

**ANKARA ÜNİVERSİTESİ
BİYOTEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ**

**TEMEL BİYOTEKNOLOJİ
DOKTORA TEZİ**

**HEPATİT DELTA VİRÜSÜ (HDV) TANISINDA 'REAL TIME' PZR TEMELİNDE
YENİ BİR YÖNTEM GELİŞTİRİLMESİ**

YASEMİN ÇELİK

**Danışman Öğretim Üyesi
Prof. Dr. A. İRFAN SOYKAN**

**ANKARA
2009**

Hepatit Delta Virüsü (HDV) Tanısında ‘Real Time’ PZR Temelinde Yeni Bir Yöntem Geliştirilmesi

ÖZET

Hepatit delta virüsü (HDV), delta hepatitine sebep olan bir viral hepatit ajanıdır. HDV defektif bir RNA virüsüdür ve tek başına patojen değildir, bu bakımdan yalnızca Hepatit B (HBV) enfeksiyonu olan bireylerde hastalık yapabilmektedir. HDV enfeksiyon tanısı ya da uygulanan tedavinin etkinliği ise genellikle spesifik anti-HDV IgM veya HDV-RNA gibi biyokimyasal, histolojik ve virolojik parametrelerle değerlendirilmektedir. Fakat akut enfeksiyon vakaları ya da immün sistemi baskılanmış bireylerdeki kronik enfeksiyonlar dışında HDV antijeninin serumda saptanması çok nadirdir. HDV RNA'nın serumda belirlenmesiyle HDV replikasyonu en iyi şekilde değerlendirilebilir. Real time PZR sistemi amplifikasyon ürünlerinin miktarlarının belirlenmesinde hızlı bir sistemdir, yüksek duyarlılık ve kesinlikte sonuçlar alınabilmektedir. Biz de çalışmamızda farklı ‘real time’ PZR cihazları, farklı primer-prob sistemleri ve farklı ticari kitler deneyerek HDV-RNA'yı kantitatif olarak saptamaya yönelik en uygun, yüksek kesinlik ve duyarlılıkta ‘real time’ PZR koşullarını belirlemeyi amaçladık.

Çalışmamıza laboratuvarımızda daha önce yapılan konvansiyonel PZR testleri ile HDV RNA'sının pozitif olduğu belirlenen 40 hasta ve bir yıl süreyle interferon ya da PEG-interferon tedavisi almış 22 HDV hastası alındı. Farklı HDV izolatları karşılaştırılarak HDV genomunun korunmuş bölgeleri belirlendi ve bu bölgelere özgü primer-prob tasarımı yapıldı. Ayrıca HDV RNA'nın kantitasyonu için HDV genomunun bir bölümünü içeren standart plazmid oluşturuldu ve kopya sayısı hesaplandı. Yapılan denemeler sonucunda delta antijeni bölgesini hedef alan iki farklı primer-prob sistemi ve farklı ‘real time’ PZR kitleri ile HDV RNA'nın, Light cycler ‘real time’ PZR sisteminde 1000 kopya/μl'ye kadar, ABI 7300 ‘real time’ PZR sisteminde ise 100 kopya/μl'ye kadar saptanabildiği gözlemlendi. Standart plazmidin bilinen miktarda oluşturulan örneklerinin döngü eşik değerlerine karşılık (CT:cycle threshold) başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğrular oluşturuldu, HDV RNA'sının pozitif olduğu belirlenen 40 hasta serumunun HDV RNA viral yükü Light cycler ‘real time’ PZR sisteminde iki aşamalı olarak, bir yıl süreyle interferon ya da PEG-interferon tedavisi alan 22 HDV hastasının serum HDV RNA viral yükü ise ABI 7300 ‘real time’ PZR sisteminde tek aşamada (ters transkripsiyon ve polimerizasyon aynı tüp içerisinde) kantitatif olarak

belirlendi. Bu bakımdan HDV RNA'nın 'real time' PZR sisteminde saptanmasına yönelik sınırlı sayıdaki çalışmalar arasında çalışmamız ilktir ve bu şekilde kontaminasyon riski ve zaman kaybı da azaltılmış olmaktadır. Sonuç olarak HDV RNA'nın serumda kantitatif ölçümü, HDV enfeksiyonlarının patofizyolojisinin analizinde ve HDV biyolojisini anlamaya yönelik çalışmalarda kullanışlı olabilir. Ayrıca HDV RNA düzeyleri ile hastalık seyri arasındaki ilişki analiz edilerek hastalığın tedavisinde izlenecek yolların belirlenmesinde ve yeni ilaçların etkilerinin değerlendirilmesinde de HDV RNA'nın kantitatif analizi yararlı olacaktır.

Anahtar kelimeler: Hepatit Delta Virüsü, HDV RNA, 'real time' PZR, Hepatit B Virüsü.

Development of A New Method Based On Real Time PCR In The Diagnosis of Hepatitis Delta Virus (HDV)

ABSTRACT

Hepatitis delta virus is an agent responsible for delta hepatitis. HDV is a defective RNA virus that can only infect people who have hepatitis B virus. HDV diagnosis or treatment of HDV infection efficiency is monitored by biochemical, histological and virological parameters such as specific anti-HDV IgM or HDV RNA. The HDV antigen can be detected rarely in serum except in cases of acute infection or chronic infections in immunosuppressed patients. HDV replication can be evaluated by detecting HDV RNA in serum specimens. Real time PCR is a rapid and sensitive method to quantitate amplification products. The aim of this study was to quantitate HDV RNA in serum by real time PCR using different real time PCR machines, different primer probe systems and different commercially available kits.

In this study there were 40 patients who have HDV RNA in their serum detected by conventional PCR in our laboratory. Also chronically infected 22 HDV patients receiving IFN or PEG-IFN therapy were enrolled to the study. Different HDV isolates were compared, conserved HDV regions were detected and primers and probes were designed based on these regions. Also we constructed a standard plasmid including HDV genome to quantitate HDV RNA and copy number of plasmid was calculated. Using two different primers and probes targeting hepatitis delta antigen region and using different PCR kits, HDV RNA could be detected in Light cycler real time PCR system and ABI 7300 real time PCR system. The sensitivity of the assay to detect HDV RNA was 1000 copies/ μ l in Light cycler real time PCR system and 100 copies/ μ l in ABI 7300 real time PCR system. Serial dilutions of standard plasmid with known copy number were tested with the cycle threshold (CT) values plotted against the copy number to establish a standard curve. Then HDV RNA viral load of 40 patients were evaluated by Light cycler 'real time' PCR system in two steps and HDV RNA viral load of 22 patients receiving IFN or PEG-IFN therapy were evaluated by ABI 7300 real time PCR system in one step (reverse transcription and polymerization were in the same tube). As the result our study was unique among studies of determining HDV RNA in serum by real time PCR and then contamination risk and time consumption was prevented using one tube. HDV RNA quantitation in serum could be helpful in understanding of HDV biology and analysing of pathophysiology of HDV

infection. Also this study should help the management of chronically infected patients and it could be used to define treatment guidelines and to evaluate the efficacy of new drugs.

Key words: Hepatitis delta virus, HDV RNA, real time PCR, Hepatitis B virus.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
ŞEKİLLER DİZİNİ	vii
ÇİZELGELER DİZİNİ	viii
SİMGELER DİZİNİ	ix
1. GİRİŞ.....	1
1. 1 HDV Epidemiyolojisi	1
1. 1. 1 Viral genetik heterojenite	2
1. 2 HDV'nın sınıflandırılması	3
1. 3 HDV Virolojisi	4
1. 3. 1 Virion Yapısı	4
1. 3. 2 Genom Yapısı	5
1. 3. 3 Ribozim Yapısı ve Özellikleri	7
1. 3. 4 Hepatit Delta Antijeni (HDAg)	8
1. 3. 4. 1 HDAg'de post-translasyonel modifikasyonlar	9
1. 3. 4. 2 RNA 'editing'	11
1. 3. 5 HDV replikasyon çalışmaları için kullanılan <i>in vivo</i> ve <i>in vitro</i> sistemler	12
1. 3. 6 HDV Genom Replikasyonu	14
1. 3. 7 Virion Oluşumu	18
1. 3. 8 HDV Patogenezi	18
1. 3. 9 HDV Enfeksiyon Tanısı	19
1. 3. 9. 1 HDAg antikorlarına (anti-HDV) yönelik serolojik tanı	20
1. 3. 9. 2 HDAg ve HDV RNA'ya yönelik moleküler tanı	21
2. KAYNAK ÖZETLERİ	23
3. MATERYAL ve YÖNTEM	24
3. 1 Materyal	24
3. 1. 1 Hastalar	24
3. 1. 2 Kimyasal Maddeler	24
3. 1. 3 Tampon ve çözeltiler	25
3. 1. 4 Kullanılan cihazlar	25
3. 1. 5 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler	25
3. 1. 6 Kullanılan Kitler	26
3. 2 Yöntem	27
3. 2. 1 Viral RNA izolasyonu	27
3. 2. 2 Kullanılan primer ve problemlerin tasarımı ve dizileri	27
3. 2. 3 Ters transkripsiyon reaksiyonu	34
3. 2. 4 HDV RNA kantitasyonu için standart oluşturulması	35
3. 2. 4. 1 PZR ile çoğaltılan Bölgenin Topo-XL Vektörlerine klonlanması	35
3. 2. 4. 2 Transformasyon	36
3. 2. 4. 3 Topo klonlaması sonrası plazmid izolasyonu ve klonların analizi	36
3. 2. 4. 4 Elde edilen plazmidlerin jelde görüntülenmesi ve analizi	37
3. 2. 4. 5 Pozitif Kolonilerin Dondurulması ve Saklanması	37
3. 2. 4. 6 DNA Dizi Analizi	38
3. 2. 4. 7 Elde edilen plazmid miktarının hesaplanması	38
3. 2. 5 HDV RNA'nın 'real time' PZR ile gösterilmesi	38
3. 2. 5. 1 Light cycler Taqman Master Kit	39

3. 2. 5. 2 Taqman EZ-RT PCR Kit	39
4. ARAŞTIRMA BULGULARI	41
4. 1 Hastalar	41
4. 2 Light cycler Taqman Master Kit	41
4. 3 Taqman EZ-RT PCR Kit	47
5. TARTIŞMA ve SONUÇ	57
KAYNAKLAR	61
ÖZGEÇMİŞ	71

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 1.1 HDV virionun şematik yapısı.....	5
Şekil 1. 2 Genom replikasyonu sırasında oluşturulan üç HDV RNA tipi.....	6
Şekil 1. 3 HDV RNA'nın genom organizasyonu.....	7
Şekil 1. 4 Delta antijeni (HDAg) fonksiyonel bölgeleri ve HDAg üzerindeki post-translasyonel modifikasyonlar.....	11
Şekil 1. 5 HDV replikasyon döngüsünde RNA 'editing' olayı.....	12
Şekil 1. 6 Macnoughan et al. (2002a) tarafından önerilen replikasyon modeli.....	17
Şekil 1. 7 Taylor (2006) tarafından önerilen genom replikasyon ve işlenmesi modeli.....	18
Şekil 3.1 Farklı HDV genotiplerinin karşılaştırılması ve tasarlanan primer, prob dizilerinin HDVgenomu üzerindeki dizilimi.....	29
Şekil 4.1 HDV RNA'nın Light cycler 1.2 'real time' PZR sisteminde Light cycler Taqman Master kit ile çoğaltılması.....	42
Şekil 4. 2 Oluşturulan standard plazmidin 1/10 seri seyreltme oranındaki örneklerinin Light cycler 1.2 'real time' PZR sisteminde Light cycler Taqman Master kit ile kantitasyonu.....	44
Şekil 4. 3 Hasta örneklerinin Light cycler 1.2 'real time' PZR sisteminde Light cycler Taqman Master kit ile kantitasyonu.....	45
Şekil 4. 4 1/10 seri seyreltme oranındaki HDV RNA 'real time' PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	46
Şekil 4. 5 Oluşturulan standard plazmidin $2,0 \times 10^7$ kopya/ μ l'den $2,0 \times 10^2$ kopya/ μ l'ye kadar olan 'real time' PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde gösterilmesi.....	46
Şekil 4. 6 HDV RNA'nın ABI 7300 'real time' PZR sisteminde Taqman EZ-RT PCR kit ile çoğaltılması.....	48
Şekil 4. 7 Oluşturulan standard plazmidin 1/10 seri seyreltme oranındaki örneklerinin ABI 7300 real time PZR sisteminde Taqman EZ-RT PCR kit ile kantitasyonu.....	49
Şekil 4. 8 Plazmidin şekil 4. 7'de CT değerleri gösterilen 1\10 seri seyreltme oranındaki miktarı bilinen örneklerinin döngü eşik değerlerine karşılık başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğru.....	50
Şekil 4. 9 1/10 Seri seyreltme oranındaki HDV RNA 'real time' PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi.....	51
Şekil 4. 10 Hasta örneklerinin ABI 7300 'real time' PZR sisteminde Taqman EZ-RT PCR kit ile kantitasyonu.....	52
Şekil 4. 11 Hasta örneklerinin viral yükünü belirlemek amacıyla deneyde kullanılan ve viral yükleri 10^6 kopyadan 10^2 kopyaya kadar olan HDV RNA standartlarının döngü eşik değerleri (CT).....	53
Şekil 4. 12 Bir önceki Şekil 4. 11'de döngü eşik değerleri (CT) verilen HDV RNA standartlarının CT değerlerine karşılık başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğru.....	54

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 1.1 HDV genom replikasyonunu çalışmak için kullanılan deneysel Sistemler	14
Çizelge 1. 2 HDV enfeksiyonu tanısında serolojik ve histolojik belirteçler	20
Çizelge 3.1 Çalışmamız için tasarlanan primer ve prob dizileri.....	28
Çizelge 3. 2 Light cycler Taqman Master Kit için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreleri	39
Çizelge 3. 3 EZ-RT PCR Kit için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreleri	40
Çizelge 4. 1 ABI 7300 ‘real time’ PZR sisteminde hesaplanan deney içi ve deneyler arası varyasyon değerleri	56
Çizelge 4. 2 Light cycler ‘real time’ PZR sisteminde hesaplanan deney içi ve deneyler arası varyasyon değerleri	56

SİMGELER DİZİNİ

µl	Mikrolitre
ADAR	RNA Adenozin Deaminaz
ALT	Alanin Transaminaz
AMV	Avian Myeloblastosis Virus
cDNA	Komplementer DNA
CT	“Cycle threshold”(Döngü eşik değeri)
EDTA	Etilen Diamin Tetra-Asetik asit
HBV	Hepatit B Virüsü
HBc	Hepatit B Virüsü Kor Antijeni
HBsAg	Hepatit B Virüsü Yüzey Antijeni
HDAg	Hepatit Delta antijeni
HDV	Hepatit Delta Virüsü
IgM	M antikoru
kDa	Kilo Dalton
L-HDAg	Büyük Hepatit Delta Antijeni
LNA	“Locked Nucleic Acid”
mRNA	Mesajcı Ribonükleik Asit
PEG	Polietilen Glikol
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
r	Korelasyon Katsayısı
RNP	Ribonükleoprotein
RT-PZR	Ters Transkripsiyon-Polimeraz Zincir Reaksiyonu
S-HDAg	Küçük Hepatit Delta Antijeni
TAE	Tris-Asetik asit- EDTA
TBE	Tris-Borik asit-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris-HCl	Tris-Hidroklorik asit
UNG	Urasil N-Glikozilaz

1. GİRİŞ

Hepatit delta virüsü (HDV), delta hepatitine sebep olan bir viral hepatit ajanıdır. HDV defektif bir RNA virüsüdür ve tek başına patojen değildir, bu bakımdan yalnızca Hepatit B (HBV) enfeksiyonu olan bireylerde hastalık yapabilmektedir.

Hepatit delta antijeni (HDAg), ilk defa 1977 yılında Rizzetto ve arkadaşları tarafından bazı bireylerdeki HBV enfeksiyonunun diğer HBV enfeksiyonlu bireylere göre neden daha şiddetli olduğu araştırılırken karaciğer biyopsi örneklerinde keşfedilmiştir. Daha sonra yapılan araştırmalar ise delta antijeninin şu anda bizim HDV olarak bildiğimiz yeni bir enfeksiyöz ajan olduğunu ortaya çıkarmıştır (Rizzetto et al. 1977, Rizzetto et al. 1980a).

HDV RNA, 1986 yılında klonlanmıştır ve yapılan dizi analizleri HDV'nin tek iplikli negatif polariteye sahip halkasal RNA genomu içeren ilk ve tek hayvan virüsü olduğunu göstermiştir. Ayrıca HBV genomu ile de bir dizi homolojisi göstermemektedir (Kos et al. 1986, Chen et al. 1986, Wang et al. 1986).

1. 1 HDV Epidemiyolojisi

HBV enfeksiyonu global bir sağlık problemidir ve dünyada 350 milyonun üzerinde insan kronik HBV taşıyıcısıdır. HBV yüzey antijeni (HbsAg) taşıyıcılarının yaklaşık % 5'inin ise aynı zamanda HDV ile enfekte olduğu tahmin edilmektedir, bu da dünya genelinde yaklaşık 10-15 milyon kadar HBV taşıyıcısının bulunduğunu göstermektedir (Hadziyannis 1997, Farci 2003).

HDV enfeksiyonunun coğrafik dağılımının HBV enfeksiyonu ile aynı olması beklenebilir, fakat HDV enfeksiyonu HBV'nin basit bir yansıması değildir. HDV kompleks bir epidemiyolojiye sahiptir, geçiş şekli ve enfeksiyon kaynağı HBV ile benzerlik gösterdiği halde dünya üzerindeki dağılım ve bulaş yolları farklıdır. HBV enfeksiyon prevalansının yüksek olduğu, fakat bunun yanında HDV enfeksiyon prevalansının oldukça düşük olduğu bölgeler bulunmaktadır. Örnek olarak HBV enfeksiyonunun çocukluk çağında ortaya çıktığı Alaska yerlilerinde HDV enfeksiyon prevalansı, HBV endemik olmasına rağmen ihmal edilebilir düzeydedir (Rizzetto et al. 1992). Orta Doğuda HDV endemik gözükmemektedir fakat dağılımı HBV ile çok az ilişkilidir (Toukan et al. 1991).

HDV prevalansının yüksek olduğu bölgeler İtalya, Doğu Avrupanın bazı bölgeleri, Amazon bölgesi, Venezuela, Kolombiya, bazı Pasifik adaları, Pakistan ve Batı Asya'yı içermektedir (Casey et al. 1993, Rizzetto et al. 1991, Mumtaz et al. 2005). Ayrıca Japonya'nın Okinowa adası, Çin'in bazı köyleri, kuzey Hindistan ve Arnavutluk'un güney kesiminde de enfeksiyonun yeni bir tipi olduğu belirlenmiştir (Dalekos et al. 1995, Saugawa et al. 1995, Singh et al. 1995).

HDV enfeksiyonunun ülkemizdeki durumuna bakılacak olursa, yapılan çalışmalarda HDV prevalansı, akut HBV enfeksiyonlarında % 2,5-21,8, asemptomatik HBV taşıyıcılarında % 0,9-16,2, kronik karaciğer hastalarında % 9-51,7, siroz hastalarında ise % 23-74 oranlarında bildirilmektedir. Ayrıca Güneydoğu Anadolu bölgesindeki oranların diğer bölgelerden daha yüksek olduğu da görülmektedir (Mıstık ve Balık, 2001).

HDV'nin bulaş yolları HBV ile benzerdir. Kuzey Avrupa ve Amerika gibi endemik olmayan bölgelerde HDV geçişinin en yaygın şekli intravenöz ilaç kullanımınıdır. Geçmişte kan transfüzyonu ile geçiş HDV enfeksiyonu için önemli bir risk oluştururken (Rosina et al. 1985), günümüzde kanda HBsAg'nin taranması ve HBV'ye karşı aşılamanın bir sonucu olarak bu risk azalmıştır. Yapılan epidemiyolojik çalışmalar HDV taşıyıcısı birey ile seksüel ilişkinin de HDV geçişinde önemli bir yol olduğu fikrini vermektedir (Wu et al. 1990). Yapılan çalışmalarda bu bireyler ve eşleri arasındaki yüksek HDV dizi homolojisi de bu tip geçiş için moleküler kanıt oluşturmaktadır (Wu et al. 1995b).

HDV'nin Akdeniz gibi endemik olduğu bölgelerde parenteral geçişin yaygın olduğu bildirilmiş ve moleküler kanıtları gösterilmiştir (Bonino et al. 1985, Niro et al. 1999). HDV'nin perinatal geçişi ise nadirdir.

1. 1. 1 Viral Genetik Heterojenite

Hastalığın seyri boyunca HDV RNA da evrimleşmekte ve nükleotid dizileri değişikliğe uğrayabilmektedir. Yapılan analizlerde HDV RNA'da mutasyon sıklığının 3×10^{-2} ile 3×10^{-3} nükleotid/ yıl olduğu hesaplanmıştır. (Lee et al. 1992). Farklı HDV genotipleri arasında, dizi farklılığının en yüksek olduğu bölge hipervariable bölgedir (1598-657. nükleotidler arası). Genomik ve antijenomik HDV RNA üzerindeki otokatalitik kesim bölgesi (ribozim) ve HDAg üzerindeki RNA bağlanma bölgesi etrafındaki dizilerin ise yüksek

oranda korunmuş bölgeler olduğu belirlenmiştir (Chao et al. 1990, Wu et al. 1995c). Dünya genelinde toplanan tam genom HDV RNA dizileri karşılaştırıldığında izolatlar arasında genomik dizi çeşitliliği bakımından % 40'a kadar bir heterojenitenin olduğu görülmüştü ve bugüne kadar üç genotip ve iki alt tip tanımlanmıştı (Negro and Rizzetto 1995). Fakat son dönemde yapılan moleküler filogenetik analizler, HDV'nin sekiz gruba ('clade') ayrılması fikrini ortaya çıkarmıştır (Deny 2006).

Dünyanın pek çok bölgesinde en yaygın olarak bulunan HDV genotipi olan HDV genotip I ile HBV genotip C enfeksiyonlarının hepatasellüler karsinoma (HCC), siroz gelişimi ve kronik hepatit D'ye bağlı ölümlerle ilişkili olduğu yapılan bir çalışmayla ortaya çıkarılmıştır (Su et al. 2006). Genotip II ise genotip I'in geniş dağılımının tersine başta Sibirya, Japonya ve Tayvan olmak üzere Güney Asya ile sınırlı olarak görülmektedir. Genotip II'nin genellikle Genotip I'den daha hafif seyreden bir hastalık oluşturduğu gözlenmiştir (Wu et al. 1995c). Genotip III ise Kolombiya, Venezuela ve Peru gibi Güney Amerika ülkelerinden izole edilmiştir ve fulminant hepatit formları ile sıkı ilişkili olduğu bulunmuştur (Casey et al. 1993).

Genotipler arasındaki yukarıda belirtilen farklılıklar, HDV genetik yapısının, HDV enfeksiyonundaki karaciğer hasarı patogenezi etkileyebileceği fikrini ortaya çıkarmaktadır (Enomoto et al. 2006).

1. 2 HDV'nin Sınıflandırılması

HDV, farklı özellikleri olan bir virüstür. HDV kendi yüzey proteinini kodlamadığı için üretimi ve enfeksiyöz virionların geçişi için HBV'ye ihtiyaç duyar. Bu bakımdan HDV'nin subviral bir partikül olduğu düşünülmektedir. Bitkileri enfekte eden subviral ajanlar arasında viroidler olarak bilinen küçük, tek iplikli, protein kodlamayan RNA'lar bulunur (Flores et al. 2004). Bu viroidler ve HDV arasında çeşitli benzerlikler bulunmaktadır. Örnek verilecek olursa HDV RNA'nın genomik ve antijenomik iplikleri üzerindeki ribozim aktivitesi ve replikasyon modelindeki bazı özellikler viroidlere benzemektedir (Diener and Pruisner 1985, Chang et al. 2005). Fakat bunun yanında viroidler HDV'den farklı olarak oldukça küçüktürler (tipik olarak 200-450 nükleotid uzunluğunda), herhangi bir protein kodlamazlar ve enfeksiyon için bilinen yardımcı bir virüsüleri yoktur (Taylor

2006a). Bu özellikleri bakımından HDV, bilinen diğer hayvan virüsleri ile herhangi bir akrabalığı olmadığından taksonomik olarak *Deltavirus* cinsinin tek üyesidir (Murphy 1995).

1. 3 HDV Virolojisi

1. 3. 1 Virion Yapısı

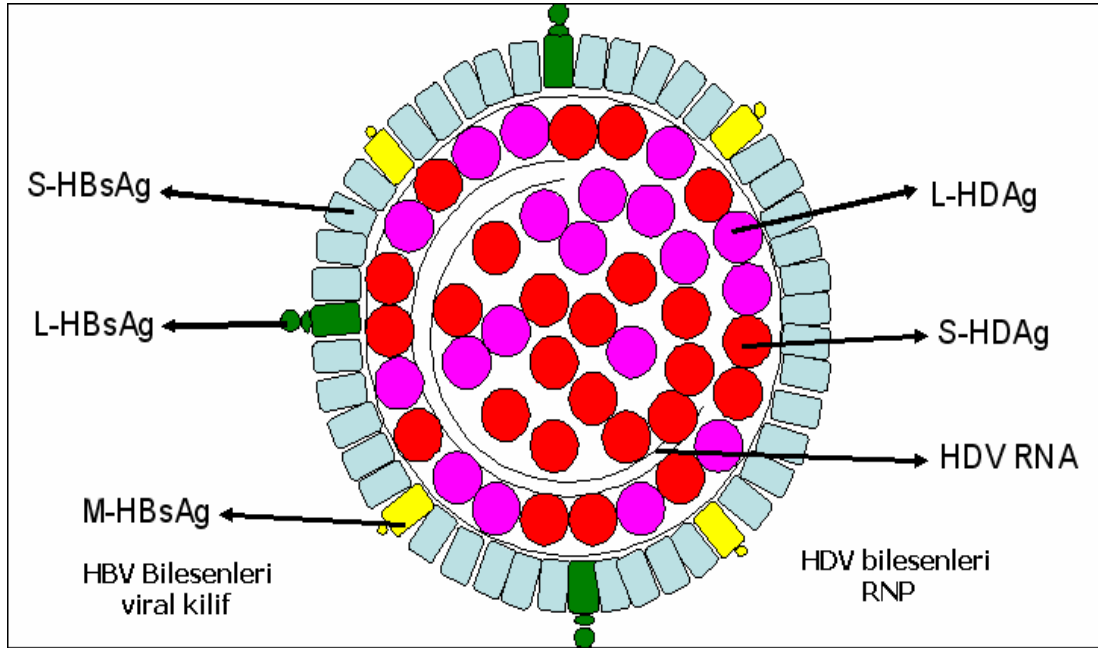
Hepatit delta virüsü, defektif bir virüstür, enfeksiyon yapmak ve virion asamblesi için HBV yüzey antijenine ihtiyaç duyar (Rizzeto et al. 1980b). HDV serumda 36-43 nm çapında partiküller halinde bulunur.

HDV virion yapısı kimeriktir çünkü virion kılıfta HBV yüzey proteinleri içerirken iç bölümdeki ribonükleoprotein (RNP) yapısı HDV spesifik elemanlardan oluşur. HDV RNP yapısı yaklaşık 1700 nükleotid uzunluğunda tek iplikli genomik RNA ve HDV tarafından kodlanan delta proteininin çoklu kopyalarından oluşur. Delta proteini hepatit delta antijeni (HDAg) olarak bilinir ve iki izoformu bulunur: bunlardan küçük formu (S-HDAg) 195 aminoasitten oluşan bir polipeptid iken büyük formu (L-HDAg) bundan 19 aminoasit daha uzundur (Rizzeto et al. 1980b, Lai 1995, Gudima et al. 2002).

HDV partikülü, noniyonik deterjan ile muamele edildikten sonra HDV RNP yapısı elektron mikroskobu ile incelenebilir. Bu yapı, ikozahedral simetri göstermez, sferik yapıdadır ve yaklaşık 19 nm çapındadır (Bonino et al. 1986, Ryu et al. 1993). HDV kılıfı ise lipit yapıda bir membrandan oluşur ve büyüklüklerine göre küçük (S-HBsAg), orta (M-HBsAg) ve büyük (L-HBsAg) olarak adlandırılan üç HBV yüzey proteinini içerir. Bu proteinlerin HDV kılıfındaki oranı 95:5:1 (S:M:L) iken buna karşılık HBV virionlarında bu oran 4:1:1 şeklindedir (Gerin and Purcell 2001).

HDV, HBV yüzey proteinlerini taşıdığı için bu iki virüsün bir hücreye tutunma ve giriş mekanizmalarının benzer olduğu düşünülmektedir. Buna kanıt olarak da L-HBsAg proteininin amino ucuna yakın bir bölgenin her iki virüsünde hücreye girişi için gerekli olduğu gösterilmiştir (Barrera et al. 2005). İlginç olarak ise HBV yüzey proteinlerinin (L, M, S) N ucundaki karbonhidrat modifikasyonu çıkarıldığında HBV enfeksiyöz özelliğini yitirirken HDV'nin hala enfeksiyöz olduğu bulunmuştur (Sureau et al. 2003). Her iki

virüsünde hücreye tutunma ve giriş mekanizmalarının açıklığa kavuşması için daha fazla çalışmaya ihtiyaç duyulmaktadır (Taylor 2006a).



Şekil 1.1 HDV virionun şematik yapısı. Virion partikülü 2 tip bileşenden oluşur: a) HBV orijinli viral kılıf; HBV yüzey proteinlerini içerir. b) Ribonükleoprotein yapısı ise çembersel genomik RNA ve HDV tarafından kodlanan delta proteinlerini içerir .

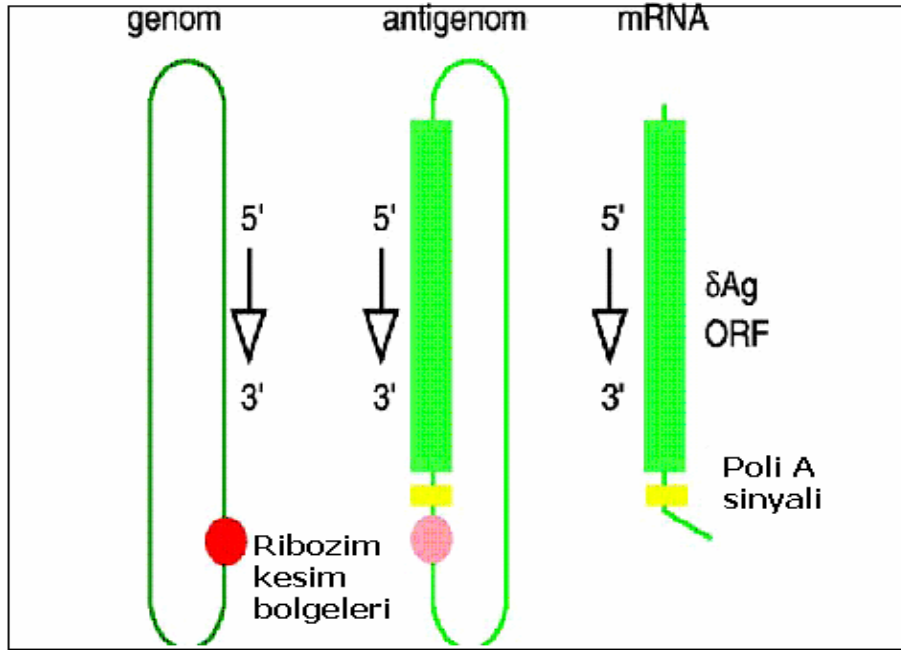
1. 3. 2 Genom Yapısı

HDV genomu yaklaşık 1700 nükleotid uzunluğunda tek iplikli çembersel yapıdaki RNA'dan oluşur. HDV genomu, hayvan virüsleri arasında en küçük ve tek çembersel yapıdaki RNA'dır. Genom içerisinde yaygın olan yaklaşık % 70 intramoleküler baz çiftleşmesinden dolayı bu RNA kendi üzerine katlanabilir ve dallanmamış çomaksı bir yapı oluşturur (rod-like structure) (Wang et al. 1986, Kuo et al. 1988).

HDV genom replikasyonu RNA'dan doğrudan RNA sentezlenmesi aracılığı ile olur. HBV gibi DNA araçları kullanmaz. HDV genom replikasyonu sırasında hücre başına ortalama 300.000 genomik RNA kopyası birikir. Ayrıca genomik RNA'nın tam bir tamamlayıcısı olan antijenomun ise genomun yaklaşık onda biri oranında bulunduğu saptanmıştır (Chen et al. 1986).

Genom ve antigenomun herbiri yaklaşık 85 nükleotid uzunluğunda tek bir ribozim bölgesi içerirler (Ferre-D'Amare et al. 1998).

Üçüncü bir HDV RNA tipi ise genomdan yaklaşık 500 kere daha az bulunur ve antigenom ile aynı polariteye sahiptir. Bu RNA lineer yapıdadır ve yaklaşık 800 nükleotid uzunluğundadır. Delta antijeni translasyonunda mRNA rolüne uygun olarak 5' kapak ve 3' poli A kuyruğuna sahiptir (Nie et al. 2004).

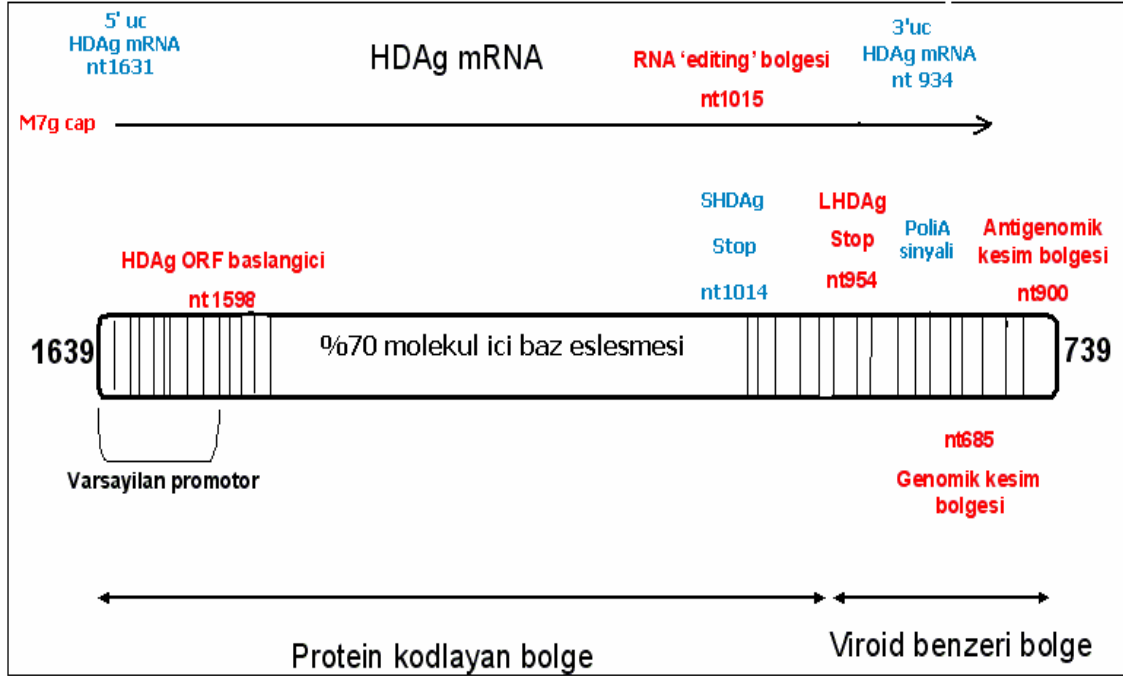


Şekil 1. 2 Genom replikasyonu sırasında oluşturulan üç HDV RNA tipi (Taylor 2006a)..

RNA replikasyonu sırasında üretilen başka RNA formları da bulunmaktadır. Bunlar işlenmemiş veya yarı işlenmiş genomik ve antigenomik polaritedeki lineer RNA'lardır (Chen et al. 1986). Bunlardan bazılarının HDV ribozimleri tarafından lineer monomerler haline getirildiği daha sonra muhtemelen konakçı RNA ligaz aktivitesi ile çembersel forma dönüştürüldüğü düşünülmektedir (Reid and Lazinski 2000).

Genom üzerinde ribozim bölgeleri, HDAg açık okuma çerçevesini içeren bölge ve HDAg mRNA için promotor olarak kabul edilen bölge oldukça iyi korunmuştur. Farklı HDV izolatları arasında en fazla dizi heterojenitesi ise 1 ve 615. nükleotidler arasında kümelenmiştir (Chao et al. 1990, Chao et al. 1991, Casey et al. 1993).

Ayrıca HDV'nin ribozim bölgesi içinde ribozim domainini kapsayan 615 ve 950. nükleotidler arasında kalan bölgesi ile viroid RNA'lar arasında dizi benzerliği bulunmaktadır (Elena et al. 1991).



Şekil 1. 3 HDV RNA'nın genom organizasyonu (numaralandırma Wang et al. (1986) göre yapılmıştır) (Macnaughton and Lai 2006).

1. 3. 3 Ribozim yapısı ve özellikleri

HDV'nin hem genomik hem de antigenomik iplikleri üzerinde ribozim aktivitesine sahip bir bölge bulunur. Yeni oluşturulan genomik ve antigenomik RNA'lar ribozimleri tarafından birim uzunlukta (1,7 kb) lineer RNA'lar oluşturmak üzere kesimlenirler (Kuo et al. 1988, Sharmeen et al. 1988). Bu lineer RNA'lar daha sonra çembersel hale gelirler. Ribozim kesim reaksiyonu bir trans-esterifikasyon reaksiyonudur ve 5' OH ve 2'3' siklik monofosfat uçları oluşturur (Sharmeen et al. 1988). HDV riboziminin yalnızca 85 nükleotidlik bölgesi kesim için gereklidir ve kesim için bütün aktif nükleotidler, kesim bölgesinin 3' ucunda yerleşmişlerdir (Perrotta et al. 1990, Wu et al. 1992).

Yapılan çalışmalarda ribozim bölgelerinden herhangi biri inaktive edildiğinde işlenmiş RNA'ların oluşturulmadığı gözlenmiş ve buradan hareketle ribozim aktivitesinin HDV replikasyonu için gerekli olduğu sonucu çıkarılmıştır (Macnaughton et al. 1993).

1. 3. 4 Hepatit delta antijeni (HDAg)

Hepatit delta antijeni (HDAg), HDV virion partikülünün bir bileşenidir, viral RNA genomu ile birlikte viral nükleokapsid yapısını oluştururlar (Bonino et al. 1984). Bir virion partikülünde her RNA molekülüne karşılık yaklaşık 70 HDAg bulunur (Ryu et al. 1993). HDAg, büyüklükleri farklı, büyük (L-HDAg, 27 kDa) ve küçük (S-HDAg, 24 kDa) olmak üzere iki ayrı formda bulunur.

Yapısal rolünün yanında HDAg, viral RNA sentezi (S-HDAg ile) ve virüs asamblesi (L-HDAg ile) gibi viral RNA replikasyon basamaklarına katılarak HDV hayat döngüsünde önemli bir rol oynar. HDAg, HDV RNA tarafından kodlanan bilinen tek fonksiyonel proteindir. HDV RNA'nın antigenomik ipliği tarafından kodlanır fakat viral genomik RNA'dan transkribe edilen yaklaşık 800 bazlık mRNA'nın translasyonu ile oluşur (Lai, 2006).

S-HDAg (195 aminoasit) ve L-HDAg (214 aminoasit) formları, L-HDAg'nın C-terminalinde ek olarak 19 aminoasit içermesi dışında aynıdır. HDAg üzerinde tanımlanmış dört yapısal ve fonksiyonel alan bulunur (Şekil 1. 4).

RNA Bağlanma bölgeleri (RBD):

HDAg üzerinde pekçok RNA bağlanma bölgesi bulunur. İlk tanımlanan bölge arjinince zengin iki motif (ARM) içerir. Hem her iki ARM dizisi hem de arada kalan heliks-ilmek-heliks motifi içeren dizi RNA'ya bağlanmak için gereklidir (Lee et al. 1993). Diğer potansiyel RNA bağlanma bölgesi proteinin N-terminalinde 2-27 aminoasitleri arasında bulunur (Poisson et al. 1993). HDAg'nin RNA replikasyonu ve RNA transportu gibi biyolojik fonksiyonlarının temelinde RNA bağlanma aktivitesi bulunur. HDAg genel bir RNA bağlanma proteindir ve hem genomik hem de antigenomik ipliğe eşit verimlilikle bağlanır (Chao et al. 1991, Hwang et al. 1992).

Nükleer lokalizasyon sinyali (NLS):

HDAg'nin nükleer lokalizasyon sinyali, proteinin N terminaline yakın üçte birlik kısmında yerleşmiştir (68-88. aminoasitler arası) (Xia and Lai 1992). Bu bölge HDAg'yi çekirdeğe yönlendirir. HDAg bu sinyal ile HDV RNA'yı replikasyonun gerçekleştirildiği nükleusa taşır (Chou et al. 1998). HDAg-HDV RNA kompleksinin çekirdeğe girip çıkabildiği gösterilmiştir (Tavanez et al. 2002). Böylece HDAg'nin nükleustan çıkış sinyali de içerdiği fikri oluşmaktadır, fakat HDAg üzerindeki çekirdeğe giriş ve çıkış sinyal bölgeleri henüz birbirinden ayrı olarak gösterilememiştir (Lai 2006).

'Coiled coil' dizisi (CCS):

Bu bölge proteinin N terminalinde bulunur (31-52. aminoasitler arası), proteinin oligomerizasyonundan sorumludur (Chen et al. 1992, Xia and Lai 1992). HDAg'nin oligomerizasyonu, S-HDAg'nin replikasyonu aktive edici görevinde ve L-HDAg'nin ise replikasyonu baskılamasında gereklidir (Xia and Lai 1992).

Virüs asamble sinyali (VAS):

Bu bölge yalnızca L-HDAg'de bulunur. Virüs asamble sinyali L-HDAg ve HBsAg'nin etkileşmesi için gereklidir bu da HDV virion asamblesi için kritik bir basamaktır (Hwang and Lai 1993, De Bruin et al. 1994). L-HDAg'de bulunan bu ekstra 19 aminoasit, virion asamblesi için gereklidir (Lee et al. 1995).

1. 3. 4. 1 HDAg'de post-translasyonel modifikasyonlar

HDAg'deki fosforilasyon , asetilasyon, prenilasyon ve metilasyon gibi post-translasyonel modifikasyonlar, viral partikül yapılarının anlaşılmasında ve HDV hayat döngüsündeki pek çok basamağın düzenlenmesinde önemli rol oynar.

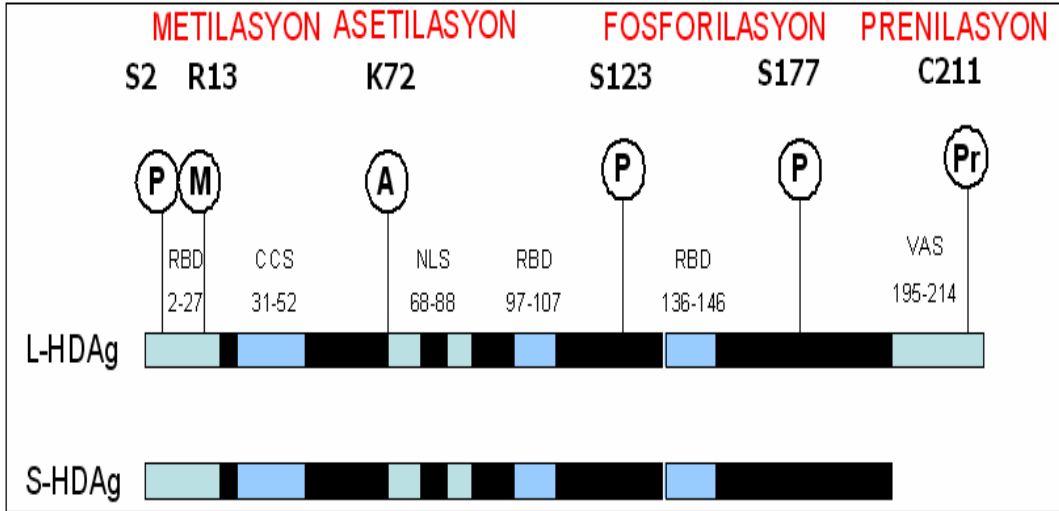
Fosforilasyon; çoğunlukla serin ve treonin bölgelerinden olmak üzere hem S-HDAg hem de L-HDAg fosforilasyona uğrar (Chang et al. 1988, Mu et al. 1999). S-HDAg için serin-177 pozisyonu dominant fosforilasyon bölgesidir. Fosforilasyonun kazein kinaz II, protein

kinaz C ya da çift iplikli RNA'ca aktive edilen kinaz PKR tarafından yapıldığı rapor edilmiştir fakat her kinazın HDAG'nin fosforilasyonundaki önemi açık değildir (Yeh et al. 1996, Chen et al. 2002). Ayrıca serin-2 ve serin-123 pozisyonları gibi diğer fosforilasyon bölgelerinin de önemi henüz belli değildir (Yeh et al. 1996).

Asetilasyon; yapılan çalışmalarda S-HDAG ve L-HDAG'nin asetilasyona uğradığı gösterilmiştir. Çoğunlukla lizin-72 pozisyonundan hücrel asetil transferaz p300 tarafından asetilasyon gerçekleştirilir. Asetilasyon HDAG'nin nükleer transportu için gereklidir (Mu et al. 2004).

Metilasyon; HDAG'nin son zamanlarda keşfedilen bir diğer modifikasyonu ise metilasyonudur. Hem arjinin hem de lizin metilasyonu belirlenmiştir. Arjinin metilasyonu N-terminal RNA bağlanma dizisi içindeki arjinin-13 pozisyonundan gerçekleşir. Bu modifikasyon, HDV RNA replikasyonunda özellikle antijenomik iplikten genomik ipliğin oluşturulmasında gereklidir (Li et al. 2004).

Prenilasyon; L-HDAG, sistein-211 pozisyonundan prenilasyona uğrar. L-HDAG'nin prenilasyonu önemli fonksiyonel sonuçlar doğurur. Genellikle proteinin prenilasyonunun membranla ilişkisini kolaylaştırdığı düşünülmektedir, bu da virion asamblesini kolaylaştırabilir. HDV partikül asamblesinde önemli bir basamak olan L-HDAG ve HbsAg'nin doğrudan etkileşimine L-HDAG'nin prenilasyonunun olanak sağladığı gösterilmiştir (Hwang and Lai 1993, De Bruin et al. 1994). Ayrıca prenilasyon, L-HDAG'nin HDV RNA replikasyonu üzerindeki inhibitör aktivitesini artırır (Hwang and Lai 1994).

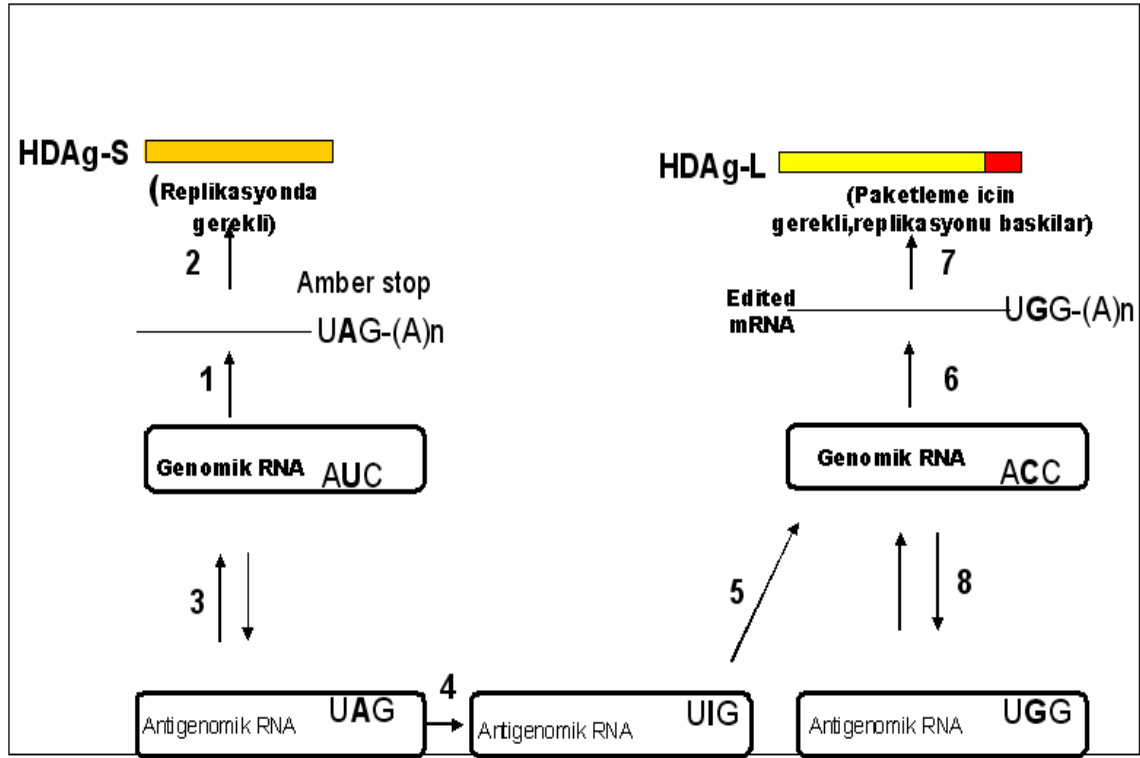


Şekil 1. 4 Delta antijeni (HDAg) fonksiyonel bölgeleri ve HDAg üzerindeki post-translasyonel modifikasyonlar. RBD : RNA bağlanma bölgesi, CCS : ‘coiled coil’ dizisi, NLS :Nükleer lokalizasyon sinyali ve VAS: virüs asamble sinyalini içerir. P: fosforilasyon ; M: metilasyon ; A: asetilasyon ; P: prenilasyon.

1. 3. 4. 2 RNA ‘editing’

HDV genom replikasyonunun başlaması için S-HDAg gereklidir (Chao et al. 1990). Nükleusta HDV genom replikasyonu sırasında RNA üzerinde etkin adenozin deaminaz (ADAR) olarak bilinen bir enzim sınıfı tarafından post-transkripsiyonel olarak düzenlenir (Wong and Lazinski 2002). Bu enzim adenozinin inozine çevirir. Bu değişiklik, S-HDAg için amber stop kodunu olan UAG dizisinin ortasındaki adenozinde gerçekleşir. Böylece oluşturulan yeni kodon UGG, triptofan olarak ifade bulur ve S-HDAg’den 19 aminoasit daha uzun olan L-HDAg üretilir.

S-HDAg’nin tersine L-HDAg, genom replikasyonunda görev almaz ve aslında belli koşullarda dominant negatif inhibitör gibi davranabilir (Chao et al. 1990). Bunun yanında delta antijeninin büyük formu HDV yaşam döngüsü içerisinde oldukça önemlidir çünkü HBV yüzey proteinlerinin kullanılarak yeni virion partiküllerinin oluşturulması için gereklidir (Chang et al. 1991).



Şekil 1. 5 HDV replikasyon döngüsünde RNA 'editing' olayı. 1. S-HDAg'yi kodlayan mRNA'nın sentezi. 2. RNA replikasyonu için gerekli S-HDAg'nin translasyonu. 3. Antigenomik ve genomik RNA'nın replikasyonu. 4. Replikasyon sırasında bazı antigenomik RNA'ların amber stop kodunu, konakçı ADAR1 enzimi tarafından değiştirilir. 5. 'RNA editing' olayının gerçekleştiği bölgede I (inozin) içeren antigenomik RNA, inozine komplementer bölgesinde C (sitozin) içerecek olan genomik RNA sentezi için kalıp görevi görür. 6. Böylece 19 baz daha büyük olan L-HDAg'yi kodlayan mRNA sentezi yapılır. 7. RNA replikasyonunu inhibe eden ve virion oluşumu için gerekli L-HDAg'nin translasyonu yapılır. 8. L-HDAg'yi kodlayan genomik ve antigenomik RNA replikasyonu devam eder (Casey 2006).

1. 3. 5 HDV replikasyon çalışmaları için kullanılan *in vivo* ve *in vitro* sistemler

HDV replikasyonu için orjinal deneysel çalışmalara şempanzede HDV enfeksiyonu oluşturulmasıyla başlamıştır (Rizzetto et al. 1980a). Hemen sonar ise eğer woodchuck'lar HBV'ye oldukça benzeyen woodchuck HBV ile enfekte edilirlse HDV'nin de bu hayvanlarda replike olabileceği anlaşılmıştır (Ponzetto et al. 1984). Ayrıca virüsün enjeksiyonuyla bir farenin bazı hepatosit hücrelerinin enfekte edilebileceği gösterilmiştir (Netter et al. 1993).

Yapılan çalışmalarda primat ya da woodchuck kökenli primer hepatosit kültürlerinde enfeksiyon oluşturulabildiği gösterilmiştir (Taylor et al. 1987, Sureau et al. 1991).

Fakat bu tip primer hücre kültürleri oldukça pahalı ve kurulması zor sistemlerdir. Bu bakımdan birçok laboratuvar daha kullanışlı sistemler geliştirmeye yönelmişlerdir.

En çok kullanılan ve HDV replikasyonu ile ilgili şimdiye kadar pek çok bilgi elde edilen sistem yabancı bir promotor altında HDV genomunun ikili ya da üçlü tekrarlarını içeren plazmid DNA'nın transfeksiyonudur. Bu sistem ile virüsün hücreye tutunma ve giriş basamakları ortadan kaldırılmış olmaktadır. HDV genomik ve antigenomik RNA'nın ve HDAg'nin saptanmasıyla plazmid üzerinden transkribe edilen HDV RNA'nın hücrelerde çoğalabildiği gösterilmiştir (Kuo et al. 1989, Macnaughton et al. 1993). Fakat bu sistemde DNA kalıbından HDV genom transkripsiyonu yapıldığı için doğal HDV replikasyonunu tam olarak yansıtmayabilir (Modahl and Lai 2000a).

Virüs replikasyonunu çalışmak için başka bir strateji ise HDV RNA'nın *in vitro* transkribe edilip hücrelere transfekte edilmesidir. Fakat bu şekilde replikasyonun gerçekleşmesi için HDV RNA delta antijeni ile birlikte ya da delta antijenini kodlayan mRNA ile birlikte transfekte edilmeli veya alıcı hücrede daha önceden delta antijeni eksprese ediliyor olmalıdır (Glenn et al. 1990, Bichko et al. 1994a, Modahl and Lai 1998).

Ayrıca rekombinant HDV dizileri kullanarak da hayvanları enfekte etmek mümkündür. Bunun için ilk örnek HDV cDNA'nın, HBV ile enfekte şempanzenin karaciğerine transfeksiyonudur (Sureau et al. 1989), daha sonra bu yöntem wooshuck da da tekrarlanmıştır (Rapicetta et al. 1993).

Çizelge 1. 1'de HDV replikasyonunu çalışmak için kullanılan deneysel sistemler özetlenmiştir.

Çizelge 1. 1 HDV genom replikasyonunu çalışmak için kullanılan deneysel sistemler (Taylor 2006b).

Genom replikasyonunu başlatmak için kullanılan yöntem	Türler\ doku ya da hücre\ hücre hattı	Kaynak
Virüs ile infeksiyon	İnsan\karaciğer Şempanze\karaciğer Woodchuck\ karaciğer Fare\karaciğer Şempanze- hepatosit kültürü Woodchuck-hepatosit kültürü	Rizzetto et al. 1977 Chen ve et al. 1986 Ponzetto et al. 1984 Netter et al. 1993 Sureau et al. 1991 Taylor et al. 1987
Virüs transfeksiyonu DNA Transfeksiyonu	Şempanze karaciğeri Woodchuck karaciğeri Fare karaciğeri Fare iskelet kası Çeşitli hücre kültürü hatları	Bichko et al. 1994a Sureau et al. 1989 Rapicetta et al. 1993 Chang et al. 2001 Polo et al. 1995 Kuo et al. 1989
RNA transfeksiyonu	Fare karaciğeri Çeşitli hücre kültürü hatları	Chang et al. 2001 Modahl and Lai 1998

1. 3. 6 HDV Genom Replikasyonu

HDV RNA replikasyonunun olduğu hücrelerde hem genomik HDV RNA hem de antigenomik HDV RNA saptanmıştır. Her iki RNA ipliği de çoğunlukla monomer halinde bulunurken bunların ikili ya da üçlü formları da saptanmıştır. Bu tip RNA'ların saptanması viroidlerdekine benzetilerek HDV RNA replikasyonunun, 'rolling circle' mekanizması aracılığıyla olduğu fikri ortaya çıkmıştır (Branch and Robertson 1984). Daha sonra yapılan HDV RNA araçlarının metabolik etiketlenmesi gibi çalışmalarla ikili ya da daha yüksek sayıdaki oligomer tiplerinin monomerlerin öncüsü olduğu kanıtlanmıştır (Macnaughton et al. 2002a). Bu RNA ürünlerinin kesimlenmesi ise RNA moleküllerinin yapısında bulunan ribozimler ile olur (Jeng et al. 1996). Ribozim kesim bölgelerine yönelik yapılan mutagenез çalışmaları hem genomik hem de antigenomik ribozim aktivitelerinin HDV RNA replikasyonu için gerekli olduğu sonucunu ortaya çıkarmıştır (Macnaughton et al. 1993). Bu bakımdan HDV RNA replikasyonu, genomik ve antigenomik ipliklerin ikisinde yer aldığı çift 'rolling circle' mekanizması aracılığıyla oluyor gözükmektedir. Bu

modele göre RNA replikasyonunun bir kere başlatıldığında teorik olarak tekrar başlatılmaya ihtiyaç duymadan uzamaya devam etmesi gerekir (Lai 2005). RNA monomerleri çembersel ve lineer formda bulunurlar. Çembersel form fonksiyonel RNA kalıbıdır, fakat lineer formda replikasyonda kullanılabilir (Gudima et al. 2004).

HDV RNA'nın replikasyona uğradığı hücrelerde genomik RNA, antijenomik RNA'dan çok daha fazla bulunmuştur (Chen et al. 1986). Bu da genomik RNA'nın antijenomik RNA'dan daha fazla sentezlendiğini göstermektedir. Bu iki RNA ipliğinin farklı sentezlenmelerine imkan veren düzenleyici mekanizmaların olması gerekmektedir. Her iki RNA ipliğinin de benzer RNA araçlarından oluşması ve benzer oranlarda çembersel ve lineer formda bulunmaları aynı 'rolling circle' mekanizması ile oluşturulduklarını göstermektedir. Fakat iki ipliğin sentezleri sırasındaki metabolik gereksinimleri birbirinden farklıdır (Lai 2005).

Genomik RNA sentezi (antijenomik kalıptan) bir toksin olan α -amanitinin düşük konsantrasyonlarına duyarlı iken antijenomik RNA sentezi (genomik kalıptan) bu ilacın çok yüksek konsantrasyonlarına bile dirençlidir. Ayrıca 0,8 kb'lik mRNA da α -amanitinine duyarlıdır (Modahl et al. 2000c, Macnoughton and Lai 2002b). Genomik RNA sentezi, fosforilasyon ve metilasyona uğramış modifiye S-HDAg'ye ihtiyaç duyarken antijenomik RNA sentezine metilasyona uğramamış S-HDAg aracılık edebilir (Sheu and Lai 2000, Mu et al. 2001, Li et al. 2004). Bununla ilgili olarak *Esherichia coli*'den elde edilen çoğunlukla modifikasyona uğramamış rekombinant S-HDAg, antijenomik RNA sentezine aracılık edebilir (Sheu and Lai 2000). Genomik RNA sentezi, replikasyonun sonuna doğru oluşturulan L-HDAg tarafından baskılanırken antijenomik RNA sentezi bundan etkilenmez (Modahl and Lai 2000b). Ayrıca genomik RNA sentezlendikten sonra sitoplazmaya gönderilirken antijenomik RNA gönderilmez (Macnoughton and Lai 2002b). Böylece bu iki RNA ipliğinin farklı taşıma kapasitelerine sahip transkripsiyon sistemleri ile ilişkili olduğu fikri ortaya çıkmaktadır, her iki iplik sentezi aynı anda fakat ayrı olarak yapılıyor gibi gözükmemektedir (Lai 2005).

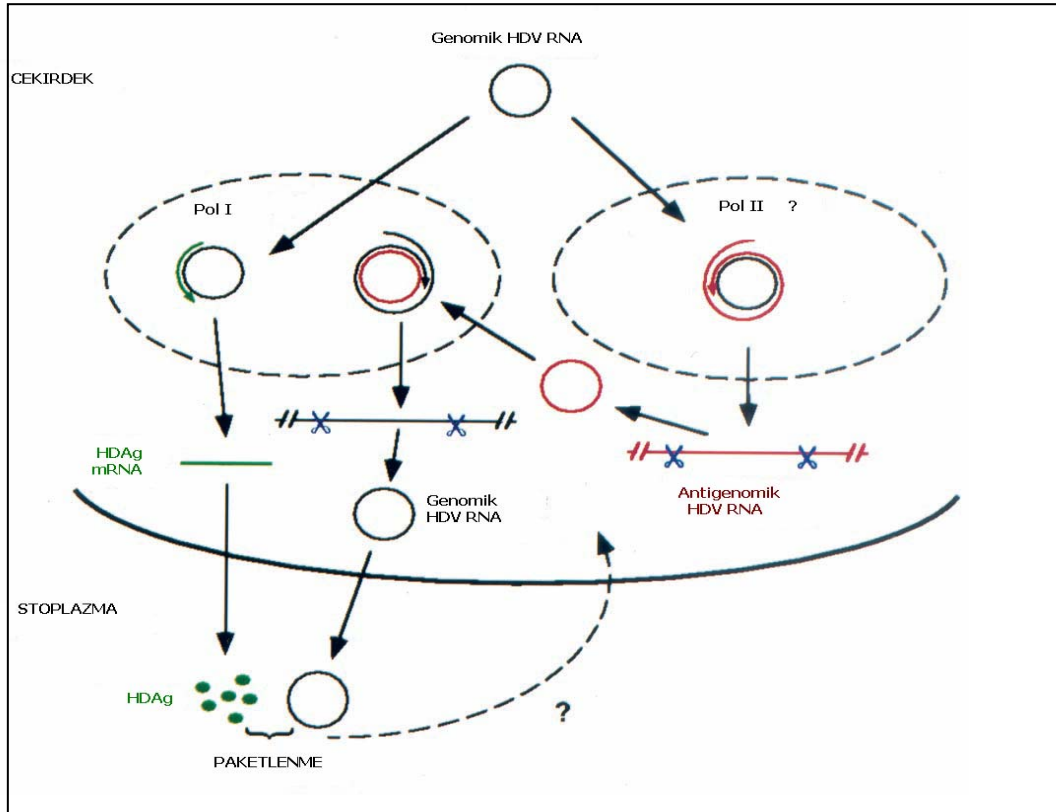
HDV, delta proteinlerinden başka bir protein kodlamadığından viroidlerle benzer olarak HDV RNA replikasyonu için konakçı polimeraz aktivitesine ihtiyaç duyar. Yapılan pek çok çalışma, normalde DNA'dan RNA sentezleyebilen bir RNA polimeraz olan RNA

polimeraz II'nin HDV RNA replikasyonunu yürüttüğü fikrini desteklemektedir (Macnaughton et al. 1991, Modahl et al. 2000c).

Polimeraz II'nin genomik RNA ve mRNA'nın transkripsiyonunda yer aldığı varsayılırken bazı çalışmalarda RNA polimeraz I gibi α -amanitinine yüksek konsantrasyonlarına dirençli başka bir polimerazın da antigenomik RNA transkripsiyonunda yer aldığı fikrini ortaya çıkarmıştır (Lai 2005). Bu da 'rolling circle' replikasyon modelinin HDV RNA replikasyonunda oldukça karmaşık olduğunu düşündürmektedir (Taylor 2006b).

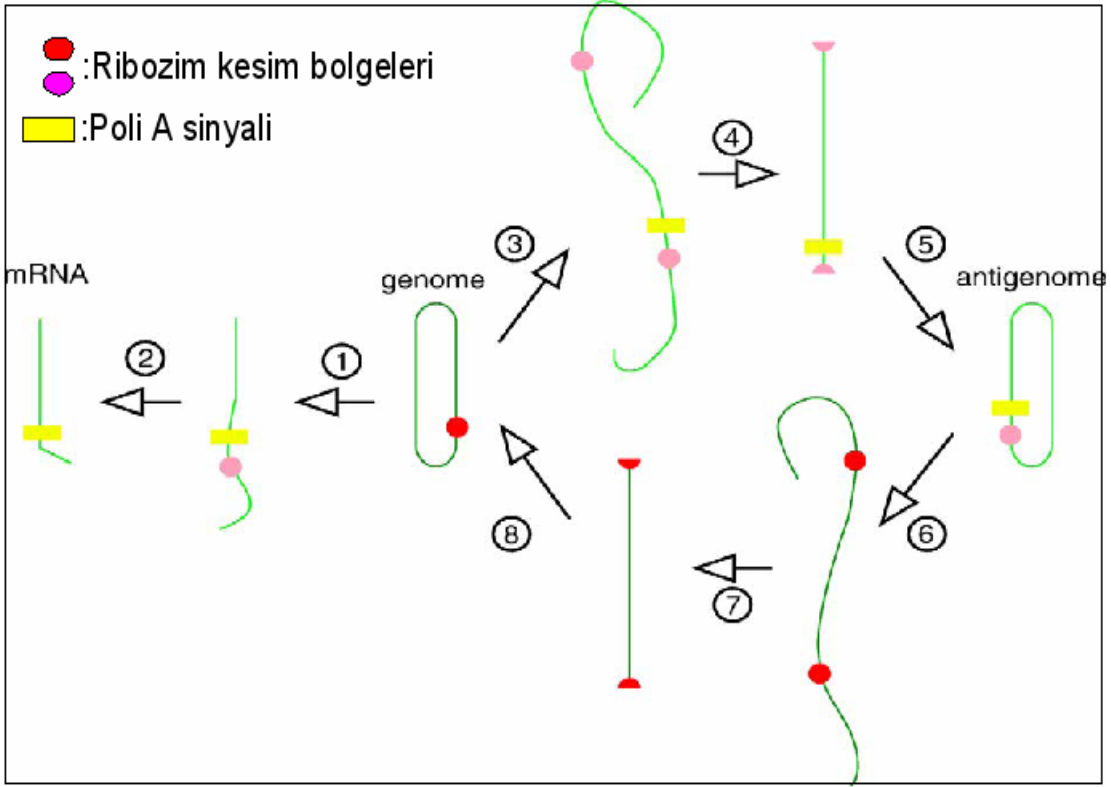
S-HDAg, HDV RNA replikasyonu için çok önemlidir. S-HDAg bütün replikasyon döngüsü boyunca gereklidir. Bunun için S-HDAg'nin, HDV RNA'nın RNA replikasyonunun olduğu bölgeye transfer edilmesi görevinin yanında RNA sentez sisteminin de bir bileşeni olduğu fikri oluşmuştur. HDAg üzerindeki bilinen bütün fonksiyonel bölgeler replikasyon için önemlidir. HDAg üzerindeki farklı modifikasyonlar, genomik ya da antigenomik RNA sentezini farklı şekilde etkiler (Lai 2005).

HDV replikasyonu için şimdiye kadar yalnızca iki replikasyon şeması yayınlanmıştır. Bu modellerden Macnaughton (2002a)'un önerdiği modelde mRNA ve genomik RNA sentezi polimeraz II tarafından yapılırken antigenomik RNA'nın başka bir polimeraz tarafından yapıldığı öngörülmektedir. Yine bu modele göre sentezlenen ve birim uzunlukta işlenen genomik RNA sitoplazmaya gönderilirken antigenomik RNA gönderilmez, böylece neden tercihen genomik RNA'ların partikül içerisine paketlenmesi açıklanmaktadır (Şekil 1. 6).



Şekil 1. 6 Macnoughan et al. (2002a) tarafından önerilen replikasyon modeli. Virüs konakçı hücreye tutunduktan sonra, viral genom HDAg aracılığı ile çekirdeğe geçer. Çekirdekte 'rolling circle' replikasyon modeli ile antigenomik RNA sentezlenir. Sentezlenen antigenomik RNA daha sonra delta antijeni aracılığıyla bir nükleoplazmik organelle gönderilir ve genomik RNA sentezi yapılır. Bu arada mRNA'nın transkripsiyonu yapılır ve delta antijenini oluşturmak amacıyla sitoplazmaya gönderilir. Yeni sentezlenen delta antijenleri sitoplazmada modifiye edilir. Genomik RNA'lar delta antijenleriyle birleşir ve HBV yüzey proteinleri de üzerine eklenir, bu da yeni virion partiküllerinin oluşmasına öncülük eder (Macnoughan et al. 2002a).

Taylor (2006a) tarafından önerilen modelde ise polimeraz gerekliliği ya da nükleer-sitoplazmik dağılımlar hesaba katılmadan yalnızca transkripsiyon ve RNA işlenmesine odaklanılmıştır (Şekil 1.7).



Şekil 1. 7 Taylor (2006a) tarafından önerilen genom replikasyon ve işlenmesi modeli. (1) Genomik RNA antigenomik RNA'nın sentezi için kalıp görevi yapar. (2) Yeni oluşturulan bu RNA, mRNA ile aynı 5' ucuna sahiptir, daha sonra bu transkript üzerinde 5' kapak ve 3' poli A işlenmesi yapılır. (3) Genomik RNA, diğer antigenomik RNA transkriptleri için kalıp olur. (4) Bu RNA'lar ikinci basamağa alternatif şekilde işlenirler; ribozim kesimine uğrarlar ve birim uzunluktaki lineer antigenomlar oluşturulur. (5) Antigenomik RNA'lar yeni antigenomik RNA oluşturmak için ligasyona uğrayıp çembersel hale gelirler ve çomak benzeri yapıyı oluşturmak için katlanırlar. (6-8) 4-6.basamaklardaki gibi yeni antigenomik RNA'lar, yeni genomik RNA'ların transkripsiyonunda kalıp görevi görürler (Taylor 2006a).

1. 3. 7 Virion oluşumu

Hepatositlerdeki HDV ve HBV'nin doğal koenfeksiyonunda, HBV yüzey proteinleri HDV genomik RNA'nın partiküller içerisine paketlenmesini kolaylaştırır. RNA asamblesi, HDV RNA ve HBV yüzey proteinleriyle etkileşebilen L-HDAg tarafından sağlanır. L-HDAg'nin bu fonksiyonu için farnesilasyon modifikasyonu gereklidir (Taylor 2006b).

1. 3. 8 HDV Patogenezi

HDV patogenezi oldukça karmaşıktır. Hastalık akut fazda iken HDAg ya da HDV RNA hepatositler için sitotoksik olabilmektedir (Gowans and Bonino 1993, Bichko et al. 1994b). S-HDAg'nin hücrede yüksek miktarlarda üretilmesinin doğrudan hücre için sitotoksik olabileceği gözlenmiştir (Macnaughton et al. 1990, Cole et al. 1991).

HDV genom replikasyonu da hücre gelişimi üzerinde inhibe edici bir etkiye sebep olabilmektedir (Bichko et al. 1994b). Hastalık kronik fazda iken çeşitli inflamasyon hücrelerinin enfekte hepatositlerin etrafını kuşattığı ve kronik HDV hastalarının serumlarında da çeşitli otoantikörlerin ortaya çıktığı saptanmıştır (Negro et al. 1988). Buradan hareketle immün cevabın HDV patogenezinde rol aldığı fikri ortaya çıkarılabilir (Lai 1995).

1. 3. 9 HDV enfeksiyon tanısı

HDV, küçük defektif bir virüstür ve yardımcı virüsü HBV tarafından sağlanan HBV yüzey antijenini (HbsAg) içeren kılıfı, HDV'nin başarılı bir şekilde paketlenmesi ve transmisyonu için gereklidir (Rizzetto et al. 1980b, Wu et al. 1991).

İki tip HDV enfeksiyonu vardır: Koenfeksiyonda hasta HDV ile HBV'yi eş zamanlı olarak almıştır. HBV kanda geçici bir süre bulunur ve HDV'de buna eşlik eder. Bu sebeple koenfeksiyon nadiren kronikleşebilir (Wu et al. 1991).

Süperenfeksiyonda ise daha önceden hastada varolan HBV enfeksiyonuna HDV enfeksiyonu da eklenir. HDV süperenfeksiyonunda hastaların büyük çoğunluğunda kronik hepatite gidiş vardır. Sürekli HDV replikasyonu, hastalıkta akut alevlenmelerle ilişkilidir ve artan ALT düzeyleri kronik aktif hepatit D için karakteristiktir (Wu et al. 1995a).

HDV enfeksiyonunun kesin tanısı için birtakım basamaklara ihtiyaç vardır. İlk basamak HBV'yi HDV enfeksiyonundan ayırmaktır. Ayırıcı tanı, hastalığın anlaşılması ve uygun şekilde idaresinde önemlidir. Bunun sebebi ise HDV enfeksiyonu fulminant hepatitin önemli sebeplerinden biridir ve kronik HBV'nin siroza ilerlemesinde de ağırlaştırıcı bir faktördür (Hadler et al. 1984, Govindarajan et al. 1986, Wu et al. 1994).

HDV enfeksiyonunun kesin tanısı için ikinci basamak ise HDV koenfeksiyonu ile süperenfeksiyonunu birbirinden ayırmaktır. Bunun sebebi ise HDV koenfeksiyonunun nadiren kronikleşmesi diğerinin ise çoğunlukla kronik hale geçmesidir. Üçüncü basamak ise akut ve kronik HDV'yi birbirinden ayırabilmektir (Wu 2006).

HDV enfeksiyon tanısı, HDV bileşenlerini (HDAg veya HDV RNA) ya da HDAg'ye karşı oluşan antikorları saptamaya yöneliktir.

Çizelge 1. 2 HDV enfeksiyonu tanısında serolojik ve histolojik belirteçler (Wu 2006)..

BELİRTEÇ	YÖNTEM	ÖZELLİK
SERUM		
Total anti-HDV	Immunoassay	Koenfeksiyon ve superenfeksiyonda pozitif Aktif enfeksiyonda titresi yüksek
IgM anti HDV	Immunoassay	Akut ve kronik enfeksiyonda pozitif Aktif enfeksiyonda titresi yüksek
HDV RNA	Northern Blot	Aktif HDV replikasyonunu bildirir
	RT-PZR	En duyarlı test 10-100 kopya
HDAg	Immunoassay	Kronik enfeksiyonda immün kompleks ile maskelenir
	Western Blot	Aktif HDV replikasyonunu bildirir, araştırma amaçlı kullanılır
HBsAg	Immunoassay	Genellikle pozitif
IgM anti-HBc	Immunoassay	Koinfeksiyonda pozitif
KARACİĞER		
HDV RNA	Northern Blot	Aktif replikasyonu bildirir, araştırma amaçlı kullanılır
HDAg	Western Blot	Aktif replikasyonu bildirir, araştırma amaçlı kullanılır
	Immuno-staining	Aktif replikasyonu bildirir, klasik standarttır

1. 3. 9. 1 HDAg antikorlarına (anti-HDV) yönelik serolojik tanı

HDV enfeksiyonunu taramak için ticari olarak mevcut çeşitli serum anti-HDV immunolojik testleri bulunmaktadır. Akut HDV enfeksiyonu, anti-HDV'nin serokonversiyonu ya da titresinin yükselmesi ile karakterizedir (Argona et al. 1987, Huang et al. 1998). HDV enfeksiyonunda iki ay içerisinde hastaların % 90'ından fazlasında serum anti-HDV pozitifleşir. Bu bakımdan HDV'nin hastalardaki akut hepatit tablosunda rolünün bulunup bulunmadığını anlamak için aralıklarla anti-HDV'nin takip edilmesi gereklidir.

Koenfeksiyon ve süperenfeksiyonu da birbirinden ayırmak önemlidir. Koenfeksiyon, anti-HBc IgM ve anti-HDV IgM'in yüksek titrelerde ortaya çıkması ile karakterizedir. Anti-HDV enfeksiyondan bir hafta sonra ortaya çıkar ve IgM anti-HDV çoğunlukla altı hafta içerisinde kaybolur. IgM anti-HDV'nin bulunmaya devam etmesi enfeksiyonun

kronikleşmeye doğru gittigini gösterirken bu antikorun kaybolması ise sıklıkla enfeksiyonun iyileştiğini gösterir. HDV süperenfeksiyon olgularında ise IgM anti-HBc serumda sıklıkla negatiftir ya da çok düşük titrededir. Akut hepatit B enfeksiyonundaki IgM anti-HBc ile zıt olarak kronik hepatit D’de IgM anti-HDV sıklıkla yüksek titrededir ve hastalık aktivitesiyle ilişkilidir (Wu 2006)

1. 3. 9. 2 HDAg ve HDV RNA’ya yönelik moleküler tanı

Enzim immuassay ya da Western Blot gibi yöntemlerle serumda HDAg’nin belirlenmesi, aktif HDV replikasyonunun olduğunu gösterir (Jardi et al. 1994). Fakat enfeksiyondan yaklaşık iki hafta sonra HDAg, muhtemelen serumdaki anti-HDV ile immünkompleks oluşturmasından dolayı immunoassay ile saptanamaz. Akut HDV enfeksiyonu olan hastalarda HDAg’nin immunoassay ile saptanma oranı % 26-100 arasında değişir, bunun sebebi olarak ise örneğin alındığı zaman aralığı ve deneylerin duyarlılığının farklı olması gösterilmektedir (Shattock and Morgan 1984, Govindarajan et al. 1996). Bu testler akut enfeksiyonda yararlı olurken yukarıdaki sebeplerden dolayı kullanımı sınırlıdır.

Akut veya kronik HDV enfeksiyonunda immunoblot yöntemi ile hasta serumunda HDAg saptanabilir ve bu yöntem enzim immunoassay’den daha duyarlıdır. HDAg’nin Western Blot ile analizinde viral proteinler izole edilir ve poliakrilamid jel elektroforezi yapılır, ardından nitroselüloz membrana aktarılır. Nitroselüloz membranda HDAg, anti-HDV primer-antikor ile reaksiyon verebilir, daha sonra immuno-peroksidaz ya da kemilüminesans bir ajan ile işaretli sekonder bir antikor bu yapıya bağlanır ve HDAg renk değişimi veya ışımaya ile membranda belirlenebilir. Bu yöntem kullanılarak kronik hepatit D hastalarının % 70’inde HDAg’nin saptanabildiği bildirilmiştir (Jardi et al. 1994). Fakat bu yöntemin rutin olarak klinik amaçlı kullanımı oldukça zordur ve RT-PZR ya da riboprobolar kullanılarak yapılan Northern blot hibridizasyon tekniklerine göre daha az duyarlıdır (Smedile et al. 1990).

Serumda HDV RNA ise, nokta blot hibridizasyonu, Northern blot hibridizasyonu ya da RT-PZR yöntemleriyle saptanabilir. Northern blot hibridizasyonda viral RNA izolasyonu yapıldıktan sonra agaroz jelde analiz edilir ve nitroselüloz membrana transfer edilir. Daha sonra ise cDNA ya da riboprobolarla hibridize edilir ve oluşan sinyal analiz edilir (Wu 2006).

Ters-transkripsiyon-PZR'nin ise HDV RNA'nin saptanmasında en duyarlı yöntem olduğu bildirilmiştir. Buna göre PZR'nin, Northern blot hibridizasyon yöntemine göre 10000 kat daha duyarlı bir yöntem olduğu rapor edilmiştir (Cariani et al. 1992, Jardi et al. 1994, Jardi et al. 1995, Wu et al. 1995a).

Son yıllarda çeşitli kronik viral enfeksiyonlar ile mücadele, kantitatif moleküler uygulamalara gittikçe daha bağımlı hale gelmiştir. Bu bakımdan 'real time' PZR sistemi amplifikasyon ürünlerinin miktarlarının belirlenmesinde çok daha yeni, hızlı ve iyi bir sistemdir ve yüksek duyarlılık ve kesinlikte sonuçlar alınabilmektedir. HDV'nin enfeksiyon şiddeti ve tedavisi sonucundaki belirsizlikler, tedavi verimliliğini gözlemlemek üzere HDV-RNA'yı kantitatif olarak saptayabilecek güvenilir testlerin geliştirilmesinde etkin faktörler olmuştur. HDV RNA'nın saptanması için ise ticari bir kit henüz mevcut değildir. Biz de çalışmamızda farklı 'real time' PZR cihazları, farklı primer-prob sistemleri ve farklı ticari kitler deneyerek HDV-RNA'yı kantitatif olarak saptamaya yönelik en uygun, yüksek kesinlik ve duyarlılıkta 'real time' PZR koşullarını belirlemeyi amaçladık.

2. KAYNAK ÖZETLERİ

'Real time' PZR sistemi ile amplifikasyon ürünlerinin miktarlarının belirlenmesinde yüksek duyarlılık ve kesinlikte sonuçlar alınabilir. Şimdiye kadar yapılan HDV RNA'yı saptamaya yönelik 'real time' PZR sisteminin kullanıldığı sınırlı sayıdaki çalışmalardan Yamashiro ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada Light Cycler (Roche Applied Science) sisteminde diziye özgü olmayan saptama yöntemlerinden SYBR Green I boyası kullanılarak HDV-RNA düzeyi kantitatif olarak belirlenmiştir. Standart olarak kullanılacak RNA'yı sentezlemek için HDAg'yi kodlayan bölgeyi hedef alan primerlerle kısmi HDV genomu çoğaltılmış ve PCR ürünü PGEM-T vektörü içine sokulmuştur. T7 RNA polimeraz enzimi kullanılarak sentetik RNA *in vitro* olarak sentezlenmiştir. Ardından saflaştırılan RNA'nın 260 nm dalga boyundaki optik yoğunluğu ölçülerek miktarı hesaplanmıştır. Bu sentetik HDV-RNA'nın 10 kat seri seyreltme oranındaki örnekleri ($1-10^6$ kopya) kullanılarak standart doğru oluşturulmuş ve HDV RNA kantitasyonu yapılmıştır. Ayrıca bu çalışmada viral yük ile karaciğer hastalığının klinik durumu arasında muhtemel bir korelasyon olduğu fikri de önerilmiştir (Yamashiro et al. 2004).

Başka bir çalışmada ise ABI PRISM 7000 (Applied Biosystems) sisteminde bütün HDV genotiplerini saptayabilecek şekilde tasarlanmış, HDV genomu üzerindeki en korunmuş bölgelerden olan ribozim bölgesini hedef alan Taqman oligoprobu kullanılarak serumda HDV RNA düzeyi saptanmıştır. HDV cDNA kantitasyonu için standart olarak ise HDV genomunun R'1 bölgesini içeren (305'den 1161. nükleotide kadar olan bölge) PCRII-Dfr45-R'1 plazmidini kullanılmıştır. Plazmidin EcoRI ile kesimini takiben R'1 bölgesi agaroz jelden saflaştırılmış ve saflaştırılan R'1 DNA konsantrasyonu çok kanallı spektrofotometre ile belirlenerek ilgili kopya sayısı hesaplanmış, seri seyreltme oranındaki örnekleri ise standart bir doğru oluşturmak üzere kullanılmıştır (Le Gal et al. 2005).

Ayrıca bu iki çalışmada da HDV RNA, ters transkriptaz enzimi ile daha önce ayrı bir tüpte DNA'ya çevrilmiş, ardından 'real time' PZR temelli yöntemlerle HDV RNA kantitatif olarak değerlendirilmiştir.

3. MATERYAL ve YÖNTEM

3. 1 Materyal

3. 1. 1 Hastalar

Çalışmamıza Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Kliniği'ne değişik zamanlarda başvuran, laboratuvarımızda yapılan konvansiyonel PZR testleri ile HDV RNA'sının pozitif olduğu belirlenen 40 hasta ve bir yıl süreyle interferon ya da PEG-interferon tedavisi almış 22 HDV hastası alınmıştır. Hastalardan alınan kan örnekleri, santrüfuj edildikten sonra plazma kısmı ayrılmış ve -80 °C'de saklanmıştır.

3. 1. 2 Kimyasal maddeler

Agaroz	Sigma, Almanya
Borik asit	Merck, Almanya
Bromofenol mavisi	Sigma, Almanya
EDTA	Quantum, Amerika
Etidyum bromür	Sigma, Almanya
Fikol	Biochrom, Almanya
Glasiyal asetik asit	Sigma, Almanya
Gliserol	Sigma, Almanya
Ksilen siyanol	Sigma, Almanya
LB Broth	Amresco, ABD
Mutlak etanol	Kimetsan, Türkiye
Tris HCl	Sigma, Almanya
Tris base	Sigma, Almanya
pUC19 DNA Marker	MBI Fermentas, Litvanya

3. 1. 3 Tampon ve çözeltiler

Agaroz jel yukleme tamponu (6X)

% 0,05 Bromofenol mavi, % 15 Fikol, % 0,05 Ksilen siyanol.

Tris-borik asit- EDTA Tamponu (TBE) (10X)

0,9 M Tris HCl, 0,9 M Borik asit, 0,01 M EDTA.

TE Tamponu

100 mM Tris HCl, 1 mM EDTA. pH=8'e ayarlanır.

Tris-asetik asit- EDTA Tamponu (TAE) (5X)

0,2 M Tris base, 0,09 M Glasiyal asetik asit, 0,05 M EDTA.

3. 1. 4 Kullanılan Cihazlar

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

Thermal Cycler PZR cihazı (Eppendorf Mastercycler Personal, Almanya),

Light cycler 1.2 Real Time PZR Cihazı (Roche Applied Science, Almanya),

ABI 7300 Real time PZR Cihazı (Applied Biosystems, Fostercity, USA)

Nanodrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, USA),

pH metre (Metler Toledo MP 220 pHmeter, İsvicre),

Hassas terazi (Sartorius, Türkiye),

Su Banyosu (Heto, HWT100, Danimarka),

Jel görüntüleme sistemi (UVP Jel dökümantasyon sistemleri, Olympus 40X kamerası, Japonya)

3. 1. 5 Polimeraz Zincir Reaksiyonunda Kullanılan Malzemeler

Thermus aquaticus (Taq) DNA polimeraz enzimi (MBI Fermentas, Litvanya),

10X PZR Tamponu (750 mM Tris-HCl (25°C'de pH 8.8), 200 mM (NH₄)₂SO₄, % 0,1

Tween 20, 25 mM MgCl₂) (MBI Fermentas, Litvanya),

dNTP (her biri 100 mM olan dATP, dTTP, dGTP, dCTP) (MBI Fermentas, Litvanya),

0,2 ml'lik PZR tüpleri (Greiner Bioone, Avusturya).

Ters transkripsiyon reaksiyonu için kullanılan malzemeler:

AMV (Avian Myeloblastosis Virus) Ters Transkriptaz Enzimi (Roche Applied Science, Almanya)

10X Tampon (200 mM potasyum fosfat, 2 mM dithiothreitol, % 0,2 Triton X-100 (v/v), %50 gliserol (v/v), pH 7.2)

3. 1. 6 Kullanılan Kitleler

Qiamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya)

Topo-XL PCR Cloning Kit (Invitrogen, California, ABD)

Plazmid DNA Purification Kit (Macherey-Nagel, Almanya)

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Fostercity, ABD)

Taqman EZ-RT PCR Kit (Applied Biosystems, Fostercity, ABD),

Light cycler Taqman Master Kit (Roche Applied Science, Almanya),

Light cycler Kapiller (20 µl) (Roche Applied Science, Almanya),

MicroAmp Optik tüp (0,2 ml) ve kapağı (Applied Biosystems, Fostercity, ABD)

3. 2 Yöntem

3. 2. 1 Viral RNA izolasyonu

HDV RNA, 140 µl plazma örneğinden Qiaamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Almanya) kullanılarak üretici firma önerilerine göre izole edildi. Buna göre 560 µl Buffer AVE, 5,6 µl poli A ve 140 µl plazma örneği ependorf tüpe (1,5 ml) eklendi, vorteks yardımıyla çok iyi karıştırıldı ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Ardından bu ependorf tüp üzerine 560 µl mutlak etanol (Kimetsan, Türkiye) eklendi ve vorteks yardımıyla 20 saniye kadar karıştırıldı. Daha sonra bu karışımdan 630 µl alınıp Qiaamp mini spin kolonlarına aktarıldı ve 8000 rpm'de 1 dakika santrüfjü edildi, alttaki sıvı kısım atıldı, ependorf tüpteki karışımın geri kalanı da kolona eklendi ve aynı işlem tekrarlandı. Yıkama işlemi için kolona 500 µl buffer AW1 eklendi, 8000 rpm'de 1 dakika santrüfjünün ardından alttaki sıvı kısım atıldı, kolona 500 µl buffer AW2 eklendi ve 14.000 rpm'de 3 dakika santrüfjü edildi. Alttaki sıvı kısım atıldı ve kolon 14.000 rpm'de 1 dakika da boş olarak santrüfjü edildi. Daha sonra kolonun altına ependorf tüp kondu ve üzerine 60 µl elüsyon buffer eklendi, bir dakika oda sıcaklığında bekletildi. Bir dakika 8000 rpm'de santrüfjü edildi, kolon çıkarıldı ve ependorf tüp içinde elde edilen RNA -80 °C'de saklandı.

3. 2. 2 Kullanılan primer ve problemlerin tasarımı ve dizileri

Çalışmamızda HDV RNA'nın 'real time' PZR ile kantitatif analizi için Mega v3.1 programı kullanılarak laboratuvarımızda daha önce dizi analizinin yapıldığı iki tam genom (ZA ve SO) ve genotip I, II ve III'ü içerecek şekilde Fransa, İtalya, İran, Tayvan, Peru ve Venezuela gibi farklı bölgelere ait izolatların tam genom HDV dizileri karşılaştırıldı, genom üzerinde bütün genotipler için en korunmuş bölgeler belirlendi. Daha sonra bu korunmuş bölgeler hedef alınarak Primer Express v2.0 programı ve Roche Universal Probe Library programı kullanılarak primer ve prob tasarımı yapıldı.

Tasarlanan primer ve problemler, Bioneer (Bioneer Corporation, Kore) ve TIB MOLBIOL (TIB MOLBIOL Syntheselabor, Almanya) tarafından sentezlenmiştir ve primer, prob dizileri ve üzerlerindeki modifikasyonlar Çizelge 3.1'de verilmiştir.

Ayrıca farklı genotiplerin izolatlarına ait tam genom HDV dizileri üzerine, tasarlanan primer ve prob dizileri yerleştirilerek bunların genom üzerindeki dizilimi de gösterilmiştir (Şekil 3. 1).

Çizelge 3.1 Çalışmamız için tasarlanan primer ve prob dizileri.

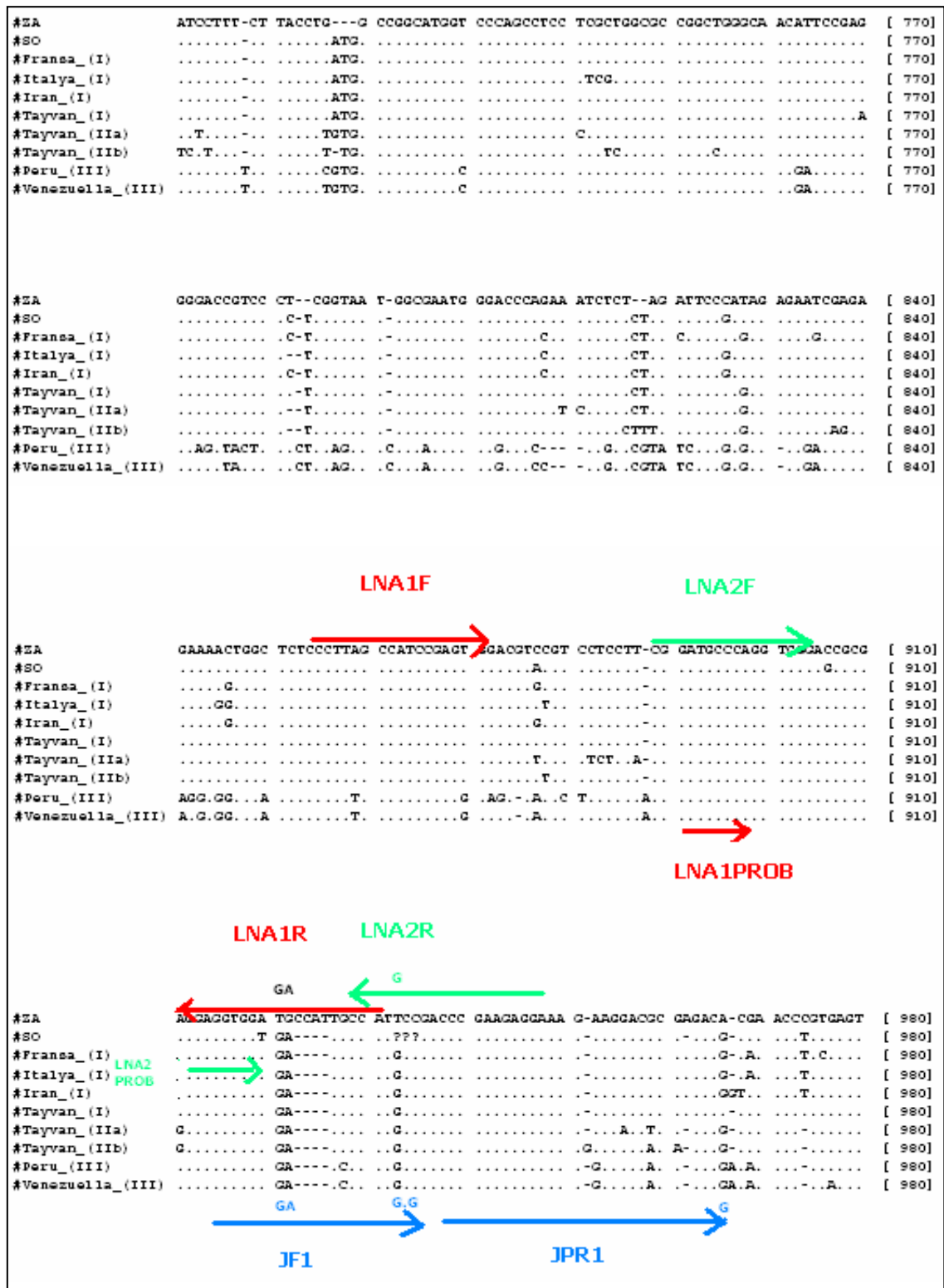
Primer/prob adı	Primer dizisi (5'→3')	Modifikasyon
JF1	GGT GGA GAT GCC ATG CGG	
JR1	CAG TGA ATA AAG CGG GTT TCC A	
JPR1	CCC GAA GAG GAA AGA AGG ACG CGA GAC G	5'FAM,3'TAMRA işaretli
JF2	GCT ACT CTT CTT TCC CTT CT	
JR2	CCG ACA AGG AGA GGC AGG	
JPR2	CTT GTT CTC GAG GGC CTT CCT TCG	5'VIC, 3'TAMRA işaretli
DF1	CTC GTT CCA CCT TCG AGG G	
DR1	CGA GGA AGA CGA GAG AAG GGA	
DPR1	ACC TGC GGG CCG GCT ATT CTT CT	5'FAM,3'TAMRA işaretli
LNA1F	CCC TTA GCC ATC CGA GTG	
LNA1R	TGG CAT CTC CAC CTC CT	
LNA1PROB	gat gcc ca	5'FAM,3'TAMRA işaretli, dizinin tamamı 'locked nucleic acid' denen nükleotid analoglarından oluşur.
LNA2F	CGG ATG CCC AGG TCG	
LNA2R	TCC TCT TCG GGT CGG CAT	
LNA2PROB	gga ggt gg	5'FAM,3'TAMRA işaretli, dizinin tamamı 'locked nucleic acid' denen nükleotid analoglarından oluşur.
320S (305-327)	CCA GAG GAC CCC TTC AGC GAAC	Ivaniushina et al.
1280AS(1285-1261)	GAA GGA AGG CCC TCG AGA ACA AGA	2001.

#ZA	CATGGCCCAT	--CTCCGAAC	GAGGATCG-C	CCCGGGGGCG	AGACAGGACA	CCGAGAGGG-	GATCRATACA	[70]
#SO	...A...A	--T...G...	..A.CGA..-	..G...AA.	GAT...CGA-A	.TG-G..GGC	[70]
#Fransa_(I)	...A...A	G-T...G...	A...TCG.	..G.A..ATA	GAT...CG-A	.TGACTCGGT	[70]
#Italya_(I)	...A...C	G-T...G...	..A..GACC.	..GG...A--	GAT...CG-A	.TGAG.CGGT	[70]
#Iran_(I)A	--T...G...	..A..GTC-	..G...AA.	GAT...TG--	.TAA.G.CGT	[70]
#Tayvan_(I)	--T...G...	..A.CGA..-	..G.C..AA.	GAT...CT--	.TAA..CGGT	[70]
#Tayvan_(IIa)CC	A--G...GG.GGG.CG	AACT...AA	G.CG..AT-GA..-	ATCTCCA..T	[70]
#Tayvan_(IIb)	G.....CC	AGT...CG..G.CCG	CAG.T...A	GAT...CCA-	..GAG...-	ACG.G..GC	[70]
#Peru_(III)CC	T-TC.G.C.A	..G..G..CGA	AATC.A.AGC	G.GCGA..AC	T.CC...A-	TTGGG.G.AC	[70]
#Venezuela_(III)CC	T-AC.G.C.AGG.CGA	AACT.T.AA.	G..G..AC.G	.TCC...A-	TTGGG.G.AC	[70]
#ZA	AAAGACCCCG	GGATCCCTGG	AGAAAGTTC	CCCAAGACGG	AAAAAAGACA	AGCCAGGACA	CCCAAGATT	[140]
#SOATT	...A..C..A	G.GG.T..CTG..-	-G...G....	..CT.....	..G.C..C..	[140]
#Fransa_(I)ATT	...A.....	..T.CAACTAG.....	..G.T..A..	[140]
#Italya_(I)ATT	...A.....	..G.GTT-CTG.G....G	..A.....G	T.G.C..GG.	[140]
#Iran_(I)TATT	...A..C..A	G..G.T..CT	CC.....	..TA.....T	..G...C..	[140]
#Tayvan_(I)ATT	...A.....	..GC..CC.	..T.....AA.....	..G.C..C..	[140]
#Tayvan_(IIa)T..A	...AATCTC.	GA..GCT.CTA..CTGGAC.C	TCT....AG	GAGG.....	[140]
#Tayvan_(IIb)T...T	...AATCTC.	C..GGGAAAT	-GTCC...AG	TCT...CT.	..AGG.GGGA	[140]
#Peru_(III)G.C.	AA.ATCTTC.	GACGG-A.C.CTCC	C..C.GAG..	..AG..C.AG	ATAG..GAGC	[140]
#Venezuela_(III)A.C.	AATCT...C.	GA.GG-AAC.CTTT	C..C.GAG..	..AG.GC.AG	ATAG..GAGC	[140]
#ZA	-CCCTATGAC	GCTGGAGA-C	A-TCTCGAA	GGGAAAGTC	GA-TAGGAGG	AAAAAAAGG	AG-CCGCCCC	[210]
#SO	T...C..A.G..-A..-	..G.AG..	..T.G..G.-	G.CG...T.	[210]	
#Fransa_(I)	T...C..A.	..CA.T..-A	..C..TA...A..	..G-A..T..	..G.C..G.A	G.CG...T.	[210]
#Italya_(I)	...C..A.CC.T....A..	--AG..T..	..G..G.-	G.CG...T.	[210]
#Iran_(I)	...C..A.TC....A..	..C..AT..	..G.C..G.-	G.CG.C... [210]	
#Tayvan_(I)	...C.....T.....A..	..T-A..T..G...	G.T...T. [210]	
#Tayvan_(IIa)	...CCGA..	T-C..G.A.T	TTCAATCAA.	A.CA..TAA	CGG.G...A	..CG...T. [210]	
#Tayvan_(IIb)	C...CGA..	GGC.GG.A.C	AA.....TA.	A.CA..TAC	GGT.G...A	..CGA...T. [210]	
#Peru_(III)	...C.C... [210]	...A.CA.A.	CG..GC.C.C	T...G..GA	..T-G..C..	..G.T.G.A-	-ACG.AGA.. [210]	
#Venezuela_(III)	...CG... [210]	...CA..-	CG..GC.C.C	T...G..GA	..T-G..C..	..G.T.G.A-	-ACG.AGA.. [210]	
#ZA	CCGATCCGAA	AGTCCCGA--	-TTCCCAAGT	TTGGAGGCA	CTCCGGCCCA	AGGGTTCTG	GAGAGTACC	[280]
#SOG	G.G..A..-	-CCA.....G..G	G.T...C.A.	A..C..C..A	[280]	
#Fransa_(I)G	G.G...G-	-CGG.....	...GA..GA	AGT-CC..A [280]	
#Italya_(I)G	G.G..A..-	-CCA.....G..GA	T..C-AC..A [280]	
#Iran_(I)G	-CG.....GA	A.C...A	[280]	
#Tayvan_(I)G	G.G..A..-	-C.A.....GC.A.	[280]	
#Tayvan_(IIa)G	T.GT...CGG	CG.AT.G..TC	A.....A.-GA.	AT..-CC.A. [280]	
#Tayvan_(IIb)A..G	TT.G..AGG	CC.AT....TC	A.....G..C	T.A...A.AA	T...-.... [280]	
#Peru_(III)	...G..... [280]	T.C.AATGGG	CAG.AA.CTC	C.CTG...TCG..G	..A..AGAAA	ACT--C.CG [280]	
#Venezuela_(III)-... [280]	T...AT.GG	CAGAGA..-C	C.CTG...TC	..TA.A..G	C.A..AG.AA	ATT--C.AG [280]	
#ZA	AGGAGGAGA	TCCACTCGA	GAAA-GCAGA	GAAATCACCT	CCAGAGGACT	CCTTCAGCGA	ACAGA-GAGC	[350]
#SO	GA..GA.GA.	G...A....	..T.G...A.CA...	[350]	
#Fransa_(I)	GA..GA.GA.	G...A....	..T.GAA...C	[350]	
#Italya_(I)	GA..G..G.CTGGAA...CA...	[350]	
#Iran_(I)	GA..GA.GA.	CA.....	..TGA...C-G...	[350]	
#Tayvan_(I)	..AGG.AG..	AT.T.A....	..A....	C.....C	[350]	
#Tayvan_(IIa)	G.TCG..T..CA..	..GGTG.AG..	..GGT.....CG..G... [350]	
#Tayvan_(IIb)	C...G..T..CA..	..TGA.G..	A.....CA...A [350]	
#Peru_(III)	C..AG..T.. [350]C....	..TTGAA.G..	C..GC...A.CG....A..C. [350]	
#Venezuela_(III)	CA..G..T.. [350]C....	..TGA..G..	C..GC...A.CA..C. [350]	

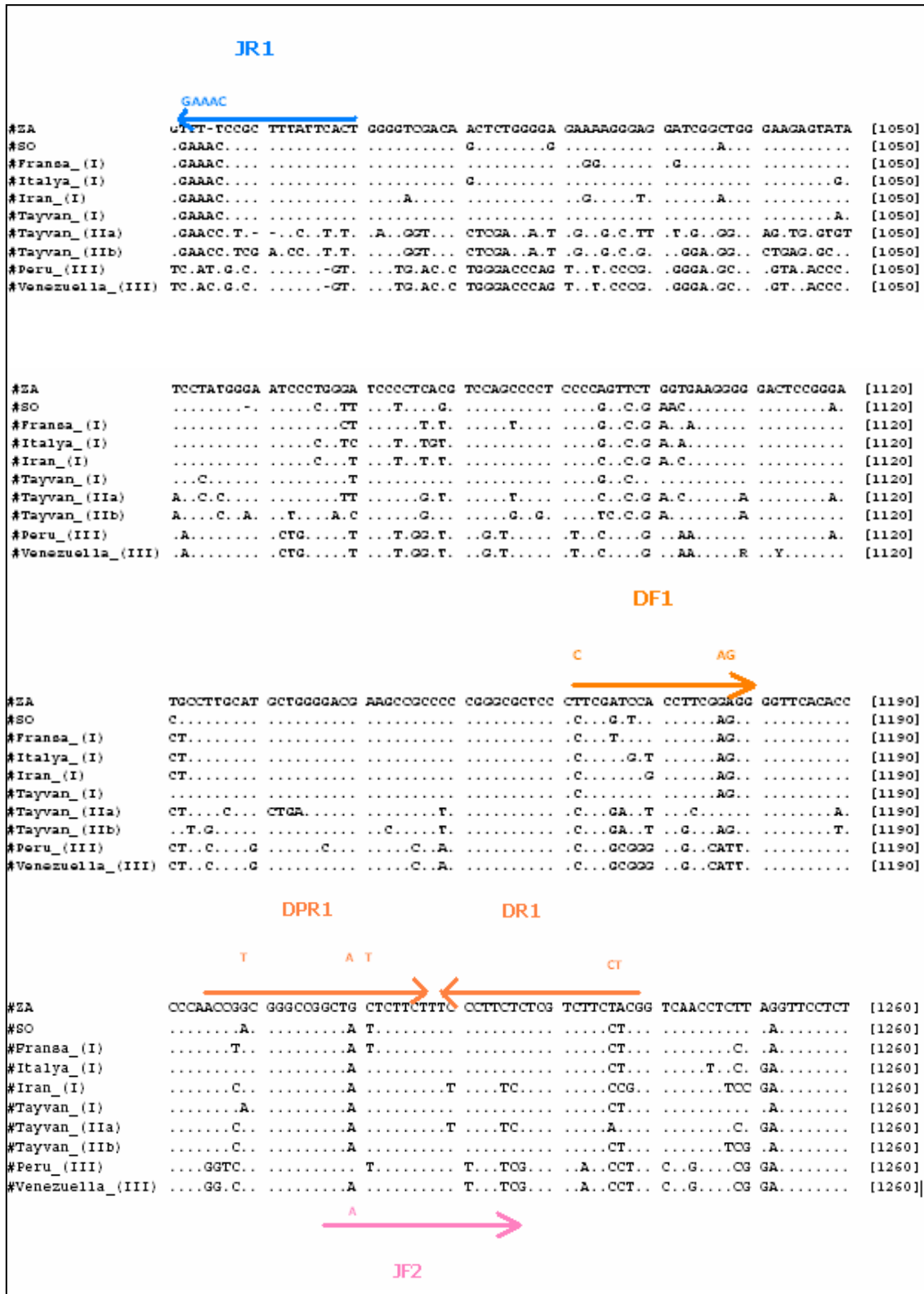
Şekil 3.1 Farklı HDV genotiplerinin karşılaştırılması ve tasarlanan primer, prob dizilerinin HDV genomu üzerindeki dizilimi.

#ZA	-TCTGACACG	CGAGGACTAA	GATCGTAGCG	ATAGCGGCGAG	ATGCTAGGAG	TTAGAGGAGA	CCGAGCGGAG	[420]
#SO	G..A...G..	TC.....	.C.A.....G.....	[420]
#Fransa_(I)	GCA.CG-..	A...GAGT.	.C.A.....A..G.G.C.....	[420]
#Italya_(I)	GCTC.CG-T	GT.....A..	.C.A.....	.G..A..G.AG.GA.....	[420]
#Iran_(I)	GCT.CGAG..	GT.....	.GC.A.....A.....AG.C.....	[420]
#Tayvan_(I)	-C.....G..CC.A.....	.G...A...	[420]
#Tayvan_(IIa)	-CTCCT.CTC	T.GA...A..	.C.A.....	.G.....GG...C..	[420]
#Tayvan_(IIb)	-CTCCC.T..	AT.....C..	.C.A.....	.G.....CG.....	[420]
#Peru_(III)	-CTG.TAC..	G...GAAT.	.CC.A...T-	.C.A.....CG...AG	.AG.A...C	[420]
#Venezuela_(III)	-CTG.TAC..	G.G..G.AT.	.GC.A...T-	.CGA.....CG.G...AG	.AG.A...C	[420]
#ZA	GAGGAGAGCA	AAGGAGGCAA	CGGCGCTAGC	CGGTGGCTGT	TCGCGCCGCC	GAGA-GGGGA	CGAGTGGGCC	[490]
#SOG...GTA.	[490]
#Fransa_(I)G...G	A.....	[490]
#Italya_(I)C.....	[490]
#Iran_(I)	[490]
#Tayvan_(I)T...	[490]
#Tayvan_(IIa)	.G.....	GA...T...	.A.....	-..C-...C	[490]
#Tayvan_(IIb)	GA...A.....C	[490]
#Peru_(III)	TGA.....	...G.....	...ACC.....	...AT..ATG	.GATC..T.C	[490]
#Venezuela_(III)	TG.....G.	T.CC.....	...AT..ATG	.GATC..T.C	[490]
#ZA	TTATCCCGGG	GAACTGGGGG	AACTGTC--C	CCACATAGCA	GCTCCAGGAC	CCCCCTTCCA	AAAGACTGA	[560]
#SOA.T	T.....CT.C...AGC...C-	[560]
#Fransa_(I)A.T	T.....ACT.CC.GAT..	...GT...C..	[560]
#Italya_(I)A.T	T.....AG-CC.GAGT...C-	[560]
#Iran_(I)A.T	T.....	...TC...G	.GA..CC.GAG.	...GT...C.G	[560]
#Tayvan_(I)ACT.CC.GG	G.....	...T...C..	[560]
#Tayvan_(IIa)G.....	...G.G..G.-G	...ACT.C.AGG	G.....	...GT...G.G	[560]
#Tayvan_(IIb)G...C--AC-CC.GG	T.....	...G	...C...G	[560]
#Peru_(III)GTGA..C.T	CGG.CCT-T.	...TTAGC.T.G	...AAT.CC-GG	G...C...C	...GG.ATGG..	[560]
#Venezuela_(III)GGA.T.C.T	CGG.CC.CT.	...TA.C.CGG	...AGTCCCGG	G...C...C	...GG.A.CGAC	[560]
#ZA	GGGGGG-AGC	TTGGAGCGTG	GGGGACCCAG	TGGAAC-AT	GGGATGCGCT	--TCCCGAT	TCCGACCCCA	[630]
#SOTGCT	.A...CTC..	...G..G..	...G...T.CTC.AAC	[630]
#Fransa_(I)TGA.	..T..A.A.TG...T.CCC.AAG	[630]
#Italya_(I)TCA.	...CA	A...G..G..	...G...T.C	G.TCG.T..C	[630]
#Iran_(I)	A...TG-	.G...A.ACCG...T.C	G.TCG.TT.C	[630]
#Tayvan_(I)TG.	.A...A..C.G...T.C	GT.CGT..AT	[630]
#Tayvan_(IIa)TCA.	.A...A.AC.	...T...T.	...T..-G.	...TG..C	TC...ACCC	...T...A..	[630]
#Tayvan_(IIb)	...AC.GTC.	...C.TCA	...G...T.	...G...-G.	...AT...C	AGAC.T.CC.	...TCC..A.T	[630]
#Peru_(III)	ACA...GC--	--A..T..AC	C...G...GC	A...C..G..	...AG.T...C	CACCAT.CC.	...G...GA.	[630]
#Venezuela_(III)	AC...GC--	--AA.T..AC	C...T...GC	A.A.C..G..	...AG...C	CACCAT.CCC	.GACGGAGA.	[630]
#ZA	TCCCTCCCC	--CGAGGCTC	GGCCAGGA--	--ATGGCTTG	GAACCACTCA	GTTGGGTTCC	CGGTTT-C	[700]
#SO	C...C.....	A-GC.....GG.	ACC.....TT	ARCA.....	[700]
#Fransa_(I)	CT.....	C..A.....GG.	ACC.....T	-CA.....	[700]
#Italya_(I)	.T..C.....	C..A..C.....GG.	ACC.....C	A-CA.....	[700]
#Iran_(I)	GA.TCC....	C..A.....GG.	ACC.....T	-CA.....	[700]
#Tayvan_(I)	C...C.....	CC...C.....GG.	ACC.....	AC.....	[700]
#Tayvan_(IIa)	CTGG...T	G...G..CC.	C...TA.G-AG.	A.C.....	A.....	...GG-C.	[700]
#Tayvan_(IIb)	C.TTCC....	TG..G..CC.	C...TA.G-GA.	ATCT.CACTC	A-T.....	TT...C.AT.	[700]
#Peru_(III)	AA.TGGT...	G-AT...G.	A...CA.TA	GG...AAA	AGGGG...-	--C.....	GT.....	[700]
#Venezuela_(III)	AA.TGGT...	G-AT...G.	A...CA.TA	GG...AG.	AGGGG...G-	--C.....	GT.....	[700]

Şekil 3.1'ın devamı.



Sekil 3.1'in devamı.



Şekil 3.1'in devamı.

#ZA	GGTCTCTCTC TOGAGATCCT CCAATTCTT TCTTGTATTG ACCCACTGCT CGAGGGTCTC TTCTCTG---	[1610]
#SO	.AGT..C....T....T..C.....CC..C.....AC.....T---	[1610]
#Fransa_(I)	.AGG.....T....T..C.....COGC.C.....AAC.....C---	[1610]
#Italya_(I)	.AGT..C....T....T..C.....COGC.C.....AAC.....C---	[1610]
#Iran_(I)	.AGA..C....T....GC.....CC.C.C.....T....AA.A.....T---	[1610]
#Tayvan_(I)	.AGG..C....T....T..C.....COG..C.....AC.....T---	[1610]
#Tayvan_(IIa)	.AGG..T....C....GCC..TC.....TG...T...TCT...C..C..TGTT	[1610]
#Tayvan_(IIb)	.AGG..C....C....TT.C.TC.....C..C..T...TTC...TTG.....C---	[1610]
#Peru_(III)	.AGA..CT....C.TTC G..CTG.....C...TCC..CT.....T....A....C.....C---	[1610]
#Venezuela_(III)	.AG...CT...GCTATTC G..TT.....C...TCC..CT.....C...C..C..C---	[1610]
#ZA	CCCCCGGAC TCTTCTCGA TTGGATCGG CTCATCT-CG ACAAGAGGCG G-CGGACCTC AGTACTCT-T	[1680]
#SO	..T.....T.....C.....C.....-AAT.....	[1680]
#Fransa_(I)	..T.....GT..T...C.TCC.....GC.....T...T.....A-..T.....	[1680]
#Italya_(I)	..T.....G..C.....C.....C.....-A.T.....G.....	[1680]
#Iran_(I)	..AT...CT.....A..C.....C.....-A.T.....G.....	[1680]
#Tayvan_(I)	..G.....T.....C.....A.....G.....G?.TT.....	[1680]
#Tayvan_(IIa)	..TT...T.....C.....C.....T...CC.A GGTC.....A-A..T.....T....C.	[1680]
#Tayvan_(IIb)	...TC..GG GTC..C....A...GCT...CT...TTGCGA...T...G..A.....	[1680]
#Peru_(III)	T...TTGGAGG ..AG..C.T.C GA...T.T...C---T...A.C .GG.AG.T.. GACGA...C.	[1680]
#Venezuela_(III)	K...TTGGAG. CCGGTC.T.C AC...G.T...C---T...A.C .GG.AG.T.. GACGA...C.	[1680]
#ZA	ACTCTTTTCT G--TAAAGAG GAGACTGCTG GACTCACCGC CCGA-GTCCG AG	[1732]
#SOTC.G....A-..T..	[1732]
#Fransa_(I)C.CTGT...A-..T..	[1732]
#Italya_(I)G....A-..T..	[1732]
#Iran_(I)A.....G....A-..T..	[1732]
#Tayvan_(I)C.....A-..T..	[1732]
#Tayvan_(IIa)	.T....C...TTCG.....C.CA.A.....C.G.--	[1732]
#Tayvan_(IIb)	.TCT.CC.GC TT-AG.....T..C....G.C.....G.--	[1732]
#Peru_(III)	TA...C.C..-AAGG.G..A .GAG..CTC. A..G.C..C..G.CTCCT..GA	[1732]
#Venezuela_(III)	TG...C.C..AAGG.G..A .GAG..CTC. A..G.T.TC..GACT.CT..GA	[1732]

Şekil 3.1'in devamı.

3. 2. 3 Ters transkripsiyon reaksiyonu

HDV bir RNA virüsü olduğu için öncelikle izolasyonu yapılan viral RNA'nın komplementer DNA'sının (cDNA) oluşturulması gerekir. Kullandığımız bazı kitler ters transkripsiyon aşamasının ve 'real time' PZR reaksiyonunun aynı tüp içerisinde yapılmasına imkan verirken bazıları için önce dışarıda cDNA oluşturulması gereklidir. Bu amaçla hazırlanan 20 µl'lik reaksiyon hacmi içerisinde 4 µl 2mM dNTP, 4 µl 10X tampon, seçilen bölgeye özgü 10 µM konsantrasyonundaki 'reverse' primerden 1µl, 0,5 µl (12,5 unite) AMV ters transkriptaz enzimi (Roche Applied Science, Almanya) ve 5µl RNA bulunmaktaydı. Daha sonra Thermal Cycler PZR cihazı (Eppendorf Mastercycler Personal, Almanya) kullanılarak 42°C'de 1 saat inkübasyondan sonra cDNA elde edildi.

3. 2. 4 HDV RNA kantitasyonu için standart oluşturulması

HDV genomu üzerinde bütün primer-prob dizilerimizin yerleştiği alanı kapsayacak şekilde 305. ile 1285. nükleotidler arasında kalan HDV RNA bölgesinin (ribozim ve delta antijeni bölgeleri) HDV RNA kantitasyonu için oluşturulacak standart için çoğaltılmasına karar verildi. Bu amaçla konvansiyonel PZR yöntemi ile HDV RNA'sının pozitif olduğu belirlenen kronik delta hepatitli bir plazma örneği alınarak yukarıda anlatıldığı şekilde RNA izolasyonunun ardından RNA cDNA'ya çevrildi. Ardından Çizelge 3.1'de verilen 320S ve 1280AS primerleri (Ivaniushina et al. 2001) kullanılarak PZR ile 94°C'de 5 dakika denatürasyon sıcaklığının ardından 94°C'de 45 saniye, 58°C'de 30 saniye ve 72°C'de 45 saniye olacak şekilde 40 döngünün ardından 980 baz çiftlik bölgenin çoğaltılması sağlandı. Çoğaltılan bu PZR ürünü Topo-XL vektörlerine klonlandı.

3. 2. 4. 1 PZR ile Çoğaltılan Bölgenin Topo-XL Vektörlerine klonlanması

PZR sonucu elde edilen amplifikasyon ürünleri Topo-XL vektörüne, üretici firmanın "Topo-XL PCR Cloning" (Invitrogen, California, ABD) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek klonlandı. Bunun için öncelikle elde edilen PZR ürünleri %1'lik agaroz jele yüklendi. Agaroz jel ise şöyle hazırlandı: 0,5 g agaroz 50 ml 1X TAE tamponuyla karıştırıldı ve agaroz eriyene kadar mikrodalga fırında ısıtıldı. Fırından çıkarıldıktan sonra soğutuldu ve 30 µl kristal violet boyası eklendi, karıştırıldı. Tarak jel tabağına yerleştirilip agaroz jel tabağına döküldü. Jel donduğunda tarak çıkarıldı ve üzerini kaplayacak kadar 1X TAE tamponu eklendi. 40 µl PZR amplifikasyon ürünü 8 µl 6X kristal violet yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi. PZR ürünü jelde 30-40 dakika kadar yürütüldü.

Daha sonra beyaz ışık altında jelde bulunan DNA bantları görüntülendi ve istenilen bant bistrü yardımıyla jelden kesilip çıkarıldı. Çıkarılan parça küçük parçacıklara ayrılıp 1,5 ml'lik bir ependorf tüpüne konuldu. Üzerine jelin hacminin (1mg yaklaşık 1 µl gelmektedir.) 2,5 katı kadar 6,6 M Sodyum iyodür solüsyonu eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı. Ardından 50°C'de jel tamamen eriyene kadar inkübasyona bırakıldı. Oda sıcaklığında toplam hacmin 1,5 katı kadar bağlama tamponu (binding buffer) eklendi ve vorteks yardımıyla karıştırıldı.

Elde edilen karışım SNAP pürifikasyon kolonuna yüklendi ve oda sıcaklığında 2000-3000 rpm'de 30 saniye santrüfjü edildi. Altta kalan sıvı kısım atıldı ve SNAP pürifikasyon kolonuna 400 µl 1X yıkama solüsyonu eklendi. Oda sıcaklığında 2000-3000 rpm'de 30 saniye santrüfjü edildi. Altta kalan sıvı kısım atıldı ve SNAP pürifikasyon kolonuna 800 µl 1X yıkama solüsyonu eklendi. Altta kalan sıvı yine atıldı ve SNAP pürifikasyon kolonu boş olarak maksimum hızda 2 dakika santrüfjü edildi. Daha sonra 40 µl Tris-EDTA (TE) tamponu filtrenin tam ortasına gelecek şekilde pipetlendi ve 1 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Oda sıcaklığında maksimum hızda santrüfjü yapılarak DNA elde edildi.

Böylece jelden saflaştırılan PZR ürününden 4 µl ve kanamisin direnç geni taşıyan pCR-XL-TOPO vektöründen 1 µl alınarak 1,5 ml'lik steril bir ependorf tüpünde karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 1 µl 6X TOPO Cloning Stop solüsyonu eklendi ve oda sıcaklığında karıştırıldı. Tüpün çeperlerindeki sıvının aşağı çökmesi için hafifçe santrüfjü edildi ve tüp buz üzerine konuldu.

3. 2. 4. 2 Transformasyon

Klonlama reaksiyon ürününden 2 µl 'One Shot Competent' *E. coli* hücreleri üzerine eklendi ve dikkatlice karıştırıldı. Buz üzerinde 30 dakika inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonrası 42°C'de 30 saniye ısı şoku uygulandı ve 30 saniye sonrasında tüp hemen buz üzerine konuldu ve 2 dakika inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin üzerine 250 µl S.O.C medyumunu eklendi ve 37°C'de 1 saat inkübasyona bırakıldı. Daha önceden hazırlanmış 50 µg/ml kanamisin içeren katı LB besiyerine 50-150 µl hücre yayıldı ve 37°C'de 1 gece inkübasyona bırakıldı.

3. 2. 4. 3 Topo klonlaması sonrası plazmid izolasyonu ve klonların analizi

Büyüyen koloniler steril bir kürdan yardımıyla kanamisin içeren 2 ml sıvı LB besiyerine aktarıldı ve 37°C'de bir gece inkübasyona bırakıldı. Plazmid DNA izolasyonu, üretici firmanın 'Plazmid DNA Purification' (Macherey-Nagel, Almanya) kiti içerisinde önerilen yöntem izlenerek yapıldı.

Öncelikle 37°C'de bir gece büyütülen kolonilerin 50 µl'si, pozitif klonların tekrar büyütülüp sonraki çalışmalarda kullanılabilmesi amacıyla dondurularak saklanmak üzere ayrı ayrı tüplere aktarıldı. Kalan hücreler izolasyon kiti içindeki üretici firma önerilerine göre 30 saniye 11000 rpm'de santrüfuj edilerek çöktürüldü ve üstte kalan besiyeri atıldı. Hücreler 250 µl RNaz içeren A1 tamponu ile tekrar süspanse edildi. Daha sonra 250 µl A2 tamponu eklendi, iyice karıştırıldı ve 5 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Ardından 300 µl A3 tamponu eklendi, karıştırıldı ve 11000 rpm'de 10 dakika santrüfuj edildi. Santrüfuj sonrası pellet atıldı ve süpernatant kısmı NucleoSpin kolonuna aktarıldı. 11000 rpm'de 1 dakika santrüfuj edildi, filtreden geçen sıvı kısım atıldı ve 600 µl A4 yıkama tamponu eklendi. Bir dakika 11000 rpm'de santrüfuj edildi, filtreden geçen sıvı kısım atıldı ve 11000 rpm'de 2 dakika santrüfuj edildi. Kolon 1,5 ml'lik steril bir ependorf tüpüne konuldu ve üzerine 50 µl AE elüsyon tamponu eklendi. Oda sıcaklığında 1 dakika inkübasyona bırakıldı ve 11000 rpm'de 1 dakika santrüfuj edilerek plazmid DNA'sı elde edildi.

3. 2. 4. 4 Elde edilen plazmidlerin jelde görüntülenmesi ve analizi

Beş g agaroz, 50 ml 1X TBE tamponuyla karıştırıldı ve % 1'lik agaroz jel hazırlandı. Jel donduğunda tarak çıkarıldı ve üzerini kaplayacak kadar 1X TBE tamponu eklendi. Beş µl plazmid DNA, 1µl 6X kristal violet yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jeldeki kuyucuklara yüklendi, 100 voltta 1 saat kadar yürütüldü. UV ışığı altında DNA bandı görüntüledi ve uygun boydaki (vektör+PZR ürünü) plazmid DNA'sına sahip pozitif koloniler jelde belirlendi.

3. 2. 4. 5 Pozitif Kolonilerin Dondurulması ve Saklanması

Jelde uygun boyda plazmid DNA'sı saptanan kolonilerden daha önce ayrılan 50 µl hücre süspansiyonu 1,75 ml kanamisin içeren LB medyumunda 37°C'de 1 gece büyütüldü. Hücrelerin üzerine %10 gliserol (200 µl) eklendi ve -80°C'de saklandı.

3. 2. 4. 6 DNA Dizi Analizi

TOPO-XL vektörüne klonlama yapıldıktan sonra üretici firmanın “Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing” (Applied Biosystems, Fostercity, ABD) kiti içerisinde bulunan kullanma kitapçığındaki yöntem izlenerek DNA dizi analizi yapıldı:

DNA dizi analizi PZR reaksiyonunun içeriği ve şartları aşağıda gösterildiği gibidir:

Big Dye Karışımı.....8 µl

Primer.....4 µl (Vektor DNA'sı içinden uygun universal primer seçildi, örn; M13 ileri primeri)

DNA.....1-8 µl

ddH₂O.....X µl (toplam hacmi 20 µl'ye tamamlayacak kadar)

Bu reaksiyonda uygulanan sıcaklıklar ve süreleri ise sırasıyla 96°C'de 30 saniyenin ardından 30 döngü olacak şekilde 96°C'de 10 sn, 50°C'de 5 sn ve 60°C'de 4 dakikadır. Daha sonra oluşan PZR ürünleri temizleme yapılarak ABI 3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Fostercity, ABD) dizi analizi cihazına yüklendi. Elde edilen dizi analizi sonuçları alınıp MEGA v.3.1 programı kullanılarak yayınlanmış HDV RNA dizileri ile karşılaştırıldı ve plazmidin istenen HDV cDNA bölgesini içerdiği belirlendi.

3. 2. 4. 7 Elde edilen plazmid miktarının hesaplanması

Klonlama sonunda elde edilen plazmid miktarı, Nanodrop 1000 Spektrofotometre (Thermo Scientific, ABD) kullanılarak ölçüldü. Daha sonra aşağıdaki formül kullanılarak kopya/µl olacak şekilde miktarı belirlendi (Salvi et al. 2008).

$$\text{Plazmid kopya/}\mu\text{l} = C \times NA / MW \times 10^9$$

(C: spektrofotometre ile ölçülen konsantrasyon (ng/µl), NA: Avogadro sayısı (6,023x 10²³),

MW: standart plazmidin moleküler ağırlığı, 10⁹: nanomolden mole çevrim faktörü).

3. 2. 5 HDV RNA'nın 'real time' PZR ile gösterilmesi

HDV RNA'yı 'real time' PZR yöntemi ile gösterebilmek için farklı primer-prob setleri ile 'real time' PZR kitleri kullanıldı. Farklı reaksiyon koşulları denenerek HDV RNA'yı

saptamak için optimum PZR koşulları belirlendi. İzlenen yöntem, kullanılan kitler ve reaksiyon koşulları aşağıda özetlenmiştir.

3. 2. 5. 1 Light cyclers Taqman Master Kit

HDV RNA'sının pozitif olduğu bilinen tek bir hastanın plazma örneğinden yeterli miktarda RNA izolasyonu yapıldı ve bütün denemelerde aynı hastanın plazma örneği kullanıldı. Öncelikle ters transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA elde edildi. Daha sonra primerler 10'ar µM, prob ise 5µM konsantrasyonunda kullanılarak Light cyclers Taqman Master kiti reaksiyon ve enzim karışımı ile Light cyclers 1.2 'real time' PZR (Roche Applied Science, Almanya) sisteminde Çizelge 3.1'de verilen sıcaklık döngülerinde uygulandı.

Çizelge 3. 2 Light cyclers Taqman Master Kit için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreleri (*: Her primer-prob için bağlanma sıcaklığı farklı olabilir).

Hedef sıcaklık (°C)	İnkubasyon süresi (sn)	Sıcaklık değişim oranı (°C/sn)	Döngü sayısı	Mod
Program:denatürasyon				
95	600	20	1	-
Program:kuantifikasyon				
95	10	20	45	-
60*	30	20		-
72	1	20		Tek (single)
Program:soğutma				
40	30	20	1	-

3. 2. 5. 2 Taqman EZ-RT PCR Kit

Taqman EZ-RT PZR Kit (Applied Biosystems, Fostercity, ABD) içeriğindeki enzim nedeniyle RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi (ters transkripsiyon) ve DNA'nın çoğaltılması aşamalarının tek tüp içinde yapılmasına imkan sağlamaktadır.

HDV RNA'sının pozitif olduğu bilinen tek bir hastanın plazma örneğinden yeterli miktarda RNA izolasyonu yapıldı ve bütün denemelerde aynı hastanın plazma örneği kullanıldı. 25 µl hacimdeki PZR karışımı içerisinde 5 µl 5X Taqman EZ tamponu (son konsantrasyonu 1X), 3 mM Mn(OAc)₂ (manganez asetat), her biri 10 mM olan dATP,

dCTP ve dGTP'den 0,3 mM, 20 mM dUTP'den ise 0,6 mM, primerlerin her birinden 0,4 μ M, prob ise 0,2 μ M, 0,1 U/ μ l rTth DNA polimeraz enzimi ve amplicon kontaminasyonunu engellemek amacıyla 0,01 U/ μ l Amperase UNG enzimi bulunmaktaydı. Taqman EZ-RT PCR Kit ile ABI 7300 'real time' PZR cihazında (Applied Biosystems, Fostercity, ABD) farklı primer-prob çiftleri kullanıldı ve uygulanan sıcaklık döngü ve süreleri Çizelge 3.3'deki gibiydi.

Çizelge 3. 3 EZ-RT PCR Kit için kullanılan PZR sıcaklık döngü ve süreleri (*: Her primer-prob için bağlanma sıcaklığı farklı olabilir).

Hedef sıcaklık (°C) ve inkübasyon süresi				
40 döngü				
UNG aktivasyonu	Ters transkripsiyon	UNG inhibisyonu	Denatürasyon	Bağlanma\Uzama
50 °C 2 dakika	60 °C 30 dakika	95 °C 5 dakika	94 °C 20 saniye	60 °C* 1 dakika

4. ARAŞTIRMA BULGULARI

4.1 Hastalar

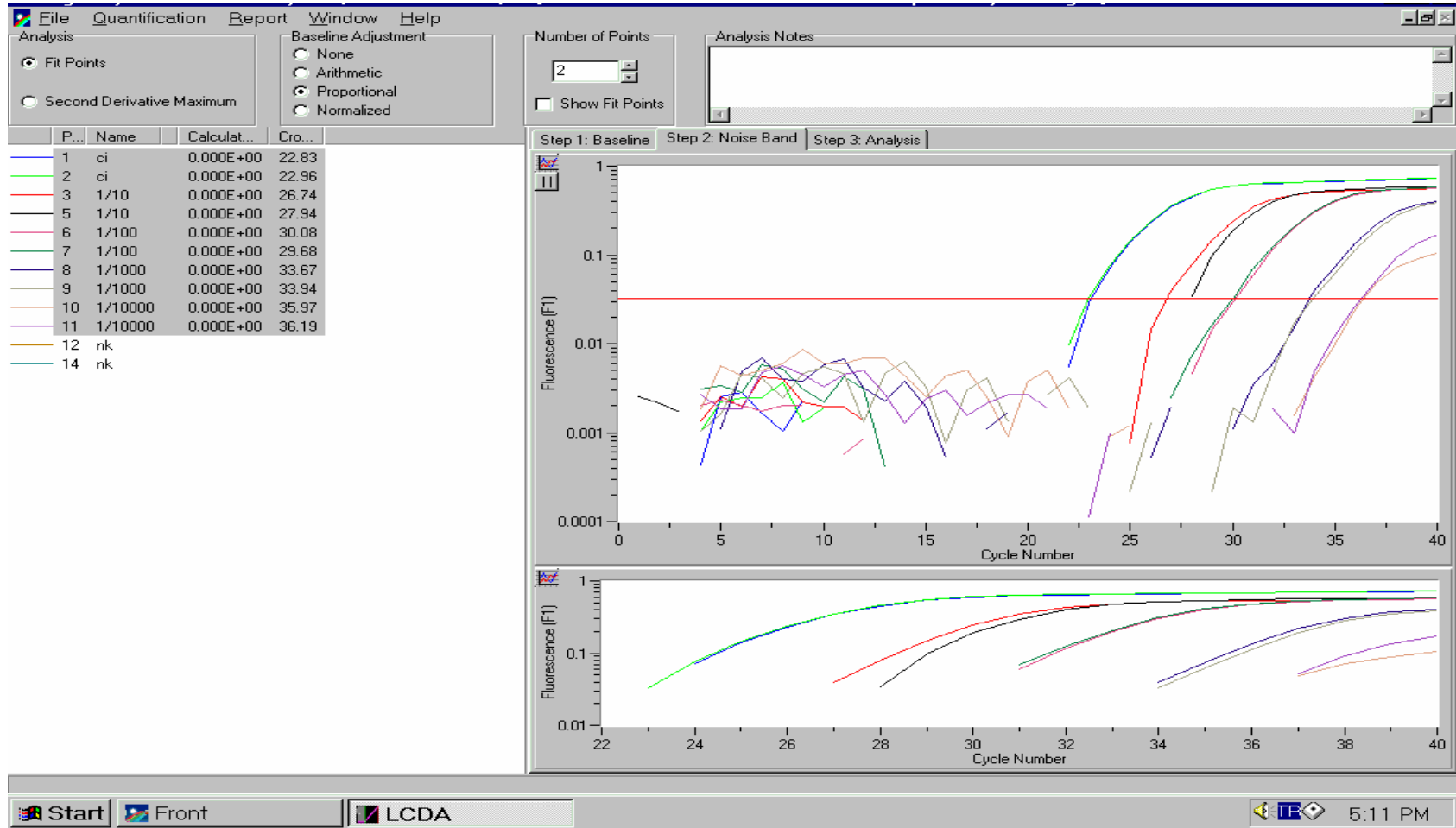
Çalışmamıza laboratuvarımızda daha önce konvansiyonel PZR testleri ile HDV RNA'sının pozitif olduğu belirlenen 18'i kadın ve 22'si erkek olmak üzere 40 hasta dahil edildi. Ayrıca bir yıl süreyle interferon ya da PEG-interferon tedavisi almış 22 hastanın tedavi başlangıcında, tedavinin 6. ayında ve 12. ayındaki serum HDV-RNA değerleri analiz edildi.

Çalışmamızda kullandığımız kitler ile bütün primer-prob sistemleri denenmiştir. Elde edilen sonuçlar, kullanılan her kitin başlığı altında verilmiştir.

4.2 Light cyclers Taqman Master Kit

Light cyclers Taqman Master Kit kullanılarak LNA bazı içeren primer-prob sistemlerimiz olan LNA1F-LNA1R primerleri ile LNA1 prob ve LNA2F-LNA2R primerleri ile LNA2 prob, Light cyclers 1.2 'real time' PZR sisteminde farklı bağlanma sıcaklıkları (48°C ile 68°C arasında değişen) ve farklı primer-prob konsantrasyonları denendi. Fakat HDV RNA bu primer-problar ile Light cyclers 1.2 'real time' PZR sisteminde çoğaltılamadı.

Aynı kit ile DF1-DR1 primerleri ve DPR1 probu kullanılarak Light cyclers 1.2 'real time' PZR sisteminde 95°C'de 10 dakikanın ardından 45 döngü olacak şekilde 95°C'de 10 saniye, 60°C'de 30 saniye, 72°C'de 1 saniye olan PZR koşullarında HDV RNA'nın çoğaltıldığı gözlemlendi. Daha sonra HDV RNA'nın negatif olduğu bilinen kontrol serum örneği kullanılarak HDV RNA'nın pozitif olduğu bilinen hasta serumu ve bunun 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000 seri seyreltme oranlarındaki örnekleri, HDV komplementer DNA'yı elde etmek için ters transkripsiyon basamağından sonra Light cyclers 1.2 'real time' PZR sisteminde yukarıdaki reaksiyon koşullarında her örnek çoklu tekrarlar şeklinde çalışıldı (Şekil 4.1).

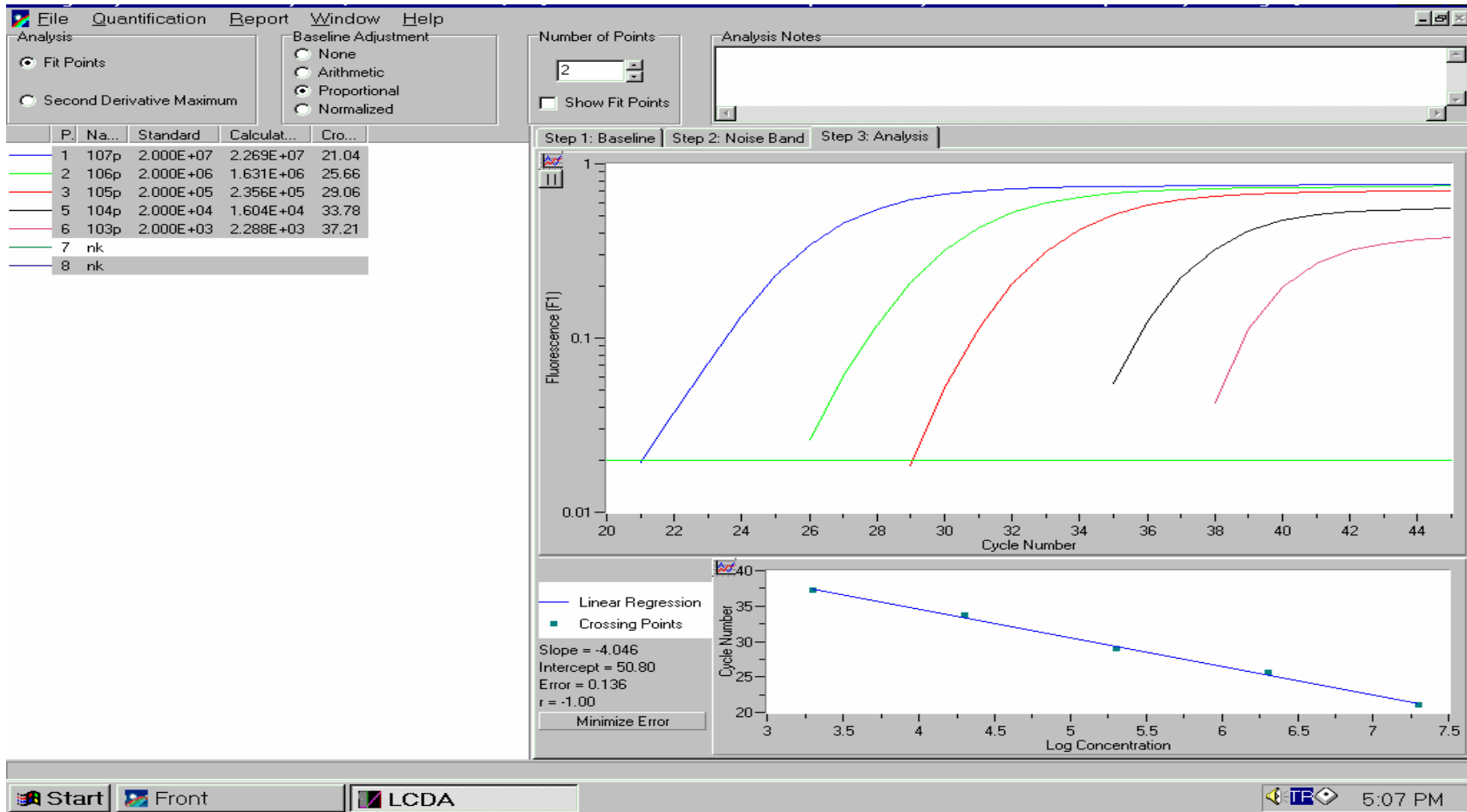


Şekil 4.1 HDV RNA'nın Light cycler 1.2 'real time' PZR sisteminde Light cycler Taqman Master kit ile çoğaltılması (her bir örnek çift çalışılmıştır).

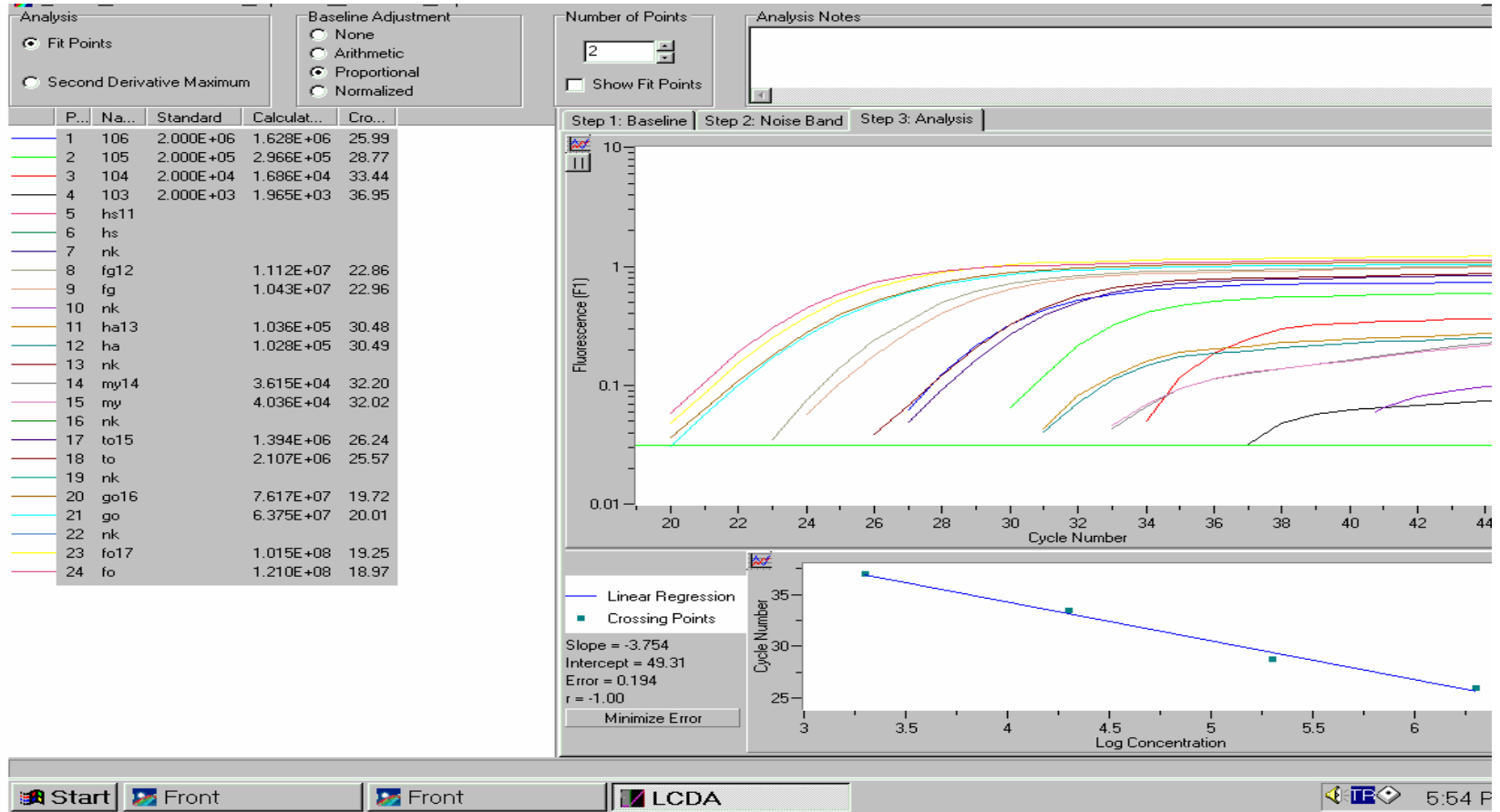
Daha sonra deneyin duyarlılığını belirlemek için HDV genomunun bir bölümünü içeren klonladığımız plazmidin miktarı kopya/ μ l olarak hesaplandı ve bu plazmidin 1\10 seri seyreltme oranındaki örnekleri oluşturuldu. Ardından ise Light cyclers 1.2 ‘real time’ PZR sisteminde çoklu denemeler yapılarak bu örneklerin döngü eşik değerlerine karşılık (CT:cycle threshold) başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğrular oluşturuldu. Korelasyon katsayısı (r) ise $\geq 0,99$ olarak tekrarlar arasında doğruların eğimi -4,0 olarak hesaplandı. Bu standart örneklerin viral yükleri 10^7 ile 10^3 kopya/ μ l arasında idi. 1000 kopya/ μ l’ye kadar HDV RNA saptanabildi (Şekil 4. 2).

Ayrıca her örnek, ‘real time’ PZR’den sonra kontrol amaçlı olarak agaroz jel elektroforezinde jel görüntüleme sistemi (UVP Jel dokümantasyon sistemleri, Olympus 40X kamerası, Japonya) kullanılarak görüntülendi ve her biri 78 bç olan bantlar gözlemlendi (Şekil 4. 4)

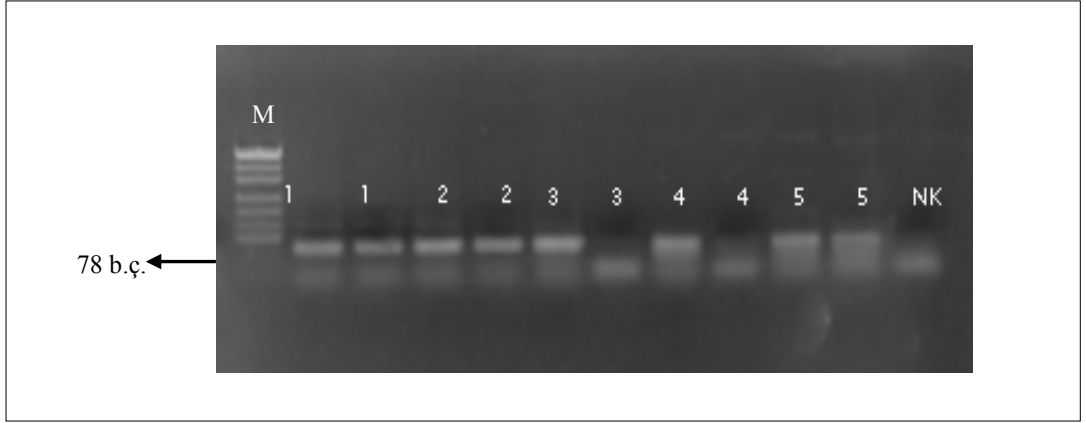
Üçüncü basamak olarak ise sistemimizi test etmek amacıyla aynı primerler ve prob kullanılarak laboratuvarımızda daha önce yapılan konvensiyonel PZR testleri ile HDV RNA’sının pozitif olduğu belirlenen 40 hastanın plazma örneğine HDV RNA izolasyonundan sonra HDV komplementer DNA’yı elde etmek için ters transkripsiyon basamağı uygulandı. Daha sonra Light cyclers 1.2 ‘real time’ PZR sisteminde yukarıda oluşturulan standart plazmid örnekleri kullanılarak bu hastaların HDV RNA viral yükleri hesaplandı (Şekil 4. 3). Buna göre her hasta çift olacak şekilde çalışıldı ve deneyde kontaminasyonu kontrol etmek amacıyla, her hasta örneğinden sonra araya su içeren negatif kontrol konularak çalışıldı. Sistemimizde başarılı bir şekilde değerlendirilen hastaların viral yükleri 4700 ile $7,1 \times 10^7$ kopya/ μ l arasında değişmekteydi.



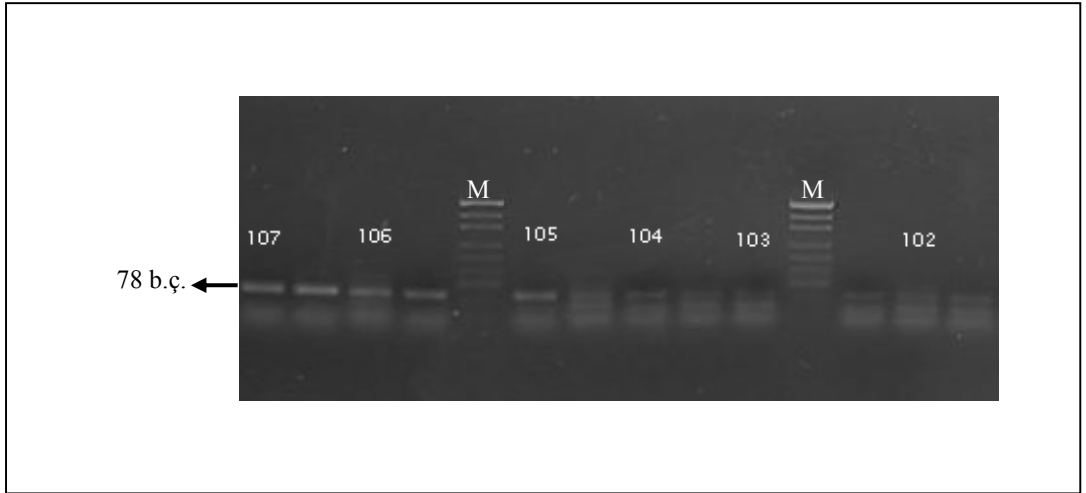
Şekil 4. 2 Oluşturulan standart plazmidin 1/10 seri seyreltme oranındaki örneklerinin Light cycler 1.2 'real time' PZR sisteminde Light cycler Taqman Master kiti ile kantitasyonu.



Şekil 4. 3 Hasta örneklerinin Light cycler 1.2 'real time' PZR sisteminde Light cycler Taqman Master kiti ile kantitasyonu.



Şekil 4. 4. 1/10 seri seyreltme oranındaki HDV RNA ‘real time’ PZR ürünlerinin %2’lik agaroz jelde görüntülenmesi (1-5: HDV RNA’nın pozitif olduğu bilinen örnek (1) ve bunun 1/10’dan (2) 1/10000 (5) seri seyreltme oranına kadar olan örnekleri, NK: negatif kontrol, M: pUC19 işaretleyicisidir).



Şekil 4. 5 Oluşturulan standart plazmidin $2,0 \times 10^7$ kopya/ μ l’den $2,0 \times 10^2$ kopya/ μ l’ye kadar olan ‘real time’ PZR ürünlerinin %2’lik agaroz jelde gösterilmesi (M: Puc19 işaretleyicisidir).

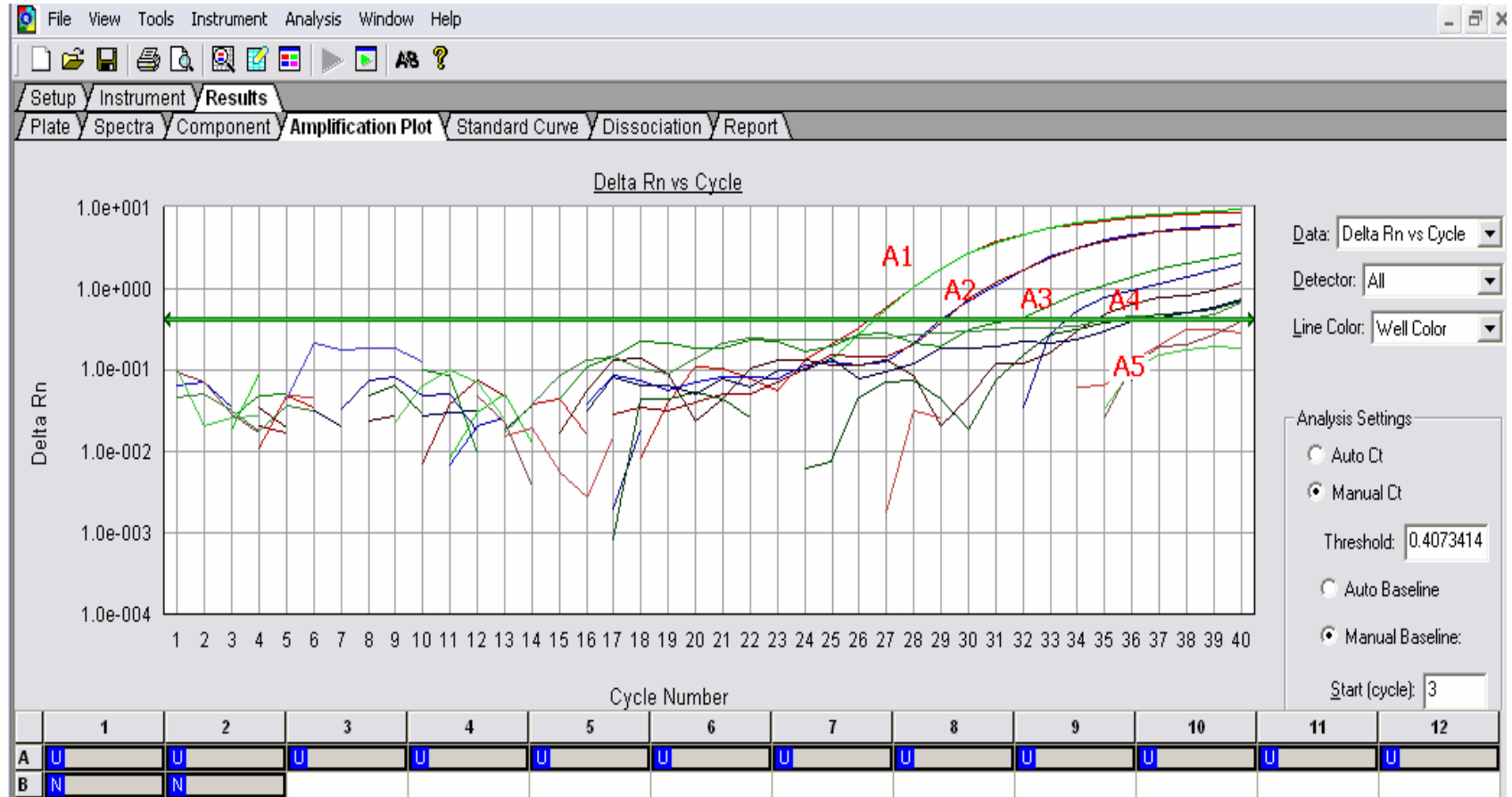
4. 3 Taqman EZ-RT PCR Kit

Taqman EZ-RT PCR Kiti ile ABI 7300 ‘real time’ PZR cihazında çalışmalar yapıldı. Bu kit ile ters transkripsiyon ve DNA’nın çoğaltılması aşamaları tek tüp içinde yapılabilir.

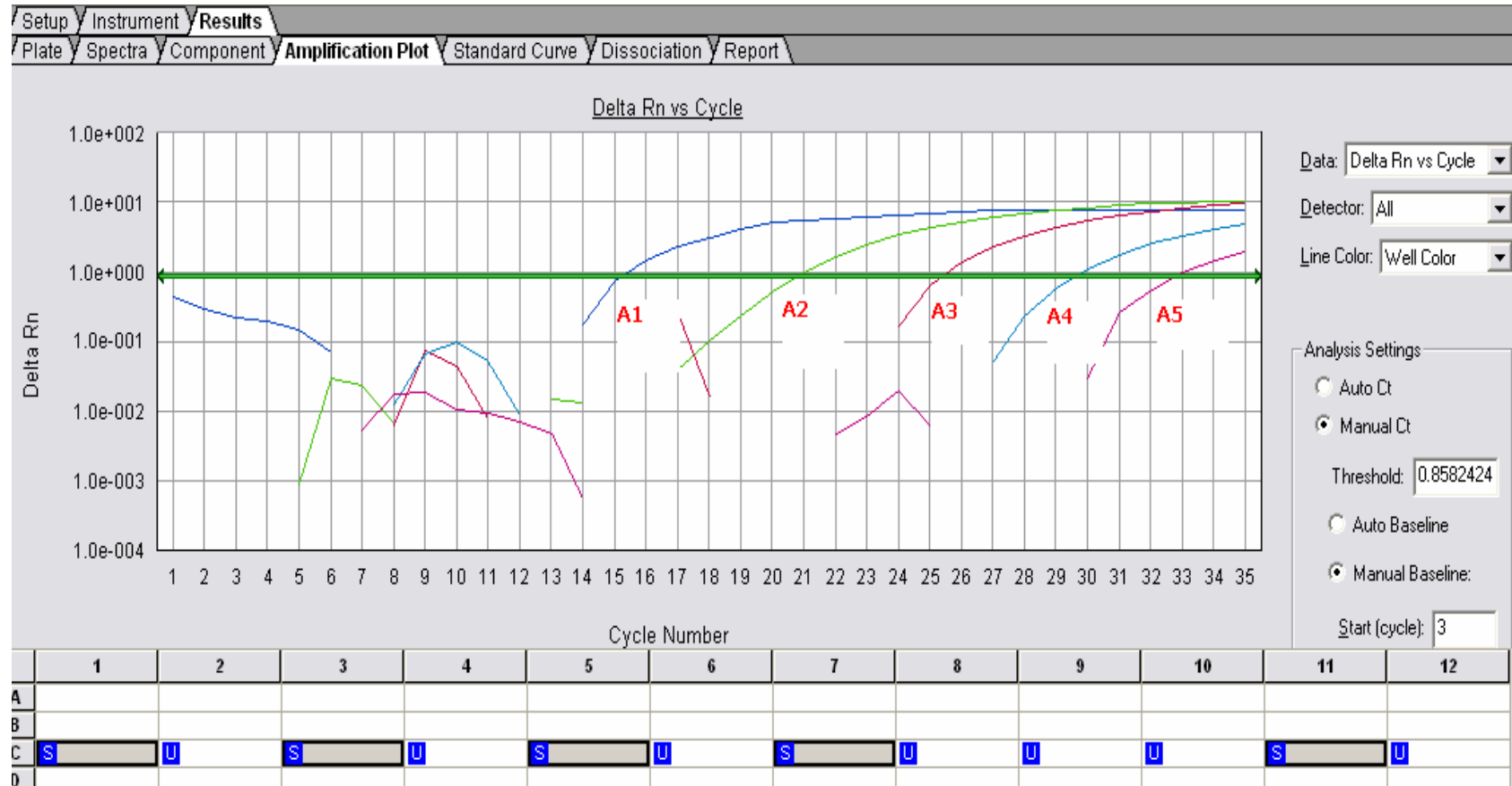
LNA bazı içeren primer-prob sistemlerimiz olan LNA1F-LNA1R primerleri ile LNA1 prob ve LNA2F-LNA2R primerleri ile LNA2 prob için Taqman EZ-RT PCR Kit ile ABI 7300 ‘real time’ PZR cihazında da farklı bağlanma sıcaklıkları (48°C-74°C sıcaklık aralığında) ve farklı primer-prob konsantrasyonları denendi. Fakat HDV RNA bu primer-problar ile ABI 7300 ‘real time’ PZR cihazında da çoğaltılmadı.

Aynı kit ile ABI 7300 ‘real time’ PZR cihazında JF1 ile JR1 primerleri ve JPR1 probu kullanılarak 50°C’de 2 dakika UNG ile muamele edildikten sonra, 60°C’de 30 dakika ters transkripsiyon ve 95 °C’de 5 dakika UNG deaktivasyonu yapıldı, ardından da aynı tüp içerisinde 40 döngü olacak şekilde 94 °C’de 20 saniye, 60 °C’de 1 dakika olan PZR koşullarında HDV RNA’nın çoğaltıldığı gözlemlendi. Daha sonra HDV RNA’nın negatif olduğu bilinen kontrol serum örneği kullanılarak HDV RNA’nın pozitif olduğu bilinen hasta serumu ve bunun 1/10, 1/100, 1/1000, 1/10000 ve 1/100000 seri seyreltme oranlarındaki örnekleri, ABI 7300 ‘real time’ PZR cihazında yukarıdaki reaksiyon koşullarında yine her örnek çoklu tekrarlar şeklinde çalışıldı (Şekil 4. 6). Ayrıca örnekler ‘real time’ PZR’den sonra kontrol amaçlı olarak agaroz jel elektroforezinde görüntülendi ve her biri 82 bç olan bantlar gözlemlendi (Şekil 4. 9).

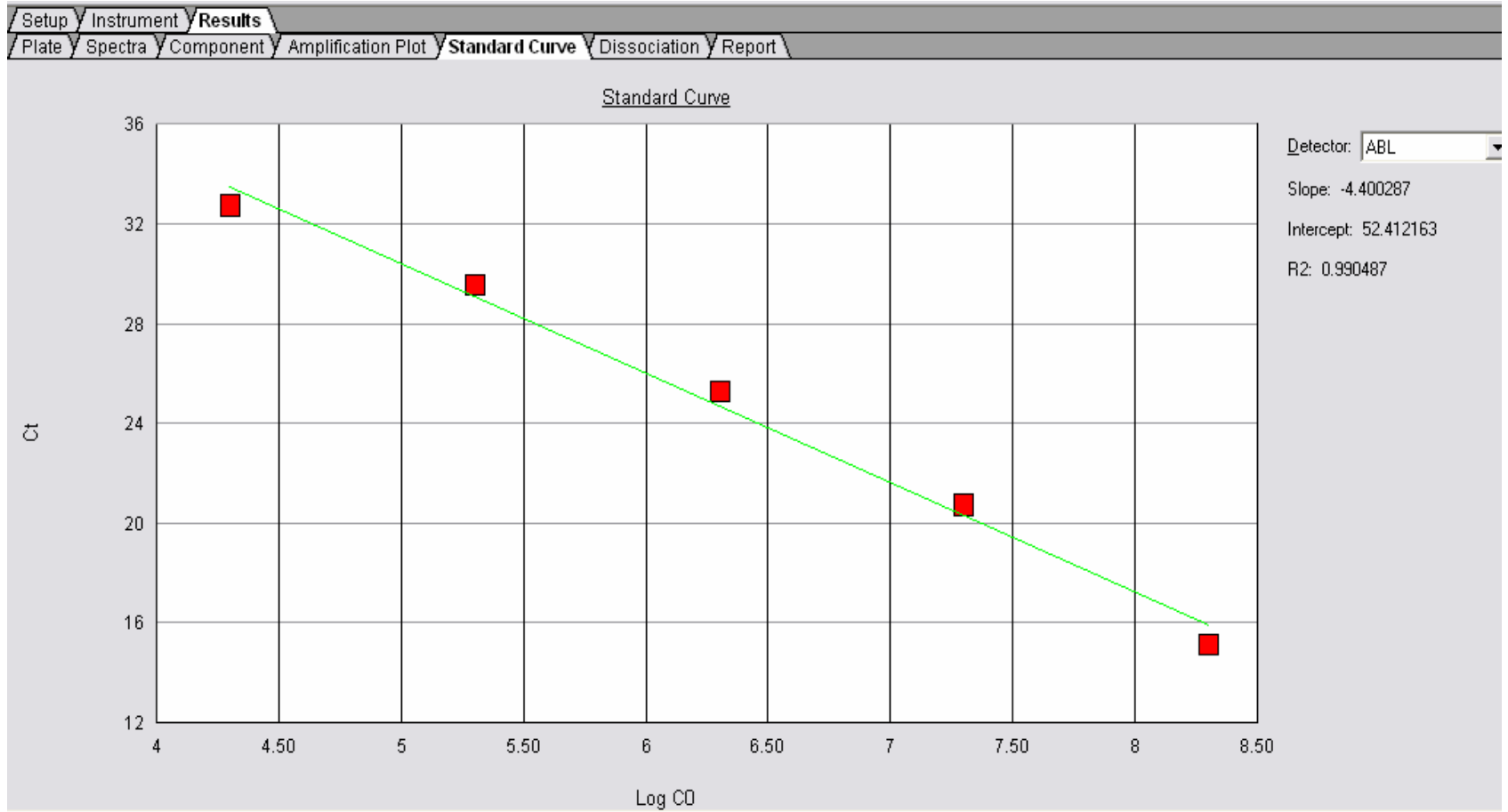
Plazmidin 1\10 seri seyreltme oranındaki miktarı bilinen örnekleri, ABI 7300 ‘real time’ PZR cihazında çoklu denemeler yapılarak bu örneklerin döngü eşik değerlerine karşılık (CT:cycle threshold) başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğrular oluşturuldu. Korelasyon katsayısı (r) ise $\geq 0,99$ olarak tekrarlar arasında doğruların eğimi -4,4 olarak hesaplandı. Bu standart örneklerin viral yükleri 10^8 ile 10^2 kopya/ μ l arasında idi (Şekil 4. 7 ve Şekil 4. 8).



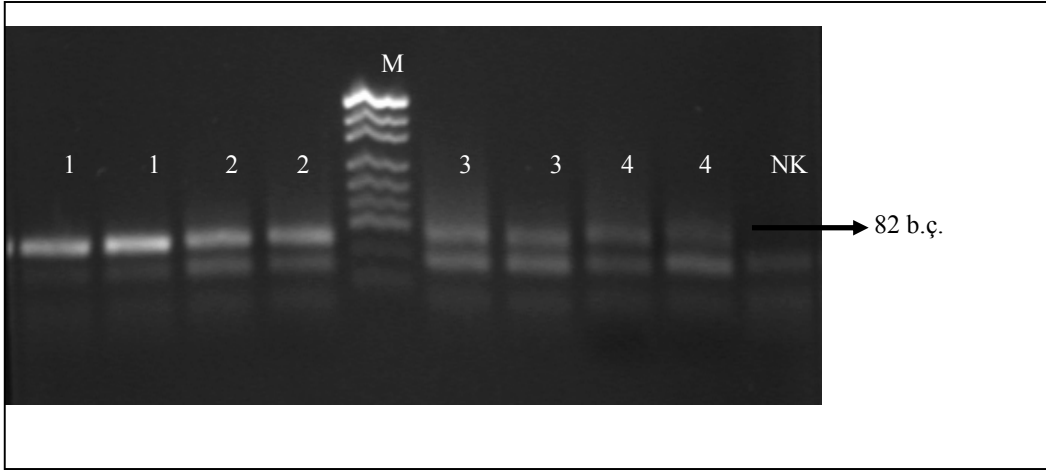
Sekil 4. 6 HDV RNA'nın ABI 7300 'real time' PZR sisteminde Taqman EZ-RT PCR kit ile çoğaltılması. A1: HDV RNA (+) stok hasta örneği, A2-A5: Stok hasta örneğinin 1/10 seri seyreltme oranındaki örnekleri (her bir örnek çift çalışılmıştır).



Şekil 4. 7 Oluşturulan standart plazmidin 1/10 seri seyreltme oranındaki örneklerinin ABI 7300 'real time' PZR sisteminde Taqman EZ-RT PCR kit ile kantitasyonu (A1: $2,0 \times 10^8$ kopya/ μ l, A2: $2,0 \times 10^7$ kopya/ μ l, A3: $2,0 \times 10^6$ kopya/ μ l, A4: $2,0 \times 10^5$ kopya/ μ l, A5: $2,0 \times 10^4$ kopya/ μ l olarak hesaplandı).

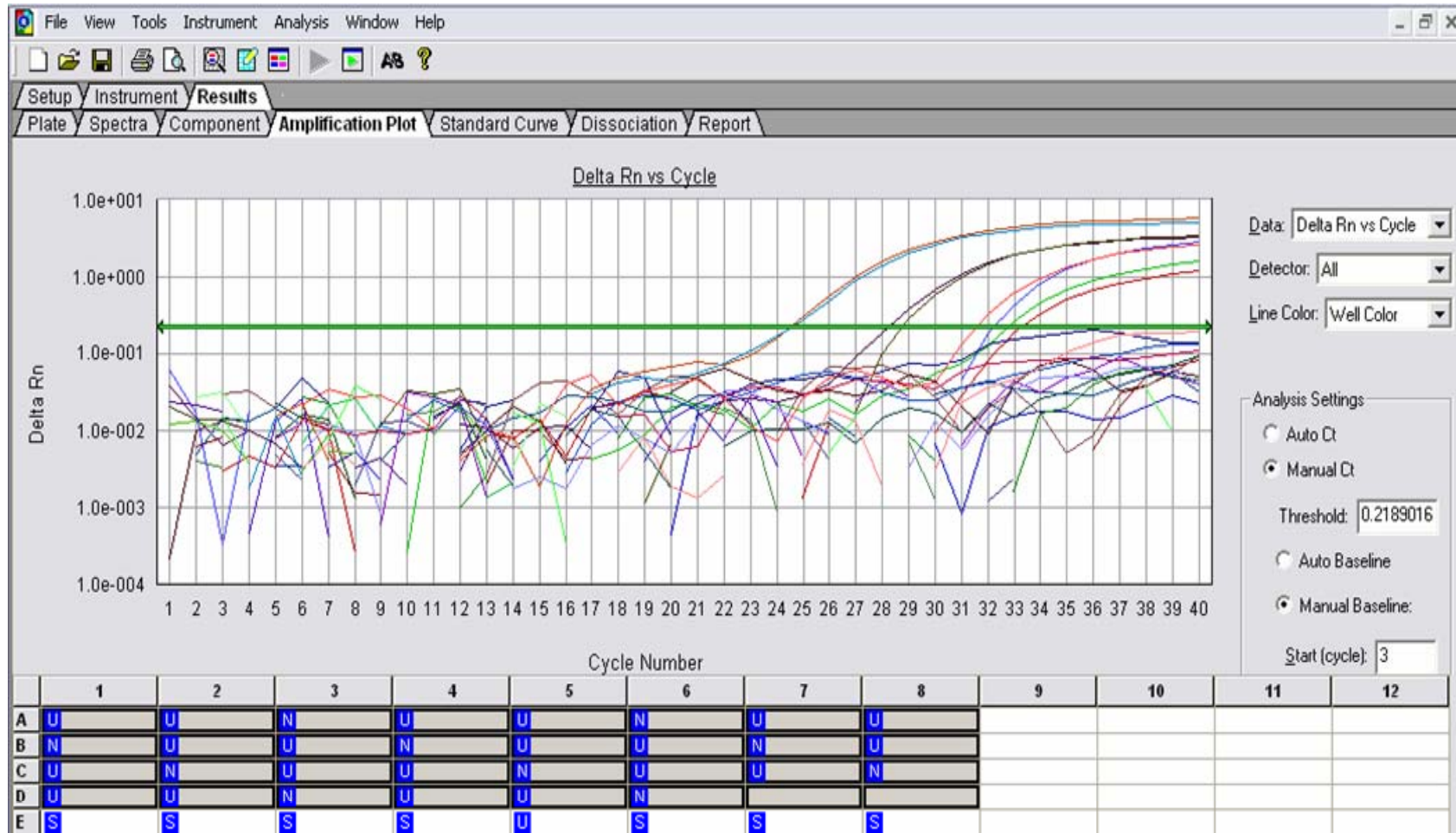


Şekil 4. 8 Plazmidin Şekil 4. 7’de CT değerleri gösterilen 1\10 seri seyreltme oranındaki miktarı bilinen örneklerinin döngü eşik değerlerine karşılık (CT:cycle threshold) başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğru.

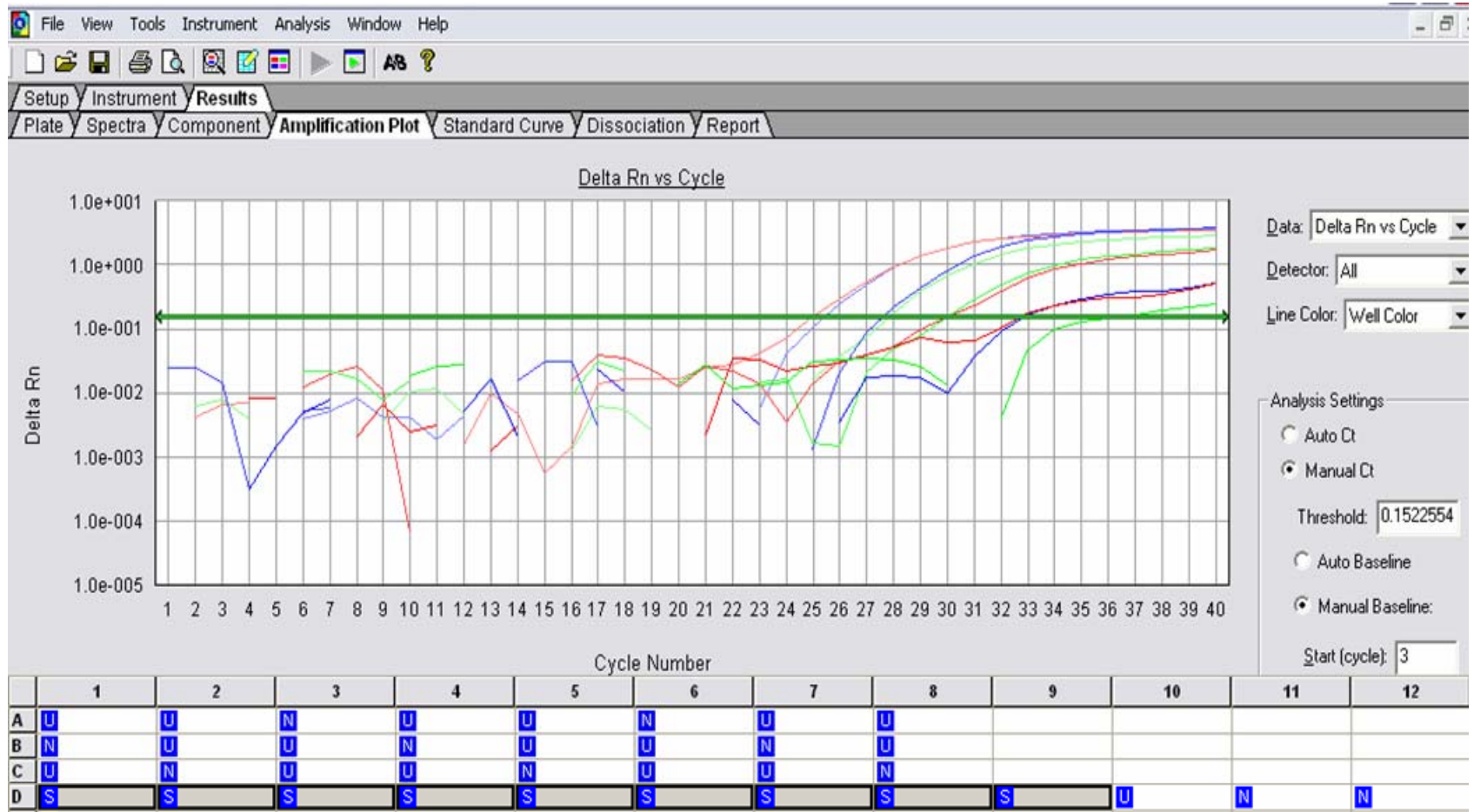


Şekil 4. 9 1/10 seri seyreltme oranındaki HDV RNA 'real time' PZR ürünlerinin %2'lik agaroz jelde görüntülenmesi (1-4: HDV RNA'nın pozitif olduğu bilinen örnek (1) ve bunun 1/10'dan (2) 1/1000 (4) seri seyreltme oranına kadar olan örnekleri, NK: negatif kontrol, M: pUC19 işaretleyicisidir).

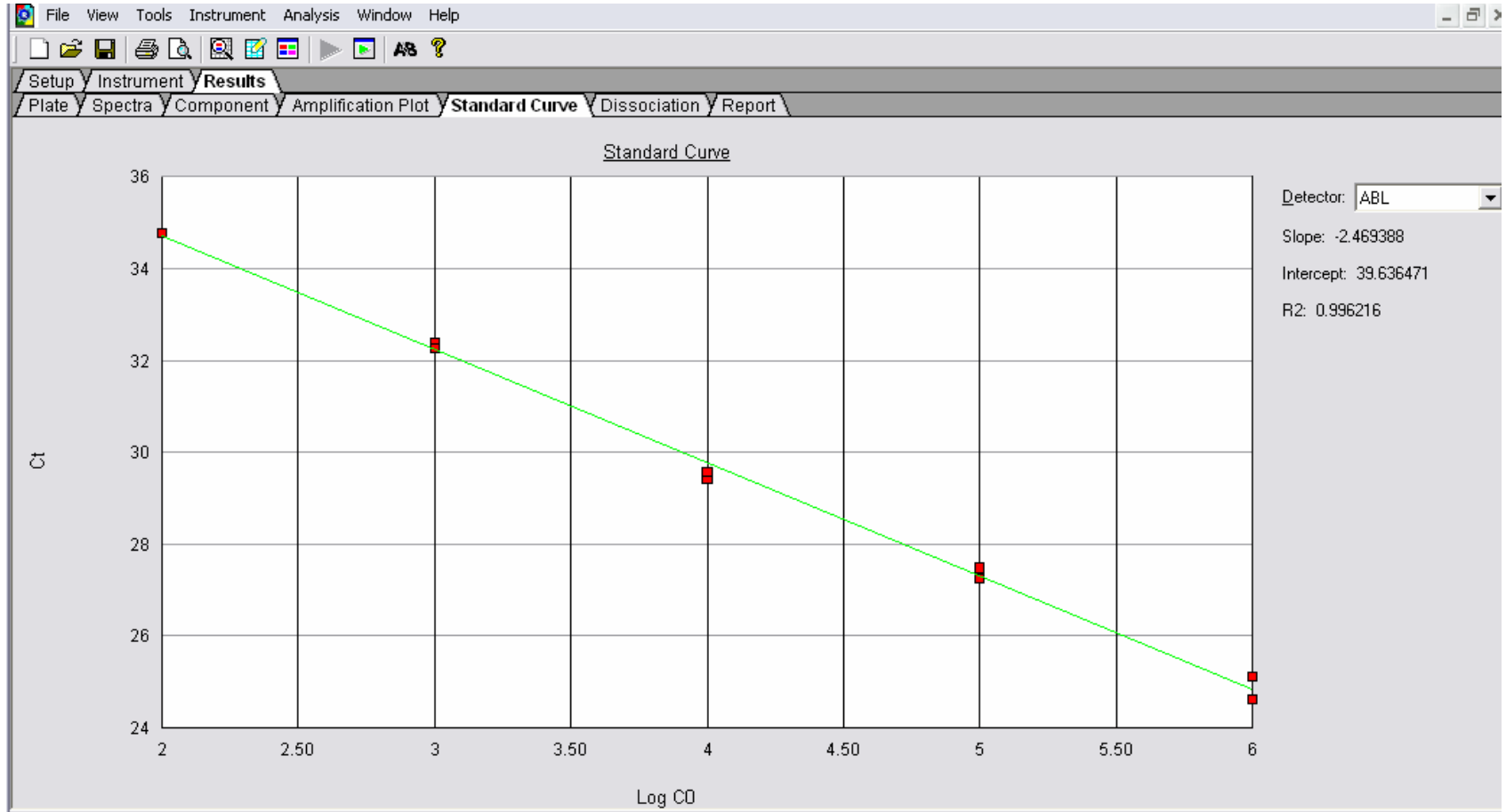
Üçüncü basamak olarak ise sistemimizi test etmek amacıyla aynı primerler ve prob kullanılarak interferon ya da PEG-interferon tedavisi almış 22 hastanın tedavi başlangıcında, tedavinin 6. ayında ve 12. ayındaki serum HDV-RNA değerleri analiz edildi. Buna göre her çalışmada, oluşturduğumuz standart plazmide göre viral yükleri belirlenen ve değerleri 10^6 kopyadan 10^2 kopyaya kadar olan HDV RNA standartları ve HDV RNA düzeyi belirlenecek olan örnekler yer aldı. Her örnek ve standart iki kere çalışıldı ve deneyde kontaminasyon kontrolü için her hasta örneğinden sonra araya su içeren negatif kontrol eklendi (Şekil 4. 10). HDV RNA standartlarının döngü eşik değerlerine karşılık (CT:cycle threshold) başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğrular oluşturularak çift şekilde çalışılan her bir örneğin ortalaması hesaplanıp viral yükü belirlenmiş oldu. Çalışmamızda başarılı bir biçimde değerlendirilen hastaların viral yükleri 144 ile $1,99 \times 10^8$ kopya/ μ l arasında değişmekteydi.



Şekil 4. 10 Hasta örneklerinin ABI 7300 'real time' PZR sisteminde Taqman EZ-RT PCR kit ile kantitasyonu (yalnızca hasta örnekleri gösterilmiştir).



Şekil 4. 11 Hasta örneklerinin viral yükünü belirlemek amacıyla deneyde kullanılan ve viral yükleri 10^6 kopyadan 10^2 kopyaya kadar olan HDV RNA standartlarının döngü eşik değerleri.



Şekil 4. 12 Bir önceki Şekil 4. 11’de döngü eşik değerleri verilen HDV RNA standartlarının döngü eşik değerlerine karşılık (CT:cycle threshold) başlangıçtaki genom kopyalarının logaritmik konsantrasyonlarının olduğu standart doğru.

Ayrıca deneyimizin tekrarlanabilirliğini ölçmek amacıyla deneylerde kullanılan plazma örneklerinden her seferinde dört defa olmak üzere viral RNA izolasyonu yapıldı, ters transkripsiyon reaksiyonunun ardından (yalnızca Light cyclers 'real time' PZR sistemi için) bu örnekler, her bir 'real time' PZR sisteminde analiz edilerek deney içi varyasyonlar (intra-assay variability) hesaplandı. Bunun yanında bu deneyler üç ayrı günde tekrarlanarak deneyler arası varyasyonlar da (inter-assay variability) hesaplandı.

Buna göre ABI 7300 'real time' PZR sisteminde analiz edilen beş örneğin viral yükleri 10^7 ile 10^3 kopya arasında bulunmaktaydı. Bu örneklerin döngü eşik değerlerine (CT) göre hesaplanan deney içi varyasyon katsayıları (CV), % 0,55 ile % 3,47 arasında değişmekteydi. Yine aynı sistemde farklı günlerde yapılan deneyler arasındaki varyasyon ise % 2,46 ile % 4,42 arasında değişmekteydi (Çizelge 4. 1).

Light cyclers 'real time' PZR sisteminde analiz edilen ve viral yükleri 10^7 ile 10^4 kopya arasında değişen dört örneğin döngü eşik değerlerine (CT) göre hesaplanan deney içi varyasyon katsayıları (CV) ise % 0,21 ile 3,60 arasında değişmekteydi. Yine bu sistemde farklı günlerde yapılan deneyler arasındaki varyasyon ise % 1,43 ile % 3,24 arasında değişmekteydi (Çizelge 4. 2).

Çizelge 4. 1 ABI 7300 ‘real time’ PZR sisteminde hesaplanan deney içi ve deneyler arası varyasyon değerleri (CT: döngü eşik değeri, SD: standart sapma, CV: varyasyon katsayısı).

Örnek	Deney içi varyasyon						Deneyler arası varyasyon	
	1.gün		2.gün		3.gün		Ort. CT ± S.D.	CV (%)
	Ort. CT ± S.D.	CV (%)	Ort. CT ± S.D.	CV (%)	Ort. CT ± S.D.	CV (%)		
IT	27,07 ± 0,15	0,55	26,03 ± 0,35	1,34	27,19 ± 0,64	2,35	26,76 ± 0,66	2,46
FO	22,89 ± 0,43	1,87	23,83 ± 0,41	1,72	21,67 ± 0,53	2,44	22,80 ± 1,01	4,42
HD	35,99 ± 0,31	0,86	35,16 ± 1,08	3,07	34,38 ± 0,84	2,44	35,38 ± 0,98	2,76
BS	29,07 ± 0,63	2,16	28,02 ± 0,49	1,74	30,88 ± 0,73	2,36	29,09 ± 1,13	3,88
AT	27,64 ± 0,70	2,53	27,20 ± 0,74	2,72	27,93 ± 0,97	3,47	27,59 ± 0,81	2,93

56 Çizelge 4. 2 Light cycler ‘real time’ PZR sisteminde hesaplanan deney içi ve deneyler arası varyasyon değerleri (CT: döngü eşik değeri, SD: standart sapma, CV: varyasyon katsayısı).

Örnek	Deney içi varyasyon						Deneyler arası varyasyon	
	1. gün		2. gün		3. gün		Ort. CT ± S.D.	CV (%)
	Ort. CT ± S.D.	CV (%)	Ort. CT ± S.D.	CV (%)	Ort. CT ± S.D.	CV (%)		
FO	21,00 ± 0,49	2,33	21,77 ± 0,19	0,87	20,65 ± 0,20	0,96	21,14 ± 0,57	2,69
BB	24,70 ± 0,36	1,45	25,38 ± 0,23	0,90	25,02 ± 0,19	0,75	25,06 ± 0,36	1,43
MB	29,33 ± 1,07	3,60	29,62 ± 0,43	1,45	28,97 ± 0,41	1,41	29,31 ± 0,70	2,38
OO	31,95 ± 0,07	0,21	29,96 ± 0,73	2,43	30,09 ± 0,22	0,73	30,55 ± 0,99	3,24

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

HDV, defektif bir RNA virüsüdür ve yalnızca Hepatit B enfeksiyonu olan bireylerde hastalık yapabilmektedir. Kronik HBV-HDV enfeksiyonu, çoğunlukla siroza ilerler ve bu tip enfeksiyonlar için mortalite oranı tek başına kronik HBV enfeksiyonundan daha yüksektir (Saracco et al. 1987). HDV enfeksiyonu için spesifik bir tedavi bulunmamaktadır. Kronik HDV enfeksiyonu tedavisinde günümüzde kullanılan ilaç interferondur.

HDV enfeksiyon tanısı ya da uygulanan tedavinin etkinliği ise genellikle spesifik anti-HDV IgM veya HDV-RNA gibi biyokimyasal, histolojik ve virolojik parametrelerle değerlendirilmektedir. Bunun yanında akut enfeksiyon vakaları ya da immün sistemi baskılanmış bireylerdeki kronik enfeksiyonlar dışında HDV antijeninin serumda saptanması çok nadirdir. Bu sebeple HDV RNA'nın serumda belirlenmesiyle HDV replikasyonu en iyi şekilde değerlendirilebilir.

Ters-transkripsiyon-PZR'nin ise HDV RNA'nın saptanmasında en duyarlı yöntem olduğu bildirilmiştir (Madejon et al. 1990, Jardi et al. 1994). HDV-RNA'nın serum ya da plazmada saptanması ise konvansiyonel kalitatif RT-PCR teknikleri ile yapılır ve viral replikasyonu yansıtır. Serumda HDV RNA düzeyini belirlemek için birçok semikantitatif yöntem önerilmesine rağmen bunların kesinlikleri yoktur ve rutin laboratuvar koşulları içerisinde uygulamak oldukça güçtür.

Son yıllarda çeşitli kronik viral enfeksiyonlar ile mücadele, kantitatif moleküler uygulamalara gittikçe daha bağımlı hale gelmiştir. HDV için de enfeksiyon şiddeti ve tedavi sonucundaki belirsizlikler, tedavi verimliliğini gözlemlemek üzere HDV-RNA'yı kantitatif olarak saptayabilecek güvenilir testlerin geliştirilmesinde tetikleyici faktörler olmuştur.

Taqman 'real time' PZR sistemi PZR ürünlerinin miktarının belirlenmesinde oldukça duyarlı ve hızlı bir sistemdir ve yüksek duyarlılık ve kesinlik ile Hepatit C ve Hepatit B virüslerinin kantitatif analizinde başarılı bir biçimde uygulanmıştır. Çalışmamızda da kullandığımız Taqman oligoprobları, 5' ve 3' ucunda floresan özellikli madde içeren dizi spesifik oligoproblardır. DNA polimeraz enzimi ilgili DNA ipliği üzerinde ilerlerken

hibridize olmuş oligoproba geldiğinde onu 5'-3' nükleolitik aktivitesiyle keser. Böylece '5' reporter' floresan madde eksitasyon enerjisini '3' quencher' moleküle transfer edemez ve eksitasyon enerjisini alet tarafından eş zamanlı olarak monitorize edilebilen belli bir dalga boyunda salar. Bu dalga boyu, 'quencher' molekülün yayımladığından farklıdır.

Genomik dizileri bakımından farklı HDV genotipleri arasındaki yüksek heterojeniteden ve HDV genomunda yüksek oranda baz eşleşmelerinden dolayı oluşan ikincil yapılar sebebiyle 'real time' RT-PZR'nin optimal koşullarda yapılması oldukça önemlidir.

HDV RNA'nın uygun şekilde izolasyonu ve o bölgede baskın olarak bulunan HDV genotipinin korunmuş bölgeleri hedef alınarak tasarlanmış primerler, deneyin yüksek duyarlılıkta olmasına imkan sağlamaktadır. Bu koşullar gözönüne alınarak yapılan çalışmalarda, akut HDV süperenfeksiyonu olan hastaların % 97'sinde, anti-HDV'si pozitif olan kronik hepatit hastalarının % 75'inde, anti-HDV'si pozitif sirotik hastaların %74'ünde, anti-HDV'si pozitif hepatoselüler kanserli hastaların % 63'ünde HDV RNA saptanabilmiştir (Wu et al. 1995a). Ayrıca Northern blot ya da nokta blot hibridizasyonu yöntemleriyle serum HDV RNA'ları negatif gözükten hastaların serum örneklerinden PZR yapıldığında önemli bir bölümünün saptanabilir düzeyde HDV RNA'ya sahip olduğu gözlenmiştir (Madejon et al. 1990, Huang et al. 1998).

Bizim çalışmamızda da bu önbilgiler ışığında yola çıkılarak farklı bölgelere ait HDV izolatları ve daha önce laboratuvarımızda dizi analizinin yapıldığı iki tam genom HDV dizileri karşılaştırılarak genom üzerinde delta antijeni bölgesi ve ribozim bölgesi üzerindeki en korunmuş diziler hedef alınmış ve bu bölgelere özgü primer ve proplar tasarlanmıştır.

Çalışmamızda farklı kitler ile farklı 'real time' PZR cihazlarında denenen primer-prob sistemlerinden ribozim bölgesini hedef alan LNA1 ve LNA2 primer-prob sistemi çalışmazken, delta antijen bölgesi üzerinde yer alan dizileri hedef alan JF1, JR1 primerleri ile JPR1 probu ABI 7300 'real time' PZR sisteminde, DF1, DF2 primerleri ile DPR1 probu ise Light cycler 'real time' PZR sisteminde verimli bir biçimde çalışmıştır. Böylece çalışmamızda HDV RNA, iki farklı 'real time' PZR sistemi ve farklı kitler ile çoğaltılabilmektedir.

HDV RNA, Light cycler 'real time' PZR sistemimizde iki aşamalı şekilde başarılı bir biçimde çoğaltılabilirken, ABI 7300 'real time' PZR sistemimizde tek aşamada yani RNA'nın cDNA'ya çevrilmesi (ters transkripsiyon) ve DNA'nın çoğaltılması aşamaları tek tüp içerisinde yapılarak yüksek duyarlılık ve kesinlikte çoğaltılabilmektedir. Bu bakımdan HDV RNA'nın 'real time' PZR sisteminde çoğaltılmasına yönelik sınırlı sayıdaki çalışmalar arasında çalışmamız ters transkripsiyon ve polimerizasyon aşamalarının aynı tüp içerisinde yapılabilmesi sebebiyle ilktir.

Real time PZR'nin konvansiyonel PZR'ye göre pek çok avantajı bulunmaktadır. Real time PZR ile kısa sürede sonuç alınabilmesi sistemin en önemli avantajlarından biridir. Bizim çalışmamızda olduğu gibi uygun enzim sistemi ile ters transkripsiyon ve polimerizasyon aşamalarının aynı tüp içerisinde yapılabilmesi ile de zaman tasarrufu sağlanmış, kontaminasyon riski de en az seviyeye indirilmiştir. Real time PZR ile bütün çalışma tek tüp içerisinde yapılabilirdi için PZR sonrası jel elektroforezi gibi işlemlere de gerek kalmamaktadır.

Rutin laboratuvarları için hızlı ve doğru sonuç alabilmek oldukça önemlidir. Real time PZR'nin, konvansiyonel PZR'ye göre daha duyarlı ve hızlı bir yöntem olması bu gerekliliğe uymaktadır. Çalışmamızda düşük viral yüke sahip örneklerin de saptanabilmesi ve her örnek arasına konan negatif kontroller ile yalancı pozitifliğin önüne geçilmesi de çalışmamızın güvenilirliğini artırmaktadır.

Çalışmamızda ayrıca Light cycler 'real time' PZR sistemimizi test etmek amacıyla daha önce konvansiyonel PZR yöntemleriyle HDV-RNA'sının pozitif olduğu bilinen 40 hasta örneğinin tamamının HDV viral yüklerinin kantitasyonu yapılmıştır. Bunun yanında ABI 7300 'real time' PZR sistemimizde optimize edilmiş primerler ve prob kullanılarak interferon ya da PEG-interferon tedavisi almış 22 hastanın tedavi başlangıcındaki ve tedavinin 6. ve 12. aylarındaki serum HDV-RNA değerleri de belirlenmiştir. Böylece kronik HDV enfeksiyonu olan hastaların tedavi öncesi, tedavi sırasında ve tedavi sonrası profilleri değerlendirilebilecek, ayrıca HDV enfeksiyonunun doğal seyri de izlenebilecektir.

HDV RNA'nın kantitatif ölçümü, HDV enfeksiyonlarının patofizyolojisinin analizinde önemli olabilir, HDV biyolojisini anlamaya yönelik çalışmalarda da kullanışlı olabilir.

HDV RNA düzeyleri ile hastalık seyri arasındaki ilişki analiz edilerek hastalığın tedavisinde izlenecek yolların belirlenmesinde ve yeni ilaçların etkilerinin değerlendirilmesinde HDV RNA'nın kantitatif analizi yararlı olabilecektir.

Bugüne kadar HDV RNA'nın kantitasyonu için kullanılabilir uluslararası bir standart ya da kontrol bulunmamaktadır. Ayrıca HDV RNA'nın saptanması için ticari bir kit de henüz mevcut değildir. Bunun sebebi ise Avrupa'da Hepatit B virüsüne karşı yapılan aşılama ile HDV sıklığının da azaltılmış olmasıdır. Bu da bu virüsün yapmış olduğu enfeksiyona olan ilgiyi azaltmaktadır. Fakat HBV enfeksiyonunun kontrol edilemediği gelişmekte olan dünyanın pek çok bölgesinde HDV hala büyük bir sağlık problemi olarak karşımıza çıkmaktadır.

Sonuç olarak serumda HDV RNA düzeylerini saptayabilecek duyarlı ve tekrarlanabilirliği yüksek iki farklı yöntem geliştirilmiştir. Çalışmamızda geliştirdiğimiz farklı 'real time' PZR sistemlerinde HDV-RNA'yı kantitatif olarak saptamaya yönelik bu testlerin, laboratuvarımızda rutin tanı prosedürü içinde kullanılan kalitatif testin yerini alması amaçlanmaktadır. Böylece serumda HDV RNA'nın saptanmasında yüksek kesinlik ve doğrulukta, ayrıca hızlı bir biçimde sonuçların alınmasının yolu açılmış olacaktır.

KAYNAKLAR

- Argona, M., Macagno, S., Carreda, F. et al. 1987. Serological response to the hepatitis delta virus in hepatitis D. *Lancet* 1, 478-80.
- Barrera, A., Guerra, B., Notvall, L., Lanford, R.E., 2005. Mapping of the hepatitis B virus pre-S1 domain involved in receptor recognition. *J Virol.* 79, 9786– 98.
- Bichko, V., Netter, H. J., Taylor, J. 1994a. Introduction of hepatitis delta virus into animal cell lines via cationic liposomes. *J. Virol* 68, 5247-52.
- Bichko, V., Netter, H. J., Wu, T. T. et al. 1994b. Pathogenesis associated with replication of hepatitis delta virus. *Infect Agents Dis*, 3, 94–7.
- Bonino F., Hoyer B., Shih J. et al. 1984. Delta Hepatitis agent: Structural and antigenic properties of the delta associated particles. *Infect Immunity* 43, 1000-5.
- Bonino, F., Caporaso, N., Dentico, P. et al. 1985. Familiar clustering and spreading of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol*, 1,221–6.
- Bonino, F., Heermann, K. H., Rizzetto, M., et al. 1986. Hepatitis delta virus: protein composition delta antigen and its hepatitis B virus-derived envelope. *J Virol*, 58, 945–50.
- Branch, A. D., and H. D. Robertson. 1984. A replication cycle for viroids and other small infectious RNAs. *Science*, 223, 450–5.
- Cariani, E., Ravaggi, A., Puoti, M. et al. 1992. Evaluation of hepatitis delta virus RNA levels during interferon therapy by analysis of polymerase chain reaction products with a nonradioisotopic hybridization assay *Hepatology*, 15, 685-9.
- Casey, J. L., Brown, T. L., Colan, E. J. et al. 1993. A genotype of hepatitis D virus that occurs in northern South America. *Proc Natl Acad Sci USA*, 90, 9016–20.
- Casey, J. L. 2006. Hepatitis Delta Virus RNA editing. Ed. Handa H., Yamaguchi Y. *Hepatitis Delta Virus*. Springer Science+ Business Media, 52-65, New York.
- Chang, F.L., Chen, P.J., Tu, S.J., Chiu, M.N., Wang, C.J., Chen, D.S. 1991. The large form of hepatitis delta antigen is crucial for the assembly of hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 88, 8490– 4.
- Chang J., Sigal L. J., Lerro A. 2001. Replication of the human HDV virus genome is initiated in mouse hepatocytes following intravenous injection of naked DANN or RNA sequences. *J Virol* 75, 3469-73.
- Chang, J., Gudima, S.O., Taylor, J. M. 2005. Evolution of hepatitis delta virus RNA genome following long-term replication in cell culture. *J. Virol.* 79, 13310-6.

- Chang, M. F., Baker, S. C., Soe, L. E., et al. 1988. Human hepatitis delta antigen is a nuclear phosphoprotein with RNA binding activity. *J. Virol* 62: 2403-10.
- Chao, M., Hsieh, S.-Y., Taylor, J. 1990. Role of two forms of the hepatitis delta virus antigen: evidence for a mechanism of self-limiting genome replication. *J Virol*, 64, 5066–9.
- Chao, M., Hsieh, S. Y., Taylor, J. 1991. The antigen of hepatitis delta virus:examination of in vitro RNA binding specificity. *J Virol*, 65, 4057-62.
- Chao, Y. C., Chang, M. F., Gust, I., et al. 1990. Sequence conservation and divergence of hepatitis delta virus RNA. *Virology*, 178, 384–92.
- Chao, Y. C., Lee, C. M., Tang, H. S. et al. 1991. Molecular cloning and characterization of an isolate of hepatitis delta virus from Taiwan. *Hepatology*, 13, 345–52.
- Chen, C. W., Tasy, Y. G., Wu, H. L., et al. 2002. The double stranded RNA activated kinase, PKR can phosphorylate hepatitis D virus small delta antigen at functional serine and threonine residues. *J Biol Chem* 277: 33058-67.
- Chen, P.-J., G. Kalpana, J. Goldberg, W. Mason, B. Werner, J. L. Gerin, and J. Taylor. 1986. Structure and replication of the genome of hepatitis delta virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 83, 8774–8.
- Chen, P. J., Chang, F. L., Wang, C. J. 1992. Functional studies of hepatitis delta virus large antigen in packaging and replication inhibition: role of the amino terminal leucine zipper. *J Virol* 66: 2853-9.
- Chou, H. C., Hsieh, T. Y., Sheu, G. T. et al. 1998. Hepatitis delta antigen mediates the nuclear import of hepatitis delta virus RNA. *J Virol* 72: 3684-90.
- Cole, S. M., Gowans, E. J., Macnaughton, T. B. et al. 1991. Direct evidence for cytotoxicity associated with expression of hepatitis delta virus antigen. *Hepatology*, 13, 845–51.
- Dalekos, G. N., Zervou, E., Karabini, F. et al. 1995. Prevalence of viral markers among refugees from southern Albania: increased incidence of infection with hepatitis A, B and D viruses. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 7, 553–8.
- De Bruin, W., Leenders, W., Kos, T. et al. 1994. In vitro binding properties of the hepatitis delta antigens to the hepatitis B virus envelope proteins: potential significance for the formation of delta particles. *Virus Res* 31: 27-37.
- Deny P. 2006. Hepatitis Delta Virus Genetic Variability: from genotypes I, II, III to Eight Major Clades? Ed. Casey J. L. *Hepatitis Delta Virus*. Springer-Verlag 151-71, Berlin.
- Diener, T.O., Pruisner, S. B. Viroids and prions. 1985 In: K Maramorosch and JJ McKelvey, eds. *Subviral pathogens of plants and animals*. Orlando, Academic, , 3–18.

- Elena, S. F., Dopazo, J., Flores, R. et al. 1991. Phylogeny of viroids, viroidlike satellite RNAs, and the viroidlike domain of hepatitis delta virus RNA. *Proc Natl Acad Sci USA*, 88, 5631–4.
- Enemoto, N., Watanabe, H., Nagayama, K., Yamashiro, T., Mamoru, W. 2006. Genotypes of Hepatitis delta virus. Springer science+ Business media, 1-9, New York.
- Farci, P. 2003. Delta hepatitis: an update. *J Hepatol* 39(Suppl 1):S212–9.
- Ferre-D'Amare, A.R., Zhou, K., Doudna, J.A., 1998. Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* 395, 567– 574.
- Flores, R., Delgado, S., Gas, M.E., Carbonell, A., Molina, D., Gago, S., De la Pena, M. 2004. Viroids: the minimal non-coding RNAs with autonomous replication. *FEBS Lett*, 567, 42–48.
- Ganem, D., Schneider, R. 2001. Hepadnaviridae: the viruses and their replication In Knipe, D. M., Howley, P. M., eds. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins 3037-50. Philadelphia.
- Gerin, J. L., Purcell, R. H. (2001). Hepatitis Delta Virus. In Knipe, D. M., Howley, P. M., eds. *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins 3037-50. Philadelphia.
- Glenn, J. S., Taylor, J. M., White, J. M. 1990. In vitro synthesized hepatitis delta virus RNA initiates genome replication in cultured cells. *J. Virol.* 64:3104-7.
- Gowans, E. J., Bonino, F. 1993. Hepatitis delta virus pathogenicity. *Prog Clin Biol Res*, 382, 125–30.
- Govindarajan, S., De Cock K. M., Redeker A. G. 1986. Natural course of delta superinfection in chronic hepatitis B virus-infected patients: Histologic study with multiple liver biopsies. *Gastroenterology* 6: 640-4.
- Govindarajan, S., Valinluck B., Peters R. L. 1996. Relapse of acute B viral hepatitis: Role of delta agent. *Gut* 27: 19-22.
- Gudima, S, Chang, J, Moraleda, G, Azvolinsky, A, Taylor, J. 2002. Parameters of human hepatitis delta virus genome replication: the quantity, quality, and intracellular distribution of viral proteins and RNA. *J Virol* 76(8): 3709-19.
- Gudima, S. O., J. Chang, and J. M. Taylor. 2004. Features affecting the ability of hepatitis delta virus RNAs to initiate RNA-directed RNA synthesis. *J. Virol.* 78:5737–5744.
- Hadler, S. C., De Monzo, M., Ponzetto, A. et al. 1984. Delta virus infection and severe hepatitis : An epidemic in Yucpa Indians of Venezuela. *Ann Intern Med* 100: 339-44.
- Hadziyannis, S. J. 1997. Decreasing prevalence of hepatitis D virus infection. *J Gastroenterol Hepatol* 12:745–6.

- Handa, H., Yamaguchi Y. 2006. Hepatitis delta virus. Springer Science+ Business Media, 92, New York.
- Huang, Y. H., Wu, J. C., Sheng, W. Y. et al. 1998. Diagnostic value of anti hepatitis D virus (HDV) antibodies revisited: A study of total and Ig M anti HDV compared with detection of HDV RNA by polymerase chain reaction. *J Gastroenterol Hepatol* 13: 57-61.
- Hwang, S. B., Lee, C. Z., Lai, M. M. C. 1992. Hepatitis delta antigen expressed by recombinant baculoviruses: comparison of biochemical properties and post translational modifications between the large and small forms. *Virology* 190: 413-22.
- Hwang, S. B., Lai, M. M. C. 1993. Isoprenylation mediates direct protein-protein interactions between hepatitis large delta antigen and hepatitis B virus surface antigen. *J Virol* 67: 7659-62.
- Hwang, S. B., Lai, M. M. C. 1994. Isoprenylation masks a conformational epitope and enhances trans dominant function of the large hepatitis delta antigen. *J Virol* 68: 2958- 64.
- Ivaniushina, V., Radjef, N., Alexeeva, M., Gault, E., Semenov, S., Salhi, M., Kiselev, O., Dény, P. 2001. Hepatitis delta virus genotypes I and II cocirculate in an endemic area of Yakutia, Russia. *J Gen Virol*, 82, 2709-18.
- Jardi, R., Buti, M., Rodriguez, F. et al. 1994. Comparative analysis of serological markers of chronic delta infection: HDV RNA, serum HDAg and anti-HD IgM. *J Virol Methods* 50: 59-66.
- Jard, R., Buti, M., Cotrino, M. et al. 1995. Determination of hepatitis delta virus RNA by polymerase chain reaction in acute and chronic delta infection. *Hepatology* 21: 25-9.
- Jeng, K. S., A. Daniel, and M. M. C. Lai. 1996. A pseudoknot ribozyme structure is active in vivo and required for hepatitis delta virus RNA replication. *J. Virol.* 70:2403–10.
- Kos,A., Dijkema, R., Arnberg, A.C. et al. 1986. The hepatitis delta virus possesses a circular RNA. *Nature* 323: 558–60.
- Kuo, M. Y. P., Sharmeen, L., Dinter-Gottlieb, G. et al. 1988. Characterization of self-cleaving RNA sequences on the genome and antigenome of human hepatitis delta virus. *J Virol*, 62, 4439–44.
- Kuo, M.Y.-P., Goldberg, J., Coates, L., Mason, W., Gerin, J., Taylor, J., 1988. Molecular cloning of hepatitis delta virus RNA from an infected woodchuck liver: sequence, structure, and applications. *J. Virol.*, 62, 1855–1861
- Kuo, M. Y. P., Chao, M., Taylor, J. 1989. Initiation of replication of the human hepatitis delta virus genome from cloned DNA: role of delta antigen. *J Virol*, 63, 1945–50.
- Lai, M. M. 1995. The molecular biology of hepatitis delta virus . *Annu Rev Biochem*, 64: 259- 86.

- Lai, M. M. C. 2005. RNA replication without RNA dependent RNA polymerase: surprises from hepatitis delta virus. *J Virol*, 79, 7951-7958.
- Lai, M. M. C. 2006. Hepatitis delta antigen: biochemical properties and functional roles in HDV replication. Ed. Handa H. and Yamaguchi Y. *Hepatitis Delta Virus*, Springer Science+ Business Media, 38-51, New York.
- Lee, C. M., Bih, F. Y., Chao, Y. C., et al. 1992. Evolution of hepatitis delta virus RNA during chronic infection. *Virology*, 188, 265–73.
- Lee C. Z., Lin J. H., Mcknight K. et al. 1993. RNA binding activity of hepatitis delta antigen involves two arginine rich motifs and is required for hepatitis delta virus RNA replication. *J Virol*, 67, 2221-9.
- Lee, C. Z., Chen, P. J., Chen, D. S. 1995. Large hepatitis delta antigen in packaging and replication inhibition: role of the carboxyl terminal 19 amino acids and aminoterminal sequences. *J Virol*, 69, 5332-6.
- Le Gal, F., Gordien, E., Affolabi, D., Hanslik, T., Alloi, C., Deny, P., Gault, E. 2005. Quantification of HDV RNA in serum by consensus real time PCR indicates different patterns of virological response to interferon therapy in chronically infected patients. *J Clin Microbiology* 43, 2363-9.
- Li, Y.-J., Stallcup, M. R., and Lai, M. M. C. 2004. Hepatitis delta virus antigen is methylated at arginine residues, and methylation regulates subcellular localization and RNA replication. *J Virol*, 78, 13325–34.
- Macnaughton, T. B., Gowans, E. J., Jilbert, A. R., et al. 1990. Hepatitis delta virus RNA, protein synthesis and associated cytotoxicity in a stably transfected cell line. *Virology*, 177, 692–8.
- Macnaughton, T. B., Gowans, E. J., McNamara, S. P., Burrell, C. J. 1991. Hepatitis delta antigen is necessary for access of hepatitis delta virus RNA to the cell transcriptional machinery but is not part of the transcriptional complex. *Virology*, 184, 387–90.
- Macnaughton, T. B., Wang, Y.-J., Lai, M. M. C. 1993. Replication of hepatitis delta virus RNA: effect of mutations of the autocatalytic cleavage sites. *J Virol*, 67, 2228–34.
- Macnaughton, T. B., Shi S. T., Modahl, L. E., Lai, M. M. 2002a. Rolling circle replication of hepatitis delta virus RNA is carried out by two different cellular RNA polymerases. *J Virol*, 76, 3920–27.
- Macnaughton, T. B., Lai M. M. 2002b. Genomic but not antigenomic hepatitis delta virus RNA is preferentially exported from the nucleus immediately after synthesis and processing. *J Virol*, 76, 3928-35.
- Macnaughton, T. B., Lai M. M. 2006. HDV RNA replication: Ancient relic or primer? Ed. Casey J. L. *Hepatitis Delta Virus*, Springer- Verlag, 25-45, Berlin.
- Madejon, A., Castillo, I., Bartolome, J. et al. 1990. Detection of HDV RNA by PCR in serum of patients with chronic HDV infection. *J Hepatol* 11: 381-4.

- Mıstık, R., Balık I. Türkiye’de viral hepatitlerin epidemiyolojik analizi. In: Kılıçturgay K, Badur S. (eds), Viral hepatit 2001. İstanbul, Viral Hepatitle Savaşım Derneği, 2001, 10-55.
- Michael, M. C. Lai. 2005. RNA Replication without RNA-Dependent RNA Polymerase: Surprises from Hepatitis Delta Virus *J. virol.* 79:51–8.
- Modahl, L. E., Lai, M. M. C. 1998. Transcription of hepatitis delta antigen mRNA continues throughout hepatitis delta virus (HDV) replication. A new model of HDV RNA transcription and regulation. *J. Virol.* 72, 5449-56.
- Modahl, L. E., Lai, M. M. C. 2000a. Hepatitis Delta Virus: The Molecular Basis of Laboratory Diagnosis *Critical Reviews in Clinical Laboratory Sciences*, 37, 45–92.
- Modahl, L. E., Lai, M. M. 2000b. The large delta antigen of hepatitis delta virus potently inhibits genomic but not antigenomic RNA synthesis: a mechanism enabling initiation of viral replication. *J Virol*, 74, 7375–80.
- Modahl, L. E., Macnaughton, T. B., Zhu, N., Johnson, D. L., Lai, M. M. C. 2000c. RNA-dependent replication and transcription of hepatitis delta virus RNA involve distinct cellular RNA polymerases. *Mol Cell Biol*, 20, 6030–9.
- Mu, J. J., Wu, H. L., Chiang, B. L. et al. 1999. Characterization of the phosphorylated forms and the phosphorylated residues of HDV delta antigens. *J Virol* 73: 10540-5.
- Mu, J. J., Tsay, Y. G., Juan, L. J. et al. 2004. The small delta antigen of hepatitis delta virus is an acetylated protein and acetylation of lysine 72 may influence its cellular localization and viral RNA synthesis. *Virology* 319: 60-70.
- Mu, J.-J., Chen, D. S., Chen, P.-J. 2001. The conserved serine 177 in the delta antigen of hepatitis delta virus is one putative phosphorylation site and is required for efficient viral RNA replication. *J Virol*, 75, 9087–95.
- Mumtaz, K., Hamid, S. S., Adil, S., et al. 2005. Epidemiology and clinical pattern of hepatitis delta virus infection in Pakistan. *J Gastroenterol Hepatol*, 20, 1503–7.
- Murphy, FA. *Virus taxonomy: sixth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Pp. 493–4. Wien; New York: Springer-Verlag, 1995.
- Negro, F., Baldi, M., Bonino, F. et al. 1988. Chronic HDV (hepatitis delta virus) hepatitis. Intrahepatic expression of delta antigen, histologic activity and outcome of liver disease. *J Hepatol*, 6, 8–14.
- Negro, F., Rizzetto, M. 1995. Diagnosis of hepatitis delta virus infection. *J Hepatol*, 22, 136–9.
- Netter, H. J., Kajino K., Taylor J. 1993. Experimental transmission of human hepatitis delta virus to the laboratory mouse. *J Virol* 67, 3357-62.
- Nie, X., Chang, J., Taylor, J.M., 2004. Alternative processing of hepatitis delta virus antigenomic RNA transcripts. *J Virol*, 78, 4517– 24.

- Niro, G. A., Casey, J. L., Gravinese, E. et al. 1999. Intrafamilial transmission of hepatitis delta virus: molecular evidence. *J Hepatol*, 30, 564–9.
- Poisson, F., Roingeard P., Baillou A. et al. 1993. Characterization of RNA binding domains of hepatitis delta antigen. *J Gen Virol* 74: 2473-7.
- Polo J. M., Lim B., Govindarajan S. et al. 1995. Replication of HDV RNA in mice after intramuscular injection of plasmid DNA. *J Virol* 69, 5203-7.
- Ponzetto, A., Cote P. J., Popper H. Et al. 1984. transmission of the hepatitis B virus associated delta agent to the eastern woodchuck. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 81:2208-12.
- Perrotta, A.T., Been, M. D. 1990. The self-cleaving domain from the genomic RNA of hepatitis delta virus: sequence requirements and the effects of denaturant. *Nucleic Acids Res* 18: 6821–7.
- Rapicetta M., Ciccaglione A. R., D’Urso N. 1993. Chronic infection in woodchucks infected by a cloned HDV. In: Hadziyannis S. J., Taylor J. M., Bonino F. eds. *Hepatitis delta virus: Molecular Biology, Pathogenesis, and clinical aspects*. Wiley Liss, 451, New York.
- Reid, C.E., Lazinski, D.W. 2000. A host-specific function is required for ligation of a wide variety of ribozyme-processed RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 424– 429.
- Rizzetto, M., Canese, M. G., Arico, S. et al. 1977. Immunofluorescence detection of new antigen-antibody system (delta-anti delta) associated to hepatitis B virus in liver and in serum of HbsAg carriers. *Gut*, 18: 997-1003.
- Rizzetto, M., Canese M. G., Gerin J. L. et al. 1980a. Transmission of the hepatitis B virus associated delta antigen to chimpanzees. *J Infect Dis*, 141(5):509-602.
- Rizzetto , M., Hoyer, B., Canese, M. G. et al. 1980b. Delta agent: association of delta antigen with hepatitis B surface antigen and RNA in serum of delta infected chimpanzees. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77: 6124-8.
- Rizzetto, M., Ponzetto, A., Forzani I. 1991. Epidemiology of hepatitis delta virus: overview. *Prog Clin Biol Res*, 364, 1–20.
- Rizzetto, M., Hadziyannis, S., Hansson, B.G. et al. 1992. Hepatitis delta virus infection in the world: epidemiological patterns and clinical expression. *Gastroenterol Int* 5:18–32.
- Rosina, F., Saracco, G., Rizzetto, M. 1985. Risk of post-transfusion infection with the hepatitis delta virus. A multicenter study. *N Engl J Med*, 312, 1488–91.
- Ryu, W. S., Netter, H. J., Bayer, M., et al. 1993. Ribonucleoprotein complexes of hepatitis delta virus. *J Virol*; 67: 3281–7.
- Sakugawa, H., Nakasone, H., Shokita, H. et al. 1995. Seroepidemiological study of hepatitis delta virus infection in Okinawa, Japan. *J Med Virol*, 45, 312–5.

- Salvi, S., D'Orso, F., Morelli, G. 2008. Detection and quantification of genetically modified organisms using very short locked nucleic acid taqman probes. *J Agric Food Chem*, 56, 4320-7.
- Saracco, G., F. Rosina, M. R. Brunetto, P. Amoroso, F. Caredda, P. Farci, P. Piantino, F. Bonino, and M. Rizzetto. 1987. Rapidly progressive HbsAgpositive hepatitis in Italy. The role of hepatitis delta virus infection. *J. Hepatol.* 5:274–281.
- Sharmeen, L., Kuo, M. Y. P., Dinter-Gottlieb, G. et al. 1988. The antigenomic RNA of human hepatitis delta virus can undergo self-cleavage. *J Virol*, 62, 2674–9.
- Shattock A. G., Morgan B. M. 1984. Sensitive enzyme immunoassay for the detection of delta antigen and anti delta, using serum as the delta antigen source. *J Med Virol* 13: 73-82.
- Sheu, G.-T., Lai, M. M. C. 2000. Recombinant hepatitis delta antigen from *E. coli* promotes hepatitis delta virus RNA replication only from the genomic strand but not the antigenomic strand. *Virology*, 278, 578–86.
- Singh, V., Goenka, M. K., Bhasin, D. K., et al. 1995. A study of hepatitis delta virus infection in patients with acute and chronic liver disease from northern India. *J Viral Hepat*, 2, 151–4.
- Smedile A., Bergmann K. F., Baroudy B. M. et al. 1990. Riboprobe assay for HDV RNA: A sensitive method for the detection of the HDV genome in clinical serum sample. *J Med Virol* 30: 20-4.
- Su, C. W., Huang, Y. H., Huo, T. I., et al. 2006. Genotypes and viremia of hepatitis B and D viruses are associated with outcomes of chronic hepatitis D patients. *Gastroenterology*, 130, 1625–35.
- Sureau C., Taylor J., Chao M. et al. 1989. A cloned DNA copy of HDV is infectious in the chimpanzee. *J Virol*, 63, 4292-7.
- Sureau C., Jacob J. R., Eichberg J. W. et al. 1991. Tissue culture system for infection with human hepatitis delta virus. *J. Virol.* 65, 3443-50.
- Sureau, C., Fournier-Wirth, C., Maurel, P., 2003. Role of N glycosylation of hepatitis B virus envelope proteins in morphogenesis and infectivity of hepatitis delta virus. *J Virol*, 77, 5519– 23.
- Tavanez J.P., Cunha C., Silva M. C. A. et al. 2002. Hepatitis delta virus ribonucleoproteins shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *RNA* 8: 637-46.
- Taylor J., Mason W., Summers J. et al. 1987. Replication of human hepatitis delta virus in primary cultures of woodchuck hepatocytes. *J. Virol.* 61: 2891-5.
- Taylor J. M. 2006a. Hepatitis delta virus. *Virology* 344:71-76.

- Taylor J. M. 2006b. Structure and replication of hepatitis delta virus RNA. Ed. Handa H., Yamaguchi Y. *Hepatitis Delta Virus*, Springer Science+ Business Media, 20-37, New York.
- Toukan, A. U., al-Kandari, S. 1991. The role of hepatitis D virus in liver disease in the Middle East. *Prog Clin Biol Res* 364:63–8.
- Wang, K.-S., Choo, Q.-L., Weiner, A.J., Ou, J.-H., Najarian, C., Thayer, R.M., Mullenbach, G.T., Denniston, K.J., Gerin, J.L., Houghton, M. 1986. Structure, sequence and expression of the hepatitis delta viral genome. *Nature* 323, 508–513.
- Wong, S. K., Lazinski, D.W. 2002. Replicating hepatitis delta virus RNA is edited in the nucleus by the small form of ADAR1. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 99, 15118–23.
- Wu, H. N., Wang Y. J., Hung C.F., et al. 1992. Sequence and structure of the catalytic RNA of hepatitis delta virus genomic RNA. *J Mol Biol* 223: 233–45.
- Wu, J. C., Lee, S. D., Govindarajan S. et al. 1990. Sexual transmission of hepatitis D virus infection in Taiwan. *Hepatology*, 11, 1057–61.
- Wu J. C., Chen P. J., Kuo M. Y. P. et al. 1991. Production of hepatitis D virus and suppression of helper hepatitis B virus in a human hepatoma cell line. *J Virol* 65: 1099-104.
- Wu J. C., Chen C. H., Hou M. C. et al. 1994. Multiple viral infections as the most common cause of fulminant and subfulminant viral hepatitis in an endemic area for hepatitis B: Application and limitations of polymerase chain reaction. *Hepatology* 19: 836-40.
- Wu J. C., Chen T. Z., Huang Y. S. et al. 1995a. Natural history of hepatitis D viral superinfection- significance of viremia detected by polymerase chain reaction. *Gastroenterology* 108: 796-802.
- Wu, J. C., Chen, C. M., Sheen, I. J., et al. 1995b. Evidence of transmission of hepatitis D virus to spouses from sequence analysis of the viral genome. *Hepatology*, 22, 1656–60.
- Wu, J. C., Choo K. B., Chen C. M. et al. 1995c. Genotyping of hepatitis D virus by restriction fragment length polymorphism and relation to outcome of hepatitis D. *Lancet*, 346(8980): 939-41.
- Wu, J. C. 2006. Diagnosis of hepatitis D virus infection. Ed. Handa H., Yamaguchi Y. *Hepatitis Delta Virus*, Springer Science+Business Media, 81-92, New York.
- Xia, Y. P., Lai M. M. C. 1992. Oligomerization of hepatitis delta antigen is required for both the trans activating and trans dominant inhibitory activities of the delta antigen. *J Virol* 66: 6641-8.
- Yamashiro, T., Nagayama, K., Enomoto N., Watanabe H., Miyagi T., Nakasone H., Sakugawa H., Watanabe M. 2004. Quantitation of the level of HDV RNA in serum by real time PCR and its possible correlation with the clinical stage of liver disease. *Journal of Infectious Diseases* 189, 1151-7.

Yeh, T. S., Lo S. J., Chen P. J. et al. 1996. Casein kinase II and protein kinase C modulate hepatitis delta virus RNA replication but not empty viral particle assembly. *J Virol* 70, 6190-8.

ÖZGEÇMİŞ

Adı Soyadı : Yasemin ÇELİK

Doğum Yeri : Ankara

Doğum Tarihi : 1979

Medeni hali : Bekar

Yabancı Dili : İngilizce

Eğitim Durumu (Kurum ve Yıl)

Lise : Fatih Sultan Mehmet Lisesi Ankara-1997

Lisans : Ankara Üniversitesi, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü-2002

Yüksek Lisans: Ankara Üniversitesi Biyoteknoloji Enstitüsü-2004

Çalıştığı Kurum/Kurumlar ve Yıl: Ankara Üniversitesi Tıp Fakültesi Gastroenteroloji Bilim Dalı-2007-

Yayımları (SCI ve diğer):

- 1- Cytokine gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. **Celik Y**, Dagli U, Kilic MY, Törüner M, Ozen SC, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Scand J Gastroenterol. 2006 May;41(5):559-65.
- 2- NOD2/CARD15, NOD1/CARD4, and ICAM-1 gene polymorphisms in Turkish patients with inflammatory bowel disease. Ozen SC, Dagli U, Kilic MY, Törüner M, **Celik Y**, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. J Gastroenterol. 2006 Apr;41(4):304-10.
- 3- Effects of polymorphism in G2677T/A triallelic region of MDR1 gene in Turkish patients with inflammatory bowel disease. Sapmaz A, Ozen Karatayli SC, Dağlı U, Kiliç ZM, Törüner M, **Celik Y**, Ozkan M, Soykan I, Cetinkaya H, Ulker A, Ozden A, Bozdayi AM. Turk J Gastroenterol. 2008 Sep;19(3):168-73.