

Hepatit Delta Virüs Virolojisi: Taksonomi, Sınıflandırma, Yapısal ve Genomik Organizasyon, Viral Replikasyon, Viral Heterojenite, Deney Hayvanlarında İnfeksiyon

Yasemin Çelik ALTUNOĞLU^{1,2}, Senem Ceren KARATAYLI², A. Mithat BOZDAYI^{2,3}

Kastamonu Üniversitesi, Fen Edebiyat Fakültesi, ¹Biyoloji Bölümü, Kastamonu

Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi, ²Hepatoloji Enstitüsü, ³Gastroenteroloji Anabilim Dalı, Ankara

GİRİŞ

Hepatit Delta Virüsü (HDV) sadece hepatit B virüsü (HBV) enfeksiyonu olan kişilerde viral hepatit etkeni olabilen defektif bir virüstür. HDV'nin viral taksonomideki yeri satelit virüsler içerisinde kabul edilmektedir. Satelit virüslerinin özelliği, ancak kendine yardımcı ("helper") bir virüsle enfekte olan konakta hastalık oluşturmalarıdır. HDV ilk olarak Rizzetto ve arkadaşları tarafından 1977 yılında HBV ile enfekte hastalara ait hepatositlerin çekirdeğinde yeni bir antijen olarak tanımlanmıştır (1). Delta hepatitinin yalnızca HBV ile enfekte bireylerde ortaya çıkmasının nedeni kendi zarf proteinini kodlamıyor olması ve geçiş için hepatit B yüzey antijenini (HBsAg) kendi zarf proteini olarak kullanmasıdır (2). Bu nedenle HDV enfeksiyonu ya HBV ile birlikte koinfeksiyona ya da HBsAg taşıyıcılarda sonradan eklenerek süperenfeksiyona neden olur (3). Diğer satelit virüslerinden farklı olarak HDV bağımsız olarak replike olabilmekte ve yardımcı virüsü HBV ile dizi homologisi göstermemektedir. HDV'nin dairesel RNA genomu ve replikasyon şekli subviral bitki patojenleri ve viroidlerine benzemektedir. Kısmen diğer hayvan virüsleri ile bir ilişki göstermemesi nedeni ile HDV taksonomik olarak tek başına *Deltavirüs* cinsine dahil edilmiştir (4).

HEPATİT DELTA VİRÜS VİROLOJİSİ

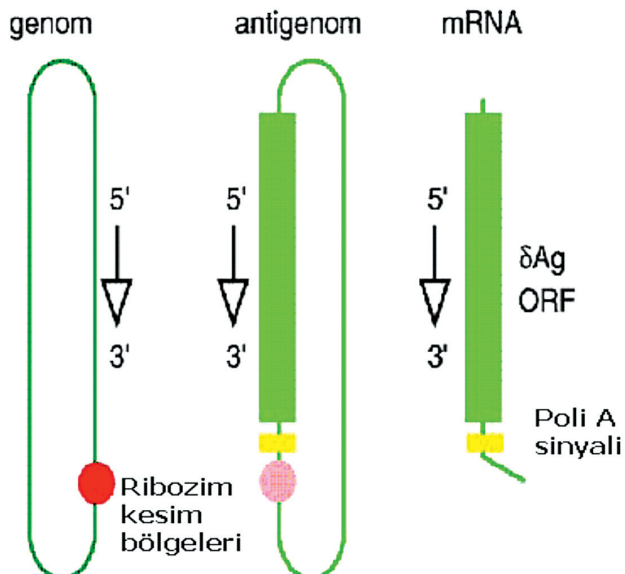
Yapısal ve Genomik Organizasyon

HDV virionu, yaklaşık 36-43 nm'lik küresel bir partiküldür.

Bu partikül; yaklaşık 1700 nükleotitlik kısa bir tek zincirli dairesel RNA, virüs tarafından kodlanan küçük (S-HDAg) ve büyük (L-HDAg) delta antijenleri ve HBsAg'den oluşur. HDV nükleokapsiti, her iki delta antijeninden yaklaşık 70 molekülün tek bir RNA molekülüne bağlandığı bir ribonükleoprotein (RNP) kompleksidir (5). Bu nükleokapsit yaklaşık 19 nm çapında olup özellikle HBsAg ve konak hücre lipidinden oluşan bir dış zarf ile çevrilidir. HBsAg'nin büyük, orta ve küçük (sırasıyla L, M, S) olmak üzere her üç şekli de enfeksiyöz HDV partikülünde bulunabilmektedir. HDV virionunun matürasyonu için yeterli olan küçük HBsAg (S-HBsAg) baskın antijen tipidir. Büyük HBsAg (L-HBsAg) ise HDV virionunun oluşumu için gereklidir. M-HBsAg'nin rolü tam olarak anlaşılamamış ancak virion oluşumunda minör rol oynayabileceği düşünülmüştür. Bu proteinlerin HDV'deki göreceli oranı ise 1:5:95 (L: M: S) şeklindedir (6).

HDV RNA, dairesel, tek zincirli ve birbiri ile yüksek derecede komplementer olan yaklaşık 1700 nükleotitten oluşan, bugüne kadar tanımlanmış en küçük hayvan virüsü genomudur (7). HDV RNA, içerdiği komplementer nükleotitler ile kendi üzerine katlanabilir ve %70 oranında intra-moleküler baz eşleşmesi yaparak dallanmamış çomaksı ikincil yapı oluşturur (8). Antigenom olarak da adlandırılan komplementer virüs RNA'sında tek bir açık okuma çerçevesi (ORF) tanımlanmıştır. Bu ORF, 1014. ve 1598. nükleotitler arasında bulunur ve

S-HDAg'yi kodlayan 0.8 Kb'lık mRNA'ya transkribe edilir (9). Ancak, replikasyon sırasında stop kodonu UAG'nin 1015. pozisyonundaki adenin rezidüsünün deaminasyonu ile triptofan kodonuna (UGG) dönüşmesi sonucu ORF'de 57 nükleotitik bir uzama gerçekleşebilmektedir (10). Böylece aynı ORF'den iki farklı HDAg oluşabilmektedir. S-HDAg 155 (24 kDa), L-HDAg ise 214 (27 kDa) amino asit uzunluğundadır. Benzer fonksiyonel bölgelere sahip bu antijenlerden S-HDAg, RNA replikasyonunu uyarır ve ribozim aktivitesini pozitif olarak düzenler (11). L-HDAg ise HDV RNA sentezini baskılar ve virion morfogenezini ve replikasyonun son aşamasında HBsAg ile etkileşim için gereklidir (12, 13). HDV'nin bir diğer önemli özelliği de hem genomik hem de antigenomik HDV RNA'sının ribozim aktivitesine sahip olmasıdır (14). Bu bölge 85 nükleotid uzunluğunda olup replikasyon sırasında multimerik RNA'nın kendini lineer tam bir RNA boyutunda kesmesi için gereklidir. Bu RNA parçaları daha sonra sirküler genomu oluşturmak üzere kendi üzerine birleşir. HDV RNA'sının kendini kesme ve birleştirme özelliği HDV RNA replikasyonunun "rolling-circle" mekanizması ile gerçekleştiği fikrini vermiştir (15). HDV ribozimleri genomik ve antigenomik RNA'nın bir parçası olarak da görev yaparak baz eşleşmesi ve saç tokası ilmeği gibi genel ikincil yapılara katılabilirler. İnfekte bir karaciğer hücresinde HDV RNA'larının yaklaşık kopya sayıları: genomik RNA için 300.000, antigenomik RNA için 50.000 ve mRNA için 600 olarak tahmin edilmiştir (16) (Resim 1). HDV mRNA'sı 5' kapak ve 3' poli(A) kuyruğu içe-



Resim 1. Genom replikasyonu sırasında oluşturulan üç HDV RNA tipi (24).

rir (17). Bu post-transkripsiyonel modifikasyonlar, tüm hücrel RNA polimeraz II sentezlerinde görülen ortak özellikler ve bu da RNA polimeraz II'nin HDV RNA replikasyonundaki olası rolünü göstermektedir.

Viral Replikasyon

HDV yalnızca karaciğer hücrelerinde replike olur. HDV zarfı HBV yüzey antijenlerini içerir ve bu nedenle hücreye giriş için her iki virüsün de aynı konak reseptörüne bağlı olması olası bir durumdur. L-HBsAg, preS1 olarak adlandırılan ve diğer HBsAg formlarında bulunmayan bir aminoterminal bölge içerir. Bu bölgede bulunan dizilerin hem HBV'nin hem de HDV'nin hücreye yapışması ve girişi için gerekli olduğu gösterilmiştir (18). Bugüne kadar HBsAg'ye bağlanan onlarca konak proteini olduğu bildirilmiş olmasına rağmen bu proteinlerden hangilerinin virüsün hücreye yapışması ve daha da önemlisi hücreye girmesi ve viral replikasyona başlaması süreçlerine katıldığı henüz bilinmemektedir.

HDV replikasyonu herhangi bir HBV dizisinden ve fonksiyonundan tamamen bağımsızdır. Karaciğer hücresine girmesi ile HDV RNP'leri, HDV genom replikasyonunun gerçekleştiği hücre çekirdeğine taşınır. Bu taşınmanın HDAg'lerde bulunan, proteinin N terminaline yakın üçte birlik kısmında yerleşmiş olan nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) aracılığıyla olduğu bilinmemektedir. Hücre çekirdeğine giriş ile HDV RNP'lerinin "rolling circle" mekanizması ile replikasyonu başlattığı ve bitki viroidlerindeki benzer şekilde multimerik antigenomik RNA moleküllerinin sentezini sağladığı düşünülmektedir (19). Hedef genomun DNA yerine bir RNA olmasının dışında HDAg mRNA'sının üretimi süreci neredeyse tam olarak konak RNA polimeraz (pol) II ile endojenöz DNA dizisinin transkripsiyonuna karşılık gelmektedir (15). Yapılan transkripsiyonel deneylerle, seçici olarak RNA pol II transkriptlerinin birikimini engelleyen amanitin toksininin düşük dozda ilavesi ile antigenomik kalıptan genomik RNA sentezinin baskılandığı gösterilmiştir (20). Bu da, kendine ait herhangi bir polimeraz enzimi olmayan delta virüsünün çomaksı yapı gösteren RNA'sının, RNA pol II tarafından çift zincirli DNA olarak algılandığını ve bağlanmanın gerçekleştiğini düşündürmektedir. RNA pol II, HDV RNA'yı bir kere kopyalamaya başladığında transkripsiyonel aktivitesini durmadan sürdürür ve dairesel viral RNA kalıplarından multimerik lineer genom ve antigenomik transkriptleri oluşturur (15). Hayvan virüslerinde gö-

rülmeyen bu çift “rolling circle” mekanizması viroidlere benzemektedir (2). Replikasyonun son basamağında lineer multimerik iplikler genomik ve antijenomik HDV-RNA'larını oluşturacak şekilde yeniden düzenlenir. Bunun için transkripsiyon ürünü, genomik ve antijenomik monomerlerini oluşturacak şekilde ribozimleri ile kesilir ve oluşan lineer monomer yapılar kendi üzerine birleştirilerek infeksiyöz dairesel formları oluşturulur (Resim 2).

HDV replikasyon döngüsü sırasında: S-HDAg'yi kodlayan genomik RNA, L-HDAg'yi kodlayan genomik RNA, S-HDAg'yi kodlayan antijenomik RNA ve L-HDAg'yi kodlayan antijenomik RNA olmak üzere farklı genomik uzunlukta RNA parçaları üretilir. HDV RNA replikasyonunun başlaması, S-HDAg'nin varlığını gerektirir (21). Replikasyon sırasında, konağa ait adenozin deaminaz enzimi ADAR1'in işleme aktivitesi ile L-HDAg'yi kodlayan antijenomik RNA'lar üretilir (10). Hepatositlerdeki HDV ve HBV'nin doğal koinfeksiyonunda, HBV yüzey proteinleri HDV genomik RNA'nın partiküller içerisine paketlenmesini kolaylaştırır. RNA asamblesi, HDV RNA ve

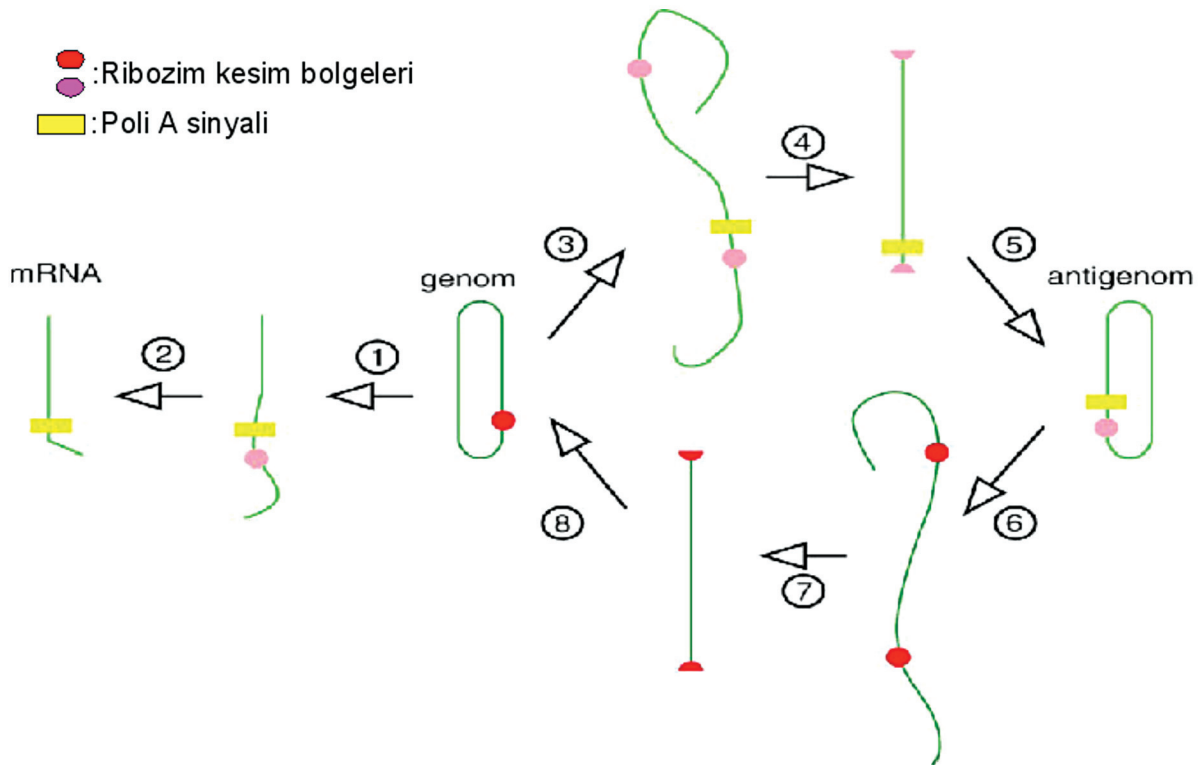
HBV yüzey proteinleriyle etkileşebilen L-HDAg tarafından sağlanır. L-HDAg'nin bu fonksiyonu için farnesilasyon modifikasyonu gereklidir.

Virale Heterojenite

Hastalığın seyri boyunca HDV RNA da evrimleşmekte ve nükleotid dizileri değişikliğe uğrayabilmektedir. Yapılan analizlerde HDV RNA'da mutasyon sıklığının 3×10^2 ile 3×10^3 nükleotid/yıl olduğu hesaplanmıştır. Dünya genelinde toplanan tam genom HDV RNA dizileri karşılaştırıldığında izolatlar arasında genomik dizi çeşitliliği bakımından %40'a kadar bir heterojenitenin olduğu görülmüştür ve bugüne kadar üç genotip ve iki alt tip tanımlanmıştır. Fakat son dönemde yapılan moleküler filogenetik analizler, HDV'nin sekiz gruba ('clade') ayrılması fikrini ortaya çıkarmıştır (22).

Deney Hayvanlarında İnfeksiyon

HDV replikasyonu için orjinal deneysel çalışmalara şempanzede HDV infeksiyonu oluşturulmasıyla başlamıştır. Ardından eğer woodchuck'lar HBV'ye oldukça benzeyen woodc-



Resim 2. (1) Genomik RNA antijenomik RNA'nın sentezi için kalıp görevi yapar. (2) Yeni oluşturulan bu RNA, mRNA ile aynı 5' ucuna sahiptir, daha sonra bu transkript üzerinde 5' kapak ve 3' poli A işlenmesi yapılır. (3) Genomik RNA, diğer antijenomik RNA transkriptleri için kalıp olur. (4) Bu RNA'lar ikinci basamağa alternatif şekilde işlenirler; ribozim kesimiyle uğrarlar ve birim uzunlukta lineer antijenomik RNA'lar oluşturulur. (5) Antijenomik RNA'lar yeni antijenomik RNA oluşturmak için ligasyona uğrayıp çembersel hale gelirler ve çomak benzeri yapıyı oluşturmak için katlanırlar. (6-8) 4-6. basamaklardaki gibi yeni antijenomik RNA'lar, yeni genomik RNA'ların transkripsiyonunda kalıp görevi görürler (24).

huck HBV ile infekte edilirse HDV'nin de bu hayvanlarda replike olabileceği anlaşılmıştır. Ayrıca virüsün enjeksiyonuyla bir farenin bazı hepatosit hücrelerinin infekte edilebileceği gösterilmiştir. Primat ya da woodchuck kökenli primer hepatosit kültürlerinde de infeksiyon oluşturulabilmiştir.

Fakat primer hücre kültürleri oldukça pahalı ve kurulması zor olduğundan HDV replikasyonu ile ilgili şimdiye kadar pek çok bilgi elde edilmesini sağlayan sistem, yabancı bir promotör altında HDV genomunun ikili ya da üçlü tekrarlarını içeren plazmid DNA'nın transfeksiyonudur. Plazmid üzerinden transkribe edilen HDV RNA'nın hücrelerde çoğalabilmesi, HDV genomik ve antijenomik RNA'nın ve HDAg'nin saptanmasıyla gösterilmiştir. Virüs replikasyonunu çalışmak için başka bir strateji ise HDV RNA'nın in vitro transkribe edilip hücrelere transfekte edilmesidir. Fakat bu şekilde replikasyonun gerçekleşmesi için HDV RNA delta antijeni ile bir-

likte ya da delta antijenini kodlayan mRNA ile birlikte transfekte edilmeli veya alıcı hücrede daha önceden delta antijeni eksprese ediliyor olmalıdır. Ayrıca rekombinant HDV dizileri kullanarak da hayvanları infekte etmek mümkündür, ilk örnek ise HDV cDNA'nın, HBV ile infekte şempanzenin karaciğerine transfeksiyonudur, bu yöntem woodchuck'da da uygulanmıştır (23).

Hepatit B virüsüne karşı yapılan aşılamalarla HDV sıklığının da azaltılmış olması, HDV virüsünün yapmış olduğu infeksiyona olan ilgiyi düşürmüş olsa da HBV infeksiyonunun kontrol edilemediği dünyanın pek çok bölgesinde HDV halen önemli bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır. Bunun yanı sıra HDV ribozimleri, delta antijeni üzerindeki post-translasyonel modifikasyonlar ve konakçı RNA polimerazları tarafından gerçekleştirilen RNA sentezi ile de moleküler biyoloji çalışmaları için ilgi çekici ve özel olmaya devam etmektedir.

KAYNAKLAR

1. Rizzetto M, Canese MG, Aricò S, et al. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/antidelta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HBsAg carriers. *Gut* 1977;18: 997-1003.
2. Diener TO, Pruisner SB. Viroids and prions. In: K Maramorosch and JJ McKelvey, eds. *Subviral pathogens of plants and animals*. Orlando: Academic, 1985; 3-18.
3. Farci P. Delta hepatitis: an update. *J Hepatol* 2003;39 (Suppl 1): S212-9.
4. Murphy FA. *Virus taxonomy: sixth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Wien; New York: Springer-Verlag, 1995; 493-4.
5. Ryu WS, Netter HJ, Bayer M, et al. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol* 1993;67:3281-7.
6. Bonino F, Heermann KH, Rizzetto M, et al. Hepatitis delta virus: protein composition of delta antigen and its hepatitis B virus derived envelope. *J Virol* 1996;58:945-50.
7. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, et al. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta (delta) viral genome. *Nature* 1986;323:508-14.
8. Kuo MY, Goldberg J, Coates L, et al. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. *J Virol* 1988;62:1855-61.
9. Macnaughton TB, Shi ST, Modahl LE, et al. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J Virol* 2002;76:3920-7.
10. Casey JL, Gerin JL. Hepatitis delta virus RNA editing: Specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *J Virol* 1995;69:7593-600.
11. Jeng KS, Su PY, Lai MM. Hepatitis delta antigen enhances the ribozyme activities of hepatitis delta virus RNA in vivo. *J Virol* 1996;70:4205-9.
12. Glenn, JS, and White JM. Trans-dominant inhibition of human hepatitis delta virus genome replication. *J Virol* 1991;65:2357-61.
13. Chang FL, Chen PJ, Tu SJ, et al. The large form of hepatitis delta antigen is crucial for the assembly of hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991;88:8490-4.
14. Sharmeen L, Kuo MY, Dinter-Gottlieb G, et al. Antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol* 1988;62:2674-9.
15. Lai MM. RNA replication without RNA-dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus. *J Virol* 2005;79:7951-8.
16. Chen PJ, Kalpana G, Gidberg J, et al. Structure and replication of the genome of hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1986;83:8774-8.
17. Hsieh SY, Chao M, Coates L, et al. Hepatitis delta virus genome replication: a polyadenylated mRNA for delta antigen. *J Virol* 1990;64:3192-8.
18. Neurath AR, Kent SB, Strick N, et al. Identification and chemical synthesis of a host cell receptor binding site on hepatitis B virus. *Cell* 1986;46:429-36.
19. Gerin JL, Casey JL, Purcell RH. Hepatitis Delta Virus. In: Howley PM, (ed) *Fields' Virology*. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001:3037-50.
20. Chang J, Nie X, Chang HE, et al. Transcription of hepatitis delta virus RNA by RNA polymerase II. *J Virol* 2008;82:1118-27.
21. Chao M, Hsieh SY, Taylor J. Role of two forms of hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J Virol* 1990;64:5066-9.
22. Hsieh TH, Liu CJ, Chen DS, Chen PJ. Natural course and treatment of Hepatitis D virus infection. *J Formos Med Assoc* 2006;105:869-81.
23. Taylor JM. Structure and replication of HDV RNA. In: Handa H, Yamaguchi Y, Editors. *Hepatitis Delta Virus, medical intelligence unit* New York. Springer Science 2006; 20-31.
24. Taylor JM. Hepatitis delta virus. *Virology* 2006;344:71-6.