

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

**HEPATİT DELTA VİRUSUNUN DELTA ANTİJEN
GENİNİN KLONLANMASI**

SERAP SARIALIOĞLU

MİKROBİYOLOJİ VE KLİNİK MİKROBİYOLOJİ ANABİLİM DALI

YÜKSEK LİSANS TEZİ

İZMİR-2005

T.C.
DOKUZ EYLÜL ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HEPATİT DELTA VİRUSUNUN DELTA ANTİJEN GENİNİN KLONLANMASI

Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı

YÜKSEK LİSANS TEZİ

SERAP SARIALIOĞLU

Danışman Öğretim Üyesi

Prof.Dr. HAKAN ABACIOĞLU

Bu araştırma DEÜ Bilimsel Araştırma Projeleri Şube Müdürlüğü tarafından 04.KB.SAĞ.086
sayı ile desteklenmiştir.

İZMİR-2005

“ Hepatit Delta Virusunun Delta Antijen Geninin Klonlanması” isimli bu tez 22.11.2005 tarihinde tarafımızdan değerlendirilerek başarılı bulunmuştur.

Jüri Başkanı

Prof.Dr.Y.Hakan ABACIOĞLU

Jüri Üyesi

Doç.Dr.Arzu SAYINER

Jüri Üyesi

Yard.Doç.Dr.M.Ali ÖKTEM

TEŐEKKÜR

Eđitimim süresince ve bu çalışmada bana her türlü desteği veren danışman hocam ve Anabilim Dalı Başkanımız Sayın Prof.Dr. Hakan Abacıoğlu'na, çalışmam sırasında bana yol gösteren Prof.Dr. Neře Atabey, Doç.Dr. Arzu Sayiner ve Yrd.Doç.Dr. M.Ali Öktem'e, ayrıca yetişmemde emeği geçen diğer tüm hocalarıma ve aileme teőkür ederim.

İÇİNDEKİLER

ŞEKİL LİSTESİ

..... *i*

RESİM LİSTESİ

..... *ii*

KISALTMALAR

..... *iii*

1. ÖZET	1
2. SUMMARY	2
3. GİRİŞ VE AMAÇ	3
4. GENEL BİLGİLER	5
4.1 Hepatit Delta Virusü (HDV)	5
4.1.1. Giriş	5
4.1.2. Sınıflandırma	5
4.1.3. Yapı ve Genom Organizasyonu	6
4.1.4. HDV Antijeni (HDAg)	7
4.1.5. Viral Replikasyon	8
4.1.6. Viral Heterojenite	10
4.1.7. Konakçı İlişkisi	10
4.1.8. Yayılım ve Epidemiyoloji	11

4.1.9. İnfeksiyonun Geçiş Yolları ve Klinik Özellikleri	11
4.1.10. Patogenez	12
4.1.11. Tanı	13
4.1.12. Tedavi ve Korunma	14
4.2. Gen Klonlama	15
4.2.1. Gen Klonlama Nedir?	15
4.2.2. Restriksiyon Enzimleri	17
4.2.3. Vektörler	18
4.2.3.1. Küçük DNA Parçalarını Klonlamak İçin Vektörler	18
4.2.3.2. Büyük DNA Parçalarını Klonlamak İçin Vektörler	20
4.2.4. DNA Ligasyonu	21
4.2.5. Rekombinant Molekülün Konak Hücreye Aktarılması (Transformasyon) ..	22
4.2.5.1. Kimyasal Teknikler	22
4.2.5.2. Fiziksel Teknikler	23
4.2.5.3. Füzyon Teknikleri	23
4.2.5.4. Viral Teknikler	24
4.2.6. Rekombinant Molekülü Taşıyan Konak Hücrelerin Seçilmesi	24
4.2.6.1. Koloni Seçimi	24
4.2.6.2. Koloni Hibritleme	24
4.2.6.3. İmmunolojik Yöntemle Saptama	25
5. GEREÇ VE YÖNTEM	26
5.1. Gereç	26
5.1.1. Çalışma Grubu	26
5.1.2. Araçlar	26
5.2. Yöntem	30
5.2.1. Öncül Setlerinin Seçilmesi	30
5.2.2. Serum Örneklerinden HDV-RNA'nın Elde Edilmesi	30
5.2.3. HDV-RNA'nın RT-PZT ile Saptanması	31
5.2.3.1. c-DNA Eldesi	31
5.2.3.2. PZT (Polimeraz Zincir Tepkimesi)	31
5.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi	32
5.2.4. PZT Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması	33

5.2.4.1. PZT Ürünlerinin Saflaştırılması	33
5.2.4.2. Saflaştırılmış Ürünün Agaroz Jelde Gösterilmesi	34
5.2.4.3. Saflaştırma Sonrası Üründeki DNA Miktarının Hesaplanması	34
5.2.5. PZT Ürünün Klonlanması	34
5.2.5.1. PZT Ürününe “A” Ucu Ekleme	35
5.2.5.2. Ligasyon Reaksiyonu	36
5.2.6. Besiyerlerinin Hazırlanması	37
5.2.7. Transformasyon	38
5.2.8. Transforme Olmuş Bakterilerin Seçimi	38
5.2.9. Plazmit DNA Eldesi	39
5.2.10. Plazmitlerde Hedef Bölge Varlığının Saptanması	40
5.2.10.1. Plazmit DNA’dan PZT	40
5.2.10.2. Restriksiyon Enzim Analizi	40
5.2.10.3. DNA Dizi Analizi	43
5.2.11. Filogenetik Analiz	43
6. BULGULAR	44
6.1. Öncül Çifti Seçimi	44
6.2. HDV-RNA Bulguları	45
6.3. PZT Ürünü Saflaştırma Bulguları	46
6.4. Transforme Olmuş Bakterilerin Seçilmesi	47
6.5. Plazmit DNA’dan PZT	48
6.6. EcoR I ve Not I Kesimleri	49
6.7. DNA Dizi Analizi Bulguları	50
6.8. Filogenetik Analiz Bulguları	56
7. TARTIŞMA VE SONUÇ	57
8. KAYNAKLAR	60

ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. HDV'nin şematik yapısı ve ve elektron mikroskop görüntüsü	6
Şekil 2. HDV genomu	7
Şekil 3. HDV RNA sentezi	9
Şekil 4. Gen klonlamanın şematik olarak aşamaları	16
Şekil 5. EcoR I restriksiyon enzim kesimi	17
Şekil 6. pUC 18 plazmiti	19
Şekil 7. pGEM T-easy vektör	35
Şekil 8. EcoR I kesimi	41
Şekil 9. Not I kesimi	42
Şekil 10. HDV PZT için tasarlanan ön öncül bölgesi	44
Şekil 11. HDV PZT için tasarlanan ters öncül bölgesi	44
Şekil 12. HDAg dizi analizi bulguları	50
Şekil 13. Filogenetik ağaca referans oluşturan farklı HDV genotiplerine ait HDAg sekanslarının karşılaştırılması	51
Şekil 14. Filogenetik ağaç	56

RESİM LİSTESİ

Resim 1. HDV RNA RT-PZT bant görüntüleri	45
Resim 2. Saflaştırma sonrası bant görüntüleri	46
Resim 3. Kolonilerin görünümü	47
Resim 4. Kolonilerin görünümü	47
Resim 5. Plazmit DNA'dan PZT görüntüleri	48
Resim 6. EcoR I ve Not I kesimleri	49

KISALTMALAR

HDV : Hepatit delta virus

HBV : Hepatit B virus

HDa_g : Hepatit delta antijeni

PZT : Polimeraz zincir tepkimesi

RT-PZT : Ters transkriptaz polimeraz zincir tepkimesi

DNA : Deoksiribonükleik asit

RNA : Ribonükleik asit

HBsAg : Hepatit B yüzey antijeni

HDa_{g-S} : Küçük delta antijeni

HDa_{g-L} : Büyük delta antijeni

ORF : Open reading frame

EIA : Enzyme immun assay

RIA : Radioimmunassay

REA : Restriksiyon enzim analizi

YAC : Maya yapay kromozomları

BAC : Bakteri yapay kromozomları

c-DNA : Komplementer deoksiribonükleik asit

bp : Base pair (baz çifti)

1. ÖZET

İnfeksiyon oluşturabilmesi için Hepatit B virus (HBV) yüzey antijenine gereksinim duyan hepatit delta virus (HDV), yaklaşık 1700 nükleotit uzunluğunda ve antijen olarak yalnızca hepatit delta antijeni (HDAg) kodlayan bir genoma sahiptir. Bu çalışmada HDAg yi kodlayan bölgenin klonlanarak çoğaltılması amaçlanmıştır.

Gen bankasından indirilen ve Türkiye’de bildirilen tek genotip olan genotip I dizileri referans alınarak hazırlanan öncül setleri kullanılarak çoğaltılan HDAg bölgesi polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile çoğaltılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan ürünün içerdiği DNA miktarı hesaplanarak vektör – insert oranı ayarlandıktan sonra pGEM[®] T-easy vektörüne (Promega) takıldı. Elde edilen rekombinant DNA *Escherichia coli* JM109 hücrelerine transforme edilerek çoğaltıldı. Ampisilin ve mavi beyaz tarama sonucunda elde edilen hedef koloniler çoğaltılarak plazmit saflaştırılması gerçekleştirildi.

Doğru dizinin vektöre takılıp takılmadığının anlaşılması için öncüller kullanılarak hedef bölge yeniden PZT ile çoğaltıldı, EcoR I ve Not I kullanılarak yapılan restriksiyon enzim analizi ile plazmit kesildi ve DNA dizi analizi yapılarak dizinin doğruluğu kontrol edildi.

Klonlama ürünü olarak saflaştırılan plazmitlerden yapılan PZT ile beklenen büyüklükteki 786 bp lik ürün elde edildi. Ayrıca plazmitlerin EcoR I ile kesimi sonucunda 248, 553 ve 2995 bp lik doğru bantlar elde edildi. Yine aynı plazmitlerin Not I ile kesimi sonucunda 819 ve 2982 bp lik doğru bantlar elde edildi. DNA dizi analizi ile de HDAg bölgesinin varlığı doğrulandı. Elde edilen klonlama ürünlerinin, ileride yapılacak olan kantitatif PZT çalışmalarında miktarı belli pozitif kontrol ve DNA dizi analizi ile oryantasyonun doğrulanmasından sonra HDAg protein ekspresyonu çalışmalarında kalıp olarak kullanılması düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler : HDV, PZT, Klonlama, REA

2. SUMMARY

Hepatitis delta virus (HDV) is a satellite of hepatitis B virus (HBV) and possesses a closed circular single-stranded RNA genome of approximately 1700 bases. The genome has an open reading frame (ORF) in the antigenomic polarity that encodes the hepatitis delta antigen (HDAg) of 195 amino acids. In this study, cloning of the whole delta antigen gene was aimed.

Primers for PCR amplification were selected from conserved HDV genotype I sequences of the delta antigen gene, since this is the only HDV genotype reported in Turkish patients.

HDAg region of the HDV gene was amplified by PCR using the chosen primer set. Amplicons were purified and DNA contents were quantified. After the adjustment of vector-insert ratio, the purified amplicon were ligated into the pGEM[®] T-easy vector (Promega). The recombinant DNA was transformed to the Escherichia coli JM109 cells. Target colonies were determined by using ampicillin and blue white colony screening and cultured in LB broth. Plasmids were purified.

Target region was amplified by PCR using the same primers in order to prove the sequence was inserted to the vector. Furthermore, the plasmid containing the insert was evaluated by restriction enzymes EcoR I, Not I and DNA sequencing.

A 786 bp amplicon was generated by the PCR of the plasmid as expected. The restriction digest of the plasmid with EcoR I produced 248, 553 and 2995 bp bands, while the digestion with Not I gave 819 and 2982 bp bands. These results and the DNA sequencing analysis confirmed the successful cloning of the HDAg gene in the correct orientation. The cloned HDV gene segment is planned to be used as a positive run control or quantification standart for the future HDV RT-PCR studies. It can also be used for generating HDAg protein after subcloning to an expression vector.

Keywords : HDV, PCR, Cloning, REA

3. GİRİŞ VE AMAC

Hepatit delta virusu (HDV) ilk defa 1977 yılında Rizzetto ve arkadaşları tarafından kronik hepatit B virusu (HBV) infeksiyonu olan bazı hastaların hepatositlerinde yeni bir nükleer antijen olarak fark edilmiştir. Önce HBV' ye ait olduğu sanılarak, HBV' ye ait delta antijeni ve antikoru saptandığı bildirilmiştir. Ancak 1980'lerde HBV ile infekte hastaların hücre nükleuslarında gösterilen delta ajanının şempanzelere de aktarılabilmesi ile ayrı bir ajan olduğu anlaşılmıştır. 1983' de hepatit delta virus olarak adlandırılmış, 1986 yılında genomu klonlanmıştır. HDV, HBV ile ortak dizilerin olmayışı nedeniyle bugün HBV satellit virusu olarak kabul edilmektedir. Uluslararası virus taksonomi komitesince delta virus cinsi içinde ve bu cinsin tek örneği olarak sınıflandırılmıştır.

HDV yaklaşık 1700 nükleotidlik genoma sahiptir. İnfekte hücreler; viral genomik RNA, viral genomik RNA'nın komplementeri olan antigenom ve delta antijenini kodlayan 800bp'lik polyadenile olmuş mRNA'yı içerir. Delta antijeni HDV'nin yaptığı tek proteindir ve antigenomik RNA tarafından kodlanır. Hem genomik hem de antigenomik formlar karaciğer hücrelerinde gösterilebilir, ancak serumda sadece antigenomik form bulunabilir.

HDV infektivitesi için HBV' ye gereksinim duyar. 36-43 nm çapında sferik bir partiküldür. HDV nin yüzeyel proteinleri HBV' nin yüzeyel antijeni tarafından oluşturulur ; hepatit B yüzey antijeninin (HBsAg)'nin küçük (S) orta (O) ve büyük (L) formlarını içerir ve bu zarf nükleosidi çevreler. HDV'nin nükleokapsidi 19 nm dir. Nükleokapsid, negatif tek iplikcikli çembersel RNA genom ve delta antijenlerinin (HDAg) 60 kopyasından oluşur. İkozohedral simetride olduğu sanılmaktadır. Delta antijeni virüsün kodladığı tek proteindir. Büyük ve küçük olmak üzere iki formu vardır. Küçük delta antijeni (HDAg-S) genomik RNA'nın çekirdeğe taşınması, yıkılmasının önlenmesi, genom replikasyonunun ilerlemesi ve genom ile komplementer genomun çomaksı yapılarına bağlanması için gereklidir. Büyük delta antijeni (HDAg-L) genom replikasyonunu inhibe eder, ancak virion partiküllerinin taşınmasında ve bir araya getirilmesinde gereklidir.

HDV doğada yalnızca insanlarda bulunur ve deneysel olarak HBV virusu ile birlikte primatlara bulaştırılabilir. HDV, HBV ile aynı anda birlikte infeksiyona (koinfeksiyon),

HbsAg taşıyıcısı veya kronik hepatitli kişilerde sonradan eklenerek üstüne enfeksiyona (süperenfeksiyon) neden olur. Birlikte enfeksiyonda fulminan hepatit gelişme riski tek başına HBV enfeksiyonuna göre daha fazladır (%2-20). Birlikte enfeksiyon sırasında HDV HBV'nin replikasyonunu baskılayabilir ve serumda HBsAg kaybolabilir. Üstüne enfeksiyon da risk, kronik aktif hepatit ve sirozlu hastalarda asemptomatik taşıyıcılara göre daha yüksektir. HBsAg taşıyıcılarında gelişen üstüne enfeksiyonda % 50-70 klinik akut hepatit tablosu görülür. Üstüne enfeksiyonda da HBV enfeksiyonuna göre daha sık fulminan hepatit gelişir. Üstüne enfeksiyonun birlikte enfeksiyondan en önemli farkı akut enfeksiyon sonrası daha sık kronikleşme ve siroz görülmesidir.

Bugüne kadar Türkiye'de HDV'nin klonlanması yapılmamıştır. Bu çalışma ile Türkiye'ye özgü bir HDV klonunun elde edilmesi planlanmaktadır. Bu klon kullanılarak ileride rekombinant HDAg'nin elde edilmesi, serolojik ve immunolojik testlerde antijen olarak kullanılması, ayrıca rekombinant plazmitin nükleik asit testlerinde standart olarak kullanımı amaçlanmaktadır. Çalışmamızın klonlama çalışmalarının metodolojisini kurma yönünde ileri çalışmalara önemli bir katkı sağlaması beklenmektedir.

4. GENEL BİLGİLER

4.1 HEPATİT DELTA VİRUSU (HDV)

4.1.1. Giriş

Rizzetto ve arkadaşları 1977 yılında yaptıkları çalışmalar sırasında HDV ile enfekte bireylerin karaciğer biyopsi örneklerinde daha önce tanımlanmamış bir insan patojeni olan HDV'yi immunfloresans yöntemi ile göstermişlerdir (1). HDV'nin önemli bir problem olması onun yüksek düzeyde patojen olması ve hızlı bir biçimde karaciğer hastalığına sebep olmasından kaynaklanır (2). HDV genomu ilk kez 1986 yılında sekanslanmış, klonlanmış ve kendine has bir yapısı olduğu gösterilmiştir (3). Sirküler RNA genomuna sahip ilk hayvan virusu olup bu özellik sadece bitki viruslarında gösterilmiştir (4).

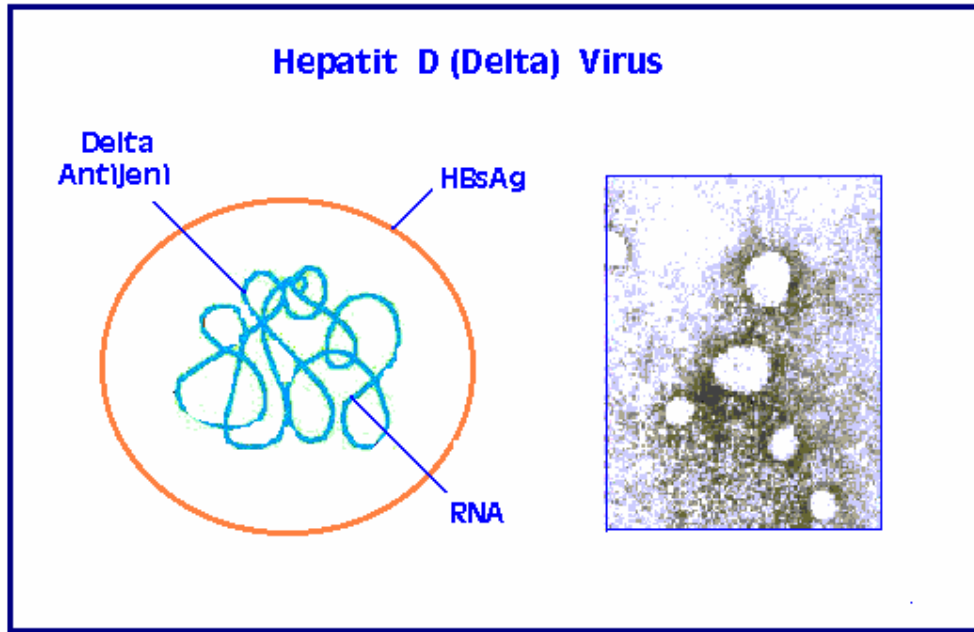
4.1.2. Sınıflandırma

HDV, RNA genom yapısı ve viral replikasyon açısından viroidlere benzemektedir. Ancak viroidler HDV'den daha küçüktürler (400 nt), protein kodlayamazlar ve bitkilerde enfeksiyona neden olurlar. HDV infektivitesi için HBV'ye gereksinim duyar. HDV'nin konak hepatositlerinden salınma ve yeni enfeksiyon bölgelerine girişi için HBsAg'ye ihtiyacı vardır. HDV daha önceleri defektif bir virus olarak nitelendirilmekteyse de HBV ile ortak dizilerinin olmayışı nedeniyle bugün HBV satellit virusu olarak kabul edilmektedir. Ancak klasik satellit viruslardan farklı olarak yardımcı virusuna gereksinim duymadan replike olabilmektedir.

Uluslararası virus taksonomi komitesince delta virusu cinsi içerisinde bu cinsin tek örneği olarak sınıflandırılmıştır (5).

4.1.3. Yapı ve Genom Organizasyonu

HDV zarflı, 36-43 nm çapında bir virustur. RNA genomu ve hepatit delta antijeninden (HDAg) oluşan nükleokapsit 19 nm çapındadır. Nükleokapsit hepatit B yüzey antijeni (HBsAg) ile çevrelenmiştir (6) (Şekil 1).

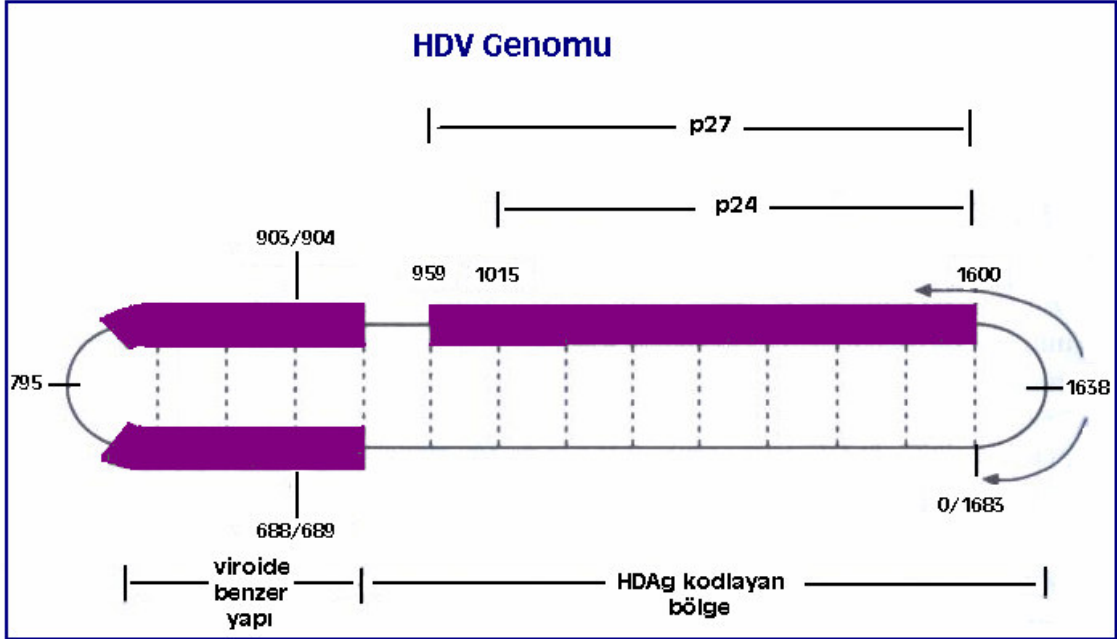


Şekil 1: HDV'nin şematik yapısı ve elektron mikroskop görüntüsü

HDV genomu negatif yönelimli, tek iplikli RNA genomu içerir ve yaklaşık 1700 nt uzunluğundadır. Genomu çemberseldir, ancak G+C oranının yüksek olması (%60) ve intramoleküler baz çiftleşmelerinin yoğunluğu (%70) nedeniyle genom çomaksı (rod-like) bir yapıda bulunur. Denatüre olduğunda ise çembersel biçimine döner (3).

HDV'de genom replikasyonu sadece hepatosit çekirdeklerinde gerçekleşmektedir. İnfekte hepatositlerin çekirdeğinde genom yanısıra bunun tam bir komplementeri olan antigenoma da rastlanır. Genomik RNA ve antigenom, spontan kırılma ve spontan bağlanma reaksiyonlarının gerçekleşmesi için ribozim aktivitesi göstermektedir. Bu aktiviteye HDV replikasyonu için gereksinim duyar (7). Ribozim bölgesi genomik RNA'da 680 ve 780 nükleotitleri arasında, antigenomik RNA'da ise genomik ribozim bölgesine komplementer olacak şekilde yerleşmiştir. Her RNA özgül olarak spontan kırılmanın oluşturduğu tek bir bölgeye

sahiptir. Genomik RNA’da spontan kırılma bölgesi 688-689 nükleotidlerinde U ve G arasındadır. Antigenomik RNA’da ise genomik RNA’ya komplementer olacak şekilde 903-904 nükleotidleri arasına yerleşmiştir (Şekil 2). Genomik ve antigenomik RNA’larda kırılmanın olduğu bölgelerde spontan bağlanma reaksiyonları ortaya çıkmaktadır (8). Hem kırılma hem de bağlanma için magnezyum katyonuna gereksinim vardır.



Şekil 2 : HDV Genomu

4.1.4. HDV Antijeni (HDAg)

HDAg, hepatit delta virüs ribonükleik asitine (HDV-RNA) yüksek bağlanma afinitesi içeren RNA bağlayan bir proteindir. HDAg üç işlevsel bölge içermektedir. Bunlardan birincisi lösin ve izolösinden zengin “leucin zipper” benzeri diziler içeren bölgedir. Bu bölge proteinin amino ucunda 31 ve 52. aminoasitler arasında yer alır ve HDAg’nin bazı görevleri için gerekli protein oligomerizasyonundan ve proteinler arası etkileşimlerden sorumludur (9,10). İkinci bölge 68-88. aminoasitler arasında bulunan bazik aminoasitlerden zengin, çekirdek yerleşim sinyal bölgesidir (nuclear localization). Bu bölge HDV-RNA’nın hücre çekirdeğine yönelmesini sağlar (11,12). Üçüncü bölge, proteinin 1/3 orta bölümünde yer alır ve arjininden zengin iki bölge içerir. Bu bölge RNA bağlanma bölgesi olarak işlev görmektedir (13).

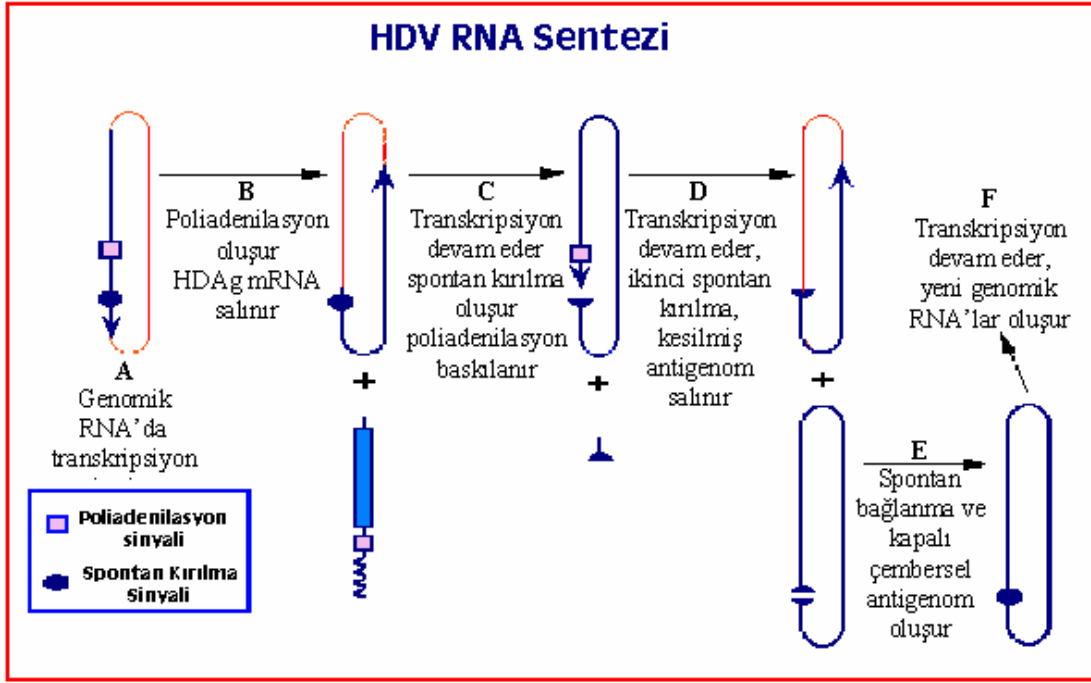
HDV’nin kodladığı tek protein olan delta antijeni tüm infekte hücrelerde bulunur. HDV delta antijeninin iki farklı formunu kodlamaktadır. Antigenomik RNA’da bulunan tek “open reading frame” (ORF) tarafından HDAg’nin küçük (S-195 aa) ve büyük (L-214 aa) formları kodlanmaktadır (14). Virusun aynı mRNA’dan 2 farklı protein yapması “özümlü post transkripsiyonel RNA düzeltme” mekanizması olarak tanımlanır (15). HDAg-S’nin (24kDa)

195. aminoasidinin sonunda bulunan UAG sonlandırıcı kodonunun UGG (triptofan) kodonuna değişmesi ile HDAg-L (27kDa) oluşur (16,17).

HDAg-S, genomik RNA'nın çekirdeğe taşınması, yıkılmasının önlenmesi ve genom replikasyonunun ilerlemesi için gereklidir (18). HDAg-L ise genom replikasyonunu baskılamak, virus partiküllerinin bir araya toplanması, paketlenmesi ve taşınması için gereklidir (19).

4.1.5. Viral Replikasyon

HBsAg aracılıklı hücresele reseptöre bağlanma arkasından HDV hepatosit içine girmekte, soyulmayı izleyerek genom doğrudan çekirdeğe yönelmektedir. Çekirdek yerleşim sinyali ile çekirdeğe taşınan genom burada replike olmaktadır. Viral genom negatif yönelimlidir ve kalıp olarak kullanılarak mRNA'nın sentezini sağlar. Daha sonra bu mRNA'dan hem HDAg, hem de viral genom sentezlenir. HDV birçok bitki virusunun kullandığı "double rolling circle" modeli olarak bilinen yuvarlanan çift çember replikasyon mekanizmasını kullanmaktadır (20). Viral RNA replikasyon öncesi çemberleşir ve bazların %70'i eşleşerek çomak şeklini alır. Bu çomak üzerinde replikasyonu başlatma, bitirme ve poliadenilasyon sinyali içeren özgül bölgeler bulunmaktadır (Şekil 3). Aynı zamanda ribozim gibi işlev görebilen viral genom, replikasyonu başlatma bölgesinde kendi üzerine katlanarak 4 kollu bir yapı oluşturur. Bu kollardan biri enzim, bir diğeri substrat bağlanma bölgesi olarak işlev görerek replikasyonu sağlar. Replikasyon poliadenilasyon bölgesine geldiğinde sentezlenen zincir poliadenil kuyruğu kazanır ve sentez devam ederken ayrılır. Oluşan poliadenile, 800 bazlık mRNA HDAg'nin sentezlenmesini sağlar. HDAg'nini kodlayan mRNA'nın ayrılmasından sonra sentez devam eder ve 1.7 kb'lık bir zincir sentezlenir. Bu antijenom olarak da adlandırılan pozitif iplikçiktir. Antijenomun poliadenillenmesi ortamdaki HDAg ve çomak benzeri yapısı nedeniyle engellenir. Antijenom sentezi ayrılma noktasında sonlanır ve iki ucundan kapanarak çembersel bir yapı oluşturur. Antijenom bu haliyle viral genom için kalıp olarak kullanılabilir. Viral genomun sentezi konak hücre çekirdeğinde ve hücresele RNA polimeraz II enzimi kullanılarak gerçekleşir. Bu sırada replikasyon döngüsü devam ederek yeni mRNA ve antijenom sentezi yapılır. HDAg'ni kodlayan mRNA iki tip protein sentezi yapar. Bunlar aynı kodondan sentezlenmeye başlayan büyük ve küçük HDAg'leridir. Viral genom çekirdekte sentezlendikten sonra küçük (S) ve büyük (L) HDAg ile birlikte paketlenir. Golgi aygıtından geçerek HBsAg kılıfını alır ve hücreden salınır. Virus çoğaldığı hücreye sitopatik ve sitostatik etki yapmaz (6).



Şekil 3 : HDV RNA Sentezi

4.1.6. Viral Heterojenite

RNA virüslerinin en önemli özelliği genetik çeşitlilik göstermeleridir (21). HDV'nin oluşturduğu genetik heterojenite 1986 yılında bildirilmiştir (3). Bu çalışmada infekte bir bireyde birbirleriyle ilişkili farklı genomların karışımı bulunmuştur. Yeni moleküler tekniklerin gelişmesiyle HDV'nin hem aynı hem de farklı bireylerdeki genetik heterojenitesini göstermek için yeni yöntemler geliştirilmiştir. Yılda genom başına 3×10^{-2} ile 3×10^{-3} arasında delta mutasyonu hesaplanmıştır (16). HDV genetik heterojenitesi tüm viral genoma düzenli bir şekilde dağılmamıştır. Genomik, antigenomik kırılğan bölge ve delta antijeninin RNA bağlayıcı bölgesi oldukça korunmuştur.

Tüm dünyada toplanan HDV izolatlarının genetik analizi HDV'nin üç ana genotip altında geliştiğini göstermektedir. Bunlar sırasıyla I, II ve III olarak belirtilmekte olup, dünya üzerinde dağılımları farklılık göstermektedir (6). Nükleotid dizimleri bu genotipler arasında belirgin olarak farklıdır. Genotipler arasında nükleotid düzeyinde %40, aminoasit düzeyinde ise %35 farklılık vardır. Genotip I tüm dünyada en yaygın olan genotiptir. ABD, Avrupa ve Ortadoğu'da yaygındır. Genotip I'de iki tane alt grup bulunur. Bunlar Ia ve Ib'dir. Ia Asya'da, Ib ABD'de, her ikisi de Akdeniz bölgesinde sıkça görülür. Genotip II hastalığın daha ılımlı formlarıyla ilişkili bulunmuştur. Japonya, Taiwan ve yakın zamanda Rusya'nın Yakut

bölgesinde gösterilmiştir (22). Genotip III ise Güney Amerika'nın kuzeyinde ciddi fulminan hepatit salgınlarıyla ilişkili bulunmuştur (23). İlginç olarak bu genotip HBV genotip F ile koinfekte bireylerde saptanmıştır (23).

4.1.7. Konakçı İlişkisi

Doğada HDV infeksiyonu sadece insanlarda saptanır. Deneysel olarak ise hepadnavirüslerin replike olabildiği şempazeler, "woodchucks" ve Pekin ördekleri gibi konakçılarda replike olabilir. HBV ile infekte hücre kültür modelleri de HDV replikasyon çalışmaları için elverişlidir (24,25).

4.1.8. Yayılım ve Epidemiyoloji

HDV infeksiyonu dünya çapında bir yayılıma sahiptir. Doğu Avrupa ve ABD'de HDV endemik değildir ve infeksiyon sadece damar içi ilaç kullananlarla sınırlıdır. Öte yandan çoklu kan transfüzyonu alan bireylerde ve hemofili hastalarında HDV, kan bankası HBsAg tarama programları ve yaygın HBV aşılama çalışmalarıyla neredeyse yok olmuştur (26). Moleküler epidemiolojik yaklaşımlar HDV'nin yayılmasındaki yeni mekanizmaların anlaşılmasını sağlamıştır. Böylelikle HDV'nin cinsel temasla geçebileceği ve aile bireyleri arasında da geçiş olabileceği doğrulanmıştır (27).

Son 10 yıl içerisinde elde edilen bulgular ile HDV epidemiyolojisi açısından değişikliklerin olduğu ortaya konmuştur. Akut ve kronik hepatitlerdeki HDV prevalansında Akdeniz bölgesinde bir azalma olduğu gözlenmiştir. Bu durum HBV ile aşılama, immünsüpresif durumların kontrolü ve sosyoekonomik iyileşme ile bağlantılıdır. Ancak dünyanın diğer bölümlerinde HDV açısından yeni odaklar oluşmaktadır. Rusya'nın Güney Doğusunda bulunan Samara şehrinde 1998-99 yıllarında fulminan akut viral hepatit salgını ortaya çıkmıştır (28). Samara şehrinde ortaya çıkan fulminan HDV suşları genotip I olup, filogenetik olarak Uzak Doğu ve Doğu Avrupa suşlarına yakındır. Yeni infeksiyon odakları arasında Japonya'nın Okinawa adası, Kuzey Hindistan ve Ermenistan sayılabilir (29-31). Güney Amerika'nın özellikle subtropikal bölgelerinin yeni HDV salgınları için potansiyel rezervuar görevi gördüğü bildirilmiştir (32).

Genel olarak bakıldığında HDV infeksiyonu hala ciddi bir toplum sağlığı sorunudur. Yaklaşık olarak HBV taşıyıcılarının %5'i HDV ile koinfekte olup, tüm dünyada 15 milyon insan HDV ile infektidir. Vakaların bu kadar çok olması sebebiyle HDV major bir mortalite ve karaciğer transplantasyonu sebebidir.

4.1.9. İnfeksiyonun Geçiş Yolları ve Klinik Özellikleri

HDV infeksiyonu iki farklı tipte karşımıza çıkabilir. Birlikte infeksiyon (koinfeksiyon) HDV ile HBV'nin eşzamanlı olarak infeksiyon yapması ile ortaya çıkar. Üstüne infeksiyon (süperinfeksiyon) ise HBV ile kronik infekte kişilerde HDV infeksiyonu sonradan gelişir. HBV'ye karşı immün olan anti-HBs'li kişiler HDV infeksiyonuna duyarlı değildir.

HBV ile birlikte görülen akut hepatit D infeksiyonunun klinik ağırlığı orta şiddetten, ağrı ve fulminan hepatite kadar değişebilir. HDV çoğu vakada normal bir hepatit B infeksiyonundan klinik ve histolojik olarak ayrılmayan tipik akut, kendini sınırlayan bir hepatit tablosu ile karşımıza çıkar. Genel olarak tam iyileşme gözlenirse de, hastaların %2'sinde infeksiyon kronikleşir. Tanı HDV ve HBV belirleyicilerinin bir arada olması ile konulur (6).

Üstüne infeksiyon tipinde önceden mevcut HBV viremisi HDV virulansının ortaya çıkması için biyolojik zemin sağlar. Klinik olarak bu olay ağır akut hepatitin fulminan gidişle sonuçlanabilir (33). Önceden var olan HBV infeksiyonunun tekrar ortaya çıkması şeklinde olabileceği gibi, eski HBsAg taşıyıcısında yeni bir infeksiyon şeklinde de görülebilir. HBsAg taşıyıcılığı bilinmiyorsa hasta yanlışlıkla klasik akut hepatit B tanısı alabilir. Doğru tanı anti-HBc IgM'nin negatif olması ve HDV belirleyicilerinin pozitif olmasıyla konur. HBsAg taşıyıcılığının HDV'nin sürekli replikasyonuna zemin hazırlaması nedeni ile, HDV üstüne infeksiyon taşıyıcılarının büyük çoğunluğunda (%90'ın üzerinde) ilerleyici hepatit ortaya çıkar. Geri kalan kısmında ise ya HBsAg taşıyıcılığı devam ederken HDV düzelir yada anti-HBs gelişmeden HBV infeksiyonu ortadan kalkar (34).

Karaciğer transplantasyonlarının yapılması ile birlikte HDV infeksiyonu açısından üçüncü bir patern olarak "latent" infeksiyon ortaya çıkmıştır (35). Karaciğer transplantasyonundan birkaç gün sonra düşük düzeyde HBV replikasyonu olsa da HDV infeksiyonu ortaya çıkabilir. Bu tip HDV infeksiyonu latent kalır ve karaciğer hastalığı ile ilgili hiçbir bulgu vermez. Ancak yüksek düzeyde HBV replikasyonu meydana gelirse HDV infeksiyonu hızlıca gelişir ve bu durumda transplantasyon sonrası ciddi karaciğer hastalığına sebep olur.

4.1.10. Patogenez

HDV'nin patolojik etkileri replike olabildiği tek organ olan karaciğer ile sınırlıdır. Karaciğerde hepatosellüler nekroz ve inflamasyonla karakterli, akut veya kronik hepatite neden olur. Histolojik olarak diğer hepatitlere benzer. HDV ile ilişkili karaciğer hastalığı patogenezine hala tam olarak bilinmemektedir. Her ne kadar virusun yaptığı sitopatik etki bildirilmiş olsa da (36), bu hipotez sadece HDAg ekspres eden graflarda (35), HDV ile infekte insanların hepatositlerinde karaciğer hasarının olmamasıyla çürütülmüştür. Konakçı immün mekanizmalarının (örneğin CD4+ ve CD8+ T lenfositlerinin) karaciğer hasarındaki rolleri bilinmemektedir (37). Viral genotiplendirme ve klinik gidiş arasındaki ilişki son yıllarda

çok gündemdedir. Ancak genotiplendirmenin patogeneze ve hepatit D enfeksiyonunun ciddiyetine olan etkisi bilinmemektedir.

4.1.11. Tanı

Moleküler tekniklerin hızla ilerlemesi HDV enfeksiyonu açısından tanıda yeni olanaklar sağlamıştır. Günümüzde HDV-RNA'nın polimeraz zincir tepkimesi (PZT) ile saptanması en güvenilir yöntemdir. Bu moleküler test sayesinde "enzyme immunoassay" (EIA) ve "radioimmunoassay" (RIA) ile delta antijeni saptamadaki kısıtlılıklar ortadan kalkar. PZT, enfeksiyonun erken dönemini saptar. Diğer taraftan PZT antiviral sağaltımın etkinliğinin izleminde de kullanılır. Delta antijeninin karboksil ucu en korunan bölge olduğu için PZT çalışmalarında öncül seçimi genellikle bu bölgeden yapılır. (38). Dizileme ve filogenetik analiz HDV genotiplenmede referans yöntemidir. Yanısıra, restriksiyon enzim analizi (REA) gibi teknikler ucuz, kolay uygulanabilir olmaları nedeniyle özellikle epidemiyolojik çalışmalarda kullanılmaktadır (39).

HDV enfeksiyonu tanısında ayrıca delta antijenine karşı IgG ve IgM türü antikorların saptanması da kullanılabilir. IgM türü antikorların saptanması sadece bir enfeksiyon belirleyicisi olarak değil, ayrıca hastalığın klinik gidişi açısından da önemlidir. Kural olarak kronik D hepatitinde IgG ve IgM türü antikorlar yüksek titrelerde saptanır (IgM'lerin yapısı burada monomerdendir). IgM türü antikorların kaybolması yada azalması kronik HDV enfeksiyonunun rezolüsyonuna işaret eder. Bu olay spontan gerçekleşebileceği gibi interferon aracılığıyla da olabilmektedir (40).

4.1.12. Tedavi ve Korunma

HDV enfeksiyonunun özgül tedavisi henüz yoktur. Alfa-interferon ile yüksek doz ve uzun süreli tedavi uygulanması remisyon sağlayabilmektedir. Tedavi ile klinik olarak hastalığın ilerlemesi yavaşlatılabilmekte; fakat HDV RNA'nın kaybolması sağlanamamaktadır. Fulminan seyreden akut HDV enfeksiyonunda ve son dönem kronik HDV enfeksiyonunda karaciğer transplantasyonu endikasyonu vardır. Transplantasyon sonrası HDV replikasyonu devam etse bile HBV enfeksiyonu baskılandığı sürece karaciğer hastalığı engellenebilmektedir (6).

HBV enfeksiyonundan korunmaya yönelik önlemler HDV için de geçerlidir. Kan ve kan ürünlerinin HBV yönünden taranması, damar içi uyuşturucu madde bağımlılarının eğitimi, hijyen koşullarının düzeltilmesi korunmada önem taşımaktadır. HBV aşısının uygulanması ile hem HBV hem de HDV enfeksiyonundan korunma sağlanabilir (6).

4.2. GEN KLONLAMA

4.2.1. Gen Klonlama Nedir?

Gen Klonlama Teknolojisi “Rekombinant DNA Teknolojisi” olarak da adlandırılmakta olup genetik bilginin (DNA) bir organizmadan aynı yada farklı türe ait diğerk bir organizmaya aktarımını kapsar. Klonlama sonucunda ilgilenilen gene ait yapısal ve işlevsel analizler yapılabildiğı gibi, genin çoğaltılması yoluyla o gene ait ürünlerde çoğaltılacağından biyoteknolojik açıdan büyük bir öneme sahiptir (41). DNA klonlaması uygulamalarından bazıları aşağıda sıralanmıştır :

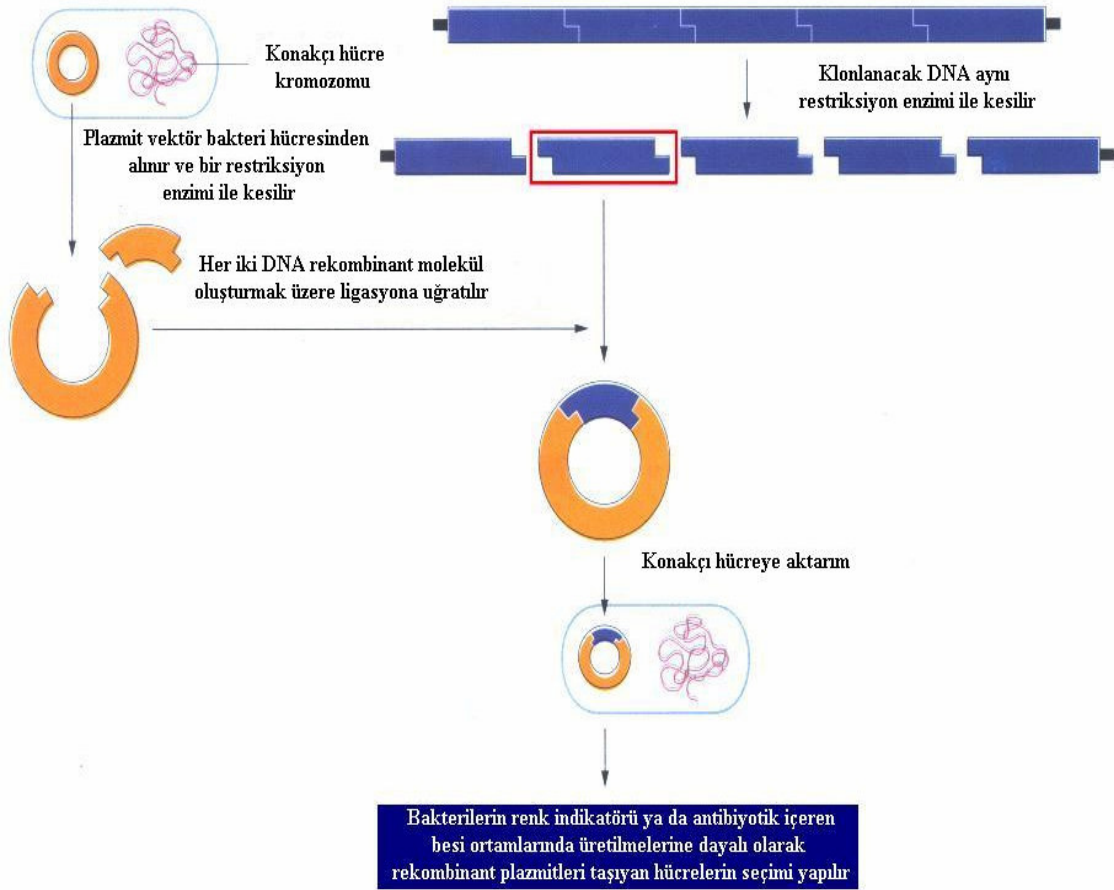
- DNA dizi analizi ve dolayısıyla protein sekanslarının türetilmesi
- Gen promotorları ve diğerk kontrol sekanslarının izolasyonu ve analizi
- Normal ve değıştirilmiş formların geniş ölçekte üretimiyle protein/enzim/RNA işlevlerinin incelenmesi
- Mutasyonların taranması, örneğın hastalığa neden gen hasarları
- Biyoteknoloji; insan insülini ve büyüme hormonu gibi biyolojik öneme sahip proteinlerin ve diğerk moleküllerin geniş ölçekte ticari üretimi
- Hayvanların ve bitkilerin mühendisliğı ve gen terapisi
- Özelliklerini değıştirmek amacıyla protein mühendisliğı

Rekombinant DNA teknolojisi, bakteri ve virüslerle yapılan çalışmalarda geliştirilen genetik teknikleri ve nükleik asit biyokimyası yöntemlerini birlikte kullanır. Bu teknikteki temel işlemler bir dizi basamağı içerir (42) (Şekil 4).

- Doku yada hücrelerden DNA veya RNA izole edilir.
- Eğer genom DNA ise PZT, RNA ise RT-PZT yapılır.
- DNA moleküllerini özgül dizilerden tanıyıp kesen restriksiyon endonükleazlar yada restriksiyon enzimleri denilen enzimlerle DNA parçaları oluşturulur.
- Restriksiyon enzimleri oluşturulan DNA parçaları, vektör yada taşıyıcı molekül adı verilen diğerk DNA molekülleri ile birleştirilir. İçine bir DNA parçası sokulmuş olan vektör, bir rekombinant DNA molekülüdür.
- Kendi DNA’sı ile birlikte, üzerinde yabancı DNA molekülünü taşıyan vektörün oluşturduğu rekombinant DNA molekülü, bir konakçı hücreye aktarılır. Rekombinant

molekül konakçı içerisinde kendini eşler ve klon olarak bilinen birbirine özdeş kopyaları oluşturur.

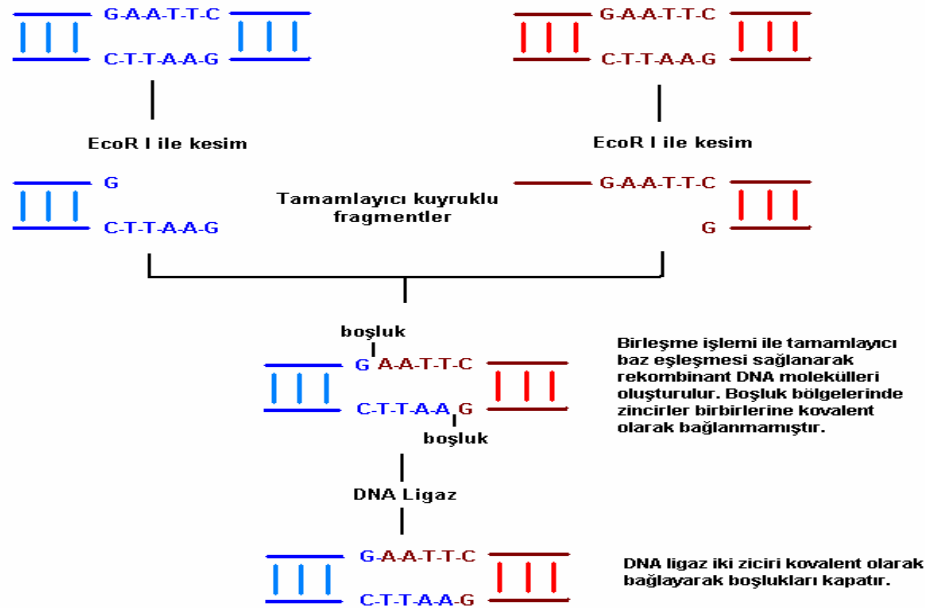
- Konakçı hücre kendisini eşlerken, rekombinant DNA molekülleri de yavru hücelere geçer ve her biri klonlanmış DNA dizisinin kopyalarını taşıyan konakçı hücre topluluğu oluşur.
- Klonlanmış DNA konakçı hücrelerden izole edilebilir ve incelenebilir.
- Potansiyel olarak, klonlanmış DNA transkripte edilebilir, oluşan mRNA proteine çevrilebilir. Söz konusu gen ürünleri izole edilebilir ve araştırma yada ticari amaçlarla satılmak için kullanılabilir.



Şekil 4 : Gen klonlamanın şematik olarak aşamaları

4.2.2. Restriksiyon Enzimleri

Gen klonlaması teknolojisinin en önemli dönüm noktalarından biri, restriksiyon enzimlerinin bulunmasıdır. Bu enzimler bakterilerden izole edilirler. Bakteriye istila eden viral DNA'yı parçalayarak, virüs infeksiyonunu önlediği yada kısıtladığı için bu ismi almışlardır (42). Restriksiyon enzimleri özgül DNA dizilerini tanırlar ve bu dizilerden her iki DNA zincirini keserler. DNA'yı tanıma bölgelerinden iki şekilde kesebilirler. İki DNA ipliğinin aynı baz çiftinden kesildiği durumlarda (örneğin, Hae III enzimi) küt uçlu DNA parçaları oluşur. Alternatif olarak, restriksiyon enzimi (örneğin EcoR I) küt uçlu parçaların aksine çıkıntı uçlu parçalar oluşturabilir ve tek iplikli bu uçlar tanıma dizisine ait olduklarından birbirlerini tanımlayıcı niteliktedirler (yapışkan uçlar) ve hidrojen bağı ile birbirlerine bağlanırlar (41). Bu bağlanma kovalent olmayıp sadece baz eşleşmesine dayanır (Şekil 5). Kovalent bağlanma ligaz enzimi ile sağlanır. Ligaz enzimi, DNA zincirinde birbirine bitişik nükleotidlerin serbest 5'-fosfat ve 3'-hidroksil grupları arasında fosfodiester bağı oluşturur (43). Yapışkan uçlar iki DNA molekülünün bir araya gelmesini kolaylaştırır fakat, iki küt ucu da birleştirmek mümkündür.



Şekil 5 : EcoR I restriksiyon enzim kesimi

4.2.3. Vektörler

Klonlanacak DNA molekülü konak hücreye taşıyıcı bir DNA molekülü (vektör) aracılığı ile aktarılabilir. Kullanılacak vektörün seçimi, klonlamanın amacı ve klonlanacak DNA molekülünün büyüklüğüne göre yapılır. Bir DNA molekülünün vektör olarak görev yapabilmesi için bazı özellikleri taşıması gerekir (42):

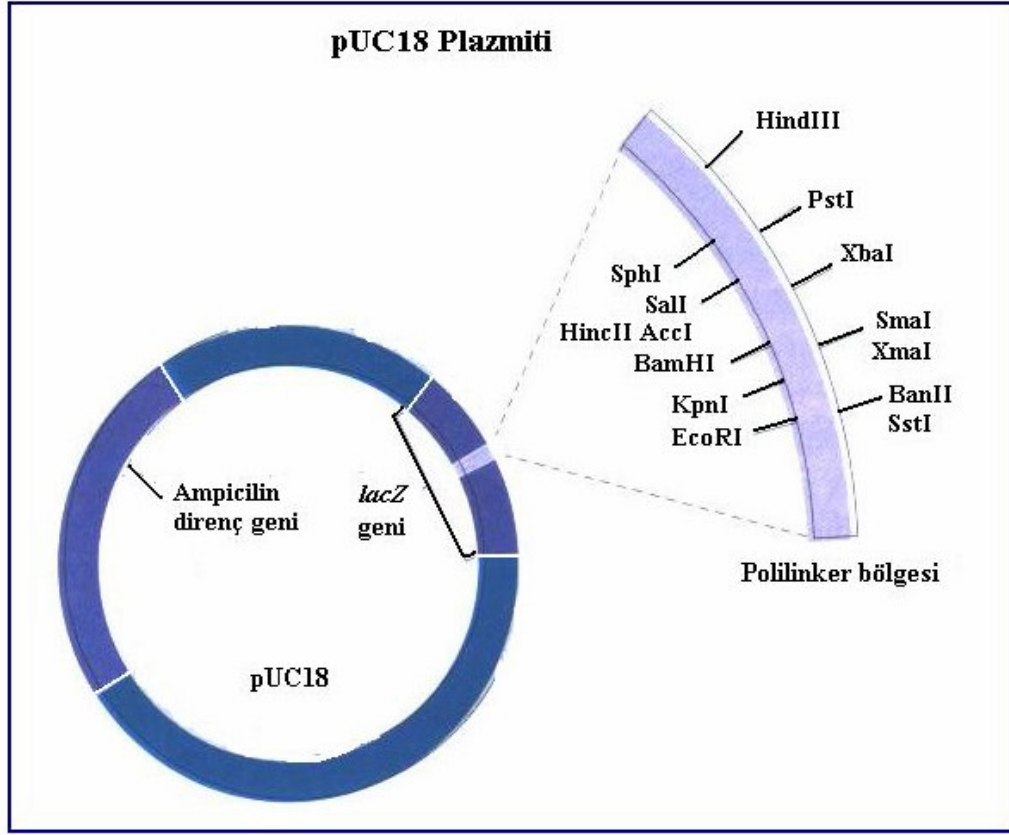
- 1) Kendisi ve taşıdığı DNA molekülünü bağımsız olarak çoğaltabilmelidir.
- 2) Vektör üzerindeki restriksiyon enzimlerinin sadece bir kırılma bölgesi olmalıdır. Bu bölge, restriksiyon enzimi ile kırılarak, aynı enzimle kırılan başka bir DNA parçasının bu bölgeye sokulması için kullanılır.
- 3) Üzerinde seçilebilir bir belirleyici (marker) taşınmalıdır (genellikle bir antibiyotik direnç geni veya konakçı hücrede olmayan bir enzime ait gen, belirleyici olabilir). Belirleyici, vektör taşıyan konak hücreleri, vektör taşımayan konakçı hücrelerden ayırmak için kullanılır.
- 4) Konakçıdan kolay izole edilebilir olmalıdır.

4.2.3.1. Küçük DNA Parçalarını Klonlamak İçin Vektörler

a) Plazmitler

İlk geliştirilen vektörler genetik olarak değişikliğe uğratılmış plazmitlerdir. Plazmitler, yaygın olarak kullanılan, ancak nispeten küçük DNA parçalarının klonlamasına olanak sağlayan vektörlerdir. Plazmitler, bakteride bulunan ekstrakromozomal, çift iplikli ve halkasal yapıdaki DNA molekülleridir ve bakteri içinde bağımsız olarak eşlenebilirler. Bir konakçı hücreye sadece bir plazmit girmesine rağmen, plazmit kendisinin çok sayıda kopyasını oluşturacak şekilde çoğalır. Bu tür bir plazmit vektör olarak kullanıldığında, klonlanmış DNA'nın çok fazla sayıda kopyasının oluşmasını sağlar. Vektör olarak kullanılan plazmitler, sınırlı sayıda uygun enzimlerin kesim bölgelerini ve plazmiti taşıyan konak hücreleri ayırt etmeye yarayan belirleyici genleri taşıyacak şekilde değişikliğe uğratılırlar (42).

Genetik mühendisliği ile oluşturulmuş birçok plazmit vektör vardır ve bu vektörler, yabancı DNA'yı taşıyan plazmitleri içeren konakçıların belirlenmesini kolaylaştıran özelliklere sahiptirler. Örneğin pUC18 böyle bir plazmittir (42) (Şekil 6).



Şekil 6 : pUC 18 plazmiti

pUC18 küçük bir plazmittir ve daha büyük DNA parçalarının klonlanmasını mümkün kılar. Çok sayıda kopya oluşturacak şekilde kendini eşleyebilir. *LacZ* geninin içinde bulunan klonlama (polilinker) bölgesinde çok sayıda restriksiyon enzim kesim bölgesi bulunmaktadır. pUC18 plazmitini taşıyan bakteriler, X-gal içeren ortamlara konulduğunda, mavi koloniler oluştururlar. Polilinker bölgesine DNA girdiği zaman, *lacZ* geni bozulur ve beyaz koloniler oluşur (44).

b) Bitki Klonlama Vektörleri

Bitkide oluşan tümörlerin nedeni bakteride bulunan Ti plazmitleridir. Bu plazmit üzerinde bulunan transfer DNA (T-DNA) tümör oluşumundan sorumlu genleri taşıyan kısımdır. *Agrobacterium* infeksiyonu sonucunda T-DNA bölgesi bitki hücrelerine aktarılmakta ve bitki kromozomu ile bütünleşmektedir. Ti plazmitlerinin bu doğal genetik transformasyon yeteneklerinden bitkilere gen aktarımında yararlanılmaktadır (41).

4.2.3.2. Büyük DNA Parçalarını Klonlamak İçin Vektörler

a) Bakteriyofaj Vektörleri

DNA molekülünün klonlanmasında kullanılan plazmit vektörler genellikle 10kb'a kadar "insert" DNA taşıyabilirler. Fakat, örneğin kütüphane oluşturulmasında daha büyük DNA parçalarını taşıyabilen vektörler gereklidir. Bakteriyofajlar, bakteriyi infekte eden virüsler olup diğer virüsler gibi DNA veya RNA yapısında genetik materyal ve protein kılıfı taşırlar (41).

En yaygın kullanılan virüs *E.coli* lambda fajıdır. Bu fajın genlerinin hepsi tanımlanmış, tüm genom haritası çıkarılmış ve nükleotid dizisi belirlenmiştir. Faj genomunun gerekli bileşenleri infeksiyon sonrası viral DNA'nın çemberleşmesini sağlayan uç *cos* bölgeleri, replikasyon başlangıç bölgesi ve replikasyon için gerekli proteinleri kodlayan viral genlerdir. Lambda kromozomunun ortasında yer alan genomun üçte birlik kısmı, faj için çok gerekli bir bölge değildir. Bu bölge yabancı bir DNA ile değiştirilebilir. Lambda yer değiştirme vektörü ile klonlama yapmak için faj DNA'sı restriksiyon enzimi ile kesilir. Böylece faj DNA'sı sol kol, sağ kol ve orta bölüm olmak üzere üçe bölünür. Sağ ve sol kollar orta kısımdan ayrılır ve aynı restriksiyon enzimi ile kesilmiş, klonlanmak istenen yabancı DNA ile birleştirildikten sonra DNA ligaz ile kovalent olarak bağlanır. Konakçı hücreler kimyasal bir işlemle geçirgen hale getirilir ve rekombinant moleküller ile karşılaştırılır (42). Her faj petri kabına ekilmiş konakçı bakteri hücrelerinde plak oluşturarak çoğalır yada sıvı ortamdaki hücreler infekte edilerek parçalanmış hücreler toplanır.

Vektör olarak kullanılan diğer fajlardan birisi de tek iplikli bir faj olan M13 dür (43). Bu faj, bakteri hücrelerini infekte ettiğinde tek iplikli DNA çift zincirli molekülünü oluşturmak üzere replike olur. Bu çift iplikli yapı, replikatif form (RF) olarak adlandırılır. Yabancı DNA parçası, faj DNA'sındaki bir restriksiyon enzim bölgesine sokulabilir. Faj, tekrar bakteri hücrelerine verildiğinde, RF DNA molekülleri pozitif iplikleri oluşturmak üzere kendini eşler. Oluşan bu tek zincirli DNA moleküllerinde, klonlanmış DNA'nın da tek zinciri bulunur (42).

b) Kozmitler

Kozmitler hibrit vektörlerdir. Plazmit ve bakteriyofaj vektörlerinin özelliklerini bir arada tutarlar. Plazmitler gibi replike olabilirler ve *cos* bölgeleri içerdiklerinden faj parçacıkları içerisinde de paketlenirler. Kozmit DNA replikasyon için gerekli viral genleri taşımadığından konak hücreye girdiğinde virüs olarak çoğalamazlar. Bu viral genler olmadığı için daha büyük DNA parçalarının (45kb'a kadar) yerleştirilmesine olanak sağlarlar (41).

c) Maya Yapay Kromozomları (YAC)

Yaklaşık 100-1000 kb büyüklüğündeki DNA parçalarını yapılarına alabildiklerinden ve büyüme sürecinde kalımlı olduklarından dolayı büyük ve karmaşık genomların haritalama çalışmaları için çok önemlidirler.

d) Bakteri Yapay Kromozomları (BAC)

100-300 kb büyüklüğündeki DNA parçalarını *E.coli* hücrelerine klonlamak için kullanılan bir vektördür. *E.coli* bakterisinde doğal olarak bulunan F-faktör plazmitine dayalıdır.

4.2.4. DNA Ligasyonu

Klonlama çalışmalarında amaca uygun olarak çok sayıda plazmit türü kullanılmaktadır. Bu plazmitler çoğu zaman daha önce de bahsedildiği gibi uygun restriksiyon enzimleri ile kesilmekte ve aynı enzimlerle kesilen DNA'lar ile bağlanmaktadır. Bu bağlanma işleminde, hedef DNA fragmentini yüklemek için DNA moleküllerini kovalent bağlayan bir yöntem gereklidir. DNA ligaz enzimleri de sadece bu fonksiyonu gerçekleştirir; bunlar 5' ucunda bir fosfat grubuna sahip olan dsDNA molekülünün bir ipliğindeki kırılmayı onarır (birleştirir). DNA ligaz enzimleri, fosfat grubunun aktifleşerek 3'-OH'a bağlanması için adenilatlanmış bir ajana gereksinim duyarlar; bu işlem için *E. coli* enzimi NAD⁺ kullanır, çok yaygın kullanılan bakteriyofaj T4 enzimi ise ATP kullanır. Restriksiyon enzim reaksiyonunun tam tersine, ligazlar yapışkan uçların tutunmuş çiftindeki kırık olan fosfodiester bağları açığını kapatmada etkilidir. T4 ligaz enzimi oldukça düşük verimlilikte olsa da bir küt ucu diğerine bağlayabilir (44).

4.2.5. Rekombinant Molekülün Konak Hücreye Aktarılması (Transformasyon)

Rekombinant DNA moleküllerinin konak hücrelere aktarılması işlemi genel olarak gen aktarımı (transformasyon) olarak adlandırılmakta olup rekombinant molekülün aktarılacağı organizmaya bağlı olarak farklı gen transfer yöntemleri kullanılmaktadır. Rekombinant DNA moleküllerinin konak hücrelere aktarımında kullanılan yöntemler dört grupta toplanabilir (41).

Kimyasal Teknikler

Fiziksel Teknikler

Füzyon Teknikleri

Viral Teknikler

4.2.5.1. Kimyasal Teknikler

Klonlanan genlerin hücelere aktarılmasında uygulanan kimyasal yöntemlerden en yaygın olarak kullanılanı kalsiyum-fosfat transfeksiyonudur. Bu yöntem, istenilen geni ve bu genin anlatımı için gerekli düzenleyici elementleri taşıyan plazmit DNA'nın çöktürülmesine dayanır. Plazmit DNA, CaPO₄ ile çöktürölüp hedef hücelere doğrudan eklenir. Bu hüceler, daha sonra zara bağlanan çökeltiyi sindirmek için içlerine alırlar ve bu şekilde gen aktarımı olur.

4.2.5.2. Fiziksel Teknikler

Başlıca 3 grupta toplanır.

a) Mikroenjeksiyon

Bu teknikte, genetik materyaller özel pipetlerle (mikropipet) hücelerin içlerine direk olarak verilir. Az sayıda DNA hücreye verilebilmesine rağmen, başarılı alım oranı yüksektir.

b) Elektro- ve Kimyasal Porasyon

Direk gen transfer yöntemlerinden olup, yeni genlerin hücreye girişini sağlamak için hücre zarında yarıklar yada delikler açılmasını kapsar. Hüceleri ya özel kimyasal çözeltiler içinde bekleterek kimyasal porasyon yada düşük elektrik akımına maruz bırakarak elektroporasyon sağlanır. Genellikle bakteri hücelerine gen aktarımında kullanılan bu yöntemlerde, bakteri hücelerinin DNA molekülünü hücre içine alabilme yeteneğinden (kompetens) yararlanılmaktadır. Soğuk CaCl₂ çözeltilisinde bekletilmiş *E.coli* hüceleri kısa bir süre yüksek sıcaklık şokunda tutularak DNA molekülünü alabilme yetenekleri yeterli duruma getirilmekte ve yabancı DNA'nın bu hüceler tarafından alınması sağlanmaktadır.

c) Biyolistik

1980 yıllarında geliştirilmiş bu yöntemde, aktarılacak DNA çoğunlukla altın yada tungsten partikülleri (0.73µm) üzerine çöktürölerek iyice bağlanmaları sağlanır. Partikül-DNA karışımı özel aletine yerleştirildikten sonra hüceler üzerine mikroprojektil ile bombardıman yapılarak partiküller üzerinde bulunan genetik materyallerin hücre içine girmesi sağlanır. Bu yöntem, özellikle bitki hücelerine gen aktarımında başarı ile uygulanmaktadır.

4.2.5.3. Füzyon Teknikleri

Her iki ebeveynden belirli özellikler taşıyan hibrit hücreler oluşturmak suretiyle iki hücrenin genetik içeriğinin birleştirilmesi yöntemidir. Başlıca iki tür füzyon tekniği vardır.

a) İstenilen özellikteki genleri bazı özel taşıyıcılara bağlayarak hedef hücrelerle birleştirme yöntemidir. Bu amaçla lipozom (lipit vezikülleri) ve eritrositler kullanılmaktadır.

b) Füzyonla gen aktarımının diğer bir yöntemi ise, iki hücrenin veya bunlardan elde edilen kromozomların diğer hücrelerle birleştirilmesi teknikleri oluşturmaktadır.

4.2.5.4. Viral Teknikler

Genetik materyalleri hücrelere etkin bir şekilde aktarma da birçok DNA ve RNA karakterinde genetik materyal taşıyan virüslerden yararlanılmaktadır. Virüs partikülleri infeksiyona yol açma niteliğine sahip olduklarından infeksiyon yoluyla taşıdıkları yeni geni konak hücreye aktarabilirler.

4.2.6. Rekombinant Molekülü Taşıyan Konak Hücrelerin Seçilmesi

Rekombinant DNA'yı almış bakteriyi saptamak, gen aktarım tekniğinin en önemli aşamasını oluşturmakta olup, bu amaçla kullanılan bazı yöntemler aşağıda yer almaktadır.

4.2.6.1. Koloni Seçimi

Rekombinant DNA'nın aktarılmasıyla yeni özelliklere sahip hücrenin yaşamasına imkan veren bir ortamın sağlanması ile yapılan seçim sonucu yalnız bu yeni tip hücreler canlı kalıp çoğalacağından gen aktarımının başarılı olup olmadığı saptanmış olur. Böyle bir ortamın seçiminde bakterinin antibiyotiklere dirençliliği gibi özellikleri dikkate alınmalıdır (41). Örneğin, ampisiline dirençlilik beta laktamaz geni (*amp^r*) ile sağlanır. Transformasyon yapılan hücreler ampisilin içeren plaklarda büyütülürse, sadece transforme olmuş plazmitin varlığından dolayı beta laktamazı ifade eden hücreler yaşamını sürdürür ve çoğalırlar (44).

4.2.6.2. Koloni Hibritleme

Yabancı DNA taşıyan bakteriler nokta tarzında ekilir ve elde edilen koloniler filtre kağıdı üzerine simetrik olarak alınır. Kağıt alkali çözeltiyle muamele edilerek bakterilerin parçalanması ve DNA'nın denatürasyonu sağlanır. DNA kağıt üzerine sabitlendikten sonra, radyoaktif DNA veya RNA probu eklenir ve bir süre bekletildikten sonra proba tamamlayıcı nitelikteki bakteri DNA'sı birleşerek çift iplikli radyoaktif DNA segmenti oluşur (hibritleme).

Hibritleme sonrası kağıdın üzerine X-ışınlarına duyarlı film kapatarak radyoaktivitenin filme etkimesi sağlanır. Otoradyoaktif yöntemle film üzerindeki radyoaktif bölgeler siyah lekeler halinde görülür. Bu bölgelerde istenilen gen DNA'sı olduğundan, agar üzerinde yeri belirlenir ve koloniler alınarak istenilen gen yönünden incelenir (45).

4.2.6.3. İmmunolojik Yöntemle Saptama

Bakteriye yeni aktarılan genin anlatımı sonucu sentezlenen gen ürünü (protein) immunolojik yöntemlerle (agar jel difüzyon yöntemi, RIA ve ELISA gibi) belirlenebilir. RIA ve ELISA yöntemlerinde, hücreden elde edilen tüm proteinleri içeren örnekler plastik plaklara konularak üzerlerine aranılan proteine özgün antikor ve ikinci antikor uygulanır. Yıkama sonrası, radyoaktivite (RIA'da) veya enzim aktivitesi (ELISA'da) ölçülerek aranılan protein belirlenir (41).

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. GEREÇ

5.1.1. Çalışma Grubu

Dokuz Eylül Üniversitesi Hastanesi moleküler tanı laboratuvarına HDV-RNA istemiyle gelen ve HDV-RNA'sı olumlu bulunan bir serum örneği kullanıldı.

5.1.2. Ayraçlar

1- 1 M Tris-Cl (pH=0.8)

Trisma base (Sigma T8524)	46.5 g
Trisma HCl	18.3 g
Distile su	500 ml'ye tamamlandı.

2- EDTA (Ethylenediaminetetraacetate) (Sigma E5134)

	<u>0.5 M</u>
Na ₂ EDTA	18.6 g
Distile su	100 ml

EDTA pH=8'de erir. PH'ı ayarlamak için NaOH pelleti kullanıldı. Daha sonra otoklavlandı.

3- NaOH

NaOH 8 g
Distile su 100 ml'ye tamamlandı.

4- Isopropanol

5- %70 Etanol

%95 EtOH 74 ml
Distile su 26 ml

6- Agarose (Sigma A9539)

7- Tris-Borik asit-EDTA (TBE 5X)

Tris base (Sigma T8524) 54 g
Boric asid (Sigma B6768) 27.5 g
0.5 M EDTA 20 ml
Distile su 1000 ml'ye tamamlandı.
Otoklavlandı.

8- Etidyum Bromid (1000X, 5 mg/ml) (Sigma E8751)

Etidyum bromid 0.5 g
Distile su 100 ml
Işıktan korumak için aliminyum folyo ile kaplandı.

9- Jel Yükleme Tamponu (6X)

%0.25 bromfenol mavisi (Sigma B5525) (%10'luk stoktan) 0.75 ml
%0.25 xylene siyanol FF (Sigma X4126) (%5'lik stoktan) 1.5 ml
%30 gliserol (su içindeki karışımı) 9 ml
Distile su 18.75 ml

10- Marker (Fermentas SM0241) (Fermentas SM0328)

11- Viral Nükleik Asit Ekstraksiyon Kiti (High Pure – Roche 1 581 295)

12- RNase İnhibitörü (Promega N2511) (40u / µl)

13- M-Mulv Revers Transkriptase Enzimi (Promega M1701) (200u / µl)

14- dNTP Karışımı (Fermentas R0181) (4x25 µmol)

15- Öncüller

Ön öncül (Ö 120) → 5' - ATG CCA TGC CGA CCC GAA GAG GAA - 3'

Ters Öncül (Ö 6657) → 5' - CAG CAG TCT CCT CTT TAC AGA - 3'

16- Pfu DNA Polimeraz (Promega M7741) (3.0u / µl)

17- DNA Purifikasyon Kiti (Fermentas K0513)

18- dATP (1mM)

Elimizde 100mM'lık dATP stoğu vardı. 1mM hazırlamak için 1/100 dilüsyon yapıldı.

19- Taq DNA Polimeraz (Fermentas EP 0405)

20- pGEM T-Easy Vector System (Promega A1380)

21- Ampisilin (Applichem A0839)

22- LB Agar (Sigma L3147)

23- Ampisilinli LB Agar (100µg/ml)

20g LB agar 500ml'ye distile su ile tamamlanır.

Otoklavlanır.

50-55°C'ye kadar soğutulup, içine ampisilin eklenir. (Ampisilin eklemeden önce 100mg/ml olacak şekilde bir ampisilin stoğu hazırlandı. Bu stoktan 500µl soğutulan LB agar içine eklendi.)

24- LB Broth (Sigma L3522)

25- SOB Medium

Tryptone	20 g
Yeast Extract	5 g
NaCl	0.5 g

Distile su ile 1 lt'ye tamamlanır ve otoklavlanır.

Daha sonra içine 1M MgCl₂ ve 1M MgSO₄' ten filtre ile sterilize edilerek 10'ar ml eklenir. +4°C' de saklanır.

26- SOC Medium

2 ml filtre ile steril edilmiş %20'lik glukoz veya 1 ml filtre ile steril edilmiş 2M glukoz alınır.

Final volümü 100 ml olacak şekilde SOB medium ile tamamlanır.

SOC medium taze hazırlanarak kullanılır.

27- X-Gal (bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-galactoside) (50mg/ml) (Applichem A4978)

İçinde 100mg/ml olan X-Gal'ın üzerine 2 ml N-N dimetilformamid eklendi.

Etrafı ışık almaması için aliminyum folyo ile kaplandı.

-20°C' de saklandı.

28- IPTG (isopropyl-β-D-thiogalactoside) (0.1M) (Applichem A4773)

İçinde 1g olan IPTG'nin üzerine 30 ml distile su eklendi ve çözüldü.

Yavaş yavaş distile su eklenerek son hacim 41.9 ml'ye tamamlandı.

Filtre ile steril edildi.

Steril ependorflara 1'er ml olarak alikotlandı.

4°C' de saklandı.

29- Nucleospin Plasmit DNA Ekstraksiyon Kiti (M&N 740 588)

30- EcoR I (Fermentas ER O271) (10u / µl)

31- Not I (Promega R 6431) (10u / µl)

32- N-N Dimethylformamid (Applichem A3676)

5.2. YÖNTEM

5.2.1. Öncül Setlerinin Seçilmesi

Öncülleri seçebilmek için öncelikle HDV genotip ve subtiplerine ait diziler Gen bankasından elde edildi. Diziler “Bio Edit 5.0.9 Sequence Aligment Editor” programı kullanılarak hizalandı. HDV delta antijeni klonlanmak istendiği için bu bölgenin hangi nükleotidler arasında olduğu saptandı. Tüm delta antijenini çoğaltabilecek yeni bir öncül seti tasarlandı.

5.2.2. Serum Örneklerinden HDV-RNA'nın Elde Edilmesi

DNA eldesinde “High Pure Viral Nucleic Acid Kit” kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde işlem gerçekleştirildi.

Tek bir serum örneği için:

- Her bir çalışma için taze çalışma solüsyonu (5 µl poly A+ 250 µl “Binding Buffer”) hazırlandı.
- 200 µl serum, 200 µl çalışma solüsyonu ve 50 µl Proteinaz K hemen karıştırılarak 72°C’de 10 dakika inkübe edildi.
- Karışımın üzerine 100 µl isopropanol eklenip tekrar karıştırıldı.
- Örneğin tümü filtrasyon tüpüne eklendi. 8000 x g’de 1 dakika santrifüj edildi. Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tüpe aktarıldı.
- Filtrasyon tüpüne 500 µl “Inhibitör Removal Buffer”eklendi.

- 8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tüpe aktarıldı.
- Filtrasyon tüpüne 450 µl "Wash Buffer" eklendi.
8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
Süzülen karışım atıldı. Filtre yeni tüpe aktarıldı.
 - İkinci kez filtrasyon tüpüne 450 µl "Wash Buffer" eklendi.
8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildikten sonra filtrede kalan sıvıyı atmak için
1300 x g 'de 10 saniye santrifüj edildi.
Süzülen karışım atıldı. Filtre steril 1.5 µl'lik reaksiyon tüpüne aktarıldı.
 - Filtrasyon tüpüne 50 µl "Elution Buffer" eklendi.
8000 x g'de 1 dakika santrifüj edildi.
 - Elde edilen 50 µl nükleik asit alikotlanarak cDNA için kullanımına kadar -
70°C'de saklandı.

5.2.3. HDV-RNA'nın RT-PZT ile Saptanması

5.2.3.1. c-DNA Eldesi

1- Tek bir örnek için buz üzerinde ependorf tüpünde şu karışım hazırlandı.

- | | |
|------------------------------|----------------|
| • M-Mulv buffer (5x) | 4 µl |
| • RNase inhibitör (40u / µl) | 0.25 µl |
| • M-Mulv RT (200u / µl) | 1 µl |
| • dNTP (10mM / her biri) | 0.4 µl |
| • H ₂ O | <u>4.35 µl</u> |
| | 10 µl |

2- 5µl DNA ürünü ile 5µl ters öncül-p6657 (50pmol / final) bir ependorf tüpüne konularak 70°C' de 5 dakika bekletildi ve buz üzerinde soğutuldu.

3- Ters öncül ve DNA ürünü, her bir örnek için ayrı hazırlanmış karışım tüplerine eklenerek toplam 20 µl'lik hacim oluşturuldu.

4- Isı döngü programı : Ependorflar ısı döngü cihazına (Techne TC-412) yerleştirilerek aşağıdaki ısı döngü programı gerçekleştirildi.

1 döngü yapıldı.

42° C' de 1 saat

72° C' de 10 dakika

Elde edilen c DNA örneği bekletilmeden PZT için kullanıldı.

5.2.3.2. PZT (Polimeraz Zincir Tepkimesi)

Klonlama kiti proofreading özelliğe sahip bir polimeraz kullanılmasını öneriyordu. Bu şekilde hem küt uçlu PZT ürünleri oluşturuldu hem de polimerazın yaptığı hatalar minimuma indirilmeye çalışıldı.

1- Her bir örnek için ependorf tüpüne, buz üstünde toplam hacim 50 µl olacak şekilde aşağıdakiler konuldu.

• Pfu buffer (10x)	5 µl
• dNTP (10mM / her biri)	1 µl
• Öncül 120 (ön) (10pmol / µl)	2.5 µl
• Öncül 6657 (ters) (10pmol / µl)	1.25 µl
• Pfu DNA polimeraz (3.0u / µl)	0.5 µl
• H ₂ O	34.75 µl
• c DNA	<u>5 µl</u>
	50 µl

2- Isı döngü programı : Ependorflar ısı döngü cihazına (Techne TC-412) yerleştirilerek aşağıdaki ısı döngü programı gerçekleştirildi.

35 döngü yapıldı.

95°C' de	6 dakika ön denatürasyon	
94°C' de	1 dakika	} 35 döngü
54°C' de	30 saniye	
72°C' de	2 dakika	
72°C' de	5 dakika son uzatma	

* Her PZT çalışmasında kontaminasyona karşı gerekli önlemler alınmış ve negatif kontrol kullanılmıştır.

5.2.3.3. Agaroz Jel Elektroforezi

PZT sonuçlarını görebilmek amacıyla %2'lik jel hazırlandı. Bunun için 50ml 1xTBE içine 1g agaroz eklendi, ısıtıcı da eritildi. İçine etidyum bromid (5mg/ml) çözeltisinden 3.5 µl eklendi ve tarakları hazırlanmış kalıba döküldü. Jel donduktan sonra tarakları çıkarılarak jel tankına yerleştirildi. PZT ürünü jel yükleme tamponu ile 1/6 oranında (2 µl jel yükleme tamponu ve 10 µl PZT ürünü) karıştırılarak her bir kuyucuğa 12 µl yüklendi. Bir kuyuya marker konuldu. Jel 1xTBE buffer içinde 120 volt uygulanarak yaklaşık 45-50 dakika yürütüldü. Sonuçlar ultraviyole transilüminatörde 280-340 nm dalga boyunda incelendi ve fotoğraflandı. Ortaya çıkan bant büyüklükleri marker ile karşılaştırılarak hedef bölgenin uzunluğu bulundu. Doğru bant olup olmadığına karar verildi. 786 baz büyüklüğündeki bant doğru kabul edildi.

5.2.4. PZT Ürünlerinin Agaroz Jelden Saflaştırılması

5.2.4.1. PZT Ürünlerinin Saflaştırılması

Klonlama da PZT ürününün temizliği önemli olduğu için öncelikle PZT ürününü saflaştırma işlemi yapıldı.

Bunun için "Fermentas DNA ekstraksiyon kiti" kullanıldı. Üretici firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde işlem gerçekleştirildi.

- Agaroz jelde ürün yürütüldükten sonra, UV üzerinde kesildi. Mümkün olduğunca jel üründen uzaklaştırıldı. Daha sonra ürün hassas tartı kullanılarak tartıldı ve bir endorf içine aktarıldı.
- Bir volüm jele, üç volüm "Binding Solution" eklendi. Agarozu eritmek amacı ile 55°C'de 5 dakika bekletildi.
- Silika toz süspansiyonu tekrar süspansiyon edilerek endorfa eklendi. Bunun için 2.5µg DNA'ya 5 µl silika toz süspansiyonu konuldu. (Eğer DNA 2.5 µg'dan fazla ise her 1 µg DNA fazlalığına karşılık 2µl silika ilave edildi.) 55°C'de 5 dakika inkübe edildi, her 2 dakika da bir karıştırıldı.
- Bu karışım pellet oluşturulmak amacı ile 5 saniye 13.000 rpm'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- Soğuk "Wash Buffer" dan 500 µl eklendi ve vortex yapıldı. 5 saniye 13.000 rpm'de santrifüj yapıldı. Süpernatant atıldı. Bu işlem üç kez tekrarlandı.
- Her yıkama da peletin tamamen çözünmesi sağlandı. Son yıkamadan sonra, süpernatant uzaklaştırıldı. Pelletin kuruması için havada yaklaşık 10-15 dakika beklendi.
- DNA elüsyonu steril distile su ile yapıldı. Silika peleti distile su ile resüspansiyon edildi. 55°C'de 5 dakika inkübe edildi. Ardından 30 saniye 13.000 rpm'de santrifüj edildi.

Süpernatant pelete dokunulmadan başka bir tüpe aktarıldı. (Silika tozu klonlama inhibitörü olduğundan 30 µl distile su ile elüsyon yapıp, bunun 20 µl'si çekildi.)

5.2.4.2. Saflaştırılmış Ürünün Agaroz Jelde Gösterilmesi

Saflaştırma sonrası elimizde kalan ürün miktarını görebilmek amacı ile tekrar agaroz jel elektroforezi yapıldı. Bunun için %2'lik jel döküldü. Saflaştırma ürünü jel yükleme tamponu ile 1/6 oranında (0.6 µl jel yükleme tamponu ve 3 µl PZT ürünü) karıştırılarak her bir kuyucuğa 3 µl yüklendi. Bant büyüklüğünü görebilmek amacı ile bir kuyuya marker konuldu. Jel 1xTBE buffer içinde 120 volt uygulanarak yaklaşık 45-50 dakika yürütüldü. Sonuçlar UV üzerinde incelendi.

5.2.4.3. Saflaştırma Sonrası Üründeki DNA Miktarının Hesaplanması

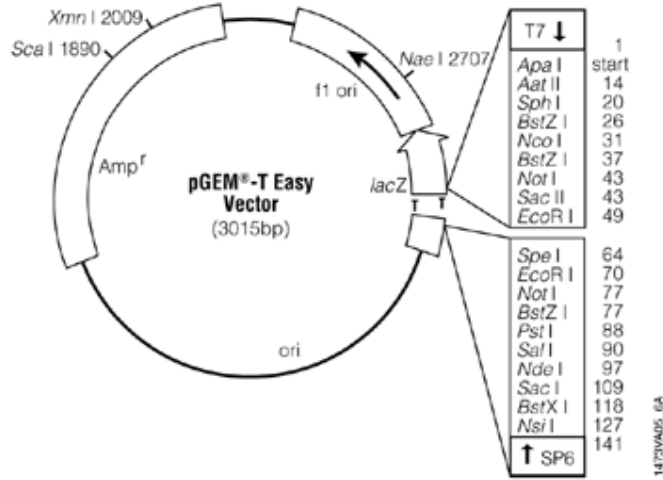
Saflaştırma işlemi sonrası üründeki DNA miktarının bilinmesi, ligasyona girecek olan ürün miktarının hesaplanması için gereklidir.

Bunun için spektrofotometrik ölçüm yapıldı. 260nm dalga boyunda yapılan ölçümde ürünün µl'sinde yaklaşık olarak 100ng DNA olduğu saptandı.

5.2.5. PZT Ürünün Klonlanması

Klonlama için "Promega pGEM® T-Easy Vector System Kiti" kullanıldı.

Bu kitte "TA" klonlama yapılmaktadır. Üretici firma tarafından plazmit olan vektörün (3015 bp) *lac Z* geni kesilmiş ve 3' uçlarına "T" bazı eklenmiştir. Klonlanacak olan ürün (PZT ürünü) bu *lac Z* geninin arasına yerleştirilmekte, böylece gen inaktive edilmektedir. Plazmit ayrıca ampisilin direnç geni taşımaktadır. Bu şekilde plazmit taşıyan bakterilerin besiyerinden seçimi sağlanmaktadır. Klonlama bölgesinin yanlarında enzim kesim bölgeleri bulunmaktadır. Bu bölgelerde bulunan enzimler kullanılarak klonlama sonrası ürün vektörden ayrılmaktadır (Şekil 7).



Şekil 7 : pGEM T-Easy Vektör

5.2.5.1. PZT Ürününe “A” Ucu Ekleme

Bu işlem ligasyon basamağında 3' uçlarına timin bazı (T) eklenmiş plazmitlerle PZT ürünlerini spesifik olarak birleştirebilmek amacı ile yapılır. Bu basamakta PZT ürününün uçlarına tek bir adenin bazı (A) eklenir. Bunun için Taq DNA polimeraz enzimi kullanılır. Taq DNA polimeraz PZT'de ürünün uçlarına tek bir adenin bazı ekleme özelliğine sahiptir. Bu işlem şu şekilde gerçekleştirilir.

- Saflaştırılmış PZT ürününden 5 µl alındı. (1-7 µl arası kullanılabilir.)
- Taq DNA polimerazın MgCl₂' lü 10X bufferından 1 µl reaksiyon tüpüne eklendi.
- 1 mM'lık dATP'den 2 µl eklendi. (Final konsantrasyonu 0.2 mM olacak şekilde)
- 1 µl Taq DNA polimeraz konuldu. (5 ünite)
- 1 µl dH₂O eklendi. (Final volümünü 10µl'ye tamamlamak için)
- 70°C'de 30 dakika bekletildi. (15-30 dakika olabilir)

5.2.5.2. Ligasyon Reaksiyonu

Ligasyon basamağında T₄ DNA Ligaz enzimi kullanılır. Bu enzim diğer ligazlardan farklı olarak ATP kullanır ve az da olsa küt uçlu ürünleri de birbirine bağlama özelliğine sahiptir. Ligasyonda plazmitin “T” bazı eklenmiş açık uçları ile, PCR ürünününün “A” bazı eklenmiş uçları karşılıklı gelerek yapışır. Uygun ortamın oluşturulması ve T₄ DNA ligazın ATP

kullanabilmesi amacıyla ortama ligazın kendi bufferı konur. (Ligaz enzimi ile vektör ve hedef DNA'nın 5'P ve 3'OH rezidüleri kovalent olarak bağlanır.)

Reaksiyonda pozitif kontrol kullanılır. Burada kullanılan kontrol DNA kitin kendi içinde bulunan dizisi bilinmeyen uçlarına "A" takılmış bir üründür. Pozitif kontrol yöntemin etkinliğinin saptanmasını sağlar.

Reaksiyonda bir de "background" kontrol kullanılır. "Background" kontrol PZT ürünü ve kontrol DNA içermez. Bu kontrol, ucuna "T" eklenmemiş veya kesilmemiş vektörleri gösterir. Reaksiyon sonunda "background" kontroldeki mavi kolonilerin sayısı standart reaksiyondaki kolonilerin sayısı karşılaştırılır. Karşılaştırma sonunda standart reaksiyonda daha fazla mavi koloni gözlenmesi olasılıkla bu kolonilerinde hedef DNA'yı içerdiğini gösterir.

Bu çalışma da vektör/ürün oranı farklı üç ayrı standart reaksiyon hazırlandı. (Bu şekilde hangi oranda klonlamanın daha başarılı olduğu görülmektedir.) Bunun için vektör molar oranını hesaplanarak ne kadar PZT ürünü kullanılması gerektiği bulundu.

$$\frac{\text{vektör (ng)} \times \text{ürünün uzunluğu (kb)}}{\text{vektörün uzunluğu (kb)}} \times \frac{\text{ürün oranı}}{\text{vektör oranı}} = \text{ürün (ng)}$$

* Daha önce saflaştırma ürününün 1 µl'sinde yaklaşık 100ng DNA olduğu bulunmuştu. Kullandığımız klonlama kiti vektörün 1 µl'sinde 50 ng DNA olduğunu söylüyor. Biz vektörden 150ng kullanmaya karar verdik. (Genel olarak klonlama yapılırken 100-150 ng vektör kullanılması öneriliyor.) Buna göre;

- $\frac{150\text{ng} \times 0.786\text{kb}}{3.015\text{ kb}} \times \frac{1}{1} = 40\text{ ng} \longrightarrow 0.4\text{ }\mu\text{l ürün}$
- $\frac{150\text{ng} \times 0.786\text{kb}}{3.015\text{ kb}} \times \frac{3}{1} = 120\text{ ng} \longrightarrow 1.2\text{ }\mu\text{l ürün}$
- $\frac{150\text{ng} \times 0.786\text{kb}}{3.015\text{ kb}} \times \frac{5}{1} = 220\text{ ng} \longrightarrow 2\text{ }\mu\text{l ürün}$

* 1:1 yaparken 0.4 µl pipetleme hatasını engellemek amacıyla 2/3 sulandırarak (2 µl ürün + 3 µl dH₂O) 1 µl kullanıldı.

Ligasyon Reaksiyonu

İçindekiler	Standart 1:1	Standart 1:3	Standart 1:5	Pozitif Kontrol	Background Kontrol
Ligasyon Buffer (2X)	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl	6 µl

Vektör (50ng/ μ l)	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l	3 μ l
PZT Ürünü	1 μ l	1.2 μ l	2 μ l	---	---
Kontrol insert DNA	---	---	---	2 μ l	---
T4 DNA Ligaz (3nite/ μ l)	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l	1 μ l
dH ₂ O	1 μ l	0.8 μ l	---	---	2 μ l
Toplam	12 μ l	12 μ l	12 μ l	12 μ l	12 μ l

* Maksimum sayıda transformant elde edebilmek için 4°C’de 16 saat bekletildi.
(Alternatif olarak 1 saat oda sıcaklığında da yapılabilir.)

5.2.6. Besiyerlerinin Hazırlanması

Transformasyon öncesi besiyerleri hazırlanmış olmalıdır. Transformasyon sırasında SOC medium, transformasyon sonrası ampisilinli LB agar ve daha sonrasında da LB broth kullanılan besiyerleridir. Bu besiyerlerinin hazırlanması sayfa 28 ve 29’da belirtildiği şekilde yapılır. (Ampisilinli LB agar klonlama kitinde istenildiği gibi 100 μ g/ml olacak şekilde hazırlandı.)

5.2.7. Transformasyon

- Kompetan haldeki JM109’lar (kite ait kompetanlar) buz üstünde erimeye bırakıldı.
- Soğutulmuş transformasyon tüplerine pipetaj yapılmadan 50’şer μ l kompetan konuldu.
- Ligasyon tüpleri pipetle karıştırılarak 2’şer μ l hücrelerin ortasına konuldu. (Karıştırmak amacıyla hafifçe tüplerin dibine vuruldu.)
- Tüpler 20 dakika buz üstünde bekletildi.
- Daha sonra 42°C’de 45-50 saniye ısı şoku verildi. (Bu esnada çalkalama yapılmadı)
- Tüpler tekrar buz üstünde 2 dakika bekletildi.
- Oda ısısına getirilmiş SOC mediumdan 950’şer μ l her bir transformasyon tüpüne eklendi.
- 37°C’de, 150 rpm’de tüpler 1.5 saat bekletildi.
- Her ligasyon reaksiyonu için 2’şer LB+ampicilin plağı hazırlandı. Besiyerlerinin her birine yaklaşık 30-45 dakika önce, önceden hazırlanmış olan IPTG (100 μ l) ve X-Gal

(20 µl) eklendi ve plak üzerine yayıldı. Besiyerleri IPTG ve X-Gal'ın içine geçmesi için ters bekletildi.

- Besiyerlerine 100'er µl transformasyon tüplerinden ekim yapıldı ve besiyeri üzerine yayıldı.
- Plaklar 37°C'de tüm gece (16-24 saat) bekletildi.

5.2.8. Transforme Olmuş Bakterilerin Seçimi

Plazmitin *lac Z* geni içine hedef bölge yerleştirildiği için bu gen inaktive edilmişti. Besiyeri üzerine konulan IPTG (*lacZ* represörünü inaktive eder) ve X-Gal (β -galactosidazın renksiz substratı) maddeleri ile hedef bölgeyi içeren koloniler şeffaf, içermeyenler ise mavi renkte görüldü. Ayrıca plazmit ampisilin direnç geni taşıdığı için sadece bu plazmite sahip koloniler ampisilinli besiyerinde üredi.

5.2.9. Plazmit DNA Eldesi

Transforme olmuş bakterilerin çoğaltılması amacıyla önce sıvı kültürleri yapıldı. Bunun için 100 µg/ml ampisilin içeren sıvı LB besiyeri hazırlandı.

- Steril cam tüplere 5'er ml aktarıldı.
- İçlerine her bir plaktan birer şeffaf koloni ekildi.
- 16 saat 37°C'de bekletildi.

Daha sonra bu sıvı kültürlerden plazmit DNA elde edildi.. Bunun için "Nucleospin Plasmid DNA Purification" kiti kullanıldı. Firmanın önerileri doğrultusunda aşağıdaki şekilde işlem gerçekleştirildi.

- *E.coli* kültürü (2 ml) 30sn. 11.000xg'de santrifüj edildi. Süpernatant atıldı.
- "Buffer A₁(resüspanse)" den 250 µl eklendi. Güçlü bir karıştırma ile hücre peleti tamamen uzaklaştırıldı.
- "Buffer A₂ (SDS/alkalin lizis buffer)" den 250 µl eklendi. 6-8 defa tüp alt-üst edilerek nazikçe karıştırıldı. En fazla 5 dakika olacak şekilde oda sıcaklığında bekletildi.

- “Buffer A₃ (nötralizan)” den 300 µl eklendi. 6-8 defa alt-üst edilerek tüp nazikçe karıştırıldı.
- Oda sıcaklığında 11.000xq’de 10 dakika santrifüj yapıldı.
- 2 ml’lik toplama tüpüne filtre yerleştirildi ve filtreye üçüncü adımdaki süpernatant eklendi. 11.000xq’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
- Filtre tekrar 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 600 µl “buffer A₄ (ethanolik)” den eklendi. 11.000xq’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
- Filtre yeni toplama tüpüne yerleştirildi. Soğutulmuş “buffer AW (yıkama)”den 500 µl eklendi. 11.000xq’de 1 dakika santrifüj edildi. Toplama tüpü atıldı.
- Silika membranı kurulamak amacı ile filtre 2 ml’lik toplama tüpüne yerleştirildi ve 11.000xq’de 2 dakika boyunca santrifüj edildi.
- Filtre 1.5 ml’lik ependorfa yerleştirildi ve üzerine 50 µl “buffer AE (önceden 70°C’ye ısıtılmış elüsyon buffer)” eklendi. 1 dakika oda sıcaklığında bekletildi. 11.000xq’de 1 dakika santrifüj edildi. Filtre atıldı.
- Plazmit DNA’ları 4°C’de saklandı.

5.2.10. Plazmitlerde Hedef Bölge Varlığının Saptanması

Bu işlem üç yolla yapılabilir.

- Plazmit DNA’dan PZT
- Restriksiyon enzim analizi
- DNA dizi analizi

5.2.10.1. Plazmit DNA’dan PZT

Daha önceki PZT öncülleri kullanılarak (p120, p6657) bu defa plazmitten PZT yapıldı. Burada farklı olarak, öncesinde c-DNA aşaması olmadığı için PZT’de kullanılan ters öncülün (p6657) miktarı arttırıldı.

- | | |
|-----------------------------------|--------|
| • Pfu buffer (10x) | 5 µl |
| • dNTP (10mM / her biri) | 1 µl |
| • Öncül 120 (ön) (10pmol / µl) | 2.5 µl |
| • Öncül 6657 (ters) (10pmol / µl) | 2.5 µl |
| • Pfu DNA polimeraz (3.0u / µl) | 0.5 µl |

• H ₂ O	33.5 µl
• Plazmit DNA	<u>5 µl</u>
	50 µl

* Sayfa 7'deki ısı döngü programı kullanılarak PZT yapıldı. Sonrasında ürünler %2'lik agaroz jelde görüntüledi. Hedef bölgeyi içeren plazmitlerde 786 bp'lık bant görülmesi beklendi.

5.2.10.2. Restriksiyon Enzim Analizi

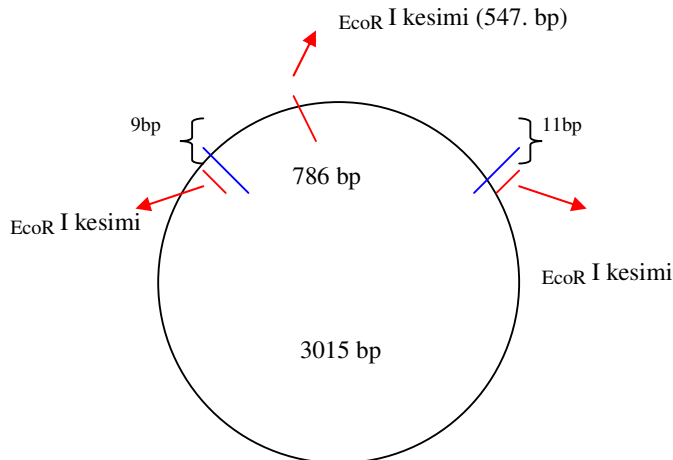
Plazmitin hedef bölgeyi içerip içermediğini anlamının bir başka yolu da restriksiyon enzimleri kullanarak hedef diziyi plazmitten ayırmaktır. Plazmit üzerindeki enzim kesim bölgelerinde üç enzim hedef bölgeyi plazmitten çift taraflı olarak ayırmayı sağlıyordu (EcoR I, Not I, BstZ I). Bu enzimlerden EcoR I ve Not I enzimlerini kullanıldı.

a) EcoR I Kesimi

Hedef bölgenin enzim kesim bölgeleri incelendiğinde (<http://tools.neb.com>) 547. nükleotit de EcoR I kesim bölgesinin varlığı saptandı. Bundan dolayı kesim yapıldığında üç bant olması beklendi (Şekil 8). Reaksiyon şu şekilde gerçekleştirildi.

• EcoR I Buffer (10x)	5 µl
• EcoR I (10u/µl)	0.5 µl
• H ₂ O	42.5 µl
• Plazmit DNA	<u>2 µl</u>
	50 µl

* Kesim için 37°C'de 2 saat, enzimi inaktive etmek için 65°C'de 20 dakika bekletildi.



Şekil 8 : EcoR I kesimi

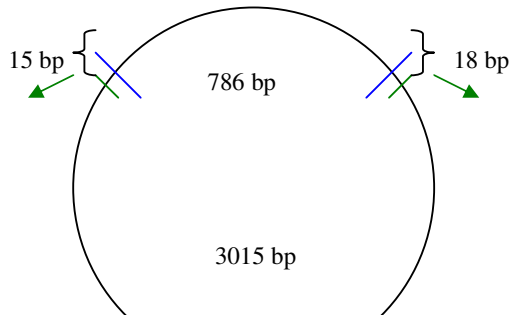
Plazmitler EcoR I ile kesildiğinde elde edilen 3 bant 248 bp, 553 bp ve 2995 bp'ı gösteriyorsa kesim doğru kabul edildi. Böylece hedef bölgenin varlığı plazmit de gösterilmiş oldu.

b) Not I Kesimi

Öncelikle hedef bölge içinde Not I kesim bölgesinin varlığı araştırıldı ve olmadığı görüldü. Bundan dolayı kesim sonrası iki bandın olması beklendi (Şekil 9). Reaksiyon şu şekilde gerçekleştirildi.

- Not I Buffer (10x) 5 µl
 - BSA 5 µl
 - Not I 0.5 µl
 - H₂O 37.5 µl
 - Plazmit DNA 2 µl
- 50 µl

* Kesim için 37°C'de 2 saat, enzimi inaktive etmek için 65°C'de 20 dakika bekletildi



Not I kesimi

Not I kesimi

Şekil 9 : Not I kesimi

Plazmitler Not I ile kesildiğinde elde edilen iki bant 819 bp ve 2982 bp'ı gösteriyorsa kesim doğru kabul edildi. Bu şekilde plazmitlerin hedef bölgeyi içerip içermedikleri gösterildi.

5.2.10.3. DNA dizi analizi

Klonlama sonrasında elde edilen plazmitlerden biri, DNA dizi analizine alınmak üzere seçildi. Plazmit DNA ya takılan hedefi dizilemek için, plazmit üzerindeki uygun bölgelere özgül pUC/M13 ön ve ters öncülleri kullanıldı. Hedef bölge takılmış olan plazmit DNA ve öncül setinin konsantrasyonları sırasıyla 100 ng/µl, 5pmol/µl ve reaksiyon başına hacimleri sırasıyla 20µl, 2µl olacak şekilde hazırlanarak uygun saklama koşulları ile Macrogen Inc.'a (Güney kore) çift yönlü olarak dizilenmek üzere gönderildi.

Referans nükleotit dizileri

Referans nükleotit dizileri internet aracılığı ile GenBank'ten elde edildi (46). HDV'nin üç genotipini ve subtiplerini temsil eden 18 adet genom referans olarak seçildi. (Referans dizilerin Gen-bank numaraları: X04451, D01075, AF425664, AF104263, AJ000558, AF098261, U81988, U81989, U19598, X60193, AF425645, AF018077, AB088679, AF209859, AB037947, AB037949, AB037948, L22063)

5.2.11. Filogenetik Analiz

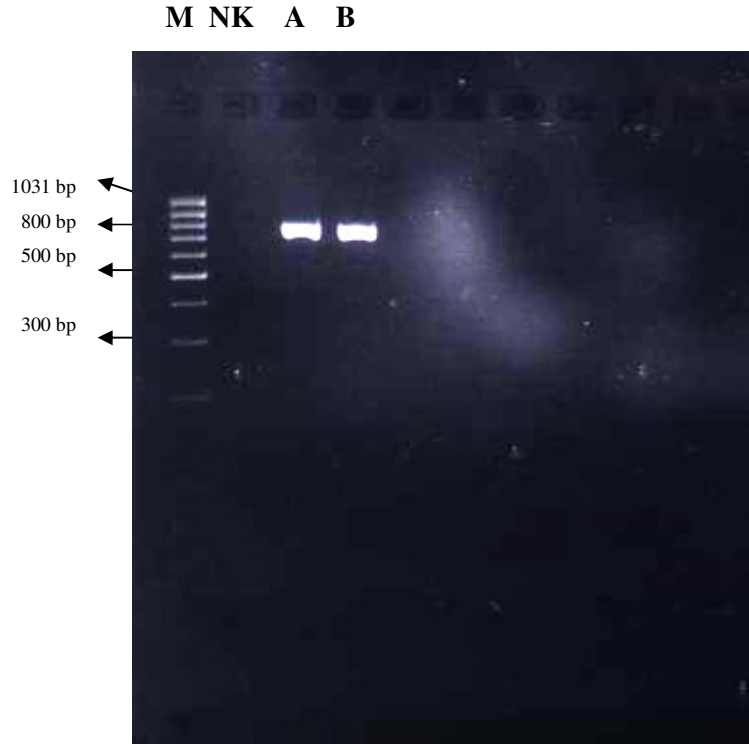
Dizi analizi ile elde edilen plazmite ait dizi Gen-bank'ten indirilen 18 dizi ile birlikte Clustal X programı 1.83 sürümü kullanılarak hizalandı. Hizalanmış dizilerden MEGA sürüm 3 yazılımında "Neighbour-Joining" yöntemi ve "Kimura-2 parametre" düzeltmesi kullanılarak filogenetik ağaç oluşturuldu (47,48). Ağacın güvenilirliği "bootstrap" analizi ile (1000set) sınıandı.

AB088679-2b TCTTAGAAGAGGAGTCTCCTG
AF209859-2b GCTTAGAAGAGGAGTCTCCTG
AB037947-3 TGAAGGAGGAAGGAGCTCTCG
AB037949-3 TGAAGGAGGAAGGAGCTCTCG
AB037948-3 TRRAGGAGGAAGGAGCTCTCG
L22063-3 T-AAGGAGGAAGGAGCTCTCG

Şekil 11 : HDV PZT için tasarlanan (Ö6657) ters öncül bölgesi

6.2. HDV-RNA Bulguları

Daha önce rutin çalışmalarda HDV-RNA'sı olumlu saptanan bir örnek kullanıldı. Serumdan tekrar DNA elde edilip, c-DNA'sı yapılarak RT-PZT'si yapıldı. Bu işlem sonunda elde edilen sonuçlar Resim 1'de gösterilmiştir.



Resim 1 : HDV-RNA RT-PZT bant görüntüleri

M : marker-100 bp (fermentas SM 0241)

NK : negatif kontrol

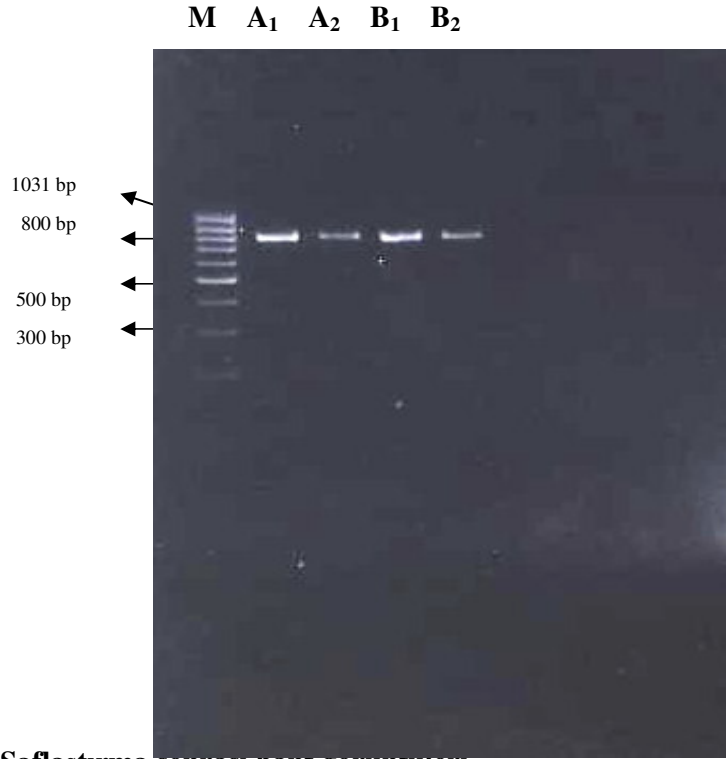
A : pozitif hasta

B : pozitif hasta (serum örneğinden iki ayrı PZT yapıldı)

(Beklenen bant büyüklüğü : 786 bp)

6.3. PZT Ürünü Saflaştırma Bulguları

Saflaştırma işlemi jelden uygun bant büyüklüğünün UV üzerinde kesilmesi ile yapıldı. (minimum %30 kayıp) Elüsyon işleminde su kullanıldı ve elüsyonlar iki kere yapıldı. Birinci elüsyon arkasından aynı işlem tekrar edilerek ikinci elüsyonlar elde edildi. (Bu işlem hangi elüsyon daha başarılı olmuşsa onu kullanmak amacıyla yapıldı.) Saflaştırma işlemi sonrası elde edilen sonuçlar Resim 2’de gösterilmiştir.



Resim 2 : Saflaştırma sonrası bant görüntüleri

M : marker-100bp (fermentas SM 0241)

A₁ : pozitif hasta 1. elüsyon

A₂ : pozitif hasta 2. elüsyon

B₁ : pozitif hasta 1. elüsyon

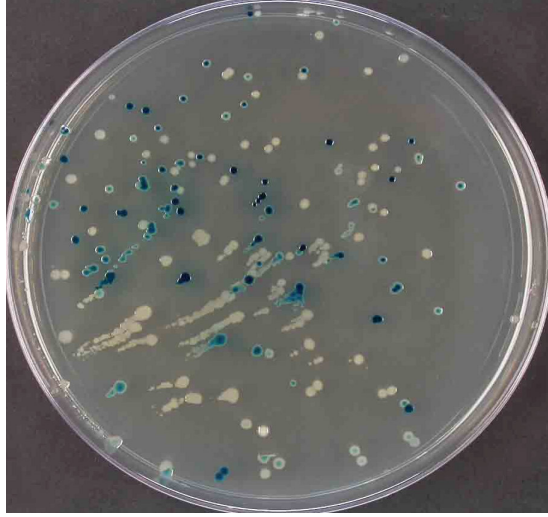
B₂ : pozitif hasta 2. elüsyon

(Beklenen bant büyüklüğü : 786bp)

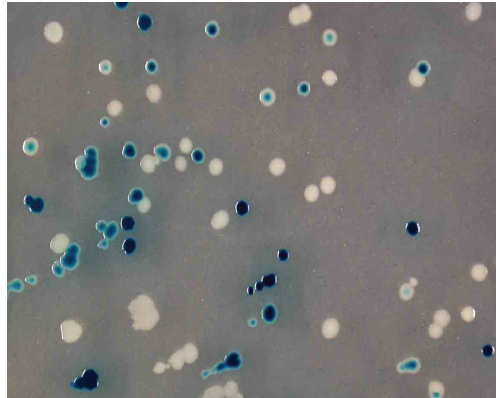
A₁'deki bant daha iyi olduğundan bu örnek klonlama için kullanıldı.

6.4. Transforme Olmuş Bakterilerin Seçilmesi

PZT ürününü alan vektörlerde *lacZ* geni inaktive edildiği için laktoz negatif şeffaf koloniler oluştu. PZT ürününü almayan vektörler de ligasyonla tekrar birleşerek laktoz pozitif mavi koloniler oluşturdu. Transformasyon sonrası elde edilen koloni görüntüleri Resim 3 ve 4'de gösterilmiştir.



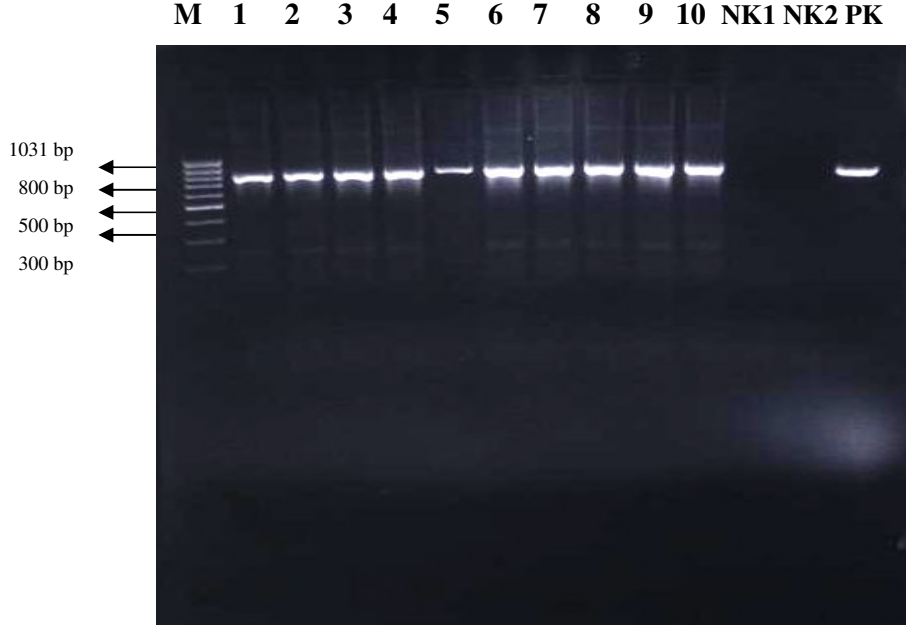
Resim 3 : Kolonilerin görünümü



Resim 4 : Kolonilerin görünümü

6.5. Plazmit DNA'dan PZT

Sıvı LB kültürleri yapılan kolonilerden plazmit DNA'ları elde edildi. Daha sonra bu DNA'lardan PZT yapıldı. Plazmitler çok yoğun olacağı için önce spektrofotometre'de DNA ölçümleri yapıldı (260nm). Her bir plazmitin μ l'sinde yaklaşık 450ng DNA oldu saptandı. PZT için yaklaşık 100ng DNA yeterli olacağı için örnekler $\frac{1}{4}$ dilüe edilerek kullanıldı. Resim 5'de plazmit DNA'larından elde edilen PZT sonuçları gösterilmiştir.



Resim 5 : Plazmit DNA'dan PZT görüntüleri

M : marker-100bp (fermentas SM 0241)

1 : koloni 1

8 : koloni 8

2 : koloni 2

9 : koloni 9

3 : koloni 3

10 : koloni 10

4 : koloni 4

NK1 : negatif kontrol 1

5 : koloni 5

NK2 : negatif kontrol 2

6 : koloni 6

PK : pozitif kontrol

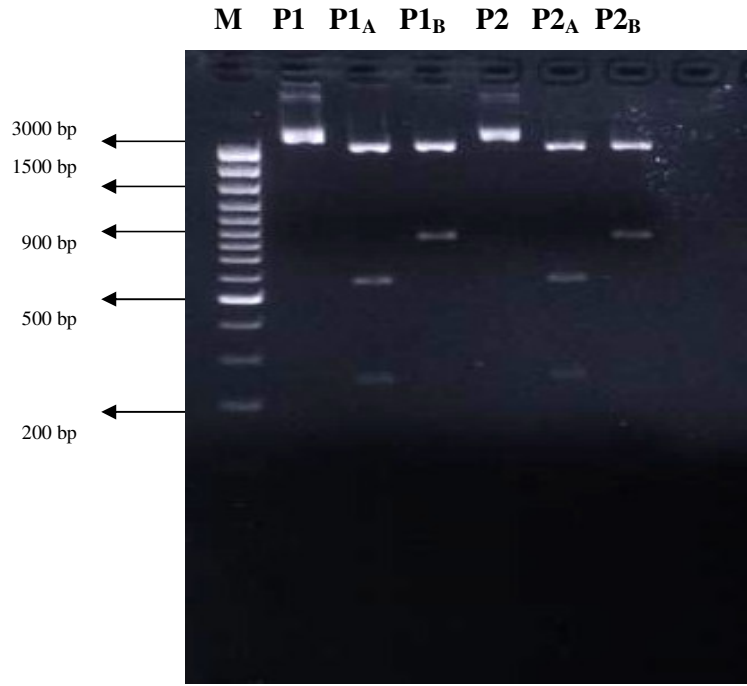
7 : koloni 7

(Beklenen bant büyüklüğü : 786bp)

* İlk on örneğin her biri farklı bir şeffaf koloniden elde edilmiştir. Negatif kontroller için iki ayrı mavi koloni, pozitif kontrol için ise normal PZT'de kullanılan c-DNA kullanılmıştır.

6.6. EcoR I ve Not I Kesimleri

Plazmit EcoR I ile kesildiğinde hedef DNA'da kesildiğinden üç ayrı bant oluşmuştur. Bu bantların büyüklükleri sırasıyla 248 bp, 558 bp ve 2995 bp'dir. Plazmit Not I ile kesildiğinde ise iki ayrı bant oluşmuştur. Bu bantların büyüklükleri ise sırasıyla 819 bp ve 2982 bp'dir. Resim 6'de plazmitler EcoR I ve Not I ile kesildiğinde oluşan sonuçlar gösterilmiştir.



Resim 6 : Plazmit EcoR I ve Not I kesim görüntüleri

M : marker (fermentas SM 0328)

P1 : plazmit 1 – kesilmemiş

P1_A : plazmit 1 – EcoR I kesimi

P1_B : plazmit 1 – Not I kesimi

P2 : plazmit 2 – kesilmemiş

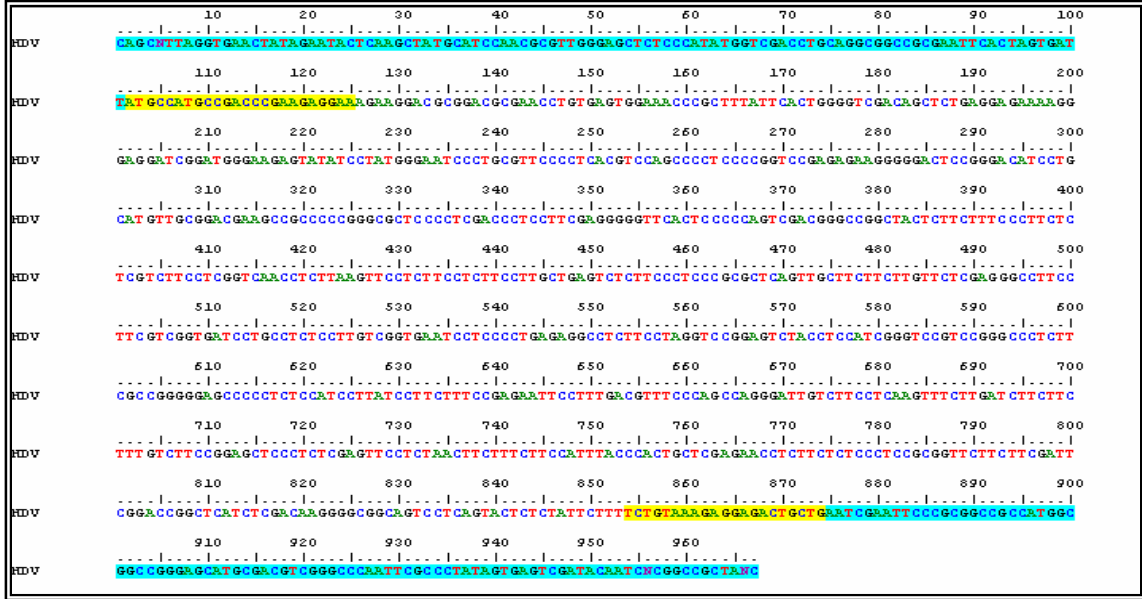
P2_A : plazmit 2 – EcoR I kesimi

P2_B : plazmit 2 – Not I kesimi

6.7. DNA Dizi Analizi Bulguları

Elde edilen klonlama ürününde HDAG'nin vektöre takılıp takılmadığı altın standart olan DNA dizi analizi ile de doğrulandı. Dizi analizi için plazmit üzerinde bulunan pUC/M13 ön ve ters öncülleri kullanıldı. Bu şekilde hem HDAG dizisi hem de plazmite ait bölümlerin

gösterildiği dizi analizi sonuçları Şekil 12 de gösterilmiştir. Elde edilen dizi analizi sonucunun diğer genotip ve subtiplerle olan karşılaştırılmaları Şekil 13 de gösterilmektedir.



Şekil 12 : HDV dizi analizi bulguları

Not: Şekilde sarı bölgeler HDV ön ve ters öncüllerini, mavi bölgeler ise plazmit sekanslarını göstermektedir.

```

          10   20   30   40   50   60   70   80
          |   |   |   |   |   |   |   |
X04451-1 ATGCCATGCCGACCCGAAGAGGAAAG AAGGACGCGAGACGCAAACCTGTGAGTGGAACCCG CTTTATTCAGTGGGGT
D01075-1 .....C.....
AF425664-1 .....A.G...C.....
AF104263-1 .....A.G...C.....
AJ000558-1 .....
AF098261-1 .....
U81988-1C .....A.....C.TT.....
U81989-1C .....TC.T.C.....A
HDAg-DEU1 .....G.....
U19598-2 .....A.T....G.....C.T-G..C.T.T.A..G
X60193-2a .....A.T....G.....C.T.A.CC.TT...A
AF425645-2a .....A.T....G..A.....C.TA.G.C.C.TT...G
AF018077-2b .....G...A.A...G.....C.TC.GA.CC..TT...G
AB088679-2b .C.....GAAG...AT...G.....C.TC.GA.CC..TT...G
AF209859-2b .....G...A...G.....C.TC.GA.CC..TT...G
AB037947-3 .C.....G...A...AC.A.C.A..TCT.CTG...CC..TT.TT.G
AB037949-3 .C.....G...A...AC.A.C.A..TCT.CTG...CC..TT.TT.G
AB037948-3 .C.....G...A...AC.A.C.A..TCT.CTG...CC..TT.TT.G
L22063-3 .C.....G...A...AC.A.C...TCT.TTG...CC..TT.TT.G

          90  100  110  120  130  140  150  160
          |  |  |  |  |  |  |  |
X04451-1 CGACAACCTCTGGG--GAGAAAAGGGCGGATCGGCTGGGAAGAGTATATCCCATGGAATCCCCGGTTTCCCCTGATGTC
D01075-1 .....GG...A.G.....T...G...T.C...T...
AF425664-1 ....G.....A.....T...G...T.....C.C...
AF104263-1 .....A.....T...G...T.....C.C...
AJ000558-1 .....T.....
AF098261-1 .....G...A.G.....T...G...T.C.....
U81988-1C .....A...A.....T.C.G...T.C.G...G.C.C...
U81989-1C .....A...A.....T.C.G...C.G.C.T.C.C...
HDAg-DEU1 ....G...A...A...A.....T...G...TCG...C.C...
U19598-2 GT...CTCGA..A--T.G..G.C.TT.T.G..GG..AG.TG.GTGTA...C.G...T.....
X60193-2a GT...CTCGA..A--T.G..G.C.TT.T.G..GG..AG.TG.GC.TA..T.C..G...T.G.C.....
AF425645-2a GT...CTCGA..A--T.G..G.C.TT.T.G..GG..AG.TG.GCGTA..T.C..G...T.....
AF018077-2b GT...CTCGA..A--T.G..G.C.G...GGA.GG..CTGAG.GC..A.T.C...T.T.AGC.....C...
AB088679-2b GT...CTCGA..A--T.G...C.G...GA..GGCTCCCAG.GCC.A.T.C.G...T.AG.C.T...G...
AF209859-2b GT...CTCGA..A--T.G..G.C.G...GGA.GG..CTGAG.GC..A.T.C...T.T.AG.....G...
AB037947-3 GTG..C.CTG..ACCCAGT..T.CCCG..GGGA.GC...GTA.ACCC..A.T...G..CTG.T.G...T.G.....
AB037949-3 GTG..C.CTG..ACCCAGT..T.CCCG..GGGA.GC...GT.ACCC..A.T...G..CTG.T.G...T.G.....
AB037948-3 GTG..C.CTG..ACCCAGT..T.CCCG..GGGA.GC...GTA.ACCC..A.T...G..CTG.T.G...T.G.....
L22063-3 GTG..C.CTG..ACCCAGT..T.CCCG..GGGA.GC...GTA.ACCC..A.T...G..CTG.T.G...T.G.....

```

Şekil 13 : Filogenetik ağaca referans oluşturan farklı HDV genotiplerine ait HDAg sekanslarının karşılaştırılması.

```

170 180 190 200 210 220 230 240
X04451-1 CAGCCCCTCCCCGGTCCGAGAGAAAGGGGGACTCCGGGACTCCCTGCAGACTGGGGACGAAGCCGCCCCCGGGC-CTCCCC
D01075-1 ..T.....TA.....T..TG.....G....
AF425664-1 .....TG.T.....TA.....TG.....G....
AF104263-1 .....TG.....G.TTA.TGT.....G....
AJ000558-1 .....T.....G....
AF098261-1 ..T.....T..TG.....G....
U81988-1C T.....CGT.TGTG.....TC.T..TG.....G....
U81989-1C .....TGT.T..T...A.....T..TG.....G....
HDAg-DEU1 .....AT...TGT..C.....G....
U19598-2 ..T.....C...C...A...A...T.C.TCTGA.....T...G....
X60193-2a ..T.....C.....A...A...TGC.TTTGA.....A...G....
AF425645-2a ..T.....C...C...T...A..A..T.C.TC.GA.....A...G....
AF018077-2b ..G..G...TC...T...A.....TGT.G..TG.....C...T...G....
AB088679-2b ..G..G...TC.TT...A.....A..G..T.C.TGG...T.....G...TG....
AF209859-2b ..G..G...TC...T...A.....TA..TG.....C...T...G....
AB037947-3 G.T...T.C.T.G.A.....A.....G.....C.A...G....
AB037949-3 G.T...T.C.T.G.A...R.Y.....G.....C.A...G....
AB037948-3 G.T...T.C.T.G.A.....A.....G.....C.A...G....
L22063-3 G.T...T.C.T.G.A.....A.....G...C...C.A...G....

250 260 270 280 290 300 310 320
X04451-1 TCGATCCACCTTCGAGGGGGATCACACCCCAACCGGCGGGCCGGCTACTCTTCTTTCCCTTCTCTCGTCTTCTCGGTC
D01075-1 ..T.....T.....T.....T.....
AF425664-1 .....T.....A...GT.....
AF104263-1 .....T.....A...GT.....
AJ000558-1 .....T.....
AF098261-1 .....G.....T.....T.....
U81988-1C .....T.....G..A.....T...GAT..TC...C..CT..C.
U81989-1C ..TG.....T.....G....
HDAg-DEU1 ...C..T.....T..T...GT.A.....
U19598-2 ..GA..T..C..GA...T...A...C.....T...TC.....AA....
X60193-2a ..GA..T..CT.GA...T...T.....C.....T...TC...A....
AF425645-2a ..GA..T..C..GA..T...T...GT.C.....CT...TC...AA....
AF018077-2b ..GA..T.G.....T...T.....C.....
AB088679-2b ..GAGGT..C.....T...T...C.....
AF209859-2b ..GA..T.G.....T...T...C.....
AB037947-3 ..GCCGGG..G..C.TT...T.....GG.C.....T...TCG...A..CT..C.
AB037949-3 ..GCCGGG..G..C.TT...T.....GG.C.....T...TCG...A..CT..C.
AB037948-3 ..GCCGGG..GK.C.TT...T.....GG.C.....T...TCG...A..CT..CY
L22063-3 ..GCCGGG..G..C.TT...T.....GGTC.....GT.....T...TCG...A..CT..C.

```

Şekil 13 (devam)

330 340 350 360 370 380 390 400
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

X04451-1 AACCTCCTGAGTTCCTCTTCTTCCTCCTTGCTGAGGTTCTTGCCTCCCGCCGATAGCTGCTTCTTCTTGTTCGAGGGC

D01075-1A.....C.....T..C.....TC.....
AF425664-1T.A.....T.....G..C.....G.CC..T...TC.....
AF104263-1T.A.....T.....G..C.....G.CC...TC.....
AJ000558-1
AF098261-1
U81988-1CC.....T..G..G.....
U81989-1CT.A.....C.....G..T..C...G..G...T.....
HDAg-DEU1T.A.....C..T.....TC...C.....GCTC..T.....
U19598-2C.....C...T...AG..G.....C.....
X60193-2a .G..T.....A..T...G..G.....
AF425645-2aC.....C.....C...T...AG..G.....
AF018077-2bT.GA.....C.....C...AG..G.....C....
AB088679-2bGA.....A.....C..T...G.AG..G...TC.T.....C....
AF209859-2bT.GA.....C.....C..C...AG..G.....C....
AB037947-3 .G...G.....TCG.....C..C..TC.G.CC..T.....
AB037949-3 .G...G.....TCG.....C..C..TC.G.CC..T.....
AB037948-3G.....TYG.....C..C..TC.G.CC..T.....
L22063-3 .G...G.....T.G.....G..T..C..TC.G.CC..T.....C....

410 420 430 440 450 460 470 480
.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|.....|

X04451-1 CTTCTTCGTCGGTGATCCCTGCCCTCCTTGTCGGTGAATCCTCCCCTGAGAGGCCTTCTCCTAGGTCCGGAGTCTACCT

D01075-1GA.....T.
AF425664-1A..C.....C..C.....T..
AF104263-1A..C.....C..C.....T..
AJ000558-1C.....
AF098261-1C.....
U81988-1CT...G....C.....C.....T.....T..
U81989-1C
HDAg-DEU1
U19598-2TG.....C.....C..G..T...T.....C..TC.....G...
X60193-2aTG.....C.....C..G..T..T...C.....G...
AF425645-2aTG.....C.....C..G..T..T...C..TC.....G..T..
AF018077-2bT.....C..T...GT.....C...GG..T.TTT.....G...
AB088679-2bT..TT...G..C.....GT.....C...GG..T.TTT.....G...
AF209859-2bT.....C..T...GT.....C...GG..T.TTT.....G...
AB037947-3T..T..G...C.....G.....C..C.TGGCTTTG.ATT..C...GTA..A..A.T..
AB037949-3T..T..G...C.....G.....C..C.TGG.TTTG.ATT..C...GTA..A..A.T..
AB037948-3T..T..G...C.....G.....C.TGGCTTTG.ATT..C...GTA..A..A.T..
L22063-3T..T..G...C.....G.....C..C.TGGCCTTG..TT..C..C.....A..A..

Şekil 13 (devam)

```

490  500  510  520  530  540  550  560
.....|
X04451-1  CCATCTGGTCCGTTCGGGGCCCTCTTCGCCGGGGGAGCCCCCTCTCCATCCCTTATCCCTTCTTTCCGAGAATTCCTTTGATG
D01075-1  .....T.....
AF425664-1 .....T.....
AF104263-1 .....T.....
AJ000558-1 .....
AF098261-1 .....
U81988-1C .....C...G.....T..T.....A..T.....
U81989-1C .....C.....A.....G.....T.....
HDAg-DEU1  ....G.....C.....C
U19598-2  ....A...C...A.....C..G....CC.T...T..TT...GAG...
X60193-2a  ....A...C...G.....C..G....CC.T...T..TT...GAC...
AF425645-2a ....A...C...G.....C..G....CC.T...T..TT...GA...
AF018077-2b ....A...C.T..T.....T...C..G...G..T...TT.TT...CG..C.
AB088679-2b ....A...C.T..T.....T...C.....G.....TT.TT...CG...
AF209859-2b ....A...C.T..T.....T...C..G...G..T...TT.TT...CG...
AB037947-3  ...G.CC.TCGC.T.G.....TC.T...T.G...C.T...TC.AC...GAC...
AB037949-3  ...G.CC.TCGC.T.G.....TC.T...T.G...C.T.C...TC..C.G...GAC...
AB037948-3  ...G.CC.TCGC.T.....TC.T...T.G...C.T...TC.AC...GAC..C.
L22063-3   ...GGTT..TGC.TC.G.....C..T..G...T.G...C.T.C...TC.AC.G..AAC..C.

570  580  590  600  610  620  630  640
.....|
X04451-1  TTCCCCAGCCAGGGATTTTCGTCTCAATCTTTTTGAGTTTCTTCTTTGCTTCCGGAGGTCTCTCTCGAGTTCCTCTAA
D01075-1  ..T.....G..A....GT..C...T....AAC.....
AF425664-1 ..T.....GT..C...T....AA.....GCC..C....A.....
AF104263-1 ..T.....GT..C...T....AA.....C....A.....
AJ000558-1  .....T...C.....
AF098261-1  .....T...C.....
U81988-1C  ..T.....C....GT..C...TC.....C.....T..CT...C....GC
U81989-1C  .....G..A...G.GT..C...TC.....G.C.....C.....T
HDAg-DEU1  ..T.....G..T....GT..C...TC.....C..C.....
U19598-2   .....T....GT..C...TGG...C.G.C.....T....C....CGC
X60193-2a  .....T....G.GT..C...TGG...C.G.....A..T....C....CGC
AF425645-2a .....A...G.GT..C...TGG...C.G.C.....T....C....CGC
AF018077-2b ..T.....G..A..C....GT.C...TAG...G..GAC.....C....C...CTT
AB088679-2b .....G..G..C...G.G.C.C...A...GG.GAC.....C..C.....CTT
AF209859-2b ..T.....G..G..C....GTC.C...TAG...G..GAC.....C....C...CTT
AB037947-3  ..T.....G....A....GT..C...TC...G..GA.TCG....C..CT...GC.ATTGCGCTT
AB037949-3  ..T.....G..C..A....GT..C...TC...G..GA.TCG....C..CT...GC.ATTGCGCTT
AB037948-3  ..T.....G....A....GT..C...TC...G..GA.TCG....C..CT...GC.ATTGCGCTT
L22063-3   ....T.....G..C..A....GT..C...TC...G..G.CTCG....A..CT....C.TTCGCCT

```

Şekil 13 (devam)

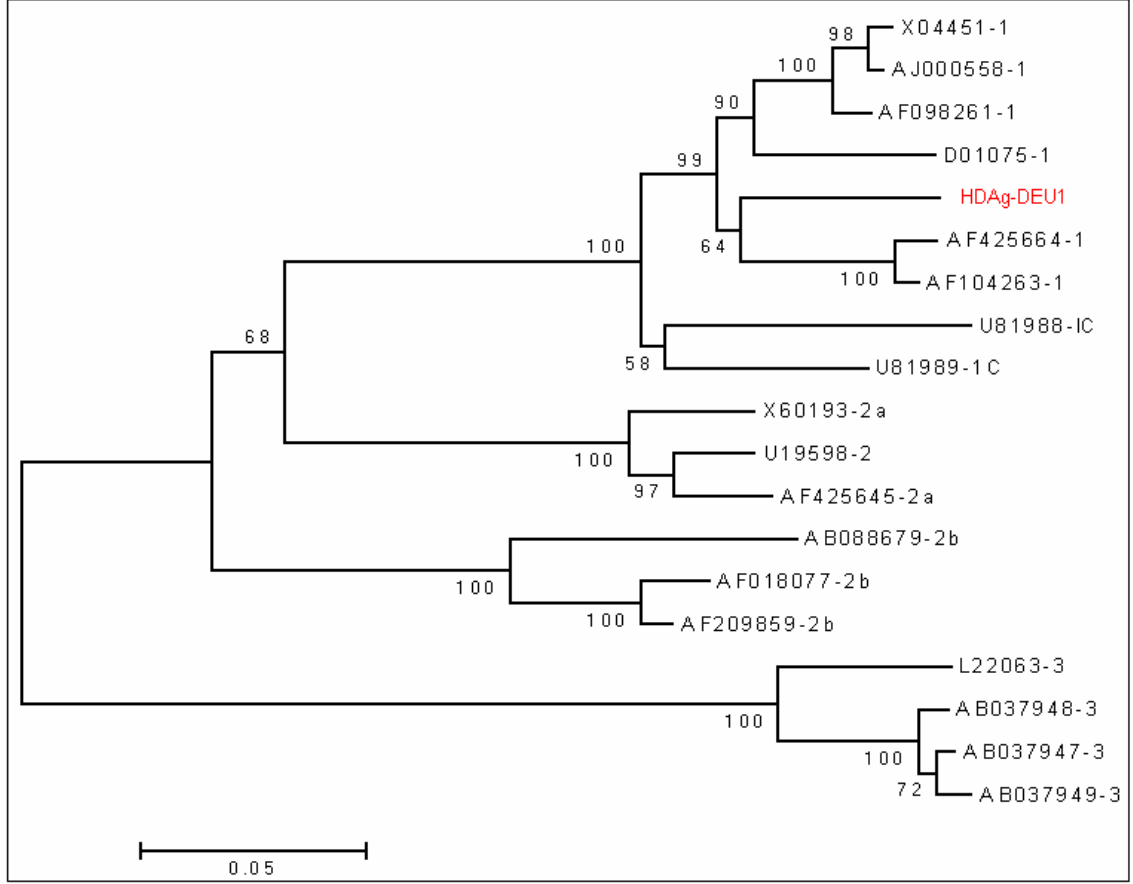
	650	660	670	680	690	700	710	720
X04451-1							
							
							
D01075-1CT.....A.C.....C.....T.....TCCT.....G.....		
AF425664-1TTT.....C.C.....T.GT.....A.....C.T.....A.....		
AF104263-1TTT.....C.C.....T.GT.....A.....C.T.....A.....		
AJ000558-1		
AF098261-1		
U81988-1C	T.....	T.TT.....	T.....	G.G.C.....	T.C.T.A.....	T.TG.....		
U81989-1C	.C.TC.....	.ATTG.....GCG.C.C.....	.G.C.T.....	T.....	T.....	
HDAg-DEU1ATTT.....A.C.....	T.....	T.....	
U19598-2	..TC.....	GTT.TG.T.....	TCT.....	G.....	C.C.TGTT.....	C.TT.AC.....	TT.....	
X60193-2a	..T.C.....	G.T.TG.T.....	T.T.....	G.....	C.C.TGTT.....	C.TT.TCCTC.....	T.....	TT.....
AF425645-2a	..TC.....	GTT.TG.T.....	T.T.....	G.....	C.C.ACC.....	C.TT.A.....	T.....	TT.....
AF018077-2b	TC.TC.....	G.AT.G.T.....	TTC.....	TTG.....	C.TC..GGTC.....	A.....	G.T.....
AB088679-2b	TC.TC.....	AT.G.T.....	TTC.....	TG.....	CTTC..G.TC.....	CA.....	T.....
AF209859-2b	TC.TC.....	G.AT.G.T.....	TTC.....	TG.....	CTTC..GGTC.....	A.....	G.A.....
AB037947-3	T.....	C..T.CT.T.....	GC..C.C.....	..G.CTTCGA.CCGGGT.....	T.CA.....	GTT.....	
AB037949-3	T.....	C..T.CT.T.....	GC..C.C.....	..K.CTTCGA.CCGGGT.....	T.CAC.....	GTT.....	
AB037948-3	T.....	C..T.CT.T.....	GC..C.C.....	..G.CTTCGRRCCGGAT.....	T.MA.....	TT.....	
L22063-3	G.....	C..T.CT.T.....	T.....	C.....	T.CTTCGA.G..AG...T.CGA..TTT.....	

	730	740	750	760	770
X04451-1				
				
				
D01075-1	..T..A.....A.G.....
AF425664-1	..A.A.....A.G.....
AF104263-1	..A.A.....A.G.....
AJ000558-1
AF098261-1
U81988-1C	..A.A..G.....G.....
U81989-1C	..C..A.....G.....C.A.....
HDAg-DEU1	..A.A..G.....C.....T.....
U19598-2	..CC.A.G.C.....	AAG.....	T.....	CT-AT.CT.TCC.....	..CG.
X60193-2a	..TC.A.G.C.....	AGG.....	T.....	CT-AT.CT.TC.....	..TG.
AF425645-2a	..CC.A.G.C.....	AGG.....	T.....	CT-AT.CT.TCC.....	..TG.
AF018077-2b	..C..AT.GCGA.....	G.....	G.A.....	..TAT.TCC.G..TAG	
AB088679-2b	..T..A..G.CG.A.G.....	CG..AG.....	..TAT.TCC..TAG		
AF209859-2b	..C..AT.GCG.....	G.....	G.A.....	..TAT.TCC.G..TAG	
AB037947-3GAGAC..GGAG.T.GACGA..CT-TGT...CC.GAAGG				
AB037949-3GAGAC..GGAG.T.GACGA..CT-TGT...CC.GAAGG				
AB037948-3GAGAC..GGAG.T.GACGA..CT-TAT...CC.RRAGG				
L22063-3GAGAC..GGAG.T.GACGA..CT-TAT...CC-AAGG				

Şekil 13 (devam)

6.8. Filogenetik Analiz Bulguları

Elde edilen dizi ile oluşturulacak filogenetik ağacın doğruluğunu sınamak için GenBank'ten alınmış dizilerle çalışıldı. HDAg kodlayan 786 bp'lık bölge kullanılarak "Neighbour-Joining" yöntemi ve "Kimura-2" parametre düzeltmesi ile oluşturulan filogenetik ağaç şekil 14 te gösterilmiştir. Filogenetik analiz sonucunda elde edilen klonun genotip I'e ait olduğu gösterilmiştir.



Şekil 14 : Filogenetik ağaç

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Bu çalışmada Türkiye'de ilk kez bir hasta örneğinden çoğaltılan, HDV delta antijen bölgesi bir plazmit olan pGEM[®] T-easy vektörüne klonlanarak çoğaltılmıştır. Bu amaçla gen bankasından indirilen HDV'nin üç ayrı genotip ve bunların alt tiplerine ait diziler karşılaştırılarak delta antijeni kodlayan bölgeye en yakın ve en korunmuş öncül bölgeleri belirlenmiştir. Bu öncüller yaklaşık 1700 nükleotid uzunluğundaki HDV-RNA üzerinde

delta antijeni kodlayan 1003–1653. nükleotidler arasındaki bölgeyi içine almaktadır. Ön öncül olarak belirlenen 933–956. nükleotidler arası her üç genotip için de korunmuş bir bölge iken, ters öncül olarak her üç genotip için de korunmuş bir bölge bulunamamıştır. Daha önce yapılan çalışmalar ışığında Türkiye’de sadece genotip I’in varlığı bildirildiğinden bu genotip için korunmuş bir bölge olan 1698–1718 nükleotidleri arası ters öncül bölgesi olarak tasarlanmıştır (39,49,50).

Dizayn edilen ters öncül kullanılarak yapılan reverse transkripsiyon basamağı ve bunu izleyen PZT basamaklarından elde edilen üründe hedeflenen bantlar elde edilmiştir.

RT-PZT’nin sonrasında ligasyon basamağına geçilmeden önce PZT ürünleri jelde yürütülerek doğru bant jelden kesilerek saflaştırılmıştır. Doğrudan PZT ürünü yerine saflaştırmanın jelden bant ekstraksiyonu sonrasında yapılmasının nedeni RT-PZT basamağında olabilecek non spesifik küçük bantların plazmit vektör ile birleşmesi olasılığının engellenmesidir. Bu nedenle hedef DNA parçası özgül olmayan bantlardan agaroz jel elektroforezi sonrasında kesilip ayrılarak saflaştırma işlemine geçilmiştir (51).

Bu çalışmada TA klonlama yapan pGEM[®] T- Easy (promega) vektör sistemi kullanılmıştır TA klonlama sistemlerinin diğer klonlama sistemlerine göre başlıca avantajı basamak sayısının daha az, dolayısı ile düşük maliyetli ve kolay uygulanabilir olmasıdır (44). Bu vektörlerin 3' uçlarına “T” bazı eklenmiştir ve 5' uçlarına “A” bazı eklenmiş DNA ile kolaylıkla birleştirilebilmektedir. Restriksiyon enzimleri ile kesilerek birleştirilen sistemlere göre dezavantajı ise DNA’nın hangi oryantasyonda vektör içine gireceğinin bilinmemesidir. Oryantasyonun doğruluğu ancak DNA dizi analizi ve restriksiyon enzim analizi ile anlaşılabilir.

pGEM[®] T- Easy (promega) vektör sistemi bakterilerde ampisilin ve mavi/beyaz koloni seçiciliğine göre ayırım yapmaktadır.

Plazmit üzerinde bulunan ampisilin direnç geni duyarlı kompetan hücrede (JM109) bulunmadığından ampisilinli besiyerinde sadece bu plazmiti taşıyan bakteriler üreyebilmektedir. Benzer şekilde farklı plazmit vektör sistemlerinde başka direnç genleri de (örn; kanamisin) kullanılabilir.

Mavi/beyaz seçiciliğinde beyaz koloniler genellikle hedef DNA içeren plazmitleri gösterirken, mavi koloniler DNA ile birleşmeden ligasyona uğramış plazmitleri gösterirler. Plazmit üzerinde *lacZ* geni bulunmaktadır. Hedef DNA plazmit içine yerleştiğinde bu gen inaktive olmakta, X-Gal ve IPTG eklenerek hazırlanmış besiyerinde hedef DNA içeren plazmitler beyaz koloniler oluştururken ligasyon basamağında hedef DNA’nın takılmadığı plazmitleri içeren bakteriler mavi koloniler oluşturmaktadır. Ancak her beyaz koloni doğru hedef DNA’yı taşıyabilir. Eğer PZT saflaştırma işlemi iyi yapılmadıysa, beyaz koloni oluşturmuş plazmitler hedeflenenden farklı DNA parçaları taşıyabilirler (52).

Plazmitlerde hedef DNA'nın varlığı PZT, restriksiyon enzim analizi ve DNA dizi analizi gibi yöntemlerle kontrol edilebilir. Vektörün hedef DNA'yı taşıyıp taşımadığını anlamamanın en pratik yolu kendi RT-PZT öncülleri kullanarak yapılan PZT'dir. Bu çalışmada plazmit DNA da HDAg bölgesini çoğaltan öncüllerin kullanıldığı PZT ile 786 bazlık doğru büyüklükteki ürün elde edilmiştir.

PGEM® T-Easy vektör sistemi diğer klonlama vektörlerinde olduğu gibi çoklu restriksiyon bölgeleri içermektedir. Bu bölgeleri tanıyan restriksiyon endonükleazları kullanılarak hedef DNA, vektör içerisinden ayrılabilir. Bu işlem tek veya iki ayrı enzim kullanılarak yapılabilir. Kullandığımız vektöre ait çoklu restriksiyon bölgelerinde bulunan EcoR I, Not I ve BstZ I enzimleri hedef DNA'yı tek enzimle vektörden ayırabilme yeteneğindedir, ancak EcoR I aynı zamanda hedef DNA içerisinde 547. nükleotid pozisyonunda bir kesim bölgesine de sahiptir. EcoR I'nın bizim DNA'mızı keserken, Not I' in hedef bölgeyi kesmediği görülmüştür. Çalışmada her iki enzim ile de yapılan restriksiyon analizlerinde elde edilen bantların hedeflenen büyüklüklerde olması klonlama sonunda çoğaltılan plazmitlerin doğru hedefi içerdiğini göstermektedir.

DNA dizi analizi ile plazmit kontrolü ise bu yöntemler içinde en güvenilir olanıdır. Dizi analizi için plazmit vektör üzerinde bulunan sekans öncülleri kullanılır. Bu öncüller kullanılarak yapılan dizi analizinde hem hedef DNA hem de plazmite ait bir kısım dizi analiz edilmekte, bu şekilde DNA'nın oryantasyonu da belirlenebilmektedir. Bu durum özellikle ekspresyon için önemlidir. Eğer klonlama ürünü miktarı belirlenmiş kalitatif veya kantitatif PZT kontrolü olarak kullanılacak ise çalışmada yapılan kontrol analizleri yeterlidir, ancak eğer bu plazmit ile HDAg ekspresyonu yapılacak ise hedef DNA'nın oryantasyonunun doğruluğu DNA dizi analizi ile desteklenmelidir.

Bugüne kadar yapılmış tüm çalışmalar Türkiye'de sadece genotip I varlığını göstermektedir (39,49,53). Yapılan analiz sonucunda da elde edilen klonun genotip I olduğu saptanmıştır. Bu çalışma ile Türkiye'ye özgü bir HDV klonu elde edilmiştir.

8. KAYNAKLAR

1. Rizzetto M, Canese MG, Arico S, Crivelli O, Trepo CG, Bonino F. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta/anti-delta) associated to hepatitis B virus in liver and serum of HBsAg carriers. *Gut*, 1977; 18:997-1003
2. Rizzetto M, Verme G, Recchia S, Bonino F, Farci P, Arico S. Chronic hepatitis in carriers of hepatitis B surface antigen, with intrahepatic expression of the delta antigen. An active and progressive disease unresponsive to immunosuppressive treatment. *Ann Intern Med*, 1983; 98:437-441
3. Wang KS, Choo QL, Weiner AJ, Ou JH, Najarian RC, Thayer RM, Mullenbach GT, Denniston KJ, Gerin JL, Houghton M. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature*, 1986; 323: 508-514
4. Kos A, Dijkema R, Arnberg AC, van der Meide PH, Schellekens H. The hepatitis delta virus possesses a circular RNA. *Nature*, 1986; 323: 558-560
5. Harisson TJ, Dusheiko GM, Zuckerman AJ. Hepatitis Delta. In: Zuckerman AJ, Banatvala JE, Pattison JR (eds). *Principles and Practice of Clinical Virology*. 4th ed. London. Wiley press, 2000;219-221
6. Bilgiç A, Özacar T. Hepatit B ve D virusları. *Temel ve Klinik Mikrobiyoloji*. In: Ustaçelebi Ş. (eds). Ankara, Güneş kitapevi, 1999; 878-880
7. Chadalavada DM, Senchak SE, Bevilacqua PC. The folding pathway of the genomic hepatitis delta virus ribozyme is dominated by slow folding of the pseudoknots. *J Mol Biol*, 2002; 317:559-575
8. Yu YC, Mao Q, Gu CH, Li QF, Wang YM. Activity of HDV ribozymes to transcleave HCV RNA. *World J Gastroenterol*, 2002; 8: 694-698
9. Wang JG, Lemon SM. Hepatitis delta antigen forms dimers and multimeric complexes in vivo. *J Virol*, 1993; 67: 446-454
10. Chen PJ, Chang FL, Wang CJ, Lin CJ, Sung SY, Chen DS. Functional study of hepatitis delta virus large antigen in packaging and replication inhibition: Role of the amino-terminal leucine zipper. *J Virol*, 1992; 66: 2853-2959
11. Chang MF, Chang SC, Chang CI, Wu K. Nuclear localization signals, but not putative leucine zipper motifs, are essential for nuclear transport of hepatitis delta antigen. *J Virol*, 1992; 66: 6019-6027

12. Chou HU, Hsien TY, Sheu GT, Lai MMC. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J Virol*, 1998; 72: 3684-3690
13. Lee CZ, Lin JH, Chao M, McKnight K, Lai MM. RNA-binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine-rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *J Virol*, 1993; 67: 2221-2227
14. Taylor JM. Organization and expression of the hepatitis delta virus genome. *Sem Virol*, 1997; 8: 59-64
15. Casey JL, Gerin JL. Hepatitis D RNA editing: Specific modification of adenosine in the antigenomic RNA. *J Virol*, 1995; 69: 7593-7600
16. Lee CM, Bih FY, Chao YC, Govindarajan S, Lai MMC. Evolution of hepatitis delta virus RNA during chronic infection. *Virology*, 1992; 188: 265-273
17. 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: 5066-5069
18. Ryu WS, Bayer M, Taylor J. Assembly of hepatitis delta virus particles. *J Virol*, 1992; 66: 2310-2315
19. Chang FL, Chen PJ, Tu SJ, Wang CJ, Chen DS. The large form of hepatitis delta antigen is crucial for assembly of hepatitis delta virus. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991; 88: 8490-8494
20. Polish LB, Gallenger M, Fields HA, Hadler SC. Delta hepatitis: Molecular biology and clinical and epidemiological features. *Clin Microbiol Rev*, 1993; 6: 211-229
21. Holland J, Spindler K, Horodyski F, Grabau E, Nichol S, VandePol S. Rapid evolution of RNA genomes (Review). *Science*, 1982; 215: 1577-1585
22. Ivaniushina V, Radjef N, Alexeeva M, Gault E, Semenov S, Salhi M. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol*, 2001; 82: 2709-2718
23. Casey JL, Niro GA, Engle RE, Vega A, Gomez H, McCarthy M. Hepatitis B virus (HBV)/hepatitis D virus (HDV) coinfection in outbreaks of acute hepatitis in the Peruvian Amazon basin: the roles of HDV genotype III and HBV genotype F. *J Infect Dis*, 1996; 174: 920-926
24. Wang TC, Chao M. Molecular cloning and expression of the hepatitis delta virus genotype IIb genome. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003; 303: 357-363
25. Gudima S, Chang J, Moraleda G, Azvolinsky A, Taylor J. Parameters of human delta virus genome replication: the quantity, quality and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol*, 2002; 76: 3709-3719

26. Rosina F, Saracco G, Rizzetto M. Risk of post-transfusion infection with the hepatitis delta virus. A multicenter study. *N Engl J Med*, 1985; 312: 1488-1491
27. Wu JC, Chen CM, Sheen IJ, Lee SD; Tzeng HM, Choo KB. Evidence of transmission of hepatitis D virus to spouses from sequence analysis of the viral genome. *Hepatology*, 1995; 22: 1656-1660
28. Flodgren E, Bengtsson S, Knutsson M, Strebkova EA, Kidd AH, Alexeyev OA. Recent high incidence of fulminant hepatitis in Samara, Russia: molecular analysis of prevailing hepatitis B and D virus strains. *J Clin Microbiol*, 2000; 38: 3311-3316
29. Sakugawa H, Nakasone H, Shokita H, Nakayoshi T, Kinjo F, Saito A. Seroepidemiological study of hepatitis delta virus infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol*, 1995; 45: 312-315
30. Singh V, Goenka MK, Bhasin DK, Kochhar R, Singh K. A Study of hepatitis delta virus infection in patients with acute and chronic liver disease from northern India. (Abs.) *J Viral Hepat*, 1995; 2: 151-154
31. Dalekos GN, Zervou E, Karabini F, Tsianos EV. Prevalance of viral markers among refugees from southern Albania: increased incidence of infection with hepatitis A, B and D viruses. (Abs.) *Eur J Gastroenterol*, 1995; 7: 553-558
32. Manock SR, Kelley PM, Hyams KC, Douce R, Smalligan RD, Watts DM. An outbreak of fulminant hepatitis delta in the Waorani, an indigenous people of the amazon basin of Ecuador. *Am J Trop Med Hyg*, 2000; 63: 209-213
33. Saracco G, Macagno S, Rosina F, Rizzetto M. Serological markers with fulminant hepatitis in persons positive for hepatitis B surface antigen. *Ann Intern Med*, 1988;108:380-383
34. Niro GA, Gravinese E, Martini E, Garrubba M, Facciorusso D, Conoscitore P. Clearance of hepatitis B surface antigen in chronic carriers of hepatitis delta antibodies. *Liver*, 2001; 21: 254-259
35. Ottobelli A, Marzano A, Smedile A, Recchia S, Salizzoni M, Cornu C. Patterns of hepatitis delta virus reinfection and disease in liver transplantation. *Gastroenterology*, 1991; 101: 1649-1655
36. Cole SM, Gowans EJ, Macnaughton TB, Hall PD, Burrell CJ. Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen. *Hepatology*, 1991; 13: 845-851
37. Nisini R, Paroli M, Accapezzato D, Bonino F, Rosina F, Santantonio T. Human CD4+ T-cell response to hepatitis delta virus: Identification of multiple epitopes and characterization of T-helper cytokine profiles. *J Virol*, 1997; 71: 2241-2251

38. Niro GA, Smedile A, Andriulli A, Rizzetto M, Gerin JL, Casey JL. The predominance of hepatitis delta virus genotype I among chronically infected Italian patients. *Hepatology*, 1997; 25: 728-734
39. Caymaz S. Hepatit Delta Virus RNA'sının Saptanması ve Genotiplenmesi. (DEÜ Tıp Fakültesi Mikrobiyoloji ve Klinik Mikrobiyoloji ABD. Uzmanlık tezi) İzmir, 2004.
40. Borghesio E, Rosina F, Smedile A, Lagget M, Niro MG, Marinucci G. Serum immunoglobulin M antibody to hepatitis D as a surrogate marker of hepatitis D in interferon-treated patients and in patients who underwent liver transplantation. *Hepatology*, 1998; 27: 873-876
41. Aktopraklıgil D. Gen Klonlaması. Moleküler Biyoloji ve Yönlendirilmiş Mutagenizasyon Temel Bilgiler ve Deneysel Uygulamalar. Mandacı S, Aygün S (eds). Gebze-Kocaeli, TÜBİTAK, 2003; 34-46
42. Klug WS, Cummings MR. Genetik Kavramlar 6th. Öner C (eds). Ankara, Palme yayıncılık, 2002; 499-521
43. Griffiths JF, Miller HJ, Suzuki DT, Lewantın RC, Gelbart WM. An introduction to Genetic Analysis. 7th. New York, W.H.Freeman&Company, 2002; 365-394
44. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Volume 2) 3th. New York, Cold Spring Harbor, 2001; 8.30-8.41
45. Alberts B, Bray D, Julian L, Martin R, Roberts K, Watson JD. Molecular Biology of The Cell. 2th. New York&London, Garland publishing, 1989; 258-274
46. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Gen-Bank>
47. Weiller GF, McClure MA, Gibbs A. Molecular phylogenetic analysis. Molecular Basis of Virus Evolution, Chapter 37, 1999
48. Phylogenetic Analysis <http://cmgm.stanford.edu/help/manuel/software/sequence/phylogenetic>
49. Shakil AO, Hadziyannis S, Hoofnagle JH, Bisceglie AM, Gerin JL, Casey JL. Geographic distribution and genetic variability of hepatitis delta genotype I. *Virology*, 1997; 234: 160-167
50. Casey JL, Gerin JL. Genotype-specific complementation of hepatitis delta virus RNA replication by hepatitis delta antigen. *J Virol*, 1998; 72: 2806-2814
51. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Volume 1). 3th. New York, Cold Spring Harbor, 2001; 5.4-5.86
52. Sambrook J, Russell DW. Molecular Cloning A Laboratory Manual (Volume 1). 3th. New York, Cold Spring Harbor, 2001; 1.123-1.125

53. Bozdayı AM, Aslan N, Bozdayı G, Türkyılmaz AR. Molecular epidemiology of hepatitis B,C and D viruses in Turkish patients. Arch Virol, 2004;149:2115-2129