

HEPATİT B VİRUSU TAŞIYICISI TRANSGENİK FARE MODELİNİN GELİŞTİRİLMESİ

DEVELOPMENT OF A HEPATITIS B VIRUS CARRIER TRANSGENIC MICE MODEL

Müge CANER¹, Sezen ARAT², Rifat BİRCAN³

ÖZET: Hepatit B virus (HBV) enfeksiyonlarının immünopatogenezi ile ilgili çalışmalara önemli katkıları olan transgenik fare modellerinin geliştirilmesi, yaklaşık 20 yıldan bu yana devam etmektedir. Bu amaçla tüm HBV genomunu ya da seçilmiş viral genleri taşıyan çeşitli soylar geliştirilmiş ve HBV replikasyon ve patogenezi mekanizmalarının aydınlatılmasındaki yararları vurgulanmıştır. Bu çalışmada HBV taşıyıcısı bir fare modelinin geliştirilmesi ve üretilmesi amaçlanmıştır. Bunun için mikroenjeksiyon yöntemi ile fare embriyolarına tüm HBV genomu aktarılmış, transgenik manipülasyon sonrası fare yavrularından HBV taşıyıcısı olanlar HBV-DNA molekülünün replikasyonu ve ekspresyonunun gösterildiği moleküler yöntemler ile saptanmıştır. Transgen aktarımı TÜBİTAK Marmara Araştırma Merkezi Transgen Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiştir. HBV-DNA taşıyan fareler, kuyruk dokularından elde edilen DNA örneklerine uygulanan polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ve fare serumlarına uygulanan dot-blot hibridizasyon yöntemiyle belirlenmiştir. Transgenik farelerde integre HBV-DNA varlığı, fare karaciğer doku kesitlerine uygulanan in situ hibridizasyon yöntemiyle saptanmıştır. HBV-DNA moleküllerini taşıyan fare karaciğerlerinden izole edilen total RNA molekülleri, revers transkriptaz PCR yöntemiyle saptanmış ve HBV-DNA ekspresyonunun gerçekleştiği gösterilmiştir. HBV taşıyıcı farelerde, HBsAg varlığı karaciğerde immünohistokimyasal yöntemle gösterilmiş, ayrıca HBsAg ve HBeAg pozitifliği ELISA yöntemi ile tespit edilmiştir. HBV genomu aktarılan fare embriyolarından yaklaşık %10'unda HBV genomu, ekspresyonu ve ekspresyon ürünü saptanmıştır. Heterozigot taşıyıcı fareler kendi aralarında çiftleştirilerek homozigot HBV transgenik fare soyu elde edilmiştir. Geliştirdiğimiz bu HBV transgenik fareler, ülkemizde üretilen ilk transgenik fareler olma özelliği taşımaktadır. Tüm dünyada olduğu gibi ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu olan HBV enfeksiyonlarının ve virusun patogenezi ile ilgili çalışmalarda, ürettiğimiz bu taşıyıcı transgenik farelerin katkısı olacağı düşünülmektedir.

Anahtar sözcükler: HBV enfeksiyonu, HBV taşıyıcısı transgenik fare modeli.

ABSTRACT: The studies for the development of transgenic mice models which provide important profits for the studies concerning immunopathogenesis of hepatitis B virus (HBV) infections are in progress since 20 years. For this purpose different lineages bearing whole HBV genome or selected viral genes have been developed and their usage in clarifying the HBV replication and pathogenesis mechanisms have

¹ Maltepe Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul. (mugecaner@yahoo.co.uk)

² Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Kurumu, Marmara Araştırma Merkezi, Gebze.

³ Marmara Üniversitesi Tıp Fakültesi, Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

been emphasized. The aim of this study was to develop and breed a HBV carrier mice model. In the study the full HBV genome has been transferred to mouse embryos by microinjection procedure. Following transgenic manipulation, the HBV carriers among the daughter mice have been detected by molecular methods in which HBV-DNA replication and expression have been shown. The manipulations for transgene transfers have been performed in TUBITAK Marmara Research Center Transgene Laboratory, Gebze, İstanbul. The HBV-DNA carrier mice have been demonstrated by polymerase chain reaction (PCR) using the DNA samples obtained from tail tissues and also by dot-blot hybridization of the mice sera. Integrated HBV-DNA has been detected by applying in-situ hybridization to the liver tissue sections. HBV-DNA expression has been shown by reverse transcriptase PCR method with total RNA molecules that have been isolated from the liver tissues of the HBV-DNA carrier mice. HBsAg has been detected in the liver by immunohistochemical method, and HBsAg and HBeAg have additionally been demonstrated by ELISA. HBV genome, expression of the genome and the expression products have been determined in approximately 10% of the mice of which HBV-DNA have been transferred. By inbreeding heterozygote carrier mice, homozygote HBV transgenic mice line have been obtained. These HBV transgenic mice are the first lineages developed in our country. It is hopefully thought that this HBV carrier transgenic mouse model may contribute to the studies on the pathogenesis of HBV infections which are important health problems in the world as well as in Turkey.

Key words: HBV infection, HBV carrying transgenic mice.

GİRİŞ

Hepatit B virusu (HBV) dünyada akut ve kronik karaciğer hastalıkları ile hepatoselüler karsinomanın (HCC) en yaygın ve en önemli etkenlerindendir. HBV enfeksiyonu Asya ve Afrika'nın gelişmemiş ve gelişmekte olan ülkelerinde endemik olup, bu ülkelerde nüfusun %15-20'si taşıyıcı durumundadır^{1,2}.

Çembersel, kısmi çift iplikli genoma sahip olan HBV, küçük, zarflı bir hepatotropik DNA virusudur³. Genellikle HBV'nun doğrudan sitopatik bir virus olmadığı ve enfeksiyon sırasındaki karaciğer hasarından antiviral immün yanıtın sorumlu olduğu kabul edilmektedir. Ancak bu görüş, transgenik bir model elde edilinceye kadar doğrudan test edilememiştir; zira dağ sıçanı ve ördek hepatit viruslarının immünobiyolojisi doğal konaklarının birbirine yakın olmaması nedeniyle tam olarak anlaşılamamıştır^{4,5}. Patogenez mekanizmalarının araştırılması, konak tipi ve in vitro kültür sistemlerinin kısıtlılığı/yokluğu nedeniyle zor olmuştur. HBV enfeksiyonunun patogenez mekanizmaları hakkında bilinenlerin çoğu *Hepadnaviridae* ailesinin diğer üyelerinden elde edilmiştir. 1980'li yılların ikinci yarısından itibaren immün sistemi iyi bilinen ve insanın immün sistemine çok benzeyen inbred küçük hayvan modeli olan HBV transgenik fare modeli geliştirilmiştir⁶⁻⁸. Böylece HBV ya da karaciğere özgül promotorlar tarafından kontrol edilen HBV zarf, kor, prekor ve X proteinlerini eksprese eden bir transgenik soy elde edilmiştir⁹⁻¹². Bu gelişme HBV patogenezini ile ilgili birçok bilinmeyenin araştırılmasında önemli rol oynamıştır.

Bu çalışmanın amacı, hepatit B enfeksiyonunun immünopatogenezinin araştırılmasında kullanılabilecek bir HBV taşıyıcısı transgenik fare soyunun geliştirilmesi ve üretilmesidir.

GEREÇ ve YÖNTEM

Transgenik Ürünlerin Hazırlanması: Tüm HBV genomundan uzun olan ve uç kısımlarda fazlalığı olan HBV kökenli ürün Hielderberg Üniversitesi Moleküler Biyoloji Bölümü'nden temin edildi. HBV 1,3 plazmidi (pT HBV 1,3), ürünün HBV “enhancer-1” dizisinden önce başlar, tüm HBV genomunu kapsadıktan sonra HBV'nin tek poliadenilasyon bölgesinin aşağısında biter⁹⁻¹¹. 5 µg pT HBV 1,3 plazmid DNA, 100 µl TE tamponda çözöldü ve 26 µl plazmid solüsyonu daha önce tarif edildiği şekilde *E.coli* HB 101 ve Nova Blue kompetan hücrelere aktararak ampicilin içeren LB sıvı besiyerinde inkübe edildi¹³. Plazmid DNA'sı, *E.coli* DNA'sından plazmid saflaştırma kiti ile (Maxi plus purification kit, Promega ve Qiagen) izole edildi ve Hind III ve Sac I restriksiyon enzimi ile kesildi. Kesilmiş olan HBV-DNA, DNA saflaştırma kiti (MBI Fermentas) ve Agar ACE enzim sistemi (Promega) ile agaroz jelden izole edildi. Saf olarak elde edilen HBV-DNA, transfer ortamında çözöldü ve mikroyeksiyonda kullanıldı.

Transgenik Manipulasyon: Çalışmada “outbred” (akraba olmayan) CD-1 ve CB6F1 (C57BL/6XBALB/C) hibrid embriyoları sırası ile donör ve alıcı olarak kullanıldı. HBV transgenik fare, Pt HBV 1,3 plazmidinden kesilerek elde edilen HindIII/SacI fragmanının enjekte edilmesi ile üretildi. Transgenik manipulasyon Türkiye Bilimsel ve Teknolojik Araştırma Enstitüsü Marmara Araştırma Merkezinde (TÜBİTAK-MAM) bulunan “Transgen Laboratuvarı”nda gerçekleştirildi. Donörler 6-7 ve alıcılar 8-9 haftalıktı. Tüm fareler deney boyunca karanlık ve aydınlık döngüsünde (12:12 saat) bırakıldı.

HBV-DNA Analizi: Fare kuyruk dokusundan elde edilen total genomik DNA, geleneksel proteinaz K fenol/kloroform izoamilalkol metodu ile ekstrakte edildi¹³. Doğumdan 1.5 ay sonra fare yavrularının kuyrukları küçük parçalara ayrıldı ve proteinaz K içeren lizis tamponunda 37°C'de 2 saat bekletildi. Ortama pH 8.0 tris ile doyurulmuş 300 µl fenol eklendikten sonra 10 dakika 5000 rpm'de santrifüj edildi. Üst faz temiz bir tüpe alındı ve ilk işlem tekrarlandı. Üst faza 100 µl kloroform/izoamilalkol (24:1) ve buzda soğutulmuş etanol eklenip -20°C'de bir gece bekletildi. İnkübasyon sonrası 30 dakika 13000 rpm'de santrifüj edildi ve pelet %70'lik etanol ile yıkandı. Daha sonra örnekler 50 ng/µl olacak şekilde sulandırıldı ve diğer bütün deneyler bu sulandırılan örnekler ile yapıldı.

TE tamponda çözölen DNA örnekleri, niceliksel ve niteliksel olarak değerlendirildi; bu amaçla sırasıyla DNA miktarları spektrofotometre ile ölçöldü ve agaroz jelde UV floresan ile görüntölendi. Taşıyıcı fareler, integre DNA molekülünün “nested” polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) ile analizi ile belirlendi. DNA izolasyon metodunda RNAz enzimi kullanılmadığından öncelikle fare beta-aktin primerleri ile PCR yapıldı. Daha sonra 200 ng HBV-DNA korunmuş Pre S ve S bölgesinden seçilen çift HBV-DNA primeri ile çoğaltıldı.

İlk PCR, kuyruk genomik DNA 20 pm “sense” 5'- TAC CAC AGG CAT TGT GAT GG-3', “anti-sense” 5'- AAT AAT AGT GAT GAC.CTG GCC GT-3' beta-aktin primerleri kullanıldı. Denatürasyon 94°C'de 60 saniye, primer yapışması 57°C'de 60 saniye, uzama 72°C'de 60 saniye olarak 24 döngü ve

son uzama 72°C'de 10 dakika olacak şekilde yapıldı. Daha sonra total genomik DNA 20 pmol "sense" 5'- GAC TCT CTG TAA TGT CAA CGA CC- 3' ve "anti-sense" 5' TTC CCA CCT TAT GAG TCC AG GA-3' primer çifti, 2 mM MgCl₂, 200 µ M dNTP, 200 ng DNA kullanılarak uygulandı. Başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dakika, denatürasyon 95°C'de 30 saniye, primer yapışması 55°C'de 60 saniye, uzama 72°C'de 2 dakika, 24 siklus ve son uzama 72°C'de 7 dakika olacak şekilde yapıldı. 10 µl PCR ürünü elektroforezle analiz edildi ve UV floresan ile görüntüldü^{6,9}.

İntegre HBV-DNA aynı zamanda taşıyıcı farelerde "dot-blot" hibridizasyon metodu ile araştırıldı. Taşıyıcı farelerin 100 µl serum örneklerinden elde edilen viral DNA, STENMBSA (Sükroz, Tris, EDTA, NaCl₂, MgCl₂, BSA) yastık kullanılarak HBV probu ile hibridize edildi¹⁴. Bu amaçla, naylon membrana yüklenen örnekler fikse edildikten sonra (Gene Screen Plus, Dupont). Dig ile işaretli HBV-DNA probu içeren hibridizasyon solüsyonu ile bir gece 42°C'de bekletildi. Noktalar (dot), Dig işaretleme kitinin (Roche) immünolojik saptama protokolü ile belirlendi. Tüm deneylerde negatif ve pozitif kontroller kullanıldı.

Serolojik Analiz: Taşıyıcı hayvanların serumları, ticari kit ile (Abbott Laboratories, USA) taranarak HBV DNA'nın ekspresyon ürünleri saptandı¹⁵. Ancak serum miktarlarının yetersiz olması nedeniyle sadece HBsAg ve HBeAg araştırılabilirdi.

Histolojik Analiz: Taşıyıcı farelerin karaciğer örnekleri %38'lik formaldehit ile bir gece tespit edildikten sonra ardarda etanol banyosundan (%70, %90, %95 ve %100) geçirilerek suyu alındı. Toluende iki kez inkübasyondan sonra bir gece parafinde fikse edildi ve parafine gömülü örnekler 4-6 um kalınlığında kesilerek hematoksilin-eozin (HE) ile boyandı¹⁶.

İmmünohistokimyasal Analiz: Taşıyıcı hayvanların karaciğer kesitlerinde HBsAg yerleşimi, işaretli avidin-biotin saptama yöntemiyle gösterildi. Kısaca, PBS içindeki parafine emdirilmiş kesitler 10 dakika 37°C'de %0.3 hidrojen peroksit ile muamele edildi ve PBS ile yıkandı. Daha sonra kesitler anti-HBs monoklonal antikoru (Primer antiserum, Dako) ile 30 dakika inkübe edildi. Tekrar PBS ile yıkamadan sonra streptavidin-peroksidaz konjugatı ile 10 dakika oda ısısında bekletildi. Peroksidaz aktivitesi 5 dakika diaminobenzidin (DAB; Sigma) ile işleme koyulup hematoksilinle boyandıktan sonra görüntüldü¹⁶. Bu süreç İzmir Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji Laboratuvarı'nda gerçekleştirildi.

İntegre HBV-DNA Molekülünün Ekspresyonu: HBV gen ekspresyonu standart ters transkriptaz PCR (RT-PCR) ile belirlendi¹³. RNA, asidik guanidin/ izotiyosiyonat/fenol/kloroform yöntemi ile taşıyıcı farelerin karaciğer dokularından izole edildi. Yaklaşık 0.5 g karaciğer dokusu küçük parçalara kesildikten sonra denatürasyon solüsyonunda çözüldü; 0.1 hacim 2 M pH: 4.0 NaOH ve ortama suyla doyurulmuş fenol/kloroform/izoamilalkol (49:1) eklendi. 15 dakika buzda inkübasyondan sonra karışım santrifüj edildi ve üst faza izopropanol eklendikten sonra bir gece -20°C'de bekletildi. Santrifüj sonrası

elde edilen pelet tekrar denatürasyon solüsyonu ve izopropanol ile muamele edildi, soğuk etanol ile presipite edildi ve TE tamponda çözöldü. Bu yöntemde kullanılan solüsyonlar bir RNAz inhibitörü olan DEPC içeren su ile hazırlandı. RNA miktarı spektrofotometrik olarak hesaplandı. Formaldehit agaroz jel elektroforezi uygulandı ve RNA örnekleri UV'de görüntölendi. PCR iki adımda yürütöldü; birinci adımda total RNA molekülünden c-DNA elde edildi. Bunun için 125 U ters transkriptaz (RT) enzimi, 20 U RNAz inhibitör, 2 mM MgCl₂, 20 pmol dış HBV'ye özgül "sense" 5'-GAC TCT CTG TAA TGT CAA CGA CC-3' ve "anti-sense" 5'-TTC CCA CCT TAT GAG TCC AAG GA-3' primerleri kullanıldı. İkinci adımda, c-DNA birinci aşamada olduğu gibi RT enzimi ve içte bulunan HBV'ye özgül ikinci "sense" 5'-GGA GGC TGT AGG CAT AAA TTG GT-3' ve "anti-sense" 5'-GGC GAG GGA GTT CTT CTT CTA GGG G-3' kullanılarak gerçekleştirildi. c-DNA sentezinde döngü 42°C'de 30 dakika, başlangıç denatürasyonu 95°C'de 5 dakika, denatürasyon 94°C'de 60 saniye idi. PCR ürünleri UV floresanda analiz edildi.

In situ Hibridizasyon (ISH): Taşıyıcı farelerin karaciğer kesitleri polilizinle kaplı lamlara alındıktan sonra bir gece 56°C'de inkübe edildi^{17,18}. Örnekler parafinlerinden kurtulmak için 3'er kez 15 dakika ksilen ile muamele edildi. Deparafinize edilen kesitler daha sonra dereceli etanol banyolarından ardarda geçirilerek dehidrate edildi ve 3 dakika PBS ile yıkandı. Kesitler sindirim tamponu ile 37°C'de 30 dakika inkübe edildikten sonra tekrar dereceli etanol (%75, %95, %100) banyolarından geçirilip oda ısısında kurutuldu. Herbir kesite 10 µl hibridizasyon tamponu (Digoxigenin Labeling Kit, Roche) eklendi ve 30 dakika 37°C'de nemli ortamda inkübe edildi. İki kez 3 dakika PBS tampon solüsyonunda yıkandıktan sonra kesitlerin tekrar seri etanol banyoları ile suları alındı ve oda ısısında kurutuldu.

Dig ile işareetlenmiş HBV'e özgül probu içeren 10 µl hibridizasyon tamponu eklendi ve lamlar 94°C'de 2 dakika DNA denatürasyonu için ısıtıldı. Nemli ortamda 1 saat inkübe edildi. Daha sonra lamlar kitte belirtildiği gibi yıkama solüsyonu ile yıkandı ve 100 µl blok solüsyonu ile muamele edildi (Dig işaretleme kiti, Roche). Daha sonra ortama 100 µl anti-digoksigenin antikorunu eklendi ve 30 dakika inkübe edildi. Bunu takiben lamlar 3 kez 3 dakika PBS ile yıkandıktan sonra 3 dakika boyama tamponu ile muamele edildi. 100 µl boya solüsyonu nitroblue-tetrazolium (NBT) ile 100 kez sulandırıldıktan sonra lamlar üzerine 5-bromo 4-kloro-indodil-fosfat (BCIP) konuldu ve karanlıkta oda ısısında inkübe edildi. 2-4 saat içinde gerçekleşen renklenmeyi takiben örnekler su ile yıkanarak reaksiyon sonlandırıldı. Lamlar mikroskopta değeriendirildi. Dig işaretleme kiti uygulanırken kit kılavuzu kullanıldı.

BULGULAR

Transgenin Hazırlanması: LB besiyerinde üretilmiş transforme hücrelerden saflaştırılan plazmid DNA'sının miktarı 876 mg/ml, A₂₆₀/A₂₈₀ oranı ise 1.94 olarak belirlenmiştir. Ayrıca %1'lik agaroz jelde yürütölerek UV floresan ile görüntölenmiştir. Saflaştırılmış plazmid DNA örneğinin Hind III ve Sac I

restriksiyon enzimleri ile kesim işlemi sonucu HBV-DNA bandı, agaroz jelden kesilerek alınmış ve saflaştırılmıştır. Bu işlemden sonra HBV-DNA miktarı ve kalitesi belirlenmiş ve 135 ng/μl ve A_{260}/A_{280} oranı:1.9 olarak bulunmuştur (Şekil 1).

Transgenik Manipulasyon: PT HBV 1,3 plazmidinden kesilerek elde edilen saflaştırılmış SacI/HindIII fragmanı, transgenik manipulasyonda transgen olarak kullanılmıştır. 620 embriyo enjekte edilmiş, canlı olan 432 tanesi ise önceden protokolda belirtildiği gibi alıcılara transfer edilmiştir. Süreç sonunda manipule edilmiş embriyolardan 131 fare yavrusu doğmuş, ancak bölgemizdeki deprem sırasında meydana gelen karışıklık nedeniyle 70 tanesi çalışmadan çıkarılmıştır.

Taşıyıcıların Analizi: Fare beta-aktin primerleri ile yapılan PCR’da beklenen büyüklükte band elde edilmiş, PCR ürünlerinin agaroz jelde görüntülenmesi sonunda da 7 taşıyıcı fare bulunmuştur (Şekil 2). Ayrıca “dot-blot” hibridizasyonu ile gerçekleştirilen transgen analizi sonunda da taşıyıcı farelerde noktalar (dot) belirlenmiştir (Şekil 3).

Serolojik Analiz: Taşıyıcı hayvanlardan H₆, H₈, I₁, I₂, I₄, ve I₅ kodlu farelerin serumunda HBsAg ve HBeAg pozitif bulunmuştur.

Histolojik Analiz: Taşıyıcı hayvanların karaciğer doku preparatlarının, normal karaciğer dokusu ile karşılaştırmalı incelemesi sonunda HBV enfeksiyonuna bağlı herhangi bir sitopatolojiye rastlanmamıştır (Şekil 4).

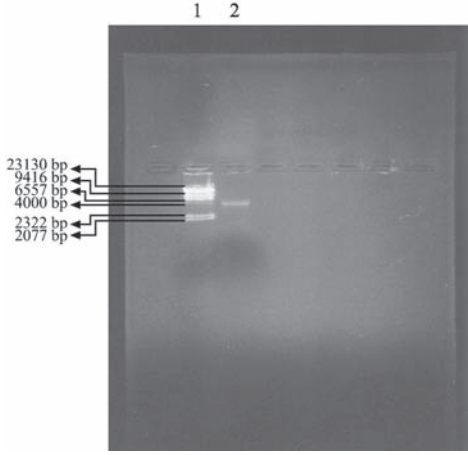
İmmünohistokimyasal Bulgular: HBV S gen ekspresyonu sadece bir transgenik faredede immünohistokimyasal yöntemle belirlenmiştir. HBsAg, DAB ile boyanmış kahverengi partiküller olarak hepatositlerin sitoplazmalarında gösterilmiştir (Şekil 5).

ISH Bulguları: Taşıyıcı farelerin karaciğer kesitlerinde uygulanan ISH sonunda HBV DNA’nın nükleustaki lokalizasyonu Dig ile işaretli HBV’e özgül prob kullanılarak saptanmıştır.

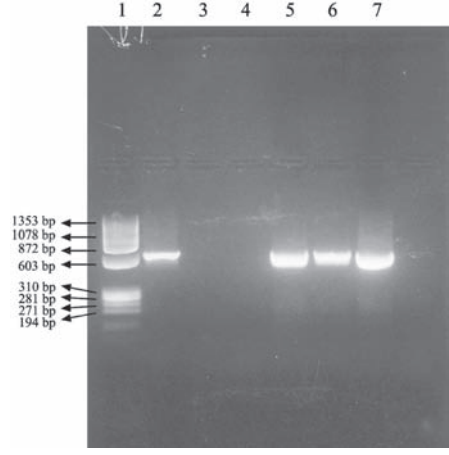
HBV Gen Ekspresyonu: Taşıyıcı farelerde HBV S gen ekspresyonu RT-PCR ile saptanmış ve %2’lik agaroz jelde görüntülenmiştir (Şekil 6).

TARTIŞMA

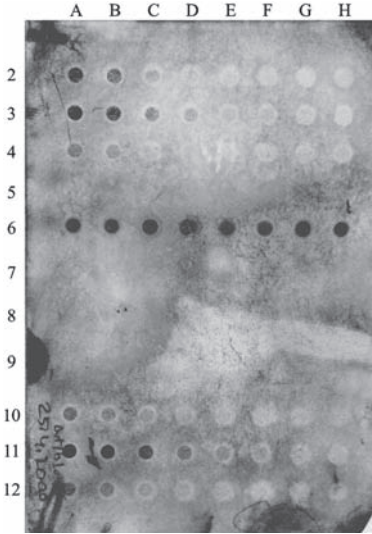
Dünya çapında 300 milyondan fazla kişinin HBV ile kronik olarak enfekte olduğu ve bu kişilerin primer karaciğer kanseri geliştirme riskine sahip oldukları bilinmektedir^{1,19,20}. HBV enfeksiyonlarının immünoopatogenezinin aydınlatılması, bu enfeksiyonların önlenmesi ve tedavisinde büyük öneme sahiptir. Bu amaçla in vivo çalışmalar için hayvan modellerinin geliştirilmesi, yaklaşık 20 yıldan bu yana devam etmektedir. Bu çalışmalarda, “inbred” farelerin döllenmiş yumurtalarına tüm/kısmi HBV genom kopyası mikroenjeksiyon ile aktararak HBV genom ürünlerini eksprese eden ve ayrıca HBV replikasyonunun belirtilerini gösteren farklı HBV transgenik fare soyları elde edilmiştir^{8,9,11}. Transgenik fare modellerinin, HBV’nun biyolojisi, immünobiolojisi ve patogenezi konularında



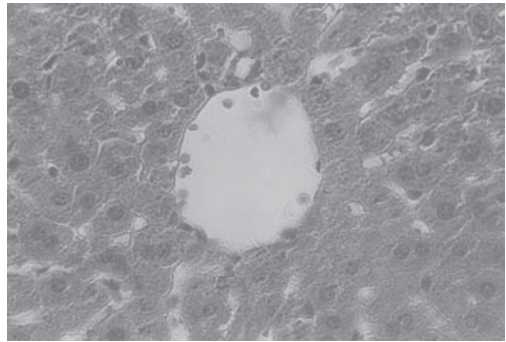
Şekil 1. MBI kiti ile saflaştırılmış HBV DNA'nın agaroz jel elektroforezindeki görüntüsü. 1.sıra: λ DNA/ Hind III belirteci; 2.sıra: 3.2 kb MBI kiti ile agarozdan saflaştırılmış HBV-DNA.



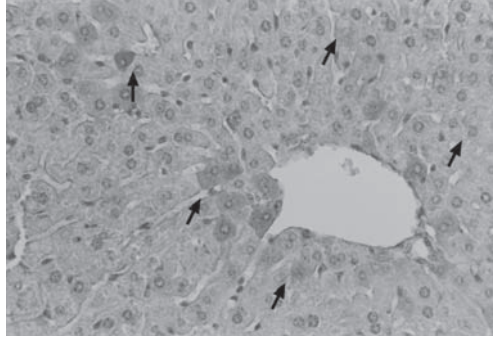
Şekil 2. HBV transgenik farelerin PCR ürünü. 1. sıra: θ X 174/Hae III belirteci; 2. sıra: Pozitif kontrol (HBV pozitif hastadan ekstrakte edilen HBV-DNA); 3.sıra: HBV negatif kontrol; 4.sıra: Boş; 5., 6. ve 7. sıralar: Sırasıyla I_1 , I_4 ve I_5 kodlu HBV-DNA pozitif transgenik farelerin 613 baz çiftlik PCR ürünleri.



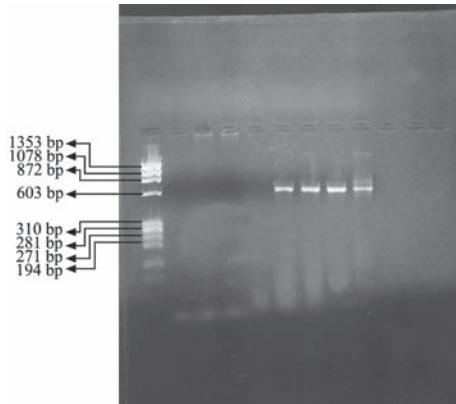
Şekil 3. "Dot-blot" hibridizasyonun immünolojik saptama ile elde edilen görüntüsü. I_1 , I_2 , I_4 ve I_5 kodlu HBV-DNA pozitif olan transgenik farelerden elde edilen pozitif sinyaller görülmektedir (HBV yüzey geninin Pre S korunmuş bölgesinden seçilen dig ile işaretlenmiş prob kullanılmıştır).



Şekil 4. I_4 kodlu HBV taşıyıcısı transgenik farenin karaciğer dokusu. (HE boyama, 400x)



Şekil 5. I₄ kodlu HBV transgenik farenin karaciğer dokusunda immünohistolojik olarak HBsAg saptanması. (Hepatositlerin sitoplazmasında görülen ok ile işaretli koyu kahverengi lekeler HBsAg varlığını göstermektedir; 400x)



Şekil 6. I₁, I₄ ve I₅ kodlu farelerin karaciğer dokularından elde edilen RNA örneklerinin RT-PCR ürünleri. 1.sıra: θ X 174/Hae III belirteci; 2.sıra: Negatif kontrol; 3.sıra: Pozitif kontrol; 4.sıra: Boş; 5., 6. ve 7.sıralar: I₁, I₄, I₅ kodlu farelerin karaciğer dokularından elde edilen RNA örnekleri.

bilgilerimize önemli katkılarda bulunduğu açıktır²¹. Tüm HBV genomunu ya da seçilmiş viral genleri taşıyan çeşitli soylar geliştirilmiş ve HBV replikasyon ve patogeneiz mekanizmalarının ortaya konmasındaki yararları gösterilmiştir. Hatta, son yıllarda sadece viral replikasyon üzerinde değil, aynı zamanda virusun giriş ve virustan temizlenme mekanizmaları konusunda çalışmalara olanak tanıyan yeni, heyecan verici alternatif fare modelleri geliştirilmiştir²².

Transgenik fare modeli, HBV ile indüklenen karaciğer hastalığının immünolojik bir temeli olduğunu ve MHC-I ile sınırlı sitotoksik T lenfositlerinin (CTL) bu süreçte belirleyici rol oynadığını ortaya koymuştur^{22,23}. Sitotoksik T

lenfositlerinin, farelerde fulminant hepatit oluşturacak kadar karaciğer hasarına yol açtığı ifade edilmektedir. Sitia ve arkadaşlarının²³ HBV transgenik fareleri virusa özgül CTL alıcısı olarak kullandıkları çalışmada, polimorfonükleer nötrofillerin ve ürettikleri matriksi degrade eden metalloproteinazların, CTL ile başlatılan karaciğer hasarını artıran antijene özgül olmayan mononükleer hücre toplanmasına neden olduğunu göstermişlerdir²³. Bunun yanı sıra Maier ve arkadaşları²⁴ HBV'e özgül CD8+ T lenfositlerini HBV transgenik farelerine aktarmışlar, antijen tanınmasının antiviral efektör fonksiyonu ve transfer edilen CTL'lerin yerleşimi üzerindeki etkisini incelemişler ve bunların salınımlarının viral eliminasyonu maksimuma çıkardığını, doku hasarını ise minimuma indirdiğini açıklamışlardır. Yine bu çalışmada, HBV transgenik farelerin karaciğerlerinde antijenin kalıcılığına rağmen HBV'e özgül CTL tarafından gama interferonun önce hızla indüklendiği daha sonra ise hızla baskılandığı gösterilmiştir²⁴. Ayrıca apoptoziste rol alan PD-1:PD-L1 gibi inhibitör yolların blokajının, CTL yanıtının bu mekanizma ile baskılandığı olgularda viral kalıcılığı ve kronik enfeksiyonu tersine çevirebildiği öne sürülmüştür²⁴.

Yapılan çalışmalar, HBV X antijenini eksprese eden transgenik farelerde hepatoselüler karsinomanın yüksek oranda görüldüğünü ve bu proteinin hepatokarsinogenezde rolü olabileceğini ifade etmektedir²⁵. Ancak yine de X gen ekspresyonunun karsinogenez açısından yeterli olmadığı ve HCC için başka epigenetik/genetik olayların gerekli olduğu vurgulanmaktadır. Bir başka çalışmada da, tüm HBV genomunu taşıyan transgenik farelerde HBV'nin tek başına yetersiz bir karsinojen olduğu, buna karşın dietilnitrozamine (DEN) gibi bir kanserojen varlığında HCC gelişimini indüklediği bildirilmiştir²⁶. Diğer taraftan Barone ve arkadaşları²⁷ HBV dizilerini taşıyan transgenik fareleri, HBV ile indüklenen HCC'nın moleküler mekanizmasını açıklığa kavuşturmak için model olarak kullanmışlardır. Bu araştırmacıların çalışmaları, HBV ile modüle edilen yeni genlerin tanımlanmasına olanak tanımış ve transgenik fare hepatositlerinde apoptotik sürecin kontrolden çıktığını göstermiştir²⁷.

HBV enfeksiyonu aşılama ile önemli ölçüde engellenebilse de, kronik hepatit için etkin bir tedavi henüz mevcut değildir²⁸. Dolayısıyla hepatit B büyük bir sağlık sorunu olmayı sürdürmektedir ve acilen yeni antiviral stratejilere gerek vardır. Transgenik fare modeli ile yapılan çalışmalar, hepadnavirusların biyolojisini ve patogenezi bir çok yönden açıklığa kavuşturacak ve gelecekte HBV enfeksiyonuna karşı yeni terapötik yaklaşımların geliştirilmesine katkıda bulunacaktır. Nitekim Akbar ve arkadaşlarının²⁹ çalışmasında, dendritik hücre kökenli bir aşı hazırlanmış ve HBV transgenik farelerde tedavi edici potansiyeli değerlendirilmiştir. Bu araştırmacılar, HBsAg ile uyarılan dendritik hücreler yolu ile kronik HBV enfeksiyonu için oldukça etkin bir terapötik aşı geliştirdiklerini bildirmektedirler²⁹.

Sunulan çalışmada, HBV immünopatogenezi çalışmalarında kullanılabilecek tüm HBV genomunu taşıyan HBV taşıyıcısı fare modeli geliştirilmiştir. Elde edilen transgenik farelerde HBV-DNA replikasyonu, ekspresyonu ve gen ürünleri çeşitli yöntemler ile belirlenmiştir. Transgen aktarımı TUBİTAK-MAM Transgen

Laboratuvarı'nda gerçekleştirilmiş, manipülasyon sonrası farelerin yaklaşık %10'unun transgenik oldukları saptanmıştır. Bu oranın düşük olmasında 1999 yılındaki İzmit-Gölcük depreminin etkisi vardır; zira farelerin yarısından fazlası kafeslerin devrilmesi ve farelerin birbirine karışmaları nedeniyle telef olmuştur. Daha sonra gerçekleştirilen ve yayınlanan çalışmamızda da belirtildiği gibi transgenik erkek ve dişi fareler çiftleştirilerek çoğalabilen sürekli bir transgenik homozigot fare soyu elde edilmiştir³⁰. Geliştirdiğimiz bu HBV transgenik fareler, ülkemizde üretilen ilk transgenik fareler olma özelliğini de taşımaktadır. Sonuç olarak, ülkemizde de önemli bir sağlık sorunu olan HBV enfeksiyonlarının ve virusun patogenezi ile ilgili çalışmalarda, ürettiğimiz bu taşıyıcı transgenik farelerin katkısı olacağı inancındayız.

TEŞEKKÜR

Dokuz Eylül Üniversitesi Tıp Fakültesi Patoloji laboratuvarı çalışanlarına ve özellikle HBV antijenlerinin immünohistokimyasal olarak gösterilmesini sağlayan Dr. Erdener Özer'e teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Beasley Y, Chen CS. Hepatocellular carcinoma and hepatitis B virus: a prospective study of 22,707 men in Taiwan. *Lancet* 1981; 2: 1129-33.
2. Vyas GN, Dienstag JL, Hoofnagle JH (eds). *Viral Hepatitis and Liver Disease*, pp: 135-66. 1984. Grune and Stratton Co. New York.
3. Toillais P, Pourcel C, Dejean A. The hepatitis B virus. *Nature* 1985; 317: 489-95.
4. Lee W. Hepatitis B virus infection. *New Engl J Med* 1997; 337: 1733-45.
5. Summers J. Three recently described animal virus models for hepatitis B virus. *Hepatology* 1981; 1: 179-83.
6. Gordon JW. Production of transgenic mice. *Methods Enzymol* 1993; 225: 747-99.
7. Brinster RL, Chen HY, Trumbauer MK, Palmiter RD. Factors influencing frequency production of transgenic mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 1985; 86: 4438- 43.
8. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: insights into the virus and disease. *Hepatology* 1995; 22: 1316- 25.
9. Farza H, Hadchouel M, Scotto J, Toillais P, Babinet C, Pourcell B. Replication and gene expression of hepatitis B virus in a transgenic mouse that contains the complete viral genome. *J Virol* 1988; 62: 4144-52.
10. Larkin J, Clayton M, Sun B, et al. Hepatitis B virus transgenic mouse model of chronic liver disease. *Nat Med* 1999; 5: 907-12.
11. Burk RD, DeLoia JA, Elawady MK, Gearhat JD. Tissue preferential expression of the hepatitis B virus (HBV) surface antigen gene in two lines of HBV transgenic mice. *J Virol* 1988; 62: 649-54.
12. Palmiter RD, Brinster RL. A transgenic mouse model of the chronic hepatitis B surface antigen carrier state. *Science* 1985; 230: 1157-60.
13. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (eds). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. 1989. Cold Spring Harbor Press, New York.
14. Brechot C, Scotto Jacques, CP, Degos F, Trepo C. Detection of hepatitis B virus DNA in liver and serum: a direct appraisal the chronic carrier state. *Lancet* 1981; 2: 765-8.
15. Hoofnagle JH, Schafer DF. Serologic markers of hepatitis B virus infection. *Semin Liver Dis* 1986; 6: 1-10.

16. Özer E, Özer E, Helvacı M, Yaprak I. Hepatic expression of viral antigens, hepatocytic proliferative activity and histologic changes in liver biopsies of children with chronic hepatitis B after interferon-alpha therapy. *Liver* 1999; 19: 369- 74.
17. Blum HE, Haase AT, Haris JD, Walker D, Vyas GN. Asymmetric replication of hepatitis B virus DNA in human liver: demonstration of cytoplasmic minus-strand DNA by blot analysis and in situ hybridization. *Virology* 1984; 139: 87-96.
18. Anderson SM, Brooke PK, Van Eyck SL, Noell H. Distribution of human papillomavirus types in genital lesions from two temporally distinct populations determined by in situ hybridization. *Hum Pathol* 1993; 24: 547-53.
19. Chisari FV. Hepatitis B virus transgenic mice: models of viral immunobiology and pathogenesis, pp: 149-73. In: Chisari FV, Oldstone MBA (eds), *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 1995. Springer-Verlag, Heidelberg.
20. Guidotti LG, Chisari FV. To kill or to cure. Options in host defense against viral infection. *Curr Opin Immunol* 1996; 8: 478-83.
21. Moriyama T, Guilhot S, Klopchin K, et al. Immunobiology and pathogenesis of hepatocellular injury in hepatitis B virus transgenic mice. *Science* 1990; 248: 361-4.
22. Dandri M, Lutgehetmann M, Volz T, Petersen J. Small animal model systems for studying hepatitis B virus replication and pathogenesis. *Semin Liver Dis.* 2006; 26:181-91.
23. Sitia G, Iannacone M, Muller S, Bianchi ME, Guidotti LG. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol* 2007; 81: 100-7.
24. Maier H, Isogawa M, Freeman GJ, Chisari FM. PD-1:PD-L1 interactions contribute to the functional suppression of virus-specific CD8+ T lymphocytes in the liver. *J Immunol* 2007; 178: 2714-20.
25. Yu DY, Moon HB, Son JK, et al. Incidence of hepatocellular carcinoma in transgenic mice expressing the hepatitis B virus X protein. *J Hepatol* 1999; 31: 123-32.
26. Zheng Y, Chen WL, Louie SG, Yen TS, Ou JH. Hepatitis B virus promotes hepatocarcinogenesis in transgenic mice. *Hepatology* 2007; 45: 16-21.
27. Barone M, Spano D, D'Apolito M, et al. Gene expression analysis in HBV transgenic mouse liver: a model to study early events related to hepatocarcinogenesis. *Mol Med* 2006;12: 115-23.
28. Nassal M. Novel molecular approaches toward therapy of chronic hepatitis B. *Arch Virol* 1997; 142: 611-28.
29. Akbar SM, Furukawa S, Hasebe A, Horiike N, Michitaka K, Onji M. Production and efficacy of a dendritic cell-based therapeutic vaccine for murine chronic hepatitis B virus carrierer. *Int J Mol Med* 2004;14: 295-9.
30. Bağış H, Arat S, Mercan HO, et al. Stable transmission and expression of the hepatitis B virus total genome in hybrid transgenic mice until F10 generation. *J Exp Zoolog A Comp Exp Biol* 2006; 305: 420-7.