

JÜRİ VE ENSTİTÜ ONAYI

İbrahim Hatipoğlu'nun "Hepatit B Aşısı Geliştirme ve Hepatit B Aşılarının Etkinliğini Artırmaya Yönelik Yaklaşımlar" başlıklı Biyoloji Anabilim Dalındaki, Doktora Tezi 06.04.2012 tarihinde, aşağıdaki jüri tarafından Anadolu Üniversitesi Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca değerlendirilerek kabul edilmiştir.

	Adı-Soyadı	İmza
Üye (Tez Danışmanı)	: Prof.Dr. Hülya SİVAS
Üye (II. Tez Danışmanı)	: Doç.Dr. Aynur BAŞALP
Üye	: Prof.Dr. Cumhuriyet ÇÖKMÜŞ
Üye	: Doç.Dr. Berrin AYZAZ TÜYLÜ
Üye	: Yard.Doç.Dr. Müge CANER

Anadolu Üniversitesi Fen Bilimleri Enstitüsü Yönetim Kurulu'nun
..... tarih ve sayılı kararıyla onaylanmıştır.

Enstitü Müdürü

ÖZET

Doktora Tezi

HEPATİT B AŞISI GELİŞTİRME ve HEPATİT B AŞILARININ ETKİNLİĞİNİ ARTIRMAYA YÖNELİK YAKLAŞIMLAR

İbrahim HATİPOĞLU

Anadolu Üniversitesi
Fen Bilimleri Enstitüsü
Biyoloji Anabilim Dalı

Danışman : Prof.Dr. Hülya SİVAS
II. Danışman : Doç.Dr. Aynur BAŞALP
2012, 92 sayfa

Hepatit B Virüsü (HBV) enfeksiyonu dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur. Dünya Sağlık Örgütünün verilerine göre dünya nüfusunun üçte biri bu virüs ile enfektedir, yaklaşık 370 milyon kişi ise kronik hepatit B hastasıdır. Aşının ve tedavi edici ilaçların varlığına rağmen HBV enfeksiyonuna bağlı nedenlerden dolayı her yıl yaklaşık olarak 1 milyon kişi ölmektedir. Bu nedenle ucuz ve etkili alternatif yeni nesil aşılar ihtiyacı vardır.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda özellikle hepatit B taşıyıcılarında virüse karşı oluşan immün toleransın kırılması amacıyla yönelik alternatif aşı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. İlk olarak faj gösterim tekniği kullanılarak M13 faj üzerinde hepatit B virüsü yüzey antijenini (HBsAg) eksprese eden rekombinant fajların anti-HBsAg yanıt oluşturmadaki etkisi BALB/c, BALB/cj, kronik hepatit B modeli transgenik (HBV-tg) farelerde ve hibrit (C57BL/6J×BALB/c) farelerde araştırıldı. İkinci çalışmada ise ticari HBV aşısı ve anti-HBsAg monoklonal antikor kullanılarak aşı-antikor kompleksi oluşturuldu ve kompleksin HBV-tg farelerdeki terapötik etkisi araştırıldı. Yapılan son çalışmada ise HBV-tg farelerdeki immün toleransın kırılması için dentritik hücre aşısı denendi. Bu amaçla HBV-tg farelerin kemik iliği hücreleri *in vitro* ortamda dentritik hücrelere farklılaştırıldı. Daha sonra farklılaşan hücreler aşı, aşı-antikor kompleksi veya antikor ile yüklü veya yüksüz olarak HBV-tg farelere immünize edilerek farelerde oluşan terapötik yanıt araştırıldı.

Elde edilen sonuçlarda taşıyıcılarda immün toleransın kırılması için güçlü adjuvanların kullanılması gerektiği ve bireylerin genetik farklılıklarının immün yanıt üzerine etkili olduğu belirlendi. Ayrıca dentritik hücrelerin yüklenmesinde ticari HBV aşılarının uygun olmayacağı tespit edildi.

Anahtar Kelimeler: Hepatit B Virüsü, Aşı-antikor kompleksi, Dentritik Hücre Aşısı, Adjuvan, Faj Gösterim Tekniği

ABSTRACT

Ph. D Dissertation

APPROACHES FOR THE DEVELOPMENT OF HBV VACCINE AND IMPROVEMENT THE EFFECTIVENESS OF HBV VACCINE

Ibrahim HATIPOGLU

Anadolu University
Graduate School of Science
Biology Program

Supervisor : Prof. Dr. Hulya SIVAS
Co-supervisor : Assoc. Prof. Dr. Aynur BASALP
2012, 92 pages

Hepatitis B virus (HBV) infection is a serious health problem all over the world. According to World Health Organization (WHO) one third of the world population have been infected with HBV and 370 million are chronic carriers of HBV. Despite the presence of the HBV vaccine and therapeutic drugs, about 1 million people die each year from HBV related diseases. Therefore, the more effective and cheaper alternative HBV vaccines are necessary.

In this thesis, alternative vaccine studies were performed to overcome the immune tolerance especially in HBV carriers. In the first part of the study, the effect of recombinant phages expressing HBV surface antigens (HBsAg) on anti-HBsAg response was investigated in BALB/c, BALB/cj, HBV transgenic (HBV-tg) and hybrid (C57BL/6J×BALB/c) mice. In the second part of the study, commercial HBV vaccine was complexed with anti-HBsAg monoclonal antibody and its therapeutic effect was investigated in HBV-tg mice. In the last part, dendritic cell vaccine was used to overcome the immune tolerance in HBV-tg mice. For this aim, Dendritic cells were derived from bone marrow *in vitro*. The therapeutic effect of dendritic cells in the presence or absence of HBV vaccine, vaccine-antibody complex was investigated in HBV transgenic mice.

Results have shown that, strong adjuvants should be used to induce immune response in HBV carriers and genetic background is effective on immune response. Our results also indicate that HBV vaccine should not be used for the stimulation of dendritic cells.

Key Words: Hepatitis B Virus, Vaccine-antibody complex, Dendritic Cell Vaccine, Adjuvant, Phage Display Method

TEŞEKKÜR

Doktora öğrenimim boyunca ilgi ve desteğini gördüğüm tez danışmanım hocam Sayın Doç.Dr. Hülya SİVAS'a teşekkür ederim. Yaptığım çalışmaların her basamağında bana rehberlik eden, her zaman daha iyiye ulaşmam için sabırla bana doğru yolu gösteren TÜBİTAK-MAM-GMBE'deki ikinci tez danışmanım hocam Sayın Doç.Dr. Aynur BASALP'e teşekkür ederim.

Yaptığım çalışmalarda yardımlarını esirgemeyen Dr. Deniz DURALI, Dr. Soner AKSU, Dr. Berrin ERDAĞ, Dr. Aylin BAHADIR ÖZDEMİR, Bilim Uzmanı Koray BALCIOĞLU, Şakir SEKMEN ve Gazi TURGUT başta olmak üzere tüm TÜBİTAK-MAM-GMBE çalışanlarına teşekkür ederim.

Ayrıca çalışmalarına desteklerinden dolayı arkadaşlarım Dr. İbrahim SÖĞÜT ve Bilim Uzmanı Duygu ERCAN'a teşekkür ederim

En sıkıntılı zamanlarda bana moral ve umut veren, her zaman desteğini hissettiğim sözlüm Manolya KUKUT'a teşekkür ederim.

Son olarak eğitim hayatım boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi olarak beni destekleyen, bilim ve araştırmanın önemini bilerek hiçbir fedakarlıktan kaçınmayan aileme teşekkür ederim.

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa</u>
ÖZET	i
ABSTRACT	ii
TEŞEKKÜR	iii
İÇİNDEKİLER	iv
ŞEKİLLER DİZİNİ	viii
ÇİZELGER DİZİNİ	xi
SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ	xii
1.GİRİŞ	1
1.1. Hepatit B Virüsü	4
1.1.1. Hepatit B virüsü genel özellikleri	4
1.1.2. HBV patogenezi ve immün yanıt oluşumu	8
1.2. Aşılar ve HBV Aşıları.....	11
1.2.1. Aşı tanımı.....	11
1.2.2. Aşı çeşitleri.....	12
1.3. HBV Aşısı	13
1.4. Adjuvanlar (Aşı taşıyıcıları).....	14
1.5. Faj Gösterim Tekniği ve Yeni Nesil Hepatit B Aşı Çalışmaları.....	16
1.6. Antijen-antikor Kompleksi	17
1.7. Dentritik Hücreler	18
1.7. Dentritik Hücre Aşıları.....	21
2. MATERYAL ve YÖNTEM	24
2.1. Materyal	24
2.1. 1. Cihazlar	24
2.1.2. Kimyasal maddeler.....	24
2.1.3. Tamponlar	25
2.1.4. Besiyeri	26
2.1.5. Rekombinant faj	26
2.1.6. Transgenik HBV (HBV-tg) fareler	27
2.2. YÖNTEM.....	27

2.2.1. Rekombinant faj immünizasyonları	27
2.2.2. Anti-faj monoklonal antikor üretimi	27
2.2.2.1. Füzyon.....	27
2.2.2.2. Monoklonal antikorların geniş ölçekte üretilmesi ve alt tiplendirme deneyi.....	28
2.2.3. Anti-faj monoklonal antikor ile faj kompleks oluşumu ve immünizasyonu	28
2.2.4. HBV-tg farelerde immün toleransın kırılması	29
2.2.4.1. Aşı-antikor kompleksi oluşumu	29
2.2.4.2. ELISA yöntemiyle aşı-antikor immün kompleks oluşumunun kontrolü	29
2.2.4.3. Aşı-antikor kompleksi immünizasyonları	29
2.2.5. Plazma eldesi.....	30
2.2.6. ELISA Yöntemiyle Antikor Yanıtının Tespiti.....	30
2.2.7. ELISA yöntemiyle plazmada antijen değişiminin tespiti.....	30
2.2.8. Dentritik hücre elde edilmesi	31
2.2.9. Dentritik hücrelerin akım sitometri cihazı ile analizi.....	32
2.2.9.1. Dentritik hücre saflığının tespiti.....	32
2.2.9.2. Dentritik hücre olgunlaşmasının tespiti	32
2.2.9.3. CFSE işaretleme.....	32
2.2.10. Dentritik hücrelerin morfolojik analizi	33
2.2.11. Dentritik hücre çalışmasında aşı-antikor kompleksinin oluşturulması	33
2.2.11.1. Anti-HBs monoklonal antikorunun geniş ölçekte üretilmesi ve saflaştırılması	33
2.2.11.2. Aşı-antikor kompleksi.....	34
2.2.12. Dentritik hücreleri yüklemeye kullanılacak HBV aşı miktarının belirlenmesi	34
2.2.12.1. WST-1 canlılık testi	34
2.2.12.2. BrdU bağlanma testi.....	35
2.2.13. Dentritik hücrelerin morfolojik analizi	35
2.2.14. Dentritik hücrelerin immünizasyonu	36

2.2.14. Karaciğer dokularından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi.....	36
2.2.15. HBV S geninin ekspresyon değişiminin RT-qPZR ile tespiti.....	37
2.2.16. IFN- γ salgılanmasındaki değişimin ELISPOT ile tespiti.....	39
2.2.17. İstatistiksel analiz.....	40

3. BULGULAR **41**

3.1. Yüzeyinde HBsAg Eksprese Eden Rekombinant Fajlara Karşı Farelerde Oluşan Antikor Yanıtının İzlenmesi	41
3.1.1. BALB/c farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt	41
3.1.2. Anti-M13 monoklonal antikor üretimi, saflaştırılması ve alt tipinin tayini.....	42
3.1.3. Faj-antikor kompleksi oluşturma çalışmaları.....	44
3.1.4. BALB/j farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt.....	45
3.1.5. HBV transgenik (HBV-tg) fareler ve hibrit farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt.....	46
3.2. Anti-HBsAg Monoklonal Antikorumun Saflaştırılması	48
3.3. Ticari Aşı-anti-HBsAg Monoklonal Antikor Kompleksi ile BALB/c Farelerde Antikor Yanıtının Araştırılması Çalışmaları.....	48
3.3.1. Aşı-antikor kompleksi oluşturulması	48
3.3.2. Aşı-antikor kompleksi immünizasyonları	49
3.4. Dentritik Hücre Aşı Çalışmaları.....	54
3.4.1. Kemik iliği hücrelerinin dentritik hücrelere farklılaştırılması	54
3.4.2. Dentritik hücrelerin morfolojik analizi	55
3.4.3. Dentritik hücrelerinin yüklenmesi için optimum aşı miktarının belirlenmesi	57
3.4.4. Yüklü dentritik hücrelerin olgunlaşmasının tespiti	61
3.4.5. Dentritik hücre aşısının HBV-tg farelerdeki terapötik etkisi	64
3.4.5.1. Anti-HBsAg yanıt	64
3.4.5.2. HBV-tg fare karaciğer dokusunda HBV S gen ekspresyon değişimi	64
3.4.5.3. IFN- γ salgı düzeyindeki değişimin ELISPOT yöntemiyle tespiti.	66
3.4.6. Dentritik hücrelerin ikincil lenfoid organlara göçünün tespiti.....	67

4. TARTIŞMA ve SONUÇ	69
KAYNAKLAR	77

ŞEKİLLER DİZİNİ

1.1. Hepatit B virüsüne ait morfolojik partiküller ve HBV genomu.....	5
1.2. HBV yaşam döngüsü	9
1.3. Hepatit B virüsüne karşı oluşan immüne yanıt	13
1.4. Yaban ve rekombinant M13 faj.....	14
1.5. Dentritik hücrelerin olgunlaşması ve lenf nodlarına göçü	20
1.6. Dentritik hücre aşısı oluşturulmasının basamakları.....	217
3.1. rFaj ve yaban faj ile immünize edilen BALB/c farelerde üçüncü immünizasyonda sonra oluşan immün yanıt.....	42
3.2. 5G12 Monoklonal antikorun diğer antijenlere karşı özgüllüğünün tespiti için yapılan çapraz reaksiyon testi sonuçları	43
3.3. 5G12 Monoklonal antikorun antikor tipinin ELISA ile belirlenmesi	44
3.4. rFaj-antikor kompleksi, rfaj, antikor (MAb), ticari aşısı ve yabana faj (M13) ile yapılan çalışmada üçüncü immünizasyon sonrası elde edilen antikor yanıt sonuçları.....	45
3.5. BALB/cj farelerde rfaj ve yaban faj immünizasyonları sonucunda üçüncü immünizasyon sonrası oluşan immün yanıt.....	46
3.6. rFaj, yaban faj, ticari HBV aşısı ve Freund's adjuvanı-HBsAg ile immünize edilen HBV-tg ve hibrit farelerde üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan anti-HBsAg yanıt.....	47
3.7. rFaj, yaban faj, ticari HBV aşısı ve Freund's adjuvanı-HBsAg ile immünize edilen HBV-tg ve hibrit farelerde dördüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan anti-HBsAg yanıt.....	47
3.8. Anti-HBsAg monoklonal antikorun afinite kromatografi ile saflaştırılması ve antikor içeren fraksiyonların belirlenmesi.....	48
3.9. Aşısı-antikor kompleksinin oluştuğunun ELISA yöntemi ile tespiti.....	49
3.10. HBV-tg ve hibrit farelerin üç farklı oranda (1:1, 1:5, 1:10) bir araya getirilmiş aşısı- antikor kompleksi, aşısı, ve 1µg, 5µg, 10µg antikorlar ile üç kez immünize edildikten sonra oluşan antikor yanıt	50

3.11. HBV-tg farelerin üç farklı oranda (1:1, 1:5, 1:10) bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, veya 1µg, 5µg, 10µg antikorlar ile üç kez immününize edildikten sonra fare plazmasında HBsAg değişimi	50
3.12. HBV-tg ve hibrit farelerin 1:5 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı ve antikor ile üç kez immününize edildikten sonra oluşan antikor yanıt	51
3.13. HBV-tg farelerin 1:5 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, ve antikor ile üç kez immününize edildikten sonra fare plazmasında HBsAg değişimi	51
3.14. HBV-tg fareler 5:1 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, antikor (MAb), Freund's adjuvan (CFA) kompleks immünizasyonu sonucu üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan antikor yanıt.....	52
3.15. HBV-tg fareler 5:1 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, faşı, antikor (MAb), Freund's adjuvan (CFA) kompleks immünizasyonu sonucu üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan antikor yanıt	53
3.16. Üçüncü terapötik immünizasyon çalışmasında, üçüncü immünizasyondan bir ay sonra ticari antijen kullanılan gruplar ve diğer kontrol gruplarındaki antikor yanıt	53
3.17. Üçüncü terapötik immünizasyon çalışmasında, üçüncü immünizasyondan bir ay sonra ticari antijen kullanılan gruplar ve diğer kontrol grupların plazmasındaki HBsAg değişimi	54
3.18. Dentritik hücrelerin akım sitometri cihazı ile analizi.....	55
3.19. Dentritik hücre hematoksilin eozin boyama görüntüleri	56
3.20. İki farklı sayıdaki dentritik hücreler 144 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor veya antikor ile yüklendikten 24 ve 48 saat sonra yüzde canlılık oranları ..	58
3.21. İki farklı sayıdaki dentritik hücreler 28 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor veya 28 ng antikor ile yüklendikten 24 ve 48 saat sonra yüzde canlılık oranları.....	59
3.22. 50×10^3 dentritik hücre 4 saat aşı ve aşı-antikor kompleksi ile yüklendikten sonra hücre canlılıkları	60
3.23. BrdU deneyi sonuçları.....	61

3.24. LPS+CpG, LPS+CpG+Aşı, LPS+CpG+Aşı+MAb ve LPS+CpG+MAb ile yüklü dentritik hücrelerin CD40, CD80 ve CD86 reseptörlerinin farklılaşmasının akım sitometri sonuçları.....	62
3.25. DC aşısı sonucu HBV-tg farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt.....	64
3.26. İkinci set çalışmasında elde edilen RNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri.....	65
3.27. DC aşısı sonucu HBV-tg farelere karaciğerinde oluşan HBsAg ekspresyon değişimi	66
3.28. HBV-tg farelerin dalak hücrelerinde IFN- γ salgılanmasındaki değişim ELISPOT yöntemi ile araştırıldığında elde edilen sonuçlar	67
3.29. DC'lerin dalak ve lenf nodlarına göçünün tespiti	68

ÇİZELGELER DİZİNİ

1.1. HBV genotiplerinin ve HBsAg alt tipleri ve genel coğrafik dağılımı	7
1.2. Türkiye’de ticari olarak satılmakta olan HBV aşıları	14
1.3. Adjuvan türleri	13
2.1. HBs geninin ekspresyon değişiminin tespitinde kullanılan RT-qPZR protokolü ve programı.	39
3.1. Füzyon Tablosu	43
3.2. Yüklü dentritik hücrelerde CD40, CD80 ve CD86 ekspresyon oranları	63

SİMGELER ve KISALTMALAR DİZİNİ

ALT	: Alanin aminotransferaz
Au	: Avustralya
cDC	: Klasik dentritik hücre
CHO	: Çin hamster ovaryum hücre hattı
CFSE	: Karboksifloresein diasetat suksinimidil ester
DC	: Dentritik Hücre
DEPC	: Dietil payrokarbonat
DSÖ	: Dünya Sağlık Örgütü
ELISA	: Enzim bağımlı immün test
FDA	: Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi
GM-CSF	: Granülosit makrofaj koloni uyarıcı faktör
HAT	: Hipoksantin aminopterin timidin
HBcAg	: Hepatit B virüs c antijeni
HBsAg	: Hepatit B virüs e antijeni
HBsAg	: Hepatit B virüs yüzey antijeni
HBxAg	: Hepatit B virüs yüzey antijeni
HBV	: Hepatit B virüs
HBV-tg	: Transgenik kronik hepatit modeli fare
IFN	: İnterferon
IL	: İnterlökin
LHBs	: HBV büyük boy yüzey antijeni
ORF	: Açık okuma çerçevesi
mDC	: Miyeloid dentritik hücre
MDDC	: Monositten türetilmiş dentritik hücreler
MHBs	: HBV orta boy yüzey antijeni
MHCI	: Doku uyumluluk antijeni I
MHCII	: Doku uyumluluk antijeni II
NK	: Doğal öldürücü hücre
PBS	: Fosfat tampon solüsyonu
PD1	: Programlanmış ölüm reseptörü 1

pDC	: Plazmasitoid dentrik hücre
PEG 400	: Polietilen glikol 4000
pNPP	: Para nitrofenil fosfat
RT	: Ters Transkriptaz
SHBs	: HBV küçük yüzey antijeni
Tc	: Sitotoksik T hücresi
Th	: Yardımcı T hücresi
TLR	: Toll benzeri reseptör
TMB	: 3,3',5,5' – tetrametil benzidin
TNF	: Tümör nekrozis faktör
TP	: Terminal protein

1.GİRİŞ

Hepatit B virüs (HBV) akut, fluminat ve kronik enfeksiyona neden olmaktadır. Virüs, parenatal olarak kan ve kan ürünleri, cinsel yolla ve ter, tükürük gibi vücut sıvılarıyla bulaşır. Perinatal olarak anneden çocuğa geçmektedir [1].

Dünya genelinde 2 milyar kişinin HBV ile enfekte olduğu ve 370 milyon kişinin kronik hepatit B hastası olduğu bilinmektedir. Her yıl HBV ve onunla ilişkilendirilmiş hastalıklar yüzünden 1 milyon kişinin öldüğü düşünülmektedir [2]. Kronik HBV yoğunluğu bakımından dünya üç bölgeye ayrılmıştır; 1) % 8 ve üzerinde kronik HBV hastası olan yüksek endemik bölgeler, 2) % 8-2 arası orta endemik bölgeler ve 3) % 2 ve daha düşük yoğunlukta olanlar düşük endemik bölgelerdir. Kuzey Amerika, Kuzey ve Batı Avrupa ve Avusturalya düşük endemik bölgelerdir. Güney ve Batı Asya ve Pasifiğin bir kısmı (Japonya, Avusturalya ve Yeni Zelanda Hariç) yüksek endemik bölgelerdir. Akdeniz Ülkeleri, Rusya, Orta ve Güney Amerika orta dereceli endemik bölgelerdir [3]. Türkiye’de HBV endemisitesi açısından orta derecede endemik bölgede bulunmaktadır. Ülkemizde kronik HBV hasta sayısının yaklaşık olarak 4-4.6 milyon olduğu tespit edilmiştir [4].

HBV ile enfekte olan bireyde virüs 3-4 ay kuluçka evresi geçirmekte olup daha sonra bulantı, ateş ve kusma gibi genel virüs enfeksiyonlarında gözlenen belirtiler oluşmaktadır. Akut hepatit B enfeksiyonunda, HBsAg 6 ay içinde serumdan kaybolur. Bu süre sonunda serumda HBsAg’nin bulunması enfeksiyonun kronikleşme evresine girdiğini belirtmektedir. Yetişkinlerde enfeksiyonun kronikleşme riski % 5 ve daha altındayken, yeni doğanlarda risk % 80-90 aralığındadır [5,6].

Kronik HBV’nin doğal seyri, immün tolerans, immün yanıt ve latent dönem olmak üzere üç döneme ayrılır. İmmün tolerans döneminde, hepatosellüler hasar olmaksızın serumda yüksek konsantrasyonda HBsAg ve HBV DNA yüksek titrede bulunmakla birlikte hastalar HBeAg pozitifler ve alanin aminotransferaz (ALT) düzeyi normal düzeydedir [7]. İmmün yanıt döneminde hastaların çoğunda HBeAg pozitiflik devam etmekte olup HBsAg ve HBV DNA

konsantrasyonlarında düşüş vardır ve ALT düzeyi yüksektir. Latent dönemde ise immun yanıt fazı sonlanmış hastalar HBeAg ve HBV DNA negatif olmasına rağmen HBsAg pozitifdir [8].

HBV enfeksiyonlarının kesin tedavisi yoktur. Günümüzde kronik HBV hastalarının tedavisinde interferonlar ve nükleotid/nükleozid analogları kullanılmaktadır [3,9]. İnterferon olarak konvansiyonel ve pegile IFN alfa 2a kullanılırken, nükleotid analogları olarak ise Amerikan Gıda ve İlaç Dairesi (FDA) tarafından kronik hepatit B tedavisinde onay verilen nükleozid analogları olan lamivudin, adefovir dipivoksil, entekavir, telbivudine ve tenofonvir kullanılmaktadır. İnterferonlar antiviral immünomodulator ve anti proliferatif etkiye sahipken, nükleozid/nükleotid analogları HBV polimerazını etkileyerek virüs çoğalmasını engellerler [10-13]. Ancak tedavi kesildikten sonra hastaların az bir kısmında kalıcı cevap oluştuğundan hastaların büyük bir bölümünde uzun süre kullanılmaktadırlar. Uzun süreli kullanım ise ilaca dirençli HBV mutantların sıklığında artışa ve ilacın etkinliğinin sınırlanmasına neden olmaktadır [14,15]. Bu nedenle kronik HBV tedavisinde yeni ve etkili yöntemlere ihtiyaç vardır. Bu amaçla yapılan alternatif çalışmalarda, kronik HBV hastaları ticari aşılar veya HBsAg-adjuvantın karışımlarıyla kas içi veya oral yoldan aşılanmış ve HBV'ye karşı oluşan immün toleransın kırılması hedeflenmiştir [16-18]. Diğer bir alternatif tedavi yöntemi olarak poliklonal antikolar kullanılarak aşı-antikor kompleksleri oluşturulmuş ve hastalar bu kompleksler ile aşılanmış [19]. DNA aşılarının keşfiyle birlikte, kronik HBV hastalarında bu aşılar denenmeye başlanmıştır [20,21]. Ayrıca son yıllarda RNA girişim teknolojisinin kronik HBV hastalarında kullanılmasını sağlamak üzere *in vitro* ve *in vivo* çalışmalar yapılmaktadır [23,24].

Bu tez, kapsamında özellikle hepatit B taşıyıcılarında daha etkin olabilecek alternatif aşı çalışmaları gerçekleştirilmesi amaçlanmıştır. Çalışmanın birinci bölümünde faj gösterim tekniği kullanılarak oluşturulan rekombinant fajlar (rfaj)'ın antikor yanıt oluşturmadaki etkinliği araştırıldı. Tezin ikinci ve üçüncü bölümünde ise aşı-antikor kompleksi immünizasyonlarının ve dentritik hücre aşısı yönteminin HBV-tg farelerde oluşan immün toleransın kırılması ve terapötik etkisi araştırıldı.

İlk amaca yönelik olarak, TÜBİTAK-GMBE’de TARAL 1007 projesi kapasamında yapılan çalışmada elde edilen rekombinat fajlar (rfaj) kullanılmıştır. rFaj, M13 fajın yüzey proteini olan P3’ün üzerinde faj gösterim tekniği kullanılarak HBsAg’nin gösterilmesiyle oluşturulmuş bakteriofajdır. rFaj dört farklı fare türüne (BALB/c, BALB/cj, Hibrit, HBV-tg) intraperitonel olarak immünize edildi ve falerde oluşan antikor yanıt ELISA yöntemi ile takip edildi. Ayrıca yaban faja karşı monoklonal antikor geliştirilerek, faj-antikor kompleksi oluşturuldu ve bu kompleks BALB/c farelere immünize edilerek farelerde oluşan antikor yanıt ELISA yöntemiyle araştırıldı.

İkinci amaca yönelik olarak ise ilk olarak günümüzde faz çalışmaları başlamış olan antijen-poliklonal antikor kompleksine alternatif olarak aşı-monoklonal antikor kompleks çalışması yapıldı. Bu amaçla farklı konsantrasyonlarda aşı ile monoklonal antikor kompleksi oluşturuldu ve hibrit ve HBV-tg farelere intraperitonel olarak immünize edilerek terapötik etkisi araştırıldı. Kronik hepatit’e karşı yapılan ikinci terapötik yaklaşımda ise dentritik hücreler (DC) aşı-antikor kompleksi ile yüklenerek terapötik etkileri araştırıldı. HBV-tg farenin femur ve tibia’sından elde edilen kemik iliği hücreleri *in vitro* ortamda DC’ye dönüştürüldü ve farklı konsantrasyonda aşı kullanılarak, farklı zaman aralığında aşının optimum dozu belirlendi. DC’ler aşı ile yüklü, aşı-antikor kompleksi ile yüklü, antikorla yüklü veya yüksüz olarak HBV-tg farelere intraperitonel olarak bir hafta ara ile iki kez immünize edildi. HBV-tg farelerde oluşan terapötik immün yanıt, plazmadaki anti-HBsAg artışının tespiti ELISA yöntemiyle araştırıldı. Karaciğerde HBsAg’nin ekspresyon değişimi RT-qPZR ile ve dalak hücrelerindeki IFN- γ salgılanmasındaki değişim ELISPOT yöntemi ile araştırıldı. Ayrıca belirlenen aşı konsantrasyonunun DC üzerinde bulunan farklılaşma reseptörlerine (CD40, CD80, CD86) etkisi araştırıldı. Son olarak DC’lerin fare lenf nodlarına göç ettiğinin belirlenmesi için DC’ler floresin boya ile işaretlenerek akım sitometri cihazında incelendi.

1.1 Hepatit B Virüsü

1.1.1 Hepatit B virüsü genel özellikleri

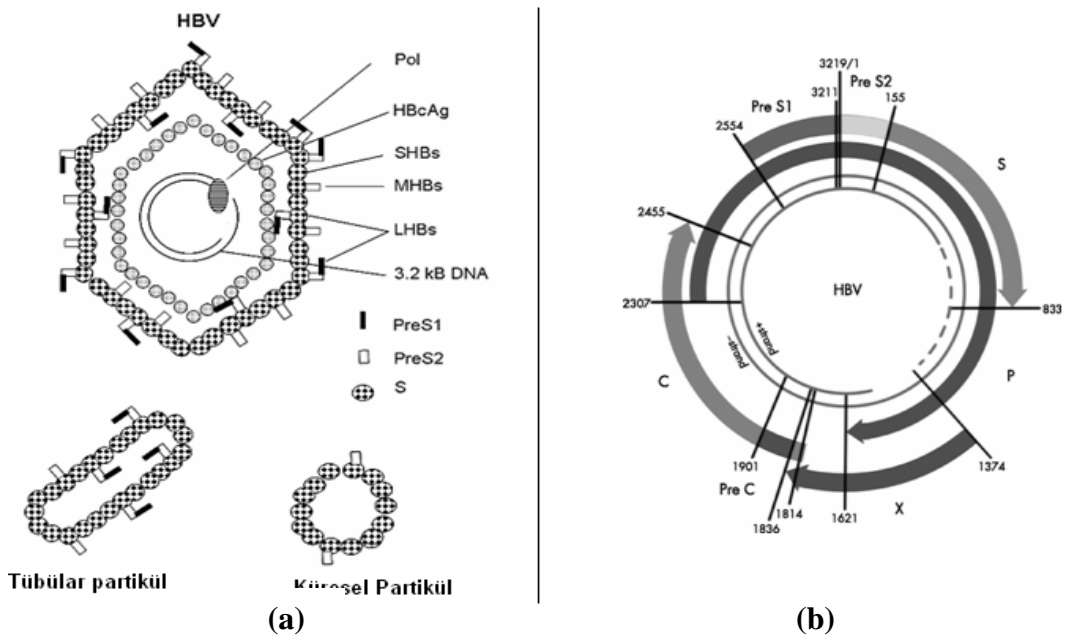
HBV, Hepednaviriade ailesine ait nonsitopatik bir DNA virüsüdür [25]. HBV'ye ait ilk bulgular 1964 yılında, Blumberg ve ark.'nın [26] Avustralyalı yerlilerin serumlarında polimorfik serum proteinleri üzerine yaptıkları çalışmada elde edilmiştir. Avusturalya (Au) antijeni olarak adlandırdıkları antijen ile hepatit B hastalığı arasındaki ilişkiyi ilk kez göstermişlerdir. 1970 yılında ise Dane ve ark. [27] HBV ile enfekte hastaların serumlarında yaptıkları çalışmada, yüzeyinde Au antijenini içeren virüs benzeri yapıları bulmuşlar ve bu yapıların HBV olduğunu belirtmişlerdir.

HBV yapısal olarak incelendiğinde dış kısmında lipoprotein (SHBs, MHBs, LHBs) yapıda zarf bölümü bulunmaktadır. Virüs genomu, kor proteinlerinin (HBcAg) oluşturduğu ikozahedral yapıdaki nükleokapsid içerisinde ters transkriptaz (RT, revers transkriptaz) özelliğinde olan DNA polimeraz (Pol) ile yer almaktadır (Şekil 1.1a) [28,29].

Hepatit B hastalarının kanlarında, HBV tübular, küresel ve Dane partikülü olmak üzere üç farklı morfolojide bulunmaktadır. Tübular ve küresel partikül HBV DNA'sı içermediği için enfekte etme özellikleri yoktur. Tübülür partikül 20 nm çapında olup kandaki konsantrasyonu $10^{12}/\text{ml}$ olarak bulunur. Küre partikül ise 12-25 nm çapında ve kanda $10^{12}/\text{ml}$ konsantrasyonda bulunmaktadır [29,7].

HBV genomu incelendiğinde 3.2 kilo baz (kb)'lık parçalı çift zincirli dairesel DNA yapıda olduğu tespit edilmiştir. HBV genomunda üst üste örtüşen 4 adet açık okuma çerçevesi (ORF) bulunmaktadır. Bu ORF bölgeleri sırasıyla, S (ORF S bölgesi preS1, preS2, S olmak üzere üç kısma ayrılır), P, C (ORF C bölgesi preC, C olmak üzere iki kısma ayrılır), X'dir (Şekil 1.1b) [30]. ORF C, kor antijeni (HBcAg) ve e antijenini (HBeAg) kodlamaktadır. Eğer translasyon C bölgesindeki başlangıç kodonundan başlarsa 183 amino asit (a.a) uzunluğunda 21 kDa ağırlığında olan HBcAg sentezlenir. HBcAg, HBV enfeksiyonu döneminde kanda tespit edilememesine rağmen, karaciğer dokusunda bulunmaktadır. HBcAg

monomerleri bir araya gelerek 30-32 nm çapında nükleokapsit yapısını oluştururlar [7,31]. HBcAg immünojenik bir antijendir ve yüzeyinde yardımcı T hücreleri (Th), sitotoksik T hücreleri (Tc) ve B hücrelerinin uyarılmasını sağlayan epitoplar bulunmaktadır. Bu özelliklerinden dolayı yeni nesil koruyucu ve/veya terapötik aşı geliştirme çalışmalarında kullanılabilceği düşünülmektedir [32-35]. ORF C bölgesinin kodladığı ikinci protein ise hepatit B e antijeni (HBeAg) dir. Translasyon Pre C üzerinde ilk başlama kodunundan başladığında sentezlenen HBeAg antijeni 17 kDa ağırlığında ve 149 a.a. uzunluğundadır [36].



Şekil 1.1. Hepatit B virüsüne ait morfolojik partiküller ve HBV genomu. (a) HBV ile enfekte hastaların kanında Tübüler, Küresel ve Dane partikülü olmak üzere üç farklı morfolojide virüs partikülü bulunur [39] (b) HBV genomu dairesel, parçalı çift zincirlidir ve C, S, P ve X ORF bölgeleri bulunmaktadır [40]

HBeAg, HBcAg ile çok benzer a.a dizisine sahip olmasına rağmen serolojik olarak farklı özelliklere sahiptirler. HBeAg her HBV enfeksiyonunda serumda görülmemesine rağmen, genel olarak viral replikasyonun ve viral enfeksiyonun devam ettiğinin serolojik işareti olarak kabul edilmektedir. Fakat HBeAg'nin asıl fonksiyonu bilinmemesine rağmen immün düzenleyici olarak görevi yaptığı düşünülmektedir. Serumdaki serbest HBeAg doğuştan immün sistem hücreleri

yüzeyinde bulunan Toll benzeri reseptörlerin (TLR) sinyal sistemini etkileyerek immün sistemi baskılamaktadır [37]. Ayrıca Th1 hücrelerini baskılayarak enfeksiyonun kronikleşmesinde rol alırlar. Fakat sitozolik HBeAg'nin immünojen olarak fonksiyonu vardır ve Tc hücreleri için hedef görevi görmektedir [38].

HBV genomundaki ORF P, yaklaşık 830 a.a uzunluğunda P proteinini kodlar [41]. P proteini dört parçadan oluşmaktadır. Bunlar sırasıyla; Polimeraz ve ters transkriptaz özelliğindeki enzim (RT) bölümü, RNaz H aktivitesine sahip bölüm ve P proteininin virüs DNA'sına ve RNA'ya bağlanmasında rol oynayan terminal protein (TP) bölümü ve ayrıca RT kısmı ile TP kısmı arasında bağlantı oluşturan "spacer" olarak adlandırılan ara bölümü bulunmaktadır [41].

ORF X'in kodladığı X antijeni (HBxAg) 154 a.a uzunluğunda ve 17.5 kDa ağırlığındadır. HBV X proteininin fonksiyonu tam olarak bilinmemekle birlikte yapılan çalışmalarda viral replikasyonda rol oynamasının yanında konak hücrenin fonksiyonlarını etkilediği düşünülmektedir [42]. Cheong ve ark. [43] HBV x proteininin transkripsiyon faktörlerine bağlanarak transkripsiyonu etkilediğini göstermişlerdir. Hepatosellüler kanser oluşumunda etkili olduğu ve transaktin kapasitesi sayesinde birçok hücre içi sinyal sistemini de etkilediği düşünülmektedir [44].

ORF S, HBV'nin zarf yapısında bulunan hepatit B virüs yüzey antijenini (HBsAg) kodlar. HBsAg'nin transkripti üzerinde translasyonun başladığı bölgeye bağlı olarak üç farklı büyüklükte yüzey antijeni sentezlenmektedir. Bu antijenlerin moleküler ağırlıkları glikozillenmemiş (P) ve glikozillenmiş (GP) olarak farklılık gösterirler. Küçük (small, SHBs) HBsAg, 226 a.a uzunluğunda ve P 24 kDa, GP 27 kDa ağırlığındadır. Orta (middle, MHBs) HBsAg, SHBs ile 226 a.a paylaşmakta ve N terminal ucunda ek olarak 55 a.a (preS₂) ve P33, GP36 bulunmaktadır. Geniş (Large, LHBs) HBsAg antijeni S ve preS₂ bölgelerine 119 a.a uzunluğunda preS₁ bölgesinin eklenmesiyle oluşmaktadır ve ağırlığı P39 kDa, GP 42 kDa'dur. Genelde HBsAg, SHBs olarak belirtilmektedir [45].

HBsAg partikülü lipoprotein yapıdadır % 75'i protein ve karbohidrattan oluşurken % 25'i lipit yapıdan oluşmaktadır [46]. HBV hastalarının kanlarından saflaştırılan HBsAg'nin a.a dizisi incelendiğinde, hidrofobik amino asitlerin, özellikle triptofanın antijende ağırlı olarak bulunduğu belirlenmiştir. Ayrıca

antijenin en az dört farklı alt tipinin (adr, adw, ayr ve ayw) olduğu ve tüm alt tiplerde “a” determinat bölgesinin (124-147 a.a) sabit olduğu görülür. Alt tipler arasındaki fark 110-190 a.a arasındaki mutasyonlar meydana gelen mutasyonlardan kaynaklanmaktadır. Her alt tip, tanımlanırken “a” belirteç bölgesiyle birlikte d/y ve w(w-1w4)/r belirteçlerinden biriside kullanılmaktadır. Çizelge 1.1’de belirtildiği gibi bazı alt tipler ek olarak q belirteç bölgesine de sahiptirler. “a” bölgesinin tüm alt tiplerde aynı olması sayesinde HBV aşılı tüm alt tiplere karşı koruyucu etki göstermektedir [47,48].

Çizelge 1.1. HBV genotiplerinin ve HBsAg alt tipleri ve genel coğrafik dağılımı

HBV genotip	HBV alt genotip	HBsAg alt tip	Görülme sıklığı	Temel coğrafi dağılım
A	A1	adw2	Yüksek	Avrupa, Kuzey Amerika, Avustralya,
	A2	ayw1, adw2	Yüksek	Afrika
B	B1, B2, B3	adw2	Yüksek	Uzak Doğu
	B4	ayw1	Yüksek	Uzak Doğu
	B2	adw3	Düşük	Uzam Doğu
C	C1, C2, C4	Adr	Yüksek	Uzak Doğu
	C3	adrq-	Yüksek	Yeni Gine, Pasifik
	C1, C2	Ayr	Yüksek	Uzak Doğu
	C1, C3	adw2	Düşük	Uzak Doğu
D	C4	ayw3	Düşük	Uzak Doğu, Pasifik
	D1, D3, D4	ayw2	Yüksek	Doğu Asya, Batı Avrupa, Orda Doğu
	D2, D3	atw2	Yüksek	Dünya genelinde
	Belirlenememiş	adw3	Düşük	Doğu Avrupa, İspanya
	D2	ayw4	Düşük	Doğu Avrupa, İspanya, Amerika Birleşik Devletleri,
E	-	ayw4	Yüksek	Afrika
F	F1, F2	adw4q-	Yüksek	Latin Amerika, Alaska, Pasifik
	F1, F2	ayw4	Düşük	Latin Amerika
G	-	adw2	Düşük	Avrupa, Kuzey Amerika
H	-	ayw4	Düşük	Orta Amerika

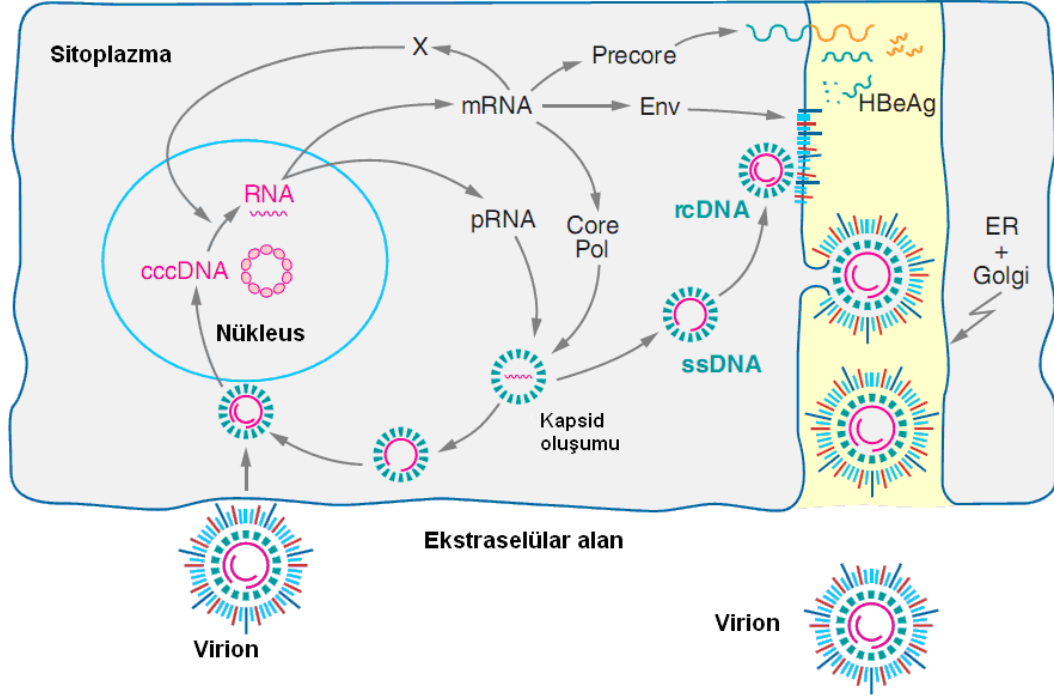
Hepatit B virüsü genomunun replikasyonu esnasında ters transkriptaz aktivitesine sahip DNA polimeraz enzimi kullanır. Bu enzim DNA polimerazdan farklı olarak transkripsiyon esnasında ortaya çıkan nükleotid hatalarını düzeltme özelliğine sahip değildir. Bu nedenle HBV genom replikasyonu esnasında sıklıkla mutasyon oluşmaktadır. HBV genom analizleri yapıldığında sekiz farklı (A-H) HBV genotipi bulunduğu tespit edilmiştir (Çizelge 1.1). Genotip A ve D dünya geneline yaygın olarak bulunmaktadır. Genotip B ve C ise Asya kıtasında yaygın iken Genotip E Batı ve Orta Afrika’da bulunur. Genotip F Alaska, Güney ve Orta Amerika’da bulunmaktadır. Genotip G hakkında elde edilen bilgiler yetersizdir. Türkiye’de ise HBV’nin D genotipinin baskın olduğu tespit edilmiştir [47,49]. Bu genotipler dışında iki genotip daha önerilmiştir. Ancak bu gruplar henüz kabul görmemişlerdir. Ayrıca genotiplerde kendi içlerinde alt gruplara ayrılarak sınıflandırılmıştır [47].

1.1.2. HBV patogenezi ve immün yanıt oluşumu

HBV’nün periferik kan monositlerini ve kemik iliği öncül hücrelerini enfekte ettiği bilinmesine rağmen, enfeksiyonun karaciğer hepatosit hücrelerini enfekte etmesiyle başladığı düşünülmektedir [25]. Virüsün enfekte edeceği hücreye, virüs yüzeyinde bulunan polipeptitler ile hücre zarındaki proteinlere (Örneğin; endoneksin II, IL-6, annexin V, apolipoprotein H proteinleri) bağlanarak girebileceği yapılan çalışmalarda belirtilmiştir [50-52].

Virüs hücreyi enfekte ettikten sonra nükleokapsidi hücre sitoplazmasına salınarak çekirdeğe geçer. Çekirdekte HBV genomundaki pozitif iplikteki eksik nükleotidler tamamlanır ve pozitif ve negatif ipliğin 5' ve 3' uçları birbirine bağlanarak virus genomu plazmid benzeri cccDNA (covalently closed complementer DNA) formunu alır (Şekil 1.2). cccDNA’nın pozitif ipliği kalıp olarak kullanılarak, konak hücrenin RNA polimeraz II enzimi tarafından pregenomik RNA (pg RNA) ve diğer viral mRNA’lar sentezlenir. pgRNA ve diğer mRNA’lar daha sonra sitoplazmaya aktararak viral proteinlerin translasyonu sağlanır. Sitoplazmada RT (revers transkriptaz) enzimi pgRNA’ya bağlanarak kor proteinlerinin nükleokapsit oluşturmasını tetikler. Bu

olgunlaşmamış nükleokapsit içerisinde RT enzimi parçalı çift zincirli virüs DNA'sını sentezler. Bu aşamadan sonra nükleokapsit'in etrafı yüzey antijenleri ile çevrilerek virion oluşur veya cccDNA havuzunu artırmak için nükleokapsit çekirdeğe göç eder [53-55].



Şekil 1.2. HBV'nin yaşam döngüsü. HBV hücre içine geçtikten sonra çekirdeğe göç eder. Çekirdekte parçalı çift zincirli yapıdaki yapıda buluna (+) iplik tamamlanarak cccDNA haline gelir. Daha sonra konak hücre RNA polimerazını kullanarak pgRNA sentezlenir. pgRNA sitoplazmaya göç ederek viral proteinleri için kalıp görevi görür veya tekrar virüs oluşturmak üzere revers transkriptaz özellikteki DNA polimeraz ile bir araya gelerek kor partikülünü oluşması tetiklenir. Kor partikülü daha sonra viron oluşumunun tamamlanması için endoplazmik retikuluma göç eder [25]

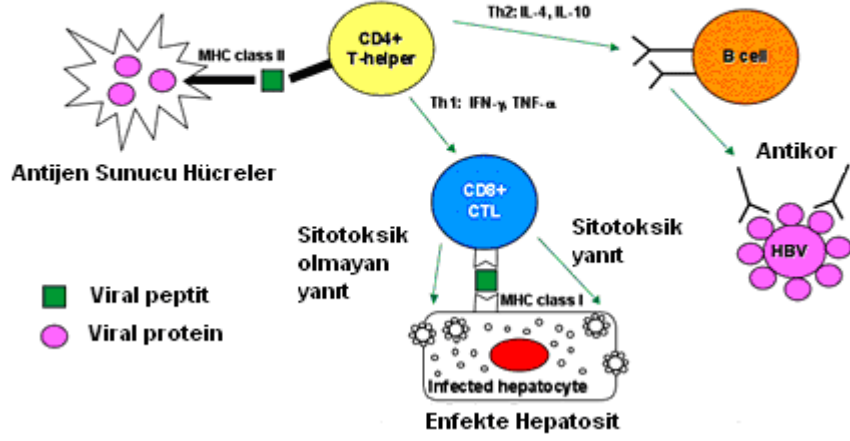
HBV enfeksiyonu ile mücadelede, doğal bağışıklık ve kazanılmış bağışıklık hücreleri birlikte hareket ederek virüsün vücuttan eliminasyonunu sağlarlar. Virüse karşı etkin bir yanıt oluşmadığında ise enfeksiyon kronikleşmektedir [56]. HBV enfeksiyonu esnasında virüse karşı ilk immün yanıt, doğal bağışıklık sisteminin bir elemanı olan doğal öldürücü hücrelerdir (Natural Killer, NK). Bu hücreler interferon gama (IFN- γ) sentezleyerek Th₁ ve Tc hücrelerinin uyarımında rol oynamaktadırlar [57].

Kazanılmış bağışıklık sisteminde ise, dentritik hücreler virüs antijenlerini lenf nodlarında naif T lenfositlerine sunarak Th ve Tc'leri aktive ederler. Th'ler salgıladıkları sitokinler ile Tc ve B lenfositlerin etkin bir immün yanıt oluşturmasını sağlarlar [32]. Th'lerin salgıladıkları interlökinlere örnek olarak, Interlökin-4 (IL-4), Interlökin1- (IL-10), IFN- γ ve tümör nekrozis faktör alfa (TNF α) verilebilir. Tc ise HBV ile enfekte hepatositlerin apoptoza uğramasını sağlarken ayrıca IFN- γ , TNF α gibi anti viral sitokinleri salgırlarlar [33] (Şekil 1.3).

B lenfositler ise HBV'ye özgül antikorlar üreterek savunma sisteminde rol oynarlar. Antikorlar etkilerini üç farklı mekanizma ile gösterirler. İlk olarak, antikorlar patojenlerin hücreye bağlanmalarında rol oynayan reseptörlerin özgül epitoplarna bağlanarak patojenin hücreye bağlanmasını engellerler. İkinci mekanizmada, patojenin reseptöründe farklı bir bölgeye bağlanır ve reseptörün üç boyutlu yapısının bozulmasına sağlayarak hücreye bağlanmasını engellerler. Son mekanizmada ise patojene bağlanarak onun diğer immün sistem hücreleri tarafından fark edilmesini sağlarlar [58,59].

Kronik HBV hastalarında, Tc hücrelerinin etkin bir fonksiyon gösteremedikleri ve çoğalamadıkları tespit edilmiştir [60,61]. T lenfositlerin yüzeyinde bulunan programlanmış ölüm 1 (PD1) inhibitör reseptörünün ekspresyonunda artış, az miktarda sitokin salgılama ve hafıza hücre oluşturmama durumları tespit edilmiştir [62]. Kronik evrenin ilerleyen durumlarında HBV'ye özgül epitoplara sahip T hücrelerinin karaciğer ve periferal kanda bulunmadığı tespit edilmiştir. Proapoptoik protein olan Bim'in ise kronik hastalardaki Tc'lerde ekspresyon düzeyinin arttığı gösterilmiştir [63].

HBV'ye karşı oluşan immün yanıt



Şekil 1.3. Hepatit B virüsüne karşı oluşan immüne yanıt. Virüse ait proteinlerin antijen sunucu hücreler tarafından alınıp işlendikten sonra MHC proteinleri ile birlikte T ve B lenfositlere sunularak virüse karşı immün yanıt oluşması sağlanır [64]

1.2. Aşılar ve HBV Aşıları

1.2.1. Aşı tanımı

Bilimsel olarak ilk aşı uygulaması 18. yy. sonlarında olmasına rağmen ilk aşı uygulamaları daha eski yıllara dayanmaktadır. Çiçek hastalığından korunmada variolasyon çalışmalarının ilk olarak Orta Asya da yapıldığı daha sonra Türkiye, Çin ve Hindistan'a yayıldığı düşünülmektedir [65]. Bilim tarihinde ilk bilimsel aşı çalışması 1796 yılında Edward Jenner tarafından yapılmıştır. Bu çalışmada çiçek (smallpox) hastalığına karşı koruyucu etkisi olan cowpox virüsü ile bireyler aşılanmış ve bağışıklanmış bireylerde aşının koruyucu etkisi tespit edilmiştir [66].

Aşılar koruyucu etkiye sahip oldukları enfeksiyon ajanına göre farklı özelliklere sahip olabilirler. Örneğin; hücre dışı patojenlere karşı koruma sağlayacak olan aşılar humoral immün yanıtı tetikleyerek etkin bir antikor yanıt oluşturmalıdır. Hücre içi patojene karşı geliştirilen aşıların ise Tc lenfositleri uyarması gerekmektedir. Fakat tüm aşılar genel olarak koruyucu ve uzun süreli immün yanıt oluşturmalı, toksik olmamalı, maliyeti düşük olmalı ve etkin bir koruyucu immün yanıt için gerekli immünizasyon sayısı az olmalıdır [67].

1.2.2. Aşı çeşitleri

Ticari olarak satılmakta olan aşılar, temel olarak üç bölüme ayrılır. Bunlar; canlı veya zayıflatılmış aşılar, ölü aşılar ve subunit aşılardır [68].

Canlı aşılar, aşının içeriğinde bulunan patojen ölü halde bulunmamaktadır ve temel olarak iki farklı yöntem ile geliştirilmektedirler. Bunlar; 1- Edward Jenner tarafından geliştirilen yöntem: Hastalıklara neden olan patojen yerine hastalığa neden olmayan, fakat hastalık etkeni patojene karşı etkin bir koruyucu immün yanıt oluşmasına neden olan mikroorganizmanın kullanılmasıdır. Bu yöntem ilk kez çiçek hastalığına karşı korunmada kullanılmıştır. 2- Çocuk felci, kızamık, sarıhumma gibi aşılarında olduğu gibi doku kültüründe veya hayvan konaklarında pasaj yapılarak virülansı düşük fakat immünitenesi yüksek virüs elde edilerek yapılır. Ayrıca düşük sıcaklık veya 37°C'nin üzerinde mikroorganizmaların geliştirilerek bu şartlara uyumlu mutantların oluşturulmasına dayanmaktadır [68].

Ölü aşılar (İnaktive aşılar), enfeksiyona neden olan mikroorganizmaların sıcaklık, radyasyon veya kimyasallar kullanılarak öldürülmesi veya etkisiz hale getirilmesiyle elde edilen aşılar. Canlı aşılar göre daha güvenilir ve yüksek dozda ve daha sık yapılabilir ve etkin bir immün yanıt oluşturur. Ölü aşılar, Hepatit A, Kuduz ve Grip aşısı örnek olarak verilebilir [68].

Subunit aşılar, enfeksiyon ajanına ait bir antijeni veya bu antijene ait epitopu içeren aşılar. Subunit aşılar kullanılan enfeksiyon ajanına ait antijenler rekombinant DNA teknolojisi kullanılarak veya ajandan saflaştırılarak elde edilir. Subunit aşılar ise hepatit B aşısı örnek olarak verilebilir [68].

Canlı aşılar diğer iki aşı alt tipine göre daha etkili koruyucu etkiye sahiptir. Canlı aşının sahip olduğu aşılar Tc yanıt oluştururken, ölü ve subunit aşılarıdaki antijenler endositoz ile alındıkları için sadece humoral immün yanıt oluştururlar. Fakat canlı aşılarıdaki zayıflatılmış patojenler vücutta tekrar mutasyon geçirerek zararlı forma dönüşebilirler. Diğer bir dezavantajları ise immün yetmezliği olan bireyler bu canlı patojeni etkisiz hale getirecek immün yanıtı oluşturamadıkları için patojenin zararlı etkisi ile karşı karşıya kalabilirler [67, 68]. Fakat ticari

olarak satılmasalarda hala deneme aşamasında olan diğer aşı tipleri vardır. Bunlar DNA, Vektör, anti-idyotip ve yenilebilir aşılardır.

1.3. HBV Aşısı

Yaklaşık otuz yıldır dünya genelinde kullanılmakta olan Hepatit B aşısı en yaygın kullanılan koruyucu aşılar arasında bulunmaktadır. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) tarafından 1992 yılından itibaren tüm yeni doğanlarda uygulanması önerilmiştir [44]. Türkiye’de aşının yeni doğanlarda uygulanmasına ise 1998 yılında başlanmıştır [69].

HBV’ye karşı aşı geliştirme çalışmaları HBsAg’ye karşı oluşan antikorun virüse karşı koruyucu etkiye sahip olduğunun tespitinden sonra başlamıştır. Blumberg ve ark. 1969 yılında HBsAg’yi hepatit B taşıyıcılarının plazmasından saflaştırarak HBV enfeksiyonuna karşı koruyucu etkisini göstermişler ve antijeni saflaştırma yöntemleri için patentini 1972 yılında almışlardır. Fakat faz çalışmalarının yapılması ve ticari olarak satılmaya başlanması 1982 yılına kadar sürmüştür [70].

Taşıyıcıların plazmalarından saflaştırılan HBsAg ile hazırlanan bu aşılar ilk nesil aşılar olarak adlandırılmaktadır [71, 72]. Moleküler Biyolojideki gelişmeler ve Rekombinant DNA teknolojisi yöntemi sayesinde HBsAg’ye ait gen mayalarda klonlanmış ve mayalarda sentezlenen HBsAg saflaştırılarak hepatit B aşılarında kullanılmıştır. Bu yöntem ile hazırlanan aşılar ikinci nesil aşılar olarak adlandırılmaktadır. İkinci nesil aşılar birinci nesil aşılarla göre daha güvenlidir. Çünkü birinci nesil aşılarla kullanılan HBsAg plazmadan saflaştırıldığında sterilizasyon için filtreden geçirilse de HIV kontaminasyonu içerebilir [72,73]. İkinci nesil aşılarıdaki HBsAg’de enfekte formda bulunan glikolizlenme olmamaktadır. Bu nedenle üçüncü nesil aşılarında, memeli hücre hattı olan (CHO)’larına klonlanmış S geni ürünü glikolizlemiş HBsAg kullanılmaktadır [72,74]. *In vitro* ortamda çoğaltılan memeli hücre hattı HBsAg’yi hücre kültür ortamına salgılamaktadır ve antijen bu ortamdan saflaştırılmaktadır. İkinci nesil aşılarında ise HBsAg maya hücreleri içinde bulunmakta ve mayalar mekanik veya kimyasal yolla parçalandıktan sonra HBsAg saflaştırılmaktadır. Mayaların

parçalanma işleminin HBsAg'nin kalitesinin bozulmasına neden olabileceği düşünüldüğünden dolayı bu durum üçüncü nesil aşılardan ikinci nesil aşılara göre glikolizlenmeden sonraki diğer bir avantajı olarak kabul edilmektedir [72,75]. Kendi içlerinde belirli avantajları ve dezavantajları olmasına rağmen her üç nesil hepatit B aşısının koruyuculuğu yetişkinlerde yaklaşık olarak % 95'tir [72]. Türkiyede sadece ikinci nesil ve üçüncü nesil aşılar kullanılmaktadır (Çizelge 1.2).

Çizelge 1.2. Türkiye'de ticari olarak satılmakta olan HBV aşıları [69]

Türkiyedeki HBV Aşıları		
Ticari İsmi	Kaynak	Doz
Engerix-B	SHBs, HBsAg (Maya)	HBsAg, 10-20 µg/doz
Euvax B	SHBs, HBsAg (Maya)	HBsAg, 10-20 µg/doz
H-B-Vax II	SHBs, HBsAg (Maya)	HBsAg, 2.5-10-40 µg/doz
Genhevac-B	SHBs, MHBs (CHO)	HBsAg, pre-S ₂ , 20 µg/doz

Hepatit B aşılarının koruyuculuğunun yüksek olmasına rağmen diyaliz hastalarında, obezlerde, yaşlılarda, ileri derecede karaciğer rahatsızlığı geçirenlerde ve immün yetmezliği olan bireylerde etkin değildir. Gelişmekte olan ülkeler için hepatit B aşısının maliyeti hala yüksektir. Üç doz aşının uygulanmasından sonra koruyucu bağışıklığın oluşması nedeniyle, tek dozda etkili yeni nesil hepatit B aşılara ihtiyaç vardır [72,76].

Yeni hepatit B aşı çalışmaları arasında, DNA aşıları, anti-idyotip aşılar, yenilebilir aşılar, oral aşılar ve faj gösterim yoluyla gerçekleştirilen aşı çalışmaları örnek olarak verilebilir [62,77-81].

1.4. Adjuvanlar (Aşı taşıyıcıları)

Bazı antijenler tek başına kullanıldığında immün yanıt oluşturacak yeteneğe sahip değildir. Bu nedenle etkin bir immün yanıt için adjuvan olarak adlandırılan maddelerle birlikte canlılara verilmeleri gerekmektedir. Adjuvan kelimesi Latince yardım anlamına gelen *adjuvare* kelimesinden gelmektedir. İlk adjuvanlar 1925 yılında Ramon tarafından yapılan çalışmalarda tespit edilmiştir

[82]. 1926 yılında Gleany ve ark. [83] difteri toksinlerinin alüminyum ile birlikte Gine domuzlarına enjekte edildiğinde oluşan koruyucu etkilerinin sadece toksoid immünize edilenlere göre daha fazla olduğunu tespit etmişlerdir [83]. Alüminyum hidroksit tuzları Amerika Birleşik Devletleri (ABD) tarafından onaylanan tek adjuvandır. Avrupa’da ise alüminyum hidroksit tuzlarının yanı sıra MF59’da kullanılmaktadır [84,85].

Adjuvanlar fiziksel yapılarına göre Çizelge 1.3’te belirtildiği gibi en az altı başlık altında incelenebilir [82]. Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda ise ticari HBV aşılarında adjuvant olarak kullanıldığı için alüminyum hidroksit adjuvanının etki mekanizması hakkında ayrıntılı bilgi verilecektir.

Çizelge 1.3. Adjuvan türleri

Adjuvan Grupları	Örnek Adjuvanlar
1- Mineral tuzları	Alüminyum tuzları, kalsiyum fosfat jel
2- Bakteriyal veya bitki’den elde edilen yapısal türevleri	Complete Freud’s adjuvanmonofosforil lipid A
3- Yüzey aktif ajanlar ve mikro partiküller	Sponin, immün uyarıcı kompleks (ISCOM)
4- Polimerler	Dextran, çift zincirli polinükleotidler (Poly rA:Poly rU)
5- Sitokin, vitamin ve hormonlar	GM-CSF, IFN α , IFN γ , IL-2, IL-6, IL-12, vitamin A, vitamin E, İnsan büyüme hormonu
6- Sentetik bileşikler	Imidazol-quinolines, peptit bağlı T ve B lenfosit epitopları

1926 yılından itibaren aşılarda kullanılmakta olan alüminyum hidroksit adjuvanının etki mekanizması üzerinde hala kesin görüşler bulunmamaktadır. Fakat adjuvanın etkileri üzerine çalışmalar yapılmasına devam edilmekte ve bu çalışmalardan oluşan derlemeler adjuvan’ın etki mekanizmaları hakkında bilgi birikimini artırmaktadır [86,87]. Önceleri alüminyum adjuvanların depo etkisinin olduğu ve antijeni tutarak yavaş yavaş salınmasını sağladığı düşünülmekteydi [83]. Ancak daha sonra yapılan çalışmalarda alüminyum adjuvantların depo etkilerinin olmadığı belirtilmiştir [88]. Diğer bir *in vivo* çalışmada ise adjuvanın verildiği noktaya nötrofillerin, eozinofillerin ve dentritik

hücre alt tiplerinin göç ettiği gösterilmiştir [89]. *In vitro* yapılan çalışmalarda, periferik kan mono nükleer hücreler (PBMC) alüminyum hidroksit adjuvanı ile inkübe edildiğinde MHCII, CD40 ve CD86 ekspresyon düzeyini artırdığı belirtilmiştir [90]. Dentritik hücreler üzerine etkileri araştırıldığında eş uyaran sentezinin değişmediğini belirten çalışmaların [91] yanında sadece CD86 ekspresyon düzeyini artırdığını belirten açıklamalar da bulunmaktadır [92]. Hem ve ark. [93] nın yaptığı çalışmada ise alüminyum adjuvanı ile kompleks haldeki antijenlerin dentritik hücreler tarafından fagositoz veya makropinositoz ile hücre içine alındığını belirtilmektedir. Yakın bir zamanda Shi ve ark. [94] tarafından yapılan çalışmada ise alüminyum adjuvanının antijen sunucu hücrelerden sadece dentritik hücrelerin zarındaki lipitlere tutularak hücre içine alındığını ve Th hücrelerine afiniteleri olduğunu gösterilmiştir.

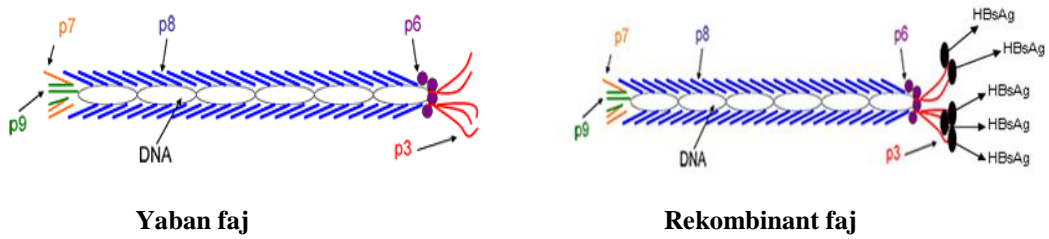
1.5. Faj Gösterim Tekniği ve Yeni Nesil Hepatit B Aşı Çalışmaları

Baktriofaj veya kısa adıyla fajlar sadece bakterileri enfekte etme özelliğine sahip virüslerdir [95]. Faj gösterim yöntemiyle, fajın yüzeyinde polipeptitler veya proteinler gösterilebilir. Bu teknik ilk kez 1985 yılında Simith ve ark. nın yaptığı çalışmada kullanılmıştır [96]. Faj gösterim yönteminde iki sistem kullanılmaktadır. İlk sistemde faj yüzeyinde gösterilmek istenilen protein veya polipeptidi kodlayan DNA dizisi faj genomuna klonlanır. Bu şekilde rekombinant faj çoğalırken yüzeyinde istenilen polipeptit ve proteini de taşımaktadır. İkinci sistemde ise fajemid olarak adlandırılan plazmidler kullanılmaktadır. Fajemidler fajın çoğalması için gerekli olan orijin bölgesini ve yüzeyde gösterilmesi istenilen polipeptidin nükleotid sekansı bulunan yüzey proteinini taşımaktadır. Fakat bu sistemde faja ait diğer proteinleri üreten yardımcı faja (hepler faj) ihtiyaç vardır [97]. Yardımcı fajın ürettiği tüm proteinler rekombinant fajın üretilmesi için kullanılır. Yardımcı fajın orijin bölgesinde mutasyon olduğu için çoğalması rekombinant faja göre 1/1000 oranında azaltılabilir. Bu mutasyon sayesinde her iki faj da bakteride çoğalır, ancak rekombinant faj daha fazla olduğu için yardımcı faj göz ardı edilebilir [97].

Fajlar hızlı ve ucuz çoğaltılması, doğuştan ve kazanılmış bağışıklık sistemini uyarması nedeniyle uygun bir aşı taşıyıcı olarak düşünülmüştür. Faj yüzeyinde gösterilen antijenlerin antikor yanıt oluşturduğu çeşitli çalışmalarla gösterilmiştir [98-100].

Faj gösterim tekniği aşı ve antikor üretim çalışmalarında kullanılmaktadır. İlk kez TÜBİTAK-MAM-GMBE’de TARAL 1007 projesinde yaptığımız çalışmalarda M13 faj yüzeyinde HBcAg antijeni gösterilmiş ve bu faj ile HBcAg’ye karşı monoklonal antikor elde edilmiştir [98].

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda M13 faj HBsAg için aşı taşıyıcısı yapı olarak kullanılmıştır. M13 faj tek iplikli DNA’ya sahiptir ve yüzeyinde 5 adet P3 proteini ve 2700 adet P8 proteini bulunmaktadır (Şekil 1.4) [101]. Bu yöntem kullanılarak yapılan HBV aşı geliştirme çalışmalarında HBsAg’ye ait değişik epitop bölgeleri (10-12 a.a uzunluğunda), M13 fajların yüzeyinde bulunan P8 proteinlerinde gösterilmiştir [102].



Şekil 1.4. Yaban ve rekombinant M13 faj. Rekombinant fajın PIII proteini üzerinde HBsAg’nin lokalizasyon modeli [103]

1.6. Antijen-antikor Kompleksi

Antijen-antikor kompleksi ile yapılan immünizasyonlar sonucunda antijenlere karşı daha etkin bir immün yanıt olduğu gösterilmiştir [104]. Antijen-antikor kompleksindeki antikorun Fc bölümünün, antijen sunucu hücreler (APC) yüzeyinde bulunan Fc reseptörlerine bağlanarak antijenin hücre içine girmesini kolaylaştırdığı ve böylece antijen sunum mekanizmasını ve APC ile T lenfositleri arasındaki etkileşimi arttırdığı gösterilmiştir [105].

Kronik hepatit B tedavisinde kullanılmak üzere HBsAg-antikor kompleksi ile uzun yıllardır HBV transgenik (HBV-tg) farelerde ve insanlarda çalışmalar yapılmaktadır. Bu çalışmalarda, hepatit B taşıyıcılarının serumundan saflaştırılan veya mayadan saflaştırılan rekombinant HBsAg ile insan veya fare poliklonal antikorları bir araya getirilerek antijen-antikor kompleksi oluşturulmaktadır. Elde edilen sonuçlarda, insanlarda ve HBV-tg fare serumlarında HBsAg düzeyinin düştüğü, HBsAg'ye karşı antikor oluştuğu ve IFN- γ sentezinin arttığı tespit edilmiştir [106-110]. Wen ve ark. [111] 60 μ g HBsAg-anti-HBsAg kompleksi kullanarak yaptıkları Faz IIB düzeyindeki çalışmada, kronik Hepatit B hastalarının % 23.1'de HBeAg'nin kaybolduğunu ve % 21.8'inde ise anti-HBeAg oluştuğu bildirilmiştir [111]. Bu sonuçlar antijen-antikor kompleksi çalışmalarının hepatit B taşıyıcılarında etkin bir aşı yöntemi oluşturmak açısından umut verici olduğunu belirtmektedir.

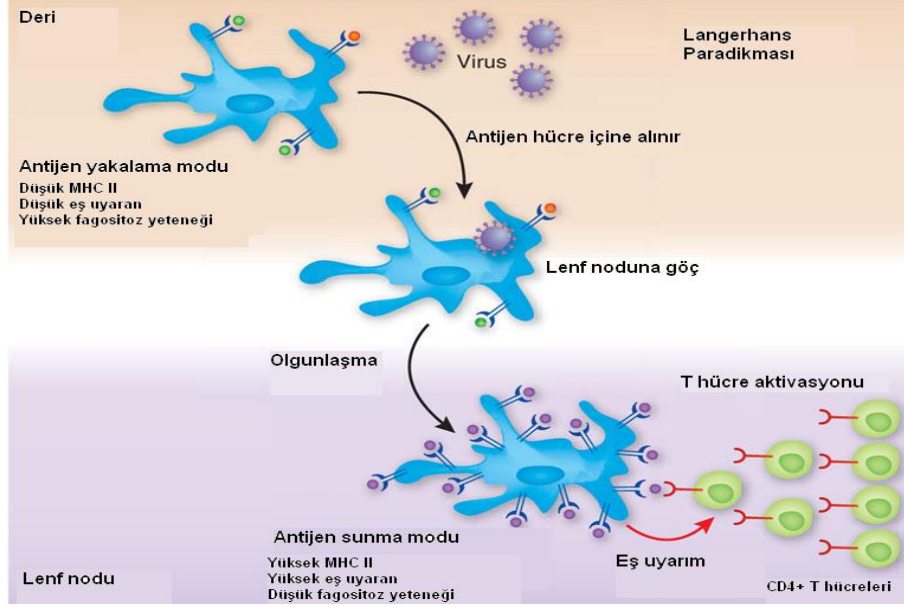
1.7. Dentritik Hücreler

Dentritik hücreler (DC) ilk kez 1868 yılında Paul Langerhans tarafından bulunmuştur ve morfolojilerinin sinir hücrelerinin dentritlerine benzemesinden dolayı bu isim verilmiştir [112]. Daha sonra 1973'te Stainman ve ark.'nın [113] yaptığı çalışmalarda DC'lerin immün sistemin hücrelerinden biri olduğu belirlenmiştir.

DC'ler, makrofajlar ve B lenfositlerle birlikte profesyonel antijen sunucu hücrelerdir. Vücutta bulunan çoğu hücrenin antijen sunma özeliği varken sadece profesyonel antijen sunucu hücreler T ve B lenfositlerini uyarma özelliğine sahiptirler. Endojenik antijenler sitozolde peptitlere parçalanır ve major doku uygunluk kompleksi (MHC) I'e bağlanarak birlikte hücre yüzeyinde gösterilirler. Böylece sitotoksik T (Tc, CD8+ T hücre) hücrelerini uyarırlar. Ekzojenik antijenler ise endositik yolak ile peptitlere parçalandıktan sonra MHC-II molekülü ile birlikte hücre yüzeyinde yardımcı T hücrelerine (Th, CD4+ T hücre) sunulurlar [114]. Ayrıca yapılan çalışmalarda, dentritik hücrelerin ve makrofajların ekzojenik antijenleri de MHC-I kompleksi ile birlikte sunabilme (çapraz sunum) özelliğine sahip olduğu tespit edilmiştir [115]. DC'ler diğer antijen sunucu

hücrelere göre 10-100 kat daha fazla naif ve hafıza T hücrelerini uyarma yeteneğine sahiptir [116]. DC'lerin ayrıca B hücrelerini uyarma ve salgıladığı antikör alt tipinin farklılaşmasını etkileme özelliği de bulunmaktadır [117]. Doğuştan immün sistemin hücrelerinden olan dentritik hücreler birçok dokuda (dalak, deri, kan, karaciğer, akciğer, böbrek, beyin, testis vb.) ve dokular arası alanda bulunmaktadır. Gelişimi olgunlaşmamış (immature) ve olgun (mature) olmak üzere ikiye ayrılmaktadır. Olgunlaşmamış hücrelerin antijeni tutma ve fagositoz yeteneği yüksektir ve interleokün (IL)-10 sentezlerler. Ancak T hücrelerini uyarma yetenekleri yoktur. Ayrıca CD40, CD54 ve CD86 gibi T hücre uyarımında gerekli olan aksesuar reseptörlerin sentez düzeyleri düşüktür. Antijenin hücre içine alınması ve hücre yüzeyinde sunulması ile birlikte DC'ler lenf nodlarında T hücre bölgesine doğru göç etmeye ve olgunlaşmaya başlamaktadırlar. Olgun dentritik hücreler yüksek seviyede IL-12 sentezlerler ve aynı zamanda T hücreleri ile etkileşimi sağlamak ve sinyal iletimini artırmak üzere CD58, CD54, CD86 reseptörlerini ve eş uyarıcılar gibi birçok molekülü sentezlemektedirler [114,118,119].

Patojen veya antijen ile karşılaşan olgunlaşmamış DC'ler, fagositoz ve makropinositoz ile hedeflerini hücre içine alarak antijen işleme ve sunma olarak adlandırılan bir dizi işleme başlar. Bu işlemlerde antijenler peptitlerine parçalanmakta, MHC proteinleri ile birlikte hücre yüzeyinde sunulmakta ve olgun hale gelmektedirler. Ayrıca DC'ler antijeni hücre içine aldıktan sonra naif T hücrelerini uyarmak üzere lenf nodlarına göç etmektedirler (Şekil 1.5) [120]. DC'ler lenf nodlarında T hücre bölgesinde MHC reseptörü ile birlikte sunduğu antijene ait epitopu taşıyan naif T hücresi ile etkileşime girerek onu aktive etmektedirler. Bu etkileşim esnasında DC'deki MHC reseptörü, T hücresindeki T hücre reseptörüne (TCR) bağlanmaktadır. Aynı zamanda DC'de bulunan CD80/86 ve CD40L eş uyarıcıları T hücre yüzeyinde bulunan CD28 ve CD40 reseptörleri ile etkileşerek T hücresinin aktive olmasına neden olur. Tc'ler aktive olduktan sonra bölünürler ve enfeksiyon bölgesine giderek enfekte hücrelerin sitotoksik veya sitotoksik olmayan yol ile apoptoz girmesini sağlamaktadırlar. Eğer Th'ler aktive olurlar ise hem B hemde Tc hücrelerini etkileyerek patojene karşı etkin bir immün yanıt oluşmasını sağlamaktadırlar [120,121].



Şekil 1.5. Dendritik hücreler periferel dokularda olgunlaşmamış olarak bulunurlar. Patojeni fagosite ettikten sonra hem olgunlaşmaya başlar hem de patojeni naif T hücrelerine tanıtmak üzere lenf noduna göç ederler [120]

DC genel olarak köken aldıkları hücre kaynağına ve yüzey antijenlerine göre plazmasitoid dendritik hücre (pDC) ve klasik/miyeloid (cDC/mDC) cDC olmak üzere iki ayrılmaktadırlar. pDC'ler $CD11c^{int} CD11b^{-} B220^{+}$ hücre yüzey reseptörlerini taşımaktadırlar. pDC'ler virüs tip-I interferonları üretirler ($IFN-\alpha$, $IFN-\beta$ ve $IFN-\omega$). $IFN-\alpha$ 'yı diğer hücrelere göre 100-1000 kat arasında fazla üretme özelliğine sahiptirler ve virüse özgü T hücre yanıtının oluşmasında etkili olan cDC'yi aktive etmektedirler. Patojenlerin sahip oldukları "patojen ilişkili moleküler patern" (PAMP) (örneğin; virion yüzeyinde bulunan yüksek tekrarlı kapsomer ve/veya peplomer, RNA, DNA) moleküllerini tanımakla görevli olan Toll benzeri reseptör (TLR) türlerinden TLR7 ve TLR-9 sentezlerler. cDC hücreleri $CD11c^{high} CD11b^{+} B220^{-}$ yüzey reseptörlerini taşırlar. cDC'ler hemen hemen tüm TLR'leri sentezlerler ve T hücre cevabında Tc ve Th hücrelerine antijen sunma özellikleri etkilidir. pDC'lere göre ise çapraz sunum özelliği daha etkilidir [121,122].

Kronik HBV hastalarında doğal ve kazanılmış immün yanıtın düzenlenmesinde rol oynayan antijen sunucu hücrelerden dentritik hücrelerin antijen sunumunda problem olduğu belirtilmiştir [129]. İleri düzey fibroz ve siroz olan kronik HBV hastalarının kanında dentritik hücre sayısında sağlıklı bireylere göre düşüş olduğu tespit edilmiştir. Dolaşımdaki DC sayısı HBV genotipinden, HBeAg varlığından ve bulaşma yolundan etkilenebilmektedir. mDC/cDC 'lerin eş uyarınlarnının sentezi kronik HBV hastalarında azalmış veya hiç üretilmemektedir. Ancak B7-H1 inhibitörünün sentezi artmaktadır [130-133]. Yuan ve ark. [134] yaptığı çalışmada HBsAg'nin pDC'lerin IFN- α sentezini TLR-9'ü inhibe ederek engellediği belirtilmiştir. Kronik HBV hastalarından elde edilen MDCC (monositlerden türetilmiş dentritik hücre)'lerin T yardımcı hücrelerini uyarma etkisinde değişiklik olmadığı tespit edilmiştir [135]. Periferik kanda HBsAg ve HBV'nin bulunması, mDC'lerin T hücre uyarma kapasitelerini azalttığı ve HBV varlığının IL-12 sentezini azalttığı belirtilmiştir [136,137].

DC aşuları ile kronik HBV hastalığının tedavisine yönelik yapılan çalışmalarda, bağışıklık sistemi ilaçlarla baskılanmış HBV-tg farelerin dalaklarından izole edilmiş dentritik hücreler, *in vitro* ortamda HBsAg ile yüklenerek farelere tekrar enjekte edildiğinde, anti-HBsAg yanıtında artış ve HBV DNA düzeyinde azalma gözlenmiştir [138]. Yapılan diğerk bir çalışmada, kronik HBV-tg farelerin kemik iliğinden izole edilen DC'ler *in vitro* ortamda, HBsAg 28-39 epitopu ve tetanos toksini ile muamele edilip, tekrar farelere enjekte edildiğinde daha önceki çalışmadaki gibi anti-HBsAg yanıtının arttığı ve HBV DNA düzeyinin azaldığı gözlenmiştir [139]. Yan ve ark. [140] yaptığı çalışmada ise 380 kronik HBV hastalarının periferik kanından elde edilen mononükleer hücreleri GM-CSF ve IL-4 ile muamele ederek otolog dentritik hücreler elde etmişlerdir. Daha sonra yine *in vitro* ortamda HBcAg'ye ait 18-27 a.a ve HBVpre-S 244-53 amino asitleri arası epitopik bölge ile 12 saat inkübe ettikten sonra DC'ler hastalara immünize edilmiştir. Tedavi sonucunda hastaların kanlarında HBsAg ve HBV DNA azalması tespit edilmiştir. HBeAg negatif hastalarda istatistiksel bakımdan anlamlı bir sonuç elde edilirken, HBeAg pozitif hastalarda anlamlı bir sonuç elde edilememiştir [140].

Wang ve ark. [141] yaptığı bir başka çalışmada, Flt-3L kodlayan plazmid DNA farelere immünize edilmiş ve 10 gün sonra fare kemik iliğinden pDC ve cDC'ler izole edilmiştir. Daha sonra CpG ile aktive edilmiş pDC ile mDC, 1:1 oranında bir araya getirilip uygun peptitle yüklenip farelere immünize edildiğinde, farelerde etkin sitotoksik T hücre yanıtı tespit edilmiştir. Yapılan diğer çalışmada ise 12 kronik hepatit B hastasının periferik kanından pDC'ler ve monositlerden türetilmiş dentritik hücreler (MDDC) izole edilmiştir. CpG ile aktive edilmiş pDC'ler ve MDDC'ler birlikte kültüre edildiklerinde HBcAg ile yüklenmiş MDDC'lerin eş uyaran sentezinin arttığı ve HBV'ye özgü Tc hücre yanıtının arttığı tespit edilmiştir [142].

Bu çalışmalar DC aşılarının hepatit B taşıyıcılarında oluşan immün toleransın kırılmasında alternatif yöntem olabileceğini göstermektedir. Ancak aynı zamanda DC'lerin etkin bir şekilde yüklenmesinde alternatif yöntemlere ihtiyaç olduğunu belirtmektedir.

2. MATERYAL ve YÖNTEM

2.1. Materyal

2.1.1. Cihazlar

Akım Sitometri Cihazı (Becton Dickinson), RT-qPZR cihazı (Bio-Rad), MACS manyetik hücre ayırıcı (Miltenyibiotec), PZR cihazı (Corbett Life Science), ELISPOT okuyucu (AID-GmbH), CO₂ inkübatörü (Thermo Heraeus Cytoperm 2), ters faz mikroskop (Olympus CKX41), yüksek hızlı santrifüj (Sorvall RC5C Plus), derin dondurucu -80 °C, derin dondurucu -150 °C (Thermo), ELISA okuyucu (BIO-RAD Model 3550 Microplate Reader), spektrofotometre (Bio-Rad), nanodrop (Thermo), vorteks (Bio Vortex), pipet tabancası (Eppendorf Easypet), süzgeç (BD Falcon, Cell Strainer), füzyon kültür plakları, 96 Kuyulu (TPP), çok kuyulu hücre kültür Plakları (TPP), ELISA plakları (TPP), ELISPOT plakları (Millipore), diyaliz membranı (Sigma 23 mm × 15 mm), protein A immün afinite kolonu (GE Healthcare), fraksiyon ayırma makinesi (BIO-RAD Model 2110), ELISA plaka yıkayıcı 12 Kuyuluk (Nunc-Immuno Wash).

2.1.2. Kimyasal maddeler

Fare granülosit makrofaj koloni stimulan faktör (GM-CSF), fare interlekin-4 (mIL-4), fare tümör nekrozis faktör (mTNF- α) ve penislin sitroptomisin (Invitrogen), anti-CD11c PE, anti-CD11b FITC ve anti-B220 PerCP-Cy5 (Becton, Dickinson), anti-fare IgG-AP konjugatı (Sigma), karboksifloresein diasetat suksinimidil ester, CFSE (Invitrogen), IFN- γ özgül I. ve II. Antikor (Millipore), BCIP/NBT substurat solüsyonu (Millipore), trizol (Invitrogen), CpG1826 (Invivogen), HBV aşısı (Gen Hevac), biotin işaretli anti-HBsAg (Diapro), streptaavidin işaretli horse radish preoksidaz (Diapro), anti-fare IgM-AP konjugatı (Sigma), monoklonal anti-HBsAg (GMBE'de daha önce yapılan çalışmalarda üretilmiştir), poliklonal anti-HBsAg (TARAL 1007 projesi kapsamında (105G056) yapılan çalışmalarda üretilmiştir), para-nitro-fenil-fosfat, (pNPP),

lipopolisakkaretid (LPS), 3,3',5,5'-tetra metil benzidin, (TMB) substurat solüsyonu, HEPES, dulbecco's modified eagle medium (DMEM), roswell park memorial institute medium (RPMI1640), Freund's complete (FCA), Freund's Incomplete Adjuvantı (IFA), transferin, anti-fare polivalen antikoru alkale fosfataz (AP) konjugatı (Sigma), fetal bovine serum (Biochrom AG), hepatit s Antijeni (HBsAg) (Fitzgerald), hipoksantin aminopterin timidin (HAT), hipoksantin timidin (HT), gentamisin, 8-azoguanin (Gibco).

2.1.3. Tamponlar

PBS (Fosfat tamponu): 10 mM KH_2PO_4 ve 10 mM K_2HPO_4 hazırlanarak pH 7.2'ye ayarlandı. Daha sonra çözeltinin üzerine 0.15 mM NaCl ilave edilerek karıştırıldı. Otoklav ile steril edildi.

PBS-Tween 20 Tamponu: 1 Litre fosfat tamponuna % 0.05 Tween-20 eklendi ve bir süre vorteks ile karıştırılarak hazırlandı.

PEG çözeltisi: 1 ml PBS ile 1 ml distile su 1:1 oranında karıştırıldıktan sonra 2 gr PEG-4000 ilave edildi. Çözelti otoklavlandıktan sonra kullanılıncaya kadar 37 °C'de saklandı.

Substrat Tamponu: 1 mM MgCl_2 , 1 mM ZnCl_2 ve 0.1 M glisin çözeltisi pH 10.4 olacak şekilde KOH ile ayarlandı. 1 ml substrat tamponunun üzerine 1 mg pNPP ilave edilerek kullanıma hazır hale getirildi.

Bağlama (binding) Tamponu: 200 mM NaH_2PO_4 ve 200 mM Na_2HPO_4 karıştırılarak pH 7.0'ye ayarlandı.

Elüsyon Tamponu: 0.1 M glisin-HCl pH 2.7 olacak şekilde hazırlandı.

Denge Tamponu (nötraliz edici): 1 M Tris-HCl pH 9.6 olacak şekilde hazırlandı.

MACS Tamponu: % 2 EDTA ve % 0.5 BSA içeren PBS hazırlandı.

Amonyum Klorid Tamponu: 0.02 M Tris-Cl ve 0.14 M NH_4Cl hazırlanarak pH 7.2'ye ayarlandı.

2.1.4. Besiyeri

RPMI besiyeri: 10.5 gr RPMI1640, 5.96 gr HEPES ve 2 gr NaHCO₃, 2 mM L-glutamine, 1 mM sodyum pirüvat, 0.1 mM MEM non-essential amino asit, 50 U/ml penisilin, 50 µg/ml streptomisin, 50 µM merkaptto etanol, 20 ng/ml GM-SCF ve 100 U/ml IL-4 içeren RPMI 1640 pH 7.2 olacak şekilde 1 litre steril distile su içinde hazırlandı. Besiyeri steril ortamda 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. % 10 (v/v) olacak şekilde FBS ilave edilip kullanıma hazır hale gelen besiyeri +4 °C'de saklandı. Kullanım sırasında RPMI1640 besiyeri belli bir süre oda sıcaklığında tutularak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve oda sıcaklığında kullanıldı.

DMEM besiyeri: 13.4 gr DMEM (4.5 gr/L glukoz, 25 mM HEPES), 5.96 gr HEPES ve 2 gr NaHCO₃ pH 7.2 olacak şekilde 1 litre steril distile su içinde hazırlandı. Besiyeri steril ortamda 0.2 µm'lik filtreden geçirilerek sterilize edildi. % 10 (v/v) olacak şekilde FBS ilave edilip gentamisin (50 µg/ml) eklendikten sonra kullanıma hazır hale gelen besiyeri +4 °C'de saklandı. Kullanım sırasında DMEM besiyeri belli bir süre oda sıcaklığında tutularak oda sıcaklığına gelmesi sağlandı ve oda sıcaklığında kullanıldı.

HAT besiyeri: İstenilen miktarda FBS ilave edilerek hazırlanan besiyerinin içinde % 2 HAT (50×) olacak şekilde çözelti hazırlandı.

HT besiyeri: İstenilen miktarda FBS ilave edilerek hazırlanan DMEM besiyerinin içinde % 2 HT (50×) olacak şekilde çözelti hazırlandı.

Hücre dondurma çözeltisi: Hücre dondurulacağı sırada taze olarak hazırlandı. Hücre dondurma çözeltisi % 80 FBS, % 10 DMEM ve % 10 DMSO olacak şekilde hazırlandı.

2.1.5. Rekombinant faj

HBsAg'nin M13fajın P3 proteini üzerinde gösterilmesi TÜBİTAK-MAM-GMBE İmmünogenetik Laboratuvarı tarafından, TARAL 1007 projesi kapsamında (105G056) gerçekleştirildi.

2.1.6. Transgenik HBV (HBV-tg) fareler

GMBE- Hayvan Genetiği ve Üreme Biyolojisi Laboratuvarında HBV transgenik fareler, C57BL/6JxBALB/c hibrid fare embriyolarına tüm HBV genomunu içeren HindIII-SacI fragmantları kesilmiş pT-HBV1.3 plazmidinin stabil olarak transfekte edilmesiyle elde edilmiştir. Elde edilen HBV-tg farelerde HBV-DNA'sının genoma stabil olarak entegre olduğu, HBVx gen transkriptlerinin oluştuğu ve karaciğer, böbrek ile serumda HBsAg bulunduğu gösterilmiştir [143].

2.2. YÖNTEM

2.2.1. Rekombinant faj immünizasyonları

Altı-sekiz haftalık BALB/c, BALB/cj, HBV-tg ve Hibrit (C57BL/6JxBALB/c) fareler, farklı konsantrasyonlarda 100 µl PBS (pH: 7.2) içerisinde 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} rekombinant faj (rfaj) partikülü ile üç hafta arayla, üç veya dört kez intraperitoneal olarak immünize edildi. Kontrol grubu olarak yaban faj (M13), ticari HBV aşısı (5 µg/fare) ve plazmadan saflaştırılmış HBsAg kullanıldı. Plazmadan saflaştırılan HBsAg (5 µg/fare) ilk immünizasyonda Freund's complete (FCA) ile karıştırılarak hazırlandı. Diğer immünizasyonlarda ise HBsAg Freund's incomplete (IFA) adjuvanı ile hazırlanarak fareler immünize edildi.

2.2.2. Anti-faj monoklonal antikor üretimi

2.2.2.1. Füzyon

Dört adet BALB/c fare, 10^{12} M13 faj partikülü ile üç hafta arayla üç kez intraperitoneal olarak immünize edildi. Farelerde oluşan immün yanıt ELISA yöntemiyle ile tespit edilip en yüksek antikor titresine sahip fare füzyona alındı. Füzyon metoduna göre [144], dekapite edilen farenin lenf nodlarından ve

dalağından elde edilen lenfositler ile F0 myeloma hücreleri ATTC 1646) 1:3 oranda birleştirildi ve polietilen glikol (PEG 4000) varlığında füzyon yapıldı. Hibrit hücrelerin seçilimi % 2 HAT (hipoksantin aminopterin timidin) içeren DMEM kullanılarak gerçekleştirildi. Hibrit hücrelerin aktivitesi, ELISA yöntemiyle tespit edildi ve antijene özgül yanıt veren hibrit hücreler geniş ölçekte çoğaltıldı.

2.2.2.2. Monoklonal antikorların geniş ölçekte üretilmesi ve alt tiplendirme deneyi

M13 fajı, yüksek özgüllükte monoklonal antikor sentezleyen hibrit hücrelerin *in vitro* ortamda geniş ölçekte çoğaltılması için % 5 FBS içeren DMEM besiyerinde 2 gün, FBS olmayan (% 0) DMEM besiyerinde 2 gün olmak üzere döngüsel olarak üretildi. Hücre kültür üst sıvıları biriktirildi ve 1250×rpm'de 10 dk santrifüj edilerek hücre pelleti uzaklaştırıldı. Çalışmalarda FBS olmayan besiyerinde biriktirilen besiyeri kullanıldı.

Hibrit hücreler tarafından üretilen monoklonal antikorun alt tipinin belirlenmesi için indirek ELISA prokolü uygulandı. Plaka 1×10^6 M13 faj ile kaplandı inkübasyona bırakıldı. Yıkama aşamalarından sonra 100 µl hücre kültür üst sıvısı ilave edildi ve inkübasyondan sonra alkalın fosfataz işaretli, anti-IgG, anti-IgM polivalen antikorlar kullanılarak monoklonal antikorun alt tipi belirlendi.

2.2.3. Anti-faj monoklonal antikor ile faj kompleks oluşumu ve immünizasyonu

Anti-faj monoklonal antikorunu farklı konsantrasyonlarda (5, 10 ve 20 µg) 1×10^{10} rfaj ile PBS içerisinde bir saat 37 °C'de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildi. Daha sonra bir gece oda sıcaklığında inkübe edilerek monoklonal antikor-faj kompleksi hazırlandı. Altı-sekiz haftalık BALB/c fareler bu kompleks ile üç kez intraperitoneal olarak immünize edildi. İkinci ve üçüncü immünizasyonlarda sadece rekombinant faj uygulandı. Kontrol grubu olarak rekombinant faj, monoklonal antikor, yaban faj ve ticari HBV aşısı kullanıldı. Farede oluşan

immün yanıt kuyruk kanından elde edilen plazma ile ELISA testi uygulanarak tespit edildi.

2.2.4. HBV-tg farelerde immün toleransın kırılması

2.2.4.1. Aşı-antikor kompleksi oluşumu

TÜBİTAK-MAM-GMBE’de daha önceki projeler kapsamında HBsAg’ye özgül monoklonal antikor ile ticari HBV aşısı farklı oranlarda (1:1, 1:5, 1:10, 5:1) PBS içerisinde bir araya getirildi. 37 °C’de çalkalayıcı inkübatörde inkübe edildikten sonra bir gece oda sıcaklığında inkübe edilerek monoklonal antikor-aşı kompleksi hazırlandı.

2.2.4.2. ELISA yöntemiyle aşı-antikor immün kompleks oluşumunun kontrolü

ELISA plaka kuyuları 20 ng/kuyu HBsAg-Ad ve 20 ng/kuyu HBsAg-Ay ile kaplanarak +4 °C’de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyular yıkama solüsyonu (PBS + % 0,5 Tween 20) ile 3 kez yıkandıktan sonra % 10 süz tozu ile bloklandı. Yıkama işleminden sonra aşı-antikor oranı sırasıyla 10:1, 5:1, 2.5:1, 1:1, 0:1 ve 1:0 olarak hazırlanmış immün kompleksler kuyulara eklenerek plaka 37 °C’de 1 saat inkübe edildi ve daha sonra kuyular tekrar yıkandı. Her kuyuya 100 µl alkalın fosfataz işaretli polivalen eklenerek 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında kuyular 4-5 kez yıkanarak her kuyuya 100 µl pNPP (nitro fenil fosfat) ilave edildi ve ELISA plaka okuyucuda 405 nm’de 60. dk absorban değerleri ölçüldü.

2.2.4.3. Aşı-antikor kompleksi immünizasyonları

Yapılan ilk çalışmada, altı-sekiz haftalık iki adet dişi ve iki adet erkek fareden oluşan HBV-tg ve Hibrit fare grupları, farklı derişimlerde aşı-antikor kompleksleri (1:1, 1:5, 1:10), sadece monoklonal antikor (1 µg, 5 µg, 10 µg) ve

ticari aşı (1 µg) olmak üzere farklı şekilde iki hafta aralıklarla üçer kez intraperitonel olarak immünize edildi. İkinci çalışmada ise aynı sayıdaki HBV-tg ve hibrit fareler sadece 1:5 aşı-antikor kompleksi, 5 µg monoklonal antikor ve 1 µg ticari aşı ile üçerkez immünize edildi.

Üçüncü çalışmada diğer çalışmalardaki gibi aynı sayı ve yaş aralığında HBV-tg fareler kullanılmıştır. Gruplar; 5:1 oranında aşı-antikor kompleksi, 5 µg ticari aşı, 1 µg monoklonal antikor, adjuvant (50 µl), aşı-adjuvan kompleksi, ticari HBsAg ve ticari HBsAg-monoklonal antikor kompleksleri ile 15 gün arayla intraperitonel olarak immünize edildi. Adjuvant kullanılarak yapılan immünizasyonların ilkinde FCA kullanılırken, ikinci ve üçüncü immünizasyonlar IFA kullanılarak yapıldı.

2.2.5. Plazma eldesi

Farelerde oluşan antikor yanıt veya antijen seviyesindeki azalmanın tespiti için fare kuyruklarından 20 µl kan alınarak 20 µl sodyum sitrat içeren tüpe konuldu. 3000×g'de 5 dakika santrifüj edilerek plazma elde edildi. Plazma yapılacak çalışmalar için -20 °C'de saklandı.

2.2.6. ELISA Yöntemiyle Antikor Yanıtının Tespiti

ELISA plaka kuyuları 20 ng/kuyu HBsAg-Ad ve 20 ng/kuyu HBsAg-Ay ile kaplanarak +4 °C'de gece boyu inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyular yıkama solüsyonu (PBS + % 0,5 Tween 20) ile 3 kez yıkanarak % 1 veya % 10 süt tozu ile bloklama için 1 saat 37 °C'de inkübe edildi. Bu süre sonunda farklı seyreltmelerde fare serumu kuyulara ilave edilerek plaka 37 °C'de 1 saat inkübe edildi ve ardından kuyular yıkandı. Her kuyuya 100 µl alkalın fosfataz işaretli poliyvalen eklenerek 37 °C'de 1 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında 4-5 kez yıkanarak her kuyuya 100 µl pNPP substurat eklendi ve karanlıkta, oda sıcaklığında 60. dk inkübe edildi. ELISA plaka okuyucuda 405 nm dalga boyunda kuyulardaki absorbans değeri ölçüldü.

2.2.7. ELISA yöntemiyle plazmada antijen değişiminin tespiti

ELISA plaka kuyuları 70 ng monoklonal anti-HBsAg ve 30 ng poliklonal anti-HBsAg ile kaplanarak +4 °C’de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon sonunda kuyular yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkanarak % 10 süt tozu ile bloklanmak üzere 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Bloklama sonrasında 5 µl HBV-tg plazması ile birlikte her kuyuya 25 µl biotin işaretli anti-HBsAg eklendi ve plaka 37 °C’de 1 saat inkübe edildi. Bir sonraki aşamada plaka tekrar yıkama solüsyonu ile 3 kez yıkandı ve her kuyuya 100 µl streptaavidin işaretli horseradish peroksidaz eklenerek plaka 1 saat 37 °C’de inkübe edildi. İnkübasyon sonunda plaka 4-5 kez yıkama solüsyonu ile yıkandı ve her kuyuya 100 µl TMB substrat solüsyonu eklendi. Plaka 5 dk karanlıkta oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra ELISA plaka okuyucuda 655 nm dalga boyunda kuyulardaki absorbanans değeri ölçüldü.

2.2.8. Dendritik hücre elde edilmesi

Dendritik hücre elde etmek için 6-8 haftalık HBV-tg fareye servikal dislokasyon yöntemiyle ötanazi uygulandıktan sonra farenin her iki femur ve tibia’sı çıkarılıp kas dokudan temizlenerek ve 2-5 dk % 70 alkol de inkübe edilerek dezenfeksiyon sağlandı. Femur ve tibiada bulunan kemik iliği hücreleri % 2 FBS içeren 2 ml PBS kullanılarak elde edildi. 0.168 M amonyum klorid çözeltisi ile oda sıcaklığında 6 dk inkübe edilerek kırmızı kan hücreleri ortamdan uzaklaştırıldı. Kemik iliği hücreleri 1×10^6 /ml olacak şekilde % 10 FBS, 2 mM L-glutamin, 1 mM sodyum pirüvat, 0.1 mM MEM non-essential amino asit, 50 U/ml penisilin, 50 µg/ml streptomisin, 50 µM merkaptto etanol, 20 ng/ml GM-CSF ve 100 U/ml IL-4 içeren RPMI 1640 ile 100 mm’lik petriye ekildi ve 37 °C, % 5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. Üçüncü gün besiyerinin 2/3’si alınarak yeni besiyeri petriye eklendi. Altıncı gün hücreler hücre kazıyıcı yardımıyla ve/veya versese solüsyonu ile süspense hale getirilerek akım sitometri çalışması için veya antijenle yüklemeye kullanılabilir duruma getirildi.

2.2.9. Dentritik hücrelerin akım sitometri cihazı ile analizi

2.2.9.1. Dentritik hücre saflığının tespiti

Elde edilen dentritik hücrelerin saflığının tespiti için, 1×10^6 dentrik hücre 1 μ l anti-CD11c PE, anti-B220 PerCP, anti-CD11b FITC ve izotipleri ile 20 dk +4 °C’de inkübe edilerek işaretlendi. İnkübasyon süresi sonunda hücreler PBS ile yıkandı. Pellet 500 μ l soğuk PBS ile süspansen hale getirilerek FACScan cihazıyla incelendi.

2.2.9.2. Dentritik hücre olgunlaşmasının tespiti

Yüklü dentritik hücrelerin olgunlaşmasının tespiti için dentritik hücrelerin yüzeylerinde bulunan CD40, CD80 ve CD86 reseptörlerinin ekspresyon düzeyleri akım sitometri cihazıyla kontrol edildi. Bu aşamada 1×10^6 dentritik hücre 1 μ l anti-CD40 PE, anti-CD80 PE-Cy5, anti-CD86 FITC ve izotipleri ile 20 dk +4 °C ‘de inkübe edilerek işaretlendi. İnkübasyon süresi sonunda PBS ile yıkanan hücreler 500 μ l soğuk PBS ile süspansen hale getirilerek FACScan cihazıyla incelendi.

2.2.9.3. CFSE işaretleme

İşaretleme için 10×10^6 dentritik hücre 5 ml PBS içinde 0.5 mM CFSE ile 10 dk 37 °C’de inkübe edilerek işaretlendi. İnkübasyon süresi sonunda tüpe 25 ml PBS eklenerek buz üzerinde 5 dk inkübe edildi. Daha sonra hücreler PBS ile iki kez yıkandı ve akım sitometri cihazında analiz yapıldıktan sonra Hibrit farelere 5×10^5 hücre/fare intraperitonel olarak verildi. İmmünizasyondan 24 saat sonra immünize edilen farenin lenf nodları ve dalağı izole edilerek akım sitometri cihazında FL-1 renk aralığında incelendi.

2.2.10. Dentritik hücrelerin morfolojik analizi

Dentritik hücreler 6. günde lamel üzerine 5×10^5 olacak şekilde ekilerek bir gece $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de %5 CO_2 'de inkübe edildi. Yedinci günde besiyeri kuyulardan uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Sonra hücreler % 4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu ile 20 dk oda sıcaklığında fikse edildi ve 3 kez PBS ile yıkandı. Dehidratasyon işlemlerinden geçirilen (% 100 alkolden % 70 alkole azalan oranlarda geçiş yapılması) hücreler hematoksilen ile 3 dk muamele edildi. PBS ile yıkamanın ardından eozin ile 3 dk boyandı ve sırası ile % 70, % 80, % 90 ve % 100 alkollerden geçirildi. Son olarak PBS ile yıkandıktan sonra mikroskopta inceleme yapıldı. Boyama sonucunda hücrelerin sitoplazmaları pembe renkte, çekirdek ise mavi renkte gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

2.2.11. Dentritik hücre çalışmasında aşı-antikor kompleksinin oluşturulması

2.2.11.1. Anti-HBs monoklonal antikorunun geniş ölçekte üretilmesi ve saflaştırılması

Anti-HBsAg monoklonal antikor üreten hibrit hücre hattı daha önceki çalışmalar kapsamında TÜBİTAK-MAM-GMBE'de gerçekleştirilmiştir. Bu çalışmada bu hücre hattı geniş ölçekte çoğaltıldı ve kültür üst sıvısında bulunan anti-HBsAg saflaştırıldı.

Antikor saflaştırılmasının yapılabilmesi için ilk olarak hibrit hücreler %10 DMEM kullanılarak 75 cm^2 ve 150 cm^2 'lik hücre kültür flasklarında çoğaltıldı ve kültür üst sıvıları biriktirildi ve daha sonra $1200 \times \text{rpm}$ 'de 5 dk santrüj edildi. Kültür üst sıvısına soğuk ortamda %45 oranında amonyum sülfat eklendi ve gece boyu $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ ' karıştırıldı. İnkübasyon süresi sonunda $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de, $10.000 \times \text{rpm}$ 'de 55 dk santrüj edildi. Oluşan pellet PBS'de çözülerek $+4 \text{ }^\circ\text{C}$ 'de gece boyu diyaliz edildi. Diyaliz sonrası antikorlar $0.45 \text{ }\mu\text{m}$ 'lik filtreden geçirilerek kolona yüklenmeye hazır hale getirildi.

Antikor saflaştırmada protein A kolonu kullanıldı. İlk olarak kolon bağlanma tamponu ile kolon hacminin 5 katı oranında yıkandı. Daha sonra filtreden geçirilmiş antikor solüsyonu kolondan geçirildi ve 1 ml hacim olacak şekilde mikro santrifüj tüplerinde biriktirildiler. Daha sonra kolon yıkandı ve kolona tutunmuş olan antikorlar elüsyon tamponu ile kolondan çözülerek içerisinde 75 µl denge tamponu olan 1ml hacimli tüplere toplandı. Tüplerdeki absorbans değeri nano drop cihazı ile ölçüldü. 1.4 absorbans değeri 1 mg/ml antikor olarak hesapladı ve çalışmalarda kullanılmak üzere +4 °C’de saklandı

2.2.11.2. Aşı-antikor kompleksi

Aşı-antikor immün kompleksi 2:1 oranında 10 µg/ml saf anti-HBsAg (IgG2b) monoklonal antikor ile 20 µg/ml hepatit B aşısının (GenHevac B), 1 saat 37 °C’de inkübe edildikten sonra gece boyuca oda sıcaklığında inkübe edilerek kompleks oluşturuldu.

2.2.12. Dentritik hücreleri yüklemeye kullanılacak HBV aşı miktarının belirlenmesi

2.2.12.1. WST-1 canlılık testi

Yüklenecek dentritik hücre sayısının ve hücrelerin yükleneceği aşı, aşı-antikor kompleksinin konsantrasyonunun belirlenmesi için iki farklı hücre konsantrasyonu ve doz konsantrasyonu ile üç farklı inkübasyon zamanı deneyerek belirlendi. 25×10^3 ve 50×10^3 dentritik hücre 96 kuyulu plakaya ekildi ve 5, 24 ve 48 saat boyunca 144 ng veya 28 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor veya aynı miktarda antikor ile yüklendi. Kontrol grubu olarak yüksüz dentritik hücreler kullanıldı. Pozitif kontrol olarak ise sitotoksik etkisi bilinen 10 µl hidrojen peroksit kullanıldı. İnkübasyon sürelerinin sonunda her kuyuya 10 µl WST-1 solüsyonu eklenerek 2 saat sonra kuyularda oluşan absorbans değeri 450 nm ölçüm dalga boyu ve 655 nm referans dalga boyunda ölçüldü.

2.2.12.2. BrdU bağlanma testi

Hücre çoğalmasının tespiti için BrdU bağlanma yöntemi kullanıldı. WST-1 testinde kullanılan hücre ve aşı, aşı-antikor veya antikor konsantrasyonları kullanılarak BrdU testi yapıldı. Hücrelerin 24 saat ve 48 saat inkübasyonu sonunda her kuyuya 1:1000 oranında seyreltilmiş 10 µl BrdU eklenerek 37 °C'de 3 saat inkübe edildi. Daha sonra, hücreler 10 dk 1200×rpm'de santrifüj edilerek süpernatant ortamdan uzaklaştırıldı ve plaka 60 °C 1 saat inkübe edildi. Kuyulara 200 µl Fix-Denat eklenerek hücreler fiske edildi. Daha sonra, her bir kuyuya 100 µl anti-BrdU eklenip 90 dk oda sıcaklığında bekletildi ve sonra PBS ile 3 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra her kuyuya 100 µl substrat solüsyonu eklenerek 20 dk reaksiyon için bekletildi ve 25 mM hidroklorik asit ile reaksiyon durdurularak 450 nm dalga boyundaki absorbans değerleri ölçüldü.

2.2.13. Dentritik hücrelerin morfolojik analizi

Dentritik hücreler 6. günde lamel üzerine 5×10^5 olacak şekilde ekilerek bir gece 37 °C'de %5 CO₂'de inkübe edildi. Yedinci günde besiyeri kuyulardan uzaklaştırıldı ve hücreler PBS ile yıkandı. Sonra hücreler % 4'lük paraformaldehit (PFA) solüsyonu ile 20 dk oda sıcaklığında fikse edildi ve 3 kez PBS ile yıkandı. Dehidratasyon işlemlerinden geçirilen (% 100 alkolden % 70 alkole azalan oranlarda geçiş yapılması) hücreler hematoksilen ile 3 dk muamele edildi. PBS ile yıkamanın ardından eozin ile 3 dk boyandı ve sırası ile % 70, % 80, % 90 ve % 100 alkollerden geçirildi. Son olarak PBS ile yıkandıktan sonra mikroskopta inceleme yapıldı. Boyama sonucunda hücrelerin sitoplazmaları pembe renkte, çekirdek ise mavi renkte gözlemlendi ve fotoğrafları çekildi.

2.2.14. Dentritik hücrelerin immünizasyonu

Dentritik hücrelerin immünizasyonu beş farklı grupta ve her grupta dört adet HBV-tg fare olmak üzere gerçekleştirilmiştir. Gruplar sırasıyla aşağıda belirtilmektedir;

1. Grup: Kontrol grubu, dentritik hücre immünize edilmeyen HBV-tg fareler.
2. Grup: Aşı grubu, 5µg aşı ile yüklü dentritik hücre immünizasyonu yapılan HBV-tg fareler.
3. Grup: Aşı-antikor grubu, 5µg aşı-antikor kompleksi ile yüklü dentritik hücre immünizasyonu yapılan HBV-tg fareler.
4. Grup: Antikor grubu, 5µg antikor ile yüklü dentritik hücre immünizasyonu yapılan HBV-tg fareler.
5. Grup: DCØ, yüklenmemiş dentritik hücre immünizasyonu yapılan HBV-tg fareler.

Kemik iliği hücrelerinin dentritik hücelere farklılaşmasının 6. gününde hücreler süspanse hale getirilerek 1.5×10^6 hücre/kuyu olacak şekilde 6 kuyulu plaka kuyularına ekildi. Yedinci gün hücreler yukarıda belirtilen gruplarına uygun olarak 5 µg aşı, aşı-antikor kompleksi veya antikor ile yüklendi. Ayrıca ek olarak her kuyuya 1 µl CpG, 100 ng/ml LPS eklenerek 5 saat 37 °C, % 5 CO₂ inkübatörde inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyulardaki dentritik hücreler süspanse hale getirilerek Thoma lamında sayıldı ve 5×10^5 hücre/fare olacak şekilde immünizasyonlar yapıldı. İmmünizasyonlar bir hafta arayla iki kez intraperitoneal olarak yapıldı.

İkinci immünizasyondan sonra birinci, ikinci ve üçüncü hafta farelerin kuyruk kanından elde edilen plazmada oluşan antikor yanıt incelendi. Ek olarak, ikinci immünizasyondan üç hafta sonra farelere servikal dislokasyon ile ötanazi uygulanarak karaciğer ve dalakları izole edildi. Elde edilen dalak hücreleri ELISPOT çalışmasında, karaciğer dokuları ise RT-qPZR çalışmasında kullanıldı.

2.2.14. Karaciğer dokularından RNA izolasyonu ve cDNA sentezi

Karaciğer dokularından total RNA izolasyonu Trizol kullanılarak yapıldı. RNA izolasyonu esnasında sağlayıcı firmanın (Invitogen) önerdiği protokol takip edildi. Ağırlıkları 10 mg'dan küçük olan dokular sıvı azot içinde porselen havanlarda toz haline gelinceye kadar öğütüldükten sonra 1 ml Trizol ile homojenize edildi. Homojenat 5 dk oda sıcaklığında bekletildikten sonra 4 °C'de 12000 ×g'de 15 dakika boyunca santrifüj edildi. Üst sıvı temiz bir tüpe aktarıldı ve üzerine 200 µl kloroform eklendi. Homojenat-kloroform karışımı 3 dk oda sıcaklığında inkübe edildikten sonra 4 °C'de 12000 ×g'de 15 dk boyunca santrifüj edildi. RNA içeren üst faz bir tüpe alındı ve 0.5 ml 2-isopropanol eklendi. Daha sonra örnekler 4°C'de 12000 ×g'de 10 dk boyunca santrifüj edildi. Üstte bulunan tüm sıvı pipetle uzaklaştırıldı. Tüpün dibinde kalan pelet 1 ml % 75'lik etanol yıkandıktan sonra 4 °C'de 7500 ×g'de 5 dk boyunca santrifüj edildi. Pelet vakumlu kurutucuda tam olarak kurutulduktan sonra 50 µl dietilpyrokarbonat (DEPC)-H₂O içinde çözüldü. RNA örneklerinin konsantrasyonu, saflığı ve kalitesi NanoDrop ND1000 spektrofotometre ve agaroz jelde yürütülerek tespit edildi. Her örnekten 1 µg RNA kullanılarak cDNA sentezi gerçekleştirildi. Bunun için "Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit" ve önerilen protokol kullanıldı. Kısaca, total RNA örneği ve 2 µl random heksomerler varlığında 60 °C'de 10 dk inkübe edildi. Daha sonra 4 µl RT enzim reaksiyon solüsyonu, 1.1 µl RT enzim, 0.5 µl RNaz inhibitörü, 2 µl deoksiniükleotitler ve 1 µl DTT eklenerek sırasıyla 45 °C'de 15 dk, 65 °C'de 60 dk ve 85 °C'de 5 dk inkübe edildi. Örnekler RT-qPZR'da kullanılmak üzere -20 °C'de saklandı.

2.2.15. HBV S geninin ekspresyon değişiminin RT-qPZR ile tespiti

RT-qPZR için kullanılacak olan primerlerin nükleotid dizisi belirlenmesinde programı (http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3/primer3_www.cgi) kullanıldı. Dizayn edilen ve çalışmada kullanılan primer çiftine ait bilgiler aşağıda verilmektedir.

Çizelge 2.1. HBs geninin ekspresyon değişiminin tespitinde kullanılan RT-qPZR protokolü ve programı. a) cDNA, primerler ve SYBR Green mikrarları, c) RT-qPZR programı

a)

Kimyasal	Konsantrasyon	Miktar (µl)
cDNA	---	10 µl
Forward Primer	10 pmol/ µl	1,25 µl
Reverse Primer	10 pmol/ µl	1,25 µl
Qiagen SYBR Green Kit	---	12,5 µl
TOPLAM		25 µl

b)

Basamak	Sıcaklık	Süre	Döngü
İlk Denatürasyon	94°C	5 dk.	1
Denatürasyon	94°C	40 sn.	40
Bağlanma	55°C	1 dk.	
Uzama	72°C	1 dk.	
Erime Sıcaklığı Grafiği	94°C	1 dk.	1
	55°C	1 dk.	1
	55°C-95°C	Erime Eğrisi	
Sonlandırma	4°C	∞	--

2.2.16. IFN-γ salgılanmasındaki değişimin ELISPOT ile tespiti

Millipore marka PVDF zar kaplı ELISPOT plaka kuyuları 15 µl (% 35'lik (v/v)) etanol ile inkübe edilerek kuyuların sterilizasyonu sağlandı. Kuyular üç kez PBS ile yıkandıktan sonra 100 µl (10 µg/ml) bağlayıcı antikor ile kaplanarak +4 °C'de bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda steril su ile yıkanan kuyulara 150 µl besiyeri eklenerek 2 saat 37 °C de bloklanması sağlandı. Süspansiyon hale getirilen HBV-tg farelerin dalak hücreleri 125×10³ hücre/kuyu olacak şekilde ELISPOT plakaya ekildi. Daha sonra 25×10³ aşılı hücre veya yüksüz dentritik hücre kuyulara eklenerek bir gece inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda kuyular altı kez % 0.01 Tween-PBS ile yıkandı ve her kuyuya 2

$\mu\text{g/ml}$ biotinlenmiş ikinci antikor eklenerek 2 saat inkübe edildi. Kuyulara tekrar yıkama solüsyonu ile yıkandıktan sonra 1:1000 dilüsyonda hazırlanan streptavidin alkalın fosfataz solüsyonu eklenerek 45 dk oda sıcaklığında inkübe edildi. Son olarak kuyular yıkama solüsyonu ve PBS ile yıkandıktan sonra her kuyuya 100 μl substrat BCIP/NBT (Nitro mavi tertatolizum klorid/ 5-bromo-4-kloro-3'-indokfosfat p-tlodin tuzu) eklendi ve 5 dk karanlıkta inkübe edildi. Kuyular noktalar oluşmaya başladıktan sonra su ile yıkandı. Plaka karanlıkta gece boyu bırakıldıktan sonra oluşan noktalar Aid marka ELISPOT okuyucu cihazda sayıldı.

2.2.17. İstatistiksel analiz

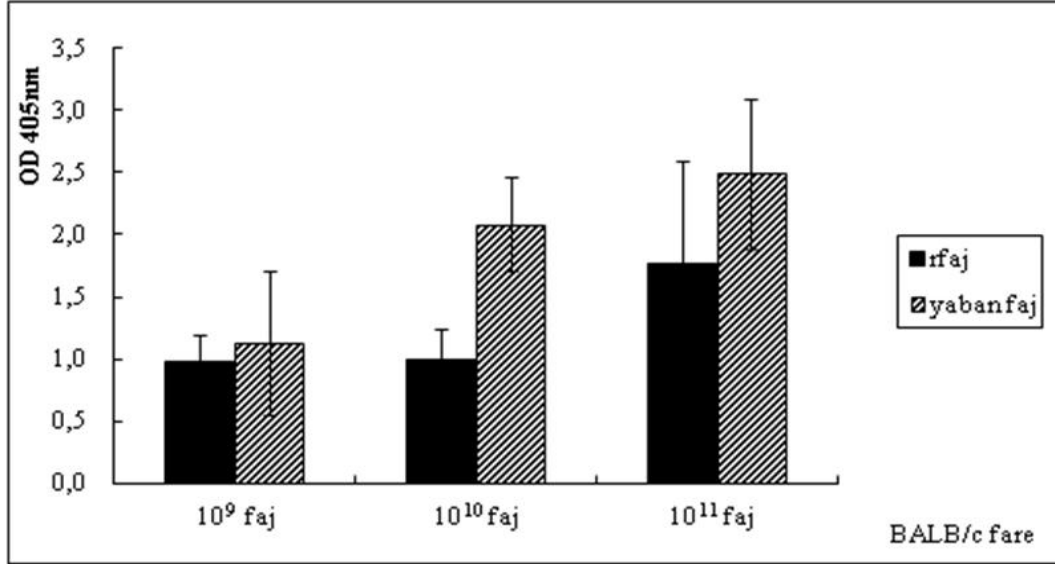
Deney sonuçları, Statistic Program for Social and Science (SPSS) istatistik programında tek yönlü ANOVA testlerinden Tukey kullanılarak gerçekleştirilmiştir. Sonuçların istatistiksel olarak anlamlı olarak kabul edildiği değerler $p < 0.05$ ve $p < 0.001$ 'dir.

3. BULGULAR

3.1. Yüzeyinde HBsAg Eksprese Eden Rekombinant Fajlara Karşı Farelerde Oluşan Antikor Yanıtının İzlenmesi

3.1.1. BALB/c farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt

TÜBİTAK-GMBE- İmmünojenetik Laboratuvarında 105G056 nolu TARAL 1007 projesi kapsamında yapılan çalışmalarda HBsAg, M13 fajın P3 proteini üzerinde faj gösterim tekniği uygulanarak gösterildi. Elde edilen rekombinant faj (rfaj)'ın HBsAg'ye karşı antikor yanıt oluşturma etkisini araştırmak için ilk olarak BALB/c fareler 1×10^9 , 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} rfaj partikülü ile üç hafta ara ile üç kez intraperitoneal olarak immünize edildi. Kontrol grubu olarak yaban faj kullanıldı. Farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra ELISA yöntemiyle incelendiğinde, rfaj ve yaban faj partikül sayısının artmasıyla anti-HBsAg yanıtın doğru orantılı olarak arttığı tespit edildi (Şekil 3.1). Ancak yaban fajın nonspesifik antikor yanıtı tetiklediği ve rfaj gruplarına göre daha etkin poliklonal antikor yanıt oluşmasına neden olduğu görüldü (Şekil 3.1). 10^{12} faj partikülü ile immünize edilen fareler ikinci ve üçüncü immünizasyonlardan sora öldüğü için değerlendirmeye alınmamıştır.



Şekil 3.1. rFaj ve yaban faj ile immünize edilen BALB/c farelerde üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan anti-HBsAg yanıt

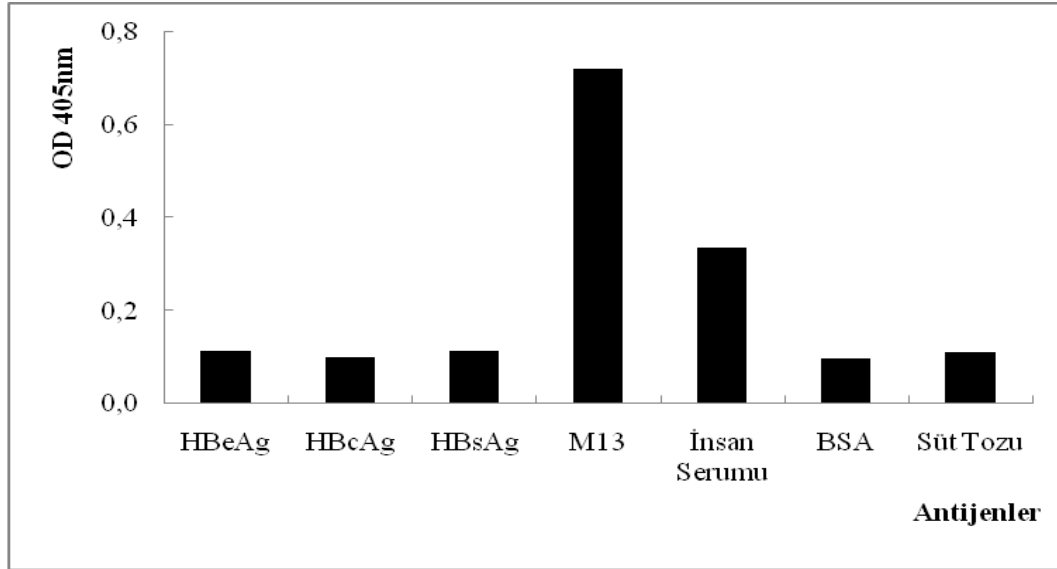
3.1.2. Anti-M13 monoklonal antikor üretimi, saflaştırılması ve alt tipinin tayini

rFaj yüzeyindeki HBsAg'ye karşı oluşan özgül antikor yanıtı artırmak ve M13 faj (Yaban faj)'ın neden olduğu nonspesifik antikor yanıtını azaltmak için M13 faj karşı özgül monoklonal antikor geliştirme çalışmaları gerçekleştirildi. M13 faja karşı monoklonal antikor elde etme çalışmalarında hibridoma teknolojisi kullanıldı. Bu kapsamda bu kapsamda 4 adet BALB/c fareye 10¹¹ M13 faj immünizasyonu yapıldı ve en yüksek anti-M13 titresine sahip fare füzyona alındı. Füzyonda PEG 4000 varlığında myeloma hücreleri ile fare dalak ve lenf nodlarından elde edilen lenfositler 1:5 oranında birleştirildi. Füzyon çalışmaları sonucunda 690 tane hibrit hücre elde edildi. ELISA testi ile antikor üreten hibrit hücrelerini belirleme çalışmalarında ise, bu hücrelerden 48 tanesinin anti-M13 aktivitesi olduğu ancak sadece 1 tanesinin M13 faja özgül antikor ürettiği tespit edildi (Çizelge 3.1, Şekil 3.2).

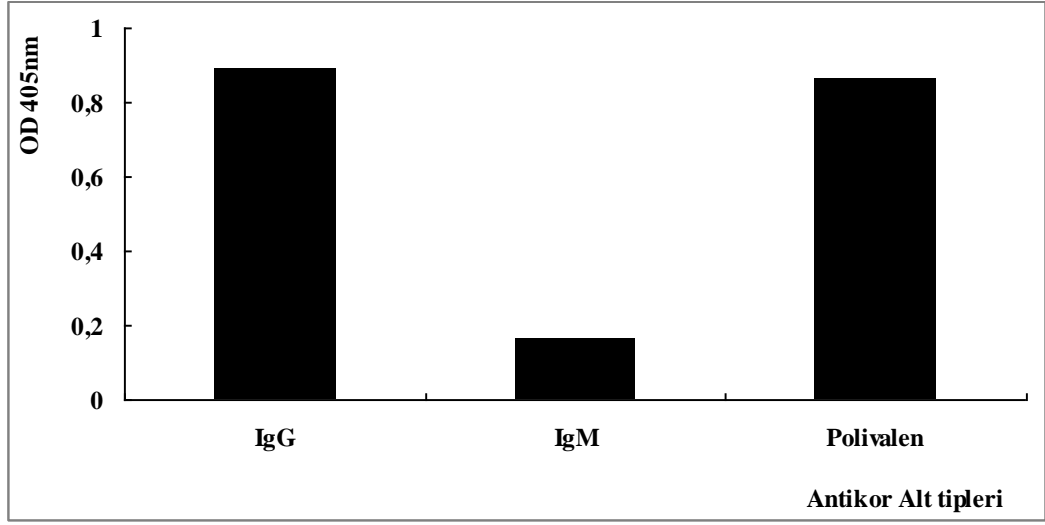
Çizelge 3.1. Füzyon Tablosu

Füzyon	Dalak Lenf Füzyonu
Lenfosit Hücre Sayısı	900x 10 ⁶
Myeloma Hücre Sayısı	130 X 10 ⁶
Füzyondaki Toplam Kuyu Sayısı	1152
Hibrit Hücre Sayısı	690
Antikor Aktivitesi içeren hibrit hücre sayısı	48
M13 faja özgül antikor üreten hibrit hücre sayısı	1 (5G12)

5G12 (5. Plaka G sırası 12. Kuyu) Monoklonal antikorunun diğer antijenlere (HBsAg, HBeAg, HBcAg), M13, insan serumuna, BSA ve süt tozu) karşı olan çapraz reaksiyon testleri ve antikorun alt tipinin tespiti ELISA yöntemiyle belirlendi (Şekil 3.2, Şekil 3.3).



Şekil 3.2. 5G12 Monoklonal antikorun diğer antijenlere karşı özgüllüğünün tespiti için yapılan çapraz reaksiyon testi sonuçları

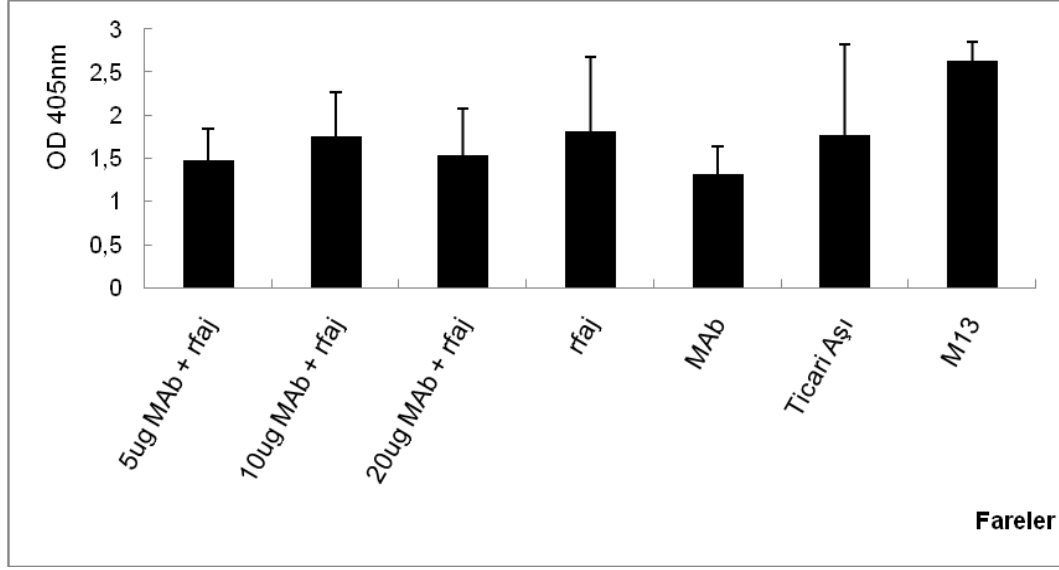


Şekil 3.3. 5G12 Monoklonal antikorun tipinin ELISA ile belirlenmesi

3.1.3. Faj-antikor kompleksi oluşturma çalışmaları

5G12 Monoklonal antikorunu hücre kültür flasklarında serumsuz ortamda geniş ölçekte üretildi, amonyum sülfat ile çöktürüldü ve diyaliz ile tek bir aşamada saflaştırıldı. Farklı miktarlarda (5µg, 10 µg, 20 µg) anti-M13 monoklonal antikor ile rfaj (1×10^{10} /fare) 37°C’de 1 saat, oda sıcaklığında gece boyu inkübe edilerek faj-antikor kompleksi oluşturuldu. Oluşan bu kompleksin dışında kontrol grubu olarak M13 faj, rfaj, ticari HBV aşısı (2 µg) ve monoklonal antikor (20 µg, 5G12) kullanılarak BALB/c fareler üç kez intraperitoneal olarak immünize edildi. Faj-antikor kompleksleri ile immünize edilen fare gruplarında ikinci ve üçüncü immünizasyonlarda sadece rfaj kullanıldı.

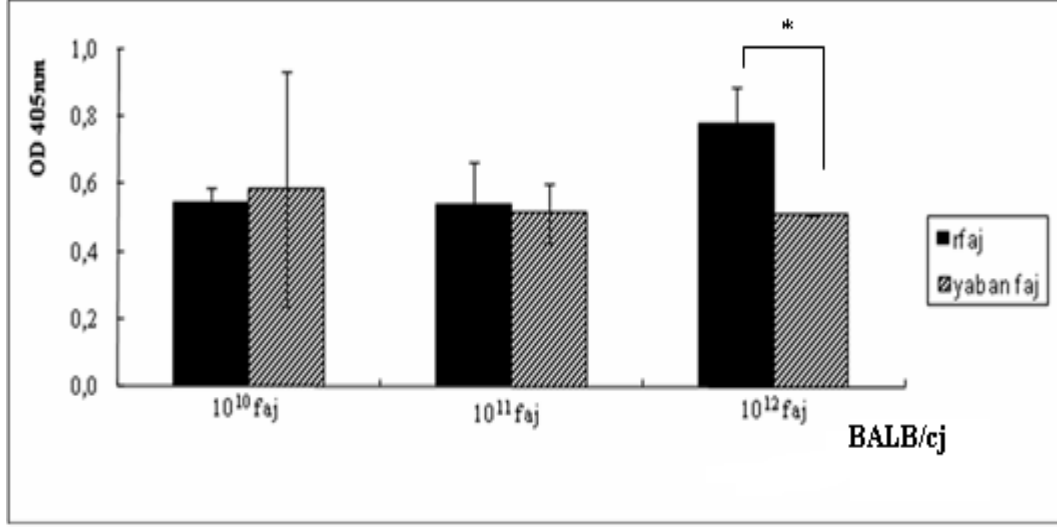
Üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra kuyruktan alınan kandan elde edilen plazma ile farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt ELISA testi ile karşılaştırıldığında gruplar arasında oluşan antikor yanıt açısından anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Şekil 3.4).



Şekil 3.4. rFaj-antikor kompleksi, rfaj, antikor (MAb), ticari aşı ve yaban faj (M13) ile yapılan çalışmada üçüncü immünizasyon sonrası elde edilen antikor yanıt sonuçları

3.1.4. BALB/cj farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt

BALB/cj fareler 1×10^{10} , 1×10^{11} , 1×10^{12} rfaj ve kontrol grubu olarak aynı sayıda yaban faj (M13) ile üç kez intraperitonel olarak immünize edildi. Üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt karşılaştırıldığında 1×10^{10} , 1×10^{11} rfaj ve yaban faj ile immünize edilen BALB/cj fare grupları arasında antikor yanıt oluşturma etkilerinde fark tespit edilmedi (Şekil 3.5). Fakat 1×10^{12} faj partikülü immünizasyonları karşılaştırıldığında rfaj ile immünize edilen BALB/cj farelerde, yaban faj ile immünize edilenlere göre yaklaşık % 30 oranında daha fazla antikor yanıt oluştuğu tespit edildi.



Şekil 3.5. BALB/cj farelerde rfaj ve yabancı faj immünizasyonları sonucunda üçüncü immünizasyon sonrası oluşan immün yanıt. Anlamlılık * $p < 0.05$

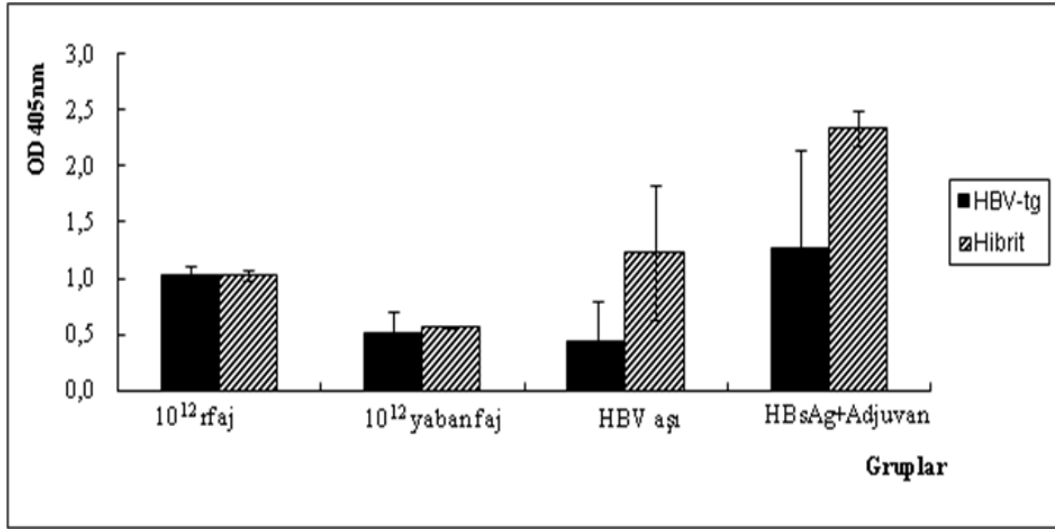
3.1.5. HBV transgenik (HBV-tg) fareler ve hibrit farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt

rFajın antikor yanıt oluşturma etkisi HBV-tg ve hibrit fareler üzerinde denendi. Bu çalışmada rekombinant fajların antikor yanıtı üzerine etkisi ticari kullanımdaki alüminyum adjuvantlar ve Freund's adjuvanlar ile karşılaştırıldı. Bu amaçla 1×10^{12} rfaj ve yabancı faj partikülü, 2 µg HBsAg içeren ticari HBV aşısı ve Freund's adjuvanları ile bir araya getirilmiş 2 µg ticari HBsAg (insan plazmasından saflaştırılmış) ile HBV-tg ve hibrit fareler dört kez intraperitonel olarak immünize edildi.

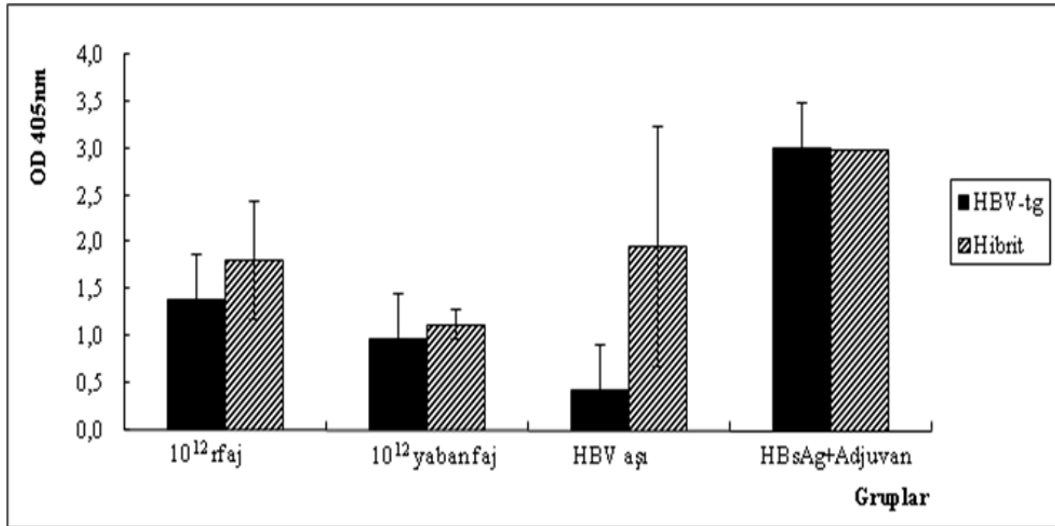
Üçüncü immünizasyondan sonra fare plazmalarında oluşan antikor yanıt incelendiğinde, rfaj'ın HBV-tg ve hibrit farelerde yabancı faja göre daha etkin anti-HBsAg yanıtını tetiklediği tespit edildi (Şekil 3.6). Freund's adjuvanıyla birlikte ticari antijen ile immünize edilen farelerde her iki fare grubunda da antikor yanıtı görülürken, alüminyum adjuvanı ile hazırlanmış ticari aşılarda yapılan immünizasyonlarda sadece hibrit grupta etki görüldü (Şekil 3.6).

Dördüncü immünizasyondan sonra, HBV-tg ve hibrit farelerde rfajın yabancı faja karşı oluşturduğu daha etkin anti-HBsAg yanıtının devam ettiği belirlendi. Ticari aşının HBV-tg farelerde antikor yanıtı uyandırmadığı, fakat Freund's adjuvan kullanılarak plazmadan saflaştırılan ticari antijen ile immünize edilen

farelerde immün toleransın kırıldığı ve HBV-tg ve hibrit farelerde benzer anti-HBsAg yanıtı neden olduğu tespit edildi (Şekil 3.7).



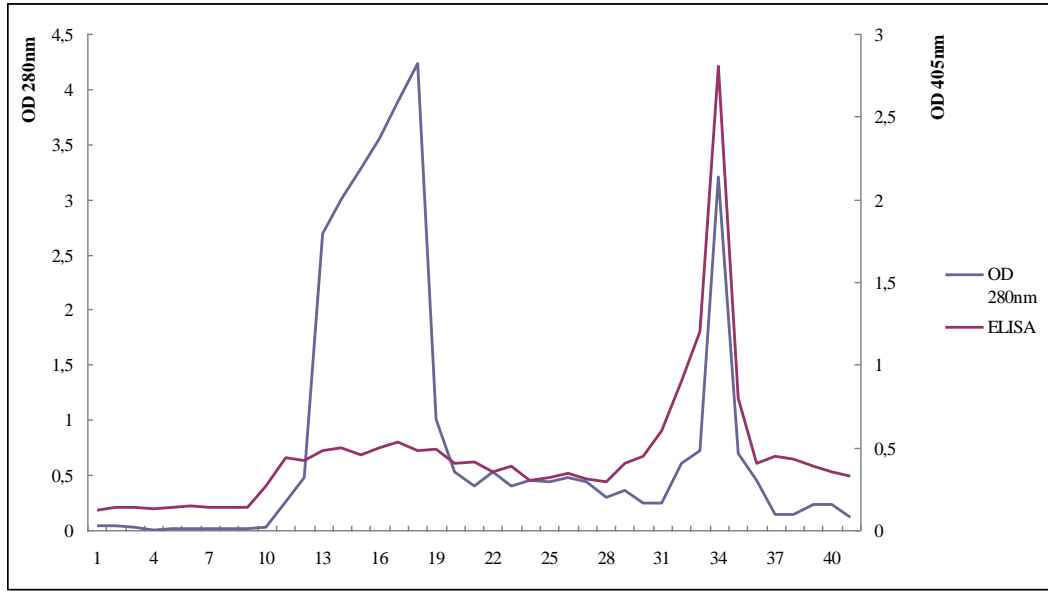
Şekil 3.6. rFaj, yaban faj, ticari HBV aşı ve Freund's adjuvanı+HBsAg ile immünize edilen HBV-tg ve hibrit farelerde üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan anti-HBsAg yanıtı



Şekil 3.7. rFaj, yaban faj, ticari HBV aşı ve Freund's adjuvanı+HBsAg ile immünize edilen HBV-tg ve hibrit farelerde dördüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan anti-HBsAg yanıtı

3.2. Anti-HBsAg Monoklonal Antikorumun Saflaştırılması

Anti-HBsAg monoklonal antikor üreten hibrit hücre TUBİTAK-MAM-GMBE’de daha önceki çalışmalar kapsamında elde edilmiştir. Yapılan bu çalışmada kullanılan anti-HBsAg monoklonal antikorunu üreten hibrit hücre kültür üst sıvısından 500 ml biriktirildi. Daha sonra amonyum sülfat çöktürmesi, diyaliz ve afinite kolon kromatografisi (Protein A) kullanılarak 2.5 mg/ml monoklonal antikor saflaştırıldı. Şekil 3.8’de afinite kromatografisinde elde edilen fraksiyonların protein miktarını belirlemek için 280 nm dalga boyunda yapılan spektrofotometrik analiz sonuçları dikkate alınarak çizilen grafik bulunmaktadır. Fraksiyonlardaki anti-HBsAg monoklonal antikoru ELISA testi incelendi (Şekil 3.8) ve antikorun saflaştırıldığı tespit edildi.



Şekil 3.8. Anti-HBsAg monoklonal antikorun afinite kromatografisi ile saflaştırılması ve antikor içeren fraksiyonların belirlenmesi

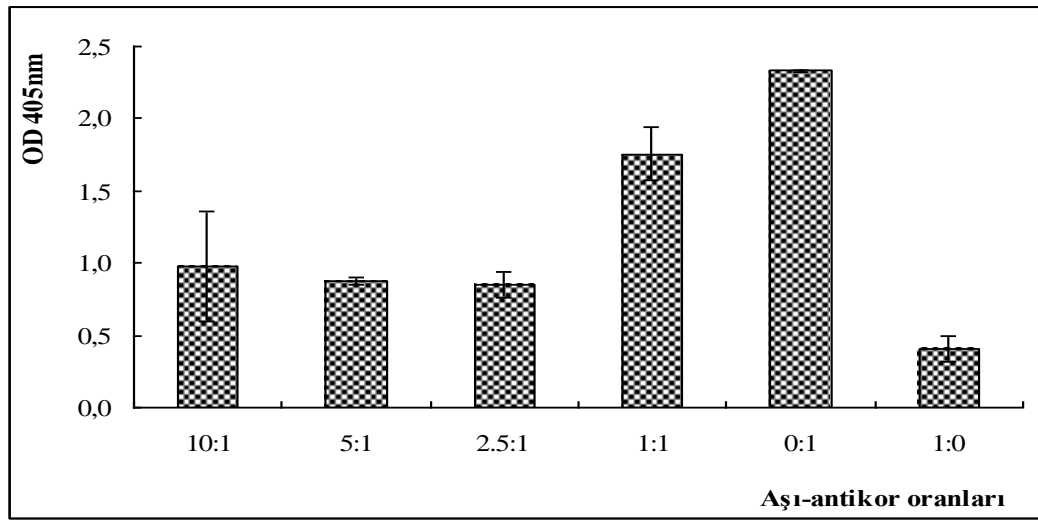
3.3. Ticari Aşı-anti-HBsAg Monoklonal Antikor Kompleksi ile BALB/c Farelerde Antikor Yanıtının Araştırılması Çalışmaları

3.3.1. Aşı-antikor kompleksi oluşturulması

Farklı oranlarda (10:1, 5:1, 2.5:1, 1:1, 0:1, 1:0) bir araya getirilen aşı ve monoklonal antikorun oluşturduğu aşı-antikor komplekslerinin tespiti için ELISA

testi uygulandı. Bu amaçla ELISA plaka kuyuları HBsAg ile kapladı ve kuyulara oluşturulan komplekslerden 5 µl eklenerek komplekslerden bulunan serbest antikor düzeyi araştırıldı.

Şekil 3.9’de yapılan ELISA testi sonucunda gruptaki absorban değerleri gösterilmektedir. Sadece antikor içeren grup en yüksek absorban değerini verdiği tespit edildi ve bu değere göre kompleks gruplarından elde edilen absorban değerleri karşılaştırıldığında en az azalmanın 1:1 oranında biraraya getirilmiş komplekste olduğu tespit edilirken, 10:1, 5:1 ve 2.5:1 komplekslerindeki azalmanın yaklaşık olarak aynı olduğu belirlendi.

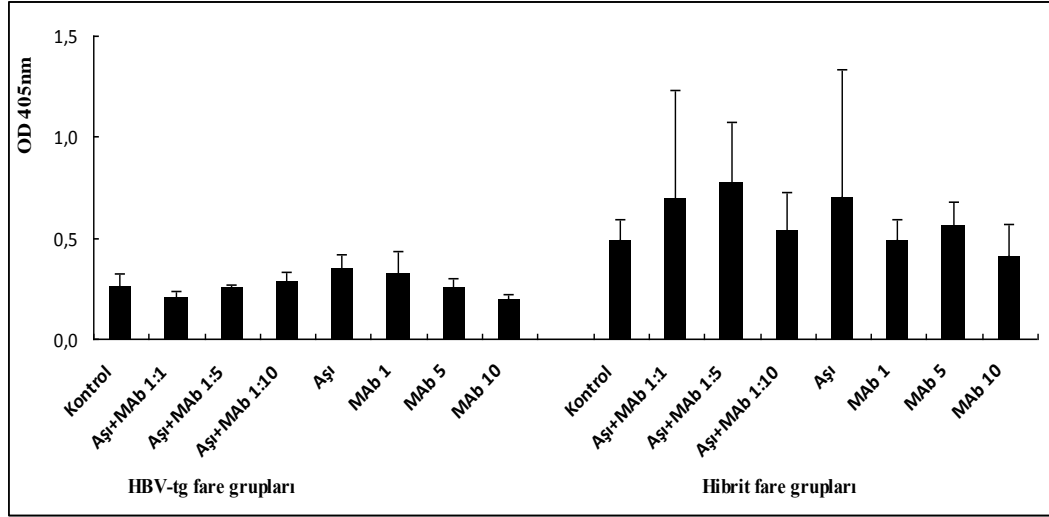


Şekil 3.9. Farklı oranlarda bir araya getirilen ticari HBV aşısı ve HBsAg’ye özgül monoklonal antikor ile oluşturulan aşı-antikor kompleksinin birleşim oranlarının tespiti için yapılan ELISA testi sonuçları

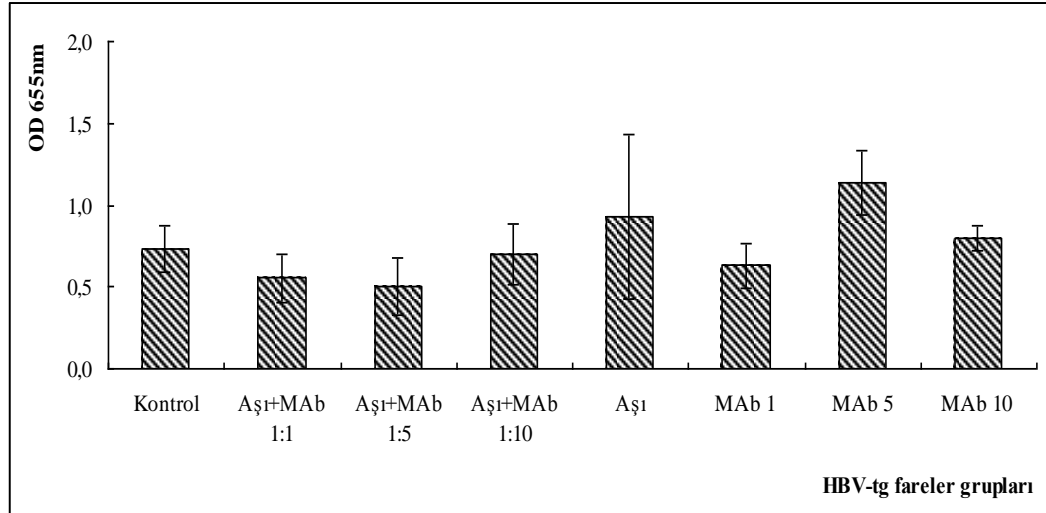
3.3.2. Aşı-antikor kompleksi immünizasyonları

Tez çalışmaları kapsamında aşı-antikor kompleksi ile üç farklı çalışma yapıldı. Bu çalışmaların ilkinde 1 µg ticari HBV aşısı, farklı oranlarda (1:1, 1:5, 1:10) anti-HBsAg monoklonal antikorunu ile bir araya getirilerek aşı-antikor kompleksleri oluşturuldu. HBV-tg ve hibrit farelere, aşı-antikor kompleksleri, ticari aşı ve 1, 5, 10 µg monoklonal antikor (MAb) intraperitonel olarak üç kez immünize edildi. ELISA testinin kontrol grubu olarak immünizasyon yapılmamış fareler kullanıldı. Üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra fare plazmalarında

oluşan anti-HBsAg miktarı ve plazmadaki HBsAg seviyesindeki değişim ELISA yöntemiyle araştırıldı. Elde edilen sonuçlarda her iki fare türünde deney gruplarında oluşan anti-HBsAg yanıt kontrol grupları ile karşılaştırıldığında istatistiksel anlamlı fark tespit edilemedi (Şekil 3.10). Ayrıca HBV-tg fare plazmasındaki HBsAg miktarında da bir azalma tespit edilemedi (Şekil 3.11).

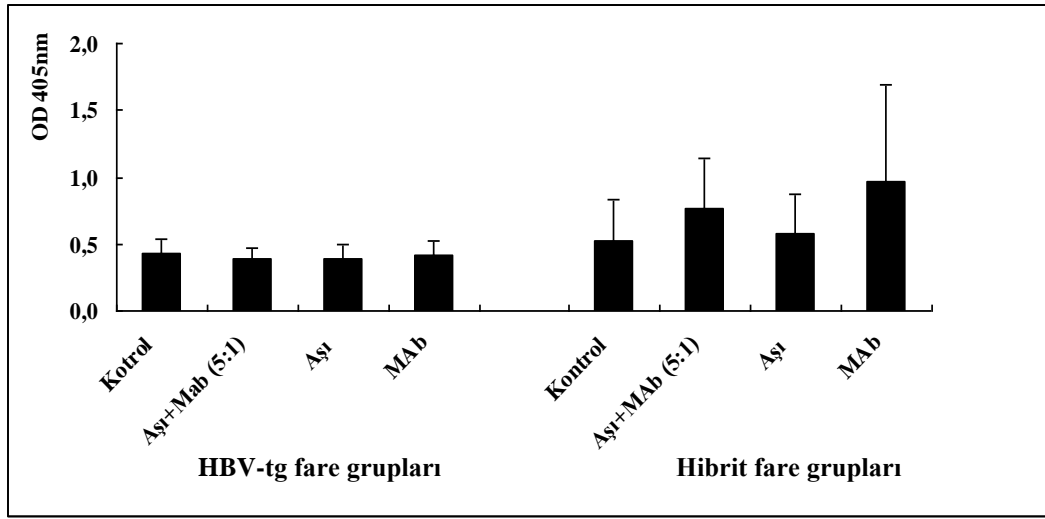


Şekil 3.10. HBV-tg ve hibrit farelerin üç farklı oranda (1:1, 1:5, 1:10) bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, ve 1µg, 5µg, 10µg antikorlar ile üç kez immününize edildikten sonra oluşan antikor yanıt

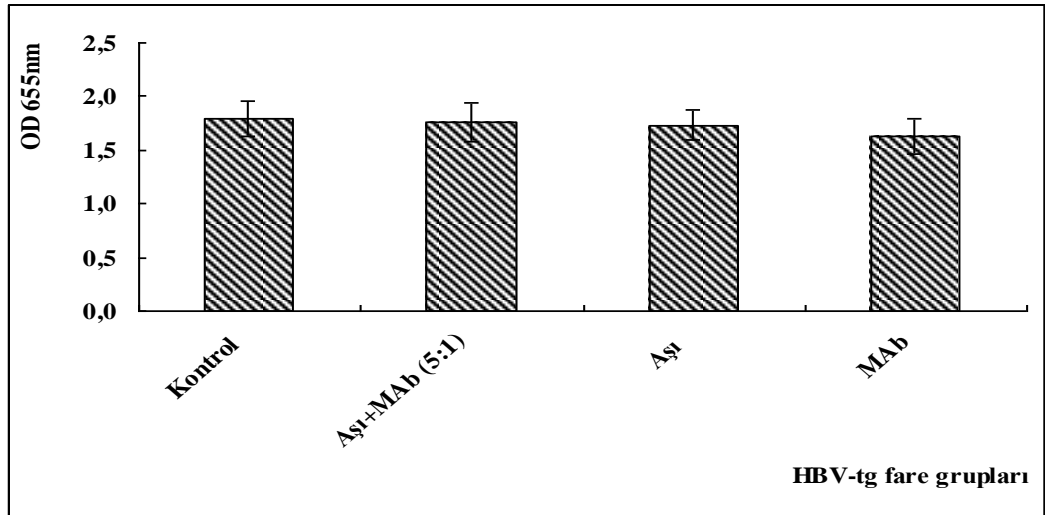


Şekil 3.11. HBV-tg farelerin üç farklı oranda (1:1, 1:5, 1:10) bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, veya 1 µg, 5 µg, 10 µg antikorlar ile üç kez immününize edildikten sonra fare plazmasında HBsAg değişimi

Yapılan ikinci çalışmada, ilk çalışmada kullanılan 1:5 aşı-antikor grubu seçilerek, deney her iki fare türünde de tekrarlandı. Gruplar sırasıyla kontrol, aşı, aşı-antikor ve antikordan oluşturuldu. Üçüncü immunizasyondan bir hafta sonra gruplarda oluşan anti-HBsAg yanıt ve HBV-tg plazmasındaki HBsAg değişimi ELISA testi ile belirlendi. Elde edilen sonuçlar ilk yapılan çalışma ile paralel olarak deney grupları arasında anlamlı anti-HBsAg artışı (Şekil 3.12) ve HBsAg azalışı tespit edilemedi (Şekil 3.13).



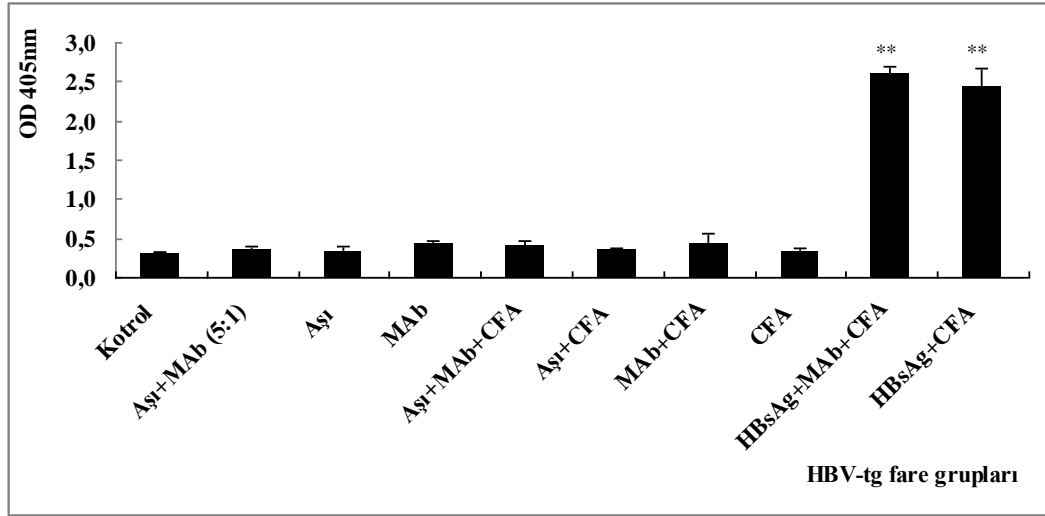
Şekil 3.12. HBV-tg ve hibrit farelerin 1:5 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı ve antikor ile üç kez immunünize edildikten sonra oluşan antikor yanıt



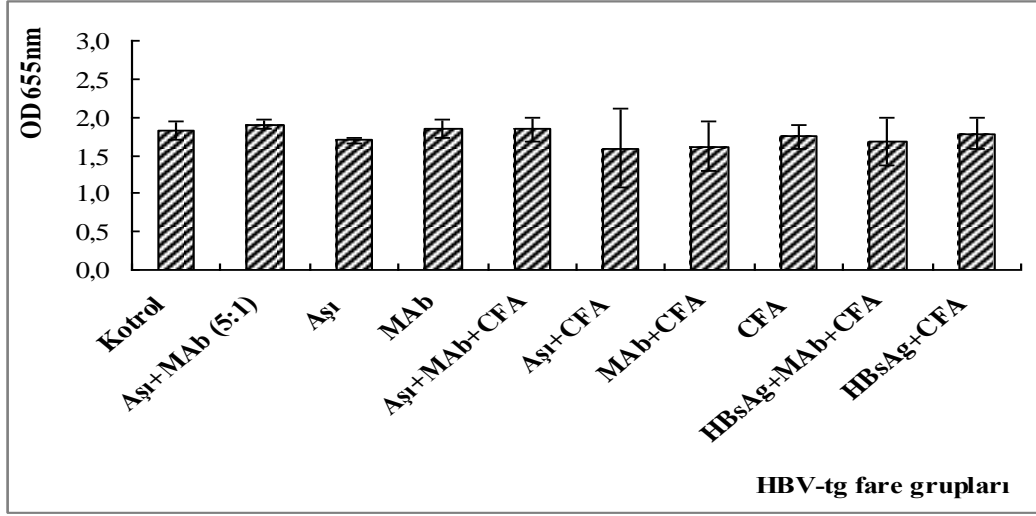
Şekil 3.13. HBV-tg farelerin 1:5 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, antikor ile üç kez immunünize edildikten sonra fare plazmasında HBsAg değişimi

Terapötik amaçlı yapılan aşı-antikor kompleksi immünizasyonlarının sonucunda çalışmada kullanılan aşı miktarı beş kat artırıldı ve aşı-antikor kompleksindeki oran 5:1 oranında değiştirildi. Daha önceki çalışmada kullanılan kontrolgruplarına ek olarak Freund's adjuvanı (ilk immünizasyonlar CFA, ikinci ve üçüncü immünizasyonlar IFA ile yapıldı) ile hazırlanmış aşı, aşı-antikor, antikor ve ticari HBs antijeni grupları eklendi. Üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra elde edilen sonuçlarda anti-HBsAg yanıt sadece ticari antijen ve ticari antijen-antikor kompleksinde elde edildi. Kontrol grubu ile karşılaştırıldığında ticari antijen-antikor kompleksinde 8.3 kat daha fazla antikor yanıt oluştu. Ticari antijen ile immünize edilen grupta ise bu oran 7.8 olarak tespit edildi (Şekil 3.14). Ancak tüm grupların plazmasındaki HBsAg düzeyinde herhangi bir azalma tespit edilmedi (Şekil 3.15).

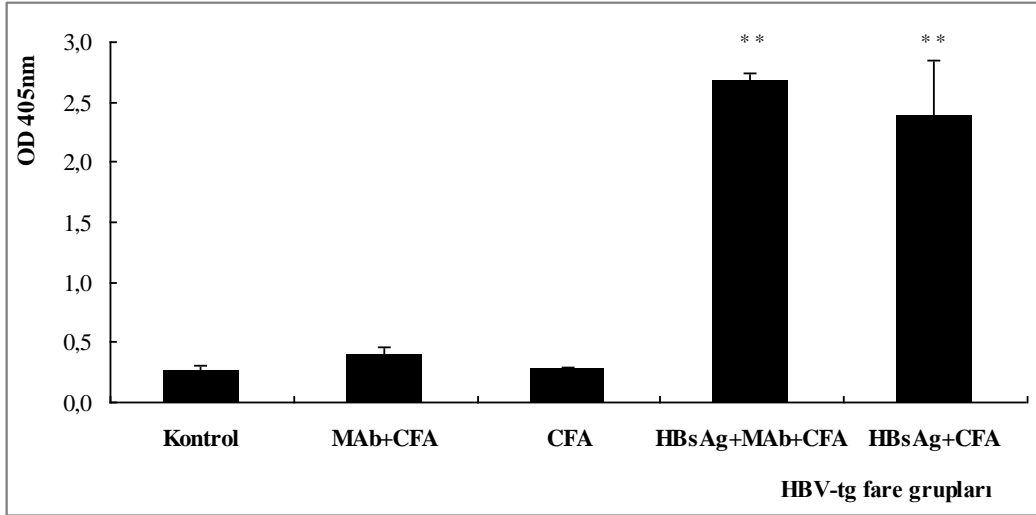
Üçüncü immünizasyon bir ay sonra, ticari antijen gruplarında antikor seviyesinin devam ettiği tespit edildi (Şekil 3.16). Ancak HBsAg miktarında bir değişim gözlenmedi (Şekil 3.17).



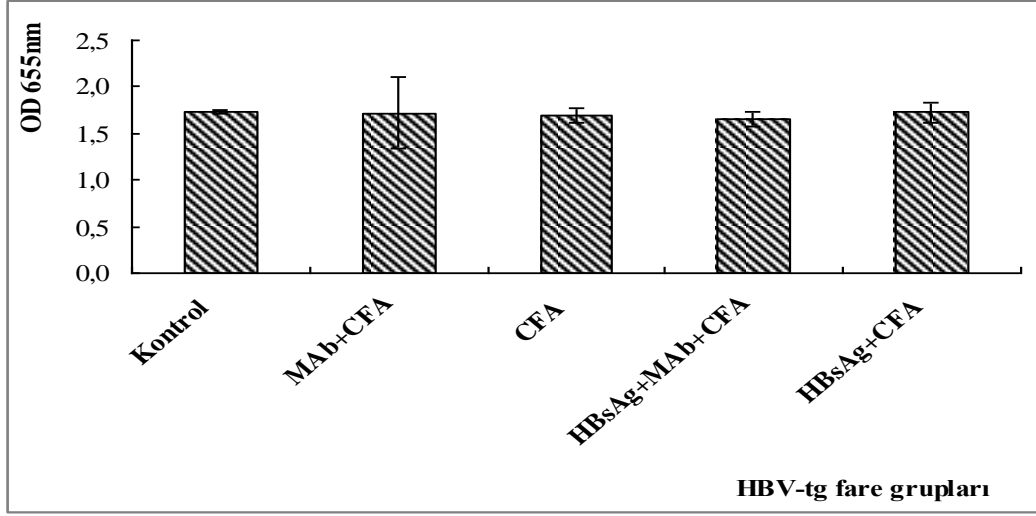
Şekil 3.14. HBV-tg fareler 5:1 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, antikor (Mab) ve Freund's adjuvan (CFA) kompleks halde üç kez immünize edildi. Ayrıca HBV-tg fareler sadece adjuvan ya da adjuvan ile kompleks ticari HBsAg veya sadece ticari antijen-antikor ve adjuvan kompleksi ile immünize edildi ve üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan anti-HBsAg yanıt ölçüldü. Anlamlılık değeri **p<0.001



Şekil 3.15. HBV-tg fareler 5:1 oranında bir araya getirilmiş aşı-antikor kompleksi, aşı, antikor (MAb), Freund's adjuvan (CFA) kompleks halde üç kez immünize edildi. Ayrıca HBV-tg fareler sadece adjuvan ya da adjuvan ile kompleks ticari HBsAg veya sadece ticari antijen-antikor ve adjuvan kompleksi ile immünize edildi. Üçüncü immünizasyondan bir hafta sonra oluşan plazmada HBsAg değişimi ELISA'da ölçüldü



Şekil 3.16. Üçüncü terapötik immünizasyon çalışmasında, üçüncü immünizasyondan bir ay sonra ticari antijen kullanılan gruplar ve diğer kontrol gruplarındaki antikor yanıt. Anlamlılık değeri $**p<0.001$

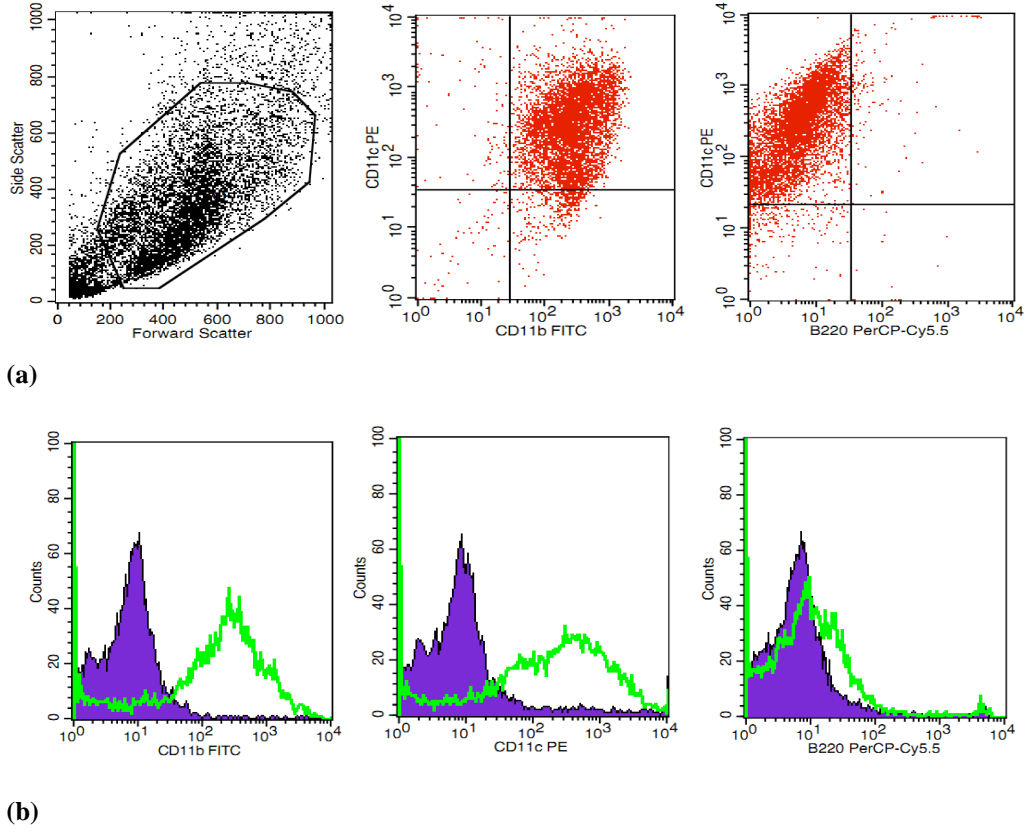


Şekil 3.17. Üçüncü terapötik immünizasyon çalışmasında, üçüncü immünizasyondan bir ay sonra ticari antijen kullanılan gruplar ve diğer kontrol grupların plazmasındaki HBsAg değişimi

3.4. Dentritik Hücre Aşı Çalışmaları

3.4.1. Kemik iliği hücrelerinin dentritik hücelere farklılaştırılması

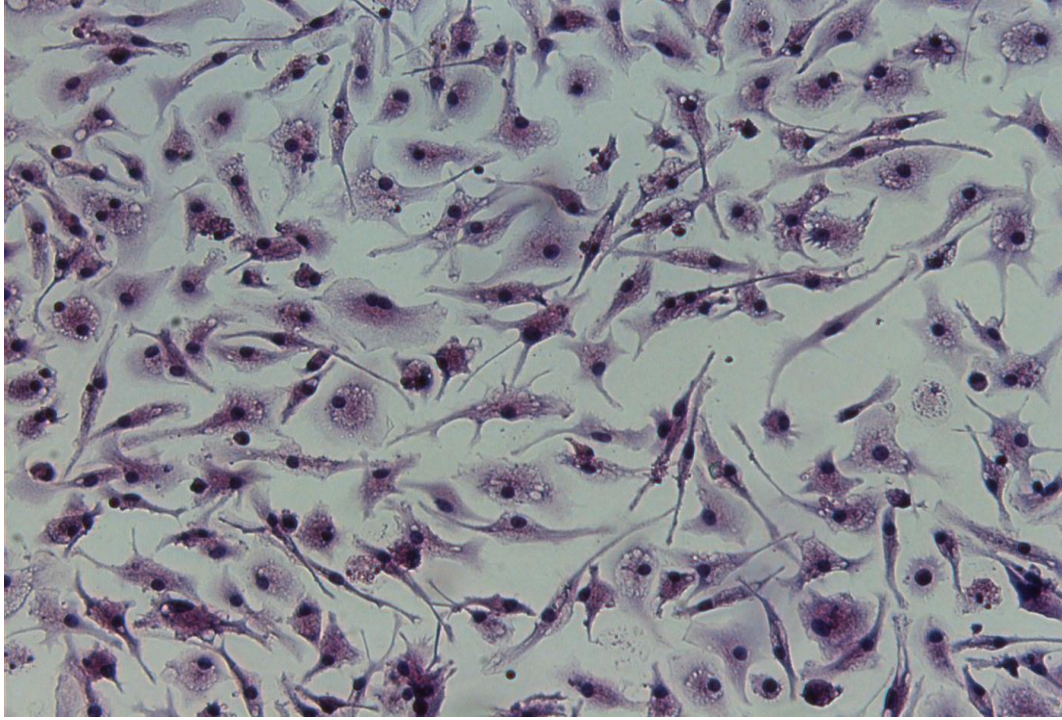
HBV-tg farelerin kemik iliği hücreleri femur ve tibia'dan elde edildikten sonra GM-CSF ve IL-4 içeren besiyeri ile altı gün 37°C'de ve % 5 CO₂ inkübe edildikten sonra petriden pipetleme ve versene solüsyonu kullanılarak süspanse hale getirildi. DC farklılaşma reseptörleri (CD11b⁺ CD11c⁺ B220⁻) akım sitometri cihazında incelendiğinde canlı hücrelerin yaklaşık % 95 oranında mDC'ye farklılaştığı tespit edildi. Tüm hücrelerin ise % 70'den fazlasının mDC'ye farklılaştığı belirlendi. pDC oranı ise canlı hücrelerin % 2'sini, tüm hücrelerin ise % 1'ni oluşturmaktadır (Şekil 3.18a). CD11b, CD11c ve B220 reseptörlerinin ekspresyon düzeyi akım sitometri cihazında histogram diagramı olarak incelendiğinde CD11b ve CD11c reseptörleri izotiplerine göre farklılaşmaktadır (Şekil 3.18b).



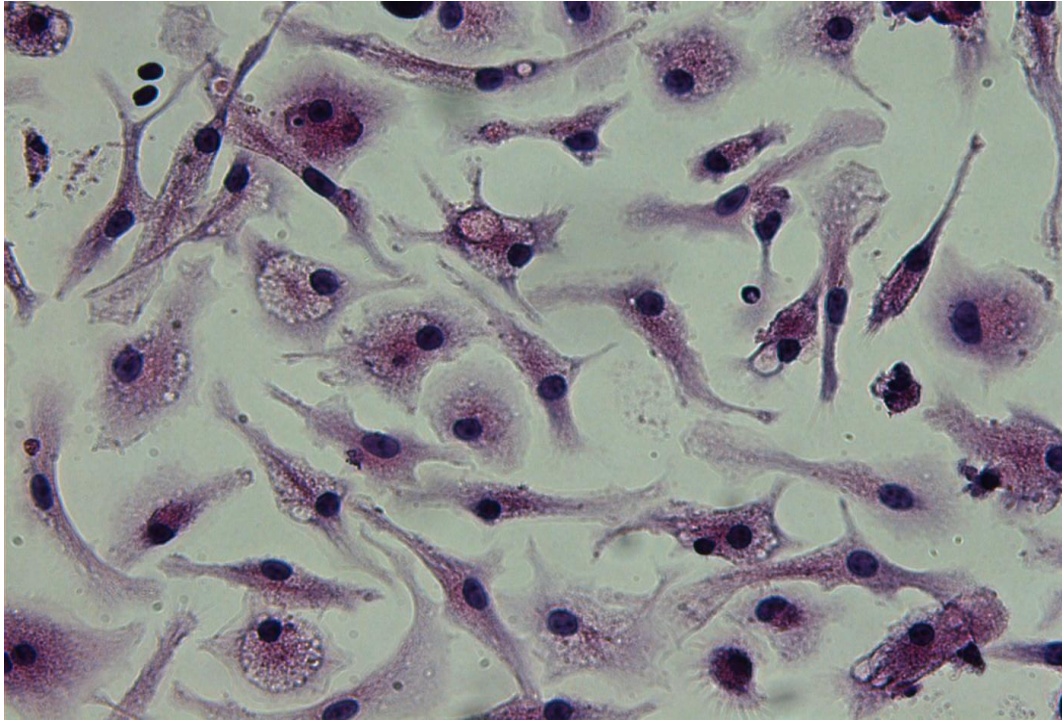
Şekil 3.18. HBV-tg farelerin kemik iliğinden hücreleri *in vitro* ortamda GM-CSF ve IL-4 ile inkübe edildiğinde altıncı günün sonunda kemik iliği hücreleri mDC'ye (CD11b⁺ CD11c⁺) farklılaşmasının tespiti için yapılan akım sitometri sonuçları. (a) Akım sitometri analizinde hücrelerin mDC'ye farklılaşmasının dot plot olarak gösterilmektedir. (b) Hücre yüzeylerinde CD11b, CD11c ve B220 farklılaşması histogram plot olarak gösterilmektedir. Mor renk izotiplere ait görüntü, yeşil renk ise reseptörlere özgül antikorları belirtmektedir

3.4.2. Dentritik hücrelerin morfolojik analizi

HBV-tg kemik iliği hücrelerinin *in vitro* ortamda mDC'ye farklılaşmasının morfolojik olarak tespiti için hücreler farklılaşmanın altıncı gününde hematoksilen eozin ile boyanmış ve hücrelerin yüzeyinden dışarı doğru membran uzantılarının varlığı gösterilerek morfolojik olarak dentritik hücrelere benzediği tespit edilmiştir (Şekil 3.19a ve Şekil 3.19b).



(a)



(b)

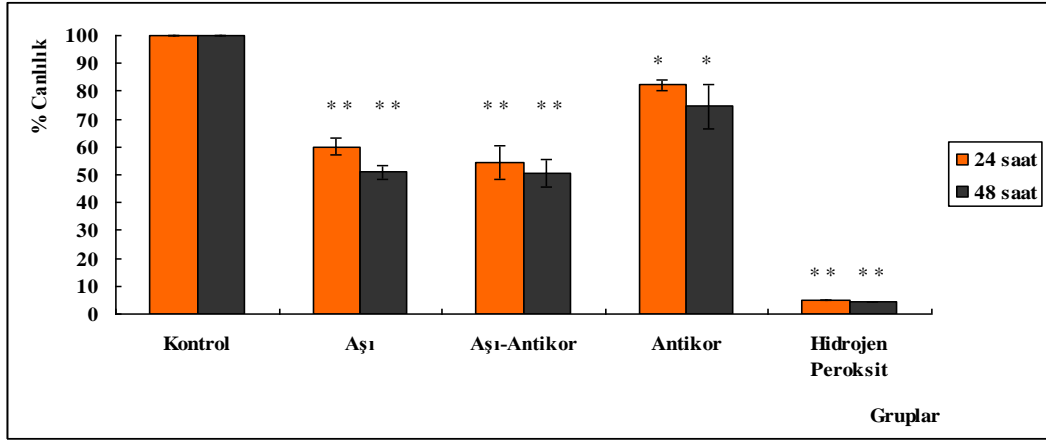
Şekil 3.19. HBV-tg fare kemik iliği hücrelerinin mDC'ye farklılaştığının tespiti için *in vitro* koşullardaki altıncı günde yapılan hemotoksilen eozin boyama görüntüleri. (a) 200×, (b) 400×

3.4.3. Dentritik hücrelerinin yüklenmesi için optimum aşı miktarının belirlenmesi

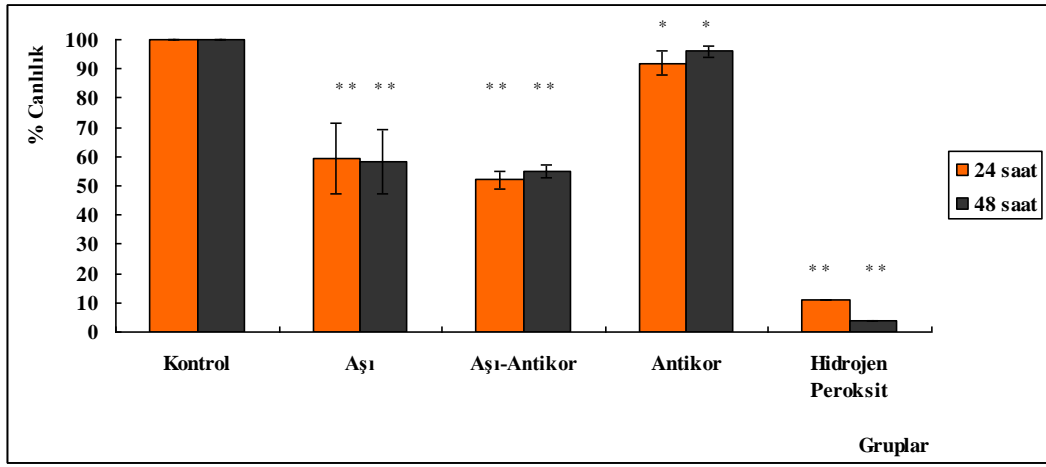
DC'lerin yüklenmesinde kullanılacak uygun aşı miktarının belirlenmesinde WST-1 ve BrdU testleri kullanıldı.

DC'ler iki farklı sayıda, üç farklı inkübasyon süresinde ve iki farklı konsantrasyonda aşı, aşı-antikor kompleksi ve antikor ile inkübe edilerek optimum doz belirlendi.

25×10^3 ve 50×10^3 DC 96 plaka kuyularına ekildi ve 24 saat ve 48 saat boyunca 144 ng HBsAg veya 28 ng HBsAg aşı, aşı-antikor veya antikor ile yüklendikten sonra her kuyuya 10 μ l WST-1 eklenerek iki saat inkübasyon süresi sonunda yüzde canlılık değeri hesaplandı. Yüksüz dentritik hücreler % 100 canlılık kabul edildi. Hücreler üzerine sitotoksik etkisi bilinen 10 μ l H₂O₂ negatif kontrol olarak kullanıldı. 144 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor veya 144 ng antikor ile yüklenen gruplarda 24 ve 48 saat inkübasyon süresi sonunda DC'lerin canlılık oranının yaklaşık % 55 olduğu tespit edildi (Şekil 3.20). Diğer taraftan 28 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor veya 28 ng antikor antikor ile yüklenen gruplarda ise canlılığın 50×10^3 hücrede 24 saat sonra yaklaşık % 90, 48 saat sonra ise yaklaşık olarak % 65 olduğu tespit edildi (Şekli 3.21a). 25×10^3 hücrede ise 24 saat inkübasyon süresi sonunda canlılığın % 70 olduğu, ancak 48 saat sonra aşı ile yüklü grupta canlılık % 65 gerilerken, aşı-antikor ile yüklü grupta canlılığın % 58 olduğu belirlendi (Şekil 3.21b).

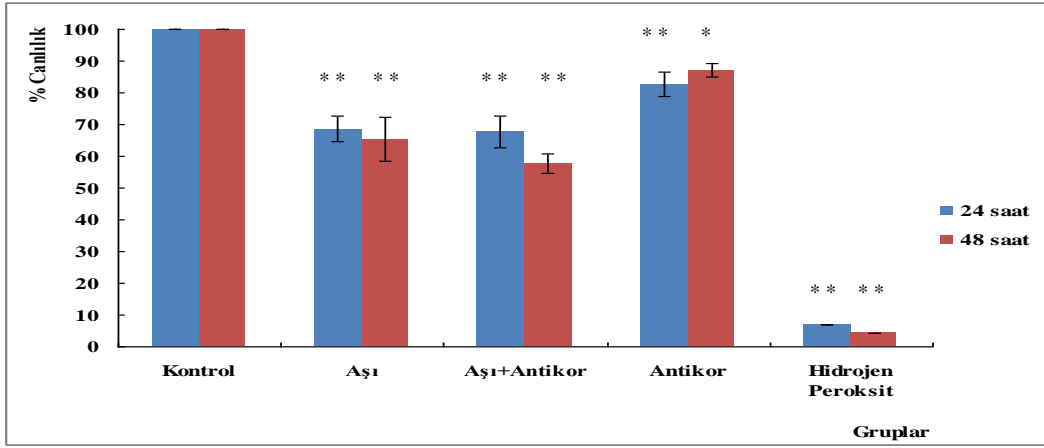


(a)

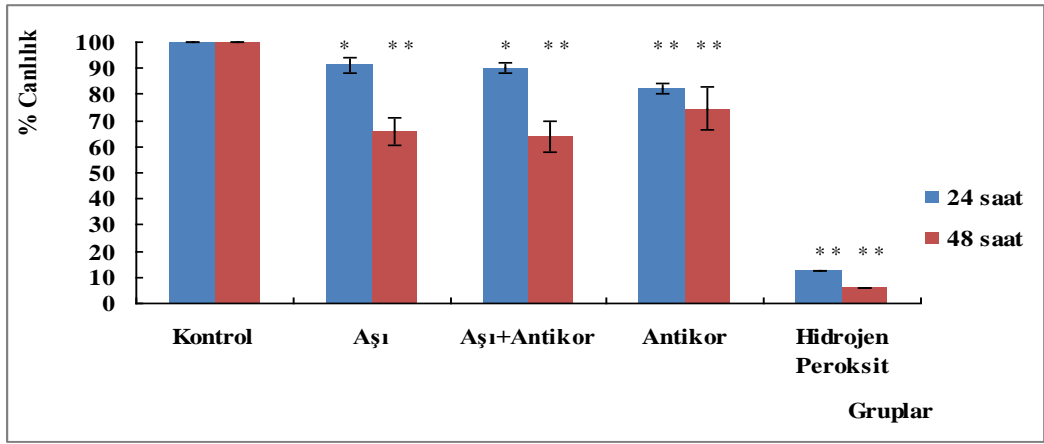


(b)

Şekil 3.20. İki farklı sayıdaki dentritik hücreler 144 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor veya antikor ile yüklendikten 24 ve 48 saat sonra yüzde canlılık oranları. (a) 50×10^3 hücre, (b) 25×10^3 hücre. Anlamlılık değeri $**p < 0.001$, $*p < 0.05$



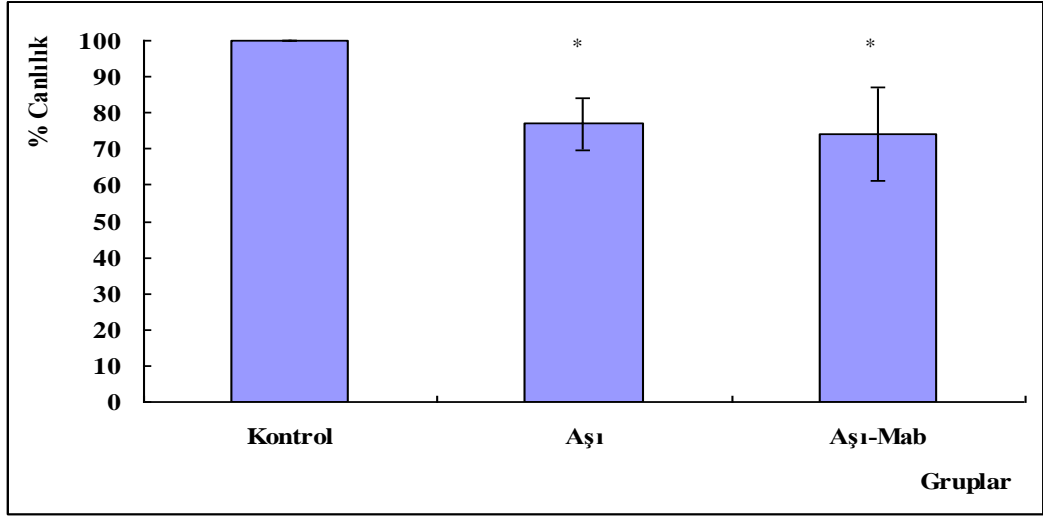
(a)



(b)

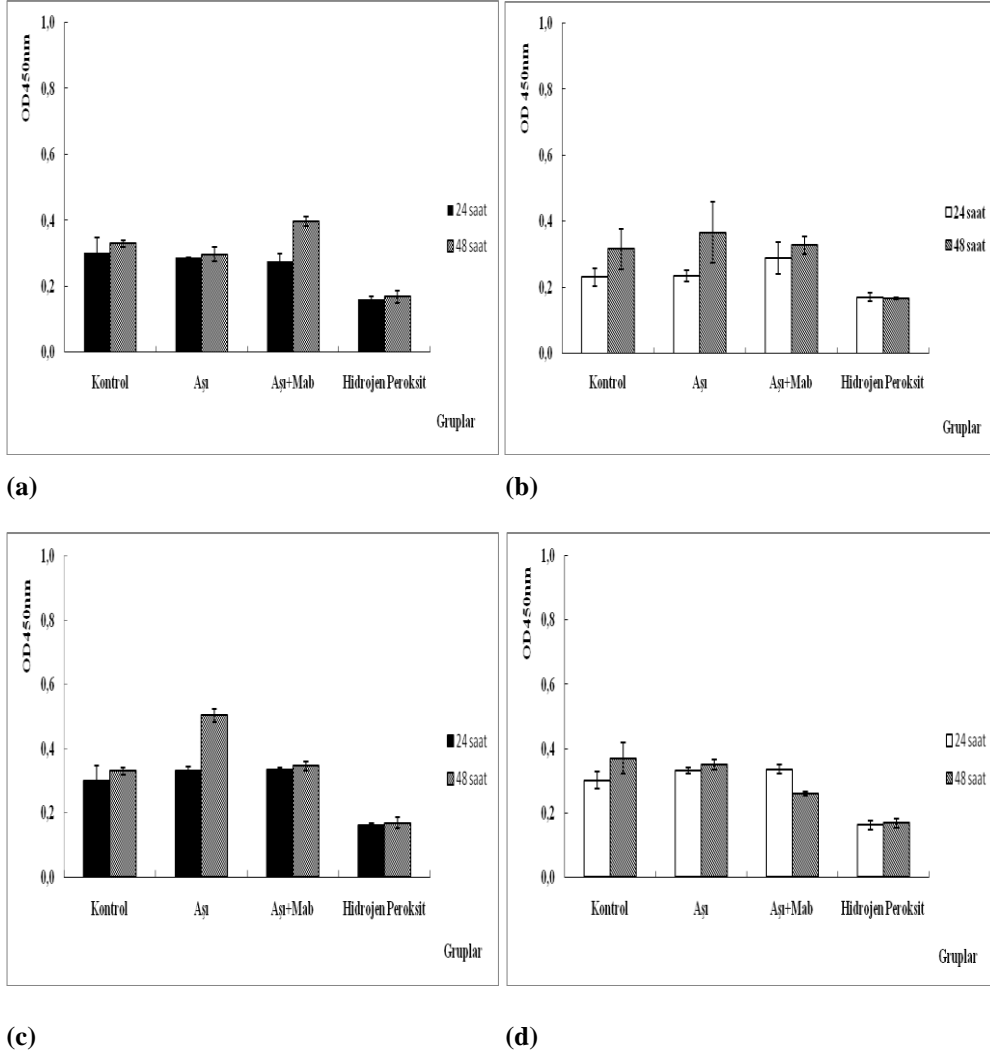
Şekil 3.21. İki farklı sayıdaki dentritik hücreler 28 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor veya 28 ng antikor ile yüklendikten 24 ve 48 saat sonra yüzde canlılık oranları. (a) 50×10^3 hücre, (b) 25×10^3 hücre. Anlamlılık değeri $**p < 0.001$, $*p < 0.05$

Ayrıca 50×10^3 hücre 144 ng HBsAg içeren aşı veya aşı-antikor kompleksi ile yüklenerek 4 saat inkübe edildiğinde hücrelerdeki canlılığın sırasıyla % 77 ve % 74 olduğu tespit edildi (Şekil 3.22).



Şekil 3.22. 50×10^3 dentritik hücre 4 saat aşı ve aşı-antikor kompleksi ile yüklendikten sonra hücre canlılıkları. Anlamlılık değeri * $p < 0.05$

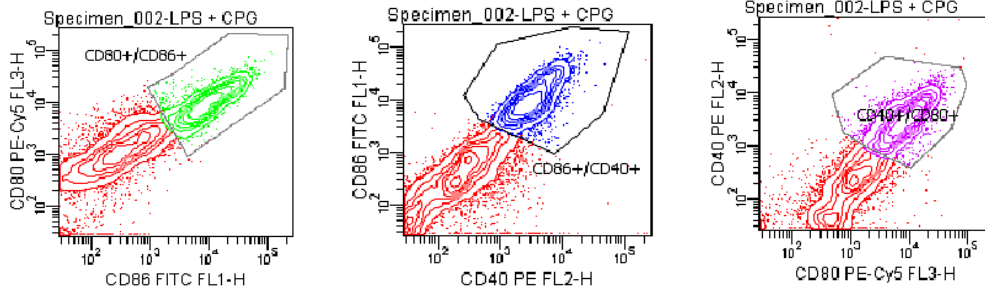
Hücre çoğalmasının belirlenmesinde kullanılan BrdU deneyi optimum aşı dozunun belirlenmesinde kullandığında gruplar arasında anlamlı bir fark tespit edilemedi (Şekil 3.23).



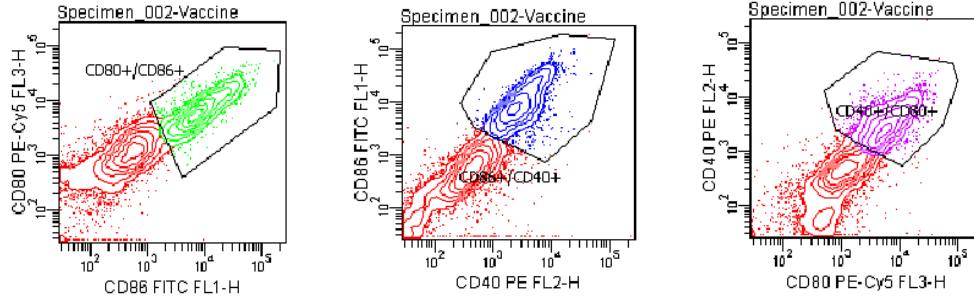
Şekil 3.23. İki farklı sayıdaki dendritik hücrenin aşı, aşı-antikor kompleksi ile 24 ve 48 saat yüklendikten sonraki hücre çoğalmasının belirlenmesi için BrdU testi sonucu. 144 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor kompleksi ile yüklü gruplar (a) 50×10³ DC (b) 25×10³ DC. 28 ng HBsAg içeren aşı, aşı-antikor kompleksi ile yüklü gruplar (c) 50×10³, (d) 25×10³. Yapılan çalışmada 10 µl hidrojen peroksit negatif kontrol grubu olarak kullanıldı

3.4.4. Yüklü dendritik hücrelerin olgunlaşmasının tespiti

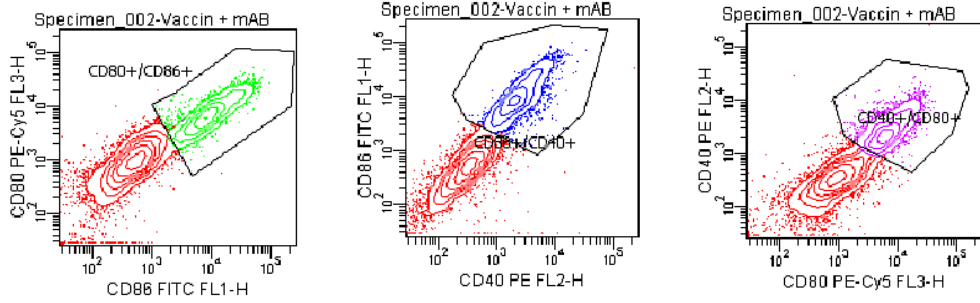
1.5×10⁶ dendritik hücre 5 µg/3.5 ml aşı, aşı-antikor kompleksi ve antikor ile yüklendi. Kontrol grubu olarak yüksüz dendritik hücreler kullanıldı. DC'ler 5 saat inkübe edildi ve hücrelerin CD40, CD80 ve CD86 reseptörlerinin düzeylerindeki değişim incelendiğinde ekspresyon düzeylerindeki bakımından anlamlı bir fark bulunamadı (Şekil 3.24, Çizelge 3.2).



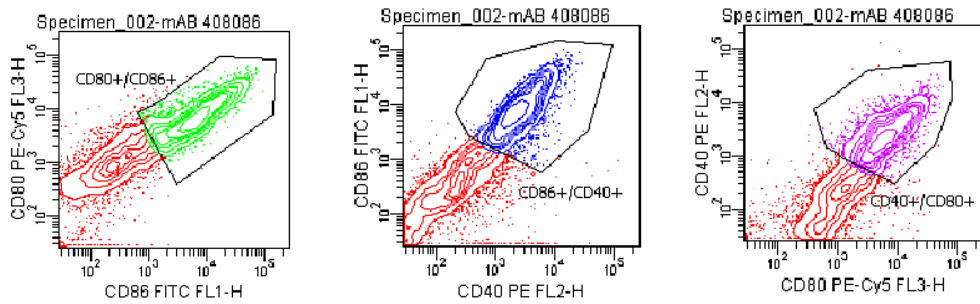
(a) LPS+CpG ile yüklü dentritik hücreler



(b) LPS+CpG+Aşı ile yüklü dentritik hücreler



(c) LPS+CpG+Aşı+MAb ile yüklü dentritik hücreler



(d) LPS+CpG+MAb ile yüklü dentritik hücreler

Şekil 3.24. LPS+CpG, LPS+CpG+Aşı, LPS+CpG+Aşı+MAb ve LPS+CpG+MAb ile yüklü dentritik hücrelerin CD40, CD80 ve CD86 reseptörlerinin farklılaşmasının akım sitometri sonuçları

Çizelge 3.2. Yüklü dentritik hücrelerde CD40, CD80 ve CD86 ekspresyon oranları

Tube: LPS+CpG			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	7,544	75.4	75.4
CD80+/CD86+	2,874	38.1	28.7
CD86+/CD40+	2,757	36.5	27.6
CD40+/CD80+	3,404	45.1	34.0
CD80+/CD86+/CD40+	2,706	35.9	27.1

(a) Kontrol grubu sadece LPS ve CpG ile yüklü

Tube: Aşı			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	7,316	73.2	73.2
CD80+/CD86+	2,643	36.1	26.4
CD86+/CD40+	2,582	35.3	25.8
CD40+/CD80+	2,693	36.8	26.9
CD80+/CD86+/CD40+	2,412	33.0	24.1

(b) Aşı ile yüklü dentritik hücreler

Tube: Aşı-MAb			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	7,398	74.0	74.0
CD80+/CD86+	2,309	31.2	23.1
CD86+/CD40+	2,298	31.1	23.0
CD40+/CD80+	2,082	28.1	20.8
CD80+/CD86+/CD40+	2,007	27.1	20.1

(c) Aşı-Antikor ile yüklü dentritik hücreler

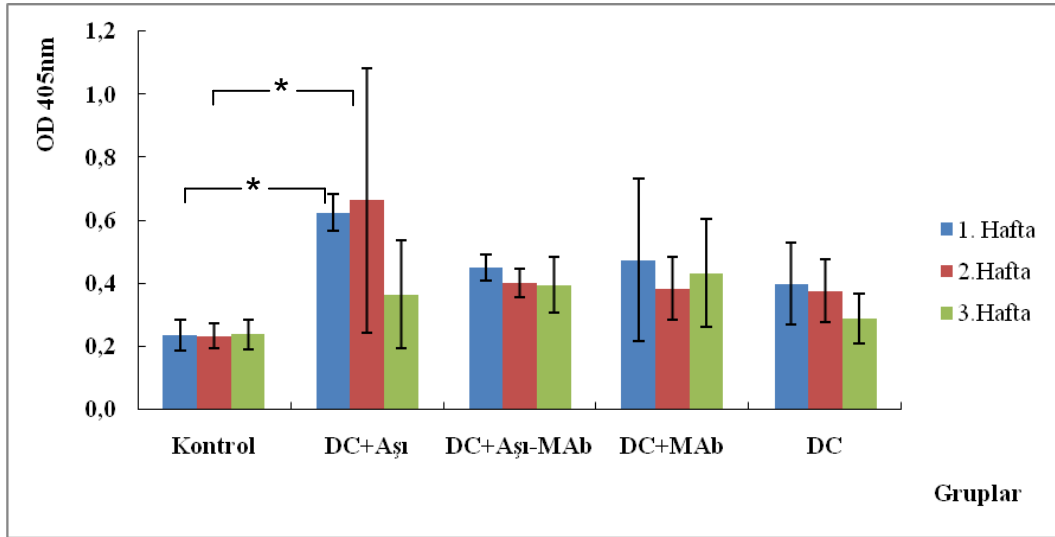
Tube: MAb			
Population	#Events	%Parent	%Total
All Events	10,000	###	100.0
P1	7,118	71.2	71.2
CD80+/CD86+	3,786	53.2	37.9
CD86+/CD40+	3,430	48.2	34.3
CD40+/CD80+	3,926	55.2	39.3
CD80+/CD86+/CD40+	3,356	47.1	33.6

(d) Antikor ile yüklü dentritik hücreler

3.4.5. Dentritik hücre aşısının HBV-tg farelerdeki terapötik etkisi

3.4.5.1. Anti-HBsAg yanıt

HBV-tg fareler aşı, aşı-antikor kompleksi (DC+MAb), antikor (MAb) ile yüklü veya yüksüz dentritik hücreler (DC) bir hafta ara ile iki kez intraperitoneal olarak immünize edildikten sonra farelerde oluşan anti-HBsAg yanıt ikinci immünizasyondan sonraki birinci, ikinci ve üçüncü haftada ELISA yöntemiyle incelendi. Tüm gruplarda oluşan antikor miktarının kontrol grubuna göre daha fazla olduğu tespit edildi. Ancak gruplar arasında, antikor yanıt açısından istatistiksel olarak tek anlamlık yanıtın aşı ile yüklü dentritik hücrelerin immünize edildiği grupta ilk iki hafta sonunda tespit edildi (Şekil 3.25).

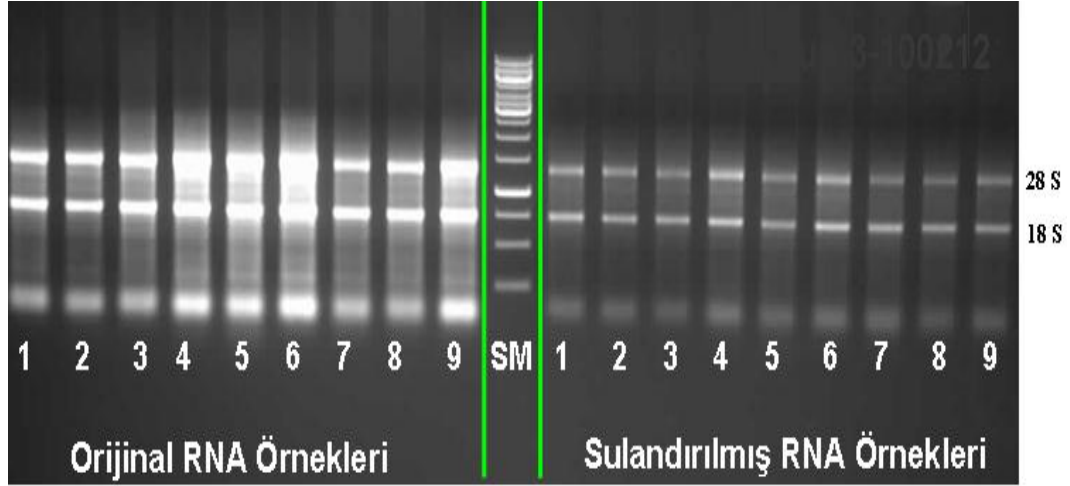


Şekil 3.25. Aşı, aşı-antikor (Aşı-MAb) ve antikor (MAb) ile yüklü veya yüksüz dentritik hücreler ile HBV-tg farelerde ikinci immünizasyondan bir, iki ve üç hafta sonra oluşan anti-HBsAg yanıt. Anlamlılık * p<0.05

3.4.5.2. HBV-tg fare karaciğer dokusunda HBV S gen ekspresyon değişimi

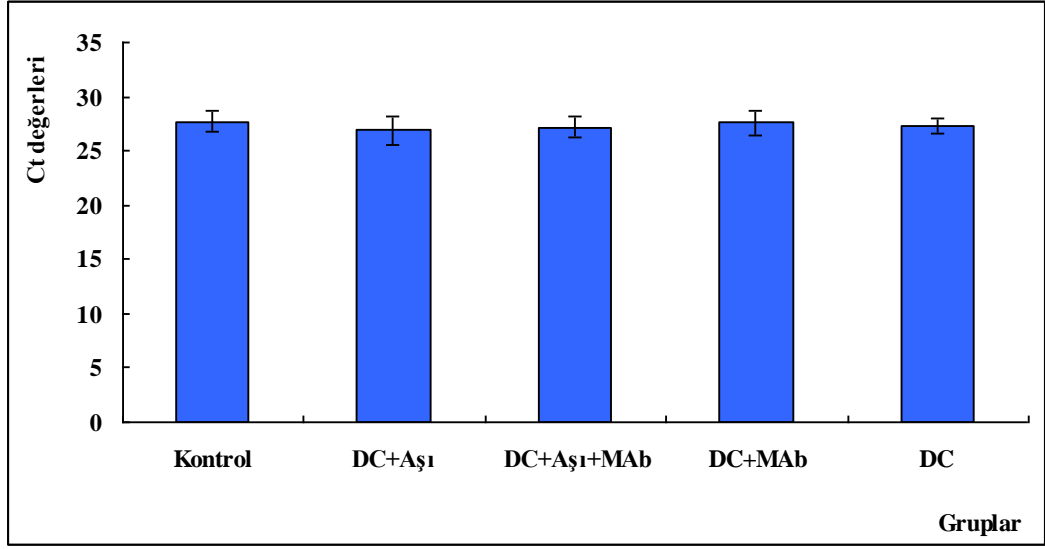
Karaciğer dokusundan trizol kullanılarak elde edilen RNA izolasyonu sonucu elde edilen RNA örnekleri belirli bir oranda seyrettilerek konsantrasyonları eşit hale getirildi. Hazırlanan sulandırılmış RNA örneklerinin konsantrasyonları

tekrar spektroskopik ölçüm yapılarak ve agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Şekil 3.26'da DC aşı çalışmasının ikinci setine ait farelerin karaciğer dokularından elde edilen RNA'ların jel elektroforez görüntüleri gösterilmektedir.



Şekil 3.26. İkinci set çalışmada elde edilen RNA örneklerinin jel elektroforez görüntüleri. 1 ve 2 kontrol; 3, DC+Aşı; 4 ve 5, DC+Aşı-MAB; 6 ve 7, DC+MAB; 8 ve 9, DC gruplarını temsil etmektedir

Seyretilmiş RNA'lardan 1 µg alınarak Roche Transcriptor High Fidelity cDNA Synthesis Kit kullanılarak cDNA'ya çevrildi. Daha sonra virüsün S genine özgü primerler ve SYBR Green kit kullanılarak RT-qPCR çalışması yapıldı. Yapılan çalışmada, aşı, aşı-antikor kompleksi, antikor ile yüklü veya yüksüz dentritik hücrelerin terapötik etkisi HBV-tg farelerin karaciğer dokusunda sentezlenen virüse ait S genininden ekspresyon düzeyindeki değişim incelendi. Elde edilen sonuçlarda, ikinci immünizasyondan üç hafta sonra fare karaciğer dokusundan tüm grupların HBsAg ekspresyon düzeyleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Şekil 3.27).

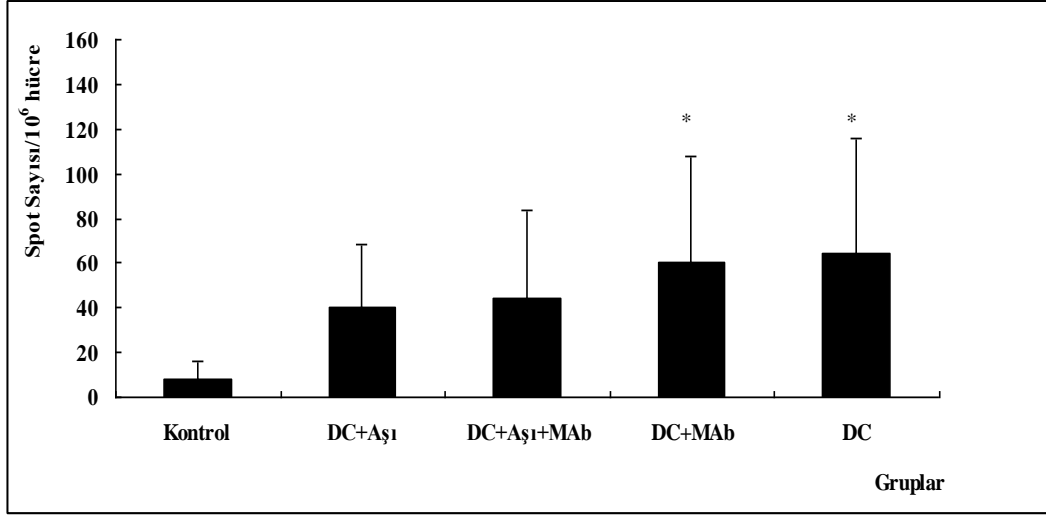


Şekil 3.27. Dentritik hücre aşısı uygulanan farelerin karaciğerler dokusunda HBsAg sentezindeki değişimin tespiti için yapılan RT-qPCR çalışmasının sonuçları

3.4.5.3. IFN- γ salgı düzeyindeki değişimin ELISPOT yöntemiyle tespiti

Dentritik hücre immünizasyonları yapılan HBV-tg farelerin dalak hücrelerinin salgıladığı IFN- γ düzeyindeki değişim ELISPOT yöntemiyle araştırıldı. İkinci immünizasyondan üç hafta sonra fare dalakları izole edilerek süspansiyon haline getirildi ve IFN- γ özgül birinci antikor kaplı kuyulara ekildi. Kuyulara 125×10^3 dalak hücrelerini uyarması için 25×10^3 aşısı ile yüklenmiş dentritik hücre eklendi. Hücreler 18 saat inkübe edildikten sonra ikincil antikor ve daha sonra substrat eklenerek kuyularda spot oluşması sağlandı.

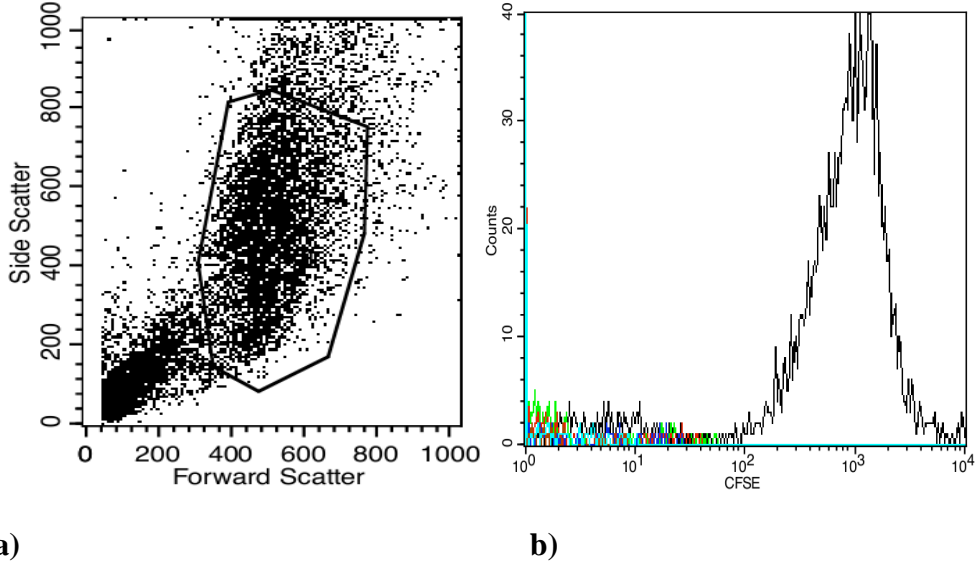
Elde edilen sonuçlarda yüksüz veya MAb ile yüklü dentritik hücreler ile immünizeli farelerin dalak hücrelerinde IFN- γ salgılama düzeyinde anlamlı bir artış olurken aşısı veya aşısı-MAb ile yüklü dentritik hücreler ile immünize edilen farelerin dalak hücrelerinde anlamlı bir artış tespit edilemedi (Şekil 3.28).



Şekil 3.28. HBV-tg farelerin dalak hücrelerinde IFN- γ salgılanmasındaki değişim ELISPOT yöntemi ile araştırıldığında elde edilen sonuçlar. Anamlılık değeri * $p < 0.05$

3.4.6. Dentritik hücrelerin ikincil lenfoid organlara göçünün tespiti

Farelere intraperitoneal olarak immünize edilen dentritik hücrelerin ikincil lenfoid organlara (lenf nodları ve dalak) göç ettiğinin tespiti için dentritik hücreler CFSE ile işaretlendi ve 5×10^5 hücre hibrit farelere immünize edildi. 24 saat sonra lenfoid organlarda işaretli dentritik hücre araştırıldığına CFSE işaretli hücre tespit edilemedi (Şekil 3.29).



Şekil 3.29. 5×10^5 dendritik hücre hibrit farelere intraperitoneal olarak immünize edildikten 24 saat sonra fare dalak ve lenf nodlarına göçtünün tespiti için yapılan akım sitometri analizi. a) Süspanse haldeki CFSE işaretli hücrelerin arandığı bölge, b) Seçilen hücre topluluğundaki CFSE analizi. Siyah renk CFSE ile işaretli hücrelerin immünize edilmeden önceki CFSE düzeyi, kırmızı, yeşil, CFSE işaretli hücre ile immünize edilmemiş ilk hibrit farenin dalak ve lenf nodlarındaki CFSE oranı, mavi ve turkuaz rengi ikinci farenin dalak ve lenf nodlarındaki CFSE ile işaretli hücre analiz sonucunu yansıtmaktadır. Kahverengi çizgi CFSE işaretli dendritik hücre verilmeyen farenin dalağının analizi

4. TARTIŞMA ve SONUÇ

Hepatit B enfeksiyonu dünya genelinde önemli bir sağlık sorunudur. DSÖ verilerine göre insanlarda ölüme neden olan ilk on hastalık arasında bulunmaktadır [145]. Hepatit B hastalığından korunmada en önemli etmen aşılamaştır. Bu kapsamda Hepatit B aşılıları 1980'li yılların başından itibaren kullanılmaktadır [70]. Koruyucu etkinliğinin yüksek olmasına rağmen kronik böbrek hastalarında, immün yetmezliği olan bireylerde, obezlerde ve özellikle hepatit taşıyıcılarında ticari olarak kullanılan aşılıların etkinliği düşüktür [72, 76]. Tedavi amaçlı olarak ise nükleotid/nükleozid analogları ve interferonlar kullanılmaktadır, ancak bu yöntemin tedavi etkinliği düşüktür ve tedaviye dirençli mutantların gelişmesine yol açmaktadır [55,56]. Bu nedenle enfeksiyona karşı korunmada ve tedavide daha etkin başka yöntemlere ihtiyaç vardır.

Bu tez, kapsamında özellikle hepatit B taşıyıcılarında daha etkin olabilecek alternatif aşı çalışmaları gerçekleştirilmiştir. Çalışmanın birinci bölümünde faj gösterim tekniği kullanılarak oluşturulan rekombinant fajlar (rfaj)'ın antikor yanıt oluşturmadaki etkinliği araştırıldı. Tezin ikinci ve üçüncü bölümünde ise aşı-antikor kompleksi immünizasyonlarının ve dentritik hücre aşısı yönteminin HBV-tg farelerde oluşan immün toleransın kırılması ve terapötik etkisi araştırıldı.

Tezin birinci bölümünde sadece bakterileri enfekte etme özellikleri olan ve yüzeylerinde eksprese edilen antijenlerinlere karşı etkin bir antikor yanıt oluşmasına neden olan M13 faj kullanıldı. rFaj, TÜBİTAK MAM GMBE İmmünogenetik laboratuvarı tarafından TÜBİTAK TARAL 1007 projesi (Proje No:105G056) kapsamında faj gösterim tekniği kullanılarak M13 fajın P3 proteini üzerinde HBsAg'nin tüm a.a. dizisinin gösterilmesi ile oluşturuldu. rFajların antikor yanıt oluşturmadaki etkinliği ilk olarak BALB/c farelerde denendi. BALB/c farelerin farklı sayılarda rfaj ve yaban faj (M13) ile immünizasyonu sonucunda farelerde faj sayısının artması ile doğru orantılı olarak anti-HBsAg yanıtın arttığı ancak yaban fajın nonspesifik antikor yanıtı tetiklediği tespit edildi (Şekil 3.1). Oluşan nonspesifik antikor yanıtı azaltmak, HBsAg'ye karşı antikor yanıtı artırmak ve ayrıca faj yüzeyinde immüdominant epitopların maskelenmesi için, rekombinant fajın anti-faj monoklonal antikorlarıyla birlikte kompleks

oluşumu sağlandı. Daha sonra fareler faj-antikor kompleksi ile immünize edildi. Antikorlar aracılığı ile epitoplara maskelenmesi uzun yıllardır kullanılmaktadır [146,147]. Bu yöntem özellikle kanser hücrelerinde bulunan özgül antijenlere karşı monoklonal antikor geliştirilmesi çalışmalarında, kanser hücreleri ile kanser hücresi olmayan hücrelerin yüzey antijenlerine ait ortak epitoplara maskelenmesinde kullanılmaktadır [147]. Yaptığımız bu çalışmada faj karşı monoklonal antikor geliştirmek için hibridoma teknoloji kullanıldı. Elde edilen monoklonal antikor farklı konsantrasyonlarda rfaj ile bir araya getirilerek rfaj-antikor kompleksleri oluşturuldu. Daha sonra BALB/c fareler rfaj, rfaj-antikor kompleksleri, ticari aşı, antikor ve yaban faj grupları immünize edilerek gruplar arasında anti-HBsAg yanıt karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlarda yine yaban fajın rfaj'a göre daha etkin antikor yanıt oluşumuna neden olduğu tespit edildi. Daha önce yapılan çalışmalarda, M13 fajın kendi başına çok etkin bir şekilde antikor yanıt oluşturduğu Hashiguchi ve ark. [148] tarafından gösterilmiştir. Bu sonuç yaptığımız çalışmada yaban faj karşı elde edilen nonspesifik antikor yanıt ile paralellik göstermektedir. Meola ve ark. [81] tarafından yapılan çalışmalarda M13 fajın P8 proteini üzerinde HBsAg'nin farklı epitoplarını göstererek beş farklı fare türünde denediklerinde, farklı epitoplara farklı fare türlerinde, birbirinden farklı anti-HBsAg yanıt oluşturduklarını göstermişlerdir. Bu nedenle çalışmanın bir sonraki aşamasında BALB/cj fareler kullanılmıştır. BALB/cj farelerle yapılan immünizasyonlar sonrası 1×10^{12} rfaj'ın yaban faj göre daha etkin bir anti-HBsAg yanıt oluşturduğu tespit edildi (Şekil 3.5). BALB/cj farelerde elde edilen umut verici sonuçtan sonra insanlardaki kronik hepatit B enfeksiyonuna en yakın model olan HBV-tg farelerde rfaj'ın antikor yanıt oluşturmadaki etkisi araştırıldı. HBV-tg fareler ile birlikte kontrol grubu olarak hibrit fareler kullanıldı. Fareler 1×10^{12} rfaj, 1×10^{12} yaban faj ile immünize edildi. Elde edilen sonuçları karşılaştırmak için insanlarda etkinliği bilinen ticari HBV aşısı ve plazmadan saflaştırılan HBsAg'nin Freund's adjuvanları ile hazırlanmış karışımı ile de fareler immünize edildi. Her iki fare türünde de rfaj'ın yaban faj göre daha etkin bir immün yanıt oluşturduğu tespit edildi (Şekil 3.6, Şekil 3.7). Rekombinant fajın, HBV-tg farelerde ticari HBV aşısından daha etkin anti-HBsAg yanıt oluştururken hibrit farelerde yaklaşık olarak aynı düzeyde anti-HBsAg yanıt oluşturduğu tespit edildi.

Plazmadan saflaştırılan HBsAg'nin Freund's adjuvanları ile birlikte immünize edildiği gruplarda ise en yüksek antikor yanıt elde edilmiştir.

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda ilk kez, HBsAg antijeninin tüm a.a dizisi faj üzerinde gösterilmiş olan fajın antikor yanıt oluşturmadaki etkinliği araştırılmıştır. Elde edilen sonuçlar, daha önce yapılan çalışmalara paralel olarak, antijene karşı oluşan antikor yanıtında genetik farklılığın önemli olduğunu göstermektedir. Yine sonuçlar hepatit B taşıyıcılarında HBV'ye karşı gelişen toleransın kırılmasında bağışıklamada güçlü adjuvanların kullanılması gerektiğini de göstermektedir.

Tez kapsamında yapılan ikinci çalışmada ise aşı-antikor kompleksi oluşturularak HBV-tg farelerde oluşan immün toleransın kırılması, etkin bir antikor yanıt ve serumdaki serbest HBsAg miktarında azalma elde edilmesi amaçlandı. Aşı-antikor kompleksinin etkin bir immün yanıtı neden olduğu daha önceki çalışmalarda tespit edilmiştir [149,150]. Ayrıca antijen-antikor kompleksi ile yapılan çalışmalarda, kompleksi oluşturan antikorun Fc kısmının antijen sunucu hücre yüzeyinde bulunan Fc reseptörüne bağlanarak, Fc reseptör aracılığı ile fagositozu sağladığı ve daha etkin bir immün yanıtı neden olduğu bilinmektedir [105].

Yaptığımız bu çalışmada ilk olarak 1 µg aşının, farklı oranlarda (1:1, 1:5, 1:10) anti-HBsAg monoklonal antikoruna ile kompleks oluşumu sağlandı ve HBV-tg, hibrit fareler bu kompleks ile immünize edildi. Kontrol grupları olarak sadece antikor veya ticari aşı ile immünizeli gruplar oluşturuldu. Elde edilen sonuçlarda her iki fare türünde de antikor yanıt oluşumu ve plazmadaki HBsAg miktarında azalış tespit edilemedi (Şekil 3.10, Şekil 3.11). Kompleks oluşturmada kullanılan aşı miktarının düşük olmasının immün yanıt oluşmasını engellediği düşünülerek bir sonraki çalışmada kullanılan aşı miktarı 5 kat artırıldı. Bu amaçla farklı oranlarda (10:1, 5:1, 2.5:1, 1:1) bir araya getirilen aşı-antikor kompleksindeki serbest antikorlar, sadece antikor içeren örnek ile karşılaştırıldılar. Komplekslerde bulunan serbest antikorların 1:1 oranında % 25 oranında azalma tespit edilirken 10:1, 5:1, 2.5:1 oranlarında birleştirilen aşı antikor komplekslerinde ise yaklaşık % 60 oranında azalma tespit edildi (Şekil 3.9). Bu sonuçtan sonra yapılan yeni çalışmada 5 µg aşı ile 1 µg monoklonal antikor ile

kompleks oluşturuldu ve yine her iki fare türü immünize edildi. Ancak her iki fare türünde de terapötik bir etki tespit edilemedi (Şekil 3.12, Şekil 3.13).

Aşı-antikor kompleksi ile yapılan çalışma 5:1 oranında oluşturulan kompleks ile HBV-tg ve hibrit farelerde tekrarlandı. Bu çalışmada karşılaştırma grubu olarak fareler Freund's adjuvanları (IFA, FCA) ile hazırlanan plazmadan saflaştırılmış HBsAg ve HBsAg-antikor kompleksi ile de immünize edildi. Elde edilen sonuçlar, plazmadan saflaştırılan HBsAg ve HBsAg-antikor kompleksinin etkin bir şekilde antikor yanıtı oluştururken aşı-antikor kompleksi, aşı veya monoklonal antikor ile immünize gruplarda anlamlı bir antikor yanıtın elde edilemediğini göstermektedir. Plazmadaki HBsAg değişimi araştırıldığında ise tüm gruplar arasında anlamlı bir farklılık tespit edilemedi (Şekil 3.16, Şekil 3.17). Elde ettiğimiz bu sonuca benzer bir sonuç Hong ve arkadaşlarının [151] yaptığı çalışmada bulunmuştur. Bu çalışmada HBsAg geni ve immunoglobulinlerin Fc kısmını eksprese eden lentivektörün tedavi edici özelliğini HBV-tg farelerde denediklerinde, plazmasında HBsAg miktarı yüksek olan HBV-tg farelerde antikor yanıt oluşmasına rağmen antijen miktarında değişiklik olmadığı, ancak HBsAg'nin düşük olduğu transgenik farelerde tedavi sonucunda antijen miktarında düşüş olduğu tespit edilmiştir.

Aşı-antikor kompleksi ile yapılan bu çalışmalarda elde edilen diğer bir sonuç ise ticari HBV aşısının, (5 µg/fare) Freund's adjuvan ile birlikte hazırlanan HBsAg kompleksine göre daha az etkili olmasıdır. Bu sonuç ticari aşıda bulunan alüminyum adjuvan ile Freund's adjuvanın, adjuvant etkilerinin farklılığından ve immünizasyon yönteminden kaynaklandığı düşünülmektedir. Alüminyum adjuvanı ile hazırlanan ticari HBV aşıları kas içine uygulanırken, Freund adjuvanı ise farelere intraperitoneal olarak uygulanmaktadır.

Bu tez kapsamında yapılan üçüncü çalışmada ise DC aşısı kullanılarak HBV-tg farelerde oluşan immün toleransın kırılması amaçlanmıştır. Klinik düzeyde ve hayvan modellerinde DC'lerin kronik hepatit B olgularının tedavisinde kullanılması üzerine çalışmalar uzun yıllardır denenmektedir [138-141,152]. Yapılan bu çalışmalarda kemik iliği hücrelerinden veya periferik kan mononükleer hücrelerin *in vitro* ortamda DC'ye farklılaştırılması ile elde edilen hücreler, HBsAg veya HBsAg epitopları ile yüklenerek deneklere immünize

edilmişlerdir. Elde edilen sonuçlarda genelde anti-HBsAg yanıt oluşurken, özellikle HBeAg pozitif deneklerde plazmadaki serbest HBsAg düzeyinde anlamlı bir azalma tespit edilememiştir.

Bu tez kapsamında yapılan DC aşı çalışmasında DC'leri yüklemek için alternatif bir yöntem olarak ticari HBV aşısı ve aşı-antikor kompleksi kullanılmıştır. Farelerde oluşan terapötik yanıtın tespiti için ise fare plazmasında oluşan yanıt ELISA yöntemiyle, dalak hücrelerinde IFN- γ salgılamasındaki değişim ELISPOT yöntemi ile ve HBV-tg fare karaciğerindeki S geninin ekspresyon değişimi RTq-PZR yöntemiyle araştırılmıştır.

Çalışmada DC elde etmek için HBV-tg farelerin femur ve tibia kemiklerinden elde edilen kemik iliği kullanıldı. Kemik iliği hücreleri *in vitro* ortamda GM-CSF ve IL-4 ile inkübe edildi ve inkübasyonun 6. gününde hücreler akım sitometri ile kontrol edilerek DC'lere farklılaştıkları tespit edildi. Daha sonra DC'leri ticari HBV aşısı ile yüklemek üzere uygun dozun belirlenmesi için WST-1 ve BrdU testleri uygulandı. WST-1 ve BrdU testlerinde iki farklı aşı miktarı (3,6 μ l aşı içerisinde 144 ng HBsAg ve 0.7 μ l aşı içerisinde 28 ng HBsAg), iki farklı hücre sayısı (50×10^3 , 25×10^3) ve iki farklı inkübasyon süresi (24 saat, 48 saat) denendi. Elde edilen sonuçlarda 0.7 μ l aşı ile yüklü 50×10^3 sayıdaki hücrelerde 24 saat sonra canlılığının yaklaşık % 90 olmasına rağmen DC'leri etkin bir şekilde yüklemek için gerekli antijen miktarı olmayacağı düşünüldü. Ancak 3.6 μ l aşı 50×10^3 sayıdaki hücrelerde canlılığın 24 saat sonunda yaklaşık % 55-60 olmasından dolayı inkübasyon süresi olarak 5 saat denendi ve hücre canlılığının % 77 olduğu tespit edildi (Şekil 3.20, Şekil 3.21, Şekil 3.2). BrdU deneyinde ise hücre çoğalmasında gruplar arasında bir fark tespit edilemedi. Kontrol grubu ile sitotoksik etkisi % 90'ın üzerinde olan hidrojen peroksitin aynı OD değerini vermesinin nedeni olarak DC'lerin kemik iliği hücrelerinden farklılaştığı ancak bölünerek çoğalmadıklarından kaynakladığı düşünülmektedir.

WST-1 ve BrdU testleri 96 kuyu plakada gerçekleştirildi. DC'ler 6 kuyulu steril plaklarda ekilerek aşı, aşı-antikor kompleksi ve antikor ile yüklendi. Bu nedenle 6 kuyulu plakanın kuyularına ekilecek hücre sayısı hesaplanırken kuyu taban alanı (8.960 cm²), 96 kuyulu plakadaki kuyunun taban alanı (0.335 cm²) ile orantılandı ve 6 kuyulu plakadaki her bir kuyuya 1.35×10^6 hücre ekilmesi

gerektiği hesapladı. Hücre sayısı 1.5×10^6 olarak belirlenerek hücre başına düşen aşı miktarının azaltılması ile daha az sitotoksititeye sahip olabileceği düşünüldü. Sonuç olarak 1.5×10^6 DC $5 \mu\text{g}/3.5 \text{ ml}$ konsantrasyonda aşı, aşı-antikor kompleksi, antikor ile yüklü veya yüksüz olarak 5 saat % 5 CO_2 , 37°C 'de inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda süspanse edilerek 5×10^5 DC farelere intraperitonel olarak immünize edildi. İmmünizasyon birer hafta arayla iki kez tekrarlandı. İkinci immünizasyondan sonra birer hafta arayla fare plazmasındaki anti-HBsAg değişimi üç hafta süresince izlendi. Kontrol grubuna göre anlamlı anti-HBsAg yanıt sadece aşı ile yüklü DC'lerin birinci ve ikinci hafta sonunda tespit edilmiş olsa da gruplar kendi aralarında karşılaştırıldığında anlamlı bir farkı bulunamadı (Şekil 3.24). LPS ile uyarılmış ancak yüksüz DC grubunda elden antikor yanıt oluşmasına benzer sonuç Farag ve ark. [153] tarafından yapılan çalışmada da gösterilmiştir.

İkinci immünizasyondan üç hafta sonra gruplar arasındaki IFN- γ sentezi ELISPOT yöntemi ile karşılaştırıldığında DC+MAb ve yüksüz DC ile immünizeli gruplarda kontrol grubuna göre anlamlı bir yanıt tespit edildi (Şekil 3.27). Fakat gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilemedi. Karaciğer dokusundaki HBsAg mRNA ekspresyonu RTq-PZR incelendiğinde gruplar arasında anlamlı bir fark elde edilemedi (Şekil 3.26). Flow sitometri ile yapılan analizlerde de DC'lerin olgunlaşma reseptörlerinin (CD40, CD80, CD86) ekspresyon düzeyleri arasında bir fark tespit edilememiştir. Dendritik hücrelerle yapılan çalışmalarda gruplar arasında IFN- γ , mRNA ve antikor düzeylerinde bir farklılık elde edilememesi bu sonuçlarla paralellik göstermektedir.

Alüminyum hidroksit adjuvanın bu üç reseptör üzerine etkininin olmadığı daha önce Sun ve ark. [91] yaptığı çalışmada da gösterilmiştir. Ancak alüminyum adjuvanların antijenlerin DC tarafından daha etkin bir şekilde alınmasını sağladığı farklı çalışmalarda belirtilmektedir [93, 94]. Flach ve ark. [94] yaptığı çalışmada sezyum alüminyum adjuvanı (CsAl) kullanarak ovalbimün'e karşı etkin antikor yanıtın oluştuğunu göstermişlerdir. Kullandıkları adjuvan farklılığı ile birlikte DC'leri yükleme yönteminde bu tez kapsamında yapılan çalışmada uygulanan yöntemden farklıdır. Flach ve ark. ilk olarak CsAl ile iki saat DC'leri inkübe edip daha sonra 10×10^6 DC'yi $100 \mu\text{g}$ OVA ile birlikte intravenöz olarak C57BL/6

farelere immünize ederek OVA'ya karşı antikor yanıt oluşumu sağlanmıştır. Akbar ve ark. [154] yaptıkları çalışmada ise HBV aşısının koruyucu antikor yanıt oluşturmadığı bireylerde koruyucu düzeyde antikor yanıt oluşturmak için DC aşısı kullanılmıştır. Yaptıkları çalışmada, bireylerin periferik kanlarından mononükleer hücreleri izole ettikten sonra *in vitro* ortamda bu hücrelerden DC elde etmiş ve ticari HBV aşısı ile yükleyerek bireylere tekrar enjekte etmişlerdir. Yapılan çalışmada DC'ler 10 µg HBsAg aşısı ile 8 saat inkübe edildikten sonra süspansiyon edilmiş ve bireyler, önce 2×10^5 hücre ile subkutan olarak, daha sonra ise 5×10^6 DC ile intradermal olarak aşılanmıştır. Ancak çalışmada altı birey aşılanmış ve sadece üç bireyde 10 mIU/ml koruyucu antikor seviyesi elde edilmiştir. Kontrol grubu olarak yüklenmemiş DC grubu çalışmaya dahil edilmemiştir. Ayrıca, Akbar ve ark. yaptığı bu çalışmada HBV aşısının DC'ler üzerine sitotoksik etkisinin olduğunu belirtmiş olmalarına rağmen, sitotoksik etkinin hangi yöntem kullanarak tespit edildiği hakkında bilgi vermemişlerdir. İlk kez bu tez kapsamında yapılan çalışmalarda aşısının DC'lerin yüklenmesinde kullanıldığında oluşan sitotoksik etki WST-1 yöntemi kullanarak, farklı inkübasyon süreleri, farklı hücre sayısı ve aşı miktarıyla araştırılarak gösterilmiştir.

Tez kapsamında yapılan DC aşısı çalışmasında etkin immün yanıt oluşmamasının birçok nedeni olabileceği düşünülmektedir. Bunlardan bir kaçısı sırasıyla;

- a) İmmünize edilen DC sayısı immün toleransın oluştuğu HBV-tg farelerde toleransı kırmak için yeterli olmamış olabilir. DC'in ikincil lenfoid organlara göçü araştırmak üzere CFSE ile işaretli 5×10^5 hücre hibrit farelere intraperitoneal olarak immünize edilmiş, 24 saat sonra fare dalak ve lenf nodları incelenmiştir, ancak çalışma sonucunda CFSE ile işaretli hücreler tespit edilememiştir (Şekil 3.27).
- b) Çalışmada kullanılan antijen konsantrasyonu yeterli olmayabilir. Daha önce açıklanan Akbar ve ark. yaptığı çalışmada DC'ler 10µg HBsAg içeren aşı ile 8 saat boyunca yüklenmişlerdir. Diğer bir çalışmada ise Chisari ve ark. [127] DC'leri 10 µg/ml HBs₂₈₋₃₉ epitopu ile 2 saat boyunca yüklemişlerdir. Alternatif olarak ise DC'ler farklılaşmasının 5. gününde 1 µg/ml HBsAg ile yüklemişlerdir. 7. gün ise 100 µg/ml HBsAg ile 2 saat yükledikten sonra fareleri immünize etmişlerdir.

c) Bu çalışmada immünizasyonlar intraperitoneal olarak uygulanmıştır. Ancak daha önce diğer gruplar tarafından yapılan çalışmalarda immünizasyonlar intravenöz, subkutan veya intradermal olarak yapılmış ve belirli düzeyde immün yanıt elde edilmiştir. Tez çalışmasında intravenöz immünizasyon kullanılmamasının nedeni ise yapısal olarak HBV-tg farelerin kuyruk damarının intravenöz immünizasyon yapılamayacak kadar ince olmasıdır [127, 151, 153].

Sonuç olarak bu tez kapsamında yapılan çalışmaların birinci bölümünde yüzeyindeki p3 proteininde tüm HBsAg proteinini eksprese eden rekombinant fajın özellikle BALB/cj, HBV-tr fareler ve hibrit farelerde Hepatit B yüzey antijenine karşı antikor yanıtı oluşturduğu belirlenmiştir. Ayrıca çalışma sonuçları özellikle ticari aşıya yanıt vermeyen Hepatit B taşıyıcı bireylerde immün toleransın kırılması için aşılama da güçlü adjuvanların kullanılmasına gerek olduğunu göstermektedir. Tez çalışmasının son bölümünde DC'ler ticari aşı ve aşı+antikor kompleksi ile yüklenmişlerdir. Ancak yapılan bu çalışma sonucunda ticari aşının hücreler üzerine sitotoksik etkisi olduğu ve DC'leri yüklemek için uygun olmadığı düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- [1] Chang, M.H., “Hepatitis B virus infection” *Semin. Fetal Neonatal Med.*, 12, 160-167, 2007.
- [2] Anonim, Hepatitis B vaccines WHO position paper, 2006.
http://www.who.int/immunization/topics/WHO_position_paper_HepB.pdf
- [3] Anonim, Hepatitis B, 2000.
<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs204/en/>
- [4] Keskinler, D.U., “Serologic evaluation for HBV and HCV of blood donors applying to red-crescent blood bank in Erzurum,” *J. Inonu Univ. Med. Faculty*, 10, 195-198, 2003.
- [5] Dienstag, J.L., “Immunopathogenesis of the extrahepatic manifestations of hepatitis B virus infection,” *Springer Semin. Immunopathol.*, 3, 461-472, 1981.
- [6] Lok, A.S. ve Lai, C.L., “A longitudinal follow-up of asymptomatic hepatitis B surface antigen-positive Chinese children,” *Hepatology*, 8, 1130-1133, 1988.
- [7] Badur, S., “Viral Hepatitler,” *Moleküler, Klinik ve Tanısal Viroloji*, (Ed: Ustaçelebi, Ş., Abacıoğlu, H. ve Badur, S.) Güneş Kitabevi, Ankara, 183-189, 2004.
- [8] Merican, I., Guan, R., Amarapura, D., Alexander, M.J., Chutaputti, A., Chien, R.N., Hasnian, S.S., Leung, N., Lesmana, L., Phiet, P.H., Sjalfoellah Noer, H.M., Sollano, J., Sun, H.S. ve Xu, D.Z., “Chronic hepatitis B virus infection in Asian countries,” *J. Gastroenterol. Hepatol.*, 15, 1356-1361, 2000.
- [9] Michel, M.L., Deng, Q. ve Mancini-Bourgine, M., “Therapeutic vaccines and immune-based therapies for the treatment of chronic hepatitis B: perspectives and challenges,” *J. Hepatol.*, 54, 1286-1296, 2011.
- [10] Cooksley, W.G., Piratvisuth, T., Lee, S.D., Mahachai, V., Chao, Y.C., Tanwandee, T., Chutaputti, A., Chang, W.Y. ve Zahm FE, Pluck N., “Peginterferon alpha-2a (40 kDa): an advance in the treatment of hepatitis B e antigen-positive chronic hepatitis B,” *J. Viral. Hepat.*, 10, 298-305, 2003.

- [11] Lai, C.L. ve Yuen, M.F., “Chronic hepatitis B--new goals, new treatment,” *N. Engl. J. Med.*, **359**, 2488-2491, 2008.
- [12] Lam, Y.F., Yuen, M.F., Seto, W.K. ve Lai, C.L., “Current antiviral therapy of chronic hepatitis B: efficacy and safety,” *Curr. Hepat. Rep.*, **10**, 235-243, 2011.
- [13] Kim, S.S., Cheong, J.Y. ve Cho, S.W., “Current nucleos(t)ide analogue therapy for chronic hepatitis B,” *Gut Liver*, **5**, 278-287, 2011.
- [14] Dienstag, J.L., “Hepatitis B virus infection,” *N. Engl. J. Med.*, **359**, 1486-1500, 2008.
- [15] Zoulim, F. ve Locarnini, S., “Hepatitis B virus resistance to nucleos(t)ide analogues,” *Gastroenterology*, **137**, 1593-1608, 2009.
- [16] Pol, S., Driss, F., Carnot, F., Michel, M.L., Nalpas, B., Berthelot, P. ve Brechot, C., “Specific vaccine therapy in chronic hepatitis B infection,” *Lancet*, **344**, 342, 1994.
- [17] Yalcin, K., Acar, M. ve Degertekin, H., “Specific hepatitis B vaccine therapy in inactive HBsAg carriers: a randomized controlled trial,” *Infection*, **31**, 221–225, 2003.
- [18] Safadi, R., Israeli, E., Papo, O., Shibolet, O., Mehlem, A. ve Bloch A., “Treatment of chronic hepatitis B virus infection via oral immune regulation toward hepatitis B virus proteins,” *Am. J. Gastroenterol.*, **98**, 2505–2515, 2003.
- [19] Wen, Y.M., Wu, X.H., Hu, D.C., Zhang, Q.P. ve Guo, S.Q., “Hepatitis B vaccine and anti-HBs complex as approach for vaccine therapy,” *Lancet*, **345**, 1575–1576, 1995.
- [20] Michel, M.L., Davis, H.L., Schleef, M., Mancini, M., Tiollais, P. ve Whalen, R.G., “DNA-mediated immunization to the hepatitis B surface antigen in mice: Aspects of the Immoral response mimic hepatitis B viral infection in humans,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **92**, 5307–5311, 1995.
- [21] Chen, J.H., Yu, Y.S., Liu, H.H., Chen, X.H., Xi, M., Zang, G.Q. ve Tang, Z.H., “Ubiquitin conjugation of hepatitis B virus core antigen DNA vaccine leads to enhanced cell-mediated immune response in BALB/c mice,” *Hepat. Mon.*, **11**, 620-628, 2011.

- [22] Chen, Y., Cheng, G. ve Mahato, I.R., “RNAi for Treating Hepatitis B Viral Infection,” *Pharm. Res.*, **25**, 72–86, 2008.
- [24] Gish, R.G., Satishchandran, C., Young, M. ve Pachuk, C., “RNA interference and its potential applications to chronic HBV treatment: results of a Phase I safety and tolerability study,” *Antivir. Ther.*, **16**, 547-54, 2011.
- [25] Chisari, F.V. ve Ferrari, C., “Hepatitis B virus immunopathogenesis,” *Ann. Rev. Immunol.*, **13**, 29-60, 1995.
- [26] Blumberg, B. S., “The discovery of Australia Antigen,” *Hepatitis B: The Hunt for Killer Virus*, (Ed: Elworthy, S.) Princcenton University Pres, New Jersey, A.B.D., 72-83, 2002.
- [27] Dane, D.S., Cameron, C.H. ve Briggs, M., “Virus-like particles in serum of patients with Australia-antigen-associated hepatitis,” *Lancet*, **4**, 695-698, 1970.
- [28] Lmeida, J.D., Rubenstein, D. ve Stott, E.J., “New antigen-antibody system in Australia-antigen-positive hepatitis,” *Lancet*, **2**, 1225–1227, 1971.
- [29] Kann, M. ve Gerlich, W.H., “Structure and Molecular Virology,” *Viral Hepatitis* (Ed: Howard C. Thomas, H.C., Lemon, S. Ve Zuckerman, A.J.) Blackwell Publishing, Massachusetts, A.B.D., 149-180, 2005.
- [30] Lau, J.Y. ve Wright, T.L., “Molecular virology and pathogenesis of hepatitis B,” *Lancet*, **342**, 1335-1340, 1993.
- [31] Vanlandschoot, P., Cao, T. ve Leroux-Roels, G., “The nucleocapsid of the hepatitis B virus: a remarkable immunogenic structure,” *Antiviral Res.*, **60**, 67-74, 2003.
- [31] Ferrari, C., Bertoletti, A., Pena, A., Cavalli, A., Vali, A., Misalse, G., Pilli, M., Fowler, P., Giuberti, T. ve Chisari, F.V., “Identification of immunodominant T cell epitopes of the hepatitis B virus nucleocapsid antigen,” *J. Clin. Invest.*, **88**, 214-222, 1991.
- [32] Misalse, G., Redeker, A., Person, J., Fowler, P., Guilhot, S., Schlicht, H.J., Ferrari, C. ve Chisari, F.V., “HLA-A31- and HLA-Aw68-restricted cytotoxic T cell responses to a single hepatitis B virus nucleocapsid epitope during acute viral hepatitis,” *J. Exp. Med.*, **177**, 751-762, 1993.

- [33] Salfeld, J., Pfaff, E., Noah, M. ve Schaller, H., “Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus,” *J. Virol.*, **63**, 798-808, 1989.
- [34] Akbar, S.M., Yoshida, O., Chen, S., Cesar, A.J., Abe, M., Matsuura, B., Hiasa, Y. ve Onji, M., “Immune modulator and antiviral potential of dendritic cells pulsed with both hepatitis B surface antigen and core antigen for treating chronic HBV infection,” *Antivir. Ther.*, **15**, 887-895, 2010.
- [35] Parekh, S., Zoulim, F., Ahn, S.H., Tsai, A., Li, J., Kawai, S., Khan, N., Trepo, C., Wands, J. ve Tong, S., “Genome replication, virion secretion, and e antigen expression of naturally occurring hepatitis B virus core promoter mutants,” *J. Virol.*, **77**, 6601-6612, 2003.
- [36] Lang, T., Lo, C., Skinner, N., Locarnini, S., Visvanathan, K. ve Mansell, A., “The hepatitis B e antigen (HBeAg) targets and suppresses activation of the toll-like receptor signaling pathway,” *J. Hepatol.*, **55**, 762-769, 2011.
- [37] Milich, D. ve Liang, T.J., “Exploring the biological basis of hepatitis B e antigen in hepatitis B virus infection,” *Hepatology*, **38**, 1075-86, 2003.
- [38] Schadler, S. ve Hildt, E., “HBV life cycle: entry and morphogenesis,” *Viruses*, **1**, 185-209, 2009.
- [39] Park, N.H., Song, I.H. ve Chung, Y.H., “Chronic hepatitis B in hepatocarcinogenesis,” *Postgrad. Med.J.*, **82**, 507-515, 2006.
- [40] Badtke, M.P., Khan, I., Cao, F., Hu, J. ve Tavis, J.E., “An interdomain RNA binding site on the hepadnaviral polymerase that is essential for reverse transcription,” *Virology*, **390**, 130–138, 2009.
- [41] Seeger, C., ve Mason, W.S., “Hepatitis B Virus Biology,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 51–68, 2000.
- [42] Nguyen, D.H., Ludgate, L. ve Hu, J., “Hepatitis B virus-cell interactions and pathogenesis,” *J. Cell. Physiol.*, **216**, 289-94, 2008.
- [43] Cheong, J.H., Yi, M., Lin, Y. ve Murakami, S., “Human RPB5, a subunit shared by eukaryotic nuclear RNA polymerases, binds human hepatitis B virus X protein and may play a role in X transactivation,” *EMBO J.*, **14**, 143-1450, 1995.

- [44] Kim, C.M., Koike, K., Saito, I., Miyamura, T. ve Jay, G., “HBx gene of hepatitis B virus induces liver cancer in transgenic mice,” *Nature*, **351**, 317-320, 1991.
- [45] Tiollais, P., Pourcel, C., ve Dejean, A., “The hepatitis B virus,” *Nature*, **317**, 489-495, 1985.
- [46] Gavilanes, F., Gonzalez-Ros, J.M. ve Peterson, D.L., “Structure of hepatitis B surface antigen. Characterization of the lipid components and their association with the viral proteins,” *J. Biol. Chem.*, **257**, 7770-7777, 1982.
- [47] Echevarria, J.M. ve Avellon, A., “Hepatitis B virus genetic diversity,” *J. Med. Virol.*, **78** Suppl 1:S36-42, 2006.
- [48] Carman, W., “The clinical significance of surface antigen variants of hepatitis B virus,” *J. Viral. Hepat.*, **4**, 11–20, 1997.
- [49] Araujo, N.M., Waizbort, R. ve Kay, A., “Hepatitis B virus infection from an evolutionary point of view: How viral, host, and environmental factors shape genotypes and subgenotypes,” *Infect. Genet. Evol.*, **11**, 1199-1207, 2011.
- [52] De Bruin, W.C., Leenders, W.P., Moshage, H. ve van Haelst, U.J., “Species specificity for HBsAg binding protein endonexin II,” *J. Hepatol.*, **24**, 265-270, 1996.
- [51] De Meyer, S., Depla, E., Maertens, G., Soumillion, A. ve Yap, S.H., “Characterization of small hepatitis B surface antigen epitopes involved in binding to human annexin V,” *J. Viral. Hepat.*, **6**, 277-285, 1999.
- [52] Neurath, A.R. ve Strick, N., “The putative cell receptors for hepatitis B virus (HBV), annexin V, and apolipoprotein H, bind to lipid components of HBV,” *Virology*, **204**, 475-477, 1994.
- [53] Ganem, D. ve Prince, A.M., “Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences,” *N. Engl. J. Med.*, **350**, 1118–1129, 2004.
- [54] Seeger, C. ve Mason, W.S., “Hepatitis B virus biology,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 51–68, 2000.
- [55] Summers, J., “The replication cycle of hepatitis B viruses,” *Cancer*, **61**, 1957–1962, 1988.

- [56] Chang, J.J. ve Lewin, S.R., “Immunopathogenesis of hepatitis B virus infection,” *Immunol. Cell. Biol.*, **85**,16-23, 2007.
- [57] Kakimi, K., Guidotti, L.G., Koezuka, Y. ve Chisari, F.V., “Natural killer T cell activation inhibits hepatitis B virus replication *in vivo*,” *J. Exp. Med.*, **192**, 921–930, 2000.
- [58] Salfeld, J., Pfaff, E., Noah, M. ve Schaller, H., “Antigenic determinants and functional domains in core antigen and e antigen from hepatitis B virus,” *J. Virol.*, **63**, 798-808, 1989.
- [59] Janeway, C.A., Traver, P., Walpot P. ve Shlomchik, M.J., “Basic Concepts in Immunology”, *Immunobiology* (Ed: Lawrence E.) Garland Science Publishing, New York, A.B.D., 1-35, 2005.
- [60] Webster, G.J., Reignat, S., Brown, D., Ogg, G.S., Jones, L., Seneviratne, S.L., Williams, R., Dusheiko, G. ve Bertoletti, A., “Longitudinal analysis of CD8+ T cells specific for structural and nonstructural hepatitis B virus proteins in patients with chronic hepatitis B: implications for immunotherapy,” *J. Virol.*, **78**, 5707–5719, 2004.
- [61] Bertoletti, A. ve Gehring, A.J., “The immune response during hepatitis B virus infection,” *J. Gen. Virol.*, **87**, 1439-1449, 2006.
- [62] Fisticaro, P., Valdatta, C., Massari, M., Loggi, E., Biasini, E., Sacchelli, L., Cavallo, M.C., Silini, E.M., Andreone, P., Misalse, G. ve Ferrari, C., “Antiviral intrahepatic T-cell responses can be restored by blocking programmed death-1 pathway in chronic hepatitis B,” *Gastroenterology*, **138**, 682-693, 2010.
- [63] Lopes, A.R., Kelam, P., Das, A., Dunn, C., Kwan, A., Turner, J., Peppia, D., Gilson, R.J., Gehring, A., Bertoletti, A. ve Maini, M.K., “Bim-mediated deletion of antigen-specific CD8 T cells in patients unable to control HBV infection,” *J. Clin. Invest.*, **118**, 1835–1845, 2008.
- [64] Koziel, M.J., “The immunopathogenesis of HBV infection,” *Antivir. Ther.*, **3**, 13-24, 1998.
- [65] Lattanzi, M. ve Rappuoli, R., “Vaccination: Past, Present and Future,” *Genomics, Proteomics, and Vaccines* (Ed: Grandi, G.) John Wiley&Sons, West Sussex, İngiltere, 1-22, 2004.

- [66] Riedel, S., “Edward Jenner and the history of smallpox and vaccination” Proc. (Bayl. Univ. Med. Cent.), **18**, 21–25, 2005.
- [67] Janeway, C.A., Traver, P., Walpot P. ve Shlomchik, M.J., “Manipulation of The Immune Response,” *Immunobiology* (Ed: Lawrence E.) Garland Science Publishing, New York, A.B.D., 613-662, 2005.
- [68] Ada, G., “Overview of Vaccines,” *Vaccine Protocols*, (Ed: Robinson, A., Hudson, M.J. ve Cranage, M.P.) Human Pres, New Jersey, A.B.D., 1-18, 2003.
- [69] Anonim, Hepatit B aşular, 2007.
<http://asicalismagrubu.org/hbv.asp>
- [70] Blumberg, B. S., “The Hepatit B vaccine,” *Hepatitis B: The Hunt for Killer Virus*, (Ed: Elworthy, S.) Priccenton University Pres, New Jersey, A.B.D., 134-158, 2002.
- [71] Szmuness, W., Stevens, C.E., Harley, E.J., Zang, E.A., Oleszko, W.R., William, D.C., Sadovsky, R., Morrison, J.M. ve Kellner, A., “Hepatitis B vaccine: demonstration of efficacy in a controlled clinical trial in a high-risk population in the United States,” *N. Engl. J. Med.*, **303**, 833-841, 1980.
- [72] Danel, S., “Hepatitis B vaccines,” *J. Hepatology*, **39**, 70-76, 2003.
- [73] McAleer, W.J., Buynak, E.B, Maigetter, R.Z., Wampler, D.E., Miller, W.J. ve Hilleman, M.R., “Human hepatitis B vaccine from recombinant yeast,” *Nature*, **307**, 178-180, 1984.
- [74] Zuckerman, J.N., “Hepatitis B third generation vaccines: improved response and conventional vaccine non-response,” *Vaccine*, **17**, 330-339, 1999.
- [75] Jones, C.D., Page, M., Bacon, A., Cahil, E., Bentley, M. ve Chatfield, S.N., “T cell and antibody response characterization of a new recombinant Pre-S1, Pre-S2 and SHBs antigen containing hepatitis B vaccine; demonstration of superior anti-SHBs antibody induction in responder mice,” *Vaccine*, **17**, 2528-2537, 2000.
- [76] Streatfield, S.J., “Oral hepatitis B vaccine candidates produced and delivered in plant material,” *Immunol. Cell. Biol.*, **83**, 257-262, 2005.
- [77] Chen, H., Wen, B., Deng, Y., Wang, W., Yin, X., Guan, J., Ruan, L. ve Tan, W., “Enhanced effect of DNA immunization plus *in vivo* electroporation

with a combination of hepatitis B virus core-PreS1 and S-PreS1 plasmids,” *Clin. Vaccine Immunol.*, **18**,1789-1795, 2011.

- [78] Kennedy, R.C., Eichberg, J.W. ve Dreesman, G.R., “Lack of genetic restriction by a potential anti-idiotypic vaccine for type B viral hepatitis,” *Virology*, 148, 369-374, 1986.
- [79] Thanavala, Y. ve Lugade, A.A., “Oral transgenic plant-based vaccine for hepatitis B,” *Immunol. Res.*, **46**, 4-11, 2010.
- [80] Pniewski, T., Kaputsa, J., Bociąg, P., Wojciechowicz, J., Kostrzak, A., Gdula, M., Fedorowicz-Strońska, O., Wójcik, P., Otta, H., Samardakiewicz, S., Wolko, B. ve Plucienniczak, A., “Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation”, *J. Appl. Genet.*, **52**, 125-136, 2011.
- [81] Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R. ve Calfre, C., “Derivation of vaccines from mimotopes: immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage,” *J. Immunol.*, **154**, 3162-3172, 1995.
- [82] Kenney R.T. ve Edelman, R., “New Generation Vaccines”, Adjuvants for The Future, (Ed: Levine, M.L., Kaoer, J.B., Pappuoli, R., Liü, M.A. ve Good, M.F.), Marcel Dekker, New York, A.B.D., 213-223, 2004.
- [83] Glenney, A.T., Pope, C.G., Waddington, H. ve Wallace, U., “Immunological Notes: XVII-XXIV,” *J. Pathol. Bacteriol*, **29**, 31–40, 1926.
- [84] Petrovsky, N. ve Aguilar, J.C., “Vaccine adjuvants: Current state and future trends,” *Immunol. Cell. Biol.*, **82**, 488-96, 2004.
- [85] Brito, L.A., Chan, M., Baudner, B., Gallorini, S., Santos, G., O'Hagan, D.T. ve Singh, M., “An alternative renewable source of squalene for use in emulsion adjuvants,” *Vaccine*, **29**, 6262-8, 2011.
- [86] Marrack, P., McKee, A.S. ve Munks, M.W., “Towards an understanding of the adjuvant action of aluminium,” *Nat. Rev. Immunol.*, **9**, 287-93, 2009.
- [87] Exley, C., Siesjö, P. ve Eriksson, H., “The immunobiology of aluminium adjuvants: How do they really work?,” *Trends Immunol.*, **31**, 103-9, 2010.

- [88] White, R.G., Coons, A.H. ve Connolly, J.M., “Studies on antibody production. III. The alum granuloma,” *J. Exp. Med.*, **102**, 73–82, 1955.
- [89] Kool, M., Soullie, T., van Nimwegen, M., Willart, M.A., Muskens, F., Jung, S., Hoogsteden, H.C., Hammad, H. ve Lambrecht, B.N., “Alum adjuvant boosts adaptive immunity by inducing uric acid and activating inflammatory dendritic cells,” *J. Exp. Med.*, **205**, 869–882, 2008.
- [90] Ulanova, M., Tarkowski, A., Hahn-Zoric, M. ve Hanson, L. A., “The common vaccine adjuvant aluminum hydroxide up-regulates accessory properties of human monocytes via an interleukin-4-dependent mechanism,” *Infect. Immun.*, **69**, 1151–1159, 2001.
- [91] Sun, H., Pollock, K.G. ve Brewer, J.M., “Analysis of the role of vaccine adjuvants in modulating dendritic cell activation and antigen presentation *in vitro*,” *Vaccine*, **21**, 849–855, 2003.
- [92] Sokolovska, A., Hem, S.L. ve HogenEsch, H., “Activation of dendritic cells and induction of CD4 +T cell differentiation by aluminum-containing adjuvants,” *Vaccine*, **25**, 4575–4585, 2007.
- [93] Morefield, G.L., Sokolovska, A., Jiang, D., HogenEsch, H., Robinson, J.P. ve Hem, S.L., “Role of aluminum-containing adjuvants in antigen internalization by dendritic cells *in vitro*,” *Vaccine*, **23**, 1588-1595, 2005.
- [94] Flach, T.L., Ng, G., Hari, A., Desrosiers, M.D., Zhang, P., Ward, S.M., Seamone, M.E., Vilaysane, A., Mucsi, A.D., Fong, Y., Prenner, E., Ling, C.C., Tschopp, J., Muruve, D.A., Amrein, M.W. ve Shi, Y., “Alum interaction with dendritic cell membrane lipids is essential for its adjuvanticity,” *Nat. Med.*, **17**, 479-487, 2011.
- [95] Vidova, B., Godany, A. ve Sturdik, E., “Phage display-a tool for detection and prevention against pathogens,” *Nova Biotechnologic*, **8**, 23-33, 2008.
- [96] Smith, G.P., “Filamentous fusion phage: Novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface,” *Science*, **228**, 1315–1317, 1985.
- [97] Paschke, M., “Phage display systems and their applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **70**, 2-11, 2006.

- [98] Bahadir, A.O., Balcioglu, B.K., Uzyol, K.S., Hatipoglu, I., Sogut, I., Basalp, A. ve Erdag B., “Phage displayed HBV core antigen with immunogenic activity,” *Appl Biochem Biotechnol.*, **165**, 1437-1447, 2011.
- [99] Gaubin, M., Fanutti, C., Mishal, Z., Durrbach, A., De Berardinis, P., Sartorius. R., Del Pozzo. G., Guardiola. J., Perham, R.N. ve Piatier-Tonneau, D., “Processing of filamentous bacteriophage virions in antigen-presenting cells targets both HLA class I and class II peptide loading compartments,” *DNA Cell Biol.*, **22**, 11-18, 2003.
- [100] De la Cruz, V.F., Lal, A.A. ve Mc Cutchan, T.F., “Immunogenicity and epitope mapping of foreign sequences via genetically engineered filamentous phage,” *J. Biol. Chem.*, **263**, 4318-4322, 1988.
- [101] Websrer, R., “Filamentous Phage Biology,” *Phage Display: A Laboratory Manual*, (Ed: Kuhlman, T. Ve Debruni, D.) Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, A.B.D., 1-6, 2001.
- [102] Meola, A., Delmastro, P., Monaci, P., Luzzago, A., Nicosia, A., Felici, F., Cortese, R. ve Calfre, C., “Derivation of vaccines from mimotopes: immunologic properties of human hepatitis B virus surface antigen mimotopes displayed on filamentous phage,” *J. Immunol.*, **154**, 3162-3172, 1995.
- [103] Anaonim, Vector: Bacteriophage lambda and M13: 7th april, 2009.
<http://bioinfo2010.wordpress.com/2009/07/08/vector-bacteriophage-lambda-and-m13-7th-april/>
- [104] Randall, R.E., Young, D.F. ve Southern, J.A., “Immunization with solid matrix- antibody-antigen complexes containing surface or internal virus structural proteins protects mice from infection with the paramyxovirus, simian virus,” *J. Gen. Virol.*, **69**, 2517–2526, 1988.
- [105] Yao, X., Zheng, B., Zhou, J., Xu, D.Z., Zhao, K., Sun, S.H., Yuan, Z.H. ve Wen, Y.M., “Therapeutic effect of hepatitis B surface antigen-antibody complex is associated with cytolytic and non-cytolytic immune responses in hepatitis B patients,” *Vaccine*, **25**, 1771-1779, 2007.

- [106] Wen, Y.M., Wu, X.H., Hu, D.C., Zhang, Q.P. ve Guo, S.Q., “Hepatitis B vaccine and anti-HBs complex as approach for vaccine therapy,” *Lancet*, **345**, 1575–1576, 1995.
- [107] Wen, Y., “Antigen–antibody immunogenic complex: promising novel vaccines for microbial persistent infections,” *Expert Opin. Biol. Ther.*, **9**, 285–291, 2009.
- [108] Wen, Y.M., Qu, D. ve Zhou, S.H., “Antigen–antibody complex as therapeutic vaccine for viral hepatitis B,” *Int. Rev. Immunol.*, **18**, 251–258, 1999.
- [109] Xu, D.Z., Huang, K.L., Zhao, K., Xu, L.F., Shi, N., Yuan, Z.H. ve Wen, Y.M., “Vaccination with recombinant HBsAg-HBIG complex in healthy adults,” *Vaccine*, **23**, 2658–2664, 2005.
- [110] Wang, X.Y., Zhang, X.X., Yao, X., Jiang, J.H., Xie, Y.H., Yuan, Z.H. ve Wen, Y.M., “Serum HBeAg sero-conversion correlated with decrease of HBsAg and HBV DNA in chronic hepatitis B patients treated with a therapeutic vaccine,” *Vaccine*, **28**, 8169-8174, 2010.
- [111] Xu, D.Z., Zhao, K., Guo, L.M., Li, L.J., Xie, Q., Ren, H., Zhang, J.M., Xu, M., Wang, H.F., Huang, W.X., Bai, X.F., Niu, J.Q., Liu, P., Chen, X.Y., Shen, X.L., Yuan, Z.H., Wang, X.Y. ve Wen, Y.M., “A randomized controlled phase IIb trial of antigen-antibody immunogenic complex therapeutic vaccine in chronic hepatitis B patients,” *PLoS ONE*, **3**, e2465, 2008.
- [112] Onji, M. ve Akbar, F., “History of Dendritic Cells,” *Dendritic Cells in Clinics*, Springer, Japonya, 1-5, 2010.
- [113] Steinman, R.M. ve Cohn, Z.A., “Identification of a novel cell type in peripheral lymphoid organs of mice. I. Morphology, quantitation, tissue distribution” *J. Exp. Med.*, **137**, 1142-1162, 1973.
- [114] Banchereau, J., ve Steinman R.M., “Dendritic cells and the control of immunity,” *Nature*, **392**, 245-252, 1998.
- [115] Rodriguez, A., Regnault, A., Klejmeer, M., Ricciardi-Castagnoli, P. ve Amigorena, S., “Selective transporter of internalized antigens to the cytosol

for MHC class I presentation in dendritic cells,” *Nat. Med.*, **6**, 1348-1354, 1999.

- [116] Ardavin, C., Martinez, del Hoyo G., Martin, P., Anjuere, F., Arias C.F., Marin, A.R, Ruiz, S., Parrillas, V., ve Hernandez, H., “Origin and differentiation of dendritic cells,” *Trends Immunol.*, **22**, 691-700, 2001.
- [117] Wykes, M., Pombo, A., Jenkins, C. ve MacPherson, G.G., “Dendritic cells interact directly with naive B lymphocytes to transfer antigen and initiate class switching in a primary T-dependent response,” *J. Immunol.*, **161**, 1313-1319, 1998.
- [118] Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. ve Alber, G., “Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation,” *J. Exp. Med.*, **184**, 747–752, 1996.
- [119] Koch, F., Stanzl, U., Jennewein, P., Janke, K., Heufler, C., Kämpgen, E., Romani, N. ve Schuler, G., “High level IL-12 production by murine dendritic cells: upregulation via MHC class II and CD40 molecules and downregulation by IL-4 and IL-10,” *J. Exp. Med.*, **184**, 741–747, 1996.
- [120] Heath, W.R. ve Carbone, F.R., “Dendritic cell subsets in primary and secondary T cell responses at body surfaces,” *Nat. Immunol.*, **10**, 1237-1244, 2009.
- [121] Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C. ve Amigorena, S., “Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells,” *Annu. Rev. Immunol.*, **20**, 621-67, 2002.
- [122] Mouries, J., Moron, G., Schlecht, G., Escriou, N., Dadaglio, G. ve Leclerc, C., “Plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-prime naive T cell *in vivo* after TLR activation,” *Blood*, **112**, 3713-3722, 2008.
- [123] Mukherji, B., Chakraborty, N.G., Yamasaki, S., Okina, T., Yamase, H., Sporn, J., Kurtzman, M.T., Ergin, M.T, Ozols, J., Meehan, J. ve Mauri F., “Induction od antigen-specific cytolytic T cells in situ in human melanoma by immunization with synthetic peptide-pulsed autologous antigen presenting cells,” *Pro. Natl. Acad. Sci.*, **9**, 8078-8082, 1995.

- [124] Ridgway, D., “The first 1000 dendritic cell vaccinees,” *Cancer Invest.*, **21**, 873-886, 2003.
- [125] Anonim, Approved letter-Provence, 2010.
<http://www.fda.gov/BiologicsBloodVaccines/CellularGeneTherapyProducts/ApprovedProducts/ucm210215.htm>
- [126] Brasel, K., De Smedt, T., Smith, J.L. ve Maliszewski, C.R., “Generation of murine dendritic cells from flt3-ligand-supplemented bone marrow cultures,” *Blood*, **96**, 3029-3039, 2000.
- [127] Shimizu, Y., Guidotti, L.G., Fowler, P. ve Chisari, F.V., “Dendritic cell immunization breaks cytotoxic T lymphocyte tolerance in hepatitis B virus transgenic mice,” *J. Immunol.*, **161**, 4520-4529, 1998.
- [128] Anonim, Dendritic cells: important adjuvants during DNA vaccination, 2000.
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/bookshelf/br.fcgi?book=eurekah&part=A17748&rendertype=figure&id=A17760>
- [129] van der Molen, R.G., Sprengers, D., Binda, R.S., de Jong, E.C., Niesters, H.G., Kusters, J.G., Kwekkeboom, J. ve Janssen, H.L., “Functional impairment of myeloid and plasmacytoid dendritic cells of patients with chronic hepatitis B,” *Hepatology*, **40**, 938-9746, 2004.
- [130] Tavakoli, S., Mederacke, I., Herzog-Hauff, S., Glebe, D., Grün, S., Strand, D., Urban, S., Gehring, A., Galle, P.R. ve Böcher, W.O., “Peripheral blood dendritic cells are phenotypically and functionally intact in chronic hepatitis B virus (HBV) infection,” *Clin. Exp. Immunol.*, **151**, 61–70, 2008.
- [131] Kunitani, H., Shimizu, Y., Murata, H., Higuchi, K. ve Watanabe, A., “Phenotypic analysis of circulating and intrahepatic dendritic cell subsets in patients with chronic liver diseases,” *J. Hepatol.*, **36**, 734–741, 2002.
- [132] Chen, L, Zhang, Z., Chen, W., Zhang, Z., Li, Y., Shi, M., Zhang, J., Chen, L., Wang, S. ve Wang, F.S., “B7-H1up-regulationon myeloid dendritic cells significantly suppresses T cell immune function in patients with chronic hepatitis B,” *J. Immunol.*, **178**, 6634–6641, 2007.

- [133] Woltman, A.M., Boonstra, A. ve Janssen, H.L.A., “Dendritic cells in chronic viral hepatitis B and C: victims or guardians?,” *Gut*, **59**, 155-125, 2010.
- [134] Xu, Y., Hu, Y., Shi, B., Zhang, X., Wang, J., Zhang, Z., Shen, F., Zhang, Q., Sun, S. ve Yuan Z., “HBsAg inhibits TLR9-mediated activation and IFN-alpha production in plasmacytoid dendritic cells,” *Mol. Immunol.*, **46**, 2640-2646, 2009.
- [135] Tavakoli, S., Scwerin, W., Rohwer, A., Hoffmann, S., Weyer, S., Weth, R., Meisel, H., Diepolder, H., Gissler, Galle P. R., Löhr, H.F. ve Böcher, W. O., “Phenotype and function of monocyte derived dendritic cells in chronic hepatitis B virus infection,” *J. General Virology*, **85**, 2829-2836, 2004.
- [136] Seeger, C. ve Mason, W.S., “Hepatitis B virus biology,” *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **64**, 51–68, 2000.
- [137] Op den Brouw, M.L., Binda, R.S., van Roosmalen, M.H., Protzer, U., Janssen, H.L. ve van der Molen, R.G., ve Woltman, A.M., “Hepatitis B virus surface antigen impairs myeloid dendritic cell function: a possible immune escape mechanism of hepatitis B virus,” *Immunology*, **126**, 280–289, 2009.
- [138] Furukawa, S., Akbar, S.M.F., Hasabe, A., Horiike, N. ve Onji, M., “Production of hepatitis B surface antigen-pulsed dendritic cells from immunosuppressed murine hepatitis B virus carrier: evaluation of immunogenicity of antigen-pulsed dendritic cells *in vivo*,” *Immunobiology*, **209**: 551-557, 2004.
- [139] Jiang, W.Z., Fan, Y., Liu, Y., Zhang, Y.L., Wen, J.J., Hao, W.L. ve Qian, M., “Therapeutic potential of dendritic cell-based immunization against HBV in transgenic mice,” *Antiviral Res.*, **77**, 50-55, 2008.
- [140] Luo, J., Li, J., Chen, R.L., Nie, L., Huang, J., Liu, Z.W., Luo, L. ve Yan, X.J., “Autologous dendritic cell vaccine for chronic hepatitis B carriers: a pilot, open label, clinical trial in human volunteers,” *Vaccine*, **28**, 2497-504. 2010.
- [141] Lou, Y., Liu, C., Kim, G.J., Liu, Y.J., Hwu, P. ve Wang, G., “Plasmacytoid dendritic cells synergize with myeloid dendritic cells in the induction of

antigen-specific antitumor immune reponse,” *J. Immunol.*, **178**, 1534-1541, 2007.

- [142] Chen, W., Zhang, Z., Sh, M., Chen, L., Fu, J., Sh, F., Zhang, B., Zhang, H., Jin, L. ve Wang, F.S., “Activated plasmacytoid dendritic cells act synergistically with hepatitis B core antigen-pulsed monocyte-derived dendritic cells in the induction of hepatitis B virus-specific CD8 T-cell response,” *Clin. Immunol.*, **129**, 295-303, 2008.
- [143] Bagis, H., Arat, S., Mercan, H.O., Aktoprakligil, D., Caner, M., Turanli, E.T., Baysal, K., Turgut, G., Sekmen, S. ve Cirakoglu, B., “Stable transmission and expression of the hepatitis B virus total genome in hybrid transgenic mice until F10 generation,” *J. Exp. Zool. A Comp. Exp. Biol.*, **305**, 420-427, 2006.
- [144] Galfre, G. ve Milstein, C. “Preparation of monoclonal antibodies: strategies and procedures,” *Methods Enzymol.*, **73**, 3-46, 1981.
- [145] Lavanchy, D., “Hepatitis B virus epidemiology, disease burden, treatment, and current and emerging prevention and control measures,” *J. Viral. Hepat.*, **11**, 97-107, 2004.
- [146] Heyman, B. ve Wigzell, H., “Immunoregulation by monoclonal sheep erythrocyte-specific IgG antibodies: suppression is correlated to level of antigen binding and not to isotype,” *J. Immunol.*, **132**, 1136-1143, 1984.
- [147] Su, Z.Z., Lin, J., Shen, R., Fisher, P.E., Goldstein, N.I. ve Fisher, P.B., “Surface-epitope masking and expression cloning identifies the human prostate carcinoma tumor antigen gene PCTA-1 a member of the galectin gene family,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.*, **93**, 7252-7257, 1996.
- [148] Hashiguchi, S., Yamaguchi, Y., Takeuchi, O., Akira, S. ve Sugimura, K., “Immunological basis of M13 phage vaccine: Regulation under MyD88 and TLR9 signaling,” *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **402**, 19-22, 2010.
- [149] Basalp, A., Cirakoglu, B. ve Bermek, E. “Enhancement of the immune response to hepatitis B virus vaccine by antigen specific IgM,” *Immunol. Let.*, **73**, 1-6, 2000.

- [150] Basalp, A., “Modulation of the humoral immune response to aluminum adjuvanted HBV vaccine by antigen specific monoclonal antibodies,” *Current. Top. Virol.*, **6**, 25-32, 2007.
- [151] Hong, Y., Peng, Y., Michael, M., Munn, D.H., Wang, G. ve He, Y., “Lentivector expressing HBsAg and immunoglobulin Fc fusion antigen induces potent immune responses and results in seroconversion in HBsAg transgenic mice,” *Vaccine*, **29**, 3909-3916, 2011.
- [152] Huang, Y., Chen, Z., Jia, H., Wu, W., Zhong, S. ve Zhou, C., “Induction of Tc1 response and enhanced cytotoxic T lymphocyte activity in mice by dendritic cells transduced with adenovirus expressing HBsAg,” *Clin. Immunol.*, **119**, 280-290, 2006.
- [153] Farag, M.M., Hoyler, B., Encke, J., Stremmel, W. ve Weigand, K., “Dendritic cells can effectively be pulsed by HBVsvp and induce specific immune reactions in mice,” *Vaccine*, **29**, 200-206, 2010.
- [154] Fazle Akbar, S.M., Furukawa, S., Yoshida, O., Hiasa, Y., Horiike, N. ve Onji, M., “Induction of anti-HBs in HB vaccine nonresponders in vivo by hepatitis B surface antigen-pulsed blood dendritic cells,” *J. Hepatol.*, **47**, 60-66, 2007.