemez, aynı zamanda 2,4 kb.lik transkriptin üretimini de baskılar (Lu ve ark. 1995). LHB'nin

artması S2 promotorunun anlamlı derecede aktive olmasına sebep olur. S2 promotorunun içinde yedi tane transkripsiyonel element (A-G) tanımlanmıştır. Bunların her biri sadece karaciğere spesifik elementlerdir.

- d) X promotoru HBx proteinini kodlayan 0,9 kb.lik mRNA'nın transkripsiyonunu düzenler. Bu promotor transkripsiyon başlangıç sekansının yaklaşık 140 nükleotid önünde lokalize olmuştur. "enhancer" I elementinin sekansının bir kısmıyla çakışır. Bu promotor da klasik TATA-kutusu ya da GC-zengin bölge içermez. X promotoru, "X-promotor binding protein" (X-PBP) elementleri için bağlanma bölgeleri içerir. X-PBP (X promotor bağlanma proteinleri) karaciğere spesifik transkripsiyon faktörleridir (Fukai, 1997). P53 (tümör baskılama gen ürünü) proteinin bu promotora bağlandığı ve fonksiyonunu baskıladığı gösterilmiştir (Takada, 1996).

HBV gen ekspresyonunun düzenlenmesi sadece promotorlarla değil aynı zamanda "enhancer" elementlerinin kullanılmasıyla mümkündür. ("enhancer": etki artırıcı diziler. "enhancer"lar promotorlar gibi genin üst kısmında yani genin başlangıç kodonundan önceki sekanslarda bulunmak zorunda değildir. Genin başlangıcından yüzlerce hatta binlerce baz önde, genin içinde bir yerde ya da genin 3'-ucunda bir yerde olabilir). HBV'nin iki "enhancer"ı vardır: "enhancer I" ve "enhancer II". "enhancer I", S ve X ORF'leri arasında 120 bç yer kaplayan bir transkripsiyon arttırıcıdır (Guo ve ark. 1991). Pregenomik/preC ve HBx mRNA'sı "enhancer I" ile büyük miktarda arttırılabilir. Ancak "enhancer I" elementinin HBsAg mRNA'sı üzerindeki etkisi bu kadar büyük değildir. Kor ekspresyonu üzerindeki etkisi ise kor bölgesinin aktivitesini 10 kat arttırmak şeklindedir (Fukai, 1997).

"Enhancer II", iki yüzey promotorunun ve X promotorunun aktivitesini arttırır (Yuh ve ark. 1990). "enhancer II" 148 bç uzunluğundadır ve IIA, IIB bölgelerinden oluşur. Tüm HBV subtipleri arasında IIA bölgesi yüksek oranda korunmuş bir bölgedir.

1.1.2 HBV'NİN YAŞAM DÖNGÜSÜ

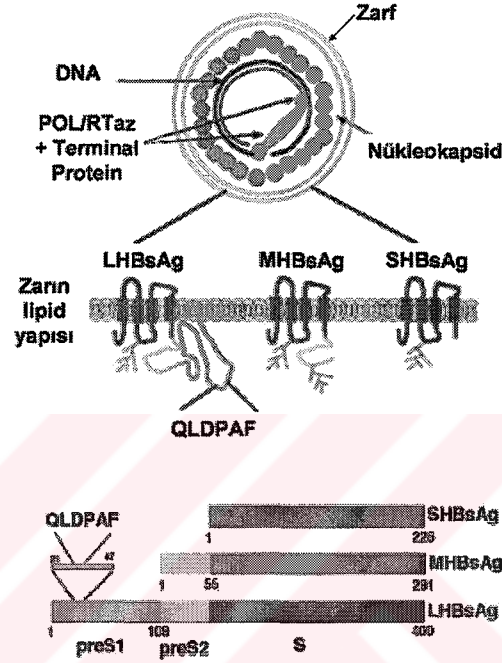
HBV'nin hepatositlere girişini, HBV genomunun kapsidden çıkışını ve viral genomun çekirdeğe girişini konu alan HBV'nin yaşam döngüsünün ilk safhaları tam olarak anlaşılammıştır (Seeger ve Mason, 2000). Ancak bilindiği kadarı aşağıdaki gibidir:

Yaşam döngüsünün ilk adımı HBV'nin hepatosit membranına bağlanmasıdır. Bu bağlanmada fibronektin, transferin reseptörü, apolipoprotein H, insan serum albumini, pre-S2 glikanları, pre-S1 ve pre-S2 bölgeleri etkilidir. HBV enfekte edeceği hücreler konusunda çok seçlidir. Asıl hedef hücreler hepatositler olmakla birlikte, raporlar lenfositlerinde ikinci hedef olabileceğini belirtmektedir (Seeger ve Mason, 2000).

Virüs partikülü hücreye girerken nükleokapsid, viral zarftan (envelope) hücre sitoplazmasına salınır ve hepatositin çekirdeğine taşınır (Şekil 6,7).

Nükleokapsid; viral genom, viral polimeraz / ters transkriptaz enzimi ve HBV kor proteini içerir (şekil 6). Nükleokapsid içindeki bu genom polimeraz/ters transkriptaza kovalent bağlarla bağlıdır. Polimeraz proteininin N ucu virion DNA'sının negatif zincirinin 5'-ucuna kovalent bağlarla bağlı terminal proteini kodlar. Polimeraz ORF'sinin bu kısmı negatif zincirin sentezinin başlatılmasında gereklidir ("priming"). Bundan sonra gelen kısım "spacer" olarak adlandırılır ve spesifik bir görevi bilinmemektedir. Üçüncü kısım RNA-DNA'ya bağlı DNA polimerazı kodlar (ters transkriptaz). C ucundaki bölge ribonükleaz (RNaz) H aktivitesini kodlar. RNaz H RNA-DNA hibridindeki RNA'yı parçalar. RNaz H aynı zamanda viral RNA paketlenmesinde, negatif DNA zincirinin sentezinin başlatılmasında ve negatif DNA zincirinin uzamasında da görev alır. Terminal proteinin 63. amino asitindeki tirozin HBV pol enziminin negatif DNA zincirinin ilk nükleotidi G ile kovalent bağ oluşturmasını sağlar (Locarnini ve ark. 2003). HBV zarfı ise hücresel lipid molekülleri ile üç viral proteinden oluşur (Buendia, 1998). Bu proteinler SHBsAg, MHBsAg ve LHBsAg'dir. Bunlardan özellikle LHBsAg'nin hepatositlere tutunmada önemli rol oynadığı bilinmektedir.

LHBsAg'nin N-ucu hepatositlere tutunmada etkili 120 amino asit içerir. Bunlardan 21- 47 arası amino asitler (QLDPAF olarak adlandırılır) hepatositlere tutunmada kritik olan bölgedir. İlginç bir şey, HbxAg'inde QLDPAF sekansını içermesidir. Bu durumda HbxAg'inde hepatositlere tutunmada etkili olma ihtimalinden söz edilebilir (Paran ve ark. 2003).



Şekil 6: HBV zarf proteinleri (Paran ve ark.2003).

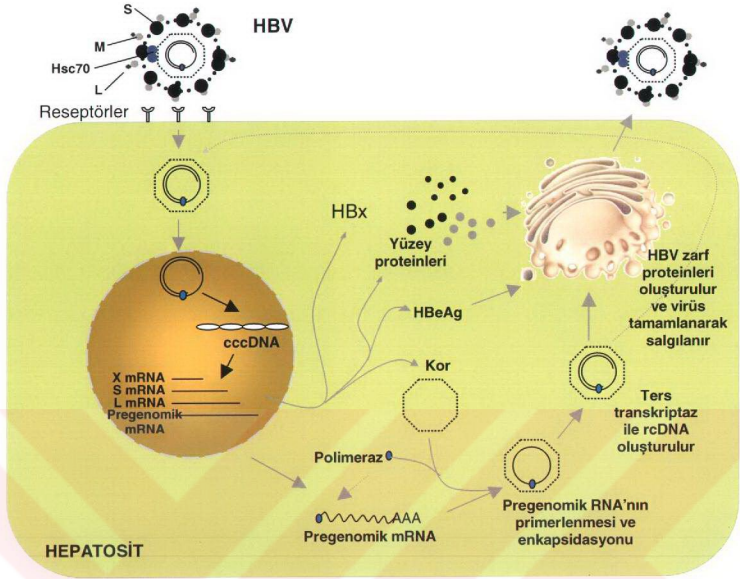
Sitoplazmaya salınan nükleokapsid HBV genomunu hücre çekirdeğine taşır. HBV genomunun hücre çekirdeğine nasıl salındığı tam olarak anlaşılamamıştır. Önceleri bu salınmada HBV kor proteinlerinin görev aldığı düşünüldüyse de daha sonra yapılan çalışmalar aksi yönde kanıtlar ortaya koymuş ve viral genomun karyoplazmaya salınmasında viral polimerazın (-ki nükleer bir lokalizasyon göstermektedir) etkili olabileceği düşünülmüştür (Kann ve Gerlich,1997). Ancak Kann ve ark. 1999'da yaptığı bazı deneyler kor proteinin nükleer taşımada etkili olabileceği kuşkularını tekrar gündeme getirmiştir.

HBV genomu (rcDNA) kısmen çift zincirli bir yapıda ve "relaxed circular" (açık sirküler) formdadır. Virüs DNA replikasyonundaki ilk olay rcDNA'nın çift sarmallı, süper kıvrımlı, kapalı, sirküler bir yapıda olan

cccDNA'ya ("covalently closed circular DNA") dönüşmesidir. Bu olay enfeksiyondan sonraki ilk 24 saat içinde gerçekleşir. Dolayısıyla cccDNA'nın viral RNA'ların transkripsiyonu için kalıp görevi gördüğü düşünülmektedir. cccDNA'nın sentezi için şu aşamalar gereklidir:

1. HBV genomuna 5' ucundaki yapıların (5' ucundaki kısa terminal kalıntıların, kovalent bağlarla bağlanmış polimerazın ve 5' ucundaki oligoribonükleotidin) koparılması.
2. Bu polimerazla HBV genomunun eksik zincirinin (pozitif DNA zincirinin) tamamlanması,
3. Her bir zincirin 5' ve 3' uçları arasındaki boşlukların doldurulması ve iki zincirin kovalent bağlarla bağlanması.

cccDNA, viral RNA'ların transkripsiyonu için bir kalıp görevi görür. Promotor ve "enhancer"ların kontrolü altında hücrel RNA polimeraz II ile dört mRNA sentezlenir. Bunlardan en büyük olanı 3,5 kb.lik prekor/pregenom mRNA'sıdır. Bu mRNA genomdan daha uzundur ve e antijeni, kor ve polimeraz proteinlerinin sentezini sağlar. Bu pregenomik RNA aynı zamanda ters transkripsiyon için de kalıp görevi görür. Ters transkripsiyon virüsün yaşam döngüsü için kilit olaydır. Diğer mRNA'lar yüzey proteinlerinin ve X proteininin sentezini sağlayan 2,4, 2,1 ve 0,9 kb.lik mRNA'lardır. Bu mRNA'ların sentezlenmesinden sonra viral zarfın, küçük partiküllerin yani L, M, S proteinlerinin ve filamentlerin translasyonu yapılır ve bunlar endoplazmik retikulumda toplanıp birleştirilirler. Sonra da lümeninde sitoplazmaya salınırlar. HBc proteini yüzey proteinlerinden bağımsız olarak sitoplazmada sentezlenir. Hemen hemen tüm ters transkripsiyon kor parçacıklarının içinde gerçekleşir (Şekil 7)



Şekil 7: HBV'nin yaşam döngüsü.

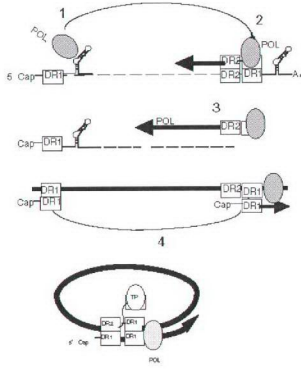
Pregenomik RNA'nın enkapsidasyonu yani sitoplazmadaki kor parçacıklarının içine yerleşmesi HBV DNA'nın replikasyon döngüsünde bir diğer kritik aşamadır. Enkapsidasyon HBV polimeraz enziminin, pregenomik RNA'nın 5' ucunda bir ilmik yapısında olan epsilon (ϵ) 6 nükleotidlik kısmına bağlanmasıyla gerçekleşir. Bu bağlanmada pregenomik RNA'nın 5'-ucunda yer alan enkapsidasyon sinyali ve kor partiküllerin karboksi ucunda yer alan arjinin grupları rol oynar. Pol- ϵ -ribonükleoprotein (RNP)'nin toplanması ATP ve Hsp 60 gibi konak moleküler şaperonlarını gerektirir (Ganem ve ark, 2001) . Polimeraz ϵ 'na bağlandıktan sonra konformasyonel bir değişikliğe uğrar bu da enzimin aktive olmasına neden olur. Sonuçta RNA-Pol kompleksiyle ve kor proteini dimerleriyle olgunlaşmamış bir nükleokapsid oluşturulmuştur. Polimeraz üzerinde ters transkripsiyonu ve

paketlenmeyi kolaylaştıracak en az üç kor-bağlama bölgesi vardır. Bu arada bir protein kinaz da paketlenir (Lott ve ark. 2000).

Kor parçacıklarının içindeki polimeraz, DNA sentezini başlatmak için primer olarak terminal protein bölgesindeki 63. amino asitte tirozin kalıntısının hidroksil grubunu kullanır (Zoulim ve ark. 1994).

Kor içinde pregenomik RNA'dan ters transkriptaz ile negatif DNA zinciri, bu zincirden de pozitif DNA zinciri sentezlenir. Fakat pozitif DNA zincirinin sentezi polimeraz aktivitesinin durması ile tamamlanamaz ve pozitif DNA zinciri eksik kalır. Böylece HBV'nin rcDNA'sı sentezlenmiş olur. Bu genomu içeren kor proteini, sitoplazmada granüllü endoplazmik retikulumda sentezlenmiş olan zarf proteinleriyle paketlenmiş olarak golgi aygıtına gönderilir. Buradan da ekzositozla hepatosit dışına salınır. Eğer zarf proteinleriyle kaplanmazsa cccDNA'lar tekrar çekirdeğe döner (Şekil 7).

Bu mekanizmada polimeraz, negatif DNA zincirinin 5'-ucundaki ilk DNA nükleotidine kovalent bağlarla bağlanır. Polimerizasyon (Şekil 8), ϵ bölgesindeki 6 nükleotidlik çıkıntının ilk 3 nükleotidinin yani 5'-UUC-3' motifinde başlar ("priming"). Böylece negatif DNA zincirinin ilk üç nükleotidi yani 5'-GAA-3' sentezlenmiş olur (Locarnini ve ark. 2003). Yeni oluşturulmuş olan bu oligonükleotid - polimeraz kompleksi, pregenomik RNA'nın 3'-ucundaki DR-1 zincirindeki komplementer nükleotid hattına aktarılır ("translocation"). Burada, pregenomun 5'ucuna doğru negatif DNA zinciri sentezlenir. Epsilonun 3'-kopyası ve DR1'in 5'-ucu negatif zincirin sentezine katılmazlar. Pregenomun 5'-ucuna doğru negatif zincirin uzaması 8- 9 nükleotidlik kısa bir kalıntı oluşmasına neden olur. Ters transkripsiyon devam ederken, viral DNA polimerazın RNaz H aktivitesiyle pregenomik RNA parçalanır. DR-1 sekansını içeren son 18 nükleotid dışında tüm pregenom parçalanır (Ganem ve ark. 2001). Bu kalan 18 nükleotidlik RNA parçası başlık yapısı içerir ve yeni zincirin sentezlenmesinde primer görevi görecektir.



Şekil 8: HBV genomunun replikasyonu (Locarnini ve ark.2003). "cap": mRNA'nın 5'ucundaki koruyucu başlıktır. Bu yapı translasyonun başlamasını kolaylaştırır.

Bu RNA primeri, yeni sentezlenen negatif DNA hattının 5'ucundaki DR-2 bölgesine aktarılır ("translocation"). Pozitif DNA hattının sentezi bu primerden negatif DNA hattının 5'-ucuna doğru devam eder. Negatif DNA hattının 3'-ucundaki kalıntı, yeni sentezlenen kısa pozitif zincirin 3'-ucunun protein-bağlantılı 5'-uçtan negatif zincirin 3'-ucuna taşınmasını sağlar. Dolayısıyla genom sirküler hale gelir. Pozitif DNA sentezi genom sirküler haldeyken devam eder. Pozitif zincirin sentezi, negatif zincirin %50-70'ine kadar (genotipe göre değişir) devam eder (Locarnini ve ark. 2003). Böylece pozitif zincir eksik kalmış ve HBV genomunun kısmen çift sarmallı açık sirküler yapısı (RC DNA) oluşturulmuş olur.

Bu genomu içeren kor partikül sitoplazmada granüllü endoplazmik retikulum tarafından sentezlenen zarf proteinleriyle çevrilerek hepatosit dışına salınır. Hepatosit çekirdeğindeki cccDNA yapısı zamanla parçalanmaktadır ve sonuçta çekirdek içi HBV genom rezervi replikasyon için sürekli cccDNA formunu oluşturmaktadır. Havuzdaki bu düzenleme, olgun korda bulunan viral DNA'nın tekrar rezerve girmesiyle olur.

PreC/Pregenom RNA'sından prekor-kor proteini sentezlenir. Bu protein endoplazmik retikulum içinde işlenir ve HbeAg olarak salgılanır. Kor

proteini dimer oluşturur, sitoplazmada PreC/Pregenom RNA'sı ve polimerazi içine alır (Şekil 7).

1.1. HBV GENOTİPLERİ

HBV genotipleri arasındaki benzerlik oranı %92 olarak saptanmıştır. Buna göre yedi genotip belirlenmiştir. Bunlar genotip A-G olarak adlandırılmışlardır. Ancak bu genotiplerin subtipleri de belirlenmiştir. Benzerlik oranı daha fazla olan HBV subtipleri S geni sekanslarının karşılaştırılmasıyla belirlenmiştir. Buna göre genotip-subtip farklılık sınırı % 4 olarak belirlenmiştir (Tablo 1).

Tablo 1: HBV subtiplerinin Dünya'daki dağılımı.

Genotip	Subtip	Coğrafi dağılım
A	adw2, ayw1	Kuzey Batı Avrupa, A.B.D. ,Orta Afrika
B	adw2, ayw1	Tayvan, Japonya,Endonezya, Çin, Vietnam
C	adw2, adrq+,adrq-,ayr	Doğu Asya, Tayvan, Kore, Çin, Japonya, Polonezya, Vietnam
D	ayw2, ayw3	Akdeniz bölgesi, Hindistan, Batı Afrika
E	ayw4	Batı Afrika
F	adw4q-,adw2, ayw4	Orta ve Güney Amerika
G	adw2	Fransa, A.B.D.

Türkiye'de %100 HBV genotip D enfeksiyonu görülmektedir (Bozdayı ve ark.2004). Ülkemizdeki HBV subtipi ise ayw olarak belirlenmiştir (Bozdayı ve ark.2005).

1.2 RNA İNTERFERANS (“RNA INTERFERENCE”)

RNA interferans (RNAi), kısaca sekans spesifik mRNA degradasyonu olarak tanımlanabilir. Dünya’da keşfi henüz 7 yıllık bir zaman önce olmasına rağmen bu mekanizma bugün Dünya araştırmacılarının en popüler konularından biri haline gelmiş ve artık bir teknoloji olmuştur. Pubmed’de konuyla ilgili 1998 yılına kadar sadece dokuz makale vardı. 1999 yılında ise makale sayısı 631 olmuştu. Bugün itibarıyla pubmed’deki makale sayısı 3992’ye ulaşmıştır. Özellikle 2001- 2003 yılında RNA interferans araştırmalarında bir patlama yaşanmış, önemi anlaşıldıkça araştırmalar katlanarak artmıştır. Büyük araştırma ve ilaç şirketleri bu teknolojiye dev yatırımlar yapmaktadır. Bu yatırımların ve tüm diğer araştırmaların nedeni, RNAi teknolojisinin, gen düzenleme mekanizmalarına bakışımızı değiştirmesi, genlerin fonksiyonlarını anlamada pratik ve etkili bir araç olması ve potansiyel olarak kullanılacak güçlü bir gen terapisi yöntemi olarak görülmesidir. Ancak bu mekanizmada henüz bilinmeyen ve keşfedilmeyi bekleyen daha çok şey vardır.

1.2.1 RNA İNTERFERANS MEKANİZMASININ TANIMLANMASININ TARİHSEL SÜRECİ

Gen ekspresyonunu mRNA düzeyinde engelleyebilmek son 25 yıldır biyologların hem rüyası hem de kâbusu olmuştur. Bunu başarabilmek için çeşitli yollar denendi ve çeşitli moleküller kullanıldı. Bunlardan bazıları antisens sekanslar, ribozimler ve kimerik oligonükleotidlerdi. Fakat bunlardan hiçbiri istenilen sonuçları vermedi.

RNA interferans olayının ilk ipuçları 1990 yılında birbirinden bağımsız iki ayrı bilim adamından geldi: Richard A. Jorgensen (1990, 1996) ve Joseph Mol & Van Der Krol (1990) mor renkteki petunya bitkilerinin renklerini daha canlı hale getirmek için, bu bitkilere petunyaların doğal pigment genlerinden bir miktar daha eklediler. Bitkideki pigment genlerinin miktarı arttığından bitkinin daha koyu renkte olacağını bekliyorlardı. Fakat şaşırtıcı bir şey oldu: beklentilerinin tam tersine beyaz petunyalar elde ettiler. Jorgensen ve Mol bu

olaydan Şu sonucu çıkarttılar; ortama fazladan gen kopyaları verildiğinde bir Şekilde mor pigment genlerinin (buna petunyaların doğal pigment genleri de dahil) sensör mekanizması etkilendi. Bu da beyaz alacalı hatta albino benzeri petunyalar ortaya çıkmasına neden oldu. Canlıya sonradan aktarılan bir genle, doğal gen arasındaki bu sensör iliŐkisine birlikte-baskılama yani “co-suppression” demiŐlerdir.

Sonraki yıllarda yapılan çalıŐmalarda, bitkilerin virüslere karşı savunma yapmak için virüs RNA’larını hedefleyip bu RNA’ları yıkıma uğrattıkları gösterildi (Dougherty ve ark. 1994, Kumagai ve ark. 1995, Angell ve ark. 1997, Ruiz ve ark. 1998).

Daha sonra, 1998 yılına geldiğinde Andrew Z. Fire (Carnegie Institution of Washington,1998) ve Craig C. Mello (University of Massachusetts, 1998) kk saydam bir solucan üzerinde (*Caenorhabditis elegans*) antisens ve sens RNA molekülleriyle deneyler yapıyorlardı. Göreceli olarak büyük miktarlardaki sens ve antisens RNA zincirleri *C. elegans*’ın önemli bir kas geni olan *unc-22* RNA’sı üzerinde çok az etki yaparken çok kk miktardaki çift zincirli *unc-22* RNA’sı solucanın ve hatta solucanın yavrularının hızlı hızlı kontrolsüz olarak kasılmalarına neden olmuştu. Bir Şey yanlıŐlıkla *unc-22* geninin ekspresyonunu baskılamış olmalıydı. Fire ve Mello, başka genleri de hedeflediler ve hedefledikleri her gen için aynı sonucu aldılar. Bu olaya yani çift zincirli RNA’nın ilgili genin sensör mekanizmasını alıŐtırmadaki rolüne “RNA interference” (RNA interferans) ismini verdiler. RNA interferans, Jorgensen ve Mol’n petunyalarının nasıl beyazladığını açıklıyordu. Bu petunyalar sonradan eklenen mor pigment genlerini tanıyor ve bir Şekilde ift zincirli mRNA’ya çeviriyor olmalıydı. Bu da RNA interferansı tetikliyor ve böylece bitki hücrelerindeki tüm pigment mRNA’ları hedeflenip parçalanıyordu.

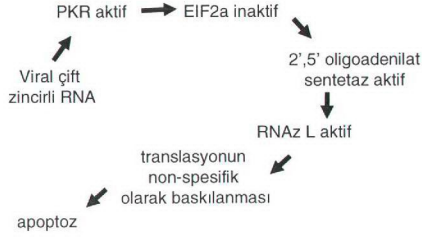
RNA interferans (RNAi) daha sonra algilerde, sirke sineklerinde, solucanlarda (flatworms), hidralarda, *Trypanosoma* gibi tek hücrelilerde, bitkilerde ve diğer bazı canlılarda (tablo 2) incelendi. Cartrew ve arkadaşları çift zincirli RNA molekülünü *Drosophila* embriyolarına verdiklerinde,

transkripsiyon sonrası bir gen susturma gerçekleştiğini gördüler. Buna PTGS (“Post transcriptional gene silencing”: transkripsiyon sonrası gen susturma) dediler (Kennerdell ve ark. 1998). Memelilerde RNA interferans mekanizması ilk olarak fare embriyolarında tanımlandı (Svoboda ve ark. 2000, Wianny ve ark.2000). Ancak memelilerde farklı bir durum vardı. Diğer organizmalarda yapıldığı gibi memeli hücrelerine, bir geni ifade edebilecek uzunlukta çift zincirli RNA molekülleri verdiklerinde interferon yanıtının (akut-faz yanıtı) ortaya çıktığı anlaşıldı.

Tablo 2: 2001 yılına kadar yapılan bazı RNA interferans çalışmaları.

Tür adı		Kaynak
<i>Danio rerio</i>	Zebra balığı	Wargelius ve ark. 1999
<i>Trypanosoma brucei</i>	Tek hücreli	Wang ve ark. 2000
<i>Hydra magnipapillata</i>	Cnidarian	Lohmann ve ark. 1999
<i>Schmidtea mediterranea</i>	Planarya	Alvarado and Newmark, 1999
<i>Escherischia coli</i>	Bakteri	Tchurikov ve ark. 2000
<i>Neurospora crassa</i>	Fungi	Cogoni and Macino, 1999
<i>Drosophila melanogaster</i>	Sirke sineği	Bernstein ve ark. 2001
<i>Mus musculus</i>	Memeli	Wianny and Zernicka-Goetz, 1999
<i>Arabidopsis thaliana</i>	Bitki	Akashi ve ark. 2001
<i>Caenorhabditis elegans</i>	Nematod	Fire ve ark. 1998; Tavernarakis ve ark. 2000

Eğer bir insan hücrelerini, bir RNA virüsü enfekte ederse serin/threonin PKR (“Responsive Protein Kinase”) aktive olur. Bu da interferon α/β yanıtına neden olur. PKR, translasyon faktörü EIF2 α 'nın (“eucaryotic initiation factor 2 α ”) fosforilasyonunu sağlayarak inaktive olmasına neden olur. EIF2 α , 2',5' oligoadenilat sentetaz enzimini aktive eder. Bu da RNAz L enzimini aktive eder. Böylece hücredeki tüm mRNA'ların translasyonu bloke edilir ve hücre apoptoza kadar gider (Şekil 9).



Şekil 9: Memelilerde çift zincirli RNA sentezi yapan virüse verilen interferon yanıtı. Interferon yanıtı için çift zincirli RNA'nın 30 baz çiftinden daha uzun olması gerekir.

Bu olay, memelilerin uzun çift zincirli RNA'lara verdiği interferon yanıtıdır. Omurgasızlarda uzun çift zincirli RNA molekülüne karşı interferon yanıtı devreye girmez.

Memelilerdeki interferon yanıtı tetiklenmeden RNAi deneyleri nasıl yapılabilir sorusunun yanıtı çok geçmeden geldi. Phillip D. Zamore (Massachusetts Üniversitesi), Gregory Hannon (Cold Spring Harbor Laboratuvarı, New York), Thomas Tuschl ve Sayda M. Elbashir (Max Planck Enstitüsü, Biyofiziksel kimya bölümü) ve diğer daha birçok araştırmacı sorunun giderilmesine olduğu kadar RNAi mekanizmasının anlaşılmasına da katkılar sağladılar.

2000 yılında ilk defa, çift zincirli RNA molekülünün parçalanarak 21- 23 nükleotid uzunluğundaki küçük RNA moleküllerine dönüştüğü bulundu (Hamilton ve ark. 1999, Grishok ve ark. 2000, Hammond ve ark. 2000, Zamore ve ark. 2000, Elbashir ve ark. 2001, Bernstein ve ark. 2001). Bu moleküllerin uzunlukları sabitti. 5'-uçlarında terminal fosfat ve 3'-uçlarında ise iki nükleotidlik bir çıkıntı bulunduruyorlardı (Elbashir ve ark. 2001). Bunlara siRNA ("small interfering RNA": küçük engelleyici moleküller) denildi. Sonra siRNA'ların hedeflenen bir mRNA molekülünün sekans- spesifik olarak parçalanmasına neden olduğu gösterildi (Fire ve ark. 1998, Hamilton ve ark. 1999, Zamore ve ark. 2000, Yang ve ark. , 2000 Bernstein ve ark. 2001).

Hammond ve arkadaşları aynı uzunluktaki küçük RNA parçalarının bitkilerde ve hayvanlarda iyi korunmuş doğal bir mekanizma olduğu sonucunu çıkardı (Hammond, 2000). Bu teori birçok çalışmada desteklendi (Fire ve ark. 1998, Kennerdell ve ark. 1998, Ngo ve ark. 1998, Timmons ve ark. 1998, Bahramian ve ark. 1998, Lohmann ve ark. 1999, Misquitta ve ark. 1999, Sanchez ve ark. 1999, Wargelius ve ark. 1999, Li ve ark.2000). Bu çalışmalar, birçok farklı türde çift zincirli RNA molekülleriyle tetiklenen gen susturmanın olabileceğini gösteriyordu.

2000 yılında Zamore ve arkadaşları siRNA'ların uzun çift zincirli RNA molekülünden üretildiğini ve hedeflenen mRNA'yı parçalamayı siRNA'ların ("small interfering RNAs" : küçük engelleyici RNA'lar) yönlendirdiğini buldular (Zamore ve ark 2000).

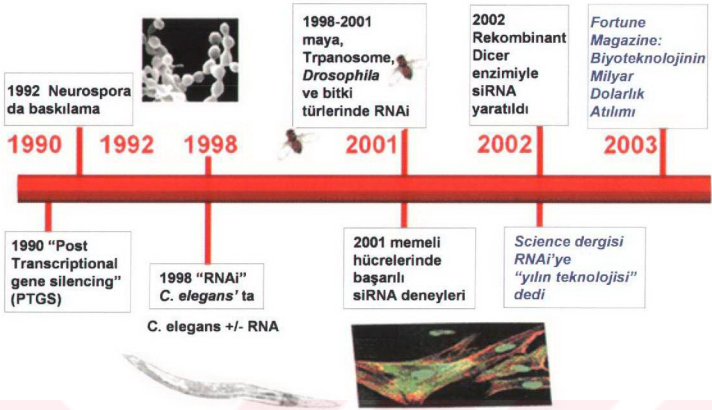
2001 yılında Bernstein ve arkadaşları çift zincirli RNA molekülünü parçalayıp siRNA'ların oluşmasını sağlayan enzimi buldular (Bernstein 2001). Bu enzim RNaz III ailesinden ATP bağımlı bir enzimdi ve helikaz alanı içeriyordu (helikaz: çift zincirli nükleik asitleri tek zincirli hale getiren bir enzim). Bu enzim hücrelerde doğal olarak var olan "Dicer" enzimiydi.

2001 yılında Elbashir ve arkadaşları memeli hücrelerinde kimyasal olarak sentezlenmiş siRNA'larla RNA interferans mekanizmasının tetiklenebildiğini gösterdiler (Elbashir ve ark. 2001). Hemen ardından Tushl ve arkadaşları siRNA aracılı RNA interferansı, insan böbrek hücrelerinde ve HeLa hücrelerinde gösterdi (Tushl ve ark. 2001). Bu çalışmaların en önemli tarafı memeli hücrelerine 30 baz çiftinden daha küçük RNA molekülleriyle transfeksiyon yapıldığında özgül olmayan hiç bir etkinin görülmemesiydi. siRNA'larla RNA interferans memeli hücrelerinde interferon yanıtına neden olmuyordu. Bu bilim adamları 21 nükleotidlik siRNA duplekslerinin memeli hücrelerinde genlerin fonksiyonunu anlayabilmek için yeni bir araç olduğunu ve gene-spesifik tedavi aracı olarak kullanılabileceğini belirtiyorlardı. Caplen ve arkadaşları bu buluşu destekler nitelikte çalışmalar yaptı. *C. elegans*'ta, insan ve fare hücrelerinde sentetik siRNA-aracılı RNA interferansın spesifik olarak gen ekspresyonunu baskılayabildiğini gösterdi (Caplen ve ark. 2001).

Bu çalışma aynı zamanda siRNA'ların, *C. elegans* ve memeli hücrelerinde gen ekspresyonuna direkt etkisini kanıtladı.

2002 yılında ilk defa rekombinant insan "Dicer" enzimi ve rekombinant *E. coli* RNaz III enzimi üretildi. Bunlar in vitro ortamda çift zincirli RNA'nın parçalanmasında kullanıldı (Calegari ve ark. 2002, Kawasaki ve ark. 2003, Myers ve ark. 2003, Lee ve ark. 2002). Artık RNA interferans teknolojisiyle ilgilenen birçok firma vardı ve RNAi kitleri üretmişlerdi bile. siRNA'ların potansiyeli bilim adamlarını heyecanlandırmıştı. siRNA aracılı RNAi teknolojisi birçok alanda kullanılabilir: "functional genomics", "reverse genetics" ve epigenetik çalışmalarında kullanılabilirdi gibi bir tedavi aracı olarak virüslere karşı, kansere karşı ve genetik hastalıklara karşı da kullanılabilir, yeni bir tedavi stratejisi olarak benimsenebilirdi. ("reverse genetics":tersine genetik. Gen manipulasyon teknikleriyle genotipten fenotipe doğru giden bir genetik analizdir. Bir genin fonksiyonunu anlamak için en etkili yoldur. Tersine genetikte daha önceleri ribozim teknolojisi ve antisense teknolojisi kullanılmıştı. Ancak bu tekniklerin yararı sınırlı olmuştu. Şu anda tersine genetikte kullanılan en etkili yöntem RNAi teknolojisidir. Epigenetik: gen ekspresyonundaki değişiklikleri konu alır. Bu değişiklikler en az bir jenerasyon boyunca devam etmeli fakat DNA kodunda bir değişim söz konusu olmamalıdır.) Science dergisi RNAi teknolojisini 2002 yılının en önemli teknolojisi seçti (www.sciencemag.org).

2003 yılında gelindiğinde, Fortune dergisi büyük biyoteknoloji firmalarının RNAi teknolojisine milyar dolarlık yatırımlar yaptığını haber yapıyordu. RNAi teknolojisi hem yepyeni bir tedavi stratejisi olabilmesi hem de genlerin fonksiyonunu anlamada kullanılabilirliği açısından yatırıma değer bir teknolojiydi (Şekil 10).



Şekil10: RNAi teknolojisinin gelişim süreci.

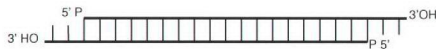
Zamore'a (2001) göre RNAi teknolojisi, insan genomunda "reverse genetics" çalışmalarını dramatik bir şekilde hızlandıracak ve önümüzdeki 5 yılda tüm insan genlerinin incelenmesi sürpriz olmayacak. Yeni teknolojiler, birçok kültür hücresinin genomundaki her bir genin baskılanmasının etkilerini araştırmak için siRNA-mikroarray-mikroçipleri yapmayı mümkün kılacak.

1.2.2 RNA İNTERFERANS MEKANİZMASI

Mekanizmada kullanılan bileşenler:

1) siRNA (small interfering RNAs: küçük engelleyici RNA'lar)

siRNA'lar 21- 23 nükleotid uzunluğunda çift zincirli RNA molekülleridir. Simetrik olarak, 5'-uçlarında fosfat bulundurlarken, 3' uçlarında 2- 3 nükleotidlik bir çıkıntıyla birlikte hidroksil grubu bulundurlar (Elbashir ve ark. 2001) (şekil 11).



Şekil 11: siRNA (küçük engelleyici RNA molekülü).

siRNA'ların yapısı RNAZ III-benzeri enzimatik parçalama modeli için karakteristik bir yapıdır. Nitekim çift zincirli RNA moleküllerini parçalayıp siRNA'ların oluşmasını sağlayan enzim de "Dicer" olarak adlandırılan RNAz III ailesinden bir enzimdir (Bernstein ve ark.2001, Ketting ve ark. 2001, Billy ve ark. 2001).

2) "Dicer"

"Dicer", RNAZ III ailesinden çift zincirli RNA moleküllerine spesifik bir endonükleazdır. RNAZ III ailesindeki ribonükleazlar çift zincirli RNA'ları 5'-uçlarında fosfat, 3'-uçlarındaysa bir çıkıntı olacak şekilde parçalar. Yani parçalama sonucu ortaya çıkanlar, siRNA'ların yapısına benzer parçacıklardır. RNAz III enzimleri içerdikleri yapılara göre üç grupta toplanabilirler:

- a) Bakteriyel RNAz III. Bu gruptakiler tek bir katalitik yapı ve bir de çift zincirli RNA bağlanma yapısı içerirler, çiftleri gruplar halinde hareket ederler,
- b) Drosha ailesi nükleazlar. Bunlar iki katalitik yapı ve bir de çift zincirli RNA bağlanma yapısı içerirler (Filippov ve ark. 2000).
- c) "Dicer" enzimleri ailesi nükleazlar. Bunlarda iki katalitik yapı, bir helikaz yapısı, PAZ motifleri ve bir de çift zincirli RNA bağlanma yapısı içerirler (Bernstein ve ark. 2001). Bu gruptaki RNazların çift zincirli RNA moleküllerini siRNA'lara dönüştürdüğü dolayısıyla RNA interferans mekanizmasını başlattığı bulunmuştur (Bernstein ve ark. 2001). Bu ailedeki enzimler "Dicer" enzimleri olarak adlandırılırlar. Şu ana dek *Drosophila*'da, *Arabidopsis*'te, *Spodoptera frugiperda* adlı bir sinek türünde, tütün bitkisinde, *C. elegans*'ta, memelilerde ve *Neurospora*'da bulunmuşlar ve tüm bu canlılarda çift zincirli RNA moleküllerini türe karakteristik büyüklükte siRNA'lara dönüştürdükleri görülmüştür (Bernstein ve ark. 2001, Ketting ve ark. 2001). PAZ (PIWI, argonaute ve zwillie), protein temas alanıdır. İçerdiği bileşiklere göre

adlandırılmıştır. PIWI yapısı proteinleri evrimsel olarak iyi korunmuş fakat henüz fonksiyonu bilinmeyen proteinlerdir. *Drosophila*'da alkol dehidrogenaz geninin birçok kopyasının translasyonal kontrolü ve susturulmasında görev aldığı bilinmektedir. Argonat ("argonaute") proteienleri (EIF2C ve RISC gibi) ökaryotik hücrelerin çoğunda bulunan ve evrimsel olarak iyi korunmuş proteinlerdir. Bu proteinlerin iki homolog bölgesi vardır: PAZ yapısı ve Piwi yapısı. (Bu yapılar aynı zamanda "Dicer" enzimlerinde de vardır). Argonat proteinleri siRNA'ları RNA interferansta görevli RISC ("RNA induced silencing Complex") enzimine götüren proteinler olabilirler (Hannon, 2002).

3) RISC

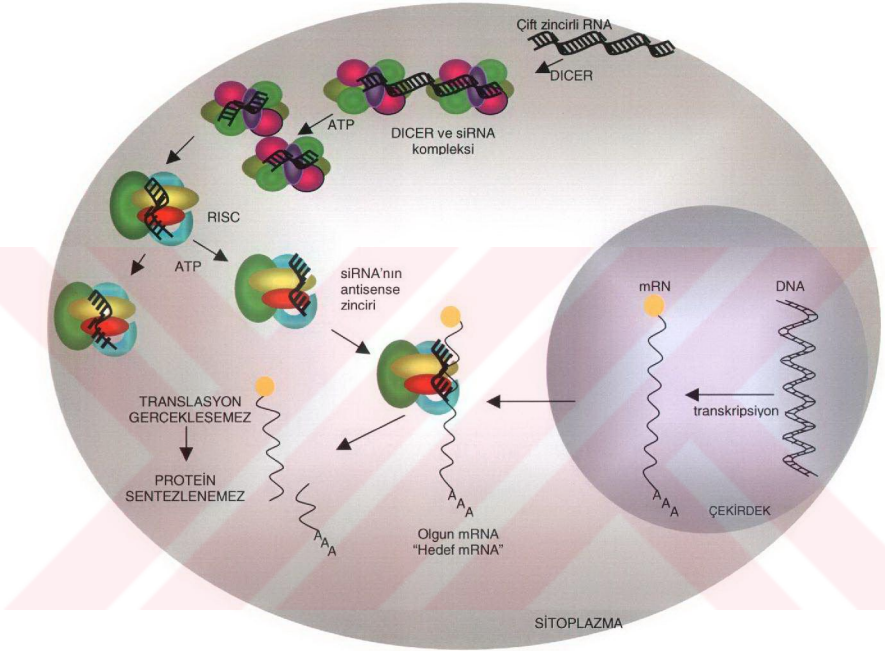
RISC ("RNA induced silencing Complex": RNA tetikli susturma kompleksi) siRNA'ların rehberliği aracılığıyla hedef mRNA'yı bulup parçalayan bir protein-RNA-nükleaz kompleksidir. RISC'in ilk bileşeni siRNA'dır. Bunun sayesinde RISC hedef mRNA sekansını tanıyabilir (Hammond ve ark. 2000). Zamore ve ark. *Drosophila* embriyolarından elde ettikleri ekstreleri incelediklerinde RISC enziminin yaklaşık 250 kilo Daltonluk bir öncü kompleksten oluştuğunu, bu öncü kompleksin, ATP eklenmesiyle aktif hale gelerek hedef mRNA'yı parçalayacak yaklaşık 100 kilo Daltonluk bir kompleks oluşturduğunu görmüşlerdir (Nykanen ve ark. 2001). (Dalton: ^{12}C çekirdeği kütle sinin, $1,657 \times 10^{-24}$ gr, 1/12'sine eşit olan bir atom kütle si birimi.) Hannon ve ark. ise *Drosophila* S2 hücrelerinden izole ettikleri RISC ribonükleotidinin ağırlığını 500 kD olarak saptamışlardır (Hannon, 2002). Çift zincirli RNA'nın (çzRNA) parçalanması endonükleolitik bir olaydır ve sadece çift zincirli RNA'nın siRNA'yla homolog bölümlerinde gerçekleşir (Nykanen ve ark. 2001). Hannon ve ark. S2 hücrelerinden elde ettikleri RISC preparasyonlarından, ne kadar iyi saflaştırılırsa saflaştırılırsın ara parçalama ürünü elde edemediklerini belirtmişler ve bunun, RISC enzim kompleksinde bir ekzonükleazın varlığından kaynaklanabileceğini belirtmişlerdir. Onlara göre in vivo da oluşan kompleks ek faktörler içeriyor olabilir ve bu

faktörler 100 kD ile 500 kD arasındaki farkı yaratıyor olabilirdi. Ya da S2 hücrelerinden saflaştırılan RISC enzim kompleksinin aktif bir formu olabilirdi (Hannon, 2002). Homolog hedefin bulunmasında en etkili olan kısım tek zincirli siRNA'dır. RISC zimojeninin ("zymogen": bir enzimin inaktif formu) aktif hale gelmesinde, siRNA zincirlerinin açılmasının etkili olup olmadığı merak konusudur (Nykanen ve ark. 2001).

Mekanizma

RNA interferans sitoplazmada gerçekleşir ve şu şekilde çalışır (Bkz. Şekil 13): hücre içinde çift zincirli RNA molekülü (30 baz çiftinden daha uzun olmak koşuluyla) sitoplazmada doğal olarak bulunan "Dicer" enzimiyle karşılaştığında, "Dicer" bu uzun RNA'yı hidrolize ederek 21- 23 nükleotid uzunluğundaki parçalara böler. Bu parçalar siRNA olarak adlandırılmıştır (Elbashir ve ark. 2001). "Dicer" çiftli bir yapıdadır. Çift zincirli RNA molekülünü keserken "sense" (sens: anlamlı) ve "antisense" (antisens: anlamsız) zincirleri yaklaşık 2 nükleotidlik bir farkla keser. Böylece oluşan siRNA'ların her iki zincirinin 3'-ucunda 2 nükleotidlik çıkıntılar meydana gelir. Ayrıca 5'-uçlarıda fosfat içerir. siRNA'nın bu yapısı mekanizmanın çalışabilmesi için önemlidir. Eğer 5'-ucu fosfat içermiyorsa endojen bir kinaz sayesinde çok hızlı bir şekilde fosforillenirler (Nykanen ve ark. 2001, Schwarz ve ark. 2002). Çünkü bu, bir sonraki aşama için gereklidir. "Dicer" enzimleri, çzRNA'yı siRNA'lara parçaladıklarında henüz siRNA'lardan ayrılmamışlardır ve siRNA'lar çift zincirli yapıdadırlar. siRNA'nın çift zincirli yapısı açılır ve antisens zincirini RISC'e bırakır (Dykxhoorn ve ark. 2003). Bernstein ve ark. "Dicer" enziminin helikaz alanı içerdiğini saptamışlardı (Bernstein 2001). Dolayısıyla bu, "Dicer" enziminin helikaz aktivitesi sayesinde olabilir. (helikaz: çift zincirli bir nükleik asitin zincirleri arasındaki hidrojen bağlarını kırıp, açan ve böylece nükleik asiti tek zincirli hale getiren enzim.) *Drosophila* emryolarından pre-RISC kompleksi izole edilmiş ve bu kompleks siRNA'ların ATP-bağımlı bir işlemle tek zincirli hale getirilmesiyle aktif hale gelmiştir. RNAi-yoksun mutantlarda yapılan araştırmalar sonucunda birkaç farklı türde helikaza rastlanmıştır: QDE-3, MUT-6 ve MUT-14 gibi. Bunlardan herhangi

bir RISC'i aktive eden enzim olabilir (Cogoni ve ark. 1999, Wu-Scharf ve ark. 2000, Tijsterman ve ark. 2002). siRNA'nın antisens zinciri RISC'in hedef mRNA'yı bulmasına rehberlik eder. Çünkü antisens zincir hedef mRNA'ya komplementerdir.



Şekil 12: RNA interferans mekanizması. Sitoplazmada çift zincirli RNA görüldüğünde "DİCER" tarafından tanınır ve 21- 23 nükleotid uzunluğunda siRNA'lara parçalanır. siRNA'ların antisens zinciri "DİCER"-siRNA kompleksinden ayrılıp RISC ile birleşir. Bu arada ATP harcanır. siRNA'nın antisens zinciri RISC'in hedef mRNA'yı bulmasına ve spesifik olarak parçalamasına rehberlik eder. Spesifik bir mRNA parçalanmış ve böylece translasyonu engellenmiş olur.

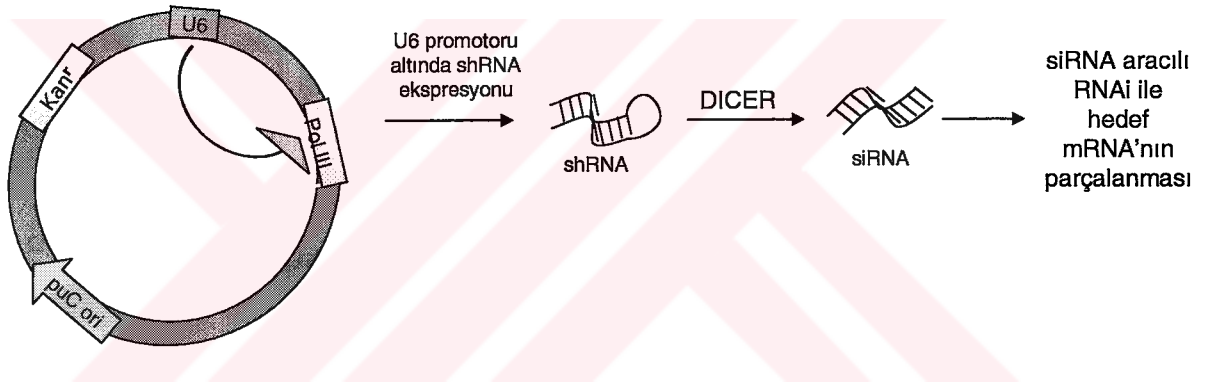
İnterferon yanıtından farklı olarak RISC hedef mRNA'yı seçmede çok yüksek bir seçiciliğe sahiptir. Hedef mRNA zinciri ile siRNA'nın antisens zinciri birleştiğinde "Slicer" olarak bilinen bir enzim mRNA'yı ikiye böler. Hedef mRNA tek bir noktadan yani mRNA - antisens siRNA zinciri

dupleksinin tam ortasından (antisense siRNA zincirinin 5'-ucundan 10 nükleotid sonra) ikiye bölünür. Daha sonra RISC ikiye parçalanmış mRNA zincirinden ayrılır ve aynı sekansta başka bir hedef mRNA'yı bulmak için yoluna devam eder. Hedef mRNA parçalandığından translasyon gerçekleşemez ve spesifik bir proteinin sentezlenmesi engellenmiş olur (Elbashir ve ark 2001).

RNAi'nin virüslere ve hareketli genetik elementlere karşı çok eski bir doğal savunma mekanizması olduğu düşünülmektedir (Plasterk, 2002). Normalde ökaryotik hücre sitoplazmasında uzun çift zincirli RNA molekülü yoktur (Dave ve Pomerantz, 2003). Bu, ancak virüslerin hücreye girmesi ve çift zincirli RNA üretmesiyle ya da hareketli genetik elementlerle mümkün olur. Yüksek ökaryotların çift zincirli RNA molekülüne verdikleri yanıt çok yönlü bir yanıtıdır (Cullen, 2002). Çift zincirli RNA molekülüne interferon yanıtı da, RNA interferans yanıtında verilebilir. Memelilerde RNA interferans, interferon yanıtından bağımsız olarak çalışır (Cullen 2002, Yu ve ark. 2002, Brummelkamp ve ark. 2002, Sui ve ark. 2002). Ayrıca "Dicer" enzimine ek olarak eIF2C2 ("eukaryotic translation initiation factor 2C 2") gibi diğer bazı PPD'ler ("PAZ / PIWI DOMAIN PROTEINS (PPD)": PAZ ve PIWI yapısı içeren bir protein) bu yollarda görev alıyor olabilirler (Hutvagner ve ark. 2002, Grishok ve ark. 2001, Mourelatos ve ark. 2002).

Bitki, fungi ve solucanlar gibi düşük ökaryotlarda çift zincirli RNA'nın sekans spesifik olarak parçalanması (RNA interferans), PTGS olarak adlandırılır (Cerutti, 2003) ("Post transcriptional gene silencing": transkripsiyon sonrası gen susturma). PTGS ile RNA interferans mekanizması aynı şekilde çalışır. Ancak bitki, fungi ve solucanlarda bir siRNA amplifikasyonu söz konusudur. Memelilerde böyle bir amplifikasyon görülmemiştir (Zeng ve ark.2002, Paddison ve ark. 2002, Chiu ve ark. 2002) Bu yüzden memelilerde ve *Drosophila*'da RNA interferans geçici ve kısa süreli iken bitki, fungi ve solucanlarda gen susturma uzun sürelidir, yayılır hatta oğul hücrelere de geçer.

Memelilerde daha uzun zamanlı RNA interferans araştırmaları yapabilmek amacıyla plazmid-vektör aracılı sistemler geliştirilmiştir (Kawasaki ve ark. 2002, Lee ve ark. 2002, Svoboda ve ark. 2001, Tavernarakis ve ark. 2000, Kennerdel ve ark. 2000, Brummelkamp ve ark. 2002, McManus ve ark. 2002, Paddison ve ark. 2002, Paul ve ark. 2002, Sui ve ark. 2002, Yu ve ark. 2002). Bu sistemlerde memeli hücrelerine gönderilen plazmidler shRNA (“small hairpin RNA”: u yapısı içeren küçük RNA’lar) molekülleri eksprese ederler. Plazmidler U6 ve H1 gibi RNA polimeraz III (ya da RNA polimeraz II) promotor sekansları içerirler ve shRNA ekspresyonunu bu promotorların kontrolü altında yaparlar. Hücre içinde eksprese ettikleri shRNA’lar “Dicer” tarafından 21 nükleotidlik siRNA’lara dönüştürölür. (şekil 13).



şekil 13: plazmid-vektör aracılı RNA interferans.

Bu ekspresyon sistemlerinde eğer uzun “hairpin” yapılar elde edilmek isteniyorsa RNA polimeraz II promotorları kullanılır. Bu sistem interferon yanıtı vermeyen ya da hafif düzeyde interferon yanıtı veren hücreler için kullanılır. Eğer kısa “hairpin” RNA molekülleri elde edilmek isteniyorsa, polimeraz III promotorları tercih edilir. Polimeraz III promotorları (genellikle U6 ya da H1) kontrolü altında eksprese eden RNA molekülleri kısa “hairpin” RNA (shRNAs) molekülleridir ve interferon yanıtına neden olmazlar (Dykxhoorn ve ark. 2003). Bu sistem memeli hücreleri gibi interferon yanıtı veren hücrelerde kullanılır.

Plazmid-vektör aracılı ekspresyon sistemi RNA interferans ile hedef gen ürününü daha uzun süre susturmayı ("gene silencing") olanaklı kılarsa da sürekli bir susturma sağlayamazlar. Bunun için virüs-vektör aracılı ekspresyon sistemi kullanmak gerekir. Hücrede stabil shRNA ekspresyonu yapmak için retrovirüs-vektör sistemleri geliştirilmiştir (Hemann ve ark. 2003, Paddison ve ark. 2002, Brummelkamp ve ark. 2002, Stewart ve ark. 2003, Rubinson ve ark. 2003, Qin ve ark. 2003). İki tür retrovirüs vektör sistemi kullanılmaktadır:

- Onkoretrovirüs-vektör kullanılarak oluşturulmuş sistemler. Bunlar "Moloney murine leukemia virus" ya da "murine stem cell virus" üzerine oluşturulmuş sistemlerdir.
- Lentivirüs vektörleri ile oluşturulmuş sistemler. Lentivirüsler HIV-1 virüsünden elde edilmiş virüslerdir.

Memelilerde doğal olarak hücre içinde eksprese eden siRNA'lar bulunmaz. Ancak mikro-RNAlar (miRNA) bulunur. Bu kısa RNA türleri (yaklaşık 22 nükleotid uzunluğunda), "Dicer" enziminin yaklaşık 70 nükleotidlik endojen, öncü, "hairpin" (u şeklinde yapı) RNA'ları parçalamasıyla oluşur. miRNA'ların hedef mRNA'nın 3'- UTR ("untranslated region": translasyonu yapılmayan bölge) bölgesine bağlandığı ve bağlanırken hedefine tam komplementer olmadığına inanılmaktadır bu da translasyonun baskılanmasına ve protein sentezinin inhibisyonuna neden olur (Pasquinelli ve ark. 2002). Ancak siRNA'larda olduğu gibi tam bir gen susturma yoktur.

miRNA'lar ilk olarak, yüzlerce farklı üyesi olan hayvanlardaki bir regülatör RNA sınıfı olarak tanımlandı (Ruvkun, 2001). İlk miRNA *C.elegans*'ta tanımlanan stRNA ("small temporal RNA") idi. miRNA'lar gibi stRNA'lar da 21 nükleotid uzunluğundadır. Ancak stRNA'lar miRNA'ların sadece bir alt grubudur. İkinci bir miRNA grubu siRNA'lardır (Zamore, 2002). Ancak miRNA'larla siRNA'lar arasında bazı farklar vardır. Bunlar şöyle sıralanabilir:

- miRNA'lar hücre içindeki ters tekrar eden DNA moleküllerinden ("inverted repeats") oluşurken, siRNA'lar hücreye dışardan gelen çift zincirli RNA'lardan ya da transgenlerden oluşur.
- miRNA'lar tek zincirliken siRNA'lar çift zincirlidirler.
- siRNA'lar hedef mRNA'ya mükemmel bir şekilde komplementerken, miRNA'lar tam komplementer değildir. Dolayısıyla translasyonel kaçaklar olabilir.

1.3 HEPG2 2.2.15 HÜCRE HATTI

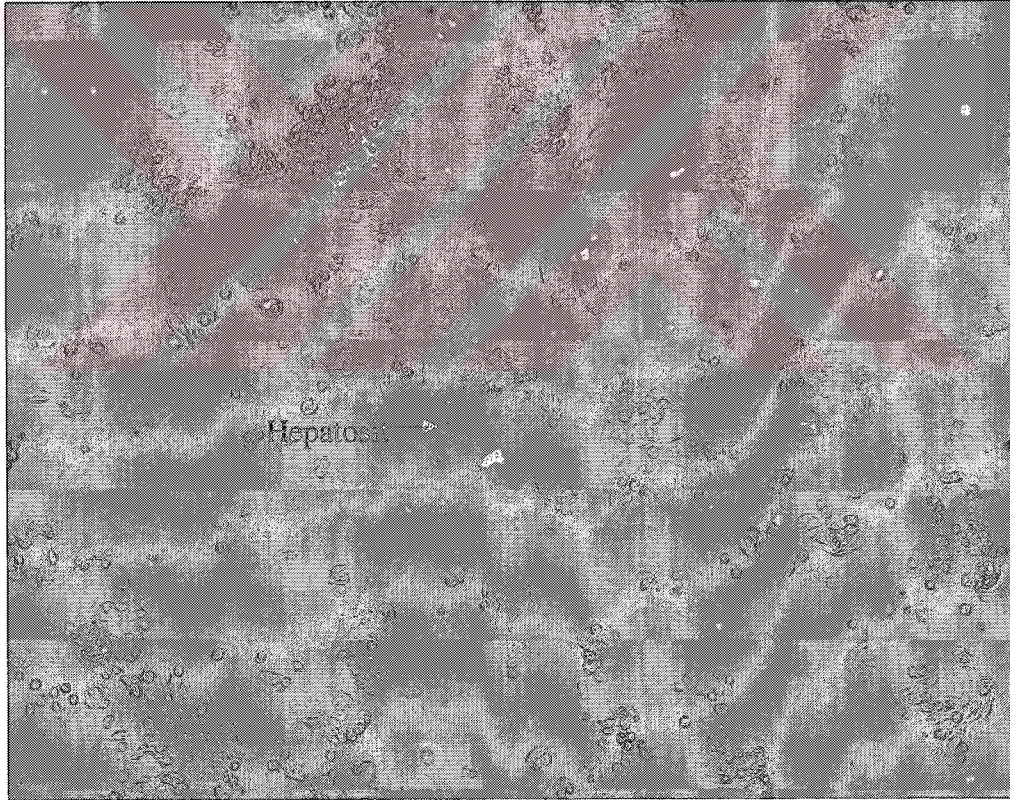
Hücre hatları sonsuza dek bölünebilen ve birçok deneyin özellikle anti-viral ajanların test edilmesine olanak sağlayan hızlı ve güvenilir sistemlerdir. Yaklaşık olarak 20- 25 yıldır HBV ekspresyonu yapan hücre hatları mevcuttur (Sells ve ark. 1987, Shih ve ark. 1989, Sureau ve ark. 1987, Sureau ve ark. 1988, Tagieva ve ark. 1995, Tsurimoto ve ark. 1987, Weiss ve ark. 1996).

HepG2.2.15 hücreleri, HepG2 hücrelerinin bir türevidir. HepG2 hücreleri ise 15 yaşında hepatoselüler karsinomlu bir erkek hastanın karaciğer biyopsisinden alınan kanserli hepatoblastoma hücrelerinden elde edilmiş bir hücre hattıdır. Kültür ortamında hızlı bir şekilde büyüebilirler. HepG2 hücreleri, albümin, alpha2-makroglobulin, alfa-1-antitripsin, transferrin ve plasminojen gibi birçok önemli plazma proteinini salgırlar. Ancak hücre genomuna HBV entegrasyonu saptanmamış ve bu hücrelerde HbsAg tespit edilememiştir (Knowles ve ark.1980). Bu hücrelerin bir diğer özelliği de G418 antibiyotiğine karşı dirençli olmaları (400µg/ml) ve insan büyüme hormonuna duyarlı olmalarıdır.

HepG2 hücrelerinin, yaban tip HBV ayw genomu içeren plazmidlerle transfekte edilmesiyle HepG2.2.15 hücre hattı elde edilmiştir (Resim 2). Bu hücrelerde HBV ayw genomu, hepatosit genomuna entegre olmuştur. Dolayısıyla stabil olarak HBV replikasyonu ve ekspresyonu yaparlar.

zamanlarında HBV DNA'nın replikatif formlarında artış gözlenmiştir. HepG2.2.15 hücrelerinde bulaşıcı özelliğe sahip virionlar üretilir.

HepG2.2.15 hücrelerinde kullanılan rekombinant plazmid, pDoITHBV-1 (HBV ayw pgDNA'sını içerir) plazmididir. Bu plazmid "geneticin" ("neo") antibiyotiğine karşı direnç geni (Ladner ve ark. 1997) ve HBV genomunun 5' ve 3' ucunun tekrarlayan 4 kopyasını içerir (Dandri ve ark. 2002, Schraufstatter ve ark. 1986). Bu hücrelerde Dane parçacıkları üretilir (Acs ve ark. 1987, Sells ve ark. 1987, 1988). Sitoplazmadaki sub-viral parçacıklar göreceli olarak sabittir. Bu hücre hattı üzerinde denenecek bir antiviralin yaklaşık 7 günde test edilmesi gerekir. Virüs replikasyonu göreceli olarak düşük düzeyde olduğundan genelde deneylerde 24-kuyulu plaklar tercih edilir (Korba ve ark. 1991, 1992).



Resim 2: HepG2.2.15 hücrelerinin 5x büyütme ile mikroskop altındaki görüntüsü. Her bir yuvarlak bir hepatositi belirtiyor.

HepG2 2.2.15 hücrelerinde kullanılan kültür ortamı şu şekildedir:

DMEM / Ham's F12 (50/50)

- + %10 FBS (v/v) "heat-inactivated fetal calf serum" (ısıyla inaktive edilmiş fetal buzağı serumu)
- + 100 ünite/ml penisilin, 50µg/ml streptomisin
- + 2mM L glutamin.

1.4 TRANSFEKSİYON

Normal koşullar altında memeli hücrelerinin, dışarıdan verilen DNA moleküllerini hücre içine almaları çok zordur. Bunun nedeni, ökaryotik hücre membranındaki lipid yapının (+) ya da (-) yüklü yapılar için güçlü bir bariyer olmasıdır. Ancak bu problemi çözmek için bazı yöntemler geliştirilmiştir. Bugün en çok kullanılan transfeksiyon yöntemleri üç grupta toplanabilir:

- 1- Biyokimyasal yöntemler,
- 2- Fiziksel yöntemler,
- 3- Viral vektörlerin kullanıldığı yöntemler.

Hangi yöntemin seçileceği, deneyin amacına, kullanılacak hücrelere ve amaçlanan transfeksiyon verimliliğine göre değişir. Her hücre hattı için, her transfeksiyon yöntemi uygun değildir.

1.4.1 Biyokimyasal yöntemler

Kalsiyum fosfat aracılı, dietilaminoetil (DEAE)- dekstran aracılı ve katyonik lipozom aracılı yöntemler olmak üzere üçe ayrılır. Bu yöntemler her ne kadar biyokimyasal ana başlığı altında toplansa da aslında nükleik asitle kimyasal ajan arasında herhangi bir kimyasal reaksiyon gerçekleşmez. Kimyasal ajanlar (Kalsiyum fosfat, dekstran ve katyonik lipozom) nükleik asidi sadece "taşıyıcı" molekül olma özelliği gösterirler. Taşıyıcı moleküllerle transfeksiyonun temel mantığı ise elektrostatik çekim kuvvetine dayanır: Nükleik asitler negatif yüklü olduklarından pozitif yüklü molekül ya da makro molekül kompleksleriyle kolaylıkla birleşecektir. Nükleik asitler taşıyıcı

moleküllerle etkili şekilde hücre içine alınır ve sitoplazma ya da nükleusta salınır. Ancak bu mekanizmanın ayrıntıları tam olarak bilinmemektedir.

Kalsiyum fosfat ve dekstran yöntemleri yaklaşık 30 yıldır nükleik asitleri kültür hücrelerinin sitoplazmalarına sokabilmek için kullanılmaktadır. İlk olarak Graham ve Van der Eb (1973) viral DNA'ları memeli hücrelerine göndermek amacıyla kalsiyum fosfat yöntemini kullanarak transfeksiyonda biyokimyasal bir yöntem uygulamış oldu. Daha sonra Wigler ve ark. bu yöntemin üzerinde çeşitli değişiklikler yapılarak daha kullanışlı hale getirdiler (Graham, 1973, Wigler ve ark. 1978). Bugün bu yöntem halen kullanılmaktadır. Ancak pH'a çok duyarlı olduğundan birçok hücre hattında çalışmaz hatta toksik etki yaratır, özellikle primer hücre dizilerinde. Bu yüzden bilim adamları daha az toksik ve daha uygulanabilir yöntemleri aramışlar ve bu arayışların sonucunda DEAE dekstran ve katyonik lipidlerle transfeksiyon yöntemlerini bulmuşlardır. Ancak bu iki yöntemden daha etkili ve daha başarılı olanı katyonik lipidlerle transfeksiyon yöntemidir (Felgner ve ark. 1993).

Katyonik lipidler doğal bir lipid karışımıdır. Pozitif amin gruplarından dolayı pozitif yük taşıyan lipozom vezikülleri oluştururlar. Nükleik asitler (negatif yüklü) bu vezikülleri adsorbe ederler ve bu moleküllerin lipid yapısı sayesinde hücre membranından geçebilirler. Geçiş şekli endositozdur. İyi optimize edildiğinde katyonik lipidlerle transfeksiyon diğer yöntemlere göre daha etkili ve daha kolaydır.

1.4.2 Fiziksel yöntemler

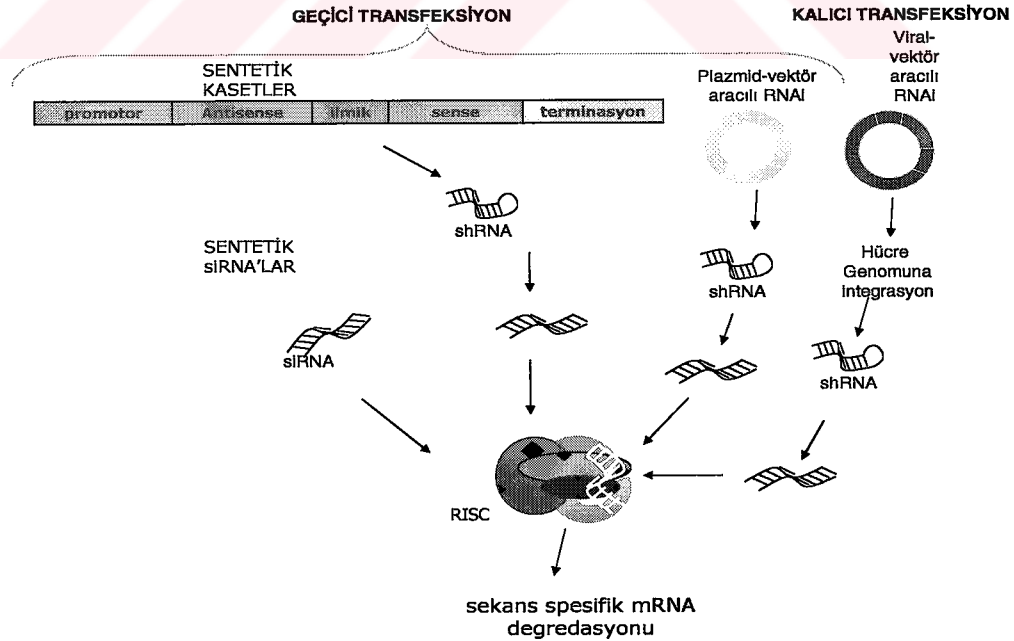
Sitoplazmaya ya da nükleusa nükleik asit göndermek için kabuk kuvvetten yararlanır. Elektroporasyon (Andreason ve ark. 1988, Shigikawa ve ark. 1988), nükleik asitleri saran taşıyıcı moleküllerle bombardıman (gen tabancası) ve mikroinjeksiyon olmak üzere üçe ayrılır. Genelde, elektroporasyon ve gen tabancasından bakteri ve bitkilerde yararlanır. Transgenik bir fare yaratmak gibi bir amaç varsa da mikroinjeksiyon yöntemi

elektroporasyon ve gen tabancasından bakteri ve bitkilerde yararlanır. Transgenik bir fare yaratmak gibi bir amaç varsa da mikroenjeksiyon yöntemi kullanılır. Fiziksel yöntemler pahalı oldukları gibi aynı zamanda daha fazla sitotoksik etki yaratırlar. Dolayısıyla rutinde çok sık kullanılmazlar.

1.4.3 Viral vektörlerin kullanıldığı yöntemler

Gen ekspresyonunu *in vitro* ya da *in vivo* ortamda çalışmak için birkaç viral vektör sistemi geliştirilmiştir. Bunlar arasında rekombinant vaccinia virüsler, retrovirüsler ve adenovirüsler en çok bilinenlerdir. Rekombinant vaccinia virüs ve adenovirüs geçici ekspresyon çalışmaları için kullanılırken, rekombinant retrovirüsler kalıcı transfeksiyon için kullanılır. Ancak rekombinant virüslerin üretimi zaman alıcıdır ve biyo-güvenlik açısından özel laboratuvarlar gerektirir.

Memelilerde RNAi çalışmaları yapmak için birkaç transfeksiyon aracı vardır. Bunlardan birincisi sentetik siRNA'lar kullanmak, ikincisi sentetik kasetler kullanmak, üçüncüsü shRNA ekspresyonunu sağlayan plazmid-vektör sistemi kullanmak ve son olarak kalıcı transfeksiyon için viral-vektörler (retrovirüsler) kullanmak. (Şekil 14).



Şekil 14: geçici ve kalıcı transfeksiyon seçenekleri.

1.5 ÇALIŞMANIN AMACI

Bu çalışmanın amacı hücre kültürü ortamında RNAi teknolojisiyle HBV replikasyonunu baskılamaktır. Bunun için plazmid-vektör aracılı bir sistem kullanıldı. Plazmid-vektör aracılı sistemin kullanılmasının amacı shRNA'larla stabil HBV ekspresyonu yapan hücrelerde HBV'nin daha uzun süre baskılanmasını sağlamaktır.



2. GEREÇ VE YÖNTEM

2.1 Gereçler

2.1.1 Hücre hattı ve kültür koşulları

HepG2 2.2.15 hücreleri, HepG2 hücrelerinin pDo1THB-1 plazmidi ile stabil transfeksiyonu yapılmış insan hepatoma hücre hattıdır. Sürekli, stabil HBV replikasyonu ve ekspresyonu yapar. İçerdiği HBV genomu Türkiye’de %100 görülen HBV ayw genomudur. Bu hücre hattının kültür ortamı şöyledir:

- DMEM / Ham’s F12 (50/50)
- + %10 FBS (v/v) ısıyla inaktive edilmiş fetal buzağı serumu
- + 100 ünite/ml penisilin, 50 µg/ml streptomisin
- + 2mM L glutamine

Hücre kültüründe kullanılan tüm malzemelerin ismi, hangi firmadan alındıkları ve katalog numaraları tablo 3’teki gibidir:

Tablo 3: Hücre kültüründe kullanılan malzemeler.

Malzeme ismi	firma
1- Tripsin (%25) EDTA(%0.1)	Invitrogen, İngiltere
2- Penisilin-Streptomisin 5,000IU/ml ve 5.000µg/ml	Invitrogen, İngiltere
3- L-Glutamin 200mM 29.2mg/ml in 8.5g/L NaCl	Invitrogen, İngiltere
4- Kanamisin 500µg/ml	Invitrogen, İngiltere
5- Dulbelco`s Modified Eagle Medium Nutrient Mixture f-12(Ham) 1:1 1x 0.1 mikronlu filtreden geçirilmiş 15mM HEPES Buffer , L-Glut. ve pyridoksin hidroklorid içeriyor	Gibco-Invitrogen, İngiltere
6- Kriyojenik tüp (Cryogenic Vial), 2ml Polypropilen	Gibco-Invitrogen, İngiltere
7- 96 kuyulu hücre kültür plağı	Invitrogen, İngiltere

8-	24 kuyulu hücre kültür plağı	Invitrogen, İngiltere
9-	6 kuyulu hücre kültür plağı	Invitrogen, İngiltere
10-	35 mm hücre kültür plağı	Cellstar, Almanya
11-	25 cm ² hücre kültürü flaskı	Gibco-Invitrogen, İngiltere
12-	75cm ² hücre kültürü flaskı	Gibco-Invitrogen, İngiltere
13-	15 ml santrifüj tüpü maksimum RCF 8400xg	Gibco-Invitrogen, İngiltere
14-	50 ml santrifüj tüpü maksimum RCF 9400xg	Gibco-Invitrogen, İngiltere
15-	Steril serolojik pipet 1/10 ml ayrımlı 5 mlik pipet	Gibco-Invitrogen, İngiltere
16-	Steril serolojik pipet 1/10 ml ayrımlı 10 mlik pipet	Gibco-Invitrogen, İngiltere
17-	Steril serolojik pipet 1/10 ml ayrımlı 25 mlik pipet	Gibco-Invitrogen, İngiltere
18-	Tripan mavi boyası % 0.4 membran filtrelı % 0.85 salın içinde hazırlanmış	Gibco-Invitrogen, İngiltere
19-	DMSO steril, filtrelenmiş	Applichem, Almanya
20-	G418 Sulfat tozu	Gibco-Invitrogen, İngiltere
21-	PBS	Biochrom, Almanya
22-	FBS	Invitrogen, İngiltere

2.1.2 Çift zincirli siRNA'ları oluşturmak ve klonlamak için kullanılanlar

HBV *ayw* genomuna spesifik üç hedef bölge seçildi ve bunlara spesifik sens ve antisens RNA sekansları kimyasal olarak Invitrogen firmasına sentezletirildi. Bu RNA sekansları şunlardı:

shRNA1686 için sırasıyla üst ve alt zincir:

5'-CACCG^{*}CGACCGACCTTGAGGCATACGAA^{*}TATGCCTCAAGGTCGGTCG^{*}-3'

5'-AAAACGACCGACCTTGAGGCATATTCGTATGCCTCAAGGTCGGTCGC^{*}-3'

shRNA 765 için sırasıyla üst ve alt zincir:

5'-CACCGTCTGTACAGCATCTTGAGCGAA^{*}CTCAAGATGCTGTACAGAC^{*}-3'

5'-AAAAGTCTGTACAGCATCTTGAGTTCGCTCAAGATGCTGTACAGAC^{*}-3'

shRNA 2228 için sırasıyla üst ve alt zincir:

5'-CACCG^{*}TTTGAAGAGAAACCGTTACGAA^{*}TAAACGGTTTCTCTTCCAAA^{*}-3'

5'-AAAATTTGAAGAGAAACCGTTATTCGTAACGGTTTCTCTTCCAAAC^{*}-3'

Klonlama yapmak için Invitrogen firmasının kiti kullanıldı:

BLOCK-IT U6 RNAi Entry vector kit Kat No: K4945-00 Invitrogen,
İngiltere

2.1.3 Kullanılan plazmidler

- HBV'ye spesifik shRNA eksprese eden plazmidler:
Lineer halde pENTRY / U6 vektörü: kanamisin direnç geni içeriyorlar.
(P1686, P765 P2228 ve PlacZ için)
- β - galaktosidaz eksprese edilmesini sağlayan lac Z genine spesifik plazmid: puc 19: pcDNA 1.2/V5-GW/ lacZ kontrol plazmidi (Invitrogen, İngiltere)
- GFP (Green Fluorescence Protein: yeşil floresan protein eksprese eden plazmid.

2.1.4 Transformasyon

Kompetent E. coli hücreleri.

Liquid Broth (sıvı besiyeri). 50 µl/ml kanamisinli.

Sigma, Almanya.

Agar noble.

Sigma, Almanya.

Kriyojenik tüp (Cryogenic Vial), 2ml

Invitrogen, İngiltere.

10 ml plastik katı besiyeri tabakları.

SOC medium.

Invitrogen, İngiltere.

LB'İN HAZIRLANMASI:

- 500 ml besiyeri için; 12,5 gr LB 500 ml'ye ddH₂O ile tamamlanır.
- otoklavlanır, otoklavlarken şişelerin kapakları hafifçe açılır. Sonra +4°C'de saklanır. Bundan sonra yapılacakların tümü ateş yanında yapılır.
- Otoklavlanmış 100 ml LB besiyerine 1,5 gr Agar noble eklenir. Otoklavlanır.
- Yeterince soğuyunca 5 mg Kanamisin tartılıp eklenir (50 µg/ml).
- Koloni başına 2 ml besiyeri kullanılır.

2.1.5 Bakteriden plazmid izolasyonu

Midi Prep Kiti.

Invitrogen, İngiltere

Mutlak etanol

Kimetsan, Türkiye.

2.1.6 Agaroz jel elektroforezi

Agaroz

Sigma, Almanya.

Etidyum Bromid

Sigma, Almanya.

Borik asit

Merck, Almanya.

Bromofenol Mavisi

Sigma, Almanya.

EDTA

Quantum, A.B.D.

Tris HCl

Sigma, Almanya.

ΦX174 DNA/Hinfl marker

MBI Fermentas, Almanya.

Fikol

Biochrom, Almanya.

Bromofenol Mavisi

Sigma, Almanya.

Ksilen siyanol

Sigma, Almanya.

TAMPON ÇÖZELTİLER:

Tris-borik asit-EDTA tamponu (TBE) (10 X) (1L)

108 g Tris HCl

55 g borik asit

20 ml 0.5 M EDTA

1000 ml ddH₂O ile tamamlandı.

Agaroz jel yükleme tamponu (6X)

%15 Fikol

% 0.05 Bromofenol mavi

% 0.05 Ksilen siyanol

TE tamponu

100mM Tris HCl

1 mM EDTA

pH=8'e ayarlanır.

2.1.8 Sekans analizi

“ABI Prism BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit with AmpliTaq DNA, Polymerase, FS” kiti. Applied Biosystem, İngiltere.

Klonlanan shRNA dizilerinin plazmide aktarıldığını test etmek için U6 “forward” ve M13 “reverse” primerleri kullanıldı. Bunların sekansları şu şekildedir:

U6 “forward”: 5'-GGACTATCATATGCTTACCG-3'

M13 “reverse”: 5'- CAGGAAACAGCTATGAC-3'

2.1.2 Transfeksiyon gereçleri

Oligofectamine (katyonik lipozom) Kat No: 12252-011, Invitrogen, İngiltere.

Opti-MEM Kat No: 12252-011, Invitrogen, İngiltere.

2.1.9 Hücre kültüründen HBV DNA izolasyonu

QIAamp DNA mini kiti

Qiagene, İngiltere.

2.1.10 Real- time PCR

Real –time PCR için Roche Light cyclers cihazıyla “LightCycler- Fast Start DNA Master Hybridization Probes” kullanıldı. Kat. No: 3003248 , Roche, Almanya.

Kullanılan primer ve proplar ise HBV ayw genomuna spesifik aşağıdaki sekansları içermektedir:

HBV-305-321 5'-GCCAAAATTCGCAGTCC-3' (“forward”)

HBV-680-663 5'-AAACTGAGCCAGGAGAAA-3' (“reverse”)

HBV-PR-1 5'-GGATGTGTCTGCGGCGTTTTATCA-fluorescein-3'

HBV-PR-2 5'-LC-Red640-TTCCTCTTCATCCTGCTGCTATGCC-fosfat
3'

2.1.11 Kullanılan cihazlar & aletler:

ABI 310 Sekans cihazı,

Light-Cycler PCR cihazı (Roche Diagnostics, Almanya),

Leica Floresan Mikroskobu,

DNA/ RNA Calculator. Cross-linker,

Soğutmalı Santrifüj (Hawk 15/05 Sanyo Refrigerated, İngiltere),

Hassas terazi (Sartorius, Türkiye),

PH metre (Metler Toledo MP 220 pH meter, İsviçre),

Su banyosu (Heto HWT100, Danimarka),

Kuru blok (Techne DRI-BLOCK, İngiltere),

Karbondioksitli inkübatör.

Jel görüntüleme sistemi ve kamerası (UVP Jel Dökümantasyon Sistemleri, Olympus 40X kamerası, Japonya).

Laminar Flow ve sıvı azot tankı.

2.2 YÖNTEMLER

Özet proje akış şeması:

- 2.2.1 Hedef HBV mRNA sekansı belirlendi.
- 2.2.2 Hedef sekansa göre shRNA sekansları tasarlandı. Bunlar kimyasal yollarla ve tek zincirli olacak şekilde sentezlettiirildi.
- 2.2.3 Birleştirme reaksiyonu ("Annealing reaction"): tek zincirli shRNA oligonükleotidlerinin sens ve antisens zincirleri bir araya getirilerek çift zincirli oligonükleotidler elde edildi.
- 2.2.4 Çift zincirli oligonükleotidler pENTR/U6 vektörüne klonlandı. Bu aşamada T4 DNA ligaz kullanıldı.
- 2.2.5 Oluşturulan bu vektörün *E.coli*'ye transformasyonu yapıldı.
- 2.2.6 *E. coli*'den kanamisine dirençli koloniler seçildi ve bunlardan plazmid izolasyonu yapıldı.
- 2.2.7 Elde edilen bu plazmidlere yapılan klonlamanın başarısını test etmek için sekans analizi yapıldı.
- 2.2.8 Bu arada HepG2 2.2.15 hücreleri transfeksiyona hazırlandı.
- 2.2.9 Sekans analizi ile başarısı doğrulanan plazmidlerin HepG2 2.2.15 hücrelerine transfeksiyonu gerçekleştirildi.
- 2.2.10 Hücrelerin bir hafta boyunca inkübe edildi. her 24 saatte bir hücrelerin salgıladığı ortam toplandı.
- 2.2.11 RNA interferans etkisinin gerçekleşip gerçekleşmediğini görmek için kültür ortamından HBV DNA izolasyonu yapıldı.
- 2.2.12 Bunlar Real-time PCR ile amplifiye edildi ve sonuçlar değerlendirildi.

2.2.1 Hedef HBV mRNA sekansının belirlenmesi

Öncelikle HepG2.2.15 (sürekli HBV ekspresyonunun olduğu insan hepatoma hücreleri) hücrelerindeki HBV genom sekansı araştırıldı (HBV ayw). Bunun için [http:// www.pubmed.com](http://www.pubmed.com) adresinden yararlanıldı. Buna göre HepG2 2.15 hücrelerindeki HBV genom sekansı, primer ve problemlerin şu şekildeydi:

Tablo:4 HepG2 2.15 hücrelerindeki HBV ayw genomu.

```
1 aattccacaa cctttcacca aactctgcaa gatcccagag tgagaggcct gtatttccct
61 gctggtggct ccagttcagg agcagtaaac cctgttccga ctactgcctc tcccttatcg
121 tcaatcttct cgaggattgg ggaccctgcy ctgaacatgg agaacatcac atcaggattc
181 ctaggacccc ttctcgtggt acaggcgggg tttttcttgt tgacaagaat cctcacata
241 ccgcagagtc tagactcgtg gtggacttct ctcaattttc tagggggaac taccgtgtgt
301 cttg1gccaaa attcgcagt1 cccaacctcc aatcactcac caacctcctg tctccaact
361 tgtcctgggt atcgct11 gg11 ggtct11 zgg cgttt11 ca11 tc11 tctctctt catcctgctg
421 ctatgcttca tcttcttgggt ggttcttctg gactatcaag gtatgttgcc cgtttgtcct
481 ctaattccag gatcctcaac caccagcagc ggaccatgcc gaacctgcat gactactgct
541 caaggaacct ctatgtatcc ctctggttgc tgtaccaaac cttcggacgg aattgcacc
601 tgtattocca tcccatcctc ctgggcttcc ggaaaattcc tatgggagtg ggctcagcc
661 cg1v gg1v ggttgcagt1v actagtcca tttgttcagt ggttcgtagg gctttcccc
721 actgtttggc tttcagttat atggatgatg tggatttggg ggccaavgtct gtacagcctc
781 ttgagtccct ttttacgctt gttaccaatt tctttttgct tttgggtata catttaaacc
841 ctaacaaaac aaagagatgg ggttactctc tgaattttat ggttatgtc attggaagtt
901 atgggtcctt gccacaagaa cacatcatac aaaaaatcaa agaagtgttt agaaaacttc
961 ctattaacag gcctattgat tggaaagtat gtcaacgaat tgtgggtctt tgggttttg
1021 ctgccccatt tacacaatgt ggttatctct cgtaaatgcc cttgtatgca tgtattcaat
1081 ctaagcaggg tttcactttc tcgccaactt acaaggcctt tctgtgtaaa caatacctga
1141 acctttacc cgttgcccgg caacggccag gctctgtgcca agtgtttgct gacgcaacc
1201 ccaactggct gggcttggtc atggggccatc agcgcgtgcy tggaaacctt tcggctcctc
1261 tgccgatcca tactgcggaa ctctagcgc cttgttttgc tcgacgagc attggagcaa
1321 acattatcgg gactgataac tctgttgtcc tctcccgcaa atatacatcg tatccatggc
1381 tgetaggctg tgetgccaac tggatcctgc gcgggacgct ctttgtttac gtcccgtcgg
1441 cgctgaatcc tgcgagcagc ccttctcggg gtcgcttggg actctctcgt cccctctcc
1501 gtctgccggt ccgaccgacc acggggcgca cctctcttta cgcggactcc ccgtctgtgc
1561 cttctcatct gccggaccgt gtgcacttgc cttcacctct gcacgtcgca tggagaccac
1621 cgtgaacgcc caccgaatgt tgccaaagt cttacataag aggactcttg gactctctgc
1681 aatgtcaav1cg accgaccttg aggcatactt caaagactgt ttgtttaaag actgggagga
1741 gttgggggag gagattagat taaaggtctt tgtactagga ggctgtaggc ataaattggt
1801 ctgcgacca gcaccatgca actttttcac ctctgcctaa tcatctcttg tcatgtcct
1861 actgttcaag cctccaagct gtgccttggg tggcttggg gcatggacat cgacccttat
1921 aaagaatttg gagctactgt ggagtactc tegttttgc cttctgactt ctttcttca
1981 gtacgagatc ttctagatac gcctcagct ctgtatcggg aagcctaga gtctcctgag
2041 actgttccac ctaccatac tgactcagg caagcaattc ttgtctgtac tgaactaatg
2101 ccttagctca cctgggtggg tgtaatttg gaagatccag catctagaga cctagtgtc
2161 agttatgtca aactaataat gggcctaaag ttcaggcaac tcttgtggtt tcacattct
2221 tgtctcactv11t ttggaagaga aaccgttata gactatttgg tgccttccgg agtgtggatt
2281 cgcactcctc cagcttatag accacaaat gccctatoc tatcaacact tccgaaact
2341 actgttgta gacgacgagg caggtccctc agaagaaga ctcctcgcct tcgcagacga
2401 aggtctcaat cgccgctgc cagaagatct caatctcggg aacctcaatg ttgtattcc
2461 ttggactcat aagtgggga acttactgg tctttattct tctactgac ctgtctttaa
2521 tctcattgg aaaacacat ctttctctaa tatacttta caccaagaca ttatcaaaaa
2581 atgtgaacag tttgtaggcc cacttacagt taatgagaaa agaagattgc aattgattat
2641 gcctgctagg ttttatccaa aggttaccaa atatttacca ttggataagg gtattaaacc
2701 ttattatcca gaacatctag ttaataatta cttccaaact agacactatt tacacactct
2761 atggaaggcg ggtatattat ataagagaga aacaacacat agcgcctcat tttgtgggtc
2821 tccatattct tgggaacaag atctacagca tggggcagaa tctttccacc agcaattcctc
2881 tgggattctt tcccgaccac cagttggatc cagccttcag agcaaacaca gcaaatccag
2941 attgggactt caatcccaac aaggacactt ggccagacgc caacaaggta ggagctggag
```

```
3001 cattcgggct gggtttcacc ccaccgcaag gaggcctttt ggggtggagc cctcaggctc
3061 agggcatact acaaactttg ccagcaaatc cgcctcctgc ctccaccaat cgccagacag
3121 gaaggcagcc taccocgctg tctccacctt tgagaaacac tcatcctcag gccatgcagt
3181 gg
```

Kullanılan primer, prob ve hedef sekanslar.

ⁱ: HBV “forward” primeri, ⁱⁱ: HBV prob 1, ⁱⁱⁱ:HBV prob 2, ^{iv} HBV “reverse” primeri, ^v: hedeflenen 765-784 nt.ler arasındaki HBV mRNA sekansını, ^{vi}: 1686-1705 nt.ler arasındaki HBV mRNA sekansını, ^{vii}: 2228-2247 nt.ler arasındaki HBV mRNA sekansını gösteriyor.

Bu sekansa göre hedef mRNA sekansını seçebilmek için şunlara dikkat edildi:

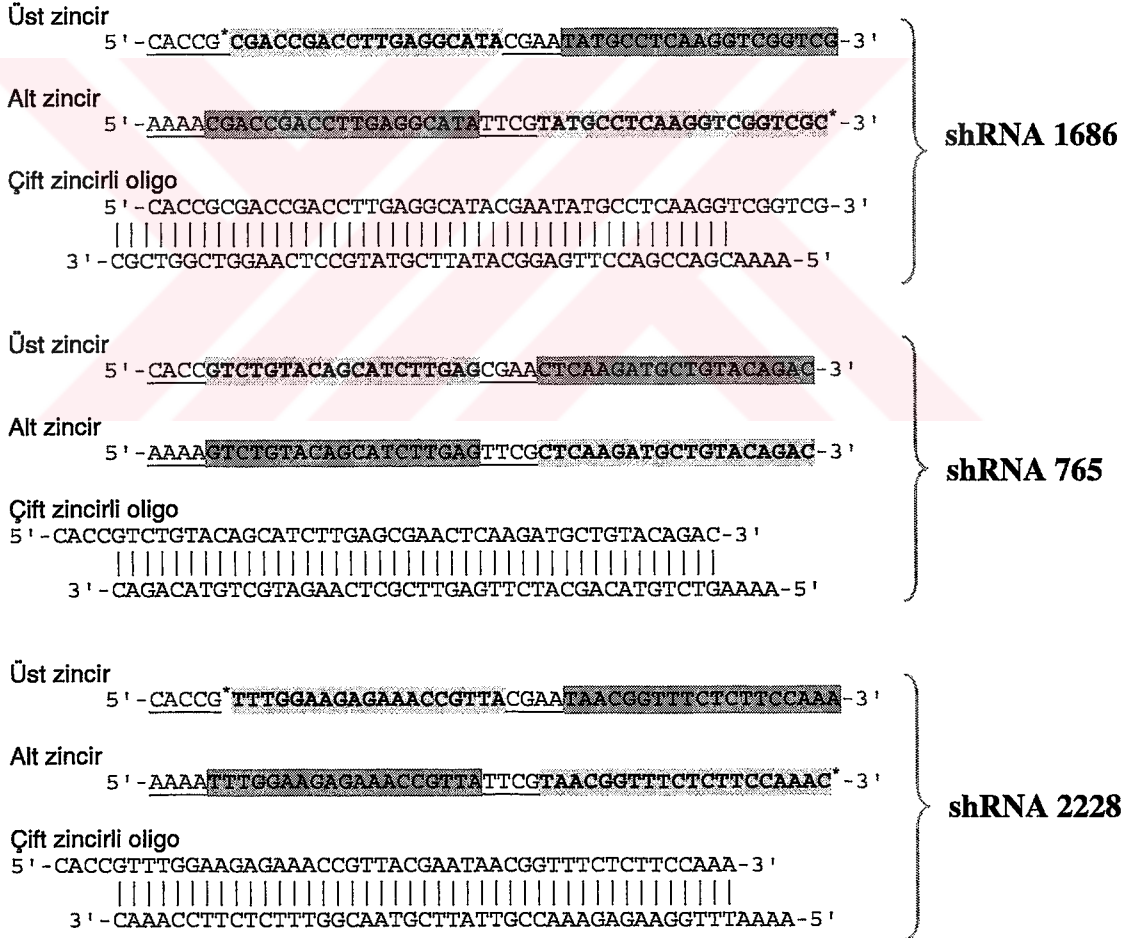
- Hedef seçilen bölgelerin mümkün olduğunca HBV transkriptlerinin regülatör elementlerinin ve transkripsiyon faktörlerinin bağlanma yerlerine gelmemesine çalışıldı.
- HBV sekansında AA(N19) yapısındaki sekanslar arandı. N her hangi bir nükleotidi temsil ediyor.
- Hedeflenen sekanslar aynı zamanda tasarlanan shRNA sekansları olacağından seçilen sekans adaylarının termodinamik özelliklerine bakılarak bir seçim yapıldı.
- Bu sekansın GC oranının %30- 60 arasında kalmasına dikkat edildi.
- Seçilen hedefler HBV ORF’lerinin ATG başlangıç kodonundan 50-100 nükleotid aşağısında olmasına dikkat edildi.
- 5’ ve 3’-UTR bölgelerinden kaçınıldı.
- Seçilen sekanslarda ters tekrar dizilerinin olmadığından emin olundu.
- Hedefin mutasyon sıklığı görülen bir bölgede olmamasına çalışıldı.
- Seçilen sekansların sadece HBV genomuna spesifik olduğundan emin olmak için BLAST taraması yapıldı.
(www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST)
- Son olarak oluşturulan RNA sekansının uzaydaki ikincil yapısına bakıldı. Bunun için MFOLD programı kullanıldı.
(<http://bibiserv.techfak.uni-bielefeld.de/mfold/>). Bu yapıda mümkün olduğunca iç yapılaşmanın (internal structures) olmamasına çalışıldı.

2.2.2 Hedef sekansa göre shRNA sekanslarının tasarımı

Hedef mRNA sekansına göre şunlar yapıldı;

- Üst zincirlerin başına CACCG sekansı eklendi.
- Üst zincirlerin sens ve antisens zincirlerinin arasına CGAA sekansı eklendi.
- Alt zincirlerin sens ve antisens zincirlerinin arasına TTCG sekansı eklendi.
- Alt zincirin başına AAAA sekansı ve sonuna T nükleotidi eklendi.

Bunların sonucunda her biri tek zincirli altı adet alt ve üst zincir elde edildi.



2.2.3 Birleştirme reaksiyonu (“Annealing reaction”)

Tek zincirli shRNA oligonükleotidlerinin sens ve antisens zincirleri bir araya getirilerek çift zincirli oligonükleotidler elde edildi. Bunun için şunlar yapıldı:

a) Liyofilize halde gelen tek zincirli oligonükleotidler, son konsantrasyonu 200 μM yapmak için TE buffer içinde çözüldü:

Oligonükleotidler	Eklenecek TE miktarı
1686 üst zincir	271,06 μl
1686 alt zincir	215,68 μl
765 üst zincir	228,52 μl
765 alt zincir	219,07 μl
2228 üst zincir	230,51 μl
2228 alt zincir	165,46 μl

b) Sonra birleştirme reaksiyonu için 05 ml’lik tüplerde reaksiyon karışımı hazırlandı ;

5 μl üst oligonükleotid

5 μl alt oligonükleotid

2 μl 10x Oligo Annealing Buffer

8 μl DNaz/RNaz içermeyen su

20 μl

c) Bu karışım 100 $^{\circ}\text{C}$ de 10 dk inkübe edildi.

d) Karışımın oda sıcaklığına gelmesi için 5- 10 dk bekletildi,

e) Yaklaşık 5 saniye hızlı çevirme (“quickspin”) yapıldı, yavaşça karıştırıldı,

f) Karışımın 1 μl ’si ayrıldı (Son konsantrasyon 50 μM) ve seyreltildi. Geri kalan 19 μl -20 $^{\circ}\text{C}$ ’de karanlık ortamda saklandı. (Son konsantrasyon 50 μM).

Elde edilen çift zincirli oligonükleotidlerin seyreltilmesi:

Elde edilen çöz (çift zincirli) oligonükleotidlerin konsantrasyonu 50 μ M'dir. Deneyde kullanılması gereken çöz oligonükleotidlerin konsantrasyonu ise 5nM. 50 μ M'ı 5nM'a indirmek için 10 000 kat seyreltilir. Kullanılacak su DNaz/ RNaz içermeyen su idi.

1 μ l, 50 μ M çöz oligo + 99 μ l su = 100 μ l, 500 nM çöz oligo. (Saklama: -20°C, 2 hafta).

1 μ l, 500 nM çöz oligo + 10 μ l 10x oligo Annealing Buffer + 89 μ l su = 100 μ l, 5 nM çöz oligonükleotid: kullanma konsantrasyonu.

Şunlara dikkat edildi:

- o Stok solüsyonlar sadece buzun üstünde çözüldü.
- o Elde edilen tüm solüsyonlar -20 °C'de saklandı.

KONTROL:

- o 500 nM'lık stok solüsyondan 5 ml alındı, % 4'lük agaroz jelde yürütüldü.
- o Çift zincirli oligonükleotid ağır olan parlak bant olarak görüldü,
- o Tek zincirli oligonükleotid hafif olan silik bant olarak görüldü.
- o Kontrol olarak lacZ çöz oligonükleotidi kullanıldı.

2.2.4 Klonlama

Ligasyon:

"Insert" (plazmide sokulacak parça): çöz DNA, pENTRY vektörüne komplementer yapışkan uç içerir.

Vektör: pENTR/U6 vektörü, yapışkan uç içerir.

- o Insert: vektör oranı= 10: 1
- o Kontrol olarak lacZ ds oligo kullanıldı. (stok= 5 nM, 10 μ l).

a) Oda sıcaklığında;

5x ligation buffer	4 µl	} Karışım hazırlandı, pipetle al-ver yapıldı. Vorteksleme yapılmadı.
pENTR/U6 (0,5 ng/µl)	2 µl	
çz oligo (5nM): buzda	1 µl	
DNaz/RNaz içermeyen su	12 µl	
T4 DNA ligaz (1U/µl)	1 µl	
<hr/> Ligasyon karışımı:	20 µl	

b) Karışım oda sıcaklığında 1 saat 50 dk inkübe edildi.

c) Karışım buza konuldu. 2 µl'si transformasyon için kullanıldı.

Kalan 18 µl'si -20°C'de 1 gece bekletilebilir.

2.1.5 Transformasyon:

- o SOC mediumu oda sıcaklığına getirildi.
- o Su banyosu 42°C'ye getirildi.
- o 50 µg/ml kanamisin içeren 3 LB plağı hazırlandı. Kullanmadan 30 dk önce 37 °C'ye gelmesi sağlandı.
- o Transformasyon için şunlar yapıldı:

a) 2 µl Ligasyon karışımı + 1 tüp kompetent *E. coli* → yavaşça karıştırıldı.

b) Buz üstünde 5-30 dk bekletildi. (20 dk)

c) Hücrelere ısı-şoku (heat-shock) uygulandı. (30 sn, 42°C'lik su banyosunda, hücreleri sarsmadan)

d) Hemen buz üstüne konuldu.

e) 250 µl S.O.C. mediumu eklendi.

f) Kapaklar iyice kapatıldı ve tüp yatay olarak 200 rpm. de 37°C'de 30 dk karıştırıldı.

- g) Daha önceden ısıtılmış LB agar plaklara 20- 100 µl (Üç farklı miktarda) hücre karışımı yayıldı.
- h) 37°C'de bir gece bekletildi.
- i) Oluşan kolonilerden 5-10 tanesi seçildi. Her bir koloni bir kürdanla alındı. Katı LB plağına bir çizik atıldı, kürdanda kalan kısım ise kanamisin içeren 1-2 ml sıvı LB içinde inoküle edildi ve büyümesi beklendi. Üreyenlerin bir kısmı donduruldu. Dondurmak için 0,85 ml üreme görülen kültür + 0,15 ml steril gliserol kriyotüpe konuldu. -80°C'ye kaldırıldı.
- j) Bir gün beklendi.
- k) Üreyen kolonilerin transformant analizi yapıldı.

2.1.6 Kolonilerin seçilmesi ve plazmid izolasyonu

E. coli'den kanamisine dirençli 5-10 koloni seçildi ve bunlardan plazmid izolasyonu yapıldı. Plazmid izolasyonu için Invitrogenin Midi Prep Kiti kullanıldı. İzole edilen plazmidlerin öncelikle % 0,8'lik agaroz jelde elektroforezi yapıldı. Beklenen bant 2854 baz çifti idi. Marker ve başka plazmidlerle agarozda, bu, tespit edildi. Yeri doğru tespit edilen kolonilerden elde edilen plazmidlerin sekansı yapıldı.

2.1.7 Plazmidlerin PZR ile çoğaltılması

Plazmidlerin shRNA sekanslarının klonlanmış olduğu bölgeyi içine alacak şekilde PZR ürünü alabilmek için U6 "forward" ve M13 "reverse" primerleri kullanıldı. PZR koşulları şöyleydi:

Su.....33 µl
dNTP..... 5 µl
10x buffer.....5 µl
MgCl₂ (25 µM).....2 µl
U6 primeri (25 µM).....1,5 µl

M13 primeri (25 µM).....1,3 µl
Taq pol (1,5 U).....0,3 µl (MBI, Fermantas, Almanya)
Kalıp DNA.....2 µl

PZR programı, 95°C' de 5 dakika denatürasyon sıcaklığı ile birlikte 95°C'de 1 dakika, 55°C'de 1 dakika, 72°C'de 2 dakika toplam 30 döngü ve sonlanma reaksiyonu için 72°C'de 7 dakika olmak üzere yapıldı. PZR'dan sonra elde edilen ürünler etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jelde yürütülüp UV altında bakıldı ve 311 bç'lik bantlar görüldü.

2.1.8 Sekanslama ile transformant analizi

İzole edilen bu plazmidlerin shRNA DNA'larının sokulduğu kısmı PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri sodyum asetat yöntemiyle temizlendi. Bu ürünlerin sekansı yapıldı. Her bir shRNA plazmidi için ayrı ayrı "forward" ve "reverse" primerlerle sekans PZR'ı yapıldı. "Forward" için kullanılan primer pENTRY/U6 vektörünün içinde var olan insan U6 promotoruna ait primer, "reverse" için kullanılan primer ise yine vektörün içinde var olan M13 bölgesine spesifik M13 primeriydi.

2.1.8 Hücre kültürü

a) Hücrelerin Çözülmesi

- o Sıvı azot tankındaki hücreler buradan çıkarılıp hızlıca 37°C'lik sıcak su banyosuna konuldu.
- o Hücreler, tamamen eridikten sonra 15 ml'lik tüpün içine aktarıldı.
- o Uygun hücre kültür ortamı ile üzerleri 10 ml'ye tamamlandı.
- o 10 dk. 1300 rpm'de santrifüjlendi.
- o Süpernatant atıldı. Pellet 2 ml hücre kültür ortamı ile çözüldü.
- o Hücreler T25 flaska aktarıldı.
- o Uygun hücre kültür ortamı ile 10 ml'ye tamamlandı. İnkübatöre konuldu.
- o Hücreler flaskın yüzeyini tamamen kapladıktan sonra T75 flaska pasajlandı.

b) Hücrelerin Pasajlanması (T 25'ten T 75'e)

- Flaskın içindeki hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı.
- 5 ml PBS ile flaskın yüzeyi yıkandı, PBS çekildi.
- Hücrelerin üzerine 2 ml tripsin eklendi. Tüm yüzeye yayılacak şekilde flask hareket ettirildi.
- 4- 5 dak 37°C'de inkübe edildi.
- Hücreler yüzeylerinden kopmaya başlayınca 5 ml hücre kültür ortamı eklendi ve bununla tüm hücre yüzeyi yıkandı.
- Ortam- hücre karışımı, flaskın tabanına çarptırılarak hücrelerin birbirlerinden ayrılması sağlandı.
- Bu karışımdan 2 ml alınıp yeni T75 flaska aktarıldı. Yeni ortam ile 20 ml'ye tamamlandı.

c) Hücrelerin Pasajlanması (T 75'ten T75'e)

- Flaskın içindeki ortam uzaklaştırıldı.
- 7 ml PBS ile flaskın yüzeyi yıkandı, PBS çekildi.
- Hücrelerin üzerine 3 ml tripsin eklendi. Tüm yüzeye yayılacak şekilde flask hareket ettirildi.
- 4- 5 dak 37°C'de inkübe edildi.
- Hücreler yüzeylerinden kopmaya başlayınca 10 ml hücre kültür ortamı eklendi ve bununla tüm hücre yüzeyi yıkandı.
- Hücre kültür ortamı- hücre karışımı, flaskın tabanına çarptırılarak hücrelerin birbirlerinden ayrılması sağlandı.
- Bu karışımdan 2 ml alınıp yeni T 75 flaska aktarıldı. Yeni hücre kültür ortamı ile 20 ml'ye tamamlandı.

d) Hücrelerin Dondurulması

- Flaskın içindeki hücre kültür ortamı uzaklaştırıldı.
- PBS ile flaskın yüzeyi yıkandı, PBS çekildi.
- Hücrelerin üzerine tripsin eklendi. Tüm yüzeye yayılacak şekilde flask hareket ettirildi.
- 4- 5 dakika 37°C'de inkübe edildi.

- Hücreler yüzeylerinden kopmaya başlayınca hücre kültür ortamı eklendi ve bununla tüm hücre yüzeyi yıkandı.
- Hücre kültür ortamı- hücre karışımı, flaskın tabanına çarptırılarak hücrelerin birbirlerinden ayrılması sağlandı.
- Bu aşamada hücreler Thoma lamda sayıldı. İdeal hücre sayısı 3×10^6 hücre/ml dir.
- Her bir kriyotüpün içine 1 ml hücre süspansiyonu konuldu. Üzerine de 100 µl DMSO konuldu (son konsantrasyon %10 olacak şekilde). Pipetle karıştırıldı.
- Hücreler sırasıyla - 20°C, -80°C ve son olarakta sıvı azot tankına aktarıldı.

2.1.9 Transfeksiyon

Transfeksiyon için bir katyonik lipozom olan “Oligofectamine” (Invitrogen, İngiltere) kullanıldı. İzlenen yöntem şu şekildeydi:

- a) HepG2.2.15 hücreleri transfeksiyondan bir gün önce 35 mm.lik plaklara 1×10^5 hücre/ plak olacak şekilde ekildi. Bu sırada kullanılan besiyeri antibiyotik içermeyen bir besiyeriydi.
- b) Hücreler şu şekilde sayıldı:

Hücreler tripsinlendi. Tripsinden sonra hücre kültür ortamı ile tüm hücreleri toplama aşamasında 12,5 µl hücre süspansiyonu alındı, bir eppendorf tüpe konuldu. Bunun üzerine 12,5 µl tripan mavisi konuldu. Karıştırıldı. Bu karışımdan 12,5 µl alındı Thoma lamına konuldu. Mikroskop altında 10x büyütmeyle hücreler sayıldı. Sayımda Thoma lamın dört köşesinde var olan karelerdeki hücreler sayıldı. Bir ml'deki hücre sayısını bulmak için; hücre sayısı x dilüsyon faktörü x sayılan kare sayısı x 10^4 hesabı yapıldı. Yani sayılan hücre x 2 x 4 x 10^4 idi.

Bu hesaba göre her bir 35 mm'lik plağa 1×10^5 hücre/ml gelecek şekilde hücre ekildi ve bir gün beklendi.

- c) 0,5 lik tüplere her bir 35 mm'lik plak için ayrı ayrı 27 µl ve 102 µl OPTIMEM I (Invitrogen, İngiltere) konuldu.
- d) 102 µl OPTIMEM konularının üzerine shRNA eksprese eden pENTRY/U6 plazmidleri konuldu (P1686, P765, P2228, PGFP).
- e) 27 µl OPTIMEM konularının üzerine de 3 µl "Oligofectamine" konuldu. 8- 9 dk. İnkübe edildi.
- f) İki tüp (102 µl OPTIMEM konulan DNA'lı solüsyon + 27 µl OPTIMEM konulan oligofektaminli solüsyon)
- g) 20 dk inkübe edildi.
- h) Bu arada hücrelerin üzerindeki hücre kültür ortamı çekildi. Hücreler bir kere PBS'le yıkandı. Hücrelerin üzerine 860 µl OPTIMEM I eklendi.
- i) İnkübasyon süresi dolunca DNA - oligofektamin kompleksi hücrelerin üzerine damla damla bırakıldı.
- j) 8 saat inkübasyondan sonra hücrelerin üzerindeki hücre kültür ortamı üzerinde normalden 3 kat daha fazla FBS (500 µl normal antibiyotikli hücre kültür ortamı içinde) eklendi.

Transfeksiyon Planı

1 x 10⁵ HepG2.2.15 hücresinin 35 mm'lik plaklara ekildikten sonra, her bir plağa konulacak plazmid ve oligofektamin miktarı şu şekildedir (tablo 5) :

Tablo 5: transfeksiyon planı.

1 P1686 : 3 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	2 P1686 : 4 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	3 P1686 : 2 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	4 P2228 : 3 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	5 P2228 : 4 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl
6 P2228 : 2 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	7 P765 : 3 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	8 P765 : 4 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	9 P765 : 2 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl	10 P1686, P2228 ve P765 plazmidlerinin herbirinden: 0,7µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl
13 PUC19: 1,2 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl SCRAMBLED (yalancı) hedef.	14 PUC19: 1,2 µg PlacZ : 3 µg PGFP : 0,3 µg Oligofektam: 3µl POZİTİF KONTROL	15 NEGATİF KONTROL. TRANSFEKS. YAPILMADI.		

Transfeksiyonun Verimliliğinin Ölçülmesi

Her bir 35 mm.lik plağa shRNA eksprese eden plazmidlerle birlikte GFP ("Green Fluorescence Protein") eksprese eden plazmidlerin transfeksiyonu yapıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra transfeksiyonun verimliliğini belirlemek amacıyla toplam GFP'ler sayıldı. Bunun için floresan mikroskopu kullanıldı. Ne kadar çok GFP sayılırsa transfeksiyon o kadar başarılı olmuş demektir. Çünkü ortamda GFP'nin olması, ancak GFP eksprese eden PGFP plazmidinin hücre sitoplazmasına girip, sitoplazmada protein eksprese edebilmesiyle mümkündür. PGFP ile birlikte diğer plazmidler aynı ortamda ve aynı şartlarda transfekte edildi. Dolayısıyla her bir plaktaki GFP sayısının transfeksiyon verimliliğiyle doğru orantılı olduğu düşünülebilir.

2.2.10 Hücrelerin bir haftalık inkübasyonu, hücre kültür ortamının toplanması

Transfeksiyondan 24 saat sonra hücrelerin üzerindeki hücre kültür ortamı normal büyüme ortamı ile değiştirildi. Bu zamandan itibaren hücrelerin salgıladığını alabilmek için her 24 saatte bir ortam toplandı. Burada zamana tam olarak uyulmasının önemi çok büyüktür. Yarım saatlik bir gecikme bile

deney sonuçlarını etkileyebilir. Ortamın toplanması transfeksiyondan sonraki yedi gün boyunca devam etti. Toplanan hücre kültür ortamı -80°C'de saklandı.

2.1.11 Kültür ortamından HBV DNA izolasyonu

Toplanan ortamlardan QIAamp DNA mini kiti ile HBV DNA izolasyonu yapıldı.

2.1.12 Real-time PCR

Reaksiyon karışımı:

HBV-305-321.....	2 µl
HBV-680-663.....	1 µl
HBV-PR-1.....	0,8 µl
HBV-PR-2.....	1,6 µl
MgCl ₂	2,4 µl
“Hot Start” reaksiyon karışımı	2 µl
Su	6,6 µl
Kalıp DNA	5 µl

Pzr koşulları:

Denaturasyon	95 °C....10 dk.	} 45 döngü
Denaturasyon	95 °C....5 sn.	
Bağlanma	54 °C....15 sn.	
Uzama	72 °C....17 sn.	
Soğuma	40°C 30 sn.	

3. BULGULAR

3.1 Tasarlanan siRNA'ların ikincil yapıları

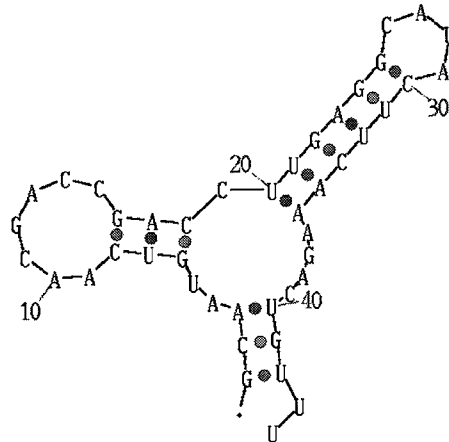
Hedeflenen sekansın BLAST taraması yapıldığında HBV *ayw* genomu dışında her hangi bir canlı DNA'sına komplementer olmadığı görüldü. Yani tasarlanan siRNA'lar sadece HBV *ayw* genomuna spesifikti. Ayrıca seçilen hedefler HBV'de daha çok korunmuş bölgelerdi. Dolayısıyla sadece HepG2.2.15 hücrelerindeki HBV genomuna değil aynı zamanda HepAD38 ve HepAD79 gibi diğer hücre dizilerinde bulunan HBV genomlarına da spesifikti.

Hedef mRNA'ların ikincil yapılarına MFOLD programıyla bakıldı. Bunun yapılması gerekiyordu, çünkü hedef mRNA sekansı ile tasarlanan siRNA sekansları aynı olacaktı. Dolayısıyla aynı zamanda siRNA'ların uzaydaki ikincil yapılarına bakılmış olunuyordu. Buna göre şu sonuçlar çıktı:

a) 1686/siRNA: CGACCGACCTTGAGGCATACT

- o Hedef mRNA'lar: X ORF, PreC/Pregenom, PreS1, PreS2/S, X
- o % GC= % 57,14 , $\Delta E= 12,06$
- o Kor promotor, "enhancer" II, δ Box bölgesinde (Şekil 5 ve15).
- o MFOLD pregenomik RNA:

UGUCAACGACCGACCUUGAGGCAUACUUCAAAGACUGUUU



$dG = -4.18$ [initially -4.9] , 44 bp (RNA)

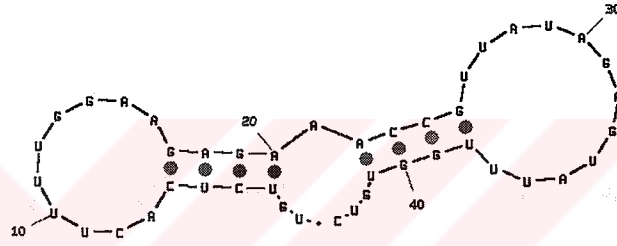
Şekil 15: P1686

2-) 2228/ siRNA: TTTGGAAGAGAAACCGTTA

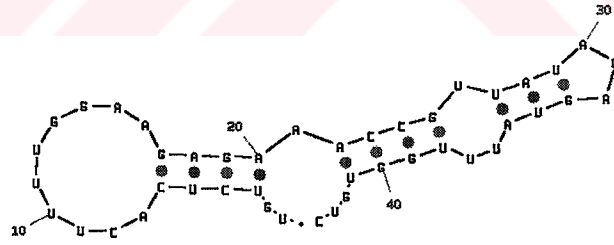
- o Hedef mRNA'lar: PreC/Pregenom
- o PreC/Pregenome mRNA'sı üzerinde kor bölgesinde.
- o % GC= % 33,33, $\Delta E= 13,8$
- o Regulator element üzerinde değil (Şekil 16).
- o MFOLD pregenomik RNA:

UGUCUCACUUUUGGAAGAGAAACCGUUAUAGAGUAAUUUGGU
GUC

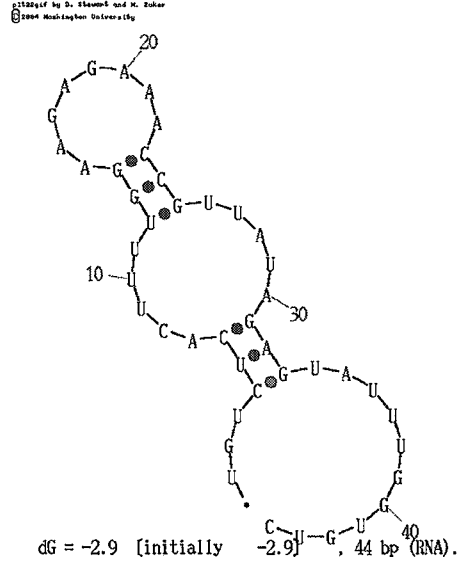
© 2009 Washington University
p1922.tif by D. Stewart and N. Zuker



$\Delta G = -5.7$ [initially -3.91], 44 bp (RNA).



$\Delta G = -5.1$ [initially -3.31], 44 bp (RNA).

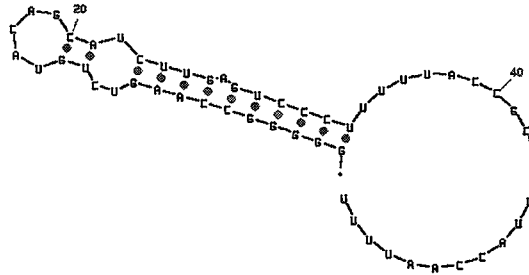


Şekil 16: P2228.

3-) 765/siRNA: GUCUGUACAGCAUCUUGAG

- Hedef mRNA'lar: PreC/Pregenome, PreS1, PreS2/S.
- Yüzey geni ve polimeraz ORF'leri üzerine düşüyor.
PreC/Pregenome, PreS1, PreS2/S.
- % GC= % 47,37
- Regülatör element üzerinde değil (Şekil 18).
- MFOLD pregenomik RNA:

GGGGCCAAGGUCUGUACAGCAUCUUGAGUCCCUUUUUACC
GCUGUUACCAAUUUU



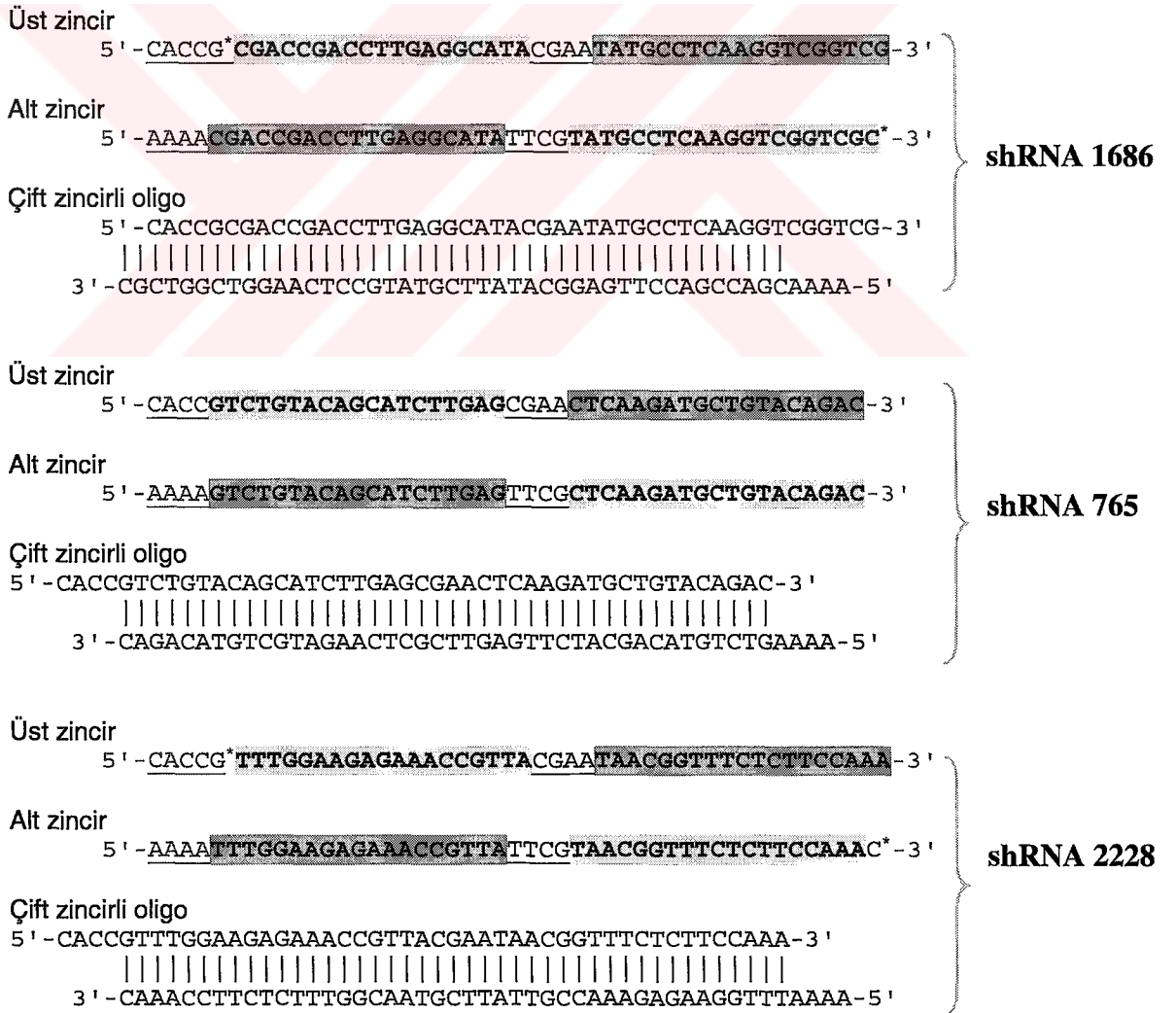
Şekil 17: P765

Şekillerden de anlaşılacağı gibi siRNA sekanslarının (yalnızca CGACCGA-CCTTGAGGCATACT, UUUGGAAGAGAAACCGUUA, GUCUGUACAGCA-UCUUGAG sekanslarının) çok fazla ikincil yapı oluşturmadığı görülmüştür.

3.2 Hedef sekansa göre shRNA sekanslarının tasarımı

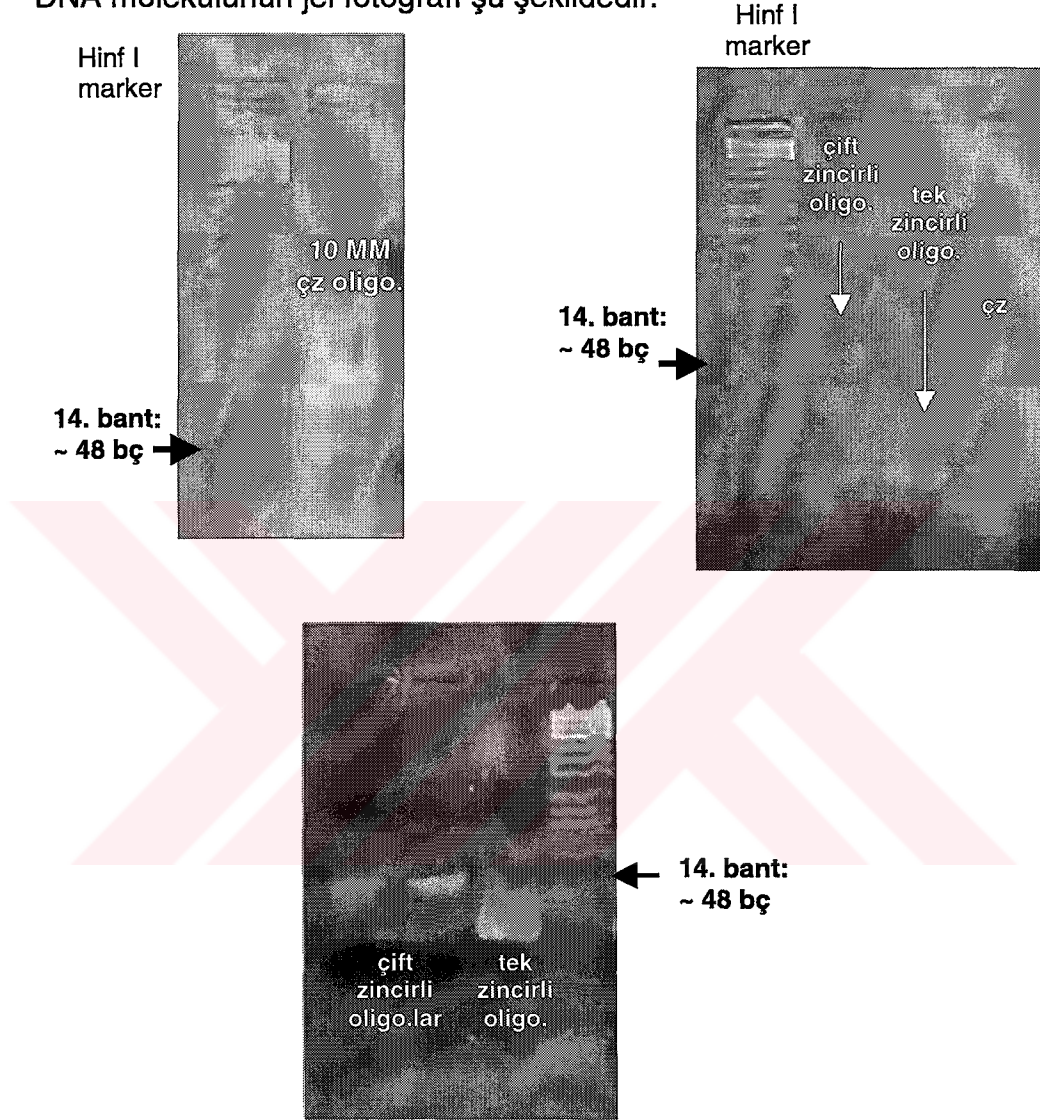
Hedef mRNA sekanslarına çeşitli eklemeler yapıldı. Bunların sonucunda her biri tek zincirli altı adet alt ve üst zincir elde edildi. Eğer bu eklemeleri yapılmayıp hedef mRNA sekanslarının sadece 3'-uçlarına –UU eklenmiş olsaydı tasarlanan şey siRNA olacaktı. Ancak shRNA tasarlamaya çalıştığımızdan, plazmide aktarılacak ve plazmidin promotorunu kullanabilecek şekilde eklentiler yapmalıydık. Başa ve sona eklenen CACCG ve AAAA sekanslarının amacı, pENTRY vektöründe bulunan insan U6 promotorundan yararlanabilmek ve böylece hücre içinde shRNA'ların eksprese edilebilmesini sağlamaktır (Tablo 6).

Tablo 6: Hedef HBV genom sekansının sens ve antisens zincirleri ve bunlar üzerinde yapılan değişiklikler.



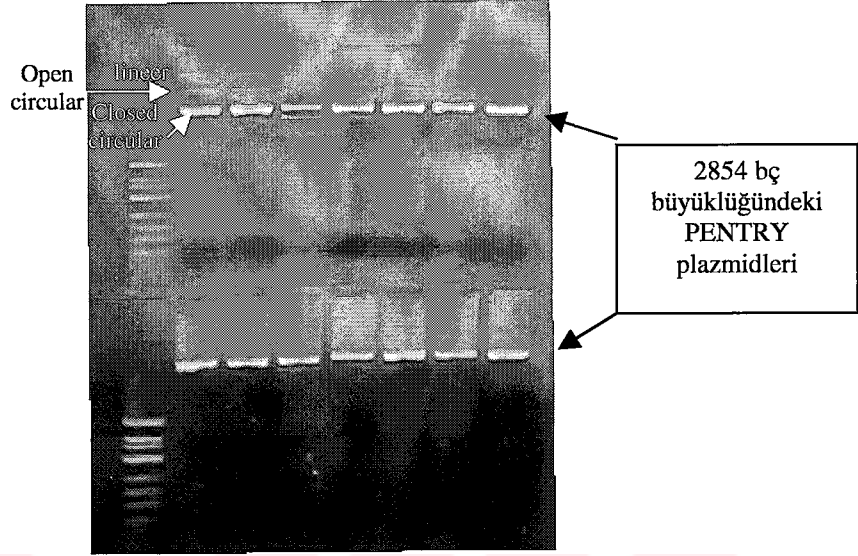
3.3 Birleştirme reaksiyonu (“annealing reaction”)

Tasarlanmış olan alt ve st zincirlerin birleştirilmesi sonucu oluşan çift zincirli DNA molekülünün jel fotoğrafı şu şekildedir:



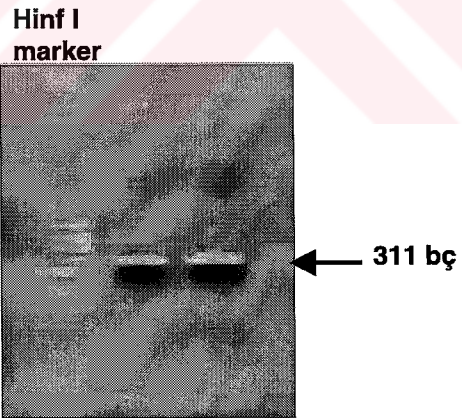
şekil18: Tek zincirli shRNA oligonükleotidlerinin birleştirme reaksiyonu sonucu çift zincirli hale getirilmesini gösteren jel fotoğrafları.

3.4 Klonlama sonucu oluşan shRNA eksprese edici plazmidlerin jel fotoğrafları



Şekil 19: Klonlama sonucu elde edilen pENTRY plazmidlerini gösteren jel fotoğrafı.

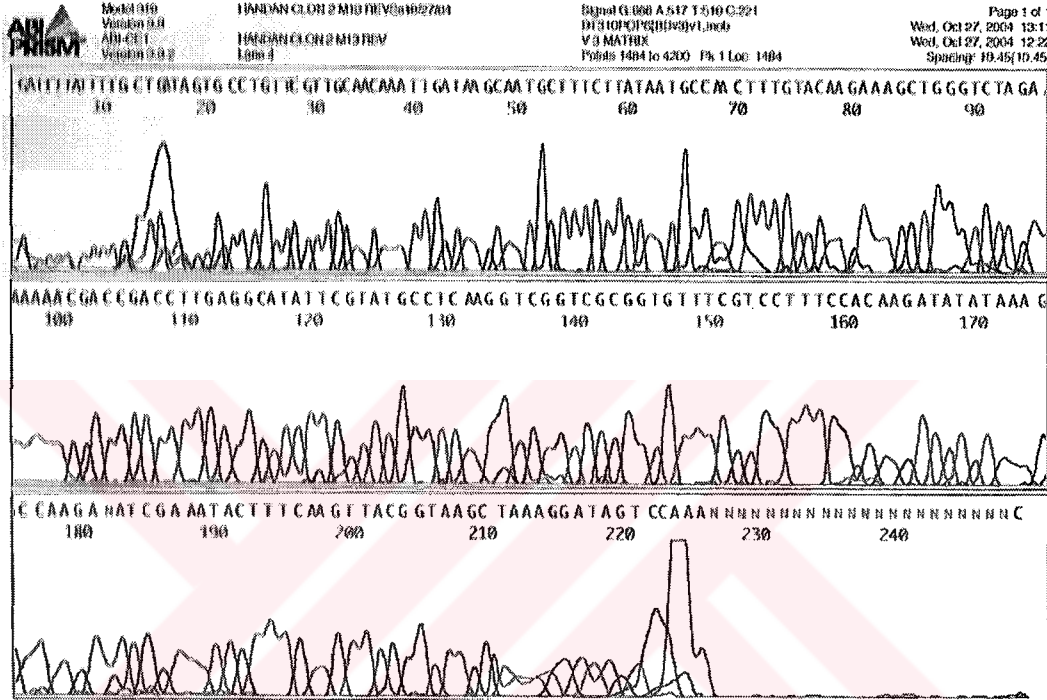
3.5 Plazmidlerin PZR ile çoğaltılması



Şekil 20: Plazmidlerin shRNA sekanslarının klonlanmış olduğu bölgenin PZR ile çoğaltılması sonucu ortaya çıkan 311 bp.lik ürün.

3.6 Klonlamanın gerçekleştiğini görmek için yapılan sekans analizi

Klonlamanın gerçekleştiğini ve klonlanan sekansların doğruluğunu görmek için sekans analizi yapıldı. Sekans analizi için U6 ve M13 primerleri kullanıldı. Bunun sonucunda plazmidin bir kısım nükleotid dizisi ile klonlanan shRNA ligonükleotid dizileri ortaya çıkarıldı.



Şekil 21: M13 primeriyle yapılan sekans analizi.

3.7 Transfeksiyonun verimliliği

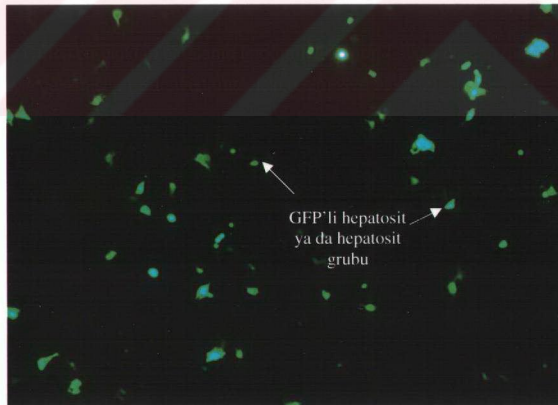
Transfeksiyondan 24 saat sonra ne kadar çok GFP sayılırsa ("Green Fluorescence Protein") transfeksiyon o kadar başarılı olmuş demektir. Ortamda GFP'nin olması, ancak GFP eksprese eden PGFP plazmidinin, sitoplazmada protein eksprese edebilmesiyle mümkündür. Bu da PGFP 'nin hücre içine girebilmesi demektir. PGFP ile birlikte diğer plazmidler aynı ortamda ve aynı şartlarda transfekte edildiği için eksprese edilen GFP sayısının diğer plazmidlerinde ekspresyonu ve dolayısıyla transfeksiyon verimliliğiyle doğru orantılı olduğu düşünülebilir. Transfeksiyonun verimliliği hücrelerin durumuna (Hücre sayısına, hücrelerin üst üste binmemiş olmalarına, transfeksiyon solüsyonuna ulaşabilme olanaklarına, sağlıklı

olmalarına vb) ve zamanlamaya bağlıdır. Bir deneydeki transfeksiyon verimliliği aşağı yukarı benzer olmakla birlikte her bir plaktaki transfeksiyon verimliliğinde (sayılan GFP'lerde) farklılıklar olması normaldir. Bu yüzden deneyin kabul edilebilir olması açısından her bir plaktaki bu farklılıklara göre deney sonuçlarının normalize edilmesi gerekir.

Floresan mikroskobunda çekilen fotoğraflardan biri ve her bir 35 mm'lik plak için sayılan GFP sayısı şu şekildedir:

Tablo 7: Her bir plaktaki GFP sayısı

Plak numarası	Sayılan GFP
1	490
2	390
3	640
4	670
5	620
6	760
7	720
8	760
9	620
10	590
13	520
14	250
15	0



Resim 3: GFP'li bir plaktan bir alanın fotoğrafı. Fotoğraf Leica floresan mikroskobunda 5x büyütmeyle çekilmiştir. (Karşılaştırmak için resim 2'ye bakınız)

3.8 Real-time PZR sonuçları

Her bir plak için transfeksiyondan 2, 3, 4, 5, 6 ve 7 gün sonra toplanan hücre kültür ortamından HBV DNA izolasyonu yapıldı. Plak numarasına göre bu sonuçlar aşağıdaki gibidir:

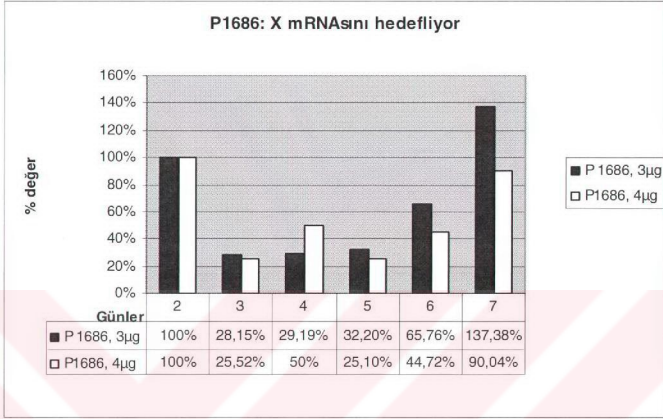
Tablo 8: Transfeksiyon sonrasında HBV DNA düzeyindeki değişiklikler.

Plak numarası	Hücre kültür ortamının toplanma zamanı	Normalize edilmiş Real-Time PCR sonucuna göre DNA'daki % artış yada düşüş
1 P1686 3 µg PGFP 0,3 µg GFP 490	Transf.dan 2 gün sonra	0
	Transf.dan 3 gün sonra	- 71,84
	Transf.dan 4 gün sonra	- 70,81
	Transf.dan 5 gün sonra	- 67,79
	Transf.dan 6 gün sonra	- 34,23
	Transf.dan 7 gün sonra	+ 137,38
2 P1686 4 µg PGFP 0,3 µg GFP 390	Transf.dan 2 gün sonra	0
	Transf.dan 3 gün sonra	- 23,57
	Transf.dan 4 gün sonra	- 24,80
	Transf.dan 5 gün sonra	- 14,80
	Transf.dan 6 gün sonra	+ 80,00
	Transf.dan 7 gün sonra	+ 135,70
3 P1686 2 µg PGFP 0,3 µg GFP 640	Transf.dan 2 gün sonra	0
	Transf.dan 3 gün sonra	- 74,48
	Transf.dan 4 gün sonra	- 50,00
	Transf.dan 5 gün sonra	- 75,00
	Transf.dan 6 gün sonra	- 55,28
	Transf.dan 7 gün sonra	- 10,00
4 P2228 3 µg PGFP 0,3 µg GFP 670	Transf.dan 2 gün sonra	0
	Transf.dan 3 gün sonra	- 57,75
	Transf.dan 4 gün sonra	- 70,00
	Transf.dan 5 gün sonra	- 75,78
	Transf.dan 6 gün sonra	- 64,90
	Transf.dan 7 gün sonra	+ 14,60
5 P2228 4 µg PGFP 0,3 µg GFP 620	Transf.dan 2 gün sonra	0
	Transf.dan 3 gün sonra	- 37,50
	Transf.dan 4 gün sonra	+ 19,00
	Transf.dan 5 gün sonra	- 55,80
	Transf.dan 6 gün sonra	- 54,29
	Transf.dan 7 gün sonra	+ 22,00
6 P2228 2 µg PGFP 0,3 µg GFP 760	Transf.dan 2 gün sonra	0
	Transf.dan 3 gün sonra	- 76,30
	Transf.dan 4 gün sonra	- 75,20
	Transf.dan 5 gün sonra	- 45,50
	Transf.dan 6 gün sonra	- 58,72
	Transf.dan 7 gün sonra	- 11,90

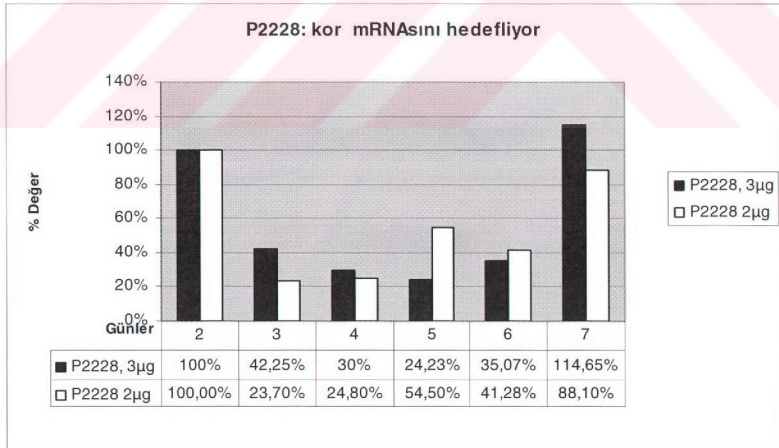
7 P765 3 µg PGFP 0,3 µg GFP 720	Transf.dan 2 gün sonra	0
	Transf.dan 3 gün sonra	- 35,23
	Transf.dan 4 gün sonra	- 30,03
	Transf.dan 5 gün sonra	- 64,26
	Transf.dan 6 gün sonra	- 01,17
	Transf.dan 7 gün sonra	- 35,7
	8 P765 4 µg PGFP 0,3 µg GFP 760	Transf.dan 2 gün sonra
Transf.dan 3 gün sonra		- 17,30
Transf.dan 4 gün sonra		- 31,40
Transf.dan 5 gün sonra		- 80,18
Transf.dan 6 gün sonra		- 30,18
Transf.dan 7 gün sonra		+ 100,00
9 P765 2 µg PGFP 0,3 µg GFP 620		Transf.dan 2 gün sonra
	Transf.dan 3 gün sonra	- 48,00
	Transf.dan 4 gün sonra	- 28,68
	Transf.dan 5 gün sonra	- 54,21
	Transf.dan 6 gün sonra	- 72,19
	Transf.dan 7 gün sonra	+ 23,70
	10 P1686, P2228 ve P765 plazmidlerinin herbirinden 0,7 µg PGFP 0,3 µg GFP 590	Transf.dan 2 gün sonra
Transf.dan 3 gün sonra		- 37,97
Transf.dan 4 gün sonra		- 18,41
Transf.dan 5 gün sonra		- 24,26
Transf.dan 6 gün sonra		+ 72,80
Transf.dan 7 gün sonra		+ 439,74
13 PUC19: 1,2 µg PGFP : 0,3 µg SCRAMBLED (yalancı hedef): LacZ genini hedef alan bir plazmid kullanıldı.		Transf.dan 2 gün sonra
	Transf.dan 3 gün sonra	+ 137,00
	Transf.dan 4 gün sonra	+ 433,00
	Transf.dan 5 gün sonra	+ 442,00
	Transf.dan 6 gün sonra	+ 467,00
	Transf.dan 7 gün sonra	+ 900,00
	Diğer deney P1686, P2228 ve P765 plazmidlerinin herbirinden 1 µg PGFP 0,3 µg GFP 352	Transf.dan 2 gün sonra
Transf.dan 3 gün sonra		- 9,00
Transf.dan 4 gün sonra		- 75,00
Transf.dan 5 gün sonra		- 77,84
Transf.dan 6 gün sonra		- 9,35
Transf.dan 7 gün sonra		

3.9 Sonuçların değerlendirilmesi

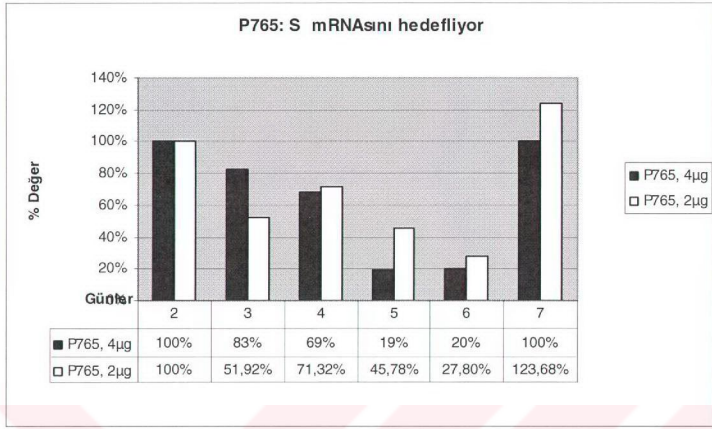
Sonuçlar excell programında grafik haline getirildi:



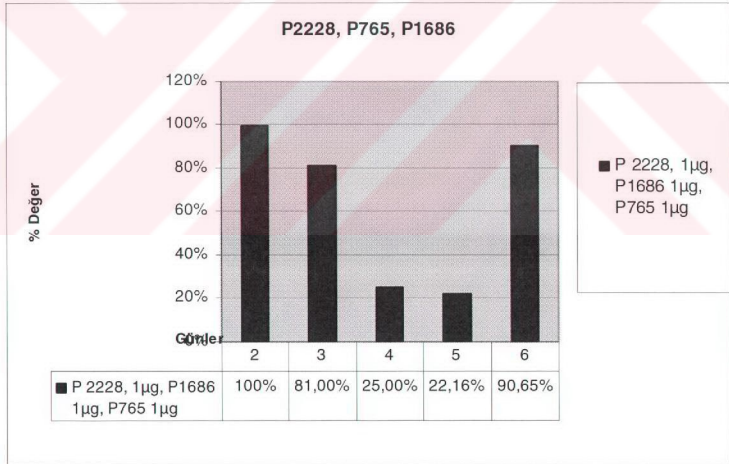
Şekil 22: P1686 ile HBV DNA inhibisyonu.



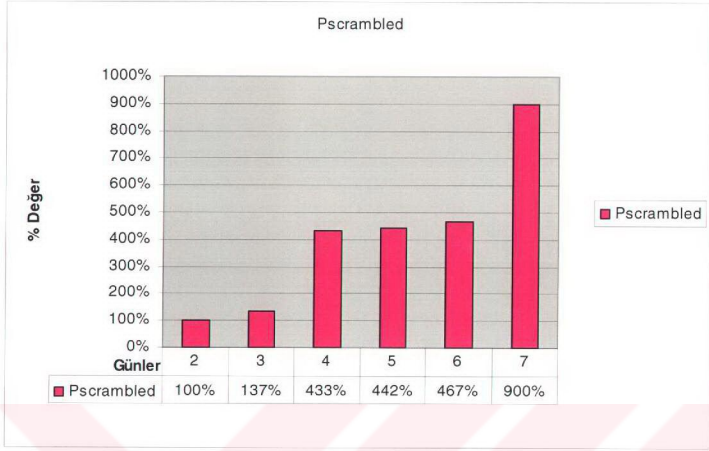
Şekil 23: P2228 ile HBV DNA inhibisyonu.



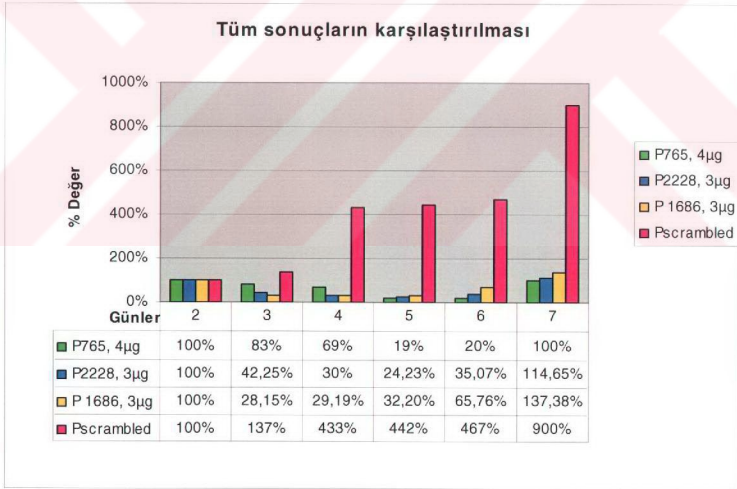
Şekil 24: P765 ile HBV DNA inhibisyonu.



Şekil 25: P1686, P765 ve P2228 ile HBV DNA inhibisyonu.



Şekil 26: Yalancı plazmid ile HBV DNA inhibisyonu.



Şekil 27: Tüm sonuçların karşılaştırılması.

4. TARTIŞMA

Aşı ve ilaçlar, viral enfeksiyonlardan korunma ve tedavide uzun süredir kullanılan yöntemlerdir. Bunlar tipik olarak, önemli viral proteinlerin sentezini engelleyerek ya da baskılayarak çalışan yöntemlerdir. Tedavide kullanılan ilaçların önemli avantajları olmasına rağmen bir takım dezavantajları da vardır. Bunların başlıcaları yan etkilerinin olması, kompleks olmaları, fiyatlarının yüksekliği ve en önemlisi de direnç gelişimine izin vermeleridir. AIDS gibi hastalıkların tedavinde bu dezavantajlar daha da öne çıkmaktadır. Özellikle bu tür hastalıklarda alternatif bir tedavinin gerekliliği açıktır. RNA interferans virüslere karşı kullanılacak yeni, alternatif bir yöntemdir. Ancak pratikte kullanılabilir olması için daha araştırılması gereken çok şey vardır. RNA intrerferans teknolojisi şu ana dek farklı tiplerde memeli virüslerine karşı kullanılmış ve deneysel olarak başarılı sonuçlar vermiştir. Bunlar arasında HIV ("human immunodeficiency virus", Novina ve ark.2002, Jacque ve ark. 2002, Stevenson ve ark. 2003, Martinez ve ark. 2002.), "Rous sarcoma virus" (Hu ve ark.), RSV ("respiratory syncytial virus, Bitko ve ark.2001), HCV ("hepatitis C virus", Wilson ve ark. 2003, Kapadia ve ark. 2003, Yokota ve ark. 2003), poliovirus (Gitlin ve ark. 2002)ve HPV ("human papillomavirus", Jiang ve ark. 2002) vardır. Bunlardan HIV ve RSV negatif zincirli RNA virüsleri, HCV ve poliovirus pozitif RNA virüsleri, HPV ise bir DNA virüsüdür.

Hepatit B virüsü bir DNA virüsü olmasına rağmen, RNA interferans teknolojisi virüse karşı etkili bir şekilde kullanılabilir. HBV'nin yaşam döngüsünde pregenomik RNA kritik öneme sahiptir ve tasarlanan siRNA'lar (ya da shRNA'lar) pregenomik RNA'yı hedefleyebilir.

Bu çalışmada amacımız, plazmid-vektör aracılı ekspresyon sistemini kullanarak HBV replikasyonunu baskılamaktır. Plazmid-vektör aracılı ekspresyon sisteminin bazı avantajlarının yanında dezavantajları da vardır: Öncelikle sentetik siRNA'larla transfeksiyon vektör-plazmid transfeksiyonuna göre daha kolaydır. Sentetik siRNA'larla daha fazla hücre transfekte olacağından inhibisyon oranı daha yüksektir (Dykxhoorn ve ark. 2003).

Vektör plazmid transfeksiyonunun optimizasyonu daha zordur. Nitekim shRNA eksprese eden pENTRY plazmidleriyle transfeksiyon deneyi optimizasyonumuz oldukça uzun sürdü.

İkinci olarak sentetik siRNA'larla transfekte edilen hücrelerde inhibisyon hemen başlarken (2. günden itibaren), plazmidlerle inhibisyon daha geç başlar (3.-4. günden itibaren). Çünkü öncelikle shRNA'nın hücre içinde eksprese edilmesi ve daha sonra bu shRNA'nın "Dicer" tarafından parçalanması için geçmesi gereken bir zaman vardır. Ancak sentetik siRNA'ların inhibisyon üzerindeki etkisi daha kısa sürelidir. Plazmidlerle bu süre uzatılır. Bizim plazmid-vektör kullanmadaki asıl amacımız inhibisyon süresini uzatmaktır. Deneylerimizde inhibisyon süresini yedi gün olarak belirledik. Eğer sentetik siRNA kullansaydık bu süre 3- 4 gün olacak idi.

Plazmid-vektörleri kullanmamızın diğer bir avantajı da bir kere klonlama yaptıktan sonra plazmidleri E.coli içinde istediğimiz kadar çoğaltabilmemiz oldu. Bu bize shRNA eksprese eden plazmidleri sonsuz kullanabilme olanağı sağladı.

Virüs-vektör aracılı bir ekspresyon sistemi de kullanabilirdik. Bu durumda stabil transfeksiyon yaptığımızdan HepG2.2.15 hücrelerindeki HBV replikasyonunu sürekli ve stabil olarak baskılamış olurduk. Ancak bunu yapmak bizim için mantıklı bir seçenek değildi çünkü asıl amacımız doğru hedefleri seçtiğimizden emin olmak ve HBV DNA inhibisyonunu göstermekti. Virüs-vektör aracılı ekspresyon sistemini kullanmanın bizim için bir avantajı olmayacaktı. Ayrıca hücrelerde virüs-vektörlerle stabil ekspresyon sağlamak oldukça zaman alıcı ve zahmetli bir iştir.

HBV pregenomunda üç hedef bölge seçildi: HBV X geni üzerinde 1686- 1705 arasındaki sekanslar, HBV yüzey geni üzerinde 765-784 arasındaki sekanslar ve prekor geni üzerindeki 2228-2247 arasındaki sekanslar. Bu çalışmanın en orijinal taraflarından biri kendimize ait siRNA'lar tasarlamış olmamızdır. Tüm siRNA tasarımları çalışmış ve HBV DNA'yı baskılamayı başarmıştır.

Ancak çalışmamız devam ederken yayınlanan iki makalede bizimde tasarlamış olduğumuz siRNA'lardan birinin kullanıldığını gördük. Chisari ve ark. (Uprichard, 2005) ile Chen ve ark. (2005) birbirlerinden bağımsız olarak HBV yüzey geni üzerinde 765- 784 arasındaki sekansları hedef alan siRNA tasarlamışlardır. Chisari bizimde yaptığımız gibi plazmid-vektör aracılı ekspresyon sistemini kullanmış, Chen ise sentetik siRNA kullanmayı tercih etmiştir. Chen HepG2.2.15 hücre dizilerini kullanmış Chisari ise farelerde deney yapmıştır (Huh7 hücrelerine ek olarak). Chen bu siRNA'yla HBV DNA düzeyini % 80,2 oranında düşürmüştür. Chisari ise farelerde yaptığı deneyde çok çarpıcı sonuçlar bulmuştur. Bulduğu sonuçlara göre fare karaciğerindeki HBV DNA düzeyi 4. günde %50 azalırken, 17. günde tespit edilemez düzeydeydi ve baskılama 26 gün boyunca devam etti. Bu arada farelerde shRNA'ya karşı hiçbir interferon yanıtı görülmedi (Uprichard, 2005).

Biz, P765 (HBV yüzey geni üzerinde 765- 784 arasındaki sekansları hedef alan shRNA ekspresyon edici plazmid) ile HBV DNA düzeyini %80 oranından düşürmeyi başardık. Bu Chen'in bulduğu sonuçlarla korelasyon gösteren bir sonuç idi. Bu arada Chisari'nin aynı plazmid-vektör ile (P765) farelerde HBV DNA'yı 26 gün boyunca baskıladığını göstermesi bizim için bir şans oldu. Chisari'nin bu sonuçları RNA interferansın güçlü bir potansiyel tedavi aracı olabileceğini göstermektedir.

Doza bağlı olarak P765 ile bulunan sonuçlar 2 µg.da %72, 3 µg.da %64 ve 4 µg.da %80 olarak belirlendi. P1686 (HBV X geni üzerinde 1686-1705 arasındaki pregenomik RNA sekanslarını hedef alan, shRNA ekspresyon edici plazmid) kullanıldığında inhibisyon oranı 2 µg.da %74, 3 µg.da %71 ve 4 µg.da %24 idi. P2228 (HBV prekor geni üzerindeki 2228-2247 arasındaki pregenomik RNA sekanslarını hedef alan, shRNA ekspresyon edici plazmid) kullanıldığında inhibisyon oranı 3 µg.da %76, 3 µg.da %75 ve 4 µg.da %55 idi. Her üç plazmidin sinerjistik etkisini görmek için üçü birlikte kullanıldığında (toplam 3µg) inhibisyon oranı %77,8 oldu. Buna karşılık yalancı bir plazmidle hücreler transfekte edildiğinde HBV DNA düzeyinde azalma bir yana, %900'e varan düzenli artışlar gözlemlendi. Yalancı plazmid ("scrambled plasmid") bakteri

genomunda lac Z genini hedefleyen shRNA ekspresyonu yapan bir plazmid idi. Yalancı plazmidin (“scrambled”) kullanılmasının nedeni deneyin kontrollü deney olması açısından tüm hücrelerin aynı koşullara sahip olmasını sağlamaktır. Hücrelere transfeksiyon yapmak ne kadar iyi bir transfeksiyon ajanı kullanılırsa kullanılsın yine de bir miktar toksik etki yapacaktır. Eğer hiçbir transfeksiyon yapılmamış hücreleri negatif kontrol olarak kullanmayı seçseydik hücrelerdeki HBV DNA artış oranı daha da yüksek olabilirdi ancak deney kontrollü deney olmazdı.

Sonuçlar aslında HBV DNA’da %80 inhibisyon olarak değil, HBV DNA’da % 900 artışa karşılık %80 düşüş olarak değerlendirilmelidir. Çünkü eğer hücreleri shRNA eksprese eden plazmidlerle transfekte etmeseydik HBV DNA düzeyi aslında % 900’e kadar artardı. Oysa yapılan bu çalışmada hücrelerdeki HBV DNA düzeyinin artışı engellenmekle kalmamış birde negatife düşürülmüştür.

Sonuçlarda dikkat çeken bir husus daha yüksek konsantrasyonlarda kullanılan plazmidlerin, inhibisyon oranını arttırmadığı tersine azalttığı olmuştur. 2 ya da 3 µg plazmid kullanıldığında inhibisyon oranının genelde daha yüksek iken 4 µg plazmid kullanıldığında bu oran biraz daha düşük kalmaktadır. Muhtemelen bu, kullanılan plazmid miktarı arttıkça ekspresyon oranı azalacaktır prensibinden kaynaklanıyor olabilir.

RNA interferansın etkisinin en çok hissedildiği günler 4. ve 5. günler. P1686 ile transfeksiyon dışında diğer tüm plazmidlerde alınan sonuçlarda 5. günde inhibisyonun en yüksek olduğunu gözlemlenmiştir.

En az inhibisyon oranı P1686 plazmidini kullanıldığında görüldü. Gerçi aradaki fark oldukça düşük idi (%1 civarında) fakat yine de P1686’nın hedef bölgesinin diğer hedef bölgelerden bir farkı olduğu için bunun belki bir anlamı olabilir. P1686, HBV genomunda 1686- 1705 nükleotidler arasındaki sekansları hedef alıyor. Ancak sekanslar regülatör elementlerin sekanslarıyla çakışıyor (kor promotor, “enhancer” II, δ Box bölgesinde (Şekil 5). Diğer plazmidlerin hedefleri ise herhangi bir regülatör element üzerinde

bulunmuyor. Hedef bölgeleri belirlerken aradaki farkı görebilmek amacıyla iki hedefin regülatör element sekanslarıyla çakışmamasına fakat birinin çakışmasına özellikle dikkat etmiştik. Böylece hedef sekansların belirlenmesinde regülatör elementlerin etkisinin bir önemi olup olmadığını görmüş olacaktık. Ancak sonuçlardan da anlaşılacağı gibi arada büyük bir fark çıkmadı. Birçok makalede hedef sekansları belirlerken regülatör elementlerin etkisinin “belki” etkili olabileceği belirtilmiştir. Fakat bu konuda kesin bir yargı yoktur.

Hedef sekansları belirlerken dikkat ettiğimiz bir diğer hususta sekansların uzaydaki ikincil yapıları oldu. Uzaydaki ikincil yapının mümkün olduğunca az olması gerekir (Chen ve ark. 2003). Ancak bununda anlamlı bir fark yaratmadığını gördük.

Aslında hedef sekansları belirlerken uyulması gereken kurallar vardır fakat bunların tümüne tam olarak uymak bile en yüksek inhibisyon oranını verecek siRNA'yı belirleyebilmek için yeterli değildir. En iyi, yani en yüksek inhibisyon oranını verecek siRNA'nın / shRNA'nın şimdilik birazda deneme yanılmayla bulunması gerekiyor. Belki de şu an için siRNA tasarımı kullandığımız kriterler yeterli kriterler değildir ve en iyi siRNA'yı tasarımı uyulması gereken ancak bizim henüz bilmediğimiz daha birçok kriter vardır. Tüm bunlar, zaman içinde RNA interferans mekanizmasıyla ilgili bilgilerimiz geliştiğinde öğreneceğimiz şeylerdir.

RNA interferans ile tedavi çok uzak bir gelecek değildir. Chisari'nin çalışması, tam tersine bu tedavi stratejisinin yakın olduğunu gösteriyor. Ancak çözülmesi gereken problemler vardır. Bu problemlerden en büyüğü siRNA'ların (Ya da shRNA eksprese eden plazmidlerin) canlılara nasıl verileceği konusudur. Her geçen gün dünyanın her yerinden birçok RNA interferans çalışmasının sonucu gelmektedir. Yakın bir zamanda bu problem çözülebilir.

Biz bu çalışmada RNA interferans mekanizmasını bir virüse karşı kullanmayı denedik. Fakat RNA interferansın kullanım alanları virüslere karşı kullanımla sınırlı değildir. Özellikle “reverse genetics” konusunda açacağı kapılar başdöndürücü. RNA interferans teknolojisiyle genlerin fonksiyonları hızlı ve etkin biçimde ortaya çıkarılabilir. Bir daha ki çalışmalarda RNA interferansı bu alanlarda da kullanmak heyecanı ve umuduyla...



5. SONUÇ VE ÖNERİLER

Sonuç olarak insan stabil HBV ekspresyonu yapan hepatoma hücreleri HepG2.2.15 hücrelerinde, shRNA eksprese eden plazmidler kullanılarak HBV DNA düzeyi % 80'e kadar inhibe edildi. Buna karşılık negatif kontrolde HBV DNA düzeyi %900'e kadar arttı.

Bu proje ile RNA interferans teknolojisi Türkiye'de ilk defa uygulanmıştır.

Bu çalışmada HBV replikasyonunun shRNA'lar ile baskılanabildiği gösterildi. RNA interferans teknolojisi HBV'ye karşı kullanılacak güçlü bir potansiyel tedavi aracı olabilir. Virüslere karşı tedavide RNA interferansın kullanılması çok uzak bir gelecek değildir. Bu açıdan çalışmada kullanılan özgün shRNA'lar yararlı olabilir.

ÖZET

HEPATİT B VİRÜS REPLİKASYONUNUN shRNA İLE IN-VITRO OLARAK BASKILANMASI

GİRİŞ: RNAi (RNA interference: RNA çatışması) kısaca sekans spesifik mRNA degradasyonu olarak tanımlanabilir. RNAi işlemi siRNA'larla (small interfering RNA: küçük engelleyici RNA molekülleri) başlar ve aktif bir gen transkriptinin (mRNA) susturulması (gene silencing) ile sonuçlanır. Bu moleküller çok spesifik olduklarından hedef mRNA dışında başka mRNA'ları yıkıma uğratmazlar. RNAi teknolojisi sadece virüslere ve diğer hastalıklara karşı potansiyel bir tedavi aracı olarak değil aynı zamanda genlerin fonksiyonunu anlamada da yeni ve güçlü bir araçtır. Bu çalışmanın amacı RNAi mekanizmasını HBV'ye karşı kullanmak yoluyla HBV replikasyonunun in-vitro ortamda baskılanmasıdır.

MATERYAL VE YÖNTEM: HBV mRNA sekanslarına spesifik, 21 nükleotid uzunluğunda, X, kor ve yüzey genlerini hedef alan üç siRNA tasarlandı. Bu siRNA'lar shRNA ("small hairpin RNA") ekspresyonu sağlamak için klonlandı. İlk olarak siRNA'ların pENTR/U6 vektörüne ligasyonu yapıldı. Elde edilen bu vektör kompetent E. Coli'ye transforme edildi. Klonlama sekans analizi ile onaylandı. shRNA'ların HBV üzerindeki etkisini görmek için stabil HBV ekspresyonu ve replikasyonunun yapıldığı insan hepatoma hücre hattı HepG.2.2.15 kullanıldı. Transfeksiyon katyonik lipozomlarla gerçekleştirildi. Transfekte edilen shRNA'ların HBV replikasyon düzeyine etkisi kantitatif "real-time PCR" yöntemi ile değerlendirildi.

BULGULAR: Viral DNA düzeyine 2., 3., 4., 5., 6. ve 7. günlerde bakıldı. Bunun sonucunda viral DNA replikasyonunun 6 gün boyunca baskılandığı görüldü. HBV DNA düzeyi, yüzey bölgesini hedef alan plazmidle 81%, kor bölgesini hedef alan plazmidle 76% ve X bölgesini hedef alan plazmidle 75 % baskılandı.

SONUÇ: Bu çalışma ile HBV replikasyonunun shRNA'lar kullanılarak baskılanabildiği gösterilmiştir. Bu baskılama RNAi'nin HBV'ye karşı potansiyel bir tedavi aracı olarak kullanılabileceğini düşündürmektedir.

Anahtar sözcükler: RNAi, siRNA, shRNA, HBV, HepG2.2.15 hücre hattı.

SUMMARY

INHIBITION OF HEPATITIS B VIRUS REPLICATION BY shRNAs: A NEW STRATEGY IN HBV TREATMENT

INTRODUCTION: RNA interference (RNAi) can be defined as sequence- specific mRNA degradation. RNAi mechanism is initiated by small interfering RNA (siRNA) and results in silencing of an active gene transcript. siRNAs are specific for only target mRNAs. So no mRNA other than target one can be degraded with RNAi mechanism. Our purpose in this study is to investigate effects of shRNAs targeting three different sites of hepatitis B virus mRNAs on the viral replication in HepG2.2.15 cells.

MATERIAL- METHOD: Three HBV-specific siRNAs were designed targeting X (1686- 1705), Core (2228- 2247) and S (765-784 nt.) transcripts. These siRNAs were cloned to PENTRY/U6 vector for expression of shRNAs (small hairpin RNAs). HepG2.2.15, a stable HBV producing cell line, was used to see the effects of shRNAs on HBV. The cells were transfected with shRNA expressing plasmids (P765, P2228 and P1686 targeting X, core and S region respectively) or a mock plasmid targeting lacZ gene. Transfection efficiency was determined by using green fluorescent protein expressing plasmid. After transfection viral DNA levels were detected.

RESULTS: The culture media was collected in the days 2, 3, 4, 5, 6, 7 posttransfection and analyzed by Real-time PCR. Viral DNA production suppressed for 7 days. The HBV DNA levels were decreased by 81 %, 76 %, 75 % with P765, P2228 and P1686 vectors respectively. Whereas viral DNA level was increased with mock plasmid (PlacZ).

DISCUSSION: In conclusion, the siRNAs designed for X, core and S regions, specifically and significantly suppressed HBV DNA. Our results support the potential use of this treatment strategy in hepatitis B.

Key words: RNAi, siRNA, shRNA, HBV, HepG2.2.15 cell line.

KAYNAKLAR

- ACS, G. M. A. SELLS, R. H. PURCELL, P. PRICE, R. ENGLE, M. SHAPIRO, VE M. POPPER. (1987). Hepatitis B virus produced by transfected Hep G2 cells causes hepatitis in chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **84**: 4641–4644.
- ANDREASON, G. L. EVANS G. A. (1988). *Bio techniques*. **6**: 650.
- ANGELL, S. M. & BAULCOMBE, D. C. (1997). Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA. *EMBO J.* **16**, 3675–3684
- BAHRAMIAN M.B. ZARBL H. (1999). "Transcriptional and post-transcriptional silencing of rodent 1 (I) collagen by a homologous transcriptionally self-silenced transgene", *Mol. Cell. Biol.* **19**, 274-283,
- BERNSTEIN E. CAUDY A.A. HAMMOND S.M. HANNON G.J. (2001). "Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference", *Nature* **409**, 363-366.
- BILLY E. BRONDANI V. ZHANG H. MÜLLER H. & FILLIPOWICZ W. (2001). Specific interference with gene expression induced by long double stranded RNA in Mouse embryonal teratocarcinoma cell lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **98**, 14428- 14433.
- BITKO V, BARIK S. (2001). Phenotypic silencing of cytoplasmic genes using sequence-specific double-stranded short interfering RNA and its application in the reverse genetics of wild type negative-strand RNA viruses. *BMC Microbiol*; **1**:34.
- BOLLYKY, P. L. RAMBAUT, A. GRASSLY, N. CARMAN, W. F. & HOLMES, E. C. (1997). Hepatitis B virus has a New World evolutionary origin. *Hepatology* **26**, 765.
- BOZDAYI AM, TÜRKYILMAZ AR, ASLAN N, ÇINAR K, BOZKAYA H, YURDAYDIN C, UZUNALIMOĞLU Ö. (2000). Hepatit B virüsü taşıyan Türk hastalarda HBV genotipinin belirlenmesi. 17. Ulusal Gastroenteroloji Kongresi, Antalya, Türkiye.
- BOZDAYI G, TURKYILMAZ AR, IDILMAN R, KARATAYLI E, ROTA S, YURDAYDIN C, BOZDAYI AM. (2005). Complete genome sequence and phylogenetic analysis of hepatitis B virus isolated from turkish patients with chronic HBV infection. *J Med Virol.*; **76**: 476- 81.
- BOZDAYI AM, ASLAN N, BOZDAYI G, TURKYILMAZ G, TURKYILMAZ AR, 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- 29.
- BRUMMELKAMP T.R. BERNARDS R. & AGAMI R. (2002). Stable suppression of tumorigenicity by virus mediated RNA interference. *Cancer cell.* 2, 243- 247.
- BRUMMELKAMP TR, BERNARDS R, AND AGAMI R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* 296:550-553.
- BUENDIA MA. (1998). Hepatitis B virus and cancerogenesis. *Biomed & Pharmacother.* 52: 34- 43.
- BULLA GA, SIDDIQUI A. (1989). Negative regulation of the hepatitis B virus pre-S1 promotor by internal DNA sequences. *Virology.* 170:251- 260.
- CALEGARI F, HAUBENSAK W, YANG D, HUTTNER WB, BUCHHOLZ F. (2002). Tissue-specific RNA interference in postimplantation mouse embryos with endoribonuclease-prepared short interfering RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 29;9914236- 40.
- CAPLEN NJ, PARRISH S, IMANI F, FIRE A, AND MORGAN RA. (2001) Specific inhibition of gene expression by small double-stranded RNAs in invertebrates and vertebrate systems. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 98: 9746- 9747.
- CDC: National Center for Infectious Diseases Centers for Disease Control and Prevention www.cdc.gov/ncidod/diseases/hepatitis/slideset/
- CERUTTI H. (2003). RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet.*;19(1):39-46.
- CHEN M, OU JH. (1995). Cell type- dependent regulation of the activity of the negative regulatory element of the hepatitis B virus core promoter. *Virology.* 214:198- 206.
- CHEN S. , XU Z. F. YE J. YAO H. ZHENG S. DING J. (2005). Combination of small interfering RNAs mediates greater inhibition of human hepatitis B virus replication and antigen expression. *Journal of Zhejiang University Science.* 6B: 236- 241.
- CHEN Y, DU D, WU J, CHAN CP, TAN Y, KUNG HF, HE ML. (2003) Inhibition of hepatitis B virus replication by stably expressed shRNA. *Biochem Biophys Res Commun*;311:398–404.
- COGONI, C. & MACINO, G. (1999). Posttranscriptional gene silencing in *Neurospora* by a RecQ DNA helicase. *Science* 286, 2342–2344.

- CULLEN BR. (2002). RNA interference: antiviral defense and genetic tool. *Nat Immunol.*;3:597- 9.
- DANDRI M, BURDA M.R. BÜRKLE A. , ZUCKERMAN D. M. WILL H. ROGLER C.E. GRETEN H. ,PETERSEN J. (2002). Increase in De Novo HBV DNA Integrations in Response to Oxidative DNA Damage or Inhibition of Poly(ADP-Ribosyl)ation. *Hepatology*. **35**: 217- 223.
- DANE, D.S. CAMERON, C.H. BRIGGS, N.M. (1970). Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis. *Lancet*. **Vol.1**, pp 695-698.
- DAVE RS, POMERANTZ RJ. (2003). RNA interference: on the road to an alternate therapeutic strategy! *Rev Med Virol*;13: 373- 85.
- DOUGHERTY, W. G. (1994).RNA-mediated virus resistance in transgenic plants: exploitation of a cellular pathway possibly involved in RNA degradation. *Mol. Plant Microbe Interact*; **7**: 544–552.
- DYKXHOORN D. M. NOVINA C. D. SHAR P. A. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Reviews*. RNAi collection: 7- 17.
- ELBASHIR SM, HARBORTH J, LENDECKEL W, YALCIN A, WEBER K, AND TUSCHL T. (2001) Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultured mammalian cells. *Nature* **411**: 494 -498.
- ELBASHIR SM, LENDECKEL W, AND TUSCHL T. (2001) RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*: **15**;188- 200.
- FUKAI K, TAKADA S, YOKOSUKA O. Characterization of a specific region in the hepatitis B virus “enhancer” I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell. (1997). *Virology*. **236**:279-287.
- GANEM D, SCHNEIDER R. (2001). Hepadnaviridae: the viruses and their replication. *Fields of virology*. Knipe DM, Howley PM, eds. Philadelphia: Lippincott-Raven. 2923- 2970.
- GANEM D. (1996). Hepadnaviridae and their replication. *Fields Virology*. 2703-2737.
- GERLICH W. ROBINSON WS. Hepatitis B virus contains protein attached to the 5' end of its complete strand. *Cell*. **21**:801- 811.
- GERLICH, W. (1993).” HBV: Structure and molecular virology.In *Viral Hepatitis.*” Zuckerman AJ, and Thomas HC (Eds), 1.th edition. Churchill Livingstone Publications, New York.

- GILADI H, KETZINEL-GILAD M, RIVKIN L, FELIG Y, NUSSBAUM O, GALUN E. (2003). Small interfering RNA inhibits hepatitis B virus replication in mice. *Mol Ther*, **8**: 769–776.
- GITLIN L, KARELSKY S, AND ANDINO R. (2002). Short interfering RNA confers intracellular antiviral immunity in human cells. *Nature*. **418**:430 -4.
- GRAHAM R. L., VAN DER ERB. A. J. A. (1973). *Virology* **52**: 456.
- GRISHOK A, PASQUINELLIAE, CONTE D, LI N, PARRISH S, HA I, BAILLIE DL, FILIRE A, RUVKUN G, AND MELLO CC. (2001) Genes and mechanisms related to RNA interference regulate expression of the small temporal RNAs that control *C. elegans* developmental timing. *Cell* **106**: 23–34.
- GRISHOK A, TABAR H, AND MELLO CC. (2000) Genetic requirements for inheritance of RNAi in *C. elegans*. *Science* **287**: 2494- 2497.
- GUNTHER S, LI BC, MISKA S, KRUGER DH, MEISEL H, WILL H. (1995). A novel method for efficient amplification of whole hepatitis B virus genomes permits rapid functional analysis and reveals deletion mutants in immunosuppressed patients. *J Virol*;**69**: 5437– 5444.
- GUO WT, BELL KD, OU JH. (1991). Characterization of a specific region in the hepatitis B virus “enhancer” I for the efficient expression of X gene in the hepatic cell. *Virology*. **236**: 279- 287.
- HAMASAKI K, NAKAO K, MATSUMOTO K, ICHIKAWA T, ISHIKAWA H, EGUCHI K. 2003 Short interfering RNA-directed inhibition of hepatitis B virus replication. *FEBS Lett*;**543**: 51–54.
- HAMILTON AJ. AND BAULCOMBE DC. (1999). A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants, *Science*: **286**;950-952.
- HAMMOND SM. BERNSTEIN E. BEACH D. HANNON GJ. (2000). An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* **404**, 293- 296.
- HANNON GJ. (2002). RNA interference. *Nature*.;**418**:244 -51.
- HEMANN MT, FRIDMAN JS, ZILFOU JT, HERNANDO E, PADDISON PJ, CORDON-CARDO C, HANNON GJ, LOWE SW. (2003). An epi-allelic series of p53 hypomorphs created by stable RNAi produces distinct tumor phenotypes in vivo. *Nat Genet*. **33**;396 -400.
- HU WY, MYERS CP, KILZER JM, PFAFF SL, BUSHMAN FD. (2002). Inhibition of retroviral pathogenesis by RNA interference. *Curr Biol*;**12**: 301 -11.

- HUTVAGNER G, ZAMORE PD. RNAi: (2002). Nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev.* **12**: 225- 32.
- JACQUE J-M, TRIQUES K, STEVENSON M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature.* **418**:435- 8.
- JORGENSEN RA, CLUSTER PD, ENGLISH J, QUE Q, NAPOLI CA. (1996). Chalcone synthase cosuppression phenotypes in petunia flowers: comparison of sense vs. antisense constructs and single-copy vs. complex T-DNA sequences. *Plant Mol Biol*:**31**;957- 73.
- KANN, M. A. BISCHOF, AND W. H. GERLICH. (1997). In vitro model for the nuclear transport of the hepadnavirus genome. *J. Virol.* **71**:1310 –1316.
- KANN, M. B. SODEIK, A. VLACHOU, W. H. GERLICH, AND A. HELENIUS. (1999). Phosphorylation-dependent binding of hepatitis B virus core particles to the nuclear pore complex. *J. Cell Biol.* **145**: 45–55.
- KAPADIA SB, BRIDEAU-ANDERSEN A, CHISARI FV. (2003). Interference of hepatitis C virus RNA replication by short interfering RNAs. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **100**:2014- 8.
- KAWASAKI H. SUYAMA E. IYO M. & TAIRA K. (2002). siRNAs generated by recombinant human Dicer induce specific and significant but target site-independent gene silencing in human cell. *Nucleic Acids Res. USA.* **99**, 14236- 14240.
- KENNERDELL J.R. CARTHEW R.W. (1998). "Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway", *Cell*, **95**, 1017- 1026,
- KENNERDELL JR, AND CARTHEW RW. (1998) Use of dsRNA-mediated genetic interference to demonstrate that frizzled and frizzled 2 act in the wingless pathway. *Cell* **95**: 1017- 1026.
- KENNERDELL JR, AND CARTHEW RW. (2000) Heritable gene silencing in *Drosophila* using double-stranded RNA. *Nature Biotech* **18**: 896- 898.
- KETTING RF, FISCHER SE, BERNSTEIN E, SIJEN T, HANNON GJ, AND PLASTERK RH. (2001) Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev* **15**:2654-2659.
- KLEIN C, BOCK CT, WEDEMEYER H, WUSTEFELD T, LOCARNINI S, DIENES HP, KUBICKA S, MANNS MP, TRAUTWEIN C. (2003). Inhibition of hepatitis B virus replication in vivo by nucleoside analogues and siRNA. *Gastroenterology*; **125**:9–18.

- KNOWLES, B. B. HOWE, C. C. & ADEN, D. P. (1980) *Science*. **209**, 497- 499.
- KONISHI M, WU CH, WU GY. (2003). Inhibition of HBV replication by siRNA in a stable HBV-producing cell line. *Hepatology*; **38**: 842– 850.
- KANE M. (1995). Global programme for control of hepatitis B infection. *Vaccine*; **13** (Suppl. 1): 47- 49.
- KORBA, B. E. VE G. MILMAN. (1991). A cell culture assay for compounds which inhibit hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* **15**: 217–228.
- KORBA, B. E. VE J. L. GERIN. (1992). Use of a standardized cell culture assay to assess activities of nucleoside analogs against hepatitis B virus replication. *Antiviral Res.* **19**: 55–70.
- KUMAGAI, M. H. Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **92**, 1679–1683 (1995).
- LADNER S. K. , OTTO M.J. BARKER C.S. , ZAIFERT K. WANG G.H. GUO J. T. , SEEGER C. KING R.W. (1997). Inducible expression of human hepatitis B virus (HBV) in stably transfected hepatoblastoma cells: a Novel system for screening potential inhibitors of HBV replication. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. **Vol. 41, No.8.** 1715- 1720.
- LAI CL, RATZIU V, YUEN MF, ROYNARD T. (2003). Viral hepatitis B. *The Lancet*. Vol **362**. 2089- 94.
- LEE NS, DOHJIMA T, BAUER G, LI H, LI M-J, EHSANI A, SALVATERRA P, AND ROSSI J. (2002). Expression of small interfering RNAs targeted against HIV-1 rev transcripts in human cells. *Nature Biotechnol.* **20**:500- 505.
- LEE WM. (1997) Hepatitis B virus infection *N Engl J Med*: **337**:1733- 45.
- LI Y.X. FARRELL M.J. LIU R. MOHANTY N. KIRBY M.L. (2000). Double-stranded RNA injection produces null phenotypes in zebrafish, *Dev. Biol.* **217**, 394- 405.
- LIEN JM, ALDRICH CE, MASON WS. (1986). Evidence that a capped oligoribonucleotide is the primer of duck hepatitis B virus plus-strand DNA synthesis. *Journal of Virology*. **61**:3832- 3840.
- LIU CJ, CHEN PJ, LAI MY, KAO JH, CHANG CF, WU HL, SHAU WY, CHEN DS. (2003). A prospective study characterizing full-length hepatitis B virus genomes during acute exacerbation. *Gastroenterology* **124**: 80–90.
- LOCARNINI S. MCMILLAN J. BARTHOLOMEUSZ A. (2003). The hepatitis B virus and common mutants. *Seminars in liver disease*. Volume **23**, number **1**: 5- 20.

- LOHMANN J.U. ENDL I. BOSCH T.C. (1999). "Silencing of developmental genes in hydra", *Dev. Biol.* **214**, 211- 214,
- LOTT L, BEAMES B, NOTVALL L, LANFORD RE. (2000). Interaction between hepatitis B virus core protein and reverse transcriptase. *Journal of virology.* **74**: 11479- 11489.
- LU CC, CHEN M, OU JH. YEN TS. (1995). Key role of a CCAAT element in regulating hepatitis B virus surface protein expression. *Virology.* **206**: 1155-1158.
- MAHONEY FJ. (1999). Update on diagnosis, management and prevention of hepatitis B virus infection. *Clin Microbiol Rev*; **12**:351- 66
- MARGOLIS HS.(1998). Hepatitis B virus infection. *Bull World Health Organ*: **76**;152-53.
- MARTINEZ J, PATKANIOWSKA A, URLAUB H, LUHRMANN R, TUSCHL T. (2002) Single-stranded antisense siRNAs guide target RNA cleavage in RNAi. *Cell.* Sep 6; **110**:563- 74.
- MCCAFFREY AP, NAKAI H, PANDEY K, HUANG Z, SALAZAR FH, XU H, WIELAND SF, MARION PL, KAY MA. (2003).Inhibition of hepatitis B virus in mice by RNA interference. *Nat Biotechnol*: **21**: 639 –644.
- MCMANUS, M.T. PETERSEN C.P. HAINES B.B. CHEN J. & SHARP P. A. (2002). Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA*: **8**, 842 -850.
- MISQUITTA L. PATERSON B.M. (1999)."Targeted disruption of gene function in *Drosophila* by RNA interference (RNA-I): a role for nautilus in embryonic somatic muscle formation", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 1451- 1456,
- MIYAGISHI M, AND TAIRA K. (2002). U6-promoter-driven siRNAs with four uridine 3' overhangs efficiently suppress targeted gene expression in mammalian cells. *Nature Biotechnol*: **20**;497- 500.
- MONTGOMERY M.K. XU S. FIRE A. (1998). "RNA as a target of double-stranded RNA-mediated genetic interference in *Caenorhabditis elegans*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 15502- 15507,
- MOOLLA N. KEW M. ARBUTHNOT P. (2002). Regulatory elements of hepatitis B virus transcription. *Journal of viral hepatitis*: **9**;323- 331.
- MOURELATOS Z. (2002). MiRNPs: a novel class of ribonucleoproteins containing numerous microRNAs. *Genes Dev.* **16**, 720- 728.

- MYERS JW, JONES JT, MEYER T, FERRELL JE. (2003). Recombinant Dicer efficiently converts large dsRNAs into siRNAs suitable for gene silencing. *Nat Biotechnol.* **21**: 324- 8.
- NAPOLI C, LEMIEUX C, AND JORGENSEN R. (1990) Introduction of a chalcone synthase gene into *Petunia* results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* **2**: 279- 289.
- NGO H. TSCHUDI C. GULL K. ULLU E. (1998). "Double-stranded RNA induces mRNA degradation in *Trypanosoma brucei*", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **95**, 14687- 14692,
- NORDER, H. COUROUCE, A. M. & MAGNIUS, L. O. (1994). Complete genomes, phylogenetic relatedness, and structural proteins of six strains of the hepatitis B virus, four of which represent two new genotypes. *Virology* **198**, 489±503.
- NOVINA CD, MURRAY MF, DYKXHOORN D, BERESFORD PJ, RIESS J, LEE S-K, COLLMAN RG, LIEBERMAN J, SHANKAR P, SHARP PA. (2002). siRNA-directed inhibition of HIV-1 infection. *Nature Med.* **8**: 681- 6.
- NYKANEN A, HALEY B, ZAMORE PD. (2001). ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell.* **107**:309- 21.
- PADDISON PJ, CAUDY A, AND HANNON GJ. (2002). Stable suppression of gene expression by RNAi in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **99**;1443-1448.
- PADDISON PJ, HANNON GJ. (2002). RNA interference: the new somatic cell genetics? *Cancer Cell.* 2002 Jul;**2**(1):17-23. RNAi. *Science.* Sep **13**;**297**:1833-7.
- PARAN N, COOPER A, SHAUL Y. (2003). Interaction of hepatitis B virus with cells. *Rev. Med. Virol.* **13**: 137- 143.
- PASQUINELLI A. E. & RUVKUN G. (2002). Control of developmental timing by microRNAs and their targets. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* **18**, 495- 513.
- PAUL CP, GOOD PD, WINER I, AND ENGELKE DR. (2002). Effective expression of small interfering RNA in human cells. *Nature Biotechnol.* **20**:505- 508.
- PLASTERK, R.H. (2002). RNA silencing: The genome's immune system. *Science* **296**: 1263–1265.
- PURCELL RH. (1993) The discovery of the hepatitis viruses. *Gastroenterology* **104**: 955-63.

- QIN XF, AN DS, CHEN IS, BALTIMORE D. (2003), Inhibiting Hiv-1 Infection In Human T Cells By Lentiviral-Mediated Delivery Of Small Interfering Rna Against Ccr5. *PROC NATL ACAD SCI U S A* **100**:183- 8.
- ROBINSON WS, FIELDS BN, KNIPE DM. (1991) Hepadnaviridae and their replication. *Fundamental Virology*. 2nd ed. New York. 989-1021
- ROBINSON WS, MANDDELL GL, DOUGLAS RG, BENNETT JE (Eds). (1990) Hepadnaviridae: Hepatitis B virus and hepatitis delta virus. Principles and Practice of Infectious Disease. 3rd ed. New York. 1204-31.
- RUBINSON DA, DILLON CP, KWIATKOWSKI AV, SIEVERS C, YANG L, KOPINJA J, ZHANG M, MCMANUS MT, GERTLER FB, SCOTT ML, VAN PARIJS L. (2003). A lentivirus-based system to functionally silence genes in primary mammalian cells, stem cells and transgenic mice by RNA interference. *Nat Genet. Mar*, **33**:401- 6.
- RUIZ, M. T. VOINNET, O. & BAULCOMBE, D. C. (1998). Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. *Plant Cell* **10**, 937–946.
- RUVKUN G. (2001) Glimpses of a tiny RNA world. *Science* **294**:797- 799.
- SANCHEZ A.A. NEWMARK P.A. (1999). "Double-stranded RNA specifically disrupts gene expression during planarian regeneration", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **96**, 5049- 5054,
- SATTLER F. ROBINSON WS. (1979). Hepatitis B viral DNA molecules have cohesive ends. *Journal of Virology*. **32**: 226- 233.
- SCHRAUFSTATTER IU, HYSLOP PA, HINSHAW DB, SPRAGG RG, SKLAR LA, COCHRANE CG. (1986). Hydrogen peroxide-induced injury of cells and its prevention by poly(ADP-ribose) polymerase. *Proc Natl Acad Sci U S A*; **83**: 4908- 4912.
- SCHWARZ DS, HUTVAGNER G, HALEY B, ZAMORE PD. (2002). Evidence that siRNAs function as guides, not primers, in the *Drosophila* and human RNAi pathways. *Mol Cell*; **10**: 537- 48.
- SEEGER C, MASON WS. (2000) Hepatitis B virus biology. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*. P:51- 68.
- SELLS, M. A. A. Z. ZELENT, M. SHVARTSMAN, VE G. ACS. (1988). Replicative intermediates of hepatitis B virus in HepG2 cells that produce infectious virions. *J. Virol.* **62**: 2836–2844.
- SELLS, M. A. M.-L. CHEN, VE G. ACS. (1987). Production of hepatitis B virus particles in Hep G2 cells transfected with cloned hepatitis B virus DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **84**:1005–1009.

- SHIH, C. L.-S. LI, S. ROYCHOUDHURY, M.-H. HO. (1989). In vitro propagation of human hepatitis B virus in a rat hepatoma cell line. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **86**; 6323– 6327.
- SHLOMAI A, SHAUL Y. (2003). Inhibition of hepatitis B virus expression and replication by RNA interference. *Hepatology*:**37**;764–770.
- SIMMONDS P. (2001).The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. *Journal of General Virology*, **82**: 693–712.
- STEVENSON M. Dissecting HIV-1 through RNA interference. (2003). *Nat Rev Immunol.* **3**: 851- 8.
- STEWART, S.A. (2003). Lentivirus delivered stable gene silencing by rna in primary cells. *RNA.* **9**. 493- 501.
- SUI G, SOOHOO C, AFFAR E-B, GAY F, SHI Y, FORRESTER WC, AND SHI Y. (2002). A DNA vector-based RNAi technology to suppress gene expression in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**:5515- 5520.
- SUREAU, C. J. ROMET-LEMONNE, J. I. MULLINS, M. ESSEX. (1987). Production of hepatitis B virus by a differentiated human hepatoma cell line after transfection with cloned circular HBV DNA. *Cell* **47**: 37–47.
- SUREAU, C. J. W. EICHBERG, G. B. HUBBARD, J. L. ROMET-LEMONNE, M. ESSEX. (1988). A molecularly cloned hepatitis B virus produced in vitro is infectious in a chimpanzee. *J. Virol.* **62**: 3064–3067.
- SVOBODA R. STEIN R. HAVASHI H. SCHULTZ RM. (2000) selective reduction of dormant maternal mRNAs in Mouse oocytes by RNA interference. *Development*: **127**; 4147- 4156.
- TAGIEVA, N. E. R. Z. GIZATULLIN, V. M. ZAKHARYEV, L. L. KISSELEV. (1995). A genome-integrated hepatitis B virus DNA in human neuroblastoma. *Gene* **152**:277–278.
- TAKADA S, KANENIWA N, TSUCHIDA N, KOIKE K. (1996). Hepatitis B virus X gene expression is activated by X protein but repressed by p53 tumor suppressor gene product in the transient expression system. *Virology.* **216**: 80-89.
- TAVERNARAKIS N, WANG SL, DOROVKOV M, RYAZANOV A, DRISCOLL M. , (2000). Heritable and inducible genetic interference by doublestranded RNA encoded by transgenes. *Nat Genet*: **24**;180- 3.
- THIOLLAIS P. POURCEL C. DEJEAN A. (1985).The hepatitis B virus. *Nature.* **317**: 489- 95.

- TIJSTERMAN, M. KETTING, R. F. OKIHARA, K. L. SIJEN, T. & PLASTERK, R. H. (2002). RNA helicase MUT-14-dependent gene silencing triggered in *C. elegans* by short antisense RNAs. *Science*: **295**, 694–697.
- TIMMONS L. FIRE A. (1998). Specific interference by ingested dsRNA. *Nature* **395**, 854.
- TSURIMOTO, T. A. FUJIYAMA, K. MATSUBARA. (1987). Stable expression and replication of hepatitis B virus genome in an integrated state in a human hepatoblastoma cell line transfected with the cloned viral DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*: **84**; 444–448.
- UPRICHARD, BOYD, ALTHAGE, CHISARI. (2005). Clearance of hepatitis B virus from the liver of transgenic mice by short hairpin RNAs. *PNAS*. 18 Jan.
- VAN DER KROL, A. R. MUR, L. A. DE LANGE, P. MOL, J. N. & STUITJE, A. R. (1990). Inhibition of flower pigmentation by antisense CHS genes: promoter and minimal sequence requirements for the antisense effect. *Plant Mol. Biol.* **14**: 457–466.
- WARGELIUS A, ELLINGSEN S, FJOSE A, (1999). Double-stranded RNA induces specific developmental defects in zebrafish embryos. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **263**, 156- 161,
- WEISS, L. A. S. KEKULE, U. JAKUBOWSKI, E. BURGELT, P. H. HOFSCHEIDER. (1996). The HBV-producing cell line Hep G2-4A5: a new in vitro system for studying the regulation of HBV replication and for screening anti-hepatitis B virus drugs. *Virology* **216**:214–218.
- WHO. World Health Report. (1996). Fighting disease, fostering development. Geneva: World Health Organization.
- WIANNY F, ZERNICKA-GOETZ M. (2000). Specific interference with gene function by double-stranded RNA in early Mouse development. *Nat Cell Biol*, **2(2)**:70-5.
- WIGLER. (1978). *Cell*. **14**: 725-731.
- WILSON JA, JAYASENA S, KHVOROVA A,. (2003). RNA interference blocks gene expression and RNA synthesis from hepatitis C replicons propagated in human liver cells. *Proc Natl Acad Sci USA*; **100**: 2783-8.
- WU-SCHARF, D. JEONG, B. ZHANG, C. & CERUTTI, H. (2000). Transgene and transposon silencing in *Chlamydomonas reinhardtii* by a DEAH-box RNA helicase. *Science* **290**, 1159–1162.
- www.sciencemag.org/content/vol298/issue5602/#special Breakthrough of the year. #1 the winner. Small RNAs make big splash. vol **298**: 2296-7.

- YANG D. LU H. ERICKSON J.W. (2000). Evidence that processed small dsRNAs may mediate sequence-specific mRNA degradation during RNAi in *Drosophila* embryos, *Curr. Biol.* **10**, 1191- 1200.
- YING C, DE CLERCQ E, NEYTS J. 2003 Selective inhibition of hepatitis B virus replication by RNA interference. *Biochem Biophys Res Commun*; **309**:482–484.
- YU J-Y, DERUITER SL, AND TURNER DL. (2002). RNA interference by expression of short-interfering RNAs and hairpin RNAs in mammalian cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**: 6047- 6052.
- YU X, MERTZ JE. (1992). Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *Journal of Virology.* **66**: 4073- 4084.
- YUH CH. TING LP.(1990). The genome of hepatitis B virus contains a second enhancer: cooperation of two elements within this “enhancer” is required for its function. *J Virology.* **64**: 4281- 4287.
- YUH CH. CHANG YL, TING LP. (1995). Transcriptional regulation of precore and pregenomic RNAs of hepatitis B virus. *Journal of virology.* **69**: 3647- 3657.
- ZAMORE P.D. (2001). RNA interference: listening to the sound of silence, *Nature Structural Biology*, **8, 9**, 746- 750.
- ZAMORE PD. TUSCHL T. SHARP PA.& BARTEL DP. (2000). RNAi: Double stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, **101**, 25- 33.
- ZENG Y, CULLEN BR. (2002) RNA interference in human cells is restricted to the cytoplasm. *FNA.* **8**:855- 60.
- ZHOU DX, YEN TS. (1991). The hepatitis B virus S promotor comprises A CCAAT motif and two initiation regions. *Journal of Biol Chem.* **266**: 23416- 23421.
- ZOULIM F, SEEGER C. (1994). Reverse transcription in hepatitis B viruses is primed by a tyrosine residue of the polymerase. *Journal of virology.* **68**: 6- 13.

ÖZGEÇMİŞ

Handan Kayhan

Yeni Batı mah. 156.sok Siyasal 86 sitesi,
Ekin Apt., 7/9, 06370 Batıkent/ Ankara
e-mail: handanozsunar@yahoo.com
Tel: 0505 680 20 42, 0312 256 85 70
Doğum tarihi: 16 11 1975
Ehliyet: 1996 (B)

Eğitim

Lisans : Biyoloji Bölümü, Moleküler Genetik branşı,
Orta Doğu Teknik Üniversitesi, Ankara. Haziran, 1999.

Lisans üstü : Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Hepatoloji A.B.D., Ankara.
Tez konusu: HBV replikasyonunun ve ekspresyonunun
shRNA'larla baskılanması.

TECRÜBE

- PE 310 sekans cihazını kullanarak rutinde YMDD mutasyon analizi, projelerde çeşitli sekans analizleri,
- Roche Light-Cycler ile kantitatif real-time PCR'lar (HBV ve HCV hastalarının viremilerini saptamak amacıyla.),
- In-house PCR, çeşitli DNA ve RNA izolasyonları, genomik DNA izolasyonu, agaroz jel elektroforezi, PAGE, Hybrid-Capture vb. gibi yöntemlerin birçok uygulaması,
- Klonlama çalışmaları,
- siRNA tasarımı, primer tasarımı,
- Hücre kültürü (HepG2, HepG2.2.15, HepAD38, HepAD79, Huh7 vb.) yapıldı
- Transfeksiyon yöntemleri denendi.
- Mikroarray ve çip teknolojisi üzerinde yapılmakta olan araştırmalara katkıda bulunuldu, bu konuda eğitim verildi. (Ankara Kriminoloji Lab.)

SEMİNERLER

- RNAi teknolojisinin *in vivo* da uygulamaları,
- Küçük engelleyici RNA molekülleri (Small Interfering RNAs),
- Hücre kültüründe siRNA'lar kullanılarak HBV replikasyonunun inhibe edilmesi,
- Replike olan HCV replikonlarının hücreden temizlenmesi,
- Farelerde Fas genini hedef alan RNAi,
- Moleküler genetikte yeni yönlemler,
- Hücre membranı,
- Mikroarray ve mikroçipler konusunda birçok seminer.

KATILIMLAR

- V. Ulusal Hepatoloji Kongresi 5- 7 Haziran 2005, İstanbul
- HEPATOLOJİ 2004, Bilkent Oteli/ Ankara,
- IX. International Antiviral symposium and Workshop, 9- 11.Kasım- 2003, Antalya,
- HEPATOLOJİ 2003, 20.Haziran.2003, Bilkent Oteli/ Ankara,
- I. Ulusal Tanıda Moleküler Genetik Kongresi 18- 22 Nisan 2002,
- Moleküler genetik yaz kursu, İzmir,2002,

SÖZLÜ SUNUM

- *shRNA ile Hepatit B virüs replikasyonunun in-vitro olarak baskılanması: HBV tedavisinde yeni bir strateji,*
(Handan Kayhan, Ersin Karataylı, A. Reşat Türkyılmaz, Cihan Yurdaydın, A. Mithat Bozdayı)
V. Ulusal Hepatoloji Kongresi 5-7 Haziran 2005, İstanbul
- *Lamivudin Tedavisi sırasında gelişen ve Adefovir Dipivoxil tedavise çapraz direnç gösteren yeni bir mutasyon patterni,*
(Ersin Karataylı, Selim Karayalçın, Handan Kayhan, A. Resat Türkyılmaz, Cihan Yurdaydın, A. Mithat Bozdayı)
V. Ulusal Hepatoloji Kongresi 5-7 Haziran 2005, İstanbul
- *Türkiye’de Lamivudine direnci belirleyen majör mutasyonların rastlanma sıklığı*
(A. Mithat Bozdayı, A. Reşat Türkyılmaz, Handan Kayhan, Özlem Erkan, Ersin Karataylı, Şahin Çoban, Ramazan İdilman, Dilek Oğuz, Can Polat Eyigün, Refik Mas, Aydan Kansu)
V. Ulusal Hepatoloji Kongresi 5-7 Haziran 2005, İstanbul
- *Mikroarray teknolojisi (Handan Kayhan)*
I. Ulusal Tanıda Moleküler Genetik Kongresi, 18-22 Nisan 2002, Adana.

ALINAN BAZI DERS VE KURSLAR

- *Temel Genetik, Moleküler Genetik1-2 , Rekombinant DNA Teknolojisi, Biyoteknoloji ve bunların laboratuvar dersleri.*
- *Biyokimya I-II ,Biyostatistik, Mikrobiyoloji, Ekoloji ve bunların laboratuvar dersleri.*
- *Hepatit A,B, C, D, E ve TTV virüslerinin yapısı ve epidemiyolojileri, Karaciğerin yapısı.*
- *Araştırma Yöntemleri, Çağdaş Yönetim Teorileri, , Çok Hızlı Okuma Teknikleri (Kariyer Gelişim Merkezi)*
- *Yönetim Sistemleri (Lineer Programlama) İstatistik, Ekonomi (Makro ve Mikro) , Finansal Yönetim,*
- *Laboratuvar güvenliği Eğitim Programı (ANKÜSEM), Toplam Kalite Yönetimiyle ilgili seminerlere katılım.*