



T.C.  
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GERÇEK ZAMANLI RT-PCR METODU İLE HIV-1  
PROVİRAL DNA KANTİTASYONUNUN  
OPTİMİZASYONUNDA KULLANILAN  
KANTİTASYON STANDARTLARININ GEN  
KLONLAMA TEKNOLOJİSİ İLE GELİŞTİRİLMESİ**

**Reyhanehsadat MİRBAKHT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**KIRŞEHİR-AĞUSTOS/2025**



T.C.  
KIRŞEHİR AHİ EVRAN ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ  
TIBBİ BİYOLOJİ ANABİLİM DALI

**GERÇEK ZAMANLI RT-PCR METODU İLE HIV-1  
PROVİRAL DNA KANTİTASYONUNUN  
OPTİMİZASYONUNDA KULLANILAN  
KANTİTASYON STANDARTLARININ GEN  
KLONLAMA TEKNOLOJİSİ İLE GELİŞTİRİLMESİ**

**Reyhanehsadat MİRBAKHT**

**YÜKSEK LİSANS TEZİ**

**DANIŞMAN**

**Prof. Dr. Elif SEVİM**

**KIRŞEHİR-AĞUSTOS/2025**

## **KABUL VE ONAY**

Gerçek Zamanlı RT-PCR Metodu ile HIV-1 Proviral DNA Kantitasyonunun Optimizasyonunda Kullanılan Kantitasyon Standartlarının Gen Klonlama Teknolojisi ile Geliştirilmesi adlı bu çalışma 27.08.2025 tarihinde aşağıdaki jüri tarafından Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı, Yüksek Lisans tezi olarak kabul edilmiştir.

### **Tez Jürisi**

Prof. Dr. Elif SEVİM (Danışman)  
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Prof. Dr. Serap YALÇIN AZARKAN  
Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

Doç. Dr. Fikriye Milletli Sezgin  
Amasya Üniversitesi  
Tıp Fakültesi

## **ETİK BEYAN VE ARAŞTIRMA FONU DESTEĞİ**

Tez içindeki bütün bilgilerin etik davranıő ve akademik kurallar çerçevesinde elde edilerek sunulduğunu, ayrıca tez yazım kurallarına uygun olarak hazırlanan bu çalışmada bana ait olmayan her türlü ifade bilginin kaynağına eksiksiz atıf yapıldığını bildiririm.

Reyhanehsadat MIRBAKHT

## ÖNSÖZ

Bu çalışma, Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı'nda "Yüksek Lisans Tezi" olarak hazırlanmıştır. Bu tez çalışmasının yürütülmesinde bilgi, deneyim ve değerli yönlendirmeleri ile bana rehberlik eden, her aşamada desteğini hissettiren birinci danışmanım Prof. Dr. Elif Sevim'e en içten teşekkürlerimi sunarım. Ayrıca, çalışmam boyunca bilimsel katkılarını esirgemeyen ve değerli görüşleriyle tezime yön veren Doç. Dr. Tülin Demir'e şükranlarımı sunarım. Araştırmamın çeşitli aşamalarında fikir ve deneyimlerini benimle paylaşarak çalışmamın gelişmesine katkı sağlayan Uzm. Bio. Kemal Gökçe ve Uzm. Bio. Neslihan Gökçe'ye teşekkür ederim. Son olarak, bu süreç boyunca her zaman yanımda olan, maddi ve manevi desteğini esirgemeyen sevgili eşim Dr. Bio. Hakan Farzin Mehmetzade'ye teşekkürlerimi sunarım.

Ağustos, 2025

Reyhanehsadat MIRBAKHT

# İÇİNDEKİLER

ÖNSÖZ .....	iv
İÇİNDEKİLER.....	v
ŞEKİL LİSTESİ.....	vii
TABLO LİSTESİ.....	viii
SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ.....	ix
ÖZET .....	x
ABSTRACT .....	xii
<b>1. GİRİŞ.....</b>	<b>1</b>
1.1. Amaç .....	2
1.2. Önem .....	2
<b>2. GENEL BİLGİLER.....</b>	<b>3</b>
2.1. HIV/AIDS Tarihçesi .....	3
2.2. HIV Yapısı .....	4
2.2.1. HIV-1 Zarf Glikoproteininin Yapısı.....	4
2.3. HIV-1 Kapsidinin Yapısı (Gag Polyprotein).....	6
2.3.1. CA Monomeri: Kapsid Çekirdeğinin Yapısal Birimi .....	7
2.3.2. CA Oligomerleri: Pentamerler ve Heksamerler .....	7
2.3.3. HIV-1 Kapsidinin Fonksiyonu.....	7
2.4. Matrix Protein (p17) .....	8
2.5. Nükleokapsid (p7/p9) .....	9
2.6. HIV-1 Genomu ve Replikasyon Döngüsü .....	10
2.6.1. LTR'nin Yapısı ve İşlevleri.....	10
2.6.2. Genetik Organizasyon .....	11
2.6.3. Düzenleyici ve Yardımcı Genler: .....	11
2.7. HIV-1'in Yaşam Döngüsü.....	12
2.8. HIV-1 Proviral DNA ve Önemi .....	13
2.9. Klonlama .....	14
2.9.1. Geleneksel Klonlama.....	15
2.9.2. Gateway Klonlama .....	15
2.9.3. Golden Gate Klonlama .....	17

2.9.4. Sekans ve Ligasyondan Bağımsız Klonlama (SLIC) .....	18
2.10. Sanger Dizileme .....	19
2.10.1. DNA Şablonunun Hazırlanması .....	20
2.10.2. DNA Polimeraz Reaksiyonu.....	20
2.10.3. Zincir Sonlandırılması ve Fragman Oluşumu .....	20
2.10.4. Jel Elektroforezi ve Kapiler Elektroforez.....	20
2.10.5. Veri Analizi ve Sekansın Birleştirilmesi.....	20
2.10.6. Veritabanlarına Karşı Dizi Kontrolü (BLAST) .....	20
2.11. RT-qPCR (Real-time PCR).....	21
<b>3. GEREÇ VE YÖNTEM.....</b>	<b>24</b>
3.1. Materyal.....	24
3.1.1. HIV-1 Pozitif Kan Örneği.....	24
3.2. Yöntem .....	24
3.2.1. DNA İzolasyonu .....	24
3.2.2. HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR) Gen Bölgesinin PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile Çoğaltılması .....	24
3.2.3. Agaroz Jel Elektroforezi ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması.....	25
3.2.4. Gen Klonlama İşlemi.....	26
3.2.5. Blunt End Oluşturma ve Ligation.....	26
3.2.6. Transformasyon .....	26
3.3. Sanger Dizileme .....	27
3.3.1. Sanger Dizileme Reaksiyonu .....	27
3.3.2. Cycle Sequencing Sonrası Pürüfikasyon ve Cihaza Yükleme İşlemi .....	28
<b>4. BULGULAR .....</b>	<b>29</b>
4.1. LTR Bölgesinin Çoğaltılma Sonucu .....	29
4.2. LTR Bölgesinin PJET 1.2 Blunt Vektörüne Klonlanma Sonucu .....	30
4.3. LTR Bölgesinin Sekanslanma Sonucu.....	30
4.4. LTR Konsensüs Dizisi ve Blast Sonucu .....	31
<b>5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....</b>	<b>32</b>
<b>KAYNAKLAR .....</b>	<b>36</b>
<b>ÖZGEÇMİŞ.....</b>	<b>46</b>

## **ŞEKİL LİSTESİ**

<b>Şekil 2.1:</b> HIV yapısı.....	4
<b>Şekil 2.2:</b> HIV-1 zarf glikoproteininin yapısı.....	6
<b>Şekil 2.3:</b> HIV-1 kapsit.....	8
<b>Şekil 2.4:</b> HIV-1 matrix protein.....	9
<b>Şekil 2.5:</b> Nükleokapsid.....	10
<b>Şekil 2.6:</b> HIV genom yapısı.....	12
<b>Şekil 2.7:</b> HIV-1'in yaşam döngüsü.....	13
<b>Şekil 2.8:</b> Klonlama yöntemleri.....	19
<b>Şekil 2.9:</b> Sanger dizileme.....	21
<b>Şekil 3.1:</b> EZ1 Advanced (Qiagen, Hombrechtikon, İsviçre).....	24
<b>Şekil 4.1:</b> PZR çalışmasının jel görüntüsü.....	29
<b>Şekil 4.2:</b> Ampisilinli LB-agar ve üzerinde krem-beyaz koloniler.....	30
<b>Şekil 4.3:</b> Kromatogram görüntüsü.....	31
<b>Şekil 4.4:</b> Blast sonucunun görüntüsü.....	31

## **TABLO LİSTESİ**

<b>Tablo 3.1:</b> Çalışmada kullanılan primerler.....	25
<b>Tablo 3.2:</b> Cycle sequencing bileşenleri. ....	28
<b>Tablo 3.3:</b> Cycle sequencing aşamasında uygulanan PZR döngü koşulları. ....	28

## **SİMGE VE KISALTMA LİSTESİ**

Kısaltma	:	Açıklamalar
AIDS	:	Edinsel Bağışıklık Yetmezliği Sendromu
ART	:	Antiretroviral Tedavi
CA	:	Kapsit
CDC	:	Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi
DNA	:	Deoksiriboz nükleik asit
ENV	:	Envelope (Zarf)
Gp41	:	Glikoprotein 41
Gp120	:	Glikoprotein 120
HIV	:	İnsan İmmün Yetmezlik Virüsü
HTLV	:	İnsan T Hücreli Lenfotropik Virüs
LTR	:	Long Terminal Repeat
RT-PCR	:	Gerçek Zamanlı Polimeraz Zincir Reaksiyonu

## **ÖZET**

### **YÜKSEK LİSANS TEZİ**

#### **GERÇEK ZAMANLI RT-PCR METODU İLE HIV-1 PROVİRAL DNA KANTİTASYONUNUN OPTİMİZASYONUNDA KULLANILAN KANTİTASYON STANDARTLARININ GEN KLONLAMA TEKNOLOJİSİ İLE GELİŞTİRİLMESİ**

**Reyhanehsadat MIRBAKHT**

**Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi**

**Sağlık Bilimleri Enstitüsü**

**Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı**

**Danışman: Prof. Dr. Elif SEVİM**

HIV-1 proviral DNA, retrovirüs olan HIV-1'in konak hücre genomuna entegre olmuş formunu temsil eder ve antiretroviral tedavi altındaki bireylerde viral kalıntının değerlendirilmesinde kritik bir biyobelirteçtir. Proviral DNA düzeylerinin doğru şekilde kantitatif olarak belirlenmesi, viral rezervuarın takibi ve tedavi etkinliğinin değerlendirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır. Bu tez çalışmasında, HIV-1 proviral DNA'nın PZR ile tespitinde testin kalite kontrolü amacıyla kullanılacak olan pozitif kontrol materyalinin gen klonlama teknolojisi kullanılarak üretimi amaçlanmıştır. Çalışmada, HIV-1 genomunun yüksek düzeyde korunan Long Terminal Repeat (LTR) bölgesi konvansiyonel PCR ile çoğaltılmış, pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmış ve elde edilen rekombinant plazmidin doğruluğu Sanger sekanslama ile teyit edilmiştir. Geliştirilen bu rekombinant standart materyal, gerçek zamanlı PCR uygulamaları için referans olarak kullanılmak üzere tasarlanmıştır. Çalışma kapsamında geliştirilen bu yerli ve özgün standart, hem düşük maliyetli hem de yüksek çoğaltılabilirlik ve güvenilirlik özellikleri ile ön plana çıkmaktadır. Literatürde benzer çalışmalarla kıyaslandığında, LTR bölgesinin hedef olarak seçilmesi sayesinde yüksek özgüllük sağlandığı, pJET1.2/blunt vektörünün pozitif seleksiyon özelliği sayesinde ise klonlama sürecinin kolaylaştırıldığı gözlemlenmiştir. Elde edilen bu standart

materyalin, ilerleyen aşamalarda klinik örneklerde yapılacak validasyon çalışmalarıyla birlikte tanısal süreçlerde güvenilir şekilde kullanılabilceği öngörülmektedir.

Ağustos 2025, 58 Sayfa

**Anahtar Kelimeler:** HIV-1 proviral DNA, LTR, RT-PCR, klonlama teknolojisi

## **ABSTRACT**

**M.Sc. THESIS**

### **THE DEVELOPMENT OF QUANTIFICATION STANDARDS USED IN THE OPTIMIZATION OF HIV-1 PROVIRAL DNA QUANTIFICATION BY REAL-TIME RT-PCR METHOD THROUGH GENE CLONING TECHNOLOGY**

**Reyhanehsadat MIRBAKHT**

**Kırşehir Ahi Evran University**

**Institute of Health Sciences**

**Department of Medical Biology**

**Supervisor: Prof. Dr. Elif SEVİM**

HIV-1 proviral DNA represents the integrated form of the retrovirus HIV-1 within the host cell genome and serves as a critical biomarker for assessing viral persistence in individuals undergoing antiretroviral therapy. Accurate quantification of proviral DNA levels is of great importance for monitoring the viral reservoir and evaluating treatment efficacy. In this thesis, the production of a positive control material to be used for quality control in the detection of HIV-1 proviral DNA by PCR was aimed through the application of gene cloning technology. The highly conserved Long Terminal Repeat (LTR) region of the HIV-1 genome was amplified by conventional PCR, cloned into the pJET1.2/blunt vector, and the accuracy of the recombinant plasmid was confirmed through Sanger sequencing. The resulting recombinant standard material was designed to serve as a reference in real-time PCR applications. This locally produced and original standard stands out due to its cost-effectiveness, high reproducibility, and reliability. Compared to similar studies, the selection of the LTR region provided high specificity, while the positive selection feature of the pJET1.2/blunt vector facilitated an efficient cloning process. It is anticipated that this standard material can be reliably used in future diagnostic applications following validation with clinical samples.

August 2025, 58 Pages

**Keywords:** HIV-1 proviral DNA, LTR, RT-PCR, cloning technology

# 1. GİRİŞ

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), insan bağışıklık sistemini hedef alan bir retrovirüstür. Bu virüs özellikle bağışıklık sisteminin işlevi için hayati öneme sahip olan CD4+ T lenfositlerini ve makrofajları enfekte ederek bağışıklık sistemini zayıflatmaktadır. İlk kez 1980’li yılların başında tanımlanan HIV, küresel halk sağlığı üzerinde önemli etkileri olan bir enfeksiyon etkenidir (1). 2023 yılı itibarıyla dünya genelinde yaklaşık 39,9 milyon kişinin HIV ile yaşadığı tahmin edilmekte olup, bu yükün büyük bir kısmı Sahra Altı Afrika bölgesinde yoğunlaşmaktadır (2). HIV enfeksiyonu zamanla edinsel bağışıklık yetmezliği sendromuna (AIDS) ilerleyebilir. AIDS, bağışıklık sisteminin ileri düzeyde zayıflamasıyla karakterize edilen bir durumdur ve bireyleri fırsatçı enfeksiyonlara ve bazı kanser türlerine karşı son derece savunmasız hâle getirir. HIV’nin bulaş yolları cinsel temas, ortak enjektör kullanımı, kan transfüzyonu ve doğum veya emzirme sırasında anneden bebeğe geçiş gibi çeşitli şekillerde gerçekleşebilir (3). Yüksek etkili antiretroviral tedavi (HAART) sayesinde HIV ile yaşayan bireyler virüsü kontrol altında tutarak yaşam kalitelerini yüksek düzeyde sürdürebilmektedir. Ancak, birçok birey hâlâ damgalanma, ayrımcılık ve sağlık hizmetlerine erişimde yaşanan yetersizlikler nedeniyle tedaviye ulaşamamakta ve bu durum bulaşın devam etmesine neden olmaktadır (4). “Tespit edilemez = Bulaştırılmaz (U=U)” ilkesi, tedaviye düzenli uyumun bulaş riskini azaltmadaki önemini vurgulamakla birlikte, dünya genelinde yaklaşık 5,4 milyon kişi hâlen HIV durumundan habersizdir. Bu da küresel salgının kontrol altına alınmasını zorlaştırmaktadır (5). HIV/AIDS ile ilgili tartışmalı konular arasında, önleme stratejilerinin etkinliği, bazı risk gruplarında zorunlu test uygulamalarının etik boyutu ve HIV ile yaşayan bireylerin hâlen maruz kaldığı toplumsal damgalanma yer almaktadır. Bu alanda sürdürülen bilimsel araştırmalar; uzun etkili tedavi seçenekleri, yenilikçi ilaçlar ve olası aşuların geliştirilmesi gibi alanlara odaklanmakta, böylece hem tedavi başarısının artırılması hem de bulaşın azaltılması amaçlanmaktadır.

HIV’nin bulaş dinamiklerinin, tedavi olanaklarının ve toplumsal etkilerinin çok boyutlu doğasının anlaşılması; etkili halk sağlığı müdahalelerinin planlanması ve virüsle yaşayan bireylerin yaşamlarının iyileştirilmesi açısından büyük önem taşımaktadır.

## **1.1. Amaç**

Bu tez çalışması Ahi Evran Üniversitesi Tıp Fakültesi Tıbbi Biyoloji Anabilim Dalı bünyesinde yürütülmüştür. Tez çalışmasının temel amacı, özellikle HIV pozitif anne bebeklerinde HIV tanısının doğrulanmasında ve serolojik olarak belirsiz sonuç alınan ancak HIV-1 RNA tespit edilemeyen tedavi almamış vakaların tanısında kullanılan HIV-1 proviral DNA testinde kullanılmak üzere gen klonlama teknolojisi kullanılarak pozitif kontrol geliştirilmesi hedeflenmiştir. Bu kapsamda, HIV-1 LTR gen bölgesi amplifiye edilerek uygun vektör sistemine klonlanmış ve elde edilen rekombinant standartların gerçek zamanlı PCR analizlerindeki performansı değerlendirilmiştir.

## **1.2. Önem**

Bu çalışmanın, HIV-1 proviral DNA düzeylerinin daha hassas, güvenilir ve tekrarlanabilir biçimde kantitatif olarak belirlenmesine katkı sağlaması hedeflenmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. HIV/AIDS Tarihçesi

İlk HIV/AIDS vakası 1981’de tanımlanmıştır. Önceden sağlıklı olan genç erkeklerde Kaposi sarkomu sıklığında artış, fırsatçı enfeksiyonların görülme sıklığında ve ölüm vakalarında artış izlenmiştir. İlk vakaların eşcinsel erkeklerde görülmesi üzerine enfeksiyon hastalığını “eşcinsel vebası olarak tanımlanmıştır (6). Daha sonra vakaların kadınlarda, bebeklerde izlenmeye başlanması, Haiti’li göçmenlerde görülmesi ve kan transfüzyonu yapılan hemofili hastalarında da tespit edilmesi üzerine enfeksiyon etkeninin kan, cinsel yol ve vertikal yolla da geçiş yapabileceği anlaşılmıştır (7).

Eylül 1982’de Hastalık Kontrol ve Önleme Merkezi (CDC) tarafından tablo "Edinilmiş Bağışıklık Yetmezliği Sendromu (AIDS)" olarak tanımlanmıştır. O dönemde HIV/AIDS tanısı için duyarlılık ve özgüllüğü yüksek bir test geliştirilmediği için, kan bankalarında kan bağışlarının güvence altına alınmasında güçlük yaşanmış ve çoğu kurum, bağışçılarda eşcinsellik sorgulamasını reddetmiştir.

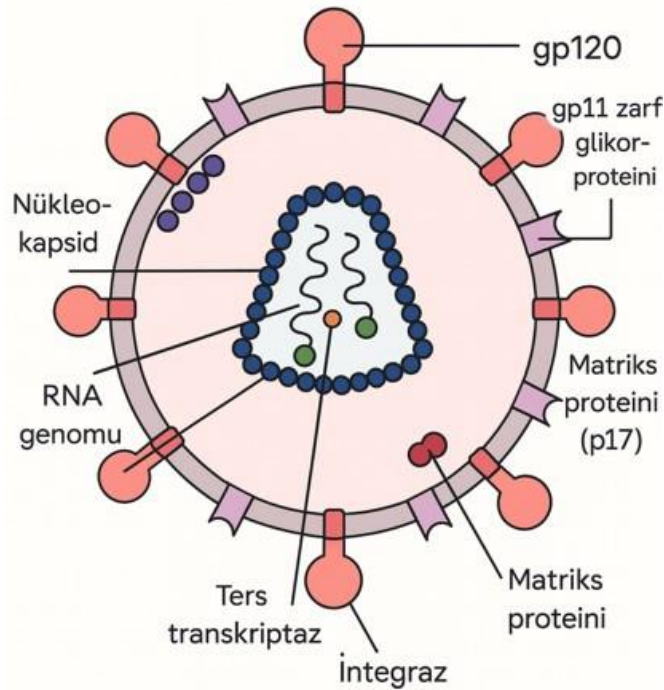
Bu kişilerden biri olan Elizabeth Glaser, hastalığı doğmamış çocuğuna bulaştırmış ve her ikisinin ölümü kamuoyunda büyük yankı uyandırarak, AIDS üzerine daha fazla araştırma yapılması yönünde baskı oluşmasına neden olmuş ve Elizabeth Glaser Pediatrik AIDS Vakfı’nın kurulmasına zemin hazırlamıştır. 1981–1984 yılları arasında, yaklaşık 15.000 hemofili hastası HIV ile enfekte olmuş, damar içi uyuşturucu kullanıcıları da enjektör paylaşımı yoluyla yüksek risk altında kalmışlardır. Bu nedenle, ilk enjektör değişim programı 1984 yılında Amsterdam’da kurulmuş, bu uygulama Avrupa’da hızla yayılırken, ABD’de benimsenmesi zaman almıştır. AIDS’in gerçek nedenine dair ilk ipuçları, titizlikle yürütülen immünolojik araştırmalardan elde edilmiştir. CD4 hücre sayısı yaklaşık olarak 200 hücre/mm<sup>3</sup>’ün altına düştüğünde, hastalar çok sayıda fırsatçı enfeksiyona ve çeşitli malignitelere karşı savunmasız hâle geldiği tespit edilmiştir. Dikkat çekici biçimde, bu T hücresi alt grubunun, ilk tanımlanan insan patojen retrovirüsü olan ve 1980 yılında Robert Gallo ve arkadaşları tarafından izole edilen HTLV-I’in (Human T-cell Leukemia Virus Type I) hedefi olduğu bilinmektedir (6). Ancak HTLV-I, CD4 T hücrelerinde tükenmeye neden

olmak yerine, bu hücreleri transforme ederek, klinik olarak erişkin T hücreli lösemi gelişimine yol açmaktadır (5).

Başlangıçta, HTLV-I ile enfekte bireylerin serumlarının AIDS hastalarına ait hücreleri zayıf şekilde boyadığı gözlemlenmiş, bu da bağışıklık yetmezliği tablosunun HTLV-I'e yakın bir retrovirüsle ilişkili olabileceği yönünde varsayımların ortaya atılmasına neden olmuştur. Her ne kadar bu bağlantı sonradan yanlış olduğu kanıtlanırsa da retrospektif olarak değerlendirildiğinde, bilim insanlarının bir retrovirüsten şüphelenmeleri doğru yönde atılmış bir adım olmuştur.

## 2.2. HIV Yapısı

HIV, yaklaşık 100–120 nm çapında, küresel şekilli ve zarflı bir RNA virüsüdür. Virion olarak adlandırılan virüs partikülü, üç ana yapısal tabakadan oluşmaktadır:



Şekil 2.1: HIV yapısı.

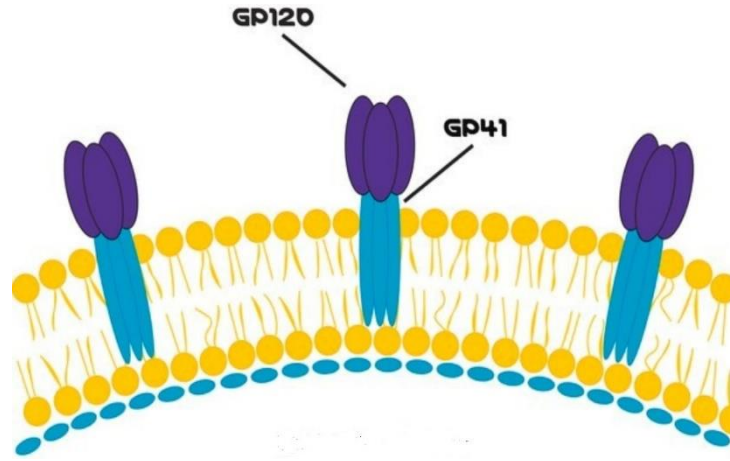
### 2.2.1. HIV-1 Zarf Glikoproteininin Yapısı

İnsan bağışıklık yetmezliği virüsünün (HIV) hedef hücreleri enfekte etme süreci, yaklaşık 100–150 nm boyutlarındaki viral partikülün, yüzeyinde bulunan zarf glikoproteini (*Env*) aracılığıyla konak hücre üzerindeki CD4 reseptörü ve CCR5 ile CXCR4 gibi yardımcı reseptörlerle etkileşime girmesiyle başlamaktadır (7). Env proteini, her biri gp120 ve gp41 alt birimlerinden oluşan üç adet kovalent olmayan heterodimerin oluşturduğu bir trimerdir.

gp120 alt birimi, konak hücre reseptörleriyle etkileşimden sorumlu olup; gp41 ise viral zarf ile hedef hücre zarı arasında füzyonun gerçekleşmesini sağlayan transmembran bileşendir.

HIV-1 gp120 yapısına dair ilk yapısal bilgiler, Kwong ve arkadaşları tarafından yayımlanan öncü nitelikteki çalışmada sunulmuştur (8). Bu çalışmada, iki domenli çözünür CD4 yapısı ve monoklonal antikör 17b'nin Fab fragmanı ile bağlanmış bir monomerik gp120 çekirdek bölgesinin kristal yapısı tanımlanmıştır. Kristalizasyon amacıyla kullanılan gp120, yaklaşık %60'lık bir polipeptit bölümünü temsil eden, glikozillenmemiş ve kısmen kısaltılmış bir çekirdek yapı olmasına rağmen, genel mimarisi ile CD4 ve yardımcı reseptör benzeri molekül 17b ile etkileşime giren moleküler yüzeyleri ortaya koymuştur (9). Bu yapısal bilgiler, CD4'ün küçük moleküllü taklitlerinin etkinlik ve kapsayıcılığını artırmak amacıyla kullanılmış; ayrıca VRC01 gibi çeşitli geniş nötralizasyon kapasitesine sahip antikörlerin izole edilmesine olanak tanıyan prob tasarımlarına temel oluşturmuştur (10). Bu ilk çalışmadan bu yana, CD4 bağlanma bölgesini hedefleyen çeşitli antikörler ve/veya moleküllerle kompleks halinde ya da bağlanmamış durumda bulunan monomerik HIV-1 gp120 çekirdeklerine ait 20'den fazla kristal yapısı yayımlanmıştır (11). Bu yapılar, nötralizan ve nötralizan olmayan antikörler ile HIV girişini kolaylaştıran ya da engelleyen agonist ve antagonist ligandları içeren gp120 komplekslerini kapsamaktadır. Tüm bu yapılar incelendiğinde, gp120'nin genel konformasyonunun büyük ölçüde benzer olduğu ve "iç" ile "dış" olmak üzere iki temel domeinden oluştuğu gözlemlenmiştir. Bu domenler, gp120'nin trimerik yapısı içerisindeki iç ve dış bölgelere yakınlığına göre adlandırılmıştır. Antikörler ile ligandların HIV fonksiyonu üzerindeki etkilerinin yapısal temelleri; bağlanma yüzeylerinde meydana gelen küçük farklılıklarda, Env trimerinde oluşan dördüncül yapı değişikliklerinde ya da kristalografi yöntemleriyle tespiti zor olan protein bölgelerindeki hareketlilikte yatıyor olabilir (12). HIV Env proteininin gp120 alt birimi, virüsün hedef hücrelere tutunmasından sorumlu iken; gp41 bölgesi, viral zarf ile hedef hücre zarı arasındaki füzyonu gerçekleştiren ana bileşendir. gp41'in yapısına dair ilk bilgiler 1997 yılında elde edilmiştir. Bu dönemde çeşitli araştırma grupları, gp41 çekirdeğinin füzyon sonrası konformasyonunun kristal yapılarını bağımsız olarak yayımlamıştır. Bu konformasyonda, gp41'in C-terminal heliksleri, N-terminal heliksler etrafında antiparalel bir şekilde dizilerek "altı heliksli demet" (six-helix bundle) olarak adlandırılan yapıyı oluşturur (13,14). Her ne kadar füzyon inhibitörü enfuvirtid (T-20) bu yapının ilk kez yayımlanmasından yıllar önce keşfedilmiş olsa da altı heliksli demet yapısı T-20'nin etki mekanizmasını anlamada önemli katkı sağlamıştır. Bu yapısal bilgiler, T-20'nin daha güçlü ve etkili türevlerinin

tasarlanmasına da zemin hazırlamıştır (15,16). X-ışını kristalografisi veya NMR spektroskopisi gibi yöntemlerle çözümlenen tüm gp41 çekirdek yapıları (ilgili maymun immün yetmezlik virüsü proteinleri dâhil), orijinal gp41 yapılarına büyük ölçüde benzer konformasyonlar sergilemiştir. Bu yapılar, farklı çözücüler kullanılarak kristalize edilmiş, çeşitli nötralizan ve nötralizan olmayan ligandlarla kompleks oluşturmuş (17), ayrıca çok sayıda mutasyon içeren formlar dahilinde elde edilmiştir (18). Buna rağmen, elde edilen 25 farklı HIV-1 gp41 yapısının süperpozisyonu orijinal konformasyonla yüksek oranda örtüşmektedir. Env proteininin gp41 alt biriminin füzyon öncesi (pre-füzyon) durumuna ait yüksek çözünürlüklü yapısal bilgilerin eksikliği, HIV zarf proteinlerinin yapısal biyolojisinde hâlâ önemli bir bilgi boşluğu oluşturmaktadır. Ancak bu alanda sınırlı da olsa ilerlemeler kaydedilmektedir (19).



Şekil 2.2: HIV-1 zarf glikoproteininin yapısı.

### 2.3. HIV-1 Kapsidinin Yapısı (Gag Polyprotein)

HIV-1 proteinleri, viral proteaz tarafından daha küçük ve işlevsel birimlere ayrılan uzun peptit zincirleri olan poliproteinler şeklinde transkribe ve translate edilirler (20). Kapsid (CA) proteini, birçok yapısal virüs bileşenini içeren daha büyük bir yapı olan Gag poliproteininin bir parçası olarak sentezlenir (21). Bu tam uzunluktaki Gag proteini, virüs yaşam döngüsünün geç evrelerinde kritik öneme sahiptir. Gag, N-terminalinde yer alan bir miristoil grubu aracılığıyla viral bileşenlerin konak hücre plazma membranına yönlendirilmesinden sorumludur (22). Virüs tomurcuklanarak konak hücreden ayrıldıktan sonra henüz olgunlaşmamıştır; çünkü Gag poliproteini hâlâ bölünmemiş durumdadır. Ancak viral proteaz tarafından Gag'ın işlevsel alt birimlerine parçalanması ile bu yapıların her biri serbest bırakılır ve olgun, enfeksiyöz bir HIV-1 virionu meydana gelir (23).

### **2.3.1. CA Monomeri: Kapsid Çekirdeğinin Yapısal Birimi**

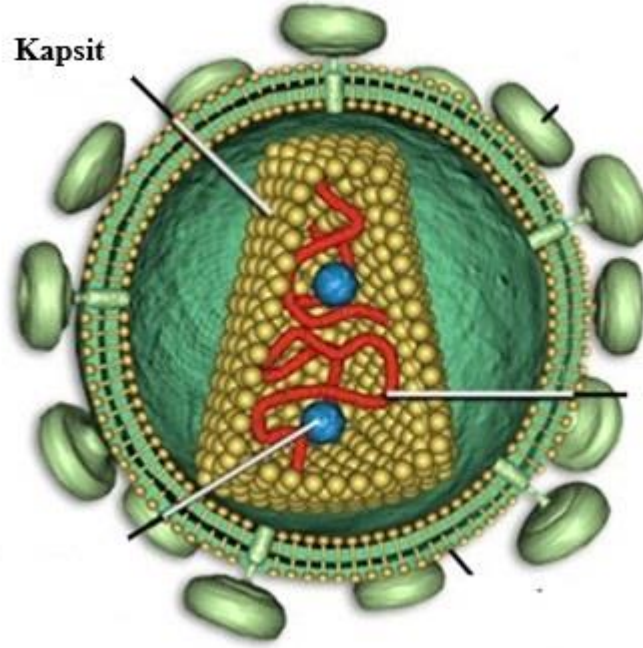
Kapsid çekirdeğinin en temel bileşeni, yüksek derecede korunmuş ve genetik olarak kırılğan bir protein olan CA monomeridir (24). CA monomeri, 231 amino asitlik bir proteindir ve iki ana alfa-sarmal domene sahiptir: amino-terminal (CA-NTD) ve karboksi-terminal (CA-CTD) domainler. Bu iki domain, beş amino asitlik bir bağlantı bölgesi (146–150. kalıntılar) ile birbirine bağlanmıştır (25). Virion henüz olgunlaşmamış formundayken, CA proteini Gag poliproteininin bir bileşenidir ve amino-terminal ucunda matriks (MA) domaini ile, karboksi-terminal ucunda ise spacer peptid 1 (SP1) domaini ile bağlantılıdır. Tomurcuklanmadan sonra ve olgunlaşma süreci boyunca, Gag poliproteini proteolitik yıkıma uğrayarak MA ve SP1 domainlerinden ayrılır. Bu ayrılmanın ardından, komşu monomerlerin Ala14 ve Glu45 kalıntıları arasında etkileşimler gerçekleşir ve bu etkileşimler sayesinde monomerler daha büyük oligomerik yapılar oluşturabilir (26).

### **2.3.2. CA Oligomerleri: Pentamerler ve Heksamerler**

HIV-1 CA monomerleri çeşitli kavisli oligomerik yapılar oluşturabilse de olgun konik kapsid yapısında en yaygın olarak bulunan oligomer heksamerdir. Viral kapsid çekirdeğinin fullerene-benzeri konik kafes yapısı, yaklaşık 250 heksamer ve tam olarak 12 pentamerden oluşur. Heksamerler, amino-terminal domainin merkezi, stabil bir çekirdek oluşturacak şekilde ve karboksi-terminal domainlerin esnek bir dış halka meydana getirecek şekilde düzenlenmiştir (26). Heksamer çekirdeğinin ortasında yer alan ve R18 poru olarak adlandırılan yapı, altı arginin kalıntısı ve amino-terminal  $\beta$ -telçiklerinden oluşan “moleküler diyafram” ile çevrilidir. Bu por, boyut seçici ve pozitif yüklü bir kanaldır; nükleotidlerin kapsid çekirdeği içine difüzyonuna izin verirken, nükleazların, konak hücreye ait kısıtlayıcı faktörlerin ve algılayıcı proteinlerin girişini engeller (27).

### **2.3.3. HIV-1 Kapsidinin Fonksiyonu**

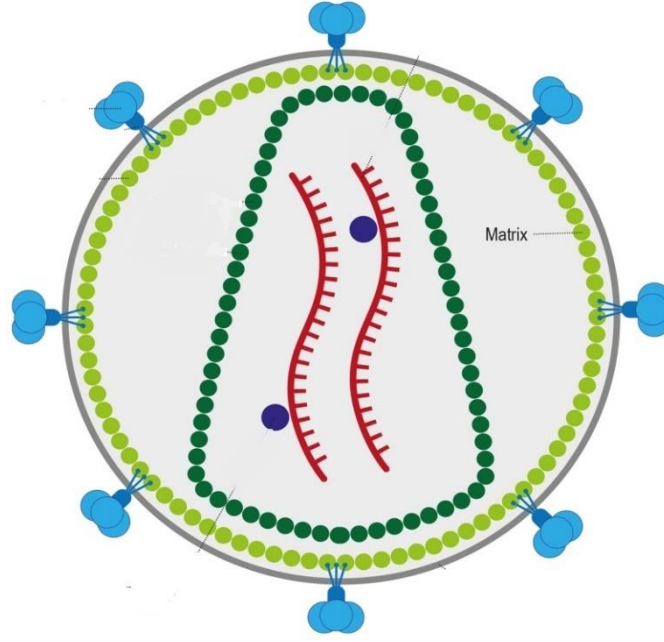
HIV-1 kapsidi, çeşitli konak hücre faktörleriyle olan etkileşimleri sayesinde birçok işlevi yerine getirir. Kapsid çekirdeği, viral genomun ve ters transkripsiyon mekanizmasının sitoplazmanın çevresinden transkripsiyonel olarak aktif nükleer bölgelere güvenli bir şekilde taşınmasından sorumludur. Bu güvenli taşımayı, bir yandan kısıtlayıcı faktörlerin viral genomu algılamasını engelleyerek, diğer yandan ters transkripsiyonun gerçekleşmesini sağlayacak uygun moleküllerin kapsid çekirdeğinden difüze olmasına izin vererek gerçekleştirir (28).



Şekil 2.3: HIV-1 kapsit.

#### 2.4. Matrix Protein (p17)

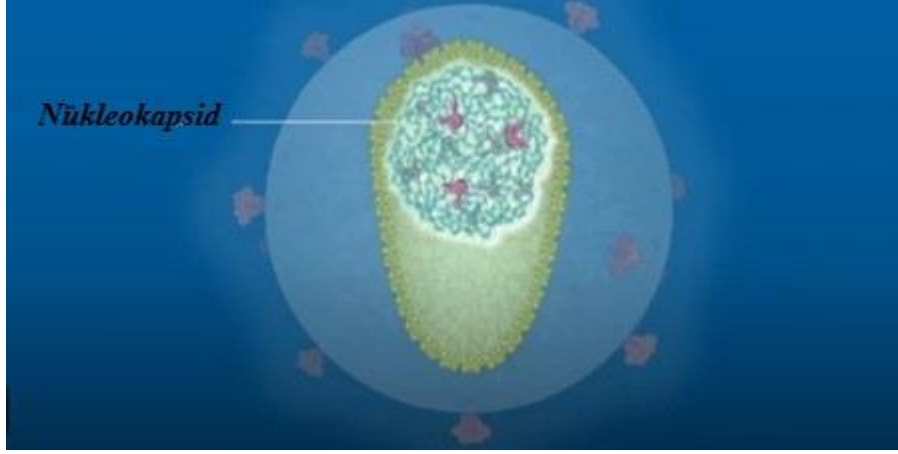
İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1 (HIV-1) matris proteini (MA), p17, virüs yaşam döngüsünde temel bir rol oynamaktadır. p17, hem p55<sup>gag</sup> hem de p160<sup>gag-pol</sup> öncül poliproteinlerinin amino terminalinde yer almakta olup, bu poliproteinleri plazma membranına yönlendirir; burada viral partiküllerin montajı ve tomurcuklanması gerçekleşir (29). Zar lokalizasyonu, hem p17'nin kotranslasyonel miristoilasyonu hem de amino terminalindeki bazik amino asit kümesi tarafından sağlanır (30). Gag poliproteinleri, plazma membranı üzerinde halka benzeri yapılardan oluşan bir ağ şeklinde bir araya gelir ve bu birleşim viral çekirdeğin ikozahedral yapısını oluşturur (31). Olgunlaşan viral partikül içinde proteolitik parçalanmayı takiben, p17 virüsün lipid zarfının hemen altında bir kılıf halinde kalır; bu durum, örgülü bir ağ yapısının oluştuğunu düşündürmektedir. Sadece simiyen immün yetmezlik virüsü (SIV) MA'nın bakulovirüs sistemlerinde ekspresyonu, virüs benzeri partiküllerin oluşumuna yol açar; bu da MA'nın kendi kendine birleşme (self-association) belirleyicilerini içerdiğini göstermektedir (32).



Şekil 2.4: HIV-1 matrix protein.

## 2.5. Nükleokapsid (p7/p9)

HIV-1 Gag (gruba özgü antijen) proteini, virion montajının tüm ana basamaklarını koordine eder. Gag, sırasıyla matris (MA), kapsid (CA) ve nükleokapsid (NC) olmak üzere üç düzenli (organize) bölgeden oluşur. Bu bölgeler, p2 (diğer adıyla SP1) ve p1 (diğer adıyla SP2) olarak adlandırılan iki bağlayıcı (linker) peptit ile birbirine bağlıdır. Farklı NC farklı formlardan oluşmaktadır. HIV-1 proteazı tarafından gerçekleştirilen ilk proteolitik kesim MA-CA-p2 ile NC-p1-p6 bölgeleri arasında gerçekleşir ve böylece NCp15 serbest bırakılır. İkinci kesim NCp9'u (NC-p1) serbest bırakırken, son kesim NC bölgesinin kendisini açığa çıkarır ve bu da olgunlaşmanın son hali olan NCp7 formunu oluşturur. NC bölgesinin, özellikle ters transkripsiyon (RT) sırasında kritik olan optimal RNA şaperon aktivitesi, sadece olgun formda (NCp7) gözlemlenir (33,34). NCp15 içeren viryonlar enfektif değildir bu nedenle p1 ile p6 arasındaki proteolitik kesim enfektivite açısından kritik öneme sahiptir (35). NC, nükleik asit (NA) bağlayıcı bir proteindir ve HIV-1 replikasyon döngüsünün neredeyse tüm aşamalarında rol oynar: Genomik RNA'nın (gRNA) dimerleşmesi, gRNA paketlenmesi, Viryon montajı, Ters transkripsiyon sırasında zincir transfer basamakları, Ve proviral DNA'nın entegrasyonu (36,37).



Şekil 2.5: Nükleokapsid.

## 2.6. HIV-1 Genomu ve Replikasyon Döngüsü

HIV-1'in yaklaşık 9 kb uzunluğundaki RNA genomu (gRNA), oldukça küçük bir yapıya sahiptir. Ancak bu genom, enfekte konak hücrelerde replikasyon ve yeni viryonların montajı için gerekli olan 15 proteinin tamamının sentezlenmesine olanak sağlayacak tüm bilgileri içermektedir (38,39). Viryonlar içinde kapsüllenmiş viral genom, pozitif polariteli tek sarmallı iki RNA'nın (dimer) birleşiminden oluşur (40). Genom, dokuz farklı *ORF* içerir ve bazı viral genler birbiriyle örtüşür. Bu durum, sınırlı bir kodlama kapasitesi içinde birçok proteinin şifrenmesini mümkün kılar. Genomun her iki ucu, uzun terminal tekrar dizileri (*LTR* – long terminal repeats) ile çevrilidir. Bu bölgeler, gen ekspresyonu, entegrasyon ve ters transkripsiyon gibi süreçler için gerekli olan viral promotör de dahil olmak üzere temel bilgileri içerir ve U3, R ve U5 elementlerinden oluşur (41).

### 2.6.1. LTR'nin Yapısı ve İşlevleri

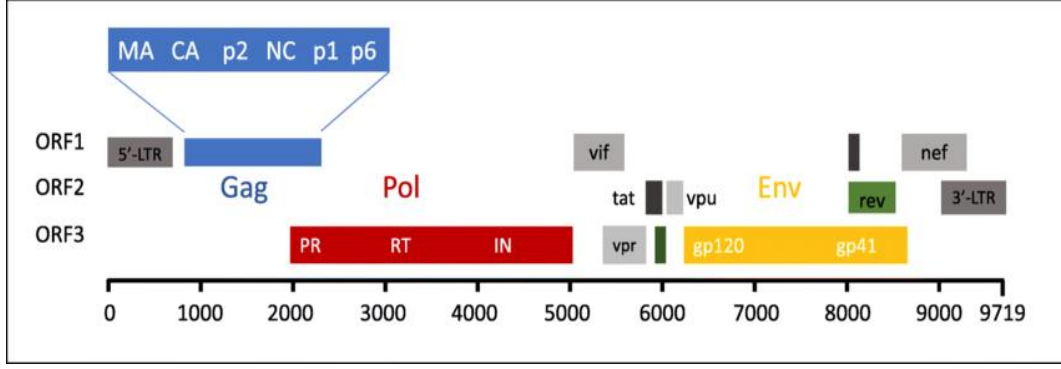
U3 elementi, düzenleyici (modülatör), güçlendirici (enhancer) ve bazal bölgelerden oluşur. Ayrıca, üç adet kesilme (splicing) faktörü bağlanma bölgesi ve örneğin Nükleer Faktör- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) gibi konak hücre transkripsiyon faktörlerine ait iki bağlanma bölgesi içerir. R elementi, trans-aktif yanıt bölgesi (TAR) olarak adlandırılan bir RNA sap-halka yapısı oluşturarak viral replikasyonda, özellikle transkripsiyonun aktivasyonunda önemli bir rol oynar (42). U5 elementi, poliadenilasyon sinyali (poly A) ile ters transkripsiyonun düzenlenmesinde görevli bölgeleri içerir. U5'in ardından başlatıcı bağlanma bölgesi (PBS), dimerizasyon başlatıcı sinyali (DIS) ve ana kesilme-donör bölgesi (D1) gelir; ancak bu yapılar Şekil 1'de gösterilmemiştir. Viral genomun paketlenmesini sağlayan paketleme sinyali Psi ( $\Psi$ ) bu süreci yönlendiren önemli bir dizidir (43).

### 2.6.2. Genetik Organizasyon

*Gag* geni, yapısal viral çekirdek proteinlerini kodlar. Öncelikle sentezlenen p55-Gag öncül proteini, viryon olgunlaşması sırasında viral proteaz tarafından parçalanarak matris (MA), kapsid (CA) ve nükleokapsid (NC) protein alt birimlerine ayrılır. *pol* geni, yine bir öncül proteinden türeyen ve viral proteaz tarafından kesilerek aktif hale getirilen üç enzim olan proteaz (PR), ters transkriptaz (RT) ve integrası (IN) kodlar. Üçüncü yapısal gen olan *env*, zar glikoproteinleri olan gp120 yüzey birimi (SU) ile gp41 transmembran birimini (TM) kodlar (44).

### 2.6.3. Düzenleyici ve Yardımcı Genler:

*Pol* genini, iki düzenleyici gen olan *rev* ve *tat* ile dört yardımcı gen olan *vif*, *vpr* ve *vpu* takip eder. *Tat* ve *Rev*, viral replikasyon için elzemdir; konak hücre çekirdeğinde birikir ve kendilerine özgü mRNA yapıları olan Rev-responsive element (RRE) ve TAR bölgelerine bağlanırlar. *Rev*, kısmen kesilmiş veya hiç kesilmemiş viral mRNA'ların sitoplazmaya taşınmasında görev alan önemli bir nükleer ihracat faktörüdür. *Tat*, güçlü bir transkripsiyonel aktivatördür (45). *Vif*, *Vpr* ve *Vpu*, virüs partikül üretim hızını etkileyen proteinlerdir. Genomun sonunda bulunan yardımcı gen *nef*, HIV enfektivitesini artırır ve CD4 ile majör doku uygunluk kompleksi I (MHC I) dahil olmak üzere çeşitli konak hücre proteinlerini aşağı regüle eder. Ayrıca, *Vif*, *Vpu* ve *Nef*, etkili replikasyonu sağlamak için çeşitli konak hücre kaynaklı kısıtlayıcı faktörleri baskılar (46).



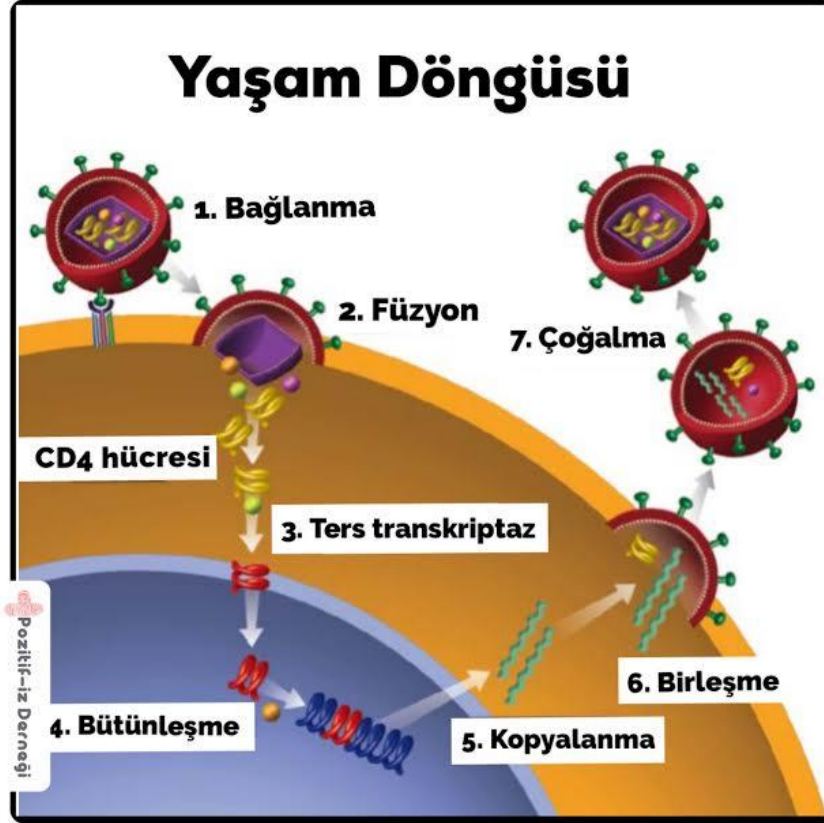
Şekil 2.6: HIV genom yapısı.

## 2.7. HIV-1'in Yaşam Döngüsü

HIV-1'in yaşam döngüsü iki ana evreye ayrılabilir: erken evre ve geç evre. Erken evre, enfektif bir viryonun konak hücreye bağlanmasıyla başlar ve viral genomun konak hücre DNA'sına entegre edilmesiyle sona erer. Geç evre ise bu entegrasyon sonrası başlayan ve viral olgunlaşmaya kadar devam eden süreci kapsar (47). Erken evrede, HIV-1 viryonunun zar glikoprotein kompleksi olan Env, konak hücre yüzeyindeki CD4 reseptörü ve CCR5 veya CXCR4 koreseptörleri ile etkileşime girer. Bu tanıma olayı, bir dizi konformasyonel yeniden düzenlemeyi başlatır ve bu değişiklikler sonucunda viral zar ile konak hücre zarı kaynaşır; bu füzyon süreciyle viral çekirdek konak hücre sitoplazmasına salınır (48). Kapsid proteini ve içerdiği bileşenlerden oluşan kompleks, ters transkripsiyon kompleksi (RTC) olarak adlandırılır. Bu noktadan sonra, ters transkripsiyon işlemi çekirdek içinde gerçekleşmelidir. Ters transkripsiyon sırasında, kapsid parçalanmaya (uncoating) başlar ve çekirdeğe taşınır. Bu süreç çekirdek içine giriş ve entegrasyon amacıyla gerçekleştirilir (49,50). RTC çekirdek içine girdikten sonra, artık pre-integrezon kompleksi (PIC) olarak adlandırılır. Uncoating ve ters transkripsiyon işlemleri, çekirdeğe girişten sonra ancak entegrasyondan önce tamamlanır. Kapsid, PIC'in transkripsiyonel olarak aktif kromatin bölgelerine yönlendirilmesinden ve viral transkriptlerin konak genomuna entegre edilmesinden sorumludur (51,52).

Viral genler daha sonra konak hücre tarafından transkribe edilir ve çekirdekten sitoplazmaya taşınır. Bu taşınmanın ardından, Gag proteini, amino terminalinde bulunan miristoil (myristoyl) grubunun aracılığıyla plazma membranına yönlendirilir. Bu lokalizasyondan sonra, henüz olgunlaşmamış bir viryon tomurcuklanır; Gag poliproteinleri, konak hücreden türemiş viral zarı kaplayacak şekilde yerleşir. Yaşam döngüsünün son basamağı olgunlaşmadır; bu süreç, enfeksiyöz bir viryonun oluşmasını sağlar. Olgunlaşma, viral

proteaz enzimi tarafından poliproteinlerin daha küçük ve işlevsel alt birimlere parçalanmasıyla gerçekleşir. Bu basamakta viral kapsid oluşur ve fulleren koni yapısında bir araya gelerek olgun, tam enfektif bir HIV-1 viryonu meydana getirir. Bu noktadan sonra, yeni oluşmuş ve olgunlaşmış viryon, HIV-1 yaşam döngüsünü tekrar başlatarak başka bir konak hücreyi enfekte edebilir (53,54).



Şekil 2.7: HIV-1'in yaşam döngüsü.

## 2.8. HIV-1 Proviral DNA ve Önemi

HIV-1 proviral DNA, viral genomun konak hücre kromatini içerisine entegre olmuş formu olarak tanımlanır ve retroviral enfeksiyonun temel belirteci kabul edilir (55). Viral girişin ardından HIV-1'in RNA genomu viral ters transkriptaz enzimi tarafından tamamlayıcı DNA'ya dönüştürülür ve bu yeni sentezlenen çift zincirli DNA nükleusa taşınır (56). İntegrasyon enziminin etkisiyle viral DNA, konağın kromozomlarıyla kovalent bağ kurarak proviral durumu oluşturur (57). Entegrasyon gerçekleştikten sonra proviral DNA transkripsiyonel olarak sessiz kalabilir ve böylece konak bağışıklık sistemi tarafından tanınmayan ve antiretroviral tedavi (ART) ile hedeflenemeyen latent bir rezervuar meydana gelir (58). Bu latentlik mekanizması, plazma viremisinin ART ile başarıyla baskılanmasına rağmen enfeksiyonun ömür boyu devam etmesini açıklar (59). Ayrıca, entegre olmuş

proviral DNA konak DNA'sı ile birlikte hücrel bölünme sırasında replike edilerek konakta uzun süreli varlığını sürdürür (60). Entegre HIV-1 genomlarının büyük çoğunluğu defektif olup, geniş delesyonlar, nokta mutasyonları veya APOBEC3G gibi konak kısıtlama faktörleri tarafından indüklenen hipermutasyonlar taşır (61). Replikasyon yeteneği bulunmamasına rağmen bu defektif provirusların birçoğu transkripsiyonel olarak aktiftir ve viral RNA ile proteinler üreterek kronik immün aktivasyona katkıda bulunur (62). Nitekim transkripsiyon yalnızca güçlü viral promotör görevi gören uzun terminal tekrar bölgelerinden (*LTR*) değil, aynı zamanda defektif provirusların intragenik bölgelerinden de gerçekleşebilir; bu durum alternatif transkripsiyon mekanizmalarını ortaya koymaktadır (63). Proviral transkripsiyon, NF- $\kappa$ B ve Sp1 gibi konak transkripsiyon faktörleri, Tat gibi viral proteinler ve kromatin yapısını etkileyen epigenetik modifikasyonlar tarafından sıkı biçimde düzenlenir (55). Buna ek olarak, mikroRNA'lar ve uzun kodlamayan RNA'lar gibi kodlamayan RNA'ların da proviral transkripsiyon ve latentlik üzerinde düzenleyici roller üstlendiği gösterilmiştir (64). Tüm bu bulgular bir arada değerlendirildiğinde, HIV-1 proviral DNA'nın hem latent bir rezervuar hem de sürekli immün stimülasyon kaynağı olarak viral eradikasyonun önündeki en büyük engeli temsil ettiği anlaşılmaktadır (65).

## 2.9. Klonlama

“Klon” terimi, Eski Yunanca'da “dal” anlamına gelen *klōn* sözcüğünden türemiştir ve bir daldan yeni bir bitkinin elde edilmesi sürecine atıfta bulunur. Günümüzde “klon” kelimesi basit bir kavram gibi görünse de kesin anlamıyla bir molekülün, hücrenin, bitkinin, hayvanın veya insanın genetik kopyasını ifade eder. Gen klonlama, belirli bir genin özdeş kopyalarının moleküler biyoloji araçları kullanılarak üretilmesi sürecidir. Herhangi bir türden bir DNA dizisinin veya genin izole edilmesi ve orijinal DNA dizisinde herhangi bir değişiklik yapılmadan çoğaltılmak üzere bir vektöre aktarılması “Moleküler Klonlama” olarak adlandırılır. İzolasyonun ardından moleküler klonlar, gen dizisinin veya proteinin ekspresyon analizinde kullanılmak üzere çok sayıda DNA kopyası üretmek için kullanılabilir; ayrıca *in vitro* koşullarda modifiye edilerek proteinin ekspresyonu ve fonksiyonu değiştirilebilir.

Rekombinant DNA'nın restriksiyon enzimleriyle kesilerek ligasyon yoluyla birleştirilmesi, 20. yüzyılın en büyük başarılarından biri olmuştur. Günümüzde ise gen dizisi değişikliklerinde yüksek doğruluk sağlayan birçok alternatif yöntem ön plana çıkmıştır. Yönlendirilmiş mutagenез (site-directed mutagenesis) ve PCR teknikleri, belirli dizilerin

değiştirilmesine ve moleküllerin yapı-fonksiyon ilişkilerinin incelenmesine olanak tanıyarak önemli katkılar sağlamıştır. Klasik restriksiyon ve ligasyon temelli yaklaşımda herhangi bir DNA parçasının klonlanmasına yönelik dört temel ve değişmez basamak; DNA'nın restriksiyon endonükleazlarla parçalanması, DNA fragmanlarının vektöre ligasyonu, transformasyon ve tarama/seçimdir. Genel olarak, adı geçen bu geleneksel basamaklar klonlama prosedürleri arasında ortak özellik taşır; ancak uygulamanın amacına bağlı olarak çeşitli noktalarda alternatif yollar tercih edilebilmektedir. 21. yüzyılda, organizmaların DNA dizisi ve kodlama yeteneklerinin belirlenmesine olanak tanıyan, dolayısıyla büyük genlerin yeni ve bilinmeyen genetik özellikler açısından analiz edilmesini ve değiştirilmesini mümkün kılan birçok yeni teknik ortaya çıkmıştır (66,67). Daha ileri bir alan olan sentetik biyoloji ise kalıtsal unsurların karmaşık bir kombinasyonunu kullanarak yeni özelliklere sahip biyolojik yapılar inşa etmektedir. Bu gelişmeler, Gateway, plazmid füzyon sistemi, Golden Gate ve dizi & ligasyondan bağımsız klonlama (sequence & ligation-independent cloning) gibi en gelişmiş ve üstün klonlama tekniklerini gerekli kılmaktadır (68,69).

### **2.9.1. Geleneksel Klonlama**

Geleneksel yönteme dayalı temel klonlama iş akışı; hedef DNA fragmanının izole edilmesi, eklerin uygun bir klonlama vektörüne ligasyonu, rekombinant plazmidlerin çoğaltılmak üzere uygun bir konağa aktarılması ve istenilen plazmidi içeren konakların taranmasını içermektedir. Moleküler klonlamanın verimliliğini artırmak amacıyla, özgün enzimlerin özelliklerinden yararlanılarak birçok özel araç ve yöntem geliştirilmiştir. TA klonlama, *Taq* polimeraz enziminden yararlanırken; ligasyondan bağımsız klonlama, tek zincirli DNA çıkıntıları oluşturan *T4 DNA polimeraz* kullanır. Son dönemde, GC klonlama yöntemi de literatüre girmiştir. Bu yöntemde, *Taq*, *Tfl* ve *Tth* gibi hata okuma özelliği bulunmayan DNA polimerazları, PCR veya G-tail reaksiyonu aracılığıyla düz (blunt) uçlu DNA moleküllerine tek bir 3'-G ekler. DNA eklentisi üzerindeki bu 3'-G çıkıntısı daha sonra 3'-C çıkıntısı içeren vektörlerle ligasyon işlemine tabi tutulur.

### **2.9.2. Gateway Klonlama**

Günümüzde biyolojik sistemlerde yapılan transgenik çalışmalar büyük ölçüde DNA klonlama teknolojilerine dayanmaktadır. Klonlama teknolojileri ve bu teknolojilerin araştırmalarda yaygın kullanımı, rekombinant genlerin analizinde biyoloji alanı için son derece önemli hale gelmiştir. Gateway klonlama, yerleşik bölgeye özgü (site-specific) rekombinasyona dayalı güçlü yapısıyla, etkin klonlama, modüler montaj ve farklı

perspektiflerde ekspresyon için moleküler biyolojide kritik bir araç olarak öne çıkmaktadır (70,71). Modern Gateway klonlama teknolojisi, DNA fragmanlarını dizilerinden bağımsız olarak önceden belirlenmiş bir sıra, yönelim ve okuma çerçevesi içerisinde düzenleyebilmesi sayesinde önemli bir gelişme sağlamıştır. “Life Technologies” tarafından geliştirilmiş ve Invitrogen aracılığıyla pazarlanmış olan Gateway klonlama teknolojisi, geniş bir araştırmacı topluluğu tarafından kabul görmüş ve çok çeşitli *in vivo* ve *in vitro* sistemlerde ekspresyon birimlerinin montajını kolaylaştırmıştır (68).

Gateway sistemi, bölgeye özgü (site-specific) rekombinasyon ilkesinden yararlanarak,  $\lambda$  fajının bir bakteriyel kromozom içine entegrasyonunu ve buradan çıkarılmasını mümkün kılmaktadır (72). Bu mekanizma, sırasıyla BP ve LR reaksiyonlarını katalizleyen iki enzimi BP Clonase ve LR Clonase gerektirir. Bu reaksiyonlar, uyumlu rekombinasyon bağlantı bölgelerini (*att* bölgeleri) taşıyan plazmidler arasında DNA dizilerinin aktarımını sağlar.

BP Clonase enzim karışımı, faj integrası ve integrasyon konak faktöründen oluşmaktadır. Bu enzim karışımı, iki *attB* bölgesi ile çevrelenmiş ilgi duyulan DNA fragmanını, iki *attP* bölgesi içeren donör vektör (*pDONR*) içerisine aktarır. Eşleşen *attB* ve *attP* bölgeleri arasında rekombinasyon gerçekleşir ve DNA fragmanı donör omurgasına eklenir. Bu işlem sonucunda, iki *attL* bölgesi ile çevrelenmiş bir giriş klonu (*entry clone*) elde edilir. LR Clonase enzim karışımı, integras, integrasyon konak faktörü ve faj eksizyonazdan oluşur. Bu karışım, giriş klonlarını substrat olarak kullanarak LR reaksiyonunu katalizler. İki *attL* bölgesi ile çevrelenmiş DNA fragmanı, iki *attR* bölgesi taşıyan hedef vektöre (*destination vector*) aktarılır. Eşleşen *attL* ve *attR* bölgeleri arasında gerçekleşen rekombinasyon sonucunda, iki *attB* bölgesi ile çevrelenmiş yeni bir ekspresyon klonu elde edilir. Klonlarının montajı, teorik olarak DNA fragmanlarının restriksiyon ve ligasyon ile çoklu klonlama bölgeleri (*multiple cloning sites*) içine yerleştirilmesi yoluyla da yapılabilir. Ancak, Gateway sisteminin geliştiricileri, özgün *attB*, *attP*, *attL* ve *attR* bölgelerinin varyantlarını tasarlamış ve bu sayede yönlendirilmiş (directional) klonlamayı kolaylaştıran yüksek özgüllüğe sahip sistemler oluşturmuşlardır (73,74).

Multisite Gateway sistemi, aynı anda iki veya üç DNA fragmanından transkripsiyonel birimlerin oluşturulmasına imkân tanıyan vektörleri içermektedir. Bu sistem; güçlü indüklenebilir veya dokuya özgü promotörler altında birden fazla genin ekspresyonunda, cis-düzenleyici dizi analizlerinde, translasyon füzyon çalışmalarında, alt hücrel lokalizasyon belirlemede ve etiketlenmiş proteinlerin ekspresyonunda kullanılmıştır (75,76).

Ayrıca, gen susturma, genomik fragman rekombinasyonu, gen istifleme (gene stacking) ve protein-protein etkileşimlerinin incelenmesi de bu rekombinasyon temelli Gateway ekspresyon kasetleri kullanılarak sistematik biçimde gerçekleştirilebilmektedir (77,78).

### 2.9.3. Golden Gate Klonlama

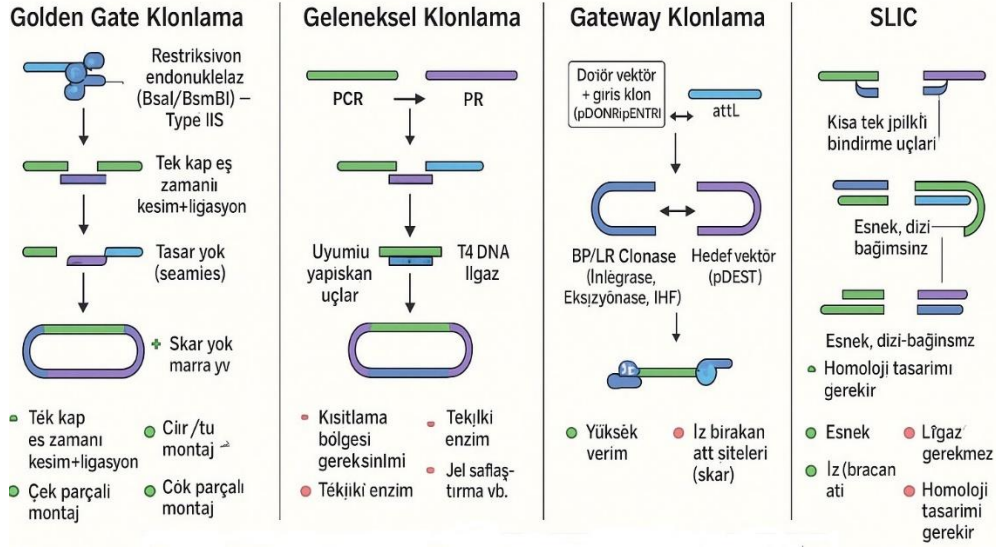
Sentetik biyoloji, genetik konstrüksiyonların oluşturulmasında standartlaştırılmış parçalara dayanmakta ve bu parçaların birleştirilmesi, belirlenmiş montaj ilkeleri doğrultusunda gerçekleştirilmektedir. Golden Gate yöntemi ve türevleri, standartlaştırılmış, neredeyse iz bırakmayan (quasi-scarless), çok parçalı DNA montajı sağlamasıyla öne çıkmakta ve kombinatoriyal kütüphane oluşturulmasında istisnai bir seçenek sunmaktadır. Golden Gate klonlama, Tip IIS restriksiyon enzimlerinin kullanıldığı bir DNA montaj yöntemidir ve montaj standartlarının geliştirilmesi açısından birçok avantajlı özelliğe sahiptir (79). DNA montaj yöntemi olarak, PCR amplifikasyonu, jel saflaştırması ve özel primerlerin tasarlanıp sipariş edilmesi gibi moleküler klonlamanın verimsiz, zaman alıcı ve maliyetli adımlarının bir kısmını ortadan kaldırmaktadır. Bu yöntem, yalnızca dört bazlık küçük bağlantı bölgeleri (fusion sites) gerektirmektedir. Komşu modüllerin birleştirilmesinde kullanılan bu bölgeler, gerektiğinde iz bırakmayan (“scarless”) montajı da mümkün kılacak şekilde tasarlanabilmektedir (80). Bu yönüyle, yan yana dizilen DNA parçalarının çakışan kenar dizileri veya rekombinasyon bölgeleri gerektiren diğer klonlama yöntemlerinden ayrılmaktadır. En yaygın kullanılan restriksiyon enzimleri BsaI, BsmBI ve BbsI'dir. Transkripsiyonel birimler, standart modüler parçalar kullanılarak tek basamaklı bir Golden Gate klonlama reaksiyonu ile birleştirilebilir; çok genli konstrüksiyonların daha ileri düzey montajı ise benzer bir prosedürle gerçekleştirilebilir (81,82). Geleneksel klonlamadan farklı olarak Golden Gate klonlama, daha az diziden bağımsız bölgelerle sınırlıdır; yani seçilen Tip IIS restriksiyon enziminin tanıma bölgesi, montajı yapılacak tüm DNA fragmanlarının iç kısımlarında bulunmamalıdır. Montajda kullanılan Tip IIS enzimlerinin tanıma bölgelerinin başlangıç modüllerinden uzaklaştırılması, “domestikasyon” adı verilen bir süreçle sağlanmaktadır. Bu yaklaşımın sonucu, DNA fragmanlarının tek adımda yapısal olarak kusursuz bir montajıdır. Bununla birlikte, Golden Gate montajı yalnızca çoklu DNA fragmanlarını birleştirmekle kalmayıp aynı zamanda çoklu yer yönelimli mutasyonların (site-directed mutations) oluşturulmasına da olanak tanıyan güçlü bir teknolojidir. Ayrıca, bu yöntem in vivo gen düzenleme amacıyla TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) sistemlerinin özelleştirilmiş versiyonlarının geliştirilmesinde de yaygın olarak kullanılmaktadır.

#### 2.9.4. Sekans ve Ligasyondan Bağımsız Klonlama (SLIC)

SLIC, homolog rekombinasyonun RecA-bağımsız yolunu izleyen bir *in vitro* yöntemdir. Bu yöntem, hedef vektör üzerinde ve en az 12 baz uzunluğunda PCR ile elde edilen ek DNA parçası üzerinde T4 DNA polimeraz kullanılarak oluşturulan tek zincirli tamamlayıcı çıkıntılardan yararlanmaktadır. Reaksiyon karışımına yalnızca tek bir dNTP eklenmesi, bu nükleotidin ilk bulunduğu noktada T4 DNA polimerazın 3'-5' ekzonükleaz ve 5'-3' polimeraz aktivitelerini dengelemek için yeterlidir.

Klonlanacak DNA dizi fragmanı, 5' uçlarında hedef vektörün uçları ile yaklaşık 25 bazlık homolog diziler içeren oligonükleotitler kullanılarak PCR ile çoğaltılır. Hedef vektör, restriksiyon enzimi ile sindirilerek veya PCR amplifikasyonu ile doğrusal hale getirilir. Doğrusal hale getirilmiş hedef vektör ve ilgi duyulan geni içeren PCR ürünü, dNTP içermeyen koşullarda T4 DNA polimeraz ile ayrı ayrı muamele edilir. Hedef vektörün ve PCR ürününün uçlarında yeterli tamamlayıcı tek zincirli 5' çıkıntılar açığa çıktığında, T4 DNA polimerazın 3'-5' ekzonükleaz aktivitesini durdurmak için dCTP eklenir. Bu şekilde işlenmiş doğrusal vektör ve PCR ürünü karıştırılarak birbirine melezlenir. Reaksiyon karışımında ligaz bulunmadığından, sonuçta dört tek zincirli boşluk veya kırık (nick) içeren bir plazmid oluşur. SLIC ile oluşturulan rekombinant DNA, ligasyon veya rekombinasyon için gerekli spesifik dizilere ihtiyaç duymaksızın, doğal elemanların kusursuz bir şekilde yeniden düzenlenmesini sağlamaktadır. Bu yöntem, araştırmacılara ilgi duyulan genin vektör ile kombinatoriyal tarzda birleştirilmesini kolay, hızlı ve düşük maliyetli bir şekilde gerçekleştirme imkânı sunmaktadır (83).

## Klonlama Yöntemlerinin Karşılaştırması



Şekil 2.8: Klonlama yöntemleri.

### 2.10. Sanger Dizileme

Frederick Sanger, sıklıkla “genomiğin babası” olarak anılan, kimya alanında iki kez Nobel Ödülü kazanmış bir bilim insanıdır. Onun “dideoksi” zincir sonlandırma yöntemi üzerine yaptığı çığır açıcı çalışma, geniş ölçekte uygulanabilen ilk DNA dizileme tekniğinin geliştirilmesine öncülük etmiş ve kendisine ikinci Nobel Ödülü’nü kazandırmıştır. Bu yöntem, 1970’lerde geliştirilen ve ilk kez 1977 yılında bir bakteriyofajın genomunun dizilenmesinde kullanılan Sanger dizilemesinin temelini oluşturmuştur. Sanger dizilemesi, genetik araştırmalarda devrim yaratmış ve otuz yılı aşkın bir süre boyunca altın standart olarak kabul edilmiştir. Bu yöntemin etkisi, 1993 yılında kurulan ve kritik bir rol üstlenen Wellcome Sanger Enstitüsü’nün de katkılarıyla, İnsan Genomu Projesi gibi büyük bilimsel girişimlere kadar uzanmıştır. Dizileme teknolojileri, manuel Sanger dizilemesiyle başlamış; 1980’lerde otomatik yöntemlerin geliştirilmesiyle birlikte hızlı bir evrim sürecine girmiştir.

Sanger dizilemesi, yeni DNA zincirlerinin sentezi sırasında zincir sonlandırılması prensibine dayanmaktadır. Bu, reaksiyona ddNTP’lerin eklenmesiyle gerçekleştirilir; çünkü ddNTP’lerin dâhil edilmesi, zincirin daha fazla uzamasını engeller. DNA polimeraz reaksiyonuna floresanla işaretlenmiş ddNTP’ler katıldığında, şablon DNA dizisine karşılık gelen farklı uzunluklarda DNA fragmanları oluşur. Ortaya çıkan bu fragmanlar, DNA dizisinin belirlenmesi amacıyla jel elektroforezi ile ayrıştırılır. Sanger dizileme süreci, DNA’nın nükleotid dizisini belirlemek için şablon hazırlığından veri analizine kadar uzanan

bir dizi kesin aşamayı içermektedir. Sanger dizileme sürecindeki basamaklar 6 basamaktan oluşmaktadır (84,85).

### **2.10.1. DNA Şablonunun Hazırlanması**

Hedef DNA, tek zincirli DNA şablonu elde etmek amacıyla ekstrakte edilir ve saflaştırılır. Bu amaçla kimyasal veya kolona dayalı ekstraksiyon yöntemleri yaygın olarak kullanılmaktadır.

### **2.10.2. DNA Polimeraz Reaksiyonu**

PCR aracılığıyla hedef DNA çoğaltılır. Reaksiyon karışımında normal dNTP'lerin yanı sıra küçük miktarlarda ddNTP'ler de bulunur. Her bir ddNTP, zincir sonlandırıcı bazın tanımlanabilmesi için floresan işaretleyicilerle etiketlenmiştir.

### **2.10.3. Zincir Sonlandırılması ve Fragman Oluşumu**

ddNTP'ler, DNA zincir uzamasını rastgele noktada durdurarak farklı uzunluklarda DNA fragmanlarının oluşmasına neden olur. Her bir fragman, dört nükleotid bazından birine karşılık gelen bir ddNTP ile sonlanır.

### **2.10.4. Jel Elektroforezi ve Kapiler Elektroferez**

DNA fragmanları, büyüklüklerine göre jel elektroforezi veya kapiler elektroferez kullanılarak ayrılır. Modern yöntemlerde kapiler elektroferez, tek bir reaksiyon tüpünde yüksek çözünürlüklü ayırıştırma sağlayarak süreci daha verimli ve kesin hale getirmektedir.

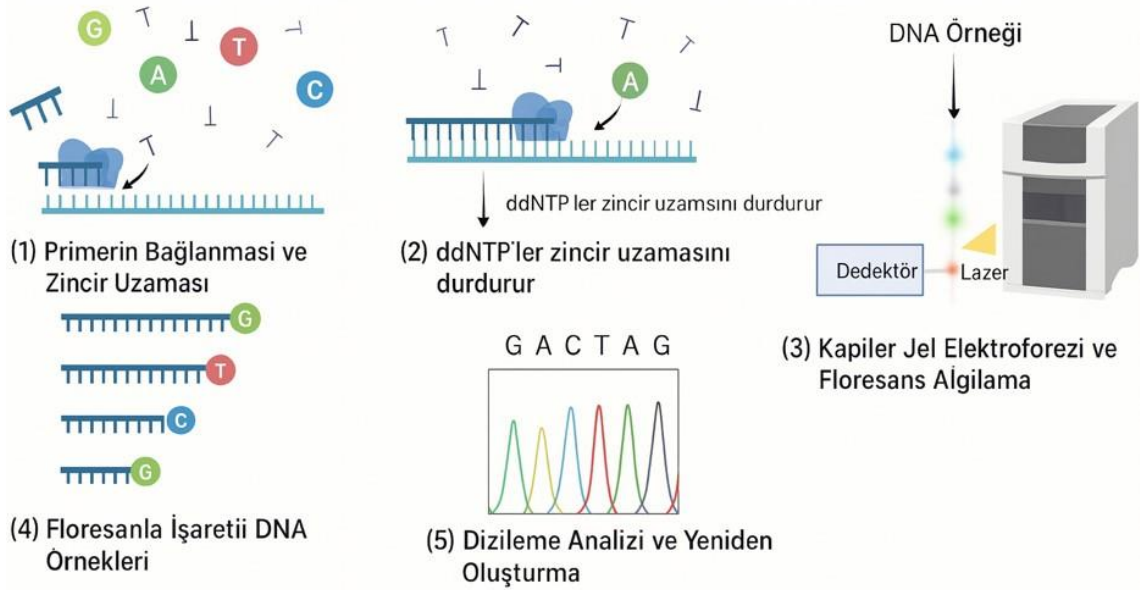
### **2.10.5. Veri Analizi ve Sekansın Birleştirilmesi**

Sonlandırılmış fragmanlardan yayılan floresan sinyaller, her bir pozisyondaki nükleotidi tanımlamak için tespit edilir. Dizilim, kromatogramdaki floresan piklerinin sırasına göre belirlenir ve daha sonra nihai analiz için birleştirilir.

### **2.10.6. Veritabanlarına Karşı Dizi Kontrolü (BLAST)**

Konsensüs dizisinin oluşturulması, kalite değerlendirmesi için gerçekleştirilen ilk adımdır. Dizilerin kalitesi doğrulandıktan ve konsensüs dizisi belirlendikten sonra, bu dizi ya manuel olarak bir referans dizisi ile karşılaştırılır ya da çevrimiçi yazılım araçları ve veri tabanları kullanılarak birden fazla referans dizisiyle karşılaştırılır. Dizi doğrulaması için VDL'ler

arasında en yaygın kullanılan veri tabanı, Ulusal Sağlık Enstitüleri (NIH) araştırmacıları tarafından geliştirilmiş olan Temel Lokal Hizalama Aracı (BLAST)'tır. BLAST algoritması, yeni elde edilen dizilerin bir kütüphane dizileri ile karşılaştırılmasına olanak tanır. BLAST, biyolojik diziler arasındaki benzerlik bölgelerini, nükleotid veya protein dizilerini veri tabanlarındaki dizilerle karşılaştırarak tespit eder ve bu bulguların istatistiksel anlamlılığını hesaplar. Yazılım, diziler arasındaki işlevsel ve evrimsel ilişkilerin belirlenmesi ve gen ailelerinin üyelerinin tanımlanmasına yardımcı olmak amacıyla tasarlanmıştır (86).



**Şekil 2.9:** Sanger dizileme.

## 2.11. RT-qPCR (Real-time PCR)

Bilimsel, tıbbi ve tanısal topluluklara, nükleik asitlerin kantitatif analizinde en güçlü araç sunulmuştur: Gerçek Zamanlı PCR (Real-Time PCR). Bu yeni teknik, 1980'lerin ortalarında Kary Mullis ve çalışma arkadaşları tarafından geliştirilen orijinal Polimeraz Zincir Reaksiyonu'nun (PCR) geliştirilmiş bir versiyonudur (87). Kary Mullis, bu buluşu nedeniyle 1993 yılında Nobel Kimya Ödülü'ne layık görülmüştür. PCR ile karmaşık bir örnekte bulunan herhangi bir nükleik asit dizisi döngüsel bir süreçle çoğaltılarak çok sayıda özdeş kopya elde edilebilmekte ve bu kopyalar kolaylıkla analiz edilebilmektedir. Bu özellik DNA'nın klonlama, genetik mühendislik ve dizileme amaçlı manipülasyonunu mümkün kılmıştır.

Ancak analitik bir yöntem olarak orijinal PCR tekniğinin ciddi sınırlılıkları vardı. DNA dizisi önce çoğaltılıyor, ardından ürün analiz ediliyordu; fakat başlangıçtaki DNA miktarından

bağımsız olarak benzer miktarda ürün oluştuğu için kantifikasyon son derece zordu. Bu sınırlılık, Higuchi ve arkadaşlarının 1992’de geliştirdiği Gerçek Zamanlı PCR ile aşılmıştır (88). Gerçek zamanlı PCR’da, reaksiyon süresince oluşan ürün miktarı, reaksiyona eklenen boyaların veya problemlerin floresansı izlenerek takip edilmektedir. Bu floresan sinyali, oluşan ürün miktarıyla orantılıdır ve belirli bir DNA miktarına ulaşmak için gereken amplifikasyon döngüsü sayısı kaydedilmektedir. Her amplifikasyon döngüsünde molekül sayısının yaklaşık iki katına çıktığı varsayıldığında, başlangıçta örnekte bulunan DNA molekülü sayısı hesaplanabilmektedir. Günümüzde mevcut olan yüksek verimli deteksiyon kimyaları, hassas cihazlar ve optimize edilmiş testler sayesinde, karmaşık bir örnekte belirli bir DNA dizisine ait molekül sayısı, tek bir molekülü saptayacak kadar yüksek doğruluk ve duyarlılıkla belirlenebilmektedir. Gerçek zamanlı PCR’ın tipik kullanım alanları arasında patojen tespiti, gen ekspresyon analizi, tek nükleotid polimorfizmi (SNP) analizi, kromozom anormalliklerinin incelenmesi ve son yıllarda gerçek zamanlı immüno-PCR ile protein tespiti yer almaktadır.

Gerçek zamanlı PCR’da DNA kantifikasyonu için iki temel yöntem bulunmaktadır. İlk yöntem, DNA’ya interkale olan veya minör oluk (minor groove) bölgelerine bağlanan boyaları kullanır. Bu boyalar, DNA’ya bağlandıklarında floresans şiddetinde artış gösterir. Her amplifikasyon döngüsünde, şablon DNA miktarı arttıkça bağlanan florofor sayısı ve dolayısıyla floresan sinyalin yoğunluğu da artar. Yaygın olarak kullanılan floresan interkalasyon boyaları arasında SYBR® Green I ve SYBR® Gold bulunmaktadır (89). Bu boyaların temel avantajı düşük maliyetli olmalarıdır. Ancak özgüllükleri yoktur; yalnızca hedef DNA’ya değil, tüm çift zincirli DNA’ya (dsDNA) bağlanırlar. İkinci yöntem ise, florofor ile işaretlenmiş diziye özgü DNA problemlerini kullanır. Bu yöntemde çeşitli kimyasal yaklaşımlar uygulanmaktadır. En yaygın kullanılan yöntem, Taq polimerazın 5’-3’ ekzonükleaz aktivitesine dayanmaktadır. Bu yöntemde, 5’ ucunda florofor ve 3’ ucunda quencher bulunan bir oligonükleotit kullanılır. Polimerazın ekzonükleaz aktivitesi, oligonükleotidi parçalayarak floroforun quencher’den ayrılmasını sağlar ve bunun sonucunda floresans artışı meydana gelir. Floresan yoğunluğu, reaksiyonun üstel fazında PCR ürününün miktarıyla orantılıdır ve gerçek zamanlı PCR’daki kantifikasyon bu ilişkiye dayanmaktadır (90). Her amplifikasyon döngüsünde floresan yoğunluğu orantılı olarak artar. Eğer başlangıçta daha fazla sayıda şablon kopyası mevcutsa, floresan yoğunluğunun taban sinyalin yaklaşık 10 katı gibi belirli bir eşik değere ulaşması daha az döngüde gerçekleşir. Bu eşik floresan yoğunluğuna ulaşmak için gereken döngü sayısı, hedef DNA’nın Ct (Cycle

threshold) değeri olarak adlandırılır. Ct değerini iki Şekilde kullanabilirsiniz. Birincisi, Ct değerini standart eğri ile karŐılaŐtırmaktır. Standart eğri, Ct değerlerinin hedef DNA'nın bilinen konsantrasyonlarının logaritması ile yarı-logaritmik olarak grafiğe dökülmesiyle elde edilir. Daha sonra bu grafikten interpolasyon yapılarak, bilinmeyen bir örnekteki hedef DNA veya RNA'nın mutlak kopya sayısı belirlenir (91).

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Materyal

##### 3.1.1. HIV-1 Pozitif Kan Örneği

Bu alışmada HIV-1 pozitif kan rneği T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü, HIV referans laboratuvarından temin edilmiştir.

#### 3.2. Yöntem

##### 3.2.1. DNA İzolasyonu

Bu çalışmada, ekstraksiyon cihazı olarak EZ1 Advanced (Qiagen, Hombrechtikon, İsviçre) kullanılmıştır. Çalışmamızda kan örneğinden total nükleik asit ekstraksiyonu, üretici firmanın talimatları doğrultusunda Qiagen EZ1 Virus Mini Kit v2.0 kullanılarak EZ1 Advanced (Qiagen, Hombrechtikon, İsviçre cihazı ile gerçekleştirilmiştir.



şekil 3.1: EZ1 Advanced (Qiagen, Hombrechtikon, İsviçre).

##### 3.2.2. HIV-1 Long Terminal Repeat (LTR) Gen Bölgesinin PZR (Polimeraz Zincir Reaksiyonu) ile çoğaltılması

Çalışmada, HIV-1 genomundan, PZR için proviral DNA tespiti için korunaklı bölge olduğu bilinen LTR bölgesi seçilmiştir. Bu alışmada HIV-1 LTR bölgesinin amplifikasyonu için

kullanılan PCR primer dizileri, literatürde Rozera ve arkadaşları tarafından rapor edilen dizilerden alınmıştır(92).

Hedef DNA bölgesi konvansiyonel PCR ile çoğaltılmıştır. Çalışmalarında kullanılan primer çiftleri Tablo 3.1’de verilmiştir. PZR Green DreamTaq DNA polimerazı (Thermo Fisher Scientific) kullanılarak gerçekleştirilmiştir. PCR reaksiyonu 25 µl toplam hacimde hazırlanmış olup; 12,5 µl 2X Master Mix, 0,5 µl ileri primer, 0,5 µl geri primer, 0,5 µl dNTP karışımı, 0,5 U Taq DNA polimeraz, 2,5 µl 10X tampon, 3 µl izole edilen DNA ve nükleaz-free su ile tamamlanmıştır. LTR amplifikasyonu ‘T100’ (*BIO-RAD, Singapur*) termal döngü cihazında yapılmıştır. Termal döngü programı; 95 °C’de 3 dakika başlangıç denatürasyonu, 35 döngü halinde 95 °C’de 30 saniye denatürasyon, 58 °C’de 30 saniye bağlanma, 72 °C’de 30 saniye uzama ve 72 °C’de 5 dakika son uzatma adımlarından oluşmuştur.

**Tablo 3.1:** Çalışmada kullanılan primerler.

Gen	Primerler	Uzunluk
LTR	R: GGCGCCACTGCTAGAGATTTT	121 bp
	F: GCCTCAATAAAGCTTGCCTTGA	

### 3.2.3. Agaroz Jel Elektrofrez ve PCR Ürünlerinin Saflaştırılması

Jel elektrofrez, DNA, RNA veya proteinlerin boyutlarına, yüklerine ya da konformasyonlarına göre ayrılmasında kullanılan temel bir laboratuvar tekniğidir. Bu yöntem, yüklü moleküllerin bir elektrik alanı etkisi altında jel matriksi içerisinde hareket etmesini esas alır (93). Bu çalışmada, DNA örneklerinin ayrılması amacıyla %3’lük agaroz jel hazırlanmıştır. Bunun için 3-gram agaroz tozu (Condalab, İspanya), 100 mL %1’lik Tris-Borat-EDTA (TBE) tamponu içerisinde çözündürülmüştür. Karışım, mikrodalga fırında 30 saniyelik aralıklarla ısıtılmış; her ısıtma işlemi sonrasında hafifçe karıştırılarak agarozun tamamen çözünmesi sağlanmıştır. Homojen, berrak ve partikülsüz bir çözelti elde edildikten sonra sıcaklık yaklaşık 55–60 °C’ye düşürülmüş ve içerisine 6 damla GelRed (A.B.T, Türkiye) eklenmiştir. Jel döküm tepsisine tarak yerleştirildikten sonra, hava kabarcığı oluşumundan kaçınılması için jel dikkatlice tepsiye dökülmüş ve oda sıcaklığında 20–30 dakika bekletilerek katılaşması sağlanmıştır. Jel opak bir görünüm aldıktan sonra, elektrofrez haznesi %1’lik TBE tamponu ile jel yüzeyini yaklaşık 3–5 mm örtecek şekilde doldurulmuştur. Tarak dikkatlice çıkarılarak örnek yükleme kuyucukları oluşturulmuştur. DNA örnekleri %6’lık yükleme boyası ile karıştırılmıştır (örneğin, 5 µL DNA + 2 µL boya). Hazırlanan karışımlar kuyucuklara dikkatlice pipetlenmiş ve karşılaştırma amacıyla 100 bp

DNA ladder (Thermo Scientific) de yüklenmiştir. Hazne güç kaynağına bağlanarak elektroforez işlemi başlatılmıştır. Elektroforez, hedeflenen DNA fragmentlerinin büyüklüğüne bağlı olarak 125 V gerilimde, 60 dakika süresince gerçekleştirilmiştir. İşlem sonunda jel, UV görüntüleme cihazı (Universal Hood III, ABD) ile incelenmiş ve belgelendirme amacıyla görüntüsü alınmıştır.

### 3.2.4. Gen Klonlama İşlemi

Bu çalışmada, HIV-1 genomunun Long Terminal Repeat (LTR) bölgesi, kantitatif standart oluşturmak amacıyla Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit (#K1232) kullanılarak blunt-end (düz uçlu) klonlama yöntemiyle pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmıştır. Kitin içerdiği pozitif seleksiyon sistemine sahip pJET1.2 vektörü, yalnızca insert içeren rekombinant klonların yaşamasına olanak tanımaktadır.

### 3.2.5. Blunt End Oluşturma ve Ligation

Saflaştırılan PCR ürünleri, Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit (K1231) kullanılarak pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmıştır. PCR ürünleri 2X Reaction Buffer ve Blunting Enzyme ile 70 °C'de 5 dakika inkübe edilerek uç düzleştirme işlemi gerçekleştirilmiştir. Ardından reaksiyon karışımına 0,5 µl pJET1.2/blunt vektörü ve 1 µl T4 DNA ligaz eklenmiş, kısa süre santrifüjlenmiş ve oda sıcaklığında bir gece inkübasyona bırakılmıştır.

### 3.2.6. Transformasyon

Transformasyon deneyi için *E. coli* DH5α hücresi kullanıldı. İlk olarak hücre kompotent haline getirildi. *E. coli* DH5α hücreleri Luria Bertani (LB) Broth besiyerine ekimi yapıldı ve 37 °C'de gece boyunca büyütüldü. Bir gecelik kültürden LB Broth besiyerine 1:100 oranında aşılama yapıldı. Hücreler 37°C'de yoğunlukları 600 nm dalga boyunda OD 0,4–0,5 olacak şekilde büyütüldü. Hücreler ardından 4°C'de 4.000×rpm hızda 5 dk santrifüj edildi ve pelletin üzerine 10 ml 100 mM soğuk CaCl<sub>2</sub> ilave edilerek elle çözümleri sağlandı. Hücreler 30 dk. buz üzerinde bekletildi ve tekrar 4°C'de 4.000×rpm hızında 5 dk santrifüj edildi. Pellet üzerine 2 ml 100 mM soğuk CaCl ilave edilerek çözünmesi sağlandı. Elde edilen kompotent hücreler +4°C'de 2 gün içerisinde kullanılmak üzere muhafaza edildi. Transformasyon deneyi daha önceki çalışmalarda tanımlandığı şartlarda gerçekleştirildi (94). Kompotent *E. coli* hücreleri mikrosantrifüj tüplerine aktarıldı ve bu hücrelerin

üzerlerine 10 µl ligasyon karışımından ilave edildi. Karışım 30 dk buz üzerinde bekletildi ve daha sonra 90 sn. 42°C’de bekletildi. Ardından ependorf tüplerinin içerisine 200 µl LB Broth besiyeri ilave edilerek 37°C’de 2 saat inkübasyona bırakıldı. İnkübasyon sonucunda hücreler petri kaplarında bulunan 50 µg/ml ampisilin içeren LB-Agar besiyeri üzerine cam bagele yayıldı. Petriler 37°C’de 1 gece inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun ardından üremenin olduğu petri kaplarından 10 koloni seçilerek 50 µg/ml ampisilin içeren 3 ml LB broth besiyerine ekimleri gerçekleştirildi ve 37°C’de bir gece çalkalamalı inkübatörde büyütüldü. Ertesi gün kültürden 1 µl koloni PCR reaksiyonunda kullanıldı. pJET1.2/blunt vektörüne spesifik primerler vasıtasıyla yapılan koloni PCR reaksiyonu 20 µl son hacimde, 1X PCR Master Mix, 0.3 pmol/µl herbir primerden ve 1 µl gecelik kültürden olacak şekilde hazırlandı. PZR programı ilk denetürasyon basamağı 95°C’de 15 dk, daha sonra 36 döngü 95°C’de 45 sn., 50°C’de 45 sn., 72°C’de büyüklüklerine göre (1dk/1000 bp) ve son uzama basamağı ise 72°C’de 5 dk. olacak şekilde oluşturuldu. Daha sonra PZR ürünleri etidyum bromür içeren %1’lik agaroz jel elektroforezinde 120 V’da 30 dk. yürütüldü ve U.V ışığı altında doğru klonlar ana PZR fragmentleri (klonlamada kullanılan ilk PZR fragmentleri) ile karşılaştırılarak seçildi. Tespit edilen doğru klondan plazmitler Plazmit Miniprep Kiti (Thermo Scientific) kullanılarak elde edildi ve DNA dizilerinin tespiti için sanger dizileme gerçekleştirildi.

### **3.3. Sanger Dizileme**

#### **3.3.1. Sanger Dizileme Reaksiyonu**

Bu çalışmada, “*Bigdye terminator v3.1 cycle sequencing kit (ABI, Foster City, CA, Applied Biosystems, USA)*” Sanger Dizileme Reaksiyonu (Cycle Sequencing) için kullanılmıştır. İlk aşamada, *LTR* bölgesi için iki 0.2’lük tüpte 8 µL mix hazırlanmıştır. Tüplerin birine ileri ve diğerine geri primer eklenmiştir. Daha sonra, 2 µL plazmit (klonlama ürünü) ilave edilerek pipetaj yapılmış ve ardından spin uygulanmıştır. Son aşamada, termal döngü cihazına yerleştirilmiştir. Bu aşamada kullanılan bileşenlerin miktarları Tablo 3.2’de yer almakta olup, termal döngü reaksiyonunun programı ise Tablo 3.3’te gösterilmiştir.

**Tablo 3.2:** Cycle sequencing bileşenleri.

Bileşen	Miktar
Bigdye terminator	2 µL
5x sequencing buffer	2 µL
Primer (F veya R)	2 µL (10 pmol)
Su	2 µL
DNA	2 µL
Reaksiyon Hacmi (Toplam)	10 µL

**Tablo 3.3:** Cycle sequencing aşamasında uygulanan PZR döngü koşulları.

Döngü Basamağı	Sıcaklık	Süre
İlk Denatürasyon	96°C	1 dk
Denatürasyon	96°C	10 sn
Bağlanma	50°C	5 sn
Uzama	60°C	4 dk

### 3.3.2. Cycle Sequencing Sonrası Pürüfikasyon ve Cihaza Yükleme İşlemi

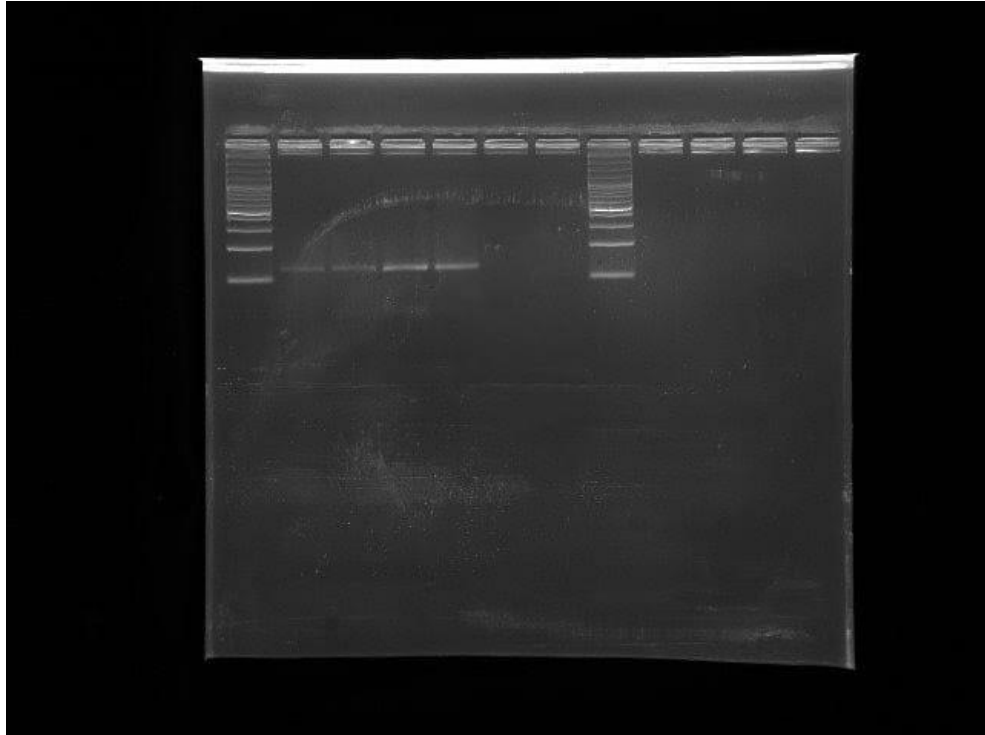
Cycle sequencing reaksiyonlarının tamamlanmasının ardından, reaksiyon karışımında bulunan kullanılmamış boya terminatörleri, tuzlar ve diğer safsızlıkların uzaklaştırılması amacıyla BigDye XTerminator Purification Kit kullanılmıştır. Bu işlem için üretici firmanın talimatları doğrultusunda SAM Solution ve XTerminator Solution birlikte kullanılmıştır. Her örnek için; 45 µL SAM Solution, 10 µL XTerminator Solution ve 10 µL cycle sequencing ürünü karıştırılarak toplamda yaklaşık 65 µL'lik bir reaksiyon karışımı hazırlanmıştır. Hazırlanan tüpler 25 dk vortekslenerek homojenize edilmiş, ardından 3dk santrifüj uygulanmıştır. Bu aşamaların gerçekleştiği 'MicroAmp Optical 96-well Reaction Plate (Applied Biosystems) septa ile kapatılmış ve "ABI 3500XL" cihazına yüklenmiştir. Fasta formatında olan DNA dizi analizi sonuçları, "<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/>" adresindeki BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) programıyla veri tabanında mevcut olan *HIV 1 Proviral* dizileri ile karşılaştırılarak incelenmiştir.

## 4. BULGULAR

Bu tez çalışmasında, 2024 yılında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Referans HIV Laboratuvarında gerçekleştirilmiştir. Toplamda 4 HIV-1 proviral izolatu, HIV laboratuvarından temin edilmiş ve yapılan PZR sonucunda 4 pozitif çıkan örnekten 1 örnek klonlama işlemi için seçilmiştir.

### 4.1. LTR Bölgesinin Çoğaltılma Sonucu

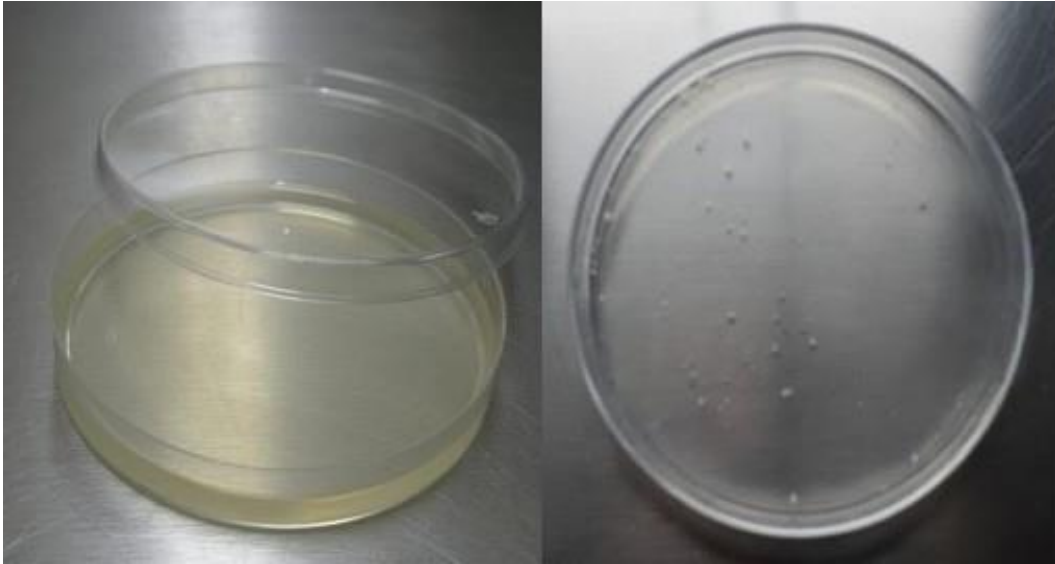
Bu tez çalışmasında, 2024 yılında Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi Tıp fakültesi Tıbbi Biyoloji Laboratuvarı ve Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Ulusal HIV-AIDS Doğrulama Merkezi ve Viral Hepatitler Referans Laboratuvarı'nda Referans gerçekleştirilmiştir. Çalışmada kullanılan dört HIV-1 pozitif kan örneğinden yapılan PZR çalışması sonucunda örneklerden birisi klonlama işlemi için seçilmiştir. Bu örnekte 121 bp'lik LTR bölgesini çoğaltmak amacıyla konvansiyonel PZR yöntemi uygulanmış ve PZR sonucunda ürünler jel elektroforez yöntemi ile analiz edilmiştir. Şekil 4.1 jel elektroforez görüntüsünde, LTR bölgesine ait bantlar görülmektedir.



Şekil 4.1: PZR çalışmasının jel görüntüsü.

#### 4.2. LTR Bölgesinin PJET 1.2 Blunt Vektörüne Klonlanma Sonucu

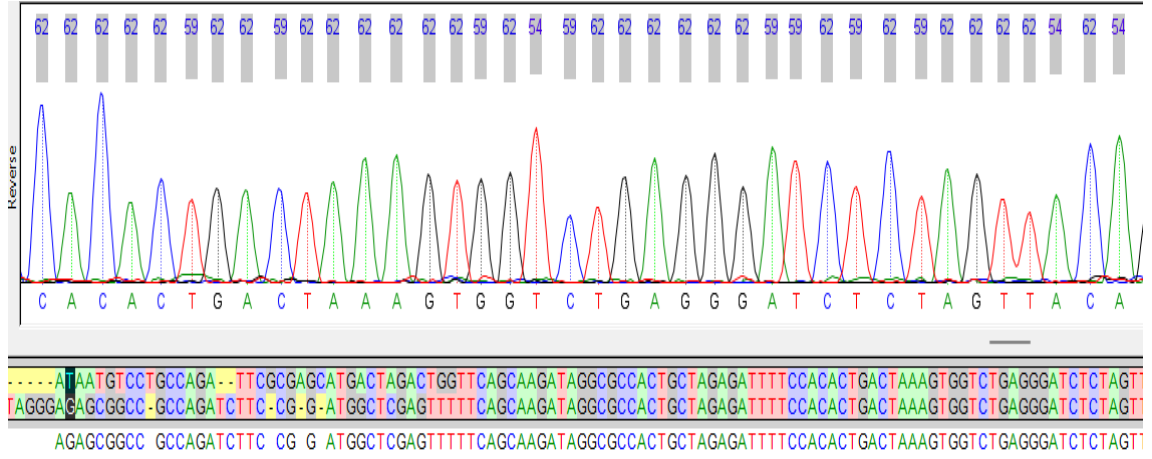
Bu çalışmada, HIV-1 proviral DNA'sının *LTR* bölgesine ait 121 bp'lik PCR ürünü, Thermo Scientific CloneJET PCR Cloning Kit kullanılarak pJET1.2/blunt vektörüne başarıyla klonlanmıştır. Klonlama işleminde transformasyon için *E. coli* DH5 $\alpha$  hücreleri kullanılmış ve ampisilin içeren seçici besiyerlerinde rekombinant koloniler elde edilmiştir. Transformasyon sonrası, ampisilinli LB-agar üzerinde krem-beyaz, düzgün kenarlı ve 1–3 mm çapında koloniler elde edilmiştir. pJET1.2 vektörünün pozitif seleksiyon sistemi nedeniyle negatif ligasyon kontrolünde koloni oluşumu gözlenmemiştir. Elde edilen kolonilerden seçilen 1 tanesi koloni PCR ile doğrulanmış, pozitif kolonilerde *LTR* insertine özgü bantların gözlenmesi klonlamanın başarılı olduğunu göstermiştir. Doğru klonların belirlenmesinin ardından plazmid izolasyonu yapılmış ve Sanger dizileme analizi ile doğrulama sağlanmıştır.



Şekil 4.2: Ampisilinli LB-agar ve üzerinde krem-beyaz koloniler.

#### 4.3. LTR Bölgesinin Sekanslanma Sonucu

Bu çalışmada HIV-1 proviral DNA'sının uzun terminal tekrar (*LTR*) bölgesi klonlanmıştır. Klonlama sürecinde dizileme (sequencing) aşaması, deneyin son basamağı olarak planlanmıştır. Bunun temel nedeni, klonlama sonrası elde edilen koloniler arasından doğru *LTR* insertini taşıyan ve uygun yönlendirilmiş klonların seçilmesidir. *LTR* bölgesine ait diziler, FASTA formatında elde edilerek ilgili referans dizi (*HIV-1 isolate 93br019 from Brazil, LTR region, GenBank: U51289.1*) karşılaştırılmıştır.



Şekil 4.3: Kromatogram görüntüsü.

#### 4.4. LTR Konsensüs Dizisi ve Blast Sonucu

Filename: PRO\_\_FB01.ab1, PRO\_\_RF01.ab1

AGAGCGGCCGCCAGATCTTCCGGATGGCTCGAGTTTTTCAGCAAGATAGGCGCC  
 ACTGCTAGAGATTTTCCACACTGACTAAAATGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACCA  
 GAGTCACACAACAGACGGGCACACACTACTTGAAGCACTCAAGGCAAGCTTTA  
 TTGAGGCATCTTTCTAGAAGATCTCCTACAATATTCTCAG

[Download](#) [GenBank Graphics](#)

**HIV-1 isolate 93br019 from Brazil, LTR region**  
 Sequence ID: [U51289.1](#) Length: 676 Number of Matches: 1

Range 1: 430 to 550 [GenBank](#) [Graphics](#) [Next Match](#) [Previous Match](#)

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
224 bits(121)	4e-54	121/121(100%)	0/121(0%)	Plus/Minus
Query 49	GGCGCCACTGCTAGAGATTTTCCACACTGACTAAAATGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC	108		
Sbjct 550	GGCGCCACTGCTAGAGATTTTCCACACTGACTAAAATGGTCTGAGGGATCTCTAGTTACC	491		
Query 109	AGAGTCACACAACAGACGGGCACACACTACTTGAAGCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGG	168		
Sbjct 490	AGAGTCACACAACAGACGGGCACACACTACTTGAAGCACTCAAGGCAAGCTTTATTGAGG	431		
Query 169	C 169			
Sbjct 430	C 430			

Şekil 4.4: Blast sonucunun görüntüsü.

## 5. TARTIŞMA VE SONUÇ

Bu tez çalışmasında, HIV-1 enfeksiyonu tanısında ve bazı özel hasta gruplarında doğrulama amacı ile kullanılmakta olan proviral DNA PZR testinde testin geçerli sayılması için gerekli olan pozitif kontrol materyalinin gen klonlama teknolojisi kullanılarak geliştirilmesi amaçlanmıştır. Bu tez çalışmasında, HIV-1 proviral DNA'nın gerçek zamanlı RT-PCR yöntemiyle kantitatif analizinin optimizasyonu amacıyla, gen klonlama teknolojisi kullanılarak yeni bir kantitasyon standardı geliştirilmiştir. Çalışmada, HIV-1 genomunun LTR (Long Terminal Repeat) bölgesi konvansiyonel PCR ile çoğaltılmış, pJET1.2/blunt vektörüne klonlanmış ve rekombinant plazmid Sanger sekanslama ile doğrulanmıştır. Literatürde bu alanda gerçekleştirilen benzer çalışmalardan biri, Desire ve ark. (95) tarafından yayımlanmıştır. Bu çalışmada araştırmacılar, HIV-1 proviral yükünün kantitasyonu için PCR@2.1-TOPO® vektörü kullanılarak HIV-1 gag gen bölgesi klonlanmış ve elde edilen plazmid dizileri doğrulanarak gerçek zamanlı PCR analizlerinde standart eğriler oluşturulmuştur. Söz konusu çalışma ile bu tez çalışması arasında hem kullanılan yöntem hem de amaç bakımından önemli benzerlikler bulunmaktadır. Ancak bazı yönlerden farklılıklar dikkat çekicidir. Bu gurubun çalışmasında *gag* geni hedeflenmişken, bu tezde LTR bölgesi tercih edilmiştir. LTR bölgesi, viral replikasyonun düzenlenmesinde kritik bir rol oynayan, yüksek oranda korunan bir dizidir ve HIV-1 tespitinde yüksek özgüllük sağlaması nedeniyle PCR tabanlı kantitasyon çalışmalarında önemli bir hedeftir. Bu yönüyle, tez çalışmasında kullanılan hedef bölgenin duyarlılık açısından daha avantajlı olduğu söylenebilir. Yine aynı grup elde ettikleri plazmid standartları kullanarak klinik örneklerde HIV-1 proviral DNA miktarını başarıyla ölçmüş ve kantitatif sonuçlar elde etmişlerdir. Tez çalışmasında ise, aynı amaçla hazırlanan rekombinant vektör doğrulama aşamasında bırakılmış ve ancak hasta örneklerinde kantitasyon analizine geçilmemiştir. Bu bağlamda, tez çalışması bir ön hazırlık ve yöntem geliştirme aşamasını başarıyla tamamlamıştır. Ancak elde edilen plazmidin referans HIV-1 hücresi kullanılarak kantite edilerek standardize hale getirilmesi ve testin klinik hasta örneklerinde kullanılması aşaması gerçekleştirilememiştir. Ayrıca pJET1.2/blunt vektörünün sahip olduğu pozitif seleksiyon sistemi sayesinde, non-rekombinant kolonilerin kolayca elenmesi süreci oldukça pratik hale getirmiştir. Desire ve ark. [95] çalışmasında ise klasik mavi-beyaz koloni ayrımı yöntemi kullanılmıştır. Ancak bu çalışmanın bazı sınırlılıkları da bulunmaktadır. Klonlanan plazmidin kopya sayısına bağlı

olarak kesin kantitasyon yapılabilmesi için, spektrofotometrik ölçüm sonrası oluşturulacak standart eğrilerin doğrulukla kalibre edilmesi gerekmektedir. Ayrıca geliştirilen standartların uzun vadede stabilitesinin test edilmesi ve klinik örneklerde doğrulayıcı analizlerin gerçekleştirilmesi, yöntemin uygulama potansiyelini ortaya koymak açısından önemlidir.

Diğer bir çalışmada, Malnati ve ark. [96] tarafından geliştirilen ve literatürde yaygın olarak referans gösterilen “evrensel real-time PCR assay” protokolü ile benzerlik göstermektedir. Bu çalışma kapsamında HIV-1’in LTR-gag birleşim bölgesine özgü primer ve prob setleri tasarlayarak, Grup M HIV-1 suşlarının neredeyse tamamını kapsayacak şekilde (yaklaşık %91) yüksek duyarlılıkla çalışan bir kantitasyon yöntemi oluşturmuşlardır. Bu çalışmada, test doğruluğu ve güvenilirliği, hem standart hücre dizileri (örneğin 8E5 hücreleri) hem de klinik örnekler üzerinde test edilmiştir. Ayrıca, protokolün hızlı uygulanabilirliği, düşük altyapılı laboratuvarlara uyumluluğu ve alt tip çeşitliliğine rağmen yüksek özgüllük sağlaması açısından dikkat çekici olduğu rapor edilmiştir. Tez çalışmasında ise benzer şekilde LTR bölgesi hedeflenmiş ancak sadece bu bölgeye odaklanılmıştır. Malnati ve ark. [96] çalışmasındaki LTR-gag birleşim bölgesi, daha geniş bir alt tip kapsayıcılığı sağlarken, tez çalışmasında LTR bölgesinin yüksek konservasyonu göz önüne alınarak daha sade bir hedefleme tercih edilmiştir. Bu tercih, özgüllük açısından avantaj sağlasa da alt tip çeşitliliğine karşı kapsayıcılığın test edilmemesi yöntemin evrensel geçerliliğini şu an için sınırlandırmaktadır. Ancak bu, sonraki validasyon çalışmalarıyla aşılabilir bir sınırlılık olarak değerlendirilebilir. Malnati ve ark. [96] çalışmasında, HIV-1 proviral DNA'nın kantitasyonu, doğrudan hazırlanmış bir hücre lizati üzerinden gerçekleştirilmiş, böylece yöntem hız ve kolaylık açısından öne çıkmıştır. Tez çalışmasında ise gen klonlama yoluyla potansiyel bir referans materyal üretilmiş, bu sayede her PCR çalışmasında sabit, tekrarlanabilir ve maliyet açısından avantajlı bir kalite kontrol örneği oluşturulması sağlanmıştır. Klonlama aşamasında kullanılan pJET1.2/blunt vektörünün pozitif seleksiyon sistemine sahip olması, sadece insert içeren transformantların seçimini kolaylaştırmış ve işlem süresini kısaltmıştır. Bu, Malnati ve ark. (96) hücre temelli referans materyallerinden farklı olarak, genetik olarak doğrulanabilir, dizi güvenilirliği yüksek bir sistem sağlamaktadır. Öte yandan, Malnati ve ark. (96) protokolü aynı gün içinde sonuç verebilecek kadar hızlı bir iş akışı sağlarken, bu tez çalışması halen geliştirme ve optimizasyon aşamasındadır. Klinik örneklerde kantitasyon çalışmaları henüz yapılmamıştır; ancak standart plazmid materyalin hazırlanması, bu tür validasyon çalışmaları için güçlü bir altyapı oluşturmuştur.

Rozera ve ark. (97) tarafından yürütülen çalışmada, HIV ve HCV ko-enfeksiyonu olan ve başarılı şekilde ART tedavisi almakta olan bireylerde HIV-1 proviral DNA dinamikleri değerlendirilmiştir. Bu çalışmada kantitasyon amacıyla, periferal kan mononükleer hücrelerinden (PBMC) ekstrakte edilen DNA üzerinden LTR bölgesine özgü primerler ile gerçek zamanlı PCR gerçekleştirilmiş, kantitasyon için ise 8E5 hücre dizisinden elde edilen proviral DNA kullanılmıştır. Çalışmanın sonucunda, total HIV-1 DNA düzeylerinin genel olarak zaman içinde stabil kaldığı, ancak bazı bireylerde tedavi sonlandığında anlamlı düzeyde artış görülebildiği rapor edilmiştir. Bu artışların muhtemel nedenleri arasında, dokularda latent olarak bulunan HIV-1 proviral DNA'nın periferik dolaşıma mobilize olması gösterilmiştir. Her iki çalışmada da LTR bölgesine özgü primerlerin tercih edilmesi, HIV-1 proviral DNA'nın kantitatif tespitinde bu bölgenin korunmuşluğu ve amplifikasyon verimliliği açısından avantaj sağladığını ortaya koymaktadır. Ancak bu tez çalışmasında, kantitasyon amacıyla kullanılan referans materyal olarak, laboratuvar ortamında gen klonlama teknolojisi ile elde edilen plazmid DNA tercih edilirken; Rozera ve ark. [97] çalışmasında, hücre dizisinden elde edilen standart DNA kullanılmıştır. Bu yönüyle bakıldığında, tez çalışması, maliyet etkinliği, standartlaştırma ve geniş erişilebilirlik bakımından laboratuvarlara daha uygulanabilir bir yöntem sunmaktadır. Ayrıca, Rozera ve ark. [97] çalışmasında HIV-1 DNA'nın klinik tedaviye yanıtla değişimi değerlendirilmişken; tez çalışmasında metodun teknik validasyonu ve kantitasyon güvenilirliği öncelikli olarak ele alınmıştır. Dolayısıyla bu tez, HIV rezervuarlarının ölçümü gibi ileri düzey klinik uygulamalara altyapı sağlayacak güvenilir kantitasyon standartlarının geliştirilmesi yönünde önemli bir katkı sunmaktadır.

Bu tez çalışmasında, HIV-1 proviral DNA'nın PZR testleri ile tespitinde kullanılacak olan pozitif kalite kontrol materyali, gen klonlama teknolojisi ile başarıyla geliştirilmiştir. Desire ve arkadaşlarının çalışması ile karşılaştırıldığında, benzer şekilde moleküler klonlama ve PCR tabanlı yaklaşım kullanılmış olmakla birlikte, hedef gen bölgesi ve vektör sisteminde bazı farklılıklar bulunmaktadır. Tez çalışmasında kullanılan LTR hedefi, özgüllük açısından avantaj sağlarken; pJET1.2 vektörü pozitif seleksiyon özelliği sayesinde işlem süresini kısaltmıştır.

Sonuç olarak, bu tez çalışması HIV-1 proviral DNA'nın kantitatif olarak değerlendirilmesi sürecinin ilk aşaması için önemli bir katkı sunmakta ve ilerleyen süreçte klinik tanı uygulamalarında kullanılacak yerli, maliyet etkin ve güvenilir referans standartların oluşturulması açısından ilk temel çalışmasını oluşturmaktadır. Bu protokolün kantitasyon

aşamasının da geliştirilerek klinik örneklerde validasyonunun tamamlanması ile HIV tanı ve takip sürecinin geliştirilmesi ve güçlendirilmesi mümkün olabilecektir.

## KAYNAKLAR

1. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie*. 2016 May;43(3):203–22.
2. HIV and AIDS [Internet]. [cited 2025 Aug 5]. Available from: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hiv-aids>
3. Dufour C, Gantner P, Fromentin R, Chomont N. The multifaceted nature of HIV latency. *J Clin Invest* [Internet]. 2021 May 28;130(7). Available from: <https://doi.org/10.1172/JCI136227>
4. Health Disparities in HIV Care and Strategies for Improving Equitable Access to Care. 2025 Feb 3 [cited 2025 Aug 5]; Available from: <https://www.ajmc.com/view/health-disparities-in-hiv-care-and-strategies-for-improving-equitable-access-to-care>
5. Calabrese SK, Kalwicz DA, Zaheer MA, Dovidio JF, Garner A, Zea MC, et al. The Potential Role of Undetectable = Untransmittable (U = U) in Reducing HIV Stigma among Sexual Minority Men in the US. *AIDS Behav*. 2024 Feb 1;28(2):741–57.
6. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. *J Mol Biol*. 1999 Jan 8;285(1):1–32.
7. Choe H, Farzan M, Sun Y, Sullivan N, Rollins B, Ponath PD, et al. The beta-chemokine receptors CCR3 and CCR5 facilitate infection by primary HIV-1 isolates. *Cell*. 1996 Jun 28;85(7):1135–48.
8. Kwong PD, Wyatt R, Robinson J, Sweet RW, Sodroski J, Hendrickson WA. Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*. 1998 Jun 18;393(6686):648–59.
9. LaLonde JM, Kwon YD, Jones DM, Sun AW, Courter JR, Soeta T, et al. Structure-based design, synthesis, and characterization of dual hotspot small-molecule HIV-1 entry inhibitors. *J Med Chem*. 2012 May 10;55(9):4382–96.

10. Wu X, Yang ZY, Li Y, Hogerkorp CM, Schief WR, Seaman MS, et al. Rational design of envelope identifies broadly neutralizing human monoclonal antibodies to HIV-1. *Science*. 2010 Aug 13;329(5993):856–61.
11. Kwon YD, Finzi A, Wu X, Dogo-Isonagie C, Lee LK, Moore LR, et al. Unliganded HIV-1 gp120 core structures assume the CD4-bound conformation with regulation by quaternary interactions and variable loops. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012 Apr 10;109(15):5663–8.
12. Guttman M, Kahn M, Garcia NK, Hu SL, Lee KK. Solution structure, conformational dynamics, and CD4-induced activation in full-length, glycosylated, monomeric HIV gp120. *J Virol*. 2012 Aug;86(16):8750–64.
13. Chan DC, Fass D, Berger JM, Kim PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell*. 1997 Apr 18;89(2):263–73.
14. Tan K, Liu J, Wang J, Shen S, Lu M. Atomic structure of a thermostable subdomain of HIV-1 gp41. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Nov 11;94(23):12303–8.
15. Chong H, Yao X, Sun J, Qiu Z, Zhang M, Waltersperger S, et al. The M-T hook structure is critical for design of HIV-1 fusion inhibitors. *J Biol Chem*. 2012 Oct 5;287(41):34558–68.
16. Ouyang W, An T, Guo D, Wu S, Tien P. The potent human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) entry inhibitor HR212 blocks formation of the envelope glycoprotein gp41 six-helix bundle. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2013 Mar;29(3):613–20.
17. Gustchina E, Li M, Louis JM, Anderson DE, Lloyd J, Frisch C, et al. Structural basis of HIV-1 neutralization by affinity matured Fabs directed against the internal trimeric coiled-coil of gp41. *PLoS Pathog*. 2010 Nov 11;6(11):e1001182.
18. Wang S, York J, Shu W, Stoller MO, Nunberg JH, Lu M. Interhelical interactions in the gp41 core: implications for activation of HIV-1 membrane fusion. *Biochemistry*. 2002 Jun 11;41(23):7283–92.
19. Shu W, Ji H, Lu M. Interactions between HIV-1 gp41 core and detergents and their implications for membrane fusion. *J Biol Chem*. 2000 Jan 21;275(3):1839–45.

20. Erickson-Viitanen S, Manfredi J, Viitanen P, Tribe DE, Tritch R, Hutchison CA 3rd, et al. Cleavage of HIV-1 gag polyprotein synthesized in vitro: sequential cleavage by the viral protease. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 1989 Dec;5(6):577–91.
21. Su CTT, Kwok CK, Verma CS, Gan SKE. Modeling the full length HIV-1 Gag polyprotein reveals the role of its p6 subunit in viral maturation and the effect of non-cleavage site mutations in protease drug resistance. *J Biomol Struct Dyn*. 2018 Dec;36(16):4366–77.
22. Bryant M, Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(2):523–7.
23. Zhao G, Perilla JR, Yufenyuy EL, Meng X, Chen B, Ning J, et al. Mature HIV-1 capsid structure by cryo-electron microscopy and all-atom molecular dynamics. *Nature*. 2013 May 30;497(7451):643–6.
24. Rihn SJ, Wilson SJ, Loman NJ, Alim M, Bakker SE, Bhella D, et al. Extreme genetic fragility of the HIV-1 capsid. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003461.
25. Jiang J, Ablan SD, Derebail S, Hercík K, Soheilian F, Thomas JA, et al. The interdomain linker region of HIV-1 capsid protein is a critical determinant of proper core assembly and stability. *Virology*. 2011 Dec 20;421(2):253–65.
26. Pornillos O, Ganser-Pornillos BK, Kelly BN, Hua Y, Whitby FG, Stout CD, et al. X-ray structures of the hexameric building block of the HIV capsid. *Cell*. 2009 Jun 26;137(7):1282–92.
27. Jacques DA, McEwan WA, Hilditch L, Price AJ, Towers GJ, James LC. HIV-1 uses dynamic capsid pores to import nucleotides and fuel encapsidated DNA synthesis. *Nature*. 2016 Aug 18;536(7616):349–53.
28. Rossi E, Meuser ME, Cunanan CJ, Cocklin S. Structure, Function, and Interactions of the HIV-1 Capsid Protein. *Life Basel Switz*. 2021 Jan 29;11(2).
29. Gelderblom HR. Assembly and morphology of HIV: potential effect of structure on viral function. *AIDS Lond Engl*. 1991 Jun;5(6):617–37.

30. Göttlinger HG, Sodroski JG, Haseltine WA. Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 Aug;86(15):5781–5.
31. Nermut MV, Hockley DJ, Jowett JB, Jones IM, Garreau M, Thomas D. Fullerene-like organization of HIV gag-protein shell in virus-like particles produced by recombinant baculovirus. *Virology*. 1994 Jan;198(1):288–96.
32. González SA, Affranchino JL, Gelderblom HR, Burny A. Assembly of the matrix protein of simian immunodeficiency virus into virus-like particles. *Virology*. 1993 Jun;194(2):548–56.
33. Levin JG, Mitra M, Mascarenhas A, Musier-Forsyth K. Role of HIV-1 nucleocapsid protein in HIV-1 reverse transcription. *RNA Biol*. 2010 Dec;7(6):754–74.
34. Levin JG, Guo J, Rouzina I, Musier-Forsyth K. Nucleic acid chaperone activity of HIV-1 nucleocapsid protein: critical role in reverse transcription and molecular mechanism. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 2005;80:217–86.
35. Lee SK, Harris J, Swanstrom R. A strongly transdominant mutation in the human immunodeficiency virus type 1 gag gene defines an Achilles heel in the virus life cycle. *J Virol*. 2009 Sep;83(17):8536–43.
36. Peliska JA, Balasubramanian S, Giedroc DP, Benkovic SJ. Recombinant HIV-1 nucleocapsid protein accelerates HIV-1 reverse transcriptase catalyzed DNA strand transfer reactions and modulates RNase H activity. *Biochemistry*. 1994 Nov 22;33(46):13817–23.
37. Mailler E, Bernacchi S, Marquet R, Paillart JC, Vivet-Boudou V, Smyth RP. The Life-Cycle of the HIV-1 Gag-RNA Complex. *Viruses*. 2016 Sep 10;8(9).
38. Cassan E, Arigon-Chifolleau AM, Mesnard JM, Gross A, Gascuel O. Concomitant emergence of the antisense protein gene of HIV-1 and of the pandemic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2016 Oct 11;113(41):11537–42.
39. Sertznig H, Hillebrand F, Erkelenz S, Schaal H, Widera M. Behind the scenes of HIV-1 replication: Alternative splicing as the dependency factor on the quiet. *Virology*. 2018 Mar;516:176–88.

40. Chameettachal A, Mustafa F, Rizvi TA. Understanding Retroviral Life Cycle and its Genomic RNA Packaging. *J Mol Biol.* 2023 Feb 1;435(3):167924.
41. Miller RH. Human immunodeficiency virus may encode a novel protein on the genomic DNA plus strand. *Science.* 1988 Mar 18;239(4846):1420–2.
42. Barboric M, Peterlin BM. A new paradigm in eukaryotic biology: HIV Tat and the control of transcriptional elongation. *PLoS Biol.* 2005 Feb;3(2):e76.
43. Mbondji-Wonje C, Dong M, Zhao J, Wang X, Nanfack A, Ragupathy V, et al. Genetic variability of the U5 and downstream sequence of major HIV-1 subtypes and circulating recombinant forms. *Sci Rep.* 2020 Aug 6;10(1):13214.
44. Li L, Li HS, Pauza CD, Bukrinsky M, Zhao RY. Roles of HIV-1 auxiliary proteins in viral pathogenesis and host-pathogen interactions. *Cell Res.* 2005 Dec;15(11–12):923–34.
45. Das AT, Harwig A, Vrolijk MM, Berkhout B. The TAR hairpin of human immunodeficiency virus type 1 can be deleted when not required for Tat-mediated activation of transcription. *J Virol.* 2007 Jul;81(14):7742–8.
46. Human Immunodeficiency Virus (HIV). *Transfus Med Hemotherapy Off Organ Dtsch Ges Transfusionsmedizin Immunhamatologie.* 2016 May;43(3):203–22.
47. Campbell EM, Hope TJ. Live cell imaging of the HIV-1 life cycle. *Trends Microbiol.* 2008 Dec;16(12):580–7.
48. Moore JP, Trkola A, Dragic T. Co-receptors for HIV-1 entry. *Curr Opin Immunol.* 1997;9(4):551–62.
49. Novikova M, Zhang Y, Freed EO, Peng K. Multiple Roles of HIV-1 Capsid during the Virus Replication Cycle. *Virol Sin.* 2019 Apr;34(2):119–34.
50. Cosnefroy O, Murray PJ, Bishop KN. HIV-1 capsid uncoating initiates after the first strand transfer of reverse transcription. *Retrovirology.* 2016 Aug 22;13(1):58.
51. Burdick RC, Li C, Munshi M, Rawson JMO, Nagashima K, Hu WS, et al. HIV-1 uncoats in the nucleus near sites of integration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2020 Mar 10;117(10):5486–93.

52. Dharan A, Bachmann N, Talley S, Zwickelmaier V, Campbell EM. Nuclear pore blockade reveals that HIV-1 completes reverse transcription and uncoating in the nucleus. *Nat Microbiol.* 2020 Sep;5(9):1088–95.
53. Bryant M, Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jan;87(2):523–7.
54. de Marco A, Müller B, Glass B, Riches JD, Kräusslich HG, Briggs JAG. Structural analysis of HIV-1 maturation using cryo-electron tomography. *PLoS Pathog.* 2010 Nov 24;6(11):e1001215.
55. Shukla A, Ramirez NGP, D’Orso I. HIV-1 Proviral Transcription and Latency in the New Era. *Viruses.* 2020 May 18;12(5):555.
56. Engelman AN, Singh PK. Cellular and molecular mechanisms of HIV-1 integration targeting. *Cell Mol Life Sci CMLS.* 2018 Jul;75(14):2491–507.
57. Craigie R, Bushman FD. HIV DNA integration. *Cold Spring Harb Perspect Med.* 2012 Jul;2(7):a006890.
58. Olson A, Basukala B, Wong WW, Henderson AJ. Targeting HIV-1 Proviral Transcription. *Curr Opin Virol.* 2019 Oct;38:89–96.
59. Siliciano JM, Siliciano RF. The Remarkable Stability of the Latent Reservoir for HIV-1 in Resting Memory CD4+ T Cells. *J Infect Dis.* 2015 Nov 1;212(9):1345–7.
60. Maldarelli F. The role of HIV integration in viral persistence: no more whistling past the proviral graveyard. *J Clin Invest.* 126(2):438–47.
61. Bruner KM, Murray AJ, Pollack RA, Soliman MG, Laskey SB, Capoferri AA, et al. Defective proviruses rapidly accumulate during acute HIV-1 infection. *Nat Med.* 2016 Sep;22(9):1043–9.
62. Buchholtz NVEJ, Hermans LE, Umunnakwe CN, Nühn MM, Voss R, Need E, et al. Defective proviruses significantly impact viral transcription and immune activation in men and women with HIV-1 subtype C in rural South Africa. *Front Immunol.* 2024;15:1484358.

63. Kuniholm J, Armstrong E, Bernabe B, Coote C, Berenson A, Patalano SD, et al. Intragenic proviral elements support transcription of defective HIV-1 proviruses. *PLoS Pathog.* 2021 Dec;17(12):e1009982.
64. Ramirez PW, Pantoja C, Beliakova-Bethell N. An Evaluation on the Role of Non-Coding RNA in HIV Transcription and Latency: A Review. *HIVAIDS Auckl NZ.* 2023 Mar 14;15:115–34.
65. McCauley SM, Kim K, Nowosielska A, Dauphin A, Yurkovetskiy L, Diehl WE, et al. Intron-containing RNA from the HIV-1 provirus activates type I interferon and inflammatory cytokines. *Nat Commun.* 2018 Dec 13;9(1):5305.
66. Backman K, Ptashne M. Maximizing gene expression on a plasmid using recombination in vitro. *Cell.* 1978 Jan;13(1):65–71.
67. Danna K, Nathans D. Specific cleavage of simian virus 40 DNA by restriction endonuclease of *Hemophilus influenzae*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1971 Dec;68(12):2913–7.
68. Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. DNA cloning using in vitro site-specific recombination. *Genome Res.* 2000 Nov;10(11):1788–95.
69. Siegel RW, Velappan N, Pavlik P, Chasteen L, Bradbury A. Recombinatorial cloning using heterologous lox sites. *Genome Res.* 2004 Jun;14(6):1119–29.
70. Karimi M, Depicker A, Hilson P. Recombinational Cloning with Plant Gateway Vectors. *Plant Physiol.* 2007 Dec;145(4):1144–54.
71. Tzfira T, Tian GW, Lacroix B, Vyas S, Li J, Leitner-Dagan Y, et al. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Mol Biol.* 2005 Mar;57(4):503–16.
72. Katzen F. Gateway(®) recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin Drug Discov.* 2007 Apr;2(4):571–89.
73. Cheo DL, Titus S, Byrd DRN, Hartley JL, Temple GF, Brasch MA. Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using in vitro site-specific recombination: functional analysis of multi-segment expression clones. *Genome Res.* 2004;14 10B:2111–20.

74. Sasaki Y, Sone T, Yoshida S, Yahata K, Hotta J, Chesnut JD, et al. Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multisite Gateway system. *J Biotechnol.* 2004 Feb 5;107(3):233–43.
75. Citovsky V, Lee LY, Vyas S, Glick E, Chen MH, Vainstein A, et al. Subcellular localization of interacting proteins by bimolecular fluorescence complementation in planta. *J Mol Biol.* 2006 Oct 6;362(5):1120–31.
76. Underwood BA, Vanderhaeghen R, Whitford R, Town CD, Hilson P. Simultaneous high-throughput recombinational cloning of open reading frames in closed and open configurations. *Plant Biotechnol J.* 2006 May;4(3):317–24.
77. Alvarez JP, Pekker I, Goldshmidt A, Blum E, Amsellem Z, Eshed Y. Endogenous and synthetic microRNAs stimulate simultaneous, efficient, and localized regulation of multiple targets in diverse species. *Plant Cell.* 2006 May;18(5):1134–51.
78. Schwab R, Ossowski S, Riester M, Warthmann N, Weigel D. Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *Plant Cell.* 2006 May;18(5):1121–33.
79. Engler C, Kandzia R, Marillonnet S. A one pot, one step, precision cloning method with high throughput capability. *PloS One.* 2008;3(11):e3647.
80. Liu Q, Li MZ, Leibham D, Cortez D, Elledge SJ. The univector plasmid-fusion system, a method for rapid construction of recombinant DNA without restriction enzymes. *Curr Biol CB.* 1998 Dec 3;8(24):1300–9.
81. Sarrion-Perdigones A, Falconi EE, Zandalinas SI, Juárez P, Fernández-del-Carmen A, Granell A, et al. GoldenBraid: an iterative cloning system for standardized assembly of reusable genetic modules. *PloS One.* 2011;6(7):e21622.
82. Weber E, Engler C, Gruetzner R, Werner S, Marillonnet S. A modular cloning system for standardized assembly of multigene constructs. *PloS One.* 2011 Feb 18;6(2):e16765.
83. Li MZ, Elledge SJ. Harnessing homologous recombination in vitro to generate recombinant DNA via SLIC. *Nat Methods.* 2007 Mar;4(3):251–6.
84. Nafea AM, Wang Y, Wang D, Salama AM, Aziz MA, Xu S, et al. Application of next-generation sequencing to identify different pathogens. *Front Microbiol.* 2023;14:1329330.

85. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1977 Dec;74(12):5463–7.
86. Crossley BM, Bai J, Glaser A, Maes R, Porter E, Killian ML, et al. Guidelines for Sanger sequencing and molecular assay monitoring. *J Vet Diagn Investig Off Publ Am Assoc Vet Lab Diagn Inc*. 2020 Nov;32(6):767–75.
87. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985 Dec 20;230(4732):1350–4.
88. Higuchi R, Dollinger G, Walsh PS, Griffith R. Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnol Nat Publ Co*. 1992 Apr;10(4):413–7.
89. Dragan AI, Pavlovic R, McGivney JB, Casas-Finet JR, Bishop ES, Strouse RJ, et al. SYBR Green I: fluorescence properties and interaction with DNA. *J Fluoresc*. 2012 Jul;22(4):1189–99.
90. Okamura Y, Kondo S, Sase I, Suga T, Mise K, Furusawa I, et al. Double-labeled donor probe can enhance the signal of fluorescence resonance energy transfer (FRET) in detection of nucleic acid hybridization. *Nucleic Acids Res*. 2000 Dec 15;28(24):E107.
91. Ma H, Bell KN, Loker RN. qPCR and qRT-PCR analysis: Regulatory points to consider when conducting biodistribution and vector shedding studies. *Mol Ther Methods Clin Dev*. 2020 Nov 17;20:152–68.
92. Rozera G, Fabbri G, Lorenzini P, Mastroiosa I, Timelli L, Zaccarelli M, et al. Peripheral blood HIV-1 DNA dynamics in antiretroviral-treated HIV/HCV co-infected patients receiving directly-acting antivirals. *PloS One*. 2017;12(10):e0187095.
93. Sambrook J. *Molecular cloning : a laboratory manual /*. 3rd. ed. Russell DW, editor. Cold Spring Harbor, N.Y. : Cold Spring Harbor Laboratory;; c2001.
94. Sambrook J. *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor, N.Y: Cold Spring Harbor Laboratory; 1989. 3 v. :
95. Désiré N, Dehée A, Schneider V, Jacomet C, Goujon C, Girard PM, et al. Quantification of Human Immunodeficiency Virus Type 1 Proviral Load by a TaqMan Real-Time PCR Assay. *J Clin Microbiol*. 2001 Apr;39(4):1303–10.

96. Malnati MS, Scarlatti G, Gatto F, Salvatori F, Cassina G, Rutigliano T, et al. A universal real-time PCR assay for the quantification of group-M HIV-1 proviral load. *Nat Protoc.* 2008;3(7):1240–8.

97. Rozera G, Fabbri G, Lorenzini P, Mastrosera I, Timelli L, Zaccarelli M, et al. Peripheral blood HIV-1 DNA dynamics in antiretroviral-treated HIV/HCV co-infected patients receiving directly-acting antivirals. *PloS One.* 2017;12(10):e0187095.

## ÖZGEÇMİŞ

Kişisel Bilgiler	
Adı Soyadı	Reyhanehsadat MIRBAKHT
Doğum Yeri	**** / *****
Doğum Tarihi	**.**.*.****
Uyruğu	****

Eğitim Bilgileri	
Lisans	
Üniversite	Tebriz Üniversitesi
Fakülte	Fen Fakültesi
Bölümü	Biyoloji
Mezuniyet Yılı	2013

Yüksek Lisans	
Üniversite	Kırşehir Ahi Evran Üniversitesi
Enstitü Adı	Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Anabilim Dalı	Tıbbi Biyoloji
Programı	Tıbbi Biyoloji
Mezuniyet Tarihi	2025

Makale ve Bildiriler
<p><b>Uluslararası Kongre ve Sempozyumlarda Sunulan Bildiri</b></p> <p><u>Mirbakht, R., Mehmetzade, H.F., Demir, T., Sevim, E. (2025). Development of Quantification Standards Used in the Optimization of HIV-1 Proviral DNA Quantification by Real-Time RT-PCR Method Through Gene Cloning Technology. 11th International Aegean Congress on Natural &amp; Medical Sciences (4-6 Nisan 2025), İzmir, Turkey.</u></p>