

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı**

**HIV-1 TRANSAKTİVASYONUNUN ANTİSENS
OLİGONÜKLEOTİD TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK
İNİBE EDİLMESİ**

**Hazırlayan
Ömer Faruk ARICI**

**Danışman
Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN**

Doktora Tezi

**Aralık 2014
KAYSERİ**

**T.C.
ERCIYES ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ
Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı**

**HIV-1 TRANSAKTİVASYONUNUN ANTİSENS
OLİGONÜKLEOTİD TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK
İNİBE EDİLMESİ**

**Hazırlayan
Ömer Faruk ARICI**

**Danışman
Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN**

Doktora Tezi

**Aralık 2014
KAYSERİ**

BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK

Bu çalışmadaki tüm bilgilerin, akademik ve etik kurallara uygun bir şekilde elde edildiğini beyan ederim. Aynı zamanda bu kural ve davranışların gerektirdiği gibi, bu çalışmanın özünde olmayan tüm materyal ve sonuçları tam olarak aktardığımı ve referans gösterdiğimi belirtirim.

Adı-Soyadı: Ömer Faruk ARICI

İmza:

YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI

“HIV-1 Transaktivasyonunun Antisens Oligonükleotid Teknolojisi Kullanılarak İnhibe Edilmesi” adlı **Doktora Tezi**, Erciyes Üniversitesi Lisansüstü Tez Önerisi ve Tez Yazma Yönergesi’ne uygun olarak hazırlanmıştır.

Tezi Hazırlayan
Ömer Faruk ARICI

Danışman
Prof.Dr.İlhan DEMİRHAN

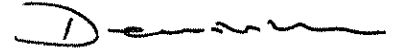
Anabilim Dalı Başkanı
Prof.Dr.İlhan DEMİRHAN

Prof.Dr.İlhan DEMİRHAN danışmanlığında Ömer Faruk ARICI tarafından hazırlanan “HIV-1 Transaktivasyonunun Antisens Oligonükleotid Teknolojisi Kullanılarak İnhibe Edilmesi” konulu bu çalışma, jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

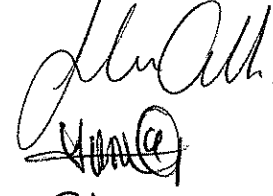
26/12/2014

JÜRİ**İmza**

Danışman : Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN



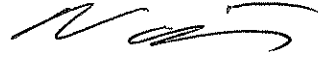
Üye : Prof. Dr. Gökçen YUVALI ÇELİK



Üye : Prof. Dr. Yeşim ÖZKAN



Üye : Doç. Dr. Behzat ÇİMEN



Üye : Yrd. Doç. Dr. Nalan ÖZDEMİR

ONAY

Bu tezin kabulü Enstitü Yönetim Kurulununtarih ve sayılı kararı ile onaylanmıştır.

...../...../.....

Enstitü Müdürü
Prof. Dr.Saim ÖZDAMAR

TEŐEKKÖR

Doktora eğitimim boyunca bilgi ve deneyimleriyle bana yardımcı olan, tezimin hazırlanmasında büyük desteklerini gördüğüm Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı Başkanımız ve danışmanım değerli Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN'a ve Doç. Dr. Behzat ÇİMEN'e ve bu bölümde yakın desteğini gördüğüm çalışanlara teşekkür ederim.

HIV-1 TRANSAKTİVASYONUNUN ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİD TEKNOLOJİSİ KULLANILARAK İNHİBE EDİLMESİ

Ömer Faruk ARICI

Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü,

Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı

Doktora Tezi, Aralık 2014

Danışman: Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN

ÖZET

HIV-1'in yüksek oranda mutajeneze bağlı olarak antiretroviral ilaçlara karşı geliştirdiği direnç nedeniyle ilaç etkinliğinin ortadan kalkması, alternatif viral hedeflerin araştırılmasına yol açmıştır. Bu hedefler arasında gösterilen HIV-1 Tat proteini, enfekte hücrelerin nükleusunda trans-acting transkripsiyonel aktivatör olarak etki eder. Ayrıca tüm HIV-1 transkriptlerinin 5' ucunda yer alan iyi korunmuş TAR saç tokası yapısı ve bazı hücrel proteinler ile kompleks etkileşimlere girerek transkripsiyonun başlatılması ve RNA zincirinin uzamasında görev alır.

Bu çalışma, farklı dizilim ve modifikasyonlar içeren antisens oligonükleotid (ASO) dizileri kullanılarak, HIV-1 transaktivatör proteini, Tat'ın oluşumunun dolayısıyla aktivitesinin inhibe edilmesi amacıyla yapıldı. ASO'lerin dizilimi, direnç gelişimini minimum düzeyde tutabilmek amacıyla tat mRNA'nın 5' ucu yakınındaki iyi korunmuş bölgenin farklı sekansları hedeflenerek belirlendi.

Transaktivasyon modeli oluşturmak amacıyla, Jurkat hücrelerine HIV-1 tat ve rev geni içeren pCV1 plazmidi ile HIV-1 LTR ve CAT raportör genini içeren pC15CAT plazmidleri DEAE-dekstran metodu kullanılarak transfekte edildi. ASO'lerin Tat aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla, ASO'ler plazmid transfeksiyonu yapılmış jurkat hücre kültürüne 1 µM, 3 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda ilave edildikten sonra hücre kültürü 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon süresi sonunda oluşan CAT enzim ekspresyonu CAT ELISA kiti aracılığıyla tespit edildi.

En yüksek CAT ekspresyonu inhibisyonu, 5 µM dozda CAT ekspresyonunu %43 inhibe eden Anti-Tat-1 dizisi ile elde edilmiştir. Sitotoksikite testi sonucu hücreler üzerinde toksik etki yarattığı tespit edilen Anti-Tat-2 ise aynı dozda CAT ekspresyonunu %35 inhibe etmiştir. Sonuç olarak bu çalışmada, antisens oligonükleotid teknolojisi kullanılarak Tat aktivitesinin inhibe edilebileceği gösterilmiştir. Tat geninin farklı korunmuş bölgeleriyle etkileşim gösterebilecek farklı dizilime ve modifikasyonlarla sahip sitotoksik olmayan ASO'lerin dizayn edilmesinin, tat aktivitesinin daha efektif olarak inhibe edilmesinde ve alternatif AIDS tedavilerinin geliştirilmesinde önemli olacağı düşünülmektedir.

Anahtar kelimeler: HIV, TAT, CAT, TAR, antisens

**INHIBITION OF HIV-1 TRANSACTIVATION BY ANTISENSE
OLIGONUCLEOTIDE TECHNOLOGY**

Ömer Faruk ARICI

Erciyes University, Institute of Health Sciences

Department of Pharmaceutical Biochemistry

PhD Thesis, December 2014

Supervisor: Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN

ABSTRACT

The elimination of antiretroviral drug efficacy due to drug resistance developed by high-rate HIV-1 mutagenesis has led to the investigation of alternative viral targets. One of these targets is the HIV-1 Tat protein, which functions as a trans-acting transcriptional activator in the nucleus of infected cells. Tat is also involved in the initiation of transcription and RNA chain elongation by a complex process involving interactions with cellular proteins and a hairpin loop called TAR which is a highly conserved stem-loop structure located at the 5' end of all HIV-1 transcripts.

In this study, we aimed to inhibit Tat activity by using antisense oligonucleotides with different sequences and modifications. To reduce risk of resistance development, ASO sequences were selected by targeting well conserved region near the 5' end of the Tat mRNA.

To create transactivation model, pCV1 plasmid containing tat and rev genes and pC15CAT plasmid containing HIV-1 LTR and CAT reporter genes were transfected in jurkat cells by DEAE-dextran method. In order to investigate the effects of ASOs on Tat activity in vitro, ASOs were added to the plasmid-transfected cell culture at concentrations of 1 μ M, 3 μ M and 5 μ M and cell culture was subsequently incubated for 48 hours. At the end of incubation period, the expression level of the CAT reporter gene was measured using the CAT ELISA Kit.

Highest inhibition of CAT expression obtained with Anti-Tat-1 at the dose of 5 μ M was %43. Anti-Tat-2, which inhibited expression of CAT at the same dose by %35, was found cytotoxic according to cytotoxicity assay. Consequently, we have shown that Tat activity can be inhibited by using antisense oligonucleotide technology. Designing non-cytotoxic ASOs with different sequences and modifications that target different conserved regions of tat mRNA is thought to be important for inhibiting tat activity more effectively and for development of alternative treatments of AIDS.

Key words: HIV, TAT, CAT, TAR, antisense

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa no</u>
İÇ KAPAK	i
BİLİMSEL ETİĞE UYGUNLUK	ii
YÖNERGEYE UYGUNLUK ONAYI	iii
KABUL VE ONAY SAYFASI	iv
TEŞEKKÜR	v
ÖZET	vi
ABSTRACT	vii
İÇİNDEKİLER	viii
TABLO, ŞEKİL ve GRAFİK LİSTESİ	xi
KISALTMALAR	xiv
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	5
2.1. HIV'İN BİYOLOJİSİ	5
2.1.1. HIV'in Kökeni.....	5
2.1.2. Olgun Virion Yapısı	7
2.1.3. Genom Yapısı ve Organizasyonu	8
2.1.3.1. LTR (Long Terminal Repeat).....	9
2.1.3.2. Yapısal Proteinler	11
2.1.3.3. Regülatör Proteinler	17
2.1.3.4. Aksesuar Proteinler	23
2.1.4. HIV-1 Replikasyon Döngüsü	26
2.2. ANTİRETROVİRAL TEDAVİ	28
2.2.1. Nükleozid/Nükleotid Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NRTİ/NtRTİ)	31
2.2.2. Non-Nükleozid Ters Transkriptaz İnhibitörleri (NNRTİ)	32
2.2.3. Proteaz İnhibitörleri (Pİ)	32
2.2.4. İntegraz İnhibitörleri (İNİ)	33
2.2.5. Ko-Reseptör Antagonistleri (KRİ)	33

	<u>Sayfa no</u>
2.2.6. Füzyon İnhibitörleri (Fİ)	34
2.3. ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER	35
2.3.1. Antisens Oligonükleotidlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri.....	38
2.3.1.1. Birinci Jenerasyon Antisens Oligonükleotidler	39
2.3.1.2. İkinci Jenerasyon Antisens Oligonükleotidler	41
2.3.1.3. Üçüncü Jenerasyon Antisens Oligonükleotidler	42
2.3.2. Antisens Oligonükleotidlerin Etki Mekanizmaları.....	43
2.3.2.1. Sterik Blokaj Mekanizmaları.....	43
2.3.2.2. Sterik Blokaj'ın Aktive Ettiği Mekanizmalar	46
GEREÇ VE YÖNTEM.....	50
3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ.....	51
3.1.1. Besiyeri Hazırlanması.....	51
3.1.1.1. Fetal Bovine Serum İnaktivasyonu.....	52
3.1.1.2. Fosfat Tamponu Hazırlanması	52
3.1.2. Jurkat Hücrelerinin Kültüre Alınması.....	52
3.1.3. Jurkat Hücrelerinin Pasajlanması	53
3.1.4. Jurkat Hücrelerini Dondurma ve Saklama	53
3.1.4.1. Krio Çözeltisi Hazırlama.....	53
3.2. PLAZMİDLER.....	54
3.2.1. pCV1.....	54
3.2.2. pC15CAT	54
3.2.3. Plazmid İzolasyonu.....	55
3.2.3.1. Qiafilter Plasmid Mega Kit (Qiagen) Prosedürü	56
3.2.3.2. İzole Edilen Plazmidlerin Saflık ve Miktar Tayini.....	59
3.2.3.3. İzole Edilen Plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kalite Tayini.....	59
3.3. TRANSFEKSİYON	63
3.3.1. CAT ELISA Kit (Roche) Prosedürü.....	65
3.3.2. Bradford Yöntemiyle Protein Miktarı Tespiti.....	68
3.3.3. Antisens Oligonükleotidler (ASO)	68
3.4. SİTOTOKSİSİTE TAYİNİ.....	71

	<u>Sayfa no</u>
4. BULGULAR	72
4.1. ELEKTROFOREZ BULGULARI	72
4.1.1. pC15CAT'ın Elektroforez Bulguları	72
4.1.2. pCV1'in Elektroforez Bulguları	73
4.2. PLAZMİTLERİN KANTİTATİF ÖLÇÜM SONUÇLARI	73
4.3. ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLERİN ETKİLERİ	74
4.3.1. Transaktivasyon Modelinin Denenmesi	74
4.3.2. Antisens Oligonükleotidlerin Tat Aktivitesi Üzerine Etkileri	76
4.3.2.1. Anti-Tat-1	76
4.3.2.2. Anti-Tat-2	77
4.3.2.3. Anti-Tat-3	78
4.3.2.4. Anti-Tat-4	78
4.3.2.5. Anti-Tat-5	79
4.3.2.6. Anti-Fos	80
4.3.2.7. Antisens Oligonükleotidlerin Tat Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması	81
4.4. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI	82
5. TARTIŞMA VE SONUÇ	84
6. KAYNAKLAR	92
ÖZGEÇMİŞ	

TABLO, ŞEKİL ve GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa no</u>
Tablo 2.1. HIV-1 tedavisinde kullanılan FDA onaylı antiretroviral ilaçlar	30
Tablo 2.2. FDA tarafından onaylanan ve faz II, faz III aşamaları devam eden bazı antisens ilaçlar	37
Tablo 3.1. Besiyeri ve PBS tamponunun içeriği	52
Tablo 3.2. Plazmid izolasyonu sırasında kullanılan antibiyotik çözeltilerin konsantrasyonları ve saklama sıcaklıkları	55
Tablo 3.3. Lennox L Broth besiyeri ve tris-EDTA tamponu içeriği	56
Tablo 3.4. Plazmid izolasyon kitinde (Qiafilter Plasmid Mega Kit) bulunan tampon çözeltilerin içeriği ve saklama sıcaklıkları	57
Tablo 3.5. 50x Tris asetat EDTA tamponu içeriği	59
Tablo 3.6. 6x yükleme tamponu içeriği.....	60
Tablo 3.7. Etidyum Bromür (EtBr) çözeltisi içeriği.....	60
Tablo 3.8. HindIII, BamHI ve HindIII+ BamHI RE enzimleri kullanılarak hazırlanan kesim reaksiyonları için gerekli bileşenler, bu bileşenlerin oranları ve RE enzimlerinin kesim noktaları.....	61
Tablo 3.9. Eco RI ve PstI RE enzimleri kullanılarak hazırlanan kesim reaksiyonları için gerekli bileşenler, bu bileşenlerin oranları ve RE enzimlerinin kesim noktaları.	62
Tablo 3.10. DNA Belirteci (Ladder Mix- Fermentas® SM0331) içeriği.....	62
Tablo 3.11. DNA transfeksiyon çözeltisinin içeriği	65
Tablo 3.12. CAT ELISA kit prosedüründe kullanılan reaktiflerin içerikleri.....	66
Tablo 3.13. CAT ELISA kit prosedüründe kullanılan tampon çözeltilerin içerikleri	66
Tablo 3.14. Bradford çözeltisinin içeriği.....	68
Tablo 3.15. Hedeflediğimiz tat mRNA sekansı	69
Tablo 3.16. Araştırılan ASO'lerin dizilimi, uzunluğu, GC içeriği, erime derecesi (Tm) ve modifikasyonları.	70
Tablo 4.1. İzole edilen pC15CAT'ın UV spektrofotometre sonuçları	74
Tablo 4.2. İzole edilen pCV1'in UV spektrofotometre sonuçları.....	74
Tablo 4.3. Plazmid transfeksiyonu yapılmış jurkat hücrelerinin ASO'ler kullanılmadan ölçülen ELISA değerleri	75
Tablo 4.4. Kontrol ve antisens gruplarının 48 saat inkübe edildikten sonra 1mL'de tespit edilen hücre sayıları.....	83

Sayfa no

Şekil 2.1.	Olgun HIV virion yapısı.....	8
Şekil 2.2.	Tek zincirli HIV genomu.....	9
Şekil 2.3.	HIV-1 LTR yapısı. AP1, NFAT-1, IL-2RE, NF-kB, SP1 ve LBP-1 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri, TATA kutusu, TAGAA zayıf transkripsiyonel başlama sekansı, TAR bölgesi ve AAUAA poli-adenilasyon sekansı gösterilmiştir	10
Şekil 2.4.	HIV-1 integraz yapısı.....	13
Şekil 2.5.	HIV-1 proteaz yapısı.....	14
Şekil 2.6.	HIV-1 RT-nükleik asit kompleksi. P51 (koyu kahverengi), kalıp DNA (açık gri), primer DNA (koyu gri) ve p66'nın fingers (mavi), palm (kırmızı), thumb (yeşil), connection (sarı), RNase H (turuncu) alt bölgeleri gösterilmiştir.....	15
Şekil 2.7.	Tat geninin ilk eksonu tarafından kodlanan polipeptid dizisi. Tat peptidinin Pro (proline zengin bölge), Cys (sisteince zengin bölge), Core, basic ve Gln'den (glutamine zengin bölge) oluşan beş bölgesi ve TAR RNA'ya yüksek affinite gösteren polipeptid sekansı (38.-72. aminoasitler) gösterilmiştir	19
Şekil 2.8.	TAR RNA üzerinde bulunan çıkıntı bölgesi, ilmek bölgesi ve belirli rezidüler	21
Şekil 2.9.	Tat aracılı transkripsiyonel aktivasyon. 1) NELF ve DSIF hipofosforillenmiş durumdaki RNA polimeraz II'ye bağlanarak transkripsiyonel uzamayı inhibe eder. 2) Tat, TAR RNA'ya bağlandıktan sonra siklin T1'e bağlanarak P-TEFb'yi TAR üzerinde toplar. 3) CDK-9'un CTD'yi fosforillemesi sonucu DSIF ve NELF RNA polimeraz II'den ayrılır. 4) p300 ve hGCN5 Tat'ın TAR RNA'ya bağlandığı bölgede bulunan lizin-50 rezidüsünü asetilleyerek PCAF'ün bu noktadan bağlanabilmesini sağlar. PCAF TAR RNA ile yarışmalı olarak Tat'a bağlanır ve Tat'ın TAR RNA'dan ayrılmasına neden olur. Sonuçta transkripsiyonel uzama indüklenmiş olur	22
Şekil 2.10.	HIV-1 replikasyon döngüsü	26
Şekil 2.11.	Modifiye olmamış RNA ve DNA nükleotidleri ile modifiye olmuş birinci jenerasyon ASO'lerin kimyasal yapısı	40
Şekil 2.12.	2'-O-metil ve 2'-O-metoksi-etil modifikasyonlu ikinci jenerasyon ASO'lerin kimyasal yapısı	41
Şekil 2.13.	Üçüncü jenerasyon LNA, MF ve PNA modifikasyonlarının kimyasal yapısı.....	42
Şekil 2.14.	Uç birleştirme modülasyonu	44

	<u>Sayfa no</u>
Şekil 2.15. ASO'lerin translasyon başlangıç kodonuna bağlanak translasyonu bloke etmesi	45
Şekil 2.16. RNase H'yi aktive eden ASO'lerin genetik mesajı susturması	47
Şekil 2.17. siRNA aracılığıyla hedef mRNA sinyalinin engellenmesi	48
Şekil 3.1. pCV1'in tat ve rev genlerini içeren cDNA bölgesi, SV40 replikasyon orijini (SV40-ori), adenovirüs büyük geç promotörü (Adenovirüs Major Late Promotor, Ad MLP), fare immünglobulin geni (Mouse Immunglobulin Gene, SS), fare dihidrofolat redüktaz gen bölgesi (Mouse Dihydrofolat Reductase, DHFR) ve SV40 poliadenilasyon sinyali bölgesi (SV40 pA).....	54
Şekil 3.2. pC15CAT'ın HIV-1 LTR'yi içeren klon 15 DNA bölgesi (C15) ve kloramfenikol asetil transferaz geni (Chloramphenicol acetyl transferase, CAT) bölgeleri.....	55
Şekil 3.3. DEAE-dekstran polimerinin moleküler.....	64
Şekil 3.4. Kontrol hücreleri ile ASO'lerin ilave edildiği hücreleri içeren 6 kuyucuklu kültür kabının transfeksiyondan 48 saat sonraki görüntüsü	64
Şekil 4.1. Agaroz jel elektroforezinde pC15CAT ve pCV1 fragmanlarının, EtBr uygulandıktan sonra UV altındaki görüntüsü. 1. Kuyucuk: Kılavuz DNA (DNA-Ladder Mix), 2. Kuyucuk RE ile kesilmemiş pC15CAT, 3. Kuyucuk: Hind III, 4. Kuyucuk: Bam HI, 5. Kuyucuk: Hind III+Bam HI, 6. Kuyucuk RE ile kesilmemiş pCV1 7. Kuyucuk: Pst I, 8. Kuyucuk: EcoRI.....	73
Şekil 4.2. Transaktivasyon modelinin ön denemesi sonucunda MP kuyucuklarındaki örneklerde CAT ekspresyonuna bağlı olarak meydana gelen renklenme.....	75
Grafik 4.1. Anti-Tat-1 oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi	76
Grafik 4.2. Anti-Tat-2 oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi	77
Grafik 4.3. Anti-Tat-3 oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi	78
Grafik 4.4. Anti-Tat-4 oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi	79
Grafik 4.5. Anti-Tat-5 oligonükleotidinin 5 µM konsantrasyonda üç farklı denemde elde edilen CAT ekspresyonu verileri	80
Grafik 4.6. Anti-Fos oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT Ekspresyonu üzerine etkisi	81
Grafik 4.7. Araştırdığımız ASO'lerin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması	82

KISALTMALAR

ADAR 1, 2	: Adenosine deaminase that acts on RNA tip 1, 2
AGO 2	: Argoneut tip 2
AIDS	: Kazanılmış immün yetmezlik sendromu
APOBEC	: Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like
ARV	: Antiretroviral ilaç
ASO	: Antisens oligonükleotid
ATP	: Adenozin 3'-trifosfat
BAD	: Bcl-2-Associated death promotör
CA	: Kapsid proteini
CAT	: Kloramfenikol Asetil Transferaz
CCD	: Catalytic core domain
CCR 2, 3	: Kemokin reseptör tip 2, 3
CD4, 26	: Cluster of differentiation glikoprotein tip 4, 26
CDK-9	: Siklin-bağımlı kinaz 9
cDNA	: Komplementer DNA
CMV	: Sitomegalovirüs
CREB	: cAMP response element binding protein
CRF	: Circulating recombinant form
CTD	: C terminal domain
CTS	: Central termination sequence
CXCR-4	: C-X-C kemokin reseptörü tip 4
CypA	: Siklofilin A
DC-SIGN	: Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin
DDN	: 2',3'-dideoksinükleozid
DEAE-dextran	: Dietilaminoetil-dekstran
DIG	: Digoksinin
DMSO	: Dimetilsülfoksit
DSIF	: 5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor
EDTA	: Etilendiamin tetra asetik asit
ELISA	: Enzyme-linked immunosorbent assay

ENV	: Zarf proteini
EtBr	: Etidyum bromür
FBS	: Fetal bovine serum
FLT-1	: Fms-bağlantılı tirozin kinaz tip 1
GAG	: Grup spesifik antijen
GP	: Glikoprotein
HAART	: Highly active antiretroviral therapy
HAT	: Histon asetil transferaz
HCV	: Hepatit C virüsü
hGCN5	: Human general control of amino acid synthesis protein 5
HIV 1, 2	: İnsan immün yetmezlik virüsü
HPLC	: Yüksek performanslı sıvı kromatografisi
HR 1, 2	: Heptad repeat-1
HSPG	: Heparan sülfat proteoglikanları
IN	: İntegraz
KB	: Kilobaz
KDR	: Kinase insert domain receptor
KRI	: Ko-reseptör inhibitörleri
KS	: Kaposi sarkomu
LNA	: Locked nucleic acid
LPR	: Düşük dansiteli lipoprotein reseptör-ilişkili protein
LTR	: Long terminal repeat
MA	: Matriks proteini
MF	: Morfolino fosforoamitler
MHC-1	: Cell surface major histocompatibility complex-1
MOE	: 2'-O-metoksi-etil
MP	: Microplate
NAM	: Nükleozid/Nükleotid analogu mutasyonları
NC	: Nükleokapsid
NES	: Nuclear export signal
NELF	: Negatif uzama faktörü kompleksi
NEF	: Negative regulatory factor
NF-kb	: NF-kappa B
NLS	: Nükleer lokalizasyon sinyali

NNRTİ	: Non-nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri
NRTİ	: Nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri
NtRTİ	: Nükleotid revers transkriptaz inhibitörleri
OD	: Optik dansite
OMe	: 2-O-metil
P-TEFB	: Pozitif transkripsiyon uzama faktörü b
PAK-2	: p21-activated kinase 2
PBS	: Primer binding site
PCAF	: p300/CREB bağlayıcı protein-ilişkili faktörü
PNA	: Peptid nükleik asit
POD	: Peroksidaz
Pol	: Polimeraz
PR	: Proteaz
PI	: Proteaz inhibitörü
REV	: Regulator of expression of virion proteins
RISC	: RNA-induced silencing complex
RRE	: Rev response element
RT	: Revers transkriptaz
RTC	: Revers transcription complex
siRNA	: Small interference RNA
snRNA	: Small nuclear RNA
SP2	: Spacer peptide 2
SIV	: Simian immün yetmezlik virüsü
SU	: Yüzey glikoproteini
SV40	: Simian virüs 40
TAE	: Tris asetat EDTA
TAK	: Tat-associated kinase
TAM	: Timidin analog mutasyonları
TAR	: Trans activation-responsive region
TAT	: Trans-activator of transcription
TBP	: TATA bağlayıcı protein
TM	: Transmembran bölge
TRM	: Tat-TAR recognition motif
UTR	: Untranslated region

VEGFR1,2	: Vasküler endotelyal büyüme faktörü reseptörleri 1,2
VIF	: Viral enfektivite faktörü
VPR	: Lentivirüs protein R
VPS	: Vacuolar protein sorting
VPU	: Viral protein U

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan immün yetmezlik virüsü tip 1 (Human Immunodeficiency Virus Type-1, HIV-1), kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu yani AIDS'in (Acquired Immundeficiency Syndrome) başlıca sebebidir. 1980'lerde ortaya çıkan AIDS, her yıl milyonlarca insanın ölümüne neden olmakta ve hızla yayılmaya devam etmektedir (1). HIV'in genom yapısının ve yaşam siklusunun çok iyi şekilde anlaşılması, HIV'e karşı ilaç geliştirmede ve virüsün yayılmasını önlemede büyük önem taşımaktadır. HIV bir retrovirüstür fakat genomik yapısı bilinen tüm havyan retrovirüslerinden farklıdır. HIV-1, retrovirüslerde bulunan gag, pol ve env yapısal genlerinin yanı sıra virüsün replikasyonu ve infektivitesini düzenleyen tat (Trans-Activator of Transcription) ve rev regülatör genleri ile vif, vpr, nef ve vpu aksesuar genlerine sahiptir (2). Tat geni, yapısal genlerin ifade edilmesinde asıl rol oynayan genidir. Tat geninden ifade edilen Tat proteini yüksek oranda korunmuş sisteince zengin bölge ile arjinin ve lizin tekrarlarından oluşan bazik amino asit bölgesi olmak üzere iki önemli bölgeye sahiptir (3). Sisteince zengin bölge, Tat'ın fonksiyonu için önemli olan metal iyonlar ile bağ oluşturarak dimerizasyonda rol alırken bazik bölge nükleikasit zinciri ile bağ kurarak HIV genomunu transaktive eder ve yapısal genlerin ekspresyonunu dolayısı ile HIV'in replikasyonunu sağlar (3,4).

Tat proteini HIV ile enfekte hücreler tarafından aktif olarak salgılandığından enfekte bireylerin serumunda tespit edilmektedir (5,6). Ekstrasellüler tat, latent olarak HIV ile

enfekte hücelere girerek viral genom transkripsiyonunu aktive edebilir. Ayrıca HIV-1 koreseptörlerinin ekspresyonunu arttırarak enfeksiyonun devamlılığına katkı sağlar. Ekstrasellüler Tat, enfekte olmamiş farklı tip hücelere aralarında integrinler ($\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$, $\alpha_v\beta_5$), vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleri (VEGFR1 / Flt-1, VEGFR2 / KDR), kemokin reseptörleri (CCR2, CCR3, CD26, CXCR-4), düşük dansiteli lipoprotein reseptör-ilişki protein (LPR) ve heparan sülfat proteoglikanları (HSPG) bulunan çeşitli reseptörler ile etkileşime girerek etki eder (7-9). Reseptör çeşitliliği Tat'ın hedef hücelerde kompleks sinyal iletim ağlarını aktive ettiğini gösterir ve Kaposi Sarkomu (KS), demans, tümöral oluşumda sıklık gibi AIDS'e bağlı patolojileri açıklar (5, 10).

Tat proteininin hücre içi aktivitesi viral replikasyon döngüsünde açıkça görülür. Viral RNA konak hücre içine girdikten sonra revers transkriptaz ile viral cDNA'ya dönüştürülür. Oluşturulan viral genom hücre çekirdeğine taşınır. Hücre genomuna entegre olan viral genomun 5' ucunda yer alan promotor yani LTR (Long-Terminal-Repeat) dizisi transkripsiyon faktörleri ve RNA Pol II ile bağlanıp viral transkripsiyonu başlatır (11). Konak hücre genomuna entegre olan proviral genomun transkripsiyonunun başlangıcında "Stem-loop" (saç tokası) yapısında katlanabilen bir RNA dizisi oluşur. +1 ve +59 nükleotidleri arasında yer alan bu RNA yapısına, trans aktivasyon duyarlı bölge anlamına gelen "Trans Activation-Responsive Region, TAR" adı verilir. Tat transaktivasyon işlemini bazik amino asitlerin yoğun bulunduğu bölgesi ile LTR üzerindeki TAR-RNA'nın spesifik bir bölgesi ile etkileşime geçerek gerçekleştirir. Tat, TAR-RNA'ya bağlandıktan sonra bir protein kinaz olan TAK (Tat-associated kinase)'ı uyandır. Bunun sonucunda RNA Polimeraz II'nin büyük alt ünitesindeki karboksi terminal ucunda hiperfosforilasyon gerçekleşir (12, 13). Böylece transkripsiyon kompleksi aktive olur ve HIV genomunun transkripsiyonu gerçekleştirilir. Tat'ın yokluğunda LTR'dan uzama başlar ancak transkripsiyon baskılanır. Çünkü promotor çok zayıf bir şekilde işlevsel polimeraza bağlanır. DNA kalıbından transkripsiyonun erken evresinde ayrılır. Dolayısıyla Tat proteininin oluşumunun veya aktivitesinin önlenmesi HIV replikasyonunu önlemek için önemli bir hedef olmuştur (12).

AIDS hastalığının standart terapisinde kullanılan ilaçların uzun dönem kullanımı sonucu toksisite ve kardiyovasküler riskde artış, ilaca dirençli HIV tiplerinin ortaya çıkması, ilaç tedavisi kesildiğinde viral yükün tedaviye başlamadan önceki seviyelere çıkması, bazı

geniş çaplı araştırmalarda ilaç tedavisi sırasında virolojik yanıt artmasına rağmen herhangi bir nedene bağlı mortalite oranında azalma gözlenmemesi ve tedavinin erken dönemlerinde immünolojik yanıtta artış olmaması gibi durumlar yeni arayışlara neden olmuş selektif olarak virüslü hücreler üzerine terapötik etki gösterecek minimum toksisiteye sahip bir etkenin bulunması araştırıcıların hedefi olmuştur (14-16). Bu süreçte gen ifadesinin moleküler biyolojisinin aydınlatılması sonucu ortaya antisens teknolojisi sistemi çıkmıştır.

Antisens kavramı, nükleik asitlerin yapı ve fonksiyonlarının aydınlatılması sonucu Watson-Crick hibritleşme kurallarına bağlı olarak ortaya çıkmıştır. Nükleik asit hibridizasyonunun aydınlatılması, in situ hibridizasyon ve diyagnostik prob teknolojilerindeki gelişmeler antisens kavramının oluşmasına katkıda bulunan en temel basamaklardır (17, 18). Antisens oligonükleotidler (ASO), hedef gen ile veya hedef genin mRNA'sı ile Watson-Crick baz eşleşmesi yaparak sahip oldukları kimyasal yapı ve modifikasyon ile hibridizasyon lokasyonuna bağlı olarak çeşitli mekanizmalarla gen ekspresyonunu inhibe edebilen tek zincirli yaklaşık 15-20 baz çifti uzunluğunda ribonükleotid veya deoksiribonükleotidlerdir (19).

Antisens teknolojisiyle bilinen nükleotid dizisine karşı komplementer antisense dizi sentezlenebilir ve bu antisens nükleik asitler büyük miktarlarda çoğaltılabilirler (20). Deneysel olarak araştırılan ASO'lerin büyük kısmı bir genin genetik mesajını, RNA-DNA heterodubleksini spesifik olarak kesen RNase H endonükleaz enzimini indükleyerek engellerler. Bunun sonucunda antisens moleküller bozulmadan kalırken hedef mRNA degradasyonu gerçekleşir (21). Antisens oligonükleotidler hedef mRNA'nın bazı proteinler, nükleik asitler ve ribonükleoproteinlerce tanınmasını sağlayan ve stabilitesini arttıran sekonder yapı motifleri hedeflenerek dizayn edilebilir (22). Ayrıca ribozomal aktivitenin sterik olarak engellenmesi sonucu translasyonel blokaj, pre-mRNA 5' cap ve 3' poli adenilasyon blokajı ile pre-mRNA destabilizasyonu ve splicing bölgelerinin blokajı ile splicing inhibisyonu gerçekleşir. Hedef sekansa yönelik olarak antisens siRNA'lar dizayn edilerek RISC aktivasyonu aracılığıyla gen susturumu gerçekleştirilebilir (23, 24).

Modifiye edilmemiş sentetik oligonükleotidler yabancı bir hücreye verildiklerinde hızla endonükleazların yıkımına uğrarlar. Antisens oligonükleotidlerin nükleazlara karşı direncini arttırmak, serum veya dokudaki yarılanma ömrünü uzatmak, sekansa bağlı

olmayan toksisiteyi azaltmak, hedef DNA veya RNA'ya afiniteyi artırmak yada hücre zarından girişi kolaylaştırmak üzere çeşitli modifikasyonlar gerçekleştirilebilir [2'-O-metil (OMe), 2'-O-metoksi-etil (MOE), Locked nükleik asit (LNA), Peptide nükleik asit (PNA) ve morfolino fosforoamitler (MF)] (25).

Antisensoligonükleotidler TAR RNA ve Tat protein mRNA'sına yönelik sekans spesifik etkileşimleri nedeniyle potansiyel transaktivasyon inhibitörleri olarak bir çok çalışma da kullanılmıştır. Ancak yapılan literatür taraması sonucu, doğrudan Tat-mRNA dizilerini hedefleyen yeterli sayıda çalışma olmadığı tespit edilmiştir. Bu nedenle, bu çalışma Tat protein mRNA'sının farklı sekansları göz önünde bulundurularak seçilen antisens oligonükleotidlerle, HIV replikasyonu için vazgeçilmez olan bu proteinin oluşumunun inhibe edilebileceği düşüncesi ile gerçekleştirilmiştir. Amaçlananlar doğrultusunda elde edilen verilerin AIDS tedavisine yeni bir yol açabilme şansı yaratması hedeflenmektedir.

2. GENEL BİLGİLER

2.1. HIV'İN BİYOLOJİSİ

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) bir retrovirüsdür ve AIDS'in birincil etyolojik ajanıdır. İnsan retrovirüslerinin 1980'li yıllarda ortaya çıkmasından önce Feline leukemia virüsü gibi hayvan retrovirüsleri keşfedilmiştir. HIV, Retroviridae familyasının Orthoretrovirinae alt familyasına ait bir cins olan lentivirüsler arasında yer almaktadır. Lentivirüsler merkezi sinir sistemi hastalıkları ve immünoşüpresif hastalıklarla karakterizedir. Ayrıca bu virüsler uzun inkübasyon sürelerine sahiptir (26).

2.1.1. HIV'in Kökeni

Kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromu yeni bir hastalık olarak ilk kez 1981 yılında bir grup homoseksüel genç erkekte fırsatçı enfeksiyonların ve malignitelerin anormal artış göstermesi üzerine keşfedilmiştir (27). Kazanılmış immün yetmezlik sendromunun (AIDS) ortaya çıkmasından sadece iki yıl sonra, yani 1983 yılında Fransa Pasteur Enstitüsü'nden Luc Montagnier ve arkadaşları enfeksiyon etkeni virüsü izole etmeyi başarmışlardır. HIV-1'in aniden ortaya çıkması, epidemik yayılımı ve benzersiz patojenitesi ile ilgili yapılan yoğun çalışmalar neticesinde 1986 yılında morfolojik olarak HIV-1'e benzeyen fakat antijenik olarak farklı yapıda bir virüs Batı Afrika'daki AIDS hastalarından izole edilmiştir (28). Makak maymunlarında immün yetmezlik sendromuna (simian AIDS) neden olan ve daha çok bir simian virüse benzeyen bu yeni

keşfedilen virüse insan immün yetmezlik virüsü tip 2 (HIV-2) denilmiştir (29). Daha sonra farklı tür simian immün yetmezlik virüsleri (SIVs) orjinine göre son ek alarak ifade edilmiştir. Bu virüsler Sahra-Altı Afrika bölgesinde yaşayan yeşil afrika maymunları, kurumlu mangabey, mandril, şempanze gibi çeşitli primat türlerinde bulunmaktadır. Ayrıca bu virüsler filogenetik sınıflandırmaya göre insan ve simian AIDS virüsleri ile aynı ataya sahip olmalarına rağmen kendi doğal konaklarında genellikle patojenik değildirler. Şempanzelerde bulunan simian virüs türü HIV-1'e, mangabeylerde bulunan simian virüs türü HIV-2 ye filogenetik olarak yakın ilişkili olduğu anlaşılmıştır (30, 31). Bu ilginç durum AIDS'in insanlar ve makak maymunlarında, farklı primat türlerinde bulunan lentivirüslerin neden olduğu viral enfeksiyonların türler arası aktarımı sonucu ortaya çıktığını göstermektedir. Daha sonra yapılan detaylı çalışmalarda makak maymunlarını enfekte ederek simian AIDS'e neden olan SIVmac'ın makak maymunlarının doğal patojeni olmadığı, ABD (Amerika Birleşik Devletleri)'deki primat merkezlerinde çeşitli makak türlerinin doğal olarak SIV ile enfekte kurumlu mangabeylerin kan ve/veya dokularıyla bilinçsizce inoküle edilmesi sonucu geliştiği bildirilmiştir (32). Moleküler epidemiyolojik verilere göre insanları enfekte eden en yaygın HIV alt tipi HIV-1 dir. HIV-1 bir şempanze alt türü olan Pan troglodytes troglodytes da bulunan ve SIVcpz olarak bilinen simian immün yetmezlik virüsünden (SIV) türemiştir. HIV-1, SIVcpz'nin yüksek oranda homologudur (33).

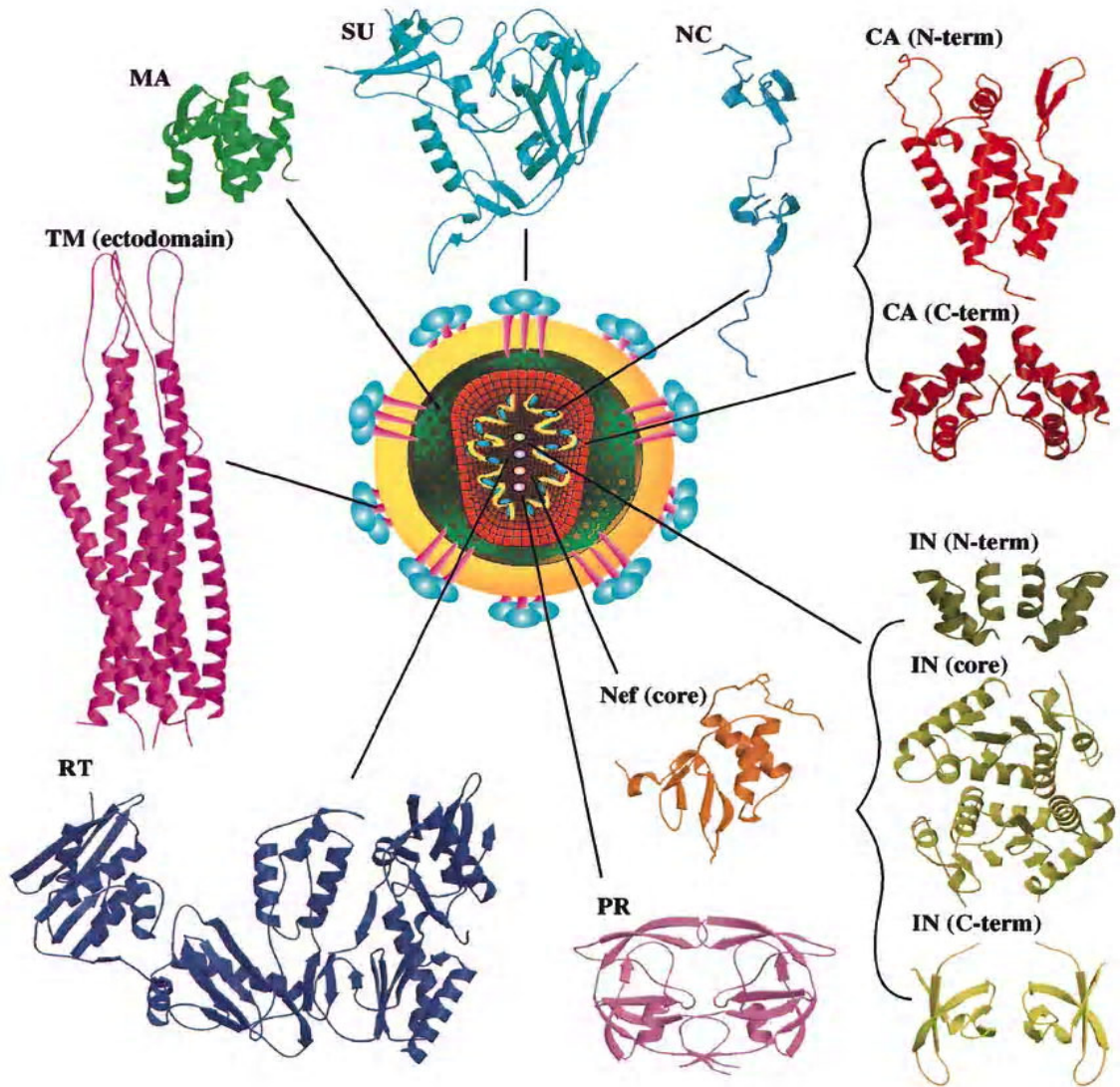
Simian immün yetmezlik virüsünün bir başka formu Sooty mangabey (kurumlu mangabey) maymun türünden izole edilen SIVsm'dir. HIV-2 SIVsm virüsünü taşıyan kurumlu mangabeylerle insanın teması sonucu ortaya çıkmıştır. HIV-2 ve SIVsm arasında benzer bir genom yapısı bulunmaktadır. Ayrıca vpx geni sadece bu iki virüste bulunmaktadır (33).

HIV-1 M, N, O ve P olarak adlandırılan dört gruba ayrılır. Her grup birbirinden bağımsız olarak farklı türler arası viral enfeksiyon transferi yoluyla oluşmuştur. M (majör) grubu dünya çapında milyonlarca kişiyi enfekte etmiş HIV-1'in pandemik formudur. HIV-1 M grubu 9 alt tipe (A–D, F–H, J, K) ve birden fazla alt tipin aynı popülasyonu enfekte etmesiyle oluşan 40 farklı dolaşan rekombinant forma (Circulating Recombinant Form, CRF) ayrılmaktadır (32). HIV-2 de 8 alt tipe (A-H) ayrılmaktadır. İlgili moleküler epidemiyolojik bulgulara göre M grubu, yirminci yüzyılın ilk yarısında SIVcpz'nin insanlara bulaşması sonucu ortaya çıkmıştır. SIV'in insana bulaşması virüsü

taşıyan primatın kanıyla ve/veya vücut sıvılarıyla kütanöz veya müköz yolla temas sonucu gelişmiştir. Bu tür riskler genellikle afrika ülkelerinde maymun ve şempanze avcılığı sırasında ortaya çıkmıştır (32). Yaygın olarak Kamerun, Gabon ve komşu ülkelerde görülen O grubu 1990 yılında keşfedilmiştir ve tüm HIV-1 enfeksiyonlarının %1'inden azını kapsamaktadır (34). N grubu 1998 yılında keşfedilmiş ve hepsi Kamerunda olmak üzere şimdiye kadar 13 vaka dokümanite edilmiştir. P grubu ise 2009 yılında Kamerunda iki kişide tespit edilmiştir (32).

2.1.2. Olgun Virion Yapısı

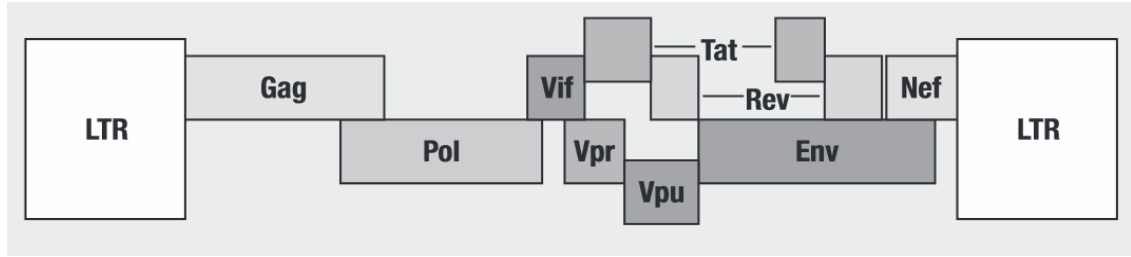
Olgun HIV virüsü yaklaşık 100-120 nm çapında ve sferik yapıdadır. Olgun HIV virion yapısı Şekil 2.1'de gösterilmiştir. Virüs viral genomu içinde barındıran koni şekilli elektronca yoğun çekirdeğe sahiptir (4). Çekirdek ara membran, kapsid, nükleokapsid, genom ve genomla ilgili proteinlerden oluşur. Yaklaşık 2000 kopya kapsid proteininden (CA, p24) meydana gelen kapsid yapısı nükleokapsid (NC, p7), birbirinin aynı olan iki adet kısa tek zincirli yaklaşık 9200 nükleotid uzunluğunda ribonükleikasit (RNA), revers transkriptaz (RT), integraz (IN) ve proteaz (PR) enzimlerini içerir (4). Ayrıca Nef, Vif ve Vpr aksesuar proteinleri de olgun virion partikülü içerisinde bulunur. RNA'nın her bir zinciri virüs genlerinin kopyasına sahiptir. Nükleokapsid yapısı yaklaşık 2000 nükleokapsid proteininden oluşmuştur. Bu yapı viral RNA'ya yüksek affinite ile bağlıdır. Viral RNA'yı çevreleyerek nükleazlardan korur ve stabilize eder. Nükleokapsidin dış kısmında yaklaşık 2000 adet matriks proteininden (MA, p17) meydana gelen bir ara membran ve en dışta konak hücrenin membranından gelen ve nükleokapsidi çevreleyen lipit zarf yapısı bulunur (4). Viral zarf yüzeyinin dışına doğru yönlene kompleks proteinler 'çıkıntı' olarak ifade edilirler. Bu yüzey çıkıntıları HIV'in CD4 reseptörüne sahip konak hücrelere bağlanmasını sağlayan donanımlardır. Her HIV virüsü yaklaşık 72 adet çıkıntıya sahiptir. Bu çıkıntılardan her biri gövde ve başlık olmak üzere iki kısımdan meydana gelir. Çıkıntıların gövdeleri 3 transmembran glikoproteinden (TM, gp41) başlıkları ise 3 yüzey glikoproteinden (SU, gp120) meydana gelir. TM ve SU glikoproteinleri birbirleriyle non-kovalent bağlarla birleşmiş halde bulunurlar (26, 35, 36).



Şekil 2.1 Olgun HIV virion yapısı (4).

2.1.3. Genom Yapısı ve Organizasyonu

Konak hücre genomuna entegre olmuş HIV-1 viral genomu (provirüs) yaklaşık 9.7 kb (kilobaz) uzunluğundadır. Provirüsün her iki ucunda Şekil 2.2’de gösterildiği gibi terminal tekrar dizileri (LTR) bulunur. LTR’ler viral genom ifadesinin düzenlenmesinde görevlidir. En az 9 farklı protein kodlayan viral genler proviral DNA’nın merkezinde bulunur. HIV genomu genel olarak retrovirüslerde olduğu gibi gag (grup spesifik antijen), pol (polimeraz), env (zarf) olarak ifade edilen üç majör yapısal gen içerir (37). Gag geni virüsün iç kısmında yer alan yapısal proteinlerin öncüllerini, pol geni viral enzimlerin öncüllerini, env geni ise virion glikoproteinlerinin öncüllerini kodlar (38).

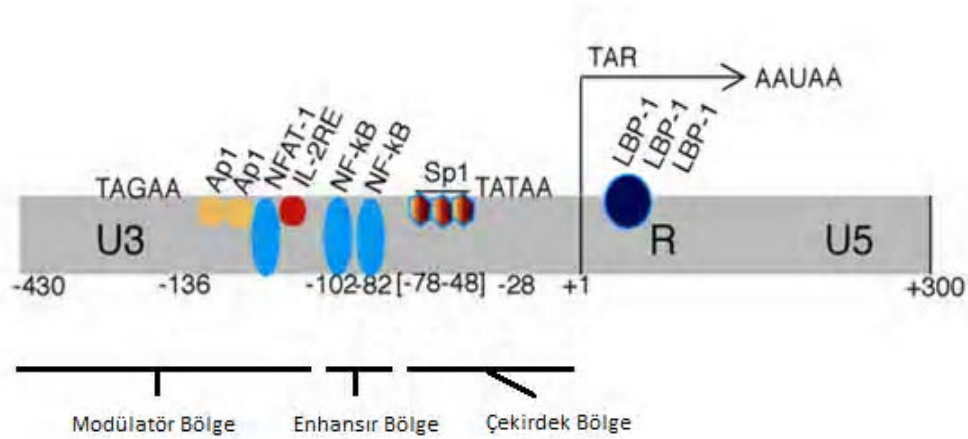


Şekil.2.2 Tek zincirli HIV genomu (37).

Bu genlerin yanısıra Tat (Transkripsiyonel transaktivatör) ve Rev (Virüs gen ekspresyonunu düzenleyici) olarak bilinen iki düzenleyici (regülatör) protein ile Nef (Negatif efektör), Vif (Viral Enfektivite Faktörü), Vpr (Lentivirüs protein R) ve Vpu (Viral Protein U) olarak bilinen dört yardımcı (aksesuar) proteini kodlayan viral genler bulunmaktadır. Bu proteinler viral replikasyon kontrolü, hücre içi taşınma, transkripsiyonel aktivasyon ve enfektivitenin devamını sağlama gibi önemli görevler üstlenir (39).

2.1.3.1. LTR (Long Terminal Repeat)

HIV-1 replikasyonu sırasında çok basamaklı revers transkripsiyon işlemi sonucu proviral DNA'nın her iki ucunda yer alan birbirinin aynısı iki LTR dizisi sentezlenir. Bu diziler provirüsün konak hücre genomuna entegre olmasında rol oynar. Proviral DNA'nın 3' ucundaki LTR yeni sentezlenen viral RNA'ya poli A kuyruğu eklenmesinde görevlidir ve nef aksesuar proteinini kodlar. 5' ucundaki LTR ise retroviral genomun promotörü olarak fonksiyon gösterir (40). Konak hücre transkripsiyon faktörlerinin viral genomun LTR bölgesinde bulunan çeşitli DNA sekanslarına bağlanması sonucu proviral gen ekspresyonu düzenlenir. HIV-1 LTR Şekil 2.3'de gösterildiği gibi sırasıyla U3, R ve U5 olarak üç yapısal bölgeye ayrılır (41). U3 bölgesi yaklaşık 450 baz çifti uzunluğunda olup her bir LTR dizisinin 5' ucunda yer alır. Bu bölgede çoğunlukla hücrel transkripsiyon faktörlerini bağlayıcı sekanslar (cis-acting elements) bulunur. LTR dizisinin merkezinde yer alan R bölgesi 100 baz çifti uzunluğundadır. Transkripsiyon 5' LTR R bölgesinin başlangıcındaki ilk baz ile başlar. Yeni sentezlenen transkriptte hücrel mekanizma ile 7-metilguanozin şapka yapısı eklenir. 3' LTR R bölgesinin son bazından sonra poli A kuyruğun eklenmesi sinyali verilerek transkripsiyon sonlanır (42).



Şekil 2.3. HIV-1 LTR yapısı. AP1, NFAT-1, IL-2RE, NF-kB, SP1 ve LBP-1 transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri, TATA kutusu, TAGAA zayıf transkripsiyonel başlama sekansı, TAR bölgesi ve AAUAAA poli-adenilasyon sekansı gösterilmiştir (43).

LTR U3 bölgesi modülatör, enhansır (enhancer) ve çekirdek olarak 3 fonksiyonel alt bölgeye ayrılır. Bu bölgeler viral genom transkripsiyonunun düzenlenmesinde görevlidir (44).

Çekirdek bölgede başta TATA kutusu, üç adet Sp1 bağlanma bölgesi ve Inr (initiator) bölgesi olmak üzere çeşitli transkripsiyon faktörü bağlanma bölgeleri bulunur. TATA kutusu RNA polimeraz II transkripsiyon kompleksini meydana getiren TBP (TATA bağlayıcı protein) ve diğer proteinlerin bağlanma bölgesidir (44).

Enhansır bölgesinde 2 adet NF-kB (NF-kappa B) transkripsiyon faktörü bağlanma bölgesi bulunur. HIV-1 genomu transkripsiyon kontrolünün pozitif düzenlenmesi için NF-kB transkripsiyon faktörlerinin enhansır bölgesine bağlanması yeterli değildir. Ancak transkripsiyon Sp1 ve NF-kB proteinlerinin birbirleriyle etkileşimi sonucu gerçekleşir (45).

Modülatör bölgedeki sekanslara özgü etkileşim gösteren birçok hücrel protein HIV-1 transkripsiyon kontrolünün hem pozitif hem negatif düzenlenmesinde görev alır. TAR (Transactivation Responsive Element), U3 bölgesinin aşağısında yer alan R bölgesinde bulunur. TAR, TAT proteinini bağlayabilmek için saç tokası (stem-loop) şeklini alır. Transkripsiyonel uzamanın verimli bir şekilde devam etmesi için TAT-TAR etkileşimi gereklidir (46).

2.1.3.2. Yapısal Proteinler

a) Gag:

Gag geni virüsün iç bölümünde yer alan yapısal proteinlerin sentezlenmesinden sorumludur. Bu genin splaylanmamış mRNA'sından öncelikle 55 kDa büyüklüğünde prekürsör gag poliproteini (Pr55) kodlanır. Translasyon sırasında Pr55 N terminali miristik asit ile konjuge edilir. (47). Bu konjugasyon partikül formasyonu için gereklidir. Bu sayede proteinin hücre membranına yönelimi ve iç yüzeye bağlanması sağlanır. Membrana bağlı Gag poliproteini, enfekte hücrenin yüzeyinden tomurcuklanma sırasında gerekli diğer viral ve hücresele proteinler ile birlikte iki kopya viral genomik RNA'yı bir araya getirir. Tomurcuklanmadan sonra bu protein proteaz enzimi vasıtasıyla parçalanarak MA, CA, SP1 (spacer peptide 1), NC, SP2 (spacer peptide 2) ve düşük molekül ağırlıklı P1, P2, P6 proteinleri meydana getirilir (48).

MA polipeptidi p55'in miristik asit ile konjuge edilmiş N terminalinden oluşur. MA molekülleri çoğunlukla viral partikül stabilizasyonu için virion lipid tabakasının iç kısmına bağlı halde bulunur. Bir kısmı ise virionun iç bölgesinde yer alan nükleoprotein kompleksinin bir parçasını oluşturur. Bu kompleks yapı viral DNA'nın nükleusa lokalizasyonu sırasında viral DNA'ya bağlı halde bulunur (49). Bu MA molekülleri, sahip oldukları karyofilik sinyal aracılığıyla nükleustaki hücresele transfer mekanizmasını aktifleştirerek viral genomun nükleusa transferini kolaylaştırır. HIV'in bu özelliği diğer retrovirüslerden farklı olarak bölünmeyen hücreleri de enfekte edebilmesini sağlar (50).

Yüksek hidrofob özellikli CA kapsid proteini viral partiküllerin konik şekilli kapsid yapısını meydana getirir. Siklofilin A (peptidil-prolil isomeras, CypA) CA'ya bağlanarak HIV-1 replikasyon siklüsünün erken evrelerinde aktivite gösterir ve viral transdüksiyon etkinliğini artırır. CypA-CA etkileşimi deneysel olarak siklofilin A'nın yarışmalı inhibitörü siklosporin A (CsA) ile engellendiğinde viral replikasyon inhibisyonu gerçekleşmiştir. Ayrıca olgunlaşmamış virüs partiküllerinin toplanması için gereken gag-gag etkileşimlerine aracılık eder (51).

Bazik ve hidrofilik bir protein olan nükleokapsid proteini, viral RNA'nın 5' ucuna yakın bir bölgede 4 adet saç tokası yapısından oluşan HIV-1 paketleme sinyalinin algılanmasından sorumludur. Bu proteinin temel fonksiyonu viral RNA'yı

paketlemektir. Ayrıca virüsün konak hücreden olgunlaşmasında da önemli rol oynar ve revers transkripsiyon ile entegrasyonu stimüle eder (52).

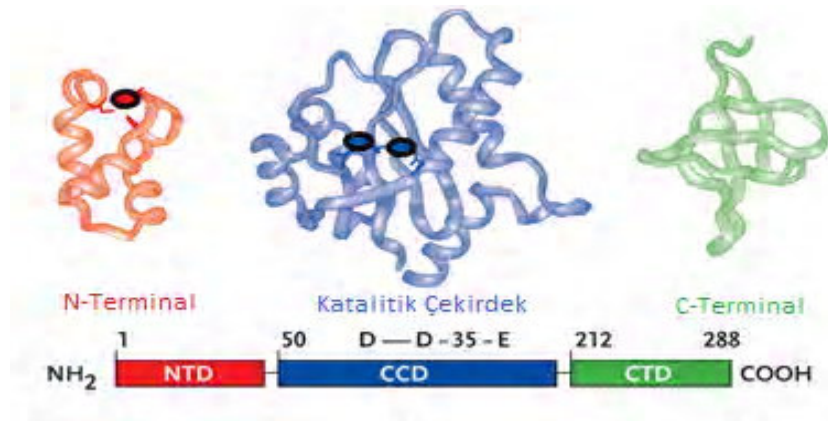
P6 polipeptidi vpr aksesuar proteinine bağlanarak p55-vpr etkileşmesine aracılık eder. Ayrıca virüsün tomurcuklanmasını olanaklı kılar (53).

b) Pol:

Pol geni gag-pol füzyon poliproteinini kodlar. Gag-pol preküsörü ribozomal çerçeve kayması olayı sonucu sentezlenir. Viral olgunlaşma evresinde proteaz enzimi pol polipeptidini gag den ayırır. Daha sonra bu enzim pol polipeptidini parçalara ayırır. Sonuçta viral proteaz, integraz, RNase H ve revers transkriptaz enzimleri meydana gelir (54).

• İntegrız (IN)

Pol geninin 3' ucunda kodlanan HIV-1 integrız, 288 amino asit içerir. İntegrız Şekil 2.4'de gösterildiği gibi yapısal olarak üç fonksiyonel bölgeden oluşur. Katalitik çekirdek bölge (Catalytic Core Domain, CCD), proteinin 51. ve 212. konumları arasında yer alan aminoasit rezidüsünden meydana gelir. Bu bölgede Asp64, Asp116 ve Glu152 den oluşan yüksek oranda korunmuş "D,D-35-E" motifi ve viral DNA'ya bağlanma bölgesi bulunmaktadır. Bu üçlü yapı katalitik aktivite için gereklidir. Ayrıca Asp64 ve Asp116, integrız enzim fonksiyonu için gerekli olan metalik katyonik kofaktörlerin (Mg^{++} veya Mn^{++}) bağlanma noktasıdır (55). N terminali (N Terminal Domain, NTD) proteinin 1. ve 50. konumlarındaki amino asitleri arasında yer alır. Bu bölgede His12, His16, Cys40 ve Cys43'den oluşan HHCC motifi bulunur. Bu tetrahedral yapı tek bir çinko atomuna bağlanır. Bu bölgenin görevi integrız oligomerizasyonunu sağlamaktır (56). C terminali (C Terminal Domain, CTD) 213. ve 288. konumlarındaki amino asitler arasında yer alan bölgedir. Bu bölge integrız enziminin konak hücre DNA'sına bağlanmasından sorumludur.

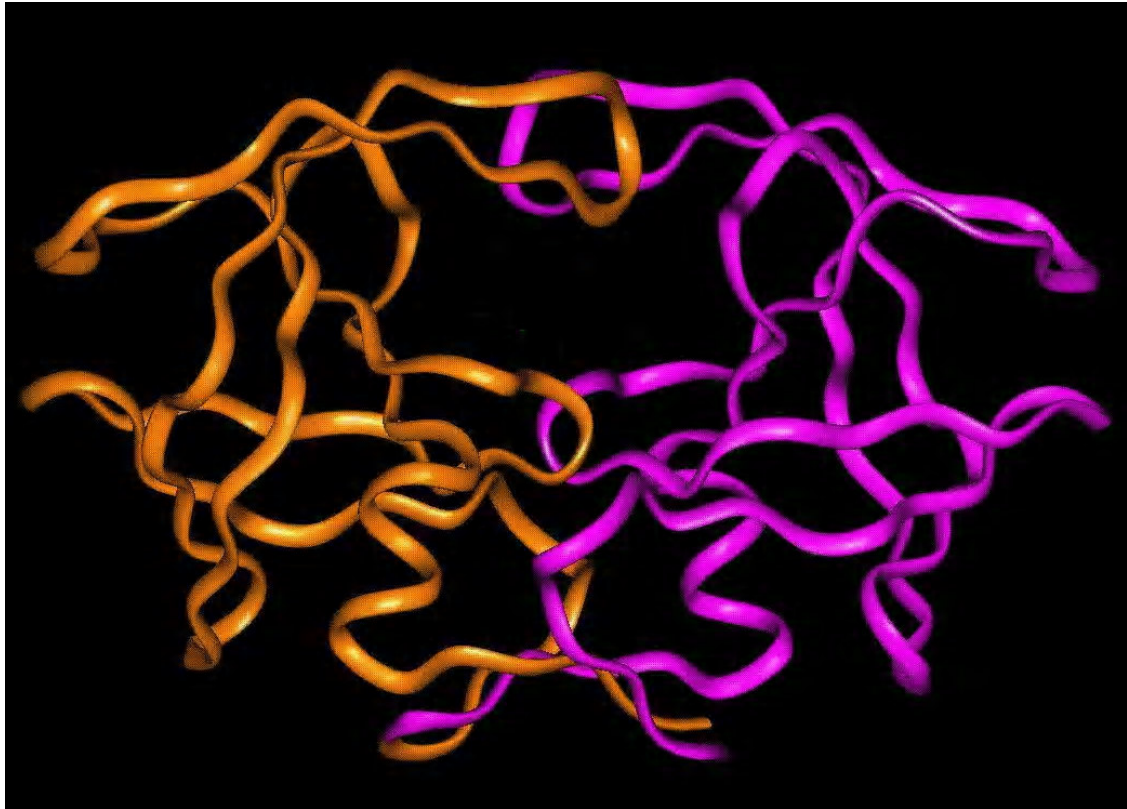


Şekil.2.4 HIV-1 integraz yapısı (57).

İntegraz proteini HIV proviral DNA'nın konak hücrenin genomik DNA'sına entegre edilmesinde görevlidir. Bu proses IN'in üç farklı özelliğiyle yürütülür. İlk olarak ekzonükleaz aktivitesiyle lineer yapıdaki viral DNA dubleksinin her iki 3' ucundan fosfodiester bağlarını kırarak iki nükleotid keser. Daha sonra endonükleaz aktivitesiyle konak hücrenin çift zincirli DNA'sını entegrasyon bölgesinden keser. Son olarak ligaz aktivitesiyle proviral DNA'nın her iki ucunda bir adet kovalent bağlantı oluşturur. Entegrasyondan sonra hücresel enzimler entegrasyon bölgesini tamir ederler. Entegrasyon eksojen enerji kaynağına (ATP vs) ihtiyaç duyulmadan yürütülür (58).

- **Proteaz (Pr):**

Proteaz, ribozomal çerçeve kayması sonucu sentezlenen prekürsör gag-pol füzyon proteininden otokatalitik mekanizmayla ayrılır. Proteaz yapısı Şekil 2.5'de gösterilmiştir. Yapısal olarak aydınlatılmış ilk HIV-1 proteindir. 1989'dan 1993'e kadar x-ışını kristalografisi kullanılarak HIV-1 Pr, Pr-inhibitör kompleksleri ve Pr mutantlarının 160'dan fazla kristal yapı analizi rapor edilmiştir. Bunlardan bir çoğu proteaz inhibitörlerinin geliştirilmesine rehberlik etmiştir (59).



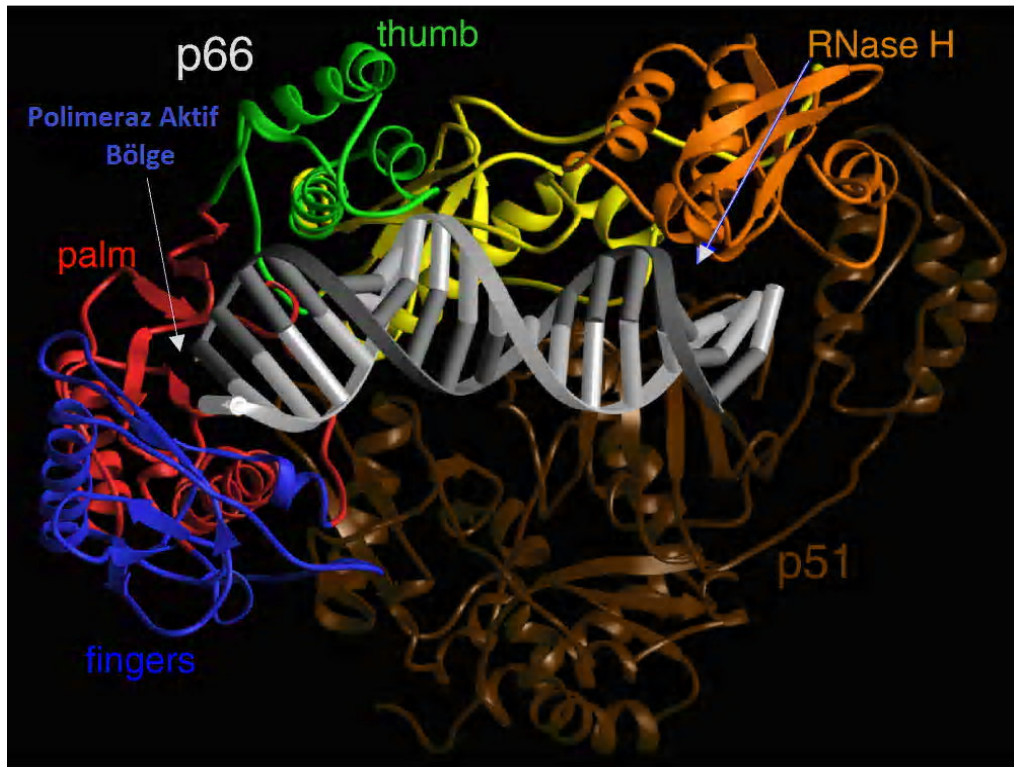
Şekil 2.5. HIV-1 proteaz yapısı (61).

Pr aspartil proteazlar enzim ailesine üyedir. Diğer aspartil proteazlar gibi simetrik homodimer yapıya sahiptir. Her bir alt birimi 99 amino asit büyüklüğündeki dimer yapı, N ve C terminalindeki β -zincirlerin oluşturduğu dört zincirli antiparalel β -tabaka tarafından stabilize edilir. Dimer yapının merkezinde bulunan katalitik üçlü yapı (Asp25-Thr26-Gly27), enzimin bölünme reaksiyonlarından sorumlu aktif bölgesidir (60). Pr, Gag ve Gag-Pol prekürsör poliproteinlerini spesifik noktalardan bölerek olgunlaşmalarını sağlar. Bu aktivite virüsün hayat döngüsü sırasında olgunlaşması ve viral enfektivitesinin sağlanması için gereklidir.

- **Revers Transkriptaz (RT):**

HIV-1 RT, Şekil 2.6'da gösterildiği gibi p66 ve p51 olarak bilinen iki alt birimden oluşan asimetrik heterodimer yapıdadır. Her iki alt birim de splaylanmamış viral mRNA'dan sentezlenen Gag-Pol poliproteininin viral proteaz enzimi aracılığıyla parçalanması sonucu oluşturulur. 560 amino asit büyüklüğünde p66 ve 440 amino asit büyüklüğünde p51 ortak N terminaline sahiptir (62, 63). Konak hücre genomuna entegre edilmek üzere tek zincirli viral RNA'nın çift zincirli DNA'ya çevirilerek kopyalanması için RT'nin DNA polimeraz ve RNase H enzim fonksiyonlarına sahip

olması gereklidir. RT'nin DNA polimeraz enzim fonksiyonu tek zincirli viral RNA'yı kalıp olarak kullanarak çift zincirli proviral DNA sentezlenmesini sağlar. RNase H enzim fonksiyonu ise RNA-DNA heterodubleksinin parçalanmasını sağlar. RT'nin büyük alt birimi (p66), her iki enzimatik aktivite (polimeraz ve RNase H) için gerekli aktif bölgeler içerir. Küçük alt birim (p51) ise p66 alt birimini yapısal olarak stabilize etmede görevlidir. Kristalografik çalışmalar sonucu RT'nin önemli yapısal özellikleri aydınlatılmıştır (63, 64). P66 birbirinden ayrı iki bölgeden oluşur. Bunlar polimeraz ve RNase H bölgeleridir. Polimeraz bölgesi fingers, palm, thumb, ve connection olarak adlandırılan dört alt bölgeye ayrılır. p51 p66'nın polimeraz bölgesindeki gibi aynı dört bölgeye (fingers, palm, thumb, connection) ayrılır. Ancak p66 ve p51 alt bölgelerinin pozisyonları birbirlerine göre farklıdır (63).



Şekil 2.6. HIV-1 RT-nükleik asit kompleksi. P51 (koyu kahverengi), kalıp DNA (açık gri), primer DNA (koyu gri) ve p66'nın fingers (mavi), palm (kırmızı), thumb (yeşil), connection (sarı), RNase H (turuncu) alt bölgeleri gösterilmiştir (64).

Nükleik asit bağlayıcı bölgeyi temel olarak p66'nın fingers, palm, thumb, connection ve RNase H alt bölgeleri oluşturur. p51 connection ve thumb alt bölgeleri nükleik asit bağlayıcı bölgeyi yapısal olarak stabilize eder. Nükleik asit bağlayıcı bölgenin polimeraz ve RNase H aktif bölgeleri nükleik asitle aynı anda temas kurabilecek

şekilde konfigüre edilmiştir. Bu iki bölge nükleik asit substrata yaklaşık 17-18 baz çifti uzaklığındadır. P66 thumb bölgesinin iki önemli alfa heliks yapısı nükleik asiti doğru konumlandırmak için primer ve kalıp zincirler ile etkileşime girer (63).

Polimeraz aktif bölge, p66'nın palm alt bölgesinde bulunan üç önemli katalitik amino asit rezidüsünden (D11, D185 ve D186) meydana gelir. Bu rezidüer polimerizasyon için gerekli olan iki Mg^{++} iyonuna bağlanır. Magnesium iyonları üç karboksilatı ve gelişen zincirin fosfat grubunun oksijenlerini koordine ederek yeni bir nükleotidin 3' OH grubuna bağlanmasını kolaylaştırır. Polimeraz aktif bölgeye benzer olarak RNase H aktif bölge de iki Mg^{++} iyonuna bağlanan katalitik aktiviteden sorumlu üç önemli (E-478, D-443 ve D-498) amino asit rezidüsü içerir (63).

c)Env:

Splayslanmış env mRNA'sından 160 kD büyüklüğünde gp160 proteini eksprese edilir. Gp160 konak hücrenin endoplazmik retikulumunda sentezlendikten sonra golgi kompleksine yönelir. Golgi kompleksinde proteinin asparajin rezidülerine yaklaşık 25-30 N-bağlı kompleks karbonhidrat yan zinciri eklenerek glikozillenme gerçekleştirilir. Env glikozilasyonu viral enfektivite için gereklidir (65). Daha sonra hücrel proteaz enzimi gp160'ı gp41 ve gp120'ye parçalar. Hidrofobik gp41 env gp'nin transmembran bölgesini içerir. Hidrofilik gp120 ise enfekte hücre ve virionun yüzeyinde gp41'e non-kovalent bağlı şekilde bulunur (66).

HIV ile T lenfosit, monosit, makrofaj ve dendritik hücrelerde bulunan CD4 reseptörü arasındaki etkileşim gp120'nin özel bir bölgesi aracılığıyla gerçekleştirilir. Gp120 dokuz yüksek oranda korunmuş zincir içi disülfid bağlara sahiptir. Ayrıca gp120, amino asit sekansları HIV izolatları arasında önemli ölçüde değişiklik gösterebilen beş değişken bölge (hypervariable regions, V1,V2,V3,V4,V5) içerir. 36 aminoasitten oluşan ve değişken bölgeyi temsil eden V3 bölgesi (loop) CD4 etkileşiminde görevli değildir (67). Ancak HIV-1'in T lenfoid hücreler veya primer makrofajlara tropizminin önemli bir determinantıdır. V3 bölgesinde bulunan sekanslar, viral suşlara duyarlılığın kısmi belirleyicisi olan CXCR4 ve CCR5 kemokin ko-reseptörleri ile etkileşim gösterir (68). Gp120, dendritik hücre yüzeyinde eksprese edilen DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin) proteiniyle etkileşim gösterir. Bu etkileşim HIV'in CD4 pozitif T hücreleri üzerindeki enfektivitesini artırır (69). Gp41'in 20 aminoasitten oluşan füzyojenik N terminal bölgesi viral zarf ile hücre

membranının füzyonunu sağlar. Böylece virionun iç bölgesindeki viral komponentler enfekte edilen hücrenin sitoplazmasına taşınmış olur (70).

2.1.3.3. Regülatör Proteinler

a) Rev:

Rev (Regulator of Expression of Virion Proteins) 13 kD büyüklüğünde ve 116 aminoasitten oluşan sekansa özgü etkileşim gösteren HIV regülatör proteindir. Tam olarak splaylanmış mRNA'dan sentezlenen Rev proteini, HIV gen ekspresyonunun erken fazından geç faza geçişini indükler. Rev iki ekzondan kodlandıktan sonra enfekte hücrenin çekirdeğinde birikir. Daha sonra HIV'in ikinci intronu içerisinde yer alan RRE (Rev response element) olarak bilinen 240 baz uzunluğunda kompleks sekonder RNA yapısına bağlanır. Rev, RRE bölgesindeki bir saç tokası yapısı (stem loop 2) içinde yer alan yüksek affiniteli Rev bağlayıcı bölge olarak bilinen yapıya bağlanır (71).

Rev'in RRE'ye bağlanması splaylanmamış ve kısmen splaylanmış viral RNA'ların nükleustan sitoplazmaya geçişini hızlandırır. Normal şartlarda intron içeren RNA'lar nükleusta bulunur. Yüksek seviyede Rev ekspresyonu çok miktarda intron içeren viral RNA'nın nükleustan çıkışına neden olur. Bunun sonucunda çekirdekte splaylanacak RNA miktarı ve dolayısı ile Rev ekspresyonu azalır. Rev'in bu özelliği rev ekspresyon seviyesini kontrol eden negatif feedback döngüsü oluşturur (72).

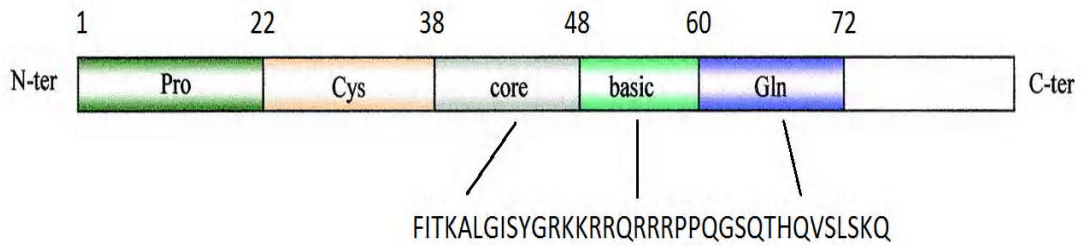
Rev en az üç fonksiyonel bölge içerir. Bunlardan biri RRE etkileşimine aracılık eden arjinince zengin RNA bağlanma bölgesidir. Diğerleri Rev'in fonksiyon gösterebilmesi için gerekli olan multimerizasyon bölgesidir. Ayrıca Rev NES (nuclear export signal) olarak bilinen RNA'ların nükleustan sitoplazmaya transferinde görevli efektör bölgesine sahiptir. Viral RNA'nın Rev aracılığıyla sitoplazmaya taşınması tipik olarak snRNA'lar (small nuclear RNA) ve ribozomal 5s RNA'nın katılımı ile gerçekleştirilir (73). Rev fonksiyonuna sahip olmayan HIV-1 provirüs transkripsiyonel olarak aktif olsa da geç faz viral genleri eksprese edemez ve sonuç olarak virion üretimi gerçekleşmez. Bu nedenle Rev HIV-1 replikasyonu için mutlaka gereklidir.

b) Tat:

Tat (Trans-Activator of Transcription, Transkripsiyon trans-aktivatörü) 14 kDa büyüklüğünde splaylanmış mRNA'dan kodlanmış önemli bir regülatör proteindir. Enfekte hücrelerin hem nükleusunda hem de sitoplazmasında bulunabilir. Nükleusta

trans-acting transkripsiyonel aktivatör olarak etki eder. Ayrıca viral mRNA üzerindeki TAR olarak bilinen saç tokası yapısı ve bazı hücrel proteinler ile kompleks etkileşimlere girerek transkripsiyonun başlatılması ve RNA zincirinin uzamasında görev alır. Sitoplazmada ise HIV-1 mRNA'larının translasyonel aktivatörü olarak fonksiyon gösterir (74). Tat'ın yokluğunda transkripsiyonel aktivite 100 kat baskılanır. Tat proteini enfekte hücrelerden aktif olarak hücre dışına salgılanır. Ekstraselüler Tat, HIV ile enfekte olmuş latent evredeki hücrelere girerek viral genom transkripsiyonunu aktive edebilir (75). Bu durum HIV-1 enfeksiyonunun erken fazında meydana gelen replikasyon artışını açıklar. Ayrıca ekstraselüler tat farklı tip hücrelerin yüzeyinde bulunan en az dört farklı reseptör grubu ile etkileşim gösterir. Bunlar kemokinler, integrinlerin hücre adezyon reseptörleri, heparan sülfat proteoglikanları, düşük dansiteli lipoprotein reseptör-ilişkili protein ve vasküler endotelial büyüme faktörü reseptörleridir. Bu reseptör çeşitliliği Tat'ın farklı tip hücrelerde kompleks sinyal ağlarını aktive ederek AIDS'e bağlı patolojilerin ortaya çıkmasında önemli bir role sahip olduğunu göstermektedir. AIDS hastalarında görülen demans gelişimi, farklı tip bağışıklık sistemi hücrelerinde immün yanıtın baskılanması, tümör gelişimi ve metastaz oluşumu için gereken neovaskülerizasyon indüklenmesi sonucu tümör vakalarının görülme sıklığının artması, hipervaskülerize Kaposi Sarkomu (KS) gelişimi gibi AIDS'e bağlı patolojiler ekstraselüler tat'ın çeşitli biyolojik aktiviteleri ile ilişkilendirilmiştir (5-10). Ayrıca ekstraselüler tat insan herpes virüsü-8 (Human Herpes Virus-8, HHV-8), hepatit C virüsü (Hepatitis C Virus, HCV) ve insan sitomegalovirüsü (Cytomegalovirus, CMV) genomunu transaktive ederek ikincil enfeksiyonların oluşmasını indükler (76).

HIV-1 tat iki ekson tarafından kodlanan 86 aminoasit uzunluğunda bir polipeptittir. Proteinin ilk 72 amino asitten oluşan kısmı birinci ekson tarafından kodlanır. Bu bölge HIV genomunun trans-aktivasyonundan sorumludur. İkinci ekson polipeptidin karboksi terminalinde bulunan ve bir RGD (arjinin-glisin-aspartik asit) motifi içeren 14 aminoasit uzunluğundaki bölgeyi kodlar. Trans-aktivasyona katılmayan bu bölge tat'ın $\alpha_v\beta_3$ ve $\alpha_5\beta_1$ integrinlerine bağlanmasından ve immünoşüpresif etkilerinden sorumludur. İlk eksonun kodladığı polipeptid dizisi Şekil 2.7'de gösterildiği gibi beş alt bölgeye ayrılır (77, 78).



Şekil 2.7. Tat geninin ilk eksonu tarafından kodlanan polipeptid dizisi. Tat peptidinin Pro (proline zengin bölge), Cys (sisteince zengin bölge), Core, basic ve Gln'den (glutamince zengin bölge) oluşan beş bölgesi ve Tar RNA'ya yüksek affinite gösteren polipeptid sekansı (38.-72. aminoasitler) gösterilmiştir (79).

Birinci bölgede (1.-21. aminoasitler) hidrofilik ve hidrofobik amino asitler periyodik tarzda konumlanmıştır. Prolince zengin bu bölge beş prolin içeren korunmuş bir motife sahiptir. Bu bölgenin işlevi tam olarak bilinmese de yüksek miktarda prolinin tat'ı proteaz degradasyonundan koruduğu düşünülmektedir (80).

İkinci bölge (22.-37. aminoasitler) birçok HIV-1 alt tipinde korunmuş olan trans-aktivasyon için gerekli sisteince zengin bir motife sahiptir. Bu bölgede belirli sistein rezidülerinin delesyonu veya nokta mutasyonları tat'ın genomu trans-aktive etme yeteneğini kaybetmesine yol açmaktadır (78). Sisteince zengin bu bölge bivalan metallere (Çinko, Kadmiyum) bağlanarak dimer oluşturma özelliği gösterir. Bu bölgede bulunan 7 sistein rezidüsünün 6'sında mutasyon gerçekleştiğinde tat'ın aktivite kaybı meydana gelir (81, 82).

Üçüncü bölge (38.-48. aminoasitler, core domain) 10 aminoasitten oluşan korunmuş motife sahiptir. Bu bölgedeki 41'inci lizin aminoasiti trans-aktivasyon için gereklidir. Bu aminoasitin nokta mutasyonu tat'ın trans-aktive etme kapasitesini dramatik olarak azaltır ya da tamamen ortadan kaldırır. Ayrıca bu bölge viral mRNA'nın 5' ucunda yer alan TAR saç tokası yapısının spesifik olarak tanınmasında görevlidir (78).

Dördüncü bölge (49.-59. Aminoasitler, basic domain) bütün HIV-1 alt tiplerinde bulunan çok iyi korunmuş, arjinin ve sisteince zengin GRKKRRQRR motifini içerir. Bu bölge HIV-1 LTR trans aktivasyonunda kritik role sahiptir. Ayrıca Tat'ın TAR RNA'ya bağlanmasında görevlidir. Bu nedenle dördüncü bölgede meydana gelen mutasyonlar trans-aktivasyon faaliyetinin kaybına yol açmaktadır. Ancak Tat'ın TAR RNA'yı tanıyabilmesi ve iki yapı arasındaki etkileşimin optimum düzeyde gerçekleştirilebilmesi

için üçüncü bölgeye ihtiyaç duyulmaktadır. Ayrıca bu bölge Tat'ın nükleusa girebilmesini sağlayan nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içerir (80).

Beşinci bölge (60.-72. aminoasitler) ilk ekzonun kodladığı en az korunmuş glutamince zengin bölgedir. Birçok glutamin rezidüsü bulunan bu bölgede Tat-TAR etkileşimi sırasında α -heliks yapı formasyonu meydana gelir (80).

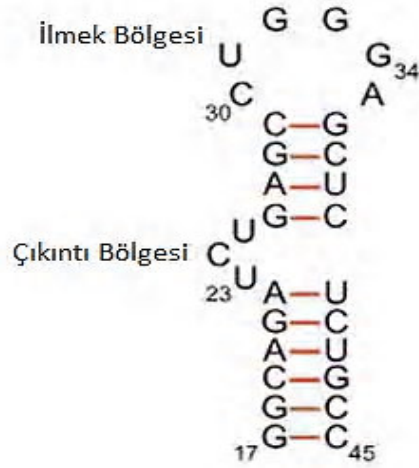
Tat-TAR RNA Etkileşimi

Tat HIV-1 viral gen ekspresyonunun ana aktivatörü olarak bütün viral transkriptlerin sentezlenmesini güçlü bir şekilde indükler. Tat'ın birçok hücrel kofaktörle etkileştiği bilinmektedir. Ancak yüksek ölçüde korunmuş TAR RNA ile etkileşimi HIV-1'in transkripsiyonel seviyede kontrol edilmesinde anahtar rol oynamaktadır (81).

TAR, tüm HIV-1 transkriptlerinin 5' ucunda bulunan 60 nükleotid uzunluğunda saç tokası yapısında RNA zinciridir. Tat proteini TAR RNA'ya 1:1 oranda bağlanarak trans-aktivasyon için gerekli olan Tat-TAR kompleksini meydana getirir. TAR'ın özgün saç tokası yapısı üç çıkıntı nükleotidi (23.-25. rezidüleri) ve altı ilmek nükleotidi (30.-35. rezidüleri) içerir. TAR'ın 19.-42. rezidüleri Tat'a duyarlı bölgeyi meydana getirir. Çıkıntı bölgesi, Tat'ın TAR'a yüksek affinite ile bağlanabilmesi için gereklidir. Bazı çalışmalarda ilmek bölgesindeki mutasyonların Tat-TAR kompleksi oluşumuna herhangi bir etkisinin olmadığı fakat transaktivasyonda anlamlı bir düşüş gözlemlendiği bildirilmiştir. Bu durum göz önüne alındığında ilmek bölgesinin transkripsiyonel kofaktörlerinin bağlanma bölgesi olarak fonksiyon gösterdiği anlaşılmaktadır (82,83). İlmek bölgesine bağlanan proteinlerin araştırılması sonucunda Siklin T1 tanımlanmıştır.

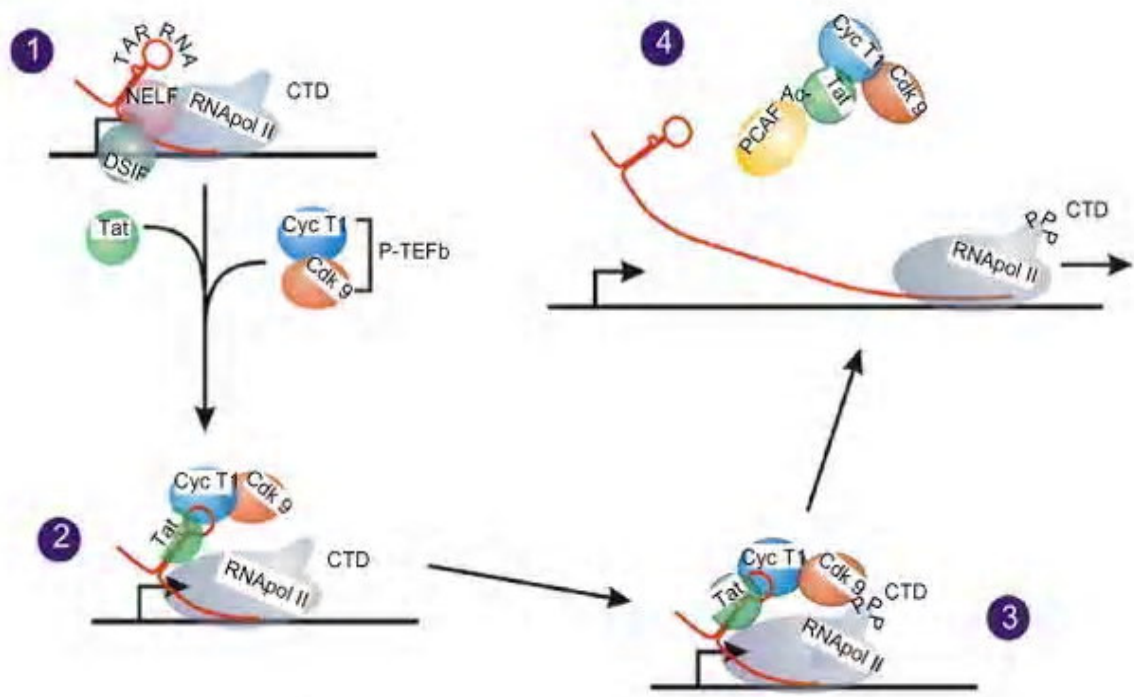
Tat'dan farklı olarak siklin T1 tek başına tat'ın yokluğunda TAR RNA'ya bağlanamamaktadır. Ancak Tat'ın siklin T1 ile etkileşimi Tat-TAR RNA etkileşiminin affinite ve spesifitesini artırır (84). Şekil 2.8'de gösterilen TAR RNA'nın çıkıntı bölgesi ve ilmek bölgesindeki G34 rezidüsü, siklin T1-Tat kompleksinin meydana gelmesi açısından önemlidir. G34, TAR ilmeğindeki C30 rezidüsü ile baz eşleşmesi yaparak 35. pozisyonda tek nükleotidden meydana gelen bir çıkıntı oluşturur. Bu çıkıntı RNA omurganın bükülmesini ve ilmek üzerindeki fonksiyonel grupların erişilebilirliğinin artmasını sağlar. Siklin T1'in 261. pozisyondaki sistein rezidüsü ortamdaki çinkoya bağlı olarak Tat'a bağlanır. Molekülün diğer sistein rezidüleri Tat'a bağlanmada görevli değildir. Siklin T1'in 252.-260. rezidüleri Tat-TAR tanıma motifini (Tat-TAR Recognition Motif, TRM) oluşturur. TRM, TAR RNA ilmeğinin bir ucu ile etkileşirken,

diğer ucun Tat lisin-50 rezidüsü ile etkileşmesini artırır. Sonuçta HIV-1 transkripsiyonu için gerekli fonksiyonel P-TEFb-Tat-TAR kompleksi oluşturulur (85).



Şekil 2.8. TAR RNA üzerinde bulunan çıkıntı bölgesi, ilmek bölgesi ve belirli rezidüleri (86).

Tat'ın yokluğunda viral LTR üzerinde toplanan RNA polimeraz II kompleksinin işlevselliği zayıflar. Bu durumda HIV-1 LTR bölgesinden bazal seviyede TAR RNA ile diğer kısa zincirli ve poliadenilasyon işlemi gerçekleşmemiş transkriptler sentezlenir. Tat ekspresyonu sonucu uzun ve poliadenilasyon işlemi gerçekleşmiş transkriptler sentezlenir (87).



Şekil 2.9. Tat aracılı transkripsiyonel aktivasyon. 1) NELF ve DSIF hipofosforillenmiş durumdaki RNA polimeraz II'ye bağlanarak transkripsiyonel uzamayı inhibe eder. 2) Tat, TAR RNA'ya bağlandıktan sonra siklin T1'e bağlanarak P-TEFb'yi TAR üzerinde toplar. 3) CDK-9'un CTD'yi fosforillemesi sonucu DSIF ve NELF RNA polimeraz II'den ayrılır. 4) p300 ve hGCN5 Tat'ın TAR RNA'ya bağlandığı bölgede bulunan lizin-50 rezidüsünü asetilleyerek PCAF'ün bu noktadan bağlanabilmesini sağlar. PCAF TAR RNA ile yarışmalı olarak Tat'a bağlanır ve Tat'ın TAR RNA'dan ayrılmasına neden olur. Sonuçta transkripsiyonel uzama indüklenmiş olur (88).

Pozitif transkripsiyon uzama faktörü b (P-TEFb) ile negatif transkripsiyon uzama faktörleri (5, 6-dichloro-1-beta-D-ribofuranosylbenzimidazole sensitivity-inducing factor, DSIF ve negatif uzama faktörü kompleksi, NELF) arasında kompleks bir etkileşim bulunmaktadır (89). RNA polimeraz II'nin işlevselliğinin düzenlenmesinde enzimin karboksi terminali bölgesinin (Carboxyterminal Domain, CTD) fosforilasyonu anahtar rol oynamaktadır. CTD'nin hipofosforile formu RNA polimeraz II kompleksinin zayıf işlevselliğine, hiperfosforile formu ise enzim kompleksi işlevselliğinin artmasına neden olur. CTD'nin fosforilasyonu Şekil 2.9'da gösterildiği gibi CTD-spesifik kinaz aktivitesine sahip P-TEFb tarafından düzenlenir (90). İlk önce P-TEFb'nin kinaz alt birimi olarak tanımlanan Nükleer Tat-ilişkili Kinaz (Tat-associated kinase, TAK) daha sonra siklin-bağımlı kinaz 9 (CDK9) olarak tanımlanmıştır. CDK9 siklin T1, siklin T2a, siklin T2b ve siklin K ile etkileşim

gösterebilir. Ancak Tat, HIV LTR üzerinden transkripsiyonel aktivasyon işlemi sırasında Tat-P-TEFb kompleksini oluşturmak üzere siklin T1 ile selektif olarak etkileşir (91,92). Tat'ın yokluğunda RNA polimeraz II'nin hipofosforile durumu ve bu durumdaki RNA polimeraz II'ye bağlanarak transkripsiyonel uzamayı inhibe eden DSIF ve NELF aktivitesi sonucunda genellikle kısa zincirli transkriptler meydana gelir. Siklin T1 ile birlikte P-TEFb'yi meydana getiren Cdk9, CTD fosforilasyonuna katılan kinazlar arasında yer alır. Transaktivasyon sırasında Tat, TAR RNA'ya bağlandıktan sonra siklin T1'e bağlanarak P-TEFb'yi bu bölgeye toplar. P-TEFb'nin TAR üzerinde toplanması sonucunda Cdk9 tarafından CTD'nin hiperfosforilasyonu indüklenmiş olur. Hiperfosforilasyon DSIF ve NELF'ün enzim kompleksinden ayrılmasına neden olur. Tat'ın RNA'ya bağlanma bölgesinde bulunan lizin-50 rezidüsünün p300 ve histon asetil transferazlar (HAT) arasında yer alan hGCN5 (Human General Control of Amino Acid Synthesis Protein 5) ile asetillenmesi sonucunda bu noktada p300/CREB (cAMP response element binding protein) bağlayıcı protein-ilişkili faktörü (PCAF) bağlayıcı bölge oluşur. Bunun sonucunda Tat-PCAF ve P-TEFb'den oluşan üçlü yapı formasyonu meydana gelir. PCAF, asetillenmiş Tat'a TAR RNA ile yarışmalı olarak bağlanır ve Tat'ın TAR RNA'dan ayrılmasını sağlar. Bu sayede transkripsiyonel uzama indüklenmiş olur (93, 94).

2.1.3.4 Aksesuar Proteinler

a) Vif:

Vif (Viral Infectivity Factor) konak hücre sitoplazmasında bulunan 23-kD büyüklüğünde viral proteindir. Viral siklüsün geç fazında eksprese edilir. Uzun zamandır belirli hücre türlerinde viral replikasyon için gerekli olduğu bilinmektedir. Vif Jurkat, HeLA, C8166, COS, U937 ve SupT1 gibi permisif hücrelerde viral replikasyon için gerekli değildir. Ancak makrofajlar, PBMC, CEM, H9 gibi non-permisif hücrelerde HIV replikasyonu için gereklidir. Non-permisif hücrelerde vif-defektif virüsler yeni virion meydana getirebilirler. Fakat oluşturulan yeni virionlar revers transkripsiyon işlemini gerçekleştiremediğinden başka hücreleri enfekte etme yeteneğine sahip değildir (95). Vif etkisini hücresel sitidin deaminazlar ailesinden APOBEC3B, APOBEC3F ve APOBEC3G'nin antiviral aktivitesini ortadan kaldırarak gösterir. Vif'in yokluğunda APOBEC3G viral çekirdek ile stabil kompleks oluşturmak üzere yeni oluşturulan virion içine taşınır. Bu virionlar hedef hücrelere penetre olduktan sonra hücre içinde viral

cDNA sentezi başlatılır. Ancak APOBEC3G, deoksisitidini deaminasyon sonucu deoksiuracile çevirerek viral cDNA da hipermutasyona neden olur. Hipermutasyon sonucu işlevsel olmayan provirüsler sentezlenir. Vif APOBEC3G ile etkileşerek APOBEC3G'nin ElonginB-ElonginC-Cullin5 E3 ligaz kompleksine bağlanmasını sağlar. Bunun sonucunda APOBEC3G ubiquitinlenir. Ubikülinlenmiş APOBEC3G proteazom tarafından parçalanarak viral replikasyonun gerçekleşmesi sağlanır. Ayrıca vif APOBEC3G'nin intrasellüler de novo sentezini post-transkripsiyonel mekanizmayla inhibe eder. Böylece APOBEC3G vif tarafından translasyonel seviyede baskılanır (88, 96).

b) Vpu:

Vpu (Virüs Protein U) 81 amino asit (16 kDA) büyüklüğünde, bisitronik vpu-env mRNA'sından kodlanan oligomerik tip I membran proteindir. Vpu, N terminalindeki hidrofobik transmembran bölge (TM) (1.-27. rezidüleri) ve C terminalindeki 54 amino asitten oluşan hidrofilik sitoplazmik bölgeden meydana gelir (97). Vpu, HIV-1 virüs partikülleri içerisinde bulunmaz. Ancak enfekte hücrelerin membranlarında virüsün hücre dışına çıkmasını kolaylaştırmak amacıyla yer alır. Vpu, virüsün yaşam siklusü sırasında viral partiküllerin hücre dışına salgılanmasının kontrolü ve endoplazmik retikulumdaki CD4 proteini degradasyonuna aracılık etme görevlerini üstlenir. Proteinin transmembran bölgesi viral partikül sekresyonunda sitoplazmik bölgesi ise CD4 proteinin degradasyonunda görevlidir (98).

c) Vpr:

Vpr (Viral Protein R) geni HIV-1, HIV-2 ve SIV virüslerinde korunmuş olarak bulunan 14 kDa büyüklüğünde vpr proteinini kodlar. Her bir virion içerisinde yaklaşık 100 kopya vpr proteini p55 Gag poliproteininin karboksi terminalinde yer alan p6 proteini ile spesifik etkileşim içine girerek paketlenir. Vpr enfekte hücrelerin nükleusunda lokalizedir ve viral yaşam döngüsünün geç döneminde virion içine taşınır. Vpr, hücre siklusünü düzenleyici p34cdc2/siklin B kompleksinin aktivasyonunu engelleyerek konak hücre siklusünü G2 fazında durdurma, mitokondri zarının geçirgenliğini arttırarak konak hücre apoptozunun kontrolünü sağlama, LTR'nin transkripsiyonunu ve viral replikasyonu indükleme gibi çeşitli fonksiyonlara sahiptir. Ayrıca PIC'in (preintegration complex) nükleer lokalizasyonuna yardımcı olarak HIV'in bölünmeyen hücreleri enfekte etme kabiliyeti üzerinde önemli rol oynar. Proteinin N terminal bölgesi

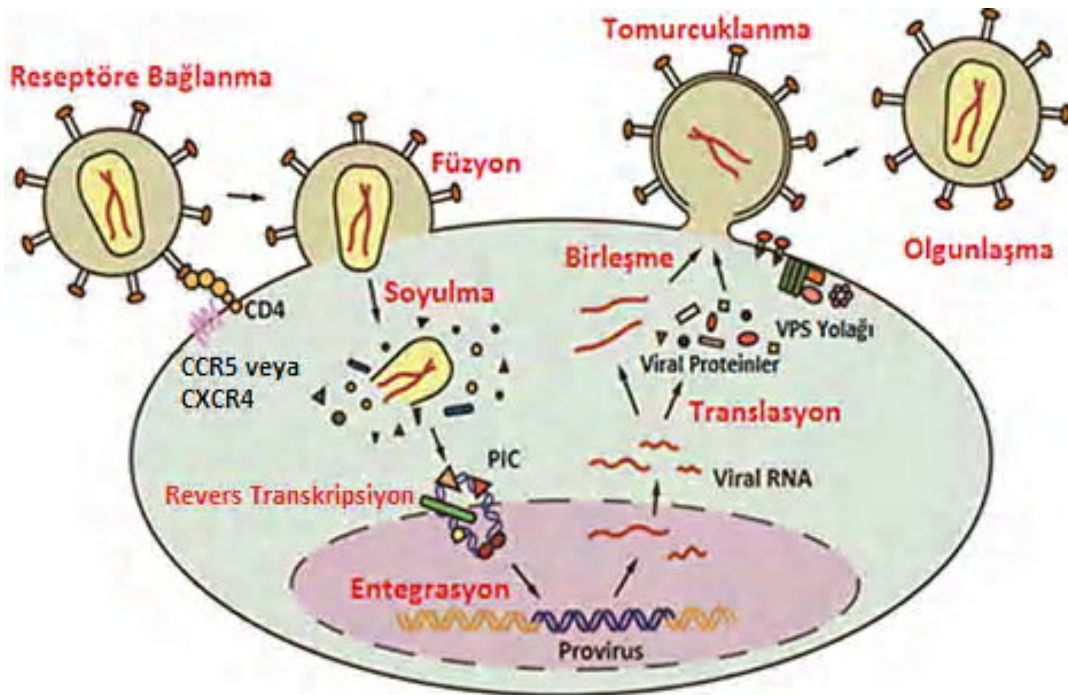
(1.-51. rezidüleri) nükleer lokalizasyon ve heksamer formasyonu için gerekli olan oligomerizasyon üzerinde önemli rol oynar. C terminal bölgesi (52.-96. rezidüleri) ise hücre bölünmesinin G2 fazında durdurulmasını, nükleokapsid proteini NCp72'ye bağlanmayı ve HIV-1 RNA'sı ile etkileşimi gerçekleştirir (99,100).

d) Nef:

Nef (Negative Regulatory Factor) 27 kDa büyüklüğünde viral siklusun erken evresinde yüksek seviyede eksprese edilen miristik asit ile konjuge edilmiş HIV-1 aksesuar proteindir. Nef, fonksiyonel olarak komplekstir ve viral patojenitenin önemli bir belirleyicisidir. Enzimatik aktivitesi olmayan Nef, protein-protein etkileşimleri üzerinden hücrel sinyal yollarını engelleyerek etki gösterir. Nef konak hücrenin süper enfeksiyonuna engel olmak ve yüksek CD4 seviyelerinin virüs üretimi üzerindeki inhibitör etkisini minimum düzeyde tutmak için hücre yüzeyinde bulunan CD4 reseptör sayısının azalmasını sağlar. Nef'in CD4 reseptörünün sitoplazmik uzantısı ile konak hücrenin endositoz mekanizması arasında bağlayıcı olarak fonksiyon gösterdiği rapor edilmiştir (101). Konağın bir viral enfeksiyona adaptif immün yanıt oluşturabilmesi için MHC (Cell Surface Major Histocompatibility Complex) aracılığı ile enfekte hücrenin yüzeyinde viral peptidlerin konumlandırılması gereklidir. Nef, HIV ile enfekte konak hücrelerin sitotoksik T-lenfositleri tarafından elimine edilmesine engel olmak amacıyla MHC-I (Cell Surface Major Histocompatibility Class I) moleküllerinin sayısını azaltır. Hücre yüzeyindeki MHC-I molekülleri nef tarafından hücre içindeki endozomlara yönlendirildikten sonra trans-Golgi ağı üzerinden clathrin içeren veziküllere taşınmasını sağlar. Daha sonra nef aracılığıyla bu veziküller degradasyon için lizozomlara yönlendirilir. Nef'in bu aktivitesi yapısal olarak bir amfipatik alfa heliks, asidik bölge ve poliprolin heliks bölgesi aracılığıyla gerçekleştirilir. Bu üç bölge Nef'in MHC-I'in sitoplazmik uzantısına doğrudan bağlanmasında görevlidir (102). Nef'in üçüncü fonksiyonu ise bir serin/treonin kinaz olan PAK-2'nin (p21-activated kinase 2) aktivasyonudur. Bu sayede HIV-1 ile enfekte hücrelerde BAD (Bcl-2-Associated Death Promoter) aracılı apoptotik hücre ölümü inhibisyonu ve virüs üretiminin artırılması sağlanır (101).

2.1.4. HIV-1 Replikasyon Döngüsü

HIV-1 enfeksiyonu viral zarf glikoproteini gp120'nin konak hücre yüzeyindeki CD4 reseptörlerine bağlanmasıyla başlar. Bu nedenle HIV-1'in ana hedefi CD4⁺ T lenfosit hücreleri, monositler ve makrofajlardır. Gp120-CD4 etkileşimi sonucu gp120 glikoproteininde bir seri konformasyonel değişiklik meydana gelir. Bu değişim gp120'nin sekonder reseptörlere (koreseptör) bağlanmasını kolaylaştırır. HIV'in konak hücre membranı ile füzyon yapabilmek için kemokin reseptörlerine ihtiyaçları vardır. Birçok HIV-1 suşu koreseptör olarak α -kemokin reseptör CXCR4'e veya β -kemokin reseptör CCR5'e bağlanır. Bunların dışında diğer bazı kemokin reseptörleri ya da ilişkili proteinlerin HIV-1 enfeksiyonlarında görev aldığı rapor edilmiştir (68, 103). Koreseptör çeşitliliği HIV-1 suşlarının farklı hücre tiplerine tropizmi için önemlidir. Gp120-CD4-koreseptör kompleksi formasyonu Env'nin gp41 alt biriminin (transmembrane envelope protein, TM) hidrofobik uca sahip sarmal bir yapı oluşturmasını indükler. Bu yapı virüs ile hücre arasında membran füzyonuna neden olur (104). Böylece virus hücre membranına Şekil 2.10'da gösterildiği gibi penetre olur.



Şekil 2.10. HIV-1 replikasyon döngüsü (105).

Penetrasyondan sonra virüsün genomik RNA'sını içeren viral nükleoprotein çekirdek (kapsid) sitoplazmaya salınır. Viral çekirdek revers transkripsiyon kompleksi (Revers Transcription Complex, RTC) formasyonu için kapsid yapısından ayrılır (106). Revers transkripsiyon işlemi RTC'de viral genomun 5' ucu yakınında primer bağlayıcı bölgeden (Primer Binding Site, PBS) başlar. RT öncelikle negatif DNA zincirini sentezler. Yeni zincir sentezlenirken RT'nin RNase H aktivitesi ile RNA kalıbı degrade edilir (63, 107). Daha sonra pozitif DNA zincirinin sentezi pürince zengin ve RNase H'ya dirençli biri HIV-1 genomun 3' ucunda diğeri ise ortasında yer alan iki kısa viral RNA segmentinden başlatılır. Pozitif DNA zincirinin sentezi negatif zincirli DNA'nın CTS (Central Termination Sequence) bölgesinde durur. Sonuçta orta bölgesinde 99 nükleotid uzunluğunda DNA Flap zinciri içeren HIV-1 DNA'sı sentezlenmiş olur (106).

Yeni sentezlenen viral DNA, PIC (Preintegration Complex) olarak bilinen büyük nükleoprotein kompleksi içinde hücresel ve viral proteinlerle bir arada bulunur. HIV-1 PIC RT, IN, MA, NC ve Vpr proteinlerini içerir. PIC'nin çekirdeğe transferinden sonra konak hücre kromatinine viral DNA entegrasyonu gerçekleşir. DNA entegrasyonunu PIC'de bulunan IN katalizler. Bu işlem, viral DNA'nın 3' ucunun kesilmesi, konak hücre DNA'sının entegrasyon bölgesinden kesilmesi, proviral DNA'nın her iki ucunda kovalent bağlantı oluşturularak hedef DNA'ya entegrasyonu ve viral DNA ile hedef DNA arasındaki boşlukların hücresel enzimler aracılığıyla tamiri aşamalarından meydana gelir (58).

Provirus olarak adlandırılan entegre olmuş viral DNA hücresel transkripsiyon faktörleri aracılığıyla viral genlerin ekspresyonunu sağlar. Replikasyon döngüsünün erken döneminde tam olarak splaylanmış mRNA'lardan Tat, Rev ve Nef proteinleri kodlanır. Tat, TAR ve hücresel uzama kompleksi ile etkileşerek viral mRNA üretimini artırır (76). Rev'in hücrede birikmesi sonucu splaylanmamış veya kısmen splaylanmış mRNA üretiminde artış tam olarak splaylanmış mRNA üretiminde azalma meydana gelir. Ayrıca Rev splaylanmamış veya kısmen splaylanmış mRNA'ların nükleustan sitoplazmaya çıkmasını sağlar (72). Bu tip viral RNA'lar env'nin kodlandığı bölgede yer alan ve RRE olarak bilinen bir cis-acting element içerir. Rev'in RRE'ye bağlanması splaylanmamış ve kısmen splaylanmış viral RNA'ların nükleustan sitoplazmaya geçişini hızlandırır. Ayrıca Rev NES (nuclear export signal) olarak bilinen RNA'ların

nükleustan sitoplazmaya transferinde görevli efektör bölgesine sahiptir. Sonuçta bu aşamada Gag, Gag-Pol, Env ve aksesuar proteinlerin üretimi gerçekleşir (72, 73).

Sentezlenen viral protein komponentleri ve viral RNA yeni bir virüs oluşturmak üzere toplanırlar. Toplanma işlemi plazma membranında gerçekleşir (108). Virion formasyonu sırasında Gag poliproteini önemli bir role sahiptir. Bu poliprotein MA, CA, NC proteinlerinin prekürsörüdür. Gag prekürsör proteinleri hızla plazma membranına yönelirler ve burada multimerize olurlar. Ayrıca Gag-Pol proteinlerinin birleşmeye katılımı enfeksiyöz virionların oluşturulması için gereklidir. Gag-Pol RT, IN ve PR'yi içeren çoklu domaine sahip proteindir. Gag-Pol plazma membranına yönelir ve burada Gag ile birleşerek yeni enfeksiyöz virionların oluşmasını sağlar (109). Env glikoproteini ise endoplazmik retikulum'da sentezlenir ve hücre yüzeyine ulaşarak virüs partikülleriyle birleşir. Gag'ın MA bölgesi Env'nin virionlara yönlendirilmesini sağlar (108). Viral genomik DNA'nın enkapsidasyonu Gag'ın NC bölgesi ile gag başlangıç kodununun 5' bölgesinde yer alan paketleme sinyali'nin (ψ) etkileşimi sonucu gerçekleşir. Ayrıca Ψ sekansı viral genomik RNA'nın dimerizasyonunu sağlar. Sonuçta üretilen virüs partikülü konak hücre membranından tomurcuklanarak ayrılır. HIV-1 tomurcuklanma işlemi VPS (Vacuolar Protein Sorting) yolağındaki bazı hücresel proteinlerin katılımı ile gerçekleşir. Virüs partikülleri plazma membranından dış ortama salındıktan sonra Gag ve Gag-Pol prekürsör proteinlerinin viral PR aracılığıyla kesilerek fonksiyonel proteinlere dönüştürüldüğü olgunlaşma aşamasına geçilir (110).

2.2. ANTİRETROVİRAL TEDAVİ

AIDS epidemisinin ortaya çıkmasından sonra birçok antiretroviral ilaç geliştirildi. Ancak 1996'dan önce çok az antiretroviral tedavi seçeneği bulunmaktaydı. Bu nedenle AIDS'in klinik yönetiminde genellikle fırsatçı patojenlere ve AIDS'e bağlı hastalıklara karşı profilaktik yaklaşımlar uygulanmaktaydı. 1990'ların ortalarında revers transkriptaz ve proteaz enzim inhibitörlerinin geliştirilmesi ve bu ilaçların kombinasyonu ile tedavinin genel etkinliğinin artırılması sonucu HIV tedavisinde önemli bir gelişim sağlandı. 1990'ların başlarında HIV-1'e spesifik antiviral ilaçlar monoterapi şeklinde uygulandı. Hastaların monoterapi başlangıcında kısa süreli yarar sağlaması ve uzun dönemde HIV-1'in yüksek oranda mutajenezeye bağlı olarak ilaca karşı geliştirdiği direnç nedeniyle ilaç etkinliğinin ortadan kalkması sonucu antiretroviral ilaçların (ARVs) kombinasyonlarını içeren tedaviler geliştirildi. ARV kombinasyonları Tablo 2.1'de

gösterilmiştir. HAART (Highly Active Antiretroviral Therapy) olarak da bilinen kombine ilaç tedavisinin geliştirilmesi HIV-1 enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde azalmaya neden olmuştur (111-113). Kombine tedavi güçlü bir şekilde viral replikasyonu ve HIV-1 plazma viral yükünü baskılayarak dolaşımdaki CD4⁺ T-lenfositlerinin sayısının artmasını sağlamaktadır (114). En az üç farklı antiretroviral ajan kullanılarak ve en az iki farklı viral molekül hedeflenerek dizayn edilen kombine tedaviler ilaca direnç gelişimi riskini azaltmaktadır. Hasta bireyin taşıdığı HIV-1 varyantları ile tam olarak uyumlu bir HAART tedavi protokolü viral replikasyonu onlarca yıl baskılayabilir. Ancak HAART tek başına HIV-1 enfeksiyonunu tamamen elimine edemez. Latent enfekte hafıza T hücreleri gibi bazı rezervuarlarda kalıcı viral replikasyon potansiyeli, uygulanan etkin kombinasyon tedavisine rağmen patojenitenin hayat boyu devam etmesine sebep olur (115). Ayrıca hastaların ömür boyu HAART tedavisine devam etmesini engelleyen bazı önemli sorunlar bulunmaktadır. Tedavide kullanılan ilaçların HIV-1 varyantı ile uyumsuzluğu, zayıf ilaç toleransı, diğer ilaçların antiretroviral ajanlarla etkileşmesi sonucunda tedavi için gereken optimum ilaç konsantrasyonunun sağlanamaması gibi durumlar HAART tedavisinin etkisini zayıflatmaktadır. Bu durumlardan her biri ilaç direnci gelişimine katkıda bulunmaktadır. Bunların dışında çeşitli mekanizmalar ilaç direnci gelişimine yol açmaktadır. Viral mutasyonların çoğu RT'nin transkripsiyon sırasında meydana getirdiği hatalardan kaynaklanır. HIV-1 RT yaklaşık her 7000 nükleotidde 1 hata oranına sahiptir. Yani her viral replikasyon döngüsü başına yaklaşık birkaç nükleotid hatalı olarak gelişen zincire katılır (116). APOBEC (Apolipoprotein B mRNA-editing enzyme catalytic polypeptide-like) protein ailesi sitidinin deaminasyonunu katalizleyerek uridin veya timidine dönüştürür. Bu protein ailesinden APOBEC3G, spesifik olarak HIV-1 ve diğer retrovirüslere karşı aktivite gösterir. Konak hücre kaynaklı bu aktivite viral RNA ve cDNA sekanslarında değişime yol açarak mutasyon gelişimine katkıda bulunur (117). Primer HIV-1 sekansında değişikliğe yol açarak antiretroviral ilaçlara karşı direnç gelişimine katkıda bulunan diğer konak hücre enzimi ADAR'dır (Adenosine Deaminase that Acts on RNA). Adenozinlerin inozine deaminasyonunu katalizleyen bu enzim çift zincirli RNA bölgelerini hedefler. İnozinler ribozom ve RT enzimi tarafından guanozin olarak algılanır ve işlem görür. İnsanlarda kısa ve uzun olmak üzere iki ADAR1 izoformu ve bir ADAR2 izoformu bulunmaktadır. Kısa ADAR1 ve ADAR2 çekirdekte,

uzun ADAR1 ise sitoplazmada bulunur. Bu nedenle primer HIV-1 sekansı değişiminde sitoplazmik uzun ADAR1 enziminin rol oynadığı düşünölmektedir (118).

Tablo 2.1. HIV-1 tedavisinde kullanılan FDA onaylı antiretroviral ilaçlar (119).

	JENERİK ADI	ONAYLANMA YILI
KOMBİNASYON İLAÇLAR	Efavirenz + emtricitabine + tenofovir disoproxil fumarate	2006
	Emtricitabine + rilpivirine + tenofovir disoproxil fumarate	2011
	Elvitegravir + cobicistat + emtricitabine + tenofovir disoproxil fumarate	2012
NÜKLEOZİD/NÜKLEOTİD REVERS TRANSKRİPTAZ İNHİBİTÖRLERİ (NRTIs/NtRTIs)	lamivudine + zidovudine	1997
	emtricitabine, FTC	2003
	lamivudine, 3TC	1995
	abacavir + lamivudine	2004
	Zalcitabine + dideoxycytidine, ddC (Üretilmiyor)	1992
	Zidovudine + azidothymidine, AZT, ZDV	1987
	Abacavir + zidovudine + lamivudine	2000
	tenofovir disoproxil fumarate + emtricitabine	2004
	enterik kaplı didanosine, ddI EC	2000
	didanosine + dideoxyinosine, ddI	1991
	tenofovir disoproxil fumarate, TDF	2001
	stavudine, d4T	1994
	abacavir sulfate, ABC	1998
	NON-NÜKLEOZİD REVERS TRANSKRİPTAZ İNHİBİTÖRLERİ (NNRTIs)	rilpivirine
etravirine		2008
PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ (PIs)	delavirdine, DLV	1997
	efavirenz, EFV	1998
	nevirapine, NVP	1996
	nevirapine, NVP	2011
	amprenavir, APV (Üretilmiyor)	1999
	tipranavir, TPV	2005
FÜZYON İNHİBİTÖRLERİ	indinavir, IDV,	1996
	saquinavir (Üretilmiyor)	1997
	saquinavir mesylate, SQV	1995
	lopinavir + ritonavir, LPV/RTV	2000
	Fosamprenavir Calcium, FOS-APV	2003
	ritonavir, RTV	1996
	darunavir	2006
	atazanavir sulfate, ATV	2003
	nelfinavir mesylate, NFV	1997
	enfuvirtide, T-20	2003
GİRİŞ/KO-RESEPTÖR İNHİBİTÖRLERİ	maraviroc	2007
	raltegravir	2007
İNTEGRAZ İNHİBİTÖRLERİ	dolutegravir	2013

2.2.1. NÜKLEOZİD/NÜKLEOTİD REVERS TRANSKRİPTAZ İNHİBİTÖRLERİ (NRTİ/NtRTİ)

NRTİ'ler, FDA tarafından onaylanan ilk ilaç sınıfıdır. Hastalara ön ilaç (prodrug) olarak verilen NRTİ'ler, konak hücreye girdikten sonra hücresel kinazlar tarafından fosforillenerek aktif formuna dönüştürülür. NRTİ'lerin antiviral aktivite gösterebilmesi için hücre içinde aktif formuna dönüştürülmesi gereklidir. Bu dönüşüm sırasında 2',3'-dideoksinükleozid (ddN) analoglarına sahip olan NRTİ'ler, hücresel kinazlar aracılığıyla sırasıyla 5'-monofosfat (ddNMP), 5'-difosfat (ddNDP) ve 5'-trifosfatlarına (ddNTP) dönüştürülürler. NRTİ'lerin şeker grubunda (2'-deoksiribozil) 3' hidroksil grubunun olmaması 3'-5' fosfodiester bağı oluşumunu engelleyerek viral DNA zincirinin uzamasını durdurur. Böylece RNA'dan DNA veya DNA'dan DNA sentezi sırasında proviral DNA'nın negatif veya pozitif zincirinin uzaması inhibe edilebilir (120). Bütün antiretroviral ilaç tedavilerinde olduğu gibi NRTİ'lerin kullanımı sonucunda ilaca direnç gösteren HIV-1 suşları ortaya çıkmaktadır. NRTİ'lere direnç iki mekanizmayla gerçekleşir. Birinci mekanizma ATP-bağımlı pirofosforolizdir. Gelişen zincirin 3' ucuna eklenen NRTİ'ler ATP'nin pirofosfat donörü olarak kullanıldığı bu mekanizmayla uzaklaştırılır. Böylece zincir uzaması inhibisyonu tersine döndürülmüş olur (121). RT'de gelişen NRTİ mutasyonları, Nükleozid/Nükleotid Analogu Mutasyonları (NAM) veya pirofosforolizi indükleyerek timidin analogu NRTİ'lerin (AZT ve d4T) uzayan zincirden eksizyonuna neden olan Timidin Analog Mutasyonları (TAM) olarak sınıflandırılır. HIV-1 RT'de ki TAM aminoasit değişimleri TAM1 yolağı ve TAM2 yolağı üzerinden gerçekleştirilir (122). Direnç gelişiminin ikinci mekanizması NRTİ'lerin uzayan zincire bağlanmasını engellemektir. Bu mekanizmayla ilgili mutasyonlar M184V ve K65R dir. M184V mutasyonu lamivudin veya emtrisitabin tedavilerinde gelişir (123). K65R ise tenofovir, dideoksisitidin, didanozin, stavudin, ve abakavir sülfat tedavilerinde gelişir (124).

2.2.2. NON-NÜKLEOZİD REVERS TRANSKRİPTAZ İNHİBİTÖRLERİ (NNRTİ)

NNRTİ'ler HIV-1 RT'yi enzimin p66 altbiriminin avuç içi bölgesinde yer alan katalitik bölgeye yaklaşık 10 Å uzaklıkta bulunan "hidrofobik cep" bölgesine bağlanarak inhibe eder. NNRTİ'nin hidrofobik cebe bağlanması RT'nin substrat bağlanma bölgesinde uzaysal konformasyonel değişime neden olur ve polimeraz aktivitenin azalmasını sağlar (125). Hidrofobik rezidüleri, p66 altbiriminde yer alan hidrofobik rezidüleri ve p51 altbiriminde yer alan I135 ve E138 rezidülerini içeren NNRTİ bağlayıcı hidrofobik cep sadece NNRTİ'lerin varlığında ortaya çıkar (126). HIV-1'in spesifik inhibitörü olan NNRTİ'ler NRTİ'lerden farklı olarak non-kompetitif inhibisyon gerçekleştirirler ve SIV, HIV-2 gibi diğer lentivirüslerin RT enzimlerini inhibe edemezler. NNRTİ direnci genellikle NNRTİ bağlayıcı hidrofobik cep bölgesinde yer alan rezidülerin substitüsyonları sonucunda meydana gelir. En sık görülen NNRTİ mutasyonları K103N ve Y181C'dir. NNRTİ mutasyonlarının birçoğu özellikle ikincil mutasyonlarla birlikte farklı NNRTİ'lere belirli düzeylerde çapraz direnç gelişimine sebep olurlar. Diğer ARV ilaç sınıflarına direnç gelişimi sonucu viral replikasyon kapasitesinde anlamlı azalma meydana gelirken, yüksek seviyede direnç geliştiren NNRTİ'ler viral replikasyon kapasitesinde çok az düşüşe neden olur. NNRTİ'lerin düşük genetik bariyere sahip olması, viral fitness üzerinde minimum etki göstermesi ve ilacın yokluğunda NNRTİ mutasyonlarının ortadan kalkmasının uzun zaman alması, NNRTİ dirençli HIV-1 suşlarının stabilitesine ve popülasyon içerisinde yayılmasına katkıda bulunur (127).

2.2.3. PROTEAZ İNHİBİTÖRLERİ (PI)

Proteaz inhibitörleri enzimin aktif bölgesine bağlanarak gag ve gag-pol poliproteinlerinin kesilmesine engel olur ve böylece olgun virionların oluşması engellenir. Revers transkriptaz inhibitörlerinden farklı olarak, proteaz inhibitörleri kronik olarak enfekte olmuş hücrelerden enfeksiyöz virüslerin oluşmasını engelleyebilir (128). Proteaz enziminin viral yaşam döngüsünde hayati role sahip olması ve göreceli olarak küçük boyuta (99 kDA) sahip olması enzime karşı direnç gelişiminin fazla olmayacağını akla getirmektedir. Ancak proteaz geni 99 kodon içerisinden 49 kodonda gözlemlenen polimorfizmler ve 20'den fazla aminoasit substitüsyonu nedeniyle ileri derecede plastisiteye sahiptir (129). Proteaz enziminin daha çok aktif bölgesinde ve ilaçların bağlanma bölgelerinde meydana gelen nükleotid değişimleri sonucu PI'lerine

direnç gelişimi gerçekleşir. Bu grup ilaçlara karşı oluşan primer mutasyonlar virüsün ilaca duyarlılığını yaklaşık beş kat azaltır. Ancak daha sonra meydana gelen sekonder mutasyonlara bağlı olarak yüksek seviyede direnç gelişimi meydana gelmektedir. Primer mutasyonlardan farklı olarak sekonder mutasyonlar tüm proteaz inhibitörlerine karşı çapraz direnç gelişimine sebep olmaktadır. Bu sebeple bir PI'ne karşı direnç gelişen hastalarda diğer PI'leri de etkisiz hale gelebilir (130).

2.2.4. İNTEGRAZ İNHİBİTÖRLERİ (İNİ)

HIV integraz enzimi esasen viral DNA'nın her iki 3' ucundan iki nükleotidin uzaklaştırıldığı "3'-işlemi" ve viral genom uçlarının konak hücre DNA'sına transesterifikasyon reaksiyonları aracılığıyla entegre edildiği "zincir transferi" olmak üzere iki önemli katalitik fonksiyona sahiptir. Bütün integraz inhibitörleri zincir transferi reaksiyonunu hedefler. İNİ'lerin zincir transferini selektif olarak bloke etmesi, integraz ile viral DNA arasında meydana gelen integraz-HIV DNA kompleksine bağlanarak ve integrazın aktif bölgesinde yer alan magnezyum iyonu kofaktörü ile etkileşerek gerçekleşir. Bütün İNİ'ler aktif bölgedeki magnezyumu uzaklaştıran metal bağlayıcı farmakofor ve viral DNA-integraz kompleksine bağlanan hidrofobik grup olmak üzere iki önemli komponentten meydana gelir (131). İNİ'lere direnç geliştiren mutasyonlar daima magnezyum kofaktörlerinin koordinasyonunu sağlayan integraz'ın aktif bölgesindeki amino asit rezidülerinde meydana gelir. Ayrıca tespit edilen primer veya sekonder mutasyonların İNİ'lere karşı çapraz direnç gelişimine neden olması son derece yaygındır (132).

2.2.5. KO-RESEPTÖR ANTAGONİSTLERİ (KRİ)

Ko-reseptör inhibitörleri (KRİ), makrofajlara tropizm gösteren M-tropik (r5 tropik) ve T-lenfositlerine tropizm gösteren T-tropik (x4 tropik) HIV suşlarının hedef hücrelere girmek için kullandığı sırasıyla CCR5 veya CXCR4 olarak bilinen ko-reseptörler ile etkileşir. Günümüzde klinikte kullanılan tek ko-reseptör inhibitörü (maravirok) bir CCR5 antagonistidir. CCR5'in küçük moleküllü antagonistleri CCR5 reseptörünün transmembranal helikslerinde bulunan hidrofobik cebe bağlanır. Bunun sonucunda CCR5 konformasyonu değişir ve viral glikoprotein gp120 ile etkileşemez. Böylece gp41 ile dış hücre membranının füzyonu engellenmiş olur. CCR5 antagonistleri ile ilgili majör problem, sadece R5 HIV suşlarına karşı aktivite göstermeleri ve X4/R5 HIV suşlarının bir arada bulunduğu popülasyonlarda X4 soylarının seleksiyonunu stimüle

etmeleridir (133). Optimum etki için, bir CCR5 antagonistin hem X4 hem de R5 HIV suşlarını bloke edecek şekilde bir CXCR4 antagonisti ile kombine edilebilmesi gereklidir. CCR5, konak hücre proteini olduğu için diğer antiretroviral ilaçlardan farklı olarak CCR5 inhibitörü kullanımıyla CCR5 proteini mutasyona uğramamaktadır. Ancak CCR5 inhibitörlerine karşı viral adaptasyon gelişmesi sonucu viral zarf proteininde bazı mutasyonlar meydana gelir. Bu mutasyonlar virüse, CCR5 proteinine bağımlı hücre girişi yolağında inhibitöre bağlanmış CCR5 reseptörünü kullanabilme yeteneğini kazandırır. En önemli direnç mekanizması gp120 glikoproteinindeki mutasyonlardır. Bu mutasyonlar sonucunda gp120, CCR5 reseptörü-ilaç kompleksine bağlanarak virüsün hücre içine taşınmasına aracılık eder (134).

2.2.6. FÜZYON İNHİBİTÖRLERİ (Fİ)

HIV-1 zarf proteini Gp41'in füzyojenik N terminal bölgesi viral zarf ile hücre membranının füzyonunu sağlar. Bu şekilde virionun iç bölgesinde yer alan viral RNA ve enzimler enfekte edilen hücrenin sitoplazmasına taşınmış olur (70).

Son zamanlarda bu füzyonu engellemek için yapılan çalışmalar sonucu bir füzyon inhibitörü (Fİ) (Enfuvirtit) geliştirilmiştir. Bu inhibitör 36 amino asitten meydana gelen sentetik oligopeptiddir ve viral glikoprotein gp41'in trimerik yedili tekrar eden bölgesi HR-1'e (Heptad Repeat-1) bağlanarak, HR-1 ve HR-2 birleşmesini engeller. Sonuçta HR-1'in HR-2 ile etkileşmesi sonucu meydana gelen ve gp41'in füzyonu başlatabilmesi için gerekli olan saç tokası yapısı oluşturulamaz. Bu şekilde HIV viral zarf ile konak hücre membranının füzyonu bloke edilmiş olur (135). Gp41'in HR1 bölgesinde meydana gelen mutasyonlar sonucu 36-38 ve 39-45. pozisyonlarında korunmuş olan amino asit üçlülerindeki değişiklikler enfuvirtidin bağlanmasını engeller (136).

2.3. ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER

İlk olarak 1978 yılında Stephenson ve Zamecnik tarafından Rous sarcoma virüsünün viral RNA sekansına komplementer kimyasal olarak modifiye edilmiş bir sentetik oligonükleotid kullanılarak viral replikasyonun inhibe edildiği rapor edilmiştir. Daha sonra bu mekanizma 'antisens' olarak adlandırılmıştır (137).

Antisens oligonükleotidler (ASO) yaklaşık 15-25 nükleotid uzunluğunda hedeflenen mRNA'ya komplementer dizilime sahip tek zincirli DNA ya da RNA yapısındaki moleküllerdir. Bu moleküller genetik bilginin DNA'dan mRNA aracılığıyla ribozomlarda proteine transferini bloke edebilirler. ASO'ler yüksek molekül ağırlığına sahiptir ve taşıdıkları fosfat grupları nedeniyle negatif yüklüdür (138).

Antisens kavramının ortaya çıktığı yıllarda temel konsept hedeflenen belirli bir RNA sekansına komplementer olarak dizayn edilen oligonükleotidin hedef RNA'ya bağlanmasıydı. Ancak oligonükleotidin hedef RNA'ya bağlanmasından sonra gerçekleşen ve genetik mesajın susturulmasında önemli role sahip olan post-hibridizasyon mekanizmaları bilinmiyordu. Antisens konsepti ile ilgili ilk çalışmalardan günümüze kadar efektif ilaç niteliklerine sahip ASO dizaynı ve hibridizasyondan sonra gerçekleşen olayların aydınlatılması ile ilgili olarak büyük oranda gelişim sağlandı. Günümüzde hedef RNA metabolizmasının baskılanması, tamamen inaktif duruma getirilmesi veya metabolik yolağının değiştirilmesini sağlayan post-hibridizasyon mekanizmaları kullanılmaktadır. (138).

Antisens konsepti, belirli bir gene selektif ilaçların geliştirilebilmesini ve Watson-Crick hibritleşme kuralları çerçevesinde rasyonel ilaç dizaynını mümkün kılar. Genomiks, epigenomiks ve RNA biyolojisindeki gelişmeler geleneksel ilaçların geliştirilmesinde yürütülen proseslerin verimsizliği ile birleşince daha rasyonel ve verimli şekilde ilaç geliştirilmesine olanak sağlayan antisens teknolojisine ilginin artmasına neden olmuştur (139).

Antisens teknolojisinin gelişimi farmakolojide yeni bir alanının doğmasını sağlamıştır. ASO'ler konvansiyonel ilaçların bağlandığı reseptörler yerine hedef RNA veya DNA'daki spesifik nükleotid sekanslarına bağlanır. Bu nedenle antisens teknolojisinin geliştirilmesinde oligonükleotidlerin yapı ve fonksiyonları ile mediyatör RNA metabolizmasının farmakolojik perspektiften anlaşılması anahtar rol oynamıştır (139).

ASO'ler, gen fonksiyonlarını belirleme ve hedef validasyonu açısından diğer teknolojilere kıyasla sekans bilgisinin direkt olarak kullanılabilirliği, geniş alanlarda uygulanabilirlik, hızlı ve düşük maliyetli üretim yapılabilmesi, başarı oranlarının ve spesifitelerinin yüksek olması gibi üstün özelliklere sahiptir (140).

ASO'lerin hücre kültürlerinde ve hayvan modellerinde başarılı oldukları kanıtlandıktan sonra terapötik amaçlar için de kullanılma olasılıkları ortaya çıkmıştır. Duchenne kas distrofisi, prostat kanseri, mesane kanseri, akciğer kanseri, progresif kornea vaskülerizasyonu, anaplastik astrositoma ve glioblastoma tümörleri, multiple sklerozis, hipertrigliseridemi, romatoid artrit, deri skarları ve ülseratif kolit gibi hastalıklara karşı geliştirilen bazı antisens ilaçlar faz II ve faz III aşamalarında. Bu antisens ilaçlar Tablo 2.2'de gösterilmiştir. Günümüze kadar FDA'in onayladığı iki ASO preparatından ilki HIV bağlantılı CMV (sitomegalovirüs) retinitis tedavisinde kullanılan Fomivirsen (Vitravene[®], ISIS Pharmaceuticals)'dir (141). Fomivirsen, insan CMV DNA'sının spesifik sekansına komplementer 21 bazlık bir fosforotiyoat ASO'dur. Fomivirsen klinik CMV izolatlarına ve gansiklovire dirençli CMV türlerine karşı in vitro olarak aktif bulunmuştur. Ayrıca AIDS'li hastalarda CMV retinitisin tedavisinde intravitreal olarak kullanımı mümkündür. Fomivirsen'in 1998'de FDA onayı almasıyla birlikte ASO'ler üzerindeki araştırma yoğunluğu artmıştır. FDA'in 2013 yılında onayladığı diğer antisens preparatı, homozigot ailesel hiperkolesterolemi'nin tedavisinde kullanılmak üzere geliştirilen mipomersen (Kynamro[®], ISIS Pharm.)'dir. Nükleazlara dirençli fosforotiyoat yapısında 20 bazlık bir ASO olan mipomersen, karaciğerde apolipoprotein B sentezini inhibe eder. Bu etkisini apolipoprotein B'yi kodlayan mRNA'yı hedefleyerek gösterir (142).

Tablo 2.2. FDA tarafından onaylanan ve faz II, faz III aşamaları devam eden bazı antisens ilaçlar (143).

İLAC	FİRMA	HASTALIK	STATÜSÜ
Vitravene	Isis Pharm.	CMV retinitis	ONAYLI
Mipomersen	Isis Pharm.	Homozigot ailevi hiperkolesterolemi	ONAYLI
Drisapersen	GlaxoSmithKline	Duchenne kas distrofisi	Faz 3
Custirsen	OncoGenex	Prostat kanseri ve akciğer kanseri	Faz 3
Aganirsen	Gene Signal	Progresif korneal neovaskülerizasyon	Faz 3
Trabedersen	Antisense Pharma	Anaplastik astrositoma ve glioblastoma	Faz 3
Eteplirsen	Sarepta Therapeutics	Duchenne kas distrofisi	Faz 2
ATL1 102	Isis	Multiple sklerozis	Faz 2
ISIS-APOCIII	Isis	Hipertrigliseridemi	Faz 2
ISIS-CRP	Isis	Romatoid artrit	Faz 2
ISIS-FXI	Isis	Pıhtılaşma hastalıkları	Faz 2
ISIS-EIF4E	Isis	Akciğer ve prostat kanseri	Faz 2
EXC 001	Pfizer	Fibrotik cilt skarları	Faz 2
iCo-007	iCo Therapeutics	Maküler ödem	Faz 2
Alicaforsen	Atlantic Pharm.	Ülseratif kolit	Faz 2
OGX-427	Oncogenex	Mesane ve prostat kanseri	Faz 2

2.3.1. Antisens Oligonükleotidlerin Kimyasal Yapısı ve Özellikleri

Modifiye olmamış oligonükleotidlerin yapısında riboz halkasına bağlı adenin, guanin, sitozin ve timin bazları ve riboz halkalarını birbirine bağlayan 3'-5' fosfodiester bağları bulunmaktadır. Bu oligonükleotidler ekstraselüler sıvılarda ve intraselüler kompartımanlarda doğal olarak bulunan bazı ekzonükleazlar ve endonükleazlara karşı direnç gösteremediklerinden kısa sürede degrade olurlar. Yaklaşık serum yarılanma ömürleri 15 dakikadır ve oligodeoksiribonükleotidler oligoribonükleotidlerden daha stabildir. Taşıdıkları elektriksel yük nedeniyle hücre membranına penetre olmaları zordur. Ayrıca oligodeoksiribonükleotidlerin nükleazlar tarafından parçalanması sonucu meydana gelen deoksiribonükleozid-5'-fosfat (dNMP)'ın bazı hücre türlerinde sitotoksik aktivite gösterdiği ve antiproliferatif etkilere sahip olduğu bildirilmiştir (144). ASO'lerin nükleazlara karşı direncini arttırmak, hedef dokulardaki yarılanma ömrünü uzatmak, hedef sekansa affinitesini arttırmak ve sekansa bağlı olmayan toksisitesini azaltmak amacıyla çeşitli kimyasal modifikasyonlar geliştirilmiştir.

ASO'lerin diziliminin uzun olması, daha fazla baz eşleşmesiyle daha stabil hibrid oluşmasını sağlayabilir ancak bu durumda sentez maliyeti artar. Ayrıca uzun ASO'lerin hedef olmayan RNA ile eşleşme potansiyeli bulunduğundan özgünlük azalır. Kısa dizayn edilen ASO'lerin modifikasyonlara rağmen intrasellüler ve ekstrasellüler yarılanma ömrü çok kısadır. Bu nedenle ASO'lerin optimum olarak 15-25 baz uzunluğunda olması istenir (145).

Efektif ASO'lerin dizayn edilebilmesi için hedef mRNA'nın sekonder yapısının doğru bir şekilde tespit edilmesi gereklidir. Bunun için sekonder yapıyı belirleyen katlanma paternlerinin, hedef mRNA molekülünün minimum total serbest enerjiye (ΔG) sahip olacak şekilde belirlenmesine yardımcı çeşitli bilgisayar algoritmaları bulunmaktadır. Bu algoritmalar kullanılarak potansiyel bir hedef ASO bölgesi seçilebilir. Hedef bölge seçilirken lokal olarak mRNA'da bulunan sekonder ve tersiyer yapılar incelenerek hibridizasyon için erişilebilir bölgeler belirlenmelidir. Bu bölgeler genellikle terminal uçlar, internal loop yapıları, en az on nükleotitten oluşan saç tokası ve çıkıntı (bulge) yapılarıdır. ASO'lerin stabil olmayan ve değişken lokal motiflere hedeflenmesi sekansa spesifik olmayan etkilere yol açtığından yüksek oranda konservatif lokal motiflerin tespit edilerek hedeflenmesi tercih edilmelidir (146).

Yapılan çalışmalarda CCAC, ACTC, TCCC, CTCT ve GCCA motiflerinin dizayn edilecek molekülde yer almasının antisens aktivitesini arttırdığı GGGG, ACTG, AAA ve TAA motiflerinin ise aktiviteyi azalttığı bildirilmiştir. Bu nedenle dizayn aşamasında ASO molekülüne eklenecek ve molekülden çıkarılacak motiflerin tespit edilmesi başarılı bir mRNA knock down'ı için gereklidir (147).

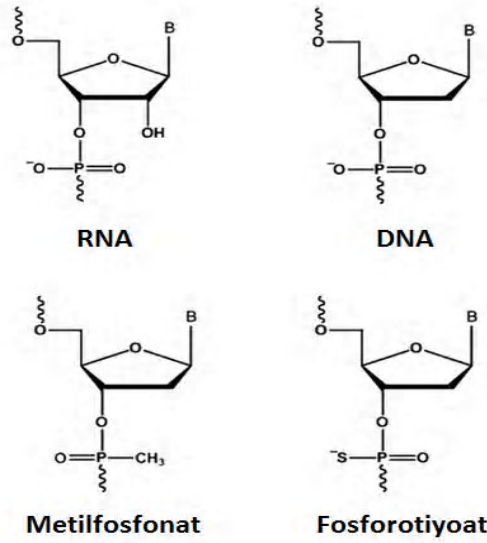
ASO'lerin G (guanin) veya C (sitozin) içeriği ile orantılı olarak ASO-mRNA dubleksinin termodinamik stabilitesinin ve RNase H aktivitesinin arttığı bildirilmiştir. Bu sebeple dizayn edilecek molekülün yüksek oranda G ya da C rezidülerini içermesi ASO aktivitesine katkıda bulunur (147).

Sentezlenecek ASO'lerin hedef mRNA'ya affinitesini tahmin edebilmek için termodinamik enerjinin dikkate alınması gereklidir. ASO'lerin hedef mRNA ile hibritleşmesi için gerekli termodinamik enerji $\Delta G_{37}^{\circ} \geq -8$ kcal/mol olduğunda yüksek oranda aktif ASO'ler dizayn edilebilmiştir. Bazı bilgisayar algoritmaları ve veri tabanları kullanılarak ASO'lerin termodinamik bağlanma enerjisi hesaplanabilir (147).

Geliştirilen bilgisayar algoritmaları ve veri tabanları efektif ASO dizaynına katkıda bulursa da ASO'ler ile ilgili kesin sonuçlara ulaşmamızı sağlayamaz. Bu nedenle dizayn edilen ASO'ler ile ilgili doğru verilerin elde edilebilmesi için her dizayn edilen ASO'nin deneysel olarak denenmesi ve gerekli ölçümlerinin yapılarak değerlendirilmesi gereklidir.

2.3.1.1. Birinci Jenerasyon Antisens Oligonükleotidler

Bu grup ASO'ler nükleotid bazlarının kovalen bağlarla bağlandığı ve nükleotidleri birbirine bağlayan fosfodiester omurganın, nükleaz saldırısına daha dirençli olması için dizayn edilmiştir. Bu modifikasyon ASO'lerin fosfat grubundaki köprü olmayan bir oksijenin sülfürle ya da metil grubu ile değiştirilmesi sonucu meydana getirilir. Metil grubunun yapıya dahil edilmesi ile ilk kimyasal olarak modifiye edilmiş oligonükleotid olarak bilinen metilfosfonatlar sentezlenmiştir. Şekil 2.11'de gösterilen metilfosfonatlar, birçok biyolojik sistemde iyi bir stabilite göstermiştir. Ancak non-iyonik yapıları nedeniyle çözünürlükleri azdır. Ayrıca non-iyonik yapı bu grup ASO'lerin, adsorptif endositoz aracılı hücre içine geçişini zorlaştırır. Bu yapıdaki ASO'lerin hibritleşme kabiliyeti düşüktür ve RNase H'yı aktive edemezler. Bu nedenlerle metilfosfonat iskelete sahip ASO'lerin kullanımı önemli ölçüde kısıtlanmaktadır (148).



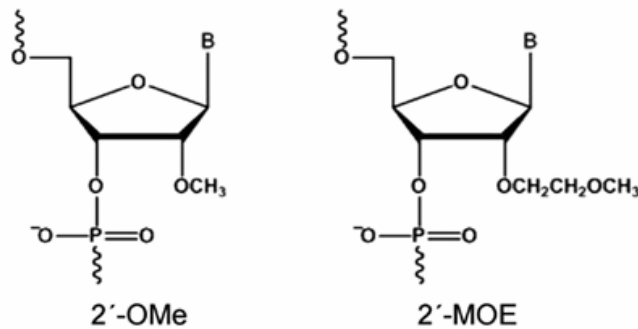
Şekil 2.11. Modifiye olmamış RNA ve DNA nükleotidleri ile modifiye olmuş birinci jenerasyon ASO'lerin kimyasal yapısı (149).

Fosforotiyoat ASO'ler, fosfodiester bağındaki köprü yapmayan oksijenlerden birinin sülfür atomu ile substitüsyonu sonucu geliştirilmiştir. Bu modifikasyonu içeren oligonükleotidler birinci jenerasyon oligonükleotidlerin önemli üyesi olmakla birlikte en yaygın kullanılan türevi olarak da bilinmektedir ve diğer oligonükleotidlere kıyasla daha kolay sentezlenebilirler. Fosforotiyoat yapı öncelikli olarak nükleaz degradasyonuna karşı dayanıklılığı artırır. Ancak substitüsyon sonucu fosfat grubu kiralite özelliği gösterdiğinden sadece Sp fosforotiyoat diastereomeri nükleazlara dirençlidir. Nükleazlara direncin artmasına bağlı olarak plazma yarı ömrü yaklaşık 9-10 saate çıkarılmıştır (150). Rp diastereomeri ise tıpkı fosfodiester iskelet gibi nükleazlara dirençsizdir. Fosforotiyoat türevler nükleazlara karşı sağladıkları dayanıklılığa ek olarak düzenli Watson-Crick baz çifti oluşumu sağlamakta ve daha iyi farmakokinetik özellikler göstermektedirler. Sp omurga doğal fosfodiester yapıya kıyasla oligonükleotid-mRNA kompleksinin erime sıcaklığını (T_m) düşürür. Bu nedenle metilfosfonatlarda görülen heliks destabilizasyonu ile hibritleşme kabiliyetinde azalma fosforotiyoat modifikasyonlarında da tespit edilmiştir. Fosforotiyoat oligonükleotidlerin yüksek oranda çözünür olmaları ve RNase H aracılı hedef mRNA hidrolizini indükleyebilmeleri antisens aktivitenin artmasına katkıda bulunmaktadır (151). Fosforotiyoat oligonükleotidlerin en önemli dezavantajı ise uzunluklarına bağlı olarak çeşitli hücrel proteinlere yüksek affinite göstermeleridir. Fosforotiyoatlar, hücrel

proteinlerle sekanstan bağımsız olarak etkileşir ve özellikle asidik fibroblast büyüme faktörü, bazik fibroblast büyüme faktörü, platelet kökenli büyüme faktörü ve vasküler endotelial büyüme faktörü gibi polianyonik özelliğe sahip heparin bağlayıcı büyüme faktörlerine bağlanırlar (23).

2.3.1.2. İkinci Jenerasyon Antisens Oligonükleotidler

İkinci jenerasyon oligonükleotidler fosforotiyoatların sekansa spesifik olmayan sitotoksik etkilerini gidermek üzere geliştirilmiştir. Oligonükleotid modifikasyonu riboz halkasının 2' pozisyonundaki hidrojenin O-alkil grubu ile substitüsyonu sonucu gerçekleşir. En önemli iki modifikasyon 2'-O-metil (OMe) ve 2'-O-metoksi-etil (MOE)'dir. Bu modifikasyonlar Şekil 2.12'de gösterilmiştir. 2'-O-alkil modifikasyonlarının en önemli eksikliği RNase H indüksiyonuna elverişli olmamalarıdır (152). Bu eksikliğin giderilmesi için merkez bölgede yaklaşık 10 fosforotiyoat nükleotidi bulunan ve merkez bölgenin 5' ve 3' uçlarında 2'-O-metil veya 2'-O-metoksi-etil nükleotidlerinden oluşan yaklaşık 5'er adet 'kanat nükleotidlerinin' yer aldığı kimerik bir ASO dizayn edilmiştir. Bu kimerik ASO, RNase H'nin fosforotiyoat nükleotidlerinin oluşturduğu merkezi boşluğa yerleşmesine olanak tanır. Böylece hedef mRNA'nın spesifik olarak degrade edilmesi için gerekli RNase H aktivasyonu gerçekleştirilmiş olur. Kanat nükleotidleri ise 2'-O-alkil modifikasyonları yardımıyla ASO'nin nükleazlar tarafından degrade edilmesini engeller (151).



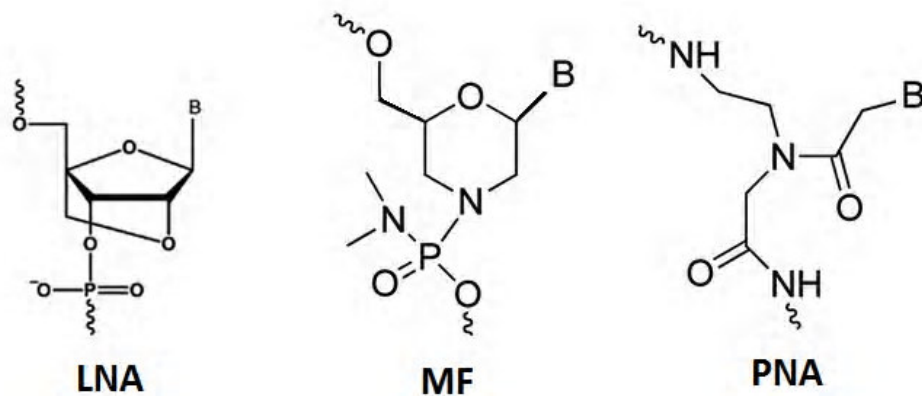
Şekil 2.12. 2'-O-metil ve 2'-O-metoksi-etil modifikasyonlu ikinci jenerasyon ASO'lerin kimyasal yapısı (149).

Bu grup ASO'ler etkisini sterik blokaj mekanizmasıyla gösterir. Bazı proteinlerin splaylanmamış mRNA'larında, 2'-O-metil oligonükleotidleri aracılığıyla ekspresyonu istenmeyen splay varyantları sterik olarak bloke edilerek eksprese edilmek istenen alternatif splay bölgelerinin indüksiyonu sağlanır. Bu durum β -talasemi ile ilgili bir çalışmada, in vitro ortamda mutant β -globin varyantı yerine yaban tip β -globin ekspresyonu indüklenerek gösterilmiştir (153).

Bu grup oligonükleotidlerin hedef mRNA ile hibritleşmesi, aynı sekansa sahip fosfodiester ve fosforotiyoat türevlerine göre daha yüksek affinite ile gerçekleşir ve hibritleşme sonucu meydana gelen ASO-mRNA heterodubleksleri yüksek T_m derecelerine sahiptir. Ayrıca bu modifikasyonlara sahip oligonükleotidler hücrel nükleazlara karşı dirençli olmalarının yanında fosforotiyoat modifikasyonlarına göre daha düşük toksisiteye sahiplerdir (151).

2.3.1.3. Üçüncü Jenerasyon Antisens Oligonükleotidler

Üçüncü jenerasyon ASO'ler oligonükleotidlerin çoğunlukla furanoz halkasının kimyasal olarak modifiye edilmesi sonucu geliştirilmiştir. Modifikasyonlar ASO'lerin nükleaz direncini, hedefe affinitelerini ve farmakokinetik özelliklerini iyileştirmek amacıyla dizayn edilmiştir. Şekil 2.13'de gösterilen Locked nükleik asit (LNA), Peptid nükleik asit (PNA) ve morfolino fosforoamitler (MF) en yaygın kullanılan üçüncü jenerasyon ASO'lerdir (151).



Şekil 2.13. Üçüncü jenerasyon LNA, MF ve PNA modifikasyonlarının kimyasal yapısı (154).

Bu grup ASO'ler nükleaz ve peptidaz degradasyonuna karşı dirençli olduklarından biyolojik sıvılarda yüksek stabiliteye sahiptirler. Ayrıca yüksek hibritleşme affiniteleri

ile stabil dubleksler meydana getirebilirler. Ayrıca PNA'ların çift zincirli DNA'ları tanıyabilmeleri, gen ekspresyonu modülasyonuna ve kromozomal DNA dubleksi ile etkileşerek hedeflenen bölgede DNA mutasyonunu indüklemeye imkan tanır (155). Üçüncü jenerasyon ASO'ler RNase H'yı aktive edemezler ve çoğunlukla biyolojik etkilerini translasyon basamağının durdurulmasına sebep olan sterik ribozomal blokaj ile gerçekleştirirler. Bu moleküller yüksüz olduklarından serum proteinlerine bağlanmazlar. Bu durum non-spesifik etkileşimleri azaltırken, diğer taraftan ASO'in vücuttan elimine edilmesini hızlandırır. Ayrıca elektrostatik olarak nötr omurgaya sahip olmaları çözünürlüklerini azaltır ve hücre içine alınmalarını zorlaştırır. Hücre içine alımı kolaylaştırmak için çeşitli taşıma sistemleri geliştirilmiştir (156).

Üçüncü jenerasyon ASO'lerin etkinliği çeşitli in-vitro ve in-vivo modellerde gösterilmiştir. PNA'lar, MF'ler ve LNA'lar'ın kullanıldığı bazı deneysel çalışmalarda ümit verici sonuçlar alınmıştır. Ayrıca LNA'ların etkinliği merkezi kısmında DNA nükleotidlerinin bulunduğu ve molekülün her iki ucunda LNA nükleotidlerinin yer aldığı kimerik yapıların dizayn edilmesi ile artırılabilir. Kimerik LNA oligonükleotidleri yüksek hibritleşme affinitesi ve yüksek nükleaz direncine ilave olarak RNase H'yı aktive etme yeteneğine de sahiptir (157).

2.3.2. Antisens Oligonükleotidlerin Etki Mekanizmaları

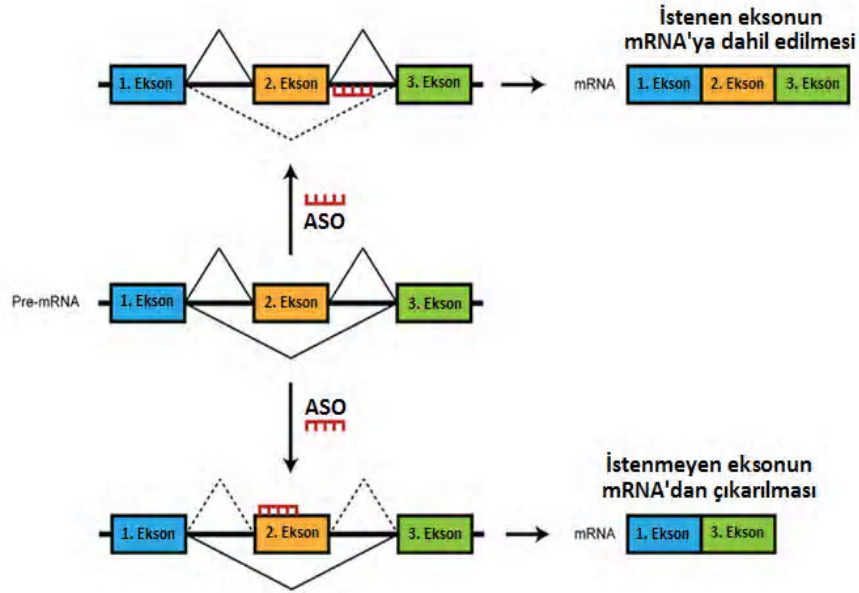
2.3.2.1. Sterik Blokaj Mekanizmaları

Klasik kompetitif antagonistler spesifik olarak bir reseptöre bağlandığında, natürel agonistlerin bu reseptöre bağlanmasını engelleyerek normal biyolojik proseslerin değiştirilmesine neden olur. Buna benzer olarak oligonükleotidlerin spesifik hedef mRNA sekansına bağlanması, hedef RNA'nın proteinler, diğer nükleik asitler veya RNA ara metabolizmasında görevli bazı faktörler ile etkileşmesini inhibe edebilir.

a) Uç Birleştirme (Splicing) Modülasyonu:

İntronların eksizyonu, birçok mRNA molekülünün metabolizması sırasında meydana gelen önemli proseslerden biridir. Uç birleştirme reaksiyonu olarak bilinen bu proses sekansa spesifiktir ve spliceosome'un katılımını gerektirir. Oligonükleotidlerin hedef mRNA'nın uç birleştirme sekanslarına bağlanması sonucu bu bölgelere uç birleştirme faktörlerinin bağlanması bloke edilir veya uç birleştirme prosesi için gerekli olan kesim reaksiyonları fiziksel olarak engellenmiş olur. Bu sterik engellemeler, olgun mRNA

üretiminin inhibisyonuna veya Şekil 2.14’de gösterildiği gibi pre-mRNA’da hedeflenen eksonun uç birleştirme işlemi sırasında atlanarak olgun mRNA diziliminden çıkarılmasına sebep olur (158).

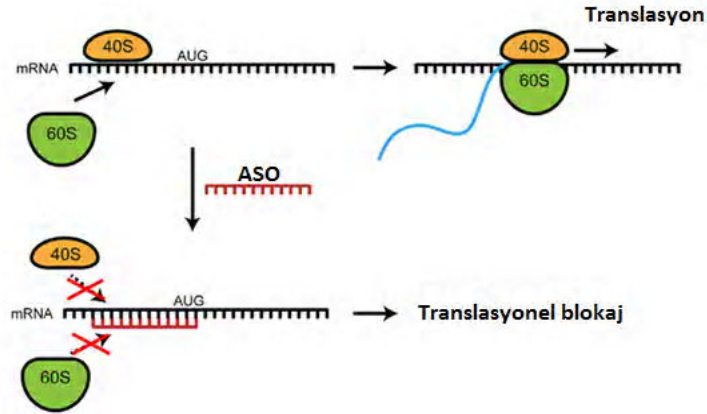


Şekil 2.14. Uç birleştirme modülasyonu (159).

Son zamanlarda uç birleştirme prosesini inhibe eden antisens ilaçların araştırılmasında önemli ilerlemeler kaydedilmiştir. Bu araştırmalarda alternatif uç birleştirme indüksiyonu için hedef mRNA'nın degradasyonunu indüklemeyen 2-metoksi, 2-MOE, PNA, MF ve LNA modifikasyonlarına sahip ASO'ler kullanılmıştır (160).

b) Translasyonel Blokaj:

Hedef mRNA translasyonunu bloke eden oligonükleotidler genellikle translasyonun düzenlenmesinde görevli 5' UTR (Untranslated Region) sekansına veya Şekil 2.15’de gösterildiği gibi translasyonun başlatılmasında görevli translasyon başlangıç kodonu sekansına veya mRNA'nın orta bölgesinde yer alan ve yapısından bağımsız olarak translasyonu başlatabilen IRE (Internal Ribosome Entry) sekansına bağlanacak şekilde dizayn edilmiştir. Bu sekanslar herhangi bir genetik kod içermez (161). Ayrıca kodlayan sekanslara bağlanan ASO'ler de sterik olarak translasyonel blokaja neden olabilir. Translasyonel blokaj çeşitli modifikasyonlara sahip ASO'ler aracılığıyla in vitro ve in vivo olarak indüklenebilir (162).



Şekil 2.15. ASO'lerin translasyon başlangıç kodonuna bağlanarak translasyonu bloke etmesi (159).

c) mRNA'nın Üç Boyutlu Yapısının Bozulması:

Molekül içi hibritleşmeler mRNA'nın çeşitli üç boyutlu yapılar içermesine sebep olur. Bunlardan en yaygın olanı saç tokası yapısıdır. Bu yapılar çeşitli biyolojik aktivitelerde kritik görevlere sahiptir ve RNA'nın stabilitesinin artmasını sağlarlar. Ayrıca bu yapılar RNA'nın ara metabolizmasında görevli bazı proteinler, nükleik asitler ve ribonükleoproteinler tarafından tanınmasını sağlayan motifler içerir. ASO'lerin bu üç boyutlu yapılara hedeflendirilmesi sonucu hedef mRNA'nın taşıdığı sinyal engellenebilir (163). Bu mekanizma yaygın olarak birçok hedefte kullanılabilme potansiyeline sahip olmasına rağmen şimdiye kadar yürütülen ASO araştırmalarında sınırlı olarak kullanılmıştır. HIV-1'in bütün varyantlarında bulunan TAR saç tokası yapısı hedeflenerek bir seri oligonükleotid dizayn edilmiştir. TAR saç tokası yapısı transaktivasyon için gereklidir ve dizayn edilen oligonükleotidler HIV TAR yapısına bağlanarak üç boyutlu saç tokası yapısının bozulmasına neden olur. Bunun sonucunda transaktivasyon inhibisyonu meydana gelir (164).

d) Şapka (Cap) Yapısının Bloke Edilmesi:

Pre-mRNA'nın işlenmesi sırasında 5' uca şapka yapısı ilave edilir. Bu yapı pre-mRNA'yı stabilize eder ve olgun mRNA stabilitesi için önemlidir. Ayrıca şapka yapısı nükleer matrikse bağlanabilir ve mRNA'nın nükleustan dışarıya transportunda görevlidir. Şapka yapısının özgün olması ve yapısal olarak aydınlatılmış olması ASO dizaynı için önemli olabilecek bir hedefi ortaya çıkarmaktadır. ASO kullanılarak SV40 (Simian Virüs 40) virüsü T-antijeni inhibisyonunun gerçekleştirildiği bir çalışmada en

yüksek inhibisyon oranlarını şapka bölgesinin yakınlarına bağlanan oligonükleotidlerin sağladığı gösterilmiştir (165). Ayrıca dizayn edilen bazı modifiye ASO'lerin 5' şapka bölgesinin kesimini indükleyebildiği rapor edilmiştir (165).

d) 3' Poliadenilasyon İnhibisyonu:

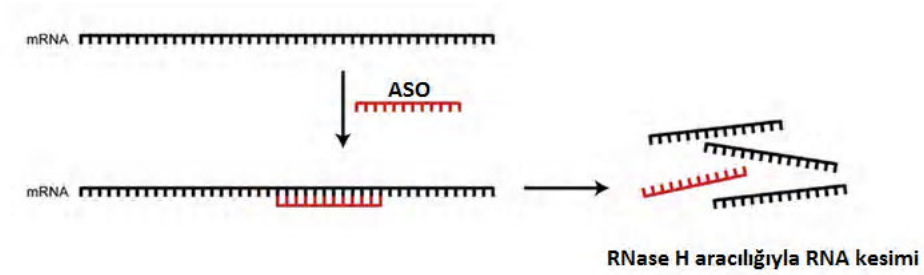
Pre-mRNA moleküllerinin 3' UTR bölgesinde post transkripsiyonel olarak yaklaşık 250 adenin rezidüsü içeren uzun poly-A (poliadenilat) kuyruğun eklenmesini indükleyen sekanslar bulunmaktadır. Poliadenilasyon, mRNA'yı eksonükleazların yıkımından koruyarak stabilize eder. Ayrıca transkripsiyonun sonlanmasında ve mRNA'nın çekirdekten dışarıya çıkarılmasında önemli role sahiptir. Teorik olarak pre-mRNA'nın 3' terminal bölgesinin ASO'ler ile etkileşimi poliadenilasyonu inhibe ederek RNA'nın destabilizasyonuna neden olabilir. 3' UTR bölgesindeki sekanslarla etkileşen ve antisens aktivitelere yol açan farklı oligonükleotidler tespit edilmiştir (166).

2.3.2.2. Sterik Blokaj'ın Aktive Ettiği Mekanizmalar:

RNA molekülleri kendi metabolizmalarını regüle etme yeteneğine sahiptir. RNA'nın bazı yapısal özellikleri RNA moleküllerinin stabilitesi, subsellüler dağılımı, transportu ve çeşitli hücrel olaylar üzerinde etki gösterebilir. RNA ara metabolizmasının aydınlatılması diğer regülatör özelliklerin ve mekanizmaların tespit edilmesini sağlar (161).

a) RNase H:

RNase H mekanizmasını aktive eden ASO'ler tek zincirli ve RNase H1'in substratı olarak karakterize olan DNA yapısındaki bir bölüme sahiptir. RNase H1 enzimi hem nükleus hem de sitozolde bulunduğundan bu mekanizmayı kullanan ASO'ler her iki hücrel kompartmanda da etki gösterebilir. Şimdiye kadar karakterize edilen ve aydınlatılan en güçlü ASO etki mekanizması, Şekil 2.16'da gösterilen RNase H aktivasyonu mekanizmasıdır. RNase H aracılı aktivite gösteren birinci ve kimerik yapıları ikinci jenerasyon ASO'ler ile ilgili yürütülen çalışmalar ve elde edilen deneysel veriler diğer etki mekanizmalarına sahip ASO'ler ile ilgili elde edilen deneysel verilerden çok daha fazladır (161). RNase H RNA-DNA dubleksindeki yalnızca RNA'yı 3'-O-P-bağından keser. Hidrolitik kesim sonucunda 3' hidroksil ve 5' fosfat gruplarıyla sonlanan ürünler meydana gelir.

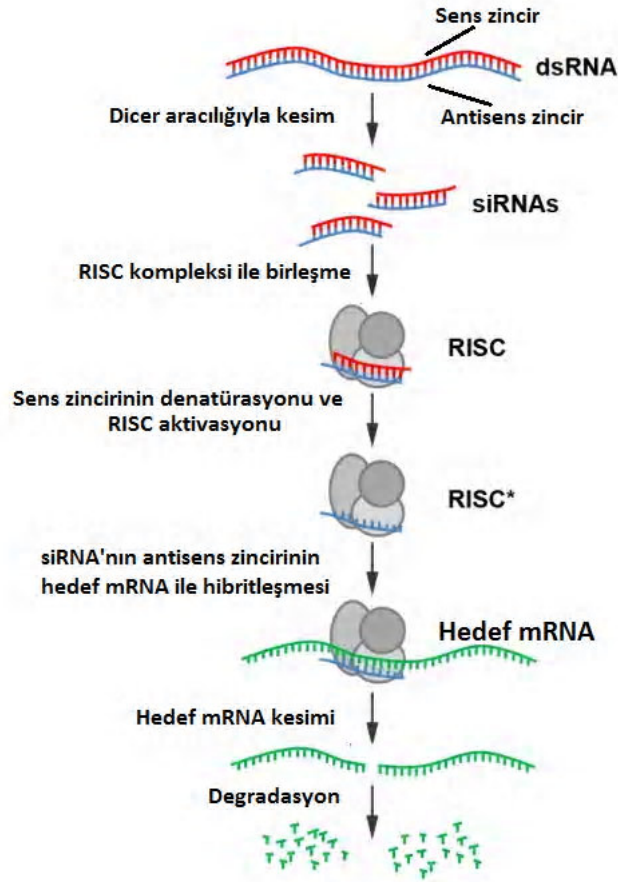


Şekil 2.16. RNase H'yi aktive eden ASO'lerin genetik mesajı susturması (159).

İnsan hücrelerinde iki tip RNase H enzimi klonlanmış ve eksprese edilmiştir. İnsanlarda bulunan RNase H1'in ve daha az ölçüde RNase H2'nin enzimolojik özellikleri karakterize edilmiştir (161). RNase H2 bir protein kompleksi içinde kromatine bağlı olarak bulunduğu için oligonükleotid-RNA dubleksine etkileşemez. Bu nedenle DNA yapısındaki ASO'lerin hücrelerdeki antisens etkileri kesin olarak RNase H1 aktivitesi ile ilişkilendirilmiştir. RNase H1 aktivitesini genel olarak hedef RNA'daki hibritleşme bölgesinin ASO'lere ulaşılabilirliği ve ASO-RNA dubleksinin RNase H1'e ulaşılabilirliği belirlemektedir (167).

b) siRNA:

Küçük interferans RNA (Small Interference RNA, siRNA) ilk kez 1999 yılında keşfedilmiştir. siRNA'ların öncüsü 70-80 bp'lik çift zincirli (ds) RNA'lardır. Şekil 2.17'de gösterilen siRNA yolağında öncelikle endonükleaz enzimlerinden RNAaz III ailesinin üyesi olan dicer enzimi, dsRNA'yı 3' uçlarında 2 nükleotidlik çıkıntı kalacak biçimde 20-25 bp'lik siRNA'lara dönüştürür. siRNA virüslerde bulunduğu için ekzojen kaynaklı RNA'lardır. Daha sonra dicer enzimi tarafından oluşturulan siRNA'lar RISC (RNA-induced silencing complex) kompleksi ile birleşir. Çift zincirli siRNA'ların sens zinciri RISC ile kompleks oluşturduktan sonra denatürasyona uğrar. RISC ile kompleks halinde bulunan tek iplikli antisens zincir hedef mRNA ile hibritleşir. Tam hibritleşme sonucu antisens zincire komplementer sekansa sahip mRNA molekülü, RISC kompleksinin katalitik komponenti olarak bilinen argoneut 2 (ago 2) proteininin endonükleaz aktivitesi aracılığıyla kesilir ve sitoplazmik p-body'ler (Processing Body) aracılığıyla degrade edilir. Hedef ile kısmen eşleşme yapan siRNA'lar hedefin degradasyonunu veya transkripsiyonel blokajını indükleyebilir. Her iki durumda da gen ifadesi susturulmuş olur (24,168).



Şekil 2.17. siRNA aracılığıyla hedef mRNA sinyalinin engellenmesi (169).

Memeli hücrelerinde siRNA yolağının aydınlatılması gen fonksiyonlarını belirleme, hedef validasyonu ve teröpatik amaçlar için kullanımını ortaya çıkarmış ve hücre biyolojisinde yeni bir çalışma alanının doğmasına sebep olmuştur. RISC mekanizması ve siRNA moleküllerinin etkileri birçok araştırmaya konu olmuştur. RNase H'yi aktive eden ASO'lerin ve siRNA antisens inhibitörlerinin ortak amacı hedeflenen mRNA'ya Watson Crick hibritleşmesi ile bağlanarak hedef degradasyonu için hücrel nükleazları indüklemektir. siRNA inhibitörlerinin sens zinciri, stabilite ve antisens zincirin RISC aktivasyonu bölgesine taşınması açısından önemlidir. RISC, sitoplazmada lokalize olduğundan terapötik siRNA ajanları sitoplazmada aktivite gösterir (170).

RISC mekanizmasının terapötik amaçla kullanımını sınırlayan bazı faktörler bulunmaktadır. siRNA'lara hücrel yanıt RNase H'yi indükleyen ASO'lere göre çok daha karmaşık ve değişkendir. RISC kompleksi birçok transkriptin regülasyonunda görevli doğal hücrel micro RNA'ların (miRNA) aktivitelerine de aracılık etmektedir.

RISC kompleksine bağlanan oligonükleotidler endojen miRNA'lar ile Ago 2'ye bağlanmak üzere yarışır. Bu nedenle antisens siRNA'ların kullanımı sonucunda meydana gelebilecek hücrel olayların tahmini zordur. Ayrıca siRNA'lar çift zincirli olduğundan tek zincirli ASO'lere göre iki kat fazla hidrofilik yüzeye ve moleküler ağırlığa sahiptir. Bu durum antisens siRNA'ların hücre içine taşınmasını zorlaştırır (171).

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. Çalışmada HIV-1 transaktivasyonunu inhibe edebilecek ASO'lerin araştırılması amacıyla jurkat hücre kültürü kullanıldı. Araştırılan ASO'ler, tat mRNA dizisinin translasyonunu bloke etmek amacıyla tat mRNA'nın farklı sekanslarıyla hibritleşecek şekilde ve hücresel nükleazlara karşı dirençli olmaları için yapısal olarak çeşitli modifikasyonlar içerecek şekilde dizayn edildi. ASO'ler BO&GA medikal aracılığıyla Syngen (USA) firmasından HPLC (Yüksek Performanslı Sıvı Kromatografisi) saflığında ve liyofilize formda temin edildi. HIV-1 LTR bölgesini, CAT'ı (Kloramfenikol Asetil Transferaz) kodlayan bölgeyi ve ampisiline direnç genini taşıyan pC15CAT ve tat, rev ve tetrasikline direnç genlerini taşıyan pCV1 plazmidleri aracılığıyla jurkat hücrelerinin transfeksiyonu sağlandı. Böylece HIV-1 transaktivasyon modeli oluşturuldu. Transfeksiyon dietilaminoetil-dekstran (DEAE-dextran) yöntemi ile gerçekleştirildi. Kullanılan jurkat hücreleri ve plazmidler "NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, USA" programından temin edildi. *Escherichia coli* DH1 (E. coli) bakterisine önceden ayrı ayrı transforme edilmiş bu plazmidler "Qiafilter Plasmid Mega Kit (Qiagen)" plazmid izolasyon kiti kullanılarak istenen miktarda izole edildi. Elde edilen plazmidlerin saflığı ve miktar tayini UV (Ultraviole) spektrofotometresi kullanılarak gerçekleştirildi. Saflaştırılan plazmidler restriksiyon endonükleazlarla kesildikten sonra plazmid kalitelerini belirlemek amacıyla agaroz jel elektroforezi kullanılarak DNA fragmanlarının büyüklükleri tespit edildi. Oluşturduğumuz HIV-1 transaktivasyon mekanizmasının verimli bir şekilde çalıştığından emin olmak için ASO'lerin inhibitör etkileri araştırılmadan önce her iki

plazmidin transfekte edildiği jurkat hücrelerinin CAT ekspresyonu, CAT ELISA (Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay) Kit (Roche) aracılığıyla spektrofotometrik olarak tespit edildi. Daha sonra ASO'lerin inhibitör etkilerini araştırmak amacıyla plazmid transfeksiyonu yapılmış jurkat hücre kültürüne inkübasyondan önce ASO'ler ilave edildi. Hücre kültürü belirli bir süre inkübe edildikten sonra ASO'lerin transaktivasyonu inhibe etme oranlarını belirlemek amacıyla hücrelere CAT ELISA Kit prosedürü uygulandı. ELISA prosedüründe her örnek için eşit miktarda protein kullanmak üzere örneklerin protein miktarları, Bradford (Coomassie Blue) yöntemi kullanılarak tayin edildi. Elde edilen ELISA verileri aracılığıyla örneklerin CAT ekspresyonları yüzdesel olarak belirlendi. HIV-1 transaktivasyon modelinin tat proteini aktivitesi CAT ekspresyonu ile doğru orantılı olduğundan ASO'lerin tat aktivitesi üzerine etkileri yüzdesel olarak belirlendi. Çalışmamızda kullandığımız cihazlardan bazıları; ELISA ölçüm cihazı (BioTek, Synergy HT), UV-VIS spektrofotometre (CHEBIOS), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), hassas terazi (OHAUS), pHmetre (WTW 320), su banyosu (Nüve ST402), CO₂'li inkübatör (Sanyo), laminar akımlı kabin (Nüve) ve otoklavdır (Nüve032). Ayrıca çalışmamız sırasında bazı organik ve inorganik kimyasallardan yararlandı. Bu kimyasallar ve hazırlanan çözeltiler optimum ortam sıcaklıklarında muhafaza edildi.

3.1. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmamızda HIV-1 replikasyonuna ve oluşturduğumuz transaktivasyon modeline uygunluğu nedeniyle interlökin-2 üreten Jurkat (Clone E6-1) hücreleri kullanıldı. Çalışma süresince hücreler düzenli olarak takip edildi. Haftada üç kez yıkanıp, besi yerleri değiştirilerek kültüre devam edildi. Hücreler +37°C'de CO₂'li inkübatörde ventilasyon özelliği olan delikli ve kapaklı hücre kültür kaplarında bulunduruldu. Yeterli büyüklük ve miktara ulaşmış hücrelerden bir kısmı krio yöntemi ile dondurulup -80°C'de stoklandı.

3.1.1. Besiyeri Hazırlanması

Hücre kültüründe kullanılacak besiyeri Tablo 3.1'de belirtilen bileşenlere ve konsantrasyonlara göre hazırlandı. Hazırlanan besiyeri olası bir kontaminasyonu önlemek için steril filtreden geçirildi ve +4°C'de saklandı.

Tablo 3.1. Besiyeri ve PBS tamponunun içeriği.

Besiyeri İçeriği	PBS Tamponu İçeriği (Ph:7,4)
RPMI-1640	136 mM NaCl
2mM L-glutamin	2mM KCl
%1 Penisilin/Streptomisin	8 mM Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O
%10 İnaktive Fetal Bovine Serum	1,5 mM KH ₂ PO

3.1.1.1. Fetal Bovine Serum İnaktivasyonu

Fetal Bovine Serum (FBS), yüksek oranda içerdiği embriyonik büyümeyi uyarıcı faktörler nedeniyle kültürdeki hücrelerin gelişimini ve bölünerek çoğalmalarını indükler. Ayrıca besiyerinin en önemli protein kaynağıdır. İnaktivasyon işlemi ile ısıya duyarlı komplement proteinlerin denatürasyonu sağlanır ve mikoplazma gibi 0.22 µm'lik steril filtreden geçebilen mikroorganizmalar tarafından oluşabilecek besiyeri kontaminasyon riski azaltılmış olur.

İNaktivasyon prosesi için -20°C'de muhafaza edilen FBS, 37°C'lik su banyosu içerisinde aralıklarla çalkalanılarak eritildi. Tamamen eridiğinden emin olunan solüsyon yaklaşık 15 dakika kadar 37°C'de bekletildi. Daha sonra su banyosu sıcaklığı +56°C'ye çıkarıldı. Yaklaşık 40 dakika boyunca her 10 dakikada bir karıştırılmak suretiyle solüsyon su banyosu içerisinde bekletildi. Bu şekilde inaktive ettiğimiz FBS tamamen soğumadan steril tüplere bölündü ve - 20°C'ta muhafaza edildi.

3.1.1.2. Fosfat Tamponu Hazırlanması

PBS tampon çözeltisi hücre kültürünün pasajlanması sırasında yıkama çözeltisi olarak kullanıldı ve Tablo 3.1.'de belirtilen bileşenlere göre hazırlandı. Hazırladığımız PBS çözeltisinin pH'ı 7,4'e ayarlandıktan sonra 120°C'da 20 dakika boyunca otoklavda sterilizasyon işlemi tamamlandı. Hazırladığımız steril PBS çözeltisi +4°C'da saklandı.

3.1.2. Jurkat Hücrelerinin Kültüre Alınması

Krio çözeltisi içinde -80°C'de küçük porsiyonlar halinde stokladığımız jurkat hücreleri +37°C'de çözüldü. Çözölmüş hücrelere hızlıca 5 ml steril PBS ilave edilip 500 g'de 5 dakika 20°C'de santrifüj edildi. Hücre pelleti üzerinde bulunan süpernatant atıldı. Böylece krio çözeltisinin içerdiği dimetilsülfoksit (DMSO) ve kimyasal kontaminantlar

uzaklaştırılmış oldu. Pellete 5 ml kadar steril ve gerekli bileşenlere sahip besiyeri eklendi ve yavaşça pipetlenerek homojenize edildi. Hücreler steril delikli hücre kültür kaplarına (flask) aktarılıp CO₂'li inkübatörde yeterli büyüklüğe ve sayıya ulaşana kadar periyodik olarak pasajlanarak muhafaza edildi.

3.1.3. Jurkat Hücrelerinin Pasajlanması

Hücre flaskı içerisinde bulunan hücre süspansiyonu 15 ml'lik steril santrifüj tüplerine aktarıldı. Hücreler 300 g'de +20 °C'de 5 dakika boyunca santrifüj edildi ve süpernatant kısmı atıldı. Pellete 5 ml penisilin/streptomisin içeren fosfat tamponu (Phosphate Buffer Saline, PBS) yavaşça ilave edilerek pelletin PBS içerisinde homojen olarak süspansiyon olması sağlandı. Aynı koşullarda tekrar santrifüj edildikten sonra süpernatant uzaklaştırıldı. Oluşan pellet önceden hazırladığımız besiyeri içinde çözülüp hücre flaskına aktarıldı ve CO₂'li inkübatörde muhafaza edildi. Hücre pasajlanması ölü hücre kalıntılarını ve bazı kontaminantları kültür ortamından uzaklaştırarak hücre canlılığının devam etmesini sağlar. Bu nedenle çalışma süresince kültürdeki hücreler haftada en az üç kere pasajlanmıştır.

3.1.4. Jurkat Hücrelerini Dondurma ve Saklama

Hücreler pasajlanma işlemindeki gibi PBS ile yıkandı ve son olarak santrifüjlendi. Oluşan pellet krio çözeltisi ile çözüldü. Bu çözelti steril ependorf tüplerine eşit miktarlarda bölündükten sonra kademeli olarak donduruldu. Dondurma işlemi sırasında çözelti öncelikle yarım saat +4 °C'de ve 3 saat -20 °C'de bekletildikten sonra -80 °C'ye kaldırıldı. Bu sayede hücrelerin uzun süre saklanabilmesi sağlandı.

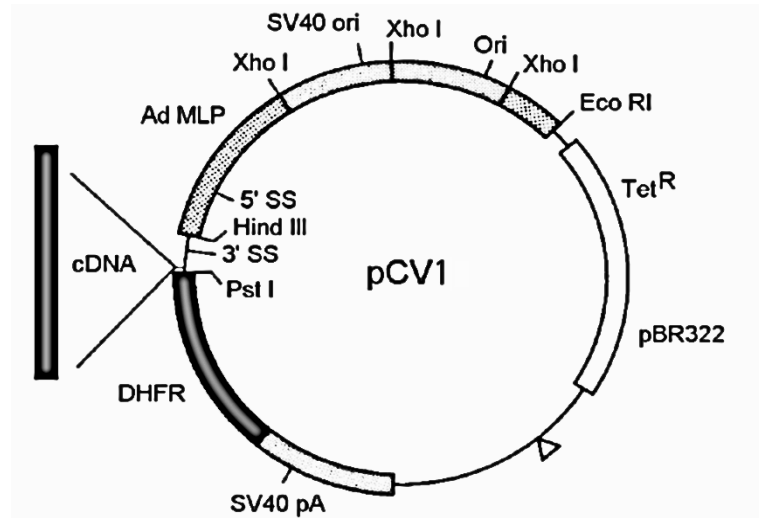
3.1.4.1. Krio Çözeltisi Hazırlama

Krio çözeltisi %90 inaktif fetal bovine serum ile %10 DMSO içerir. Bu oranlara göre steril koşullarda hazırladığımız krio çözeltisi parafilm ile sarılarak -20 °C'de muhafaza edildi.

3.2. PLAZMİDLER

3.2.1. pCV1

Şekil 3.1'de gösterilen pCV1 plazmid, viral tat ve rev genlerinin 7 kb uzunluğundaki pCV memeli ekspresyon vektörüne insersiyonu sonucu türetilmiştir. cDNA bölgesi yakınında 1,5 kb uzunluğunda pBR322 dizileri bulunur. 1,8 kb'lık bölüm tat ve rev genlerini kodlar. PstI ve EcoRI restriksiyon endonükleazları tarafından farklı noktalardan kesilir. EcoRI pCV1'i bir noktadan keserek 9,2 kb uzunluğunda tek bir fragment oluşturur. Pst I ise plazmidi iki noktadan keserek 3 kb ve 6,2 kb uzunluğunda iki fragman meydana getirir. 3 kb uzunluğundaki bölgenin 1,6 kb'lık bölümü Tat proteini genini içeren cDNA bölgesini, 1,4 kb'lık bölümü ise pBR322 vektör bölgesi ve tetrasikline direnç genini içermektedir (172).

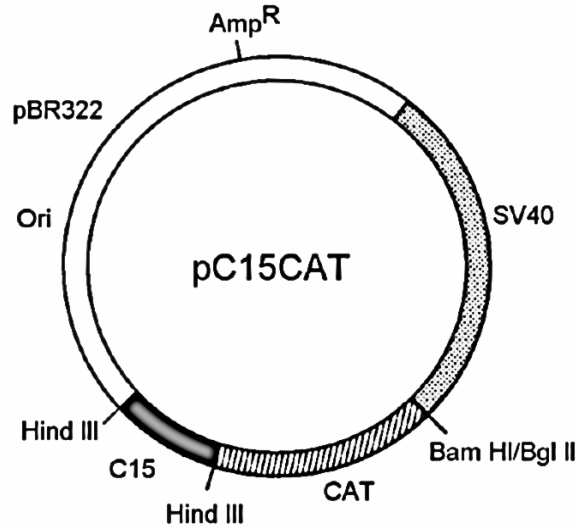


Şekil 3.1. pCV1'in tat ve rev genlerini içeren cDNA bölgesi, SV40 replikasyon orjini (SV40-ori), adenovirüs büyük geç promotörü (Adenovirüs Major Late Promotor, Ad MLP), fare immünglobulin geni (Mouse Immünglobulin Gene, SS), fare dihirofolat redüktaz gen bölgesi (Mouse Dihydrofolat Reductase, DHFR) ve SV40 poliadenilasyon sinyali bölgesi (SV40 pA) (173).

3.2.2. pC15CAT

HIV-1 LTR bölgesi ve CAT genini içeren pC15CAT plazmid, HIV-1 klon 15 DNA'sının pSV0-CAT'a Hind III bölgesinden insersiyonu sonucu elde edilmiştir. Şekil 3.2'de gösterilen bu plazmid, BamHI ve Hind III restriksiyon endonükleazları tarafından kesilir. BamHI plazmidi bir noktadan keserek 4,8 kb'lık tek bir fragman oluştururken, Hind III plazmidi iki noktadan keserek, 0,3 kb ve 4,5 kb'lık iki fragman oluşturur. Her iki restriksiyon enzimini birlikte kullanılarak 0,3, 1,5 ve 3 kb'lık üç ayrı

fragman meydana getirilir. 1,5 kb'lık fragman CAT genini, 3 kb'lık fragman pBR322 vektör bölgesini ve ampisilin direnç genini, 0,3 kb büyüklüğündeki fragman ise HIV-1 LTR bölgesini içerir (172).



Şekil 3.2. pC15CAT'ın HIV-1 LTR'yi içeren klon 15 DNA bölgesi (C15) ve kloramfenikol asetil transferaz geni (Chloramphenicol acetyl transferase, CAT) bölgeleri (173).

3.2.3. Plazmid İzolasyonu

Plazmidler önceden transforme edilmiş *E.coli* bakterisinden Qiafilter Plasmid Mega Kit (Qiagen) yardımıyla protokole uygun olarak izole edildi. Kit içeriğinde bulunmayan ve izolasyon işlemi sırasında kullanılan çözeltilerin içeriği ve saklanma sıcaklıkları Tablo 3.2 ve 3.3'de verilmiştir.

Tablo 3.2. Plazmid izolasyonu sırasında kullanılan antibiyotik çözeltilerin konsantrasyonları ve saklama sıcaklıkları.

Antibiyotik	Stok Solüsyon Konsantrasyonu	Çalışma Konsantrasyonu	Saklama Sıcaklığı
Tetrasiklin	100mg/20ml etanol	100 µg/ml	-20 °C
Ampisilin	1000mg/20ml su	25 µg/ml	-20 °C
Kloramfenikol	34 mg/ml etanol	170 µg/ml	-20 °C

Tablo 3.3. Lennox L Broth besiyeri ve tris-EDTA tamponu içeriği.

Lennox L (Lysogeny) Broth Besiyeri		Saklama Sıcaklığı	Tris-EDTA Tamponu (TE, pH:7,5)		Saklama Sıcaklığı
Lennox L Broth (LB, acumedia) Besiyeri	20 g	+4°C	Tris-HCl	10 mM	+4°C
Distile Su	1 L		Etilendiamin tetra asetik asit (EDTA)	1 mM	

pC15CAT ile pCV1'in izolasyon prosedürleri kullanılan antibiyotikler ve antibiyotik konsantrasyonları dışında aynıdır. Öncelikle 10 ml LB Broth besiyerine dondurulmuş antibiyotik stok solüsyonundan eritilerek çalışma konsantrasyonunda ilave edildi. *E.coli* bakterisi dirençli olduğu antibiyotiği içeren besiyerine ilave edildi ve 37 °C'de çalkalayıcı su banyosunda 24 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra bakteri kültürü, 500 ml LB Broth besiyerine aktarıldı ve Tablo 3.3'deki çalışma konsantrasyonlarına göre plazmid türüne uygun antibiyotik ilave edildi. Bu şekilde yarım gün inkübe olan kültüre protein sentezini durdurmak ve plazmid amplifikasyonunu indüklemek için uygun çalışma konsantrasyonunda kloramfenikol eklenip 24 saat inkübe edildi. Daha sonra plazmid izolasyonu için izolasyon kitinin prosedürü takip edildi.

3.2.3.1. Qiafilter Plasmid Mega Kit (Qiagen) Prosedürü

Öncelikle kit içerisindeki liyofilize RNase A, kite ait süspansiyon tamponu (P1) içerisinde çözüldü ve kullanılacak tüm solüsyonlar gözden geçirilerek uygun sıcaklıklara alınıp muhafaza edildi. Kit'e ait tampon çözeltiler ve içerikleri Tablo 3.4.'de verilmiştir.

Tablo 3.4. Plazmid izolasyon kitinde (Qiafilter Plasmid Mega Kit) bulunan tampon çözeltilerin içeriği ve saklama sıcaklıkları.

Tampon Çözeltiler	İçeriği	Saklama Sıcaklığı
P1 (Süspansiyon Tamponu)	50 mM Tris HCl, pH 8.0; 10 mM EDTA; 100 µg/ml	2–8°C (RNase A eklendikten sonra)
P2 (Liziz Tamponu)	200 mM NaOH, 1% SDS (a/h)	15–25°C
P3 (Nötralizasyon Tamponu)	3.0 M potasyum asetat, pH 5.5	15–25°C veya 2–8°C
FWB2 (Yıkama Tamponu)	1 M potasyum asetat, pH 5.0	15–25°C
QBT (Kalibrasyon Tamponu)	750 mM NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% izopropanol (h/h); 0.15% Triton® X-100 (h/h)	15–25°C
QC (Yıkama Tamponu)	1.0 M NaCl; 50 mM MOPS, pH 7.0; 15% izopropanol (h/h)	15–25°C
QF (Elüsyon Tamponu)	1.25 M NaCl; 50 mM Tris HCl, pH 8.5; 15% izopropanol (h/h)	15–25°C

- Hazırlanan kültür porsiyonlar halinde 50 ml'lik santrifüj tüplerine alınarak 10 dakika 6000 x g'de +4°C'de santrifüj edildi.
- Pellet üzerine önceden hazırlanmış P1 süspansiyon tamponu solüsyonundan 50 ml eklenerek süspanse edildi.
- Süspansiyon üzerine 50 ml P2 liziz tamponu eklenerek, genomik DNA'nın parçalanması ihtimaline karşın tüp dikkatlice çalkalandı ve oda sıcaklığında 5 dakika boyunca bekletildi.
- Lizat üzerine 50 ml soğuk nötralizasyon tamponu eklenerek tüp dikkatlice çalkalandı. Lizat içerisinde bulutlanmalar, ipliksi yapılar oluşuncaya dek buz içinde yaklaşık 10 dakika bekletildi.

- Lizat QIAfilter Mega Kartuş'a aktarılarak oda sıcaklığında 10 dk inkübe edildi. Vakum kaynağı kartuşa bağlanıp çalıştırıldı.
- Bütün lizat kartuştan geçtikten sonra vakum kapatıldı. QIAfilter kartuşu yıkamak amacıyla FWB2 yıkama solüsyonu tekrar vakum kullanılarak kartuştan geçirildi.
- Bu işlemler sonucunda elde edilen filtrelenmiş lizat steril bir kap içerisinde toplandı.
- Kolondan 35 ml QBT kalibrasyon çözeltisi geçirilmesinden sonra kolona yüklendi.
- Kolondan iki kez geçirilen filtrat uzaklaştırıldı.
- Kolon 200 ml QC yıkama tamponu ile yıkandı.
- 45- 50 kb'dan uzun baz dizileri elde edebilmek amacıyla QF elüsyon tamponu, sıcaklığı 65°C'ye ulaşıncaya kadar ısıtıldı.
- Kolondan 35 ml ısıtılmış elüsyon tamponu geçirildi.
- Süzülen elüent steril bir kaptaki toplandı.
- Plazmid DNA'yı çöktürmek amacıyla elüent üzerine oda sıcaklığındaki izopropanolden 24.5 ml eklenerek hızlıca 15000 x g'de 30 dakika +4°C'de santrifüjlendi.
- Santrifüj sonucunda süpernatant kısım pellete zarar verilmeden uzaklaştırıldı.
- Pellet içerisinde bulunabilecek çökmüş tuzları uzaklaştırmak ve izopropanolden daha uçucu olan etanol kullanılarak plazmid DNA'nın tekrar çözünmesini kolaylaştırmak amacıyla plazmid DNA'yı içeren pellet 7 ml soğuk % 70 etanol çözeltisi ile yıkanarak 15000 g'de 10 dakika +4°C'ta santrifüj edildi.
- Süpernatant uzaklaştırıldı ve pellet 10–20 dakika kadar oda sıcaklığında bekletilerek kurutuldu.
- Pellet, önceden Tablo 3.3.'e göre hazırladığımız 350µl Tris–EDTA tamponu (pH=7,5) içerisinde çözüldü.
- İzolasyonu tamamlanan plazmidler steril ependorfa alındı saflık ve miktar tayini yapıldıktan sonra çalışmamızda kullanılmak üzere -20°C'de saklandı.

3.2.3.2 İzole Edilen Plazmidlerin Saflık ve Miktar Tayini

İzole ettiğimiz plazmid DNA solüsyonunun UV spektrofotometresi kullanılarak miktar ve saflık ölçümleri yapıldı. DNA numunelerinin kuvarz küvette TE tamponuna karşı 260 nm, 280 nm ve 320 nm dalga boylarında optik dansite (OD) değerleri tespit edildi. “Plazmid DNA konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) = Abs (OD_{260}) x 50 (50 $\mu\text{g/ml}$ Çift sarmal DNA= 1 OD)x Dilüsyon Katsayısı” eşitliğinden faydalanarak hesaplandı. UV spektrofotometresinde 260 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlar DNA miktarını, 280 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlar protein miktarını, 320 nm dalga boyunda elde edilen sonuçlar ise izole edilen DNA ile birlikte bulunabilecek kirlilik miktarını göstermektedir. DNA solüsyonunun istenen saflıkta olması için $(A_{260} - A_{320})/(A_{280} - A_{320})$ oranının 1,8- 2,0 aralığında olması gereklidir.

3.2.3.3 İzole Edilen Plazmidlerin Agaroz Jel Elektroforezi ile Kalite Tayini

Agaroz jel elektroforezi kullanılarak *E. coli* bakterisinden izole ettiğimiz pCV1 ve pC15CAT plazmid DNA’ları çeşitli restriksiyon endonükleazlarla kesildikten sonra oluşan DNA fragmanlarının büyüklükleri ve jel üzerindeki görüntüleri tespit edildi.

a) Kullanılan Tampon Çözeltiler

Tris Asetat EDTA Tamponu:

Tris Asetat EDTA (TAE) tamponu Tablo 3.5.’e göre 100 ml hazırlandı. Hazırlanan tampon 50 kat dilüe edilerek kullanıldı. Çözelti +4°C’ta saklandı.

Tablo 3.5. 50x Tris asetat EDTA tamponu içeriği.

50 X TAE (pH=8.5) Tamponu	
Trizma baz	2 M
Glasiyel Asetik Asit	17,4 M
EDTA	100 mM
Distile Su	100 mL

Örnek Yükleme Tamponu:

Örneklerimizi jel oyuklara yüklemek amacıyla yükleme tamponu kullandık. Tamponu Tablo 3.6.'ya göre hazırladık. Hazırlanan tampon 6 kat dilüe edildikten sonra kullanıldı.

Tablo 3.6. 6x yükleme tamponu içeriği.

6 X Yükleme Tamponu	
Bromfenol mavisi	%0,25
Gliserol	%30

Etidyum Bromür Stok Çözeltisi:

Etidyum Bromür (EtBr) floresan özelliği nedeniyle agaroz jel elektroforezinde DNA fragmanlarını UV altında görünür hale getirmek amacıyla kullanılmaktadır. EtBr çözeltisi Tablo 3.7.'ye göre hazırlandı.

Tablo 3.7. Etidyum Bromür (EtBr) çözeltisi içeriği.

Etidyum Bromür (EtBr) Çözeltisi	
Etidyum Bromür(EtBr)	10 mg
Distile Su	1mL

b) Agaroz Jel Elektroforezi

pC15CAT Plazmidinin Kesim Reaksiyonları:

pC15CAT plazmidi, HindIII (Fermentas®ER0501) ve BamHI (Fermentas®ER0051) restriksiyon endonükleazları yardımıyla Tablo 3.8.'de gösterilen kesim noktalarından kesildi. Bunun için enzimler tüplere plazmid ile ayrı ayrı ve her iki enzim ile birlikte konarak üç reaksiyon ortamı hazırlandı ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.8. HindIII, BamHI ve HindIII+BamHI RE enzimleri kullanılarak hazırlanan kesim reaksiyonları için gerekli bileşenler, bu bileşenlerin oranları ve RE enzimlerinin kesim noktaları.

HindIII (Fermentas®ER0501)		BamHI (Fermentas®ER0051)		HindIII+ BamHI	
5' A↓A-G-C-T-T 3'		5' G↓G-A-T-C-C 3'			
3' T-T-C-G-A↑A 5'		3' C-C-T-A-G↑G 5'			
Nükleaz- içermeyen su	44 µl	N. içermeyen su	44 µl	N. içermeyen su	44 µl
10X Buffer R (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA)	5 µl	10X Buffer BamHI (10 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/mL BSA)	5 µl	10X BufferR (10 mM Tris-HCl (pH 8.5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM KCl, 0.1 mg/ml BSA)	5 µl
DNA(0,5-1µg/ml)	1 µl	DNA(0,5-1µg/ml)	1 µl	DNA(0,5-1µg/ml)	1µl
HindIII	10 U	Bam HI	10 U	HindIII	10 U
				BamHI	10 U

pCV1 Plazmidinin Kesim Reaksiyonları:

pCV1, EcoRI (Fermentas®ER0271) ve PstI (Fermentas® ER0611) isimli iki restriksiyon endonükleaz aracılığıyla Tablo 3.9'da verilen spesifik noktalardan kesilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi.

Tablo 3.9. Eco RI ve PstI RE enzimleri kullanılarak hazırlanan kesim reaksiyonları için gerekli bileşenler, bu bileşenlerin oranları ve RE enzimlerinin kesim noktaları.

EcoRI (Fermentas® ER0271)		PstI (Fermentas® ER0611)	
5' G↓A-A-T-T-C 3'		5' C-T-G-C-A↓G 3'	
3' C-T-T-A-A↑G 5'		3' G↑A-C-G-T-C 5'	
Nükleaz- içermeyen su	16 µl	Nükleaz- içermeyen su	44 µl
10X Buffer EcoRI (50 mM Tris-HCl (pH 7.5), 10 mM MgCl ₂ , 100 mM NaCl, 0.02% Triton X-100, 0.1 mg/ml BSA)	2 µl	10X Buffer O (50mM Tris-HCl (pH7.5), 10mM MgCl ₂ , 100mM NaCl, 0.1mg/ml BSA)	5 µl
DNA(0,5-1µg/ml)	1 µl	DNA(0,5-1µg/ml)	1 µl
EcoRI	10 U	PstI	10 U

DNA Belirteci (Ladder Mix- Fermentas® SM0331):

Kullandığımız DNA belirteci 100-10000 bp aralığında çift zincirli DNA fragmanlarının büyüklüklerini tespit ederek plazmidlerin kalitelerini belirlememizi sağlayan kromatografik olarak saflaştırılmış serbest DNA fragmanlarından meydana gelmiştir. DNA belirtecinin içeriği Tablo 3.10'da verilmiştir.

Tablo 3.10. DNA Belirteci (Ladder Mix- Fermentas® SM0331) içeriği.

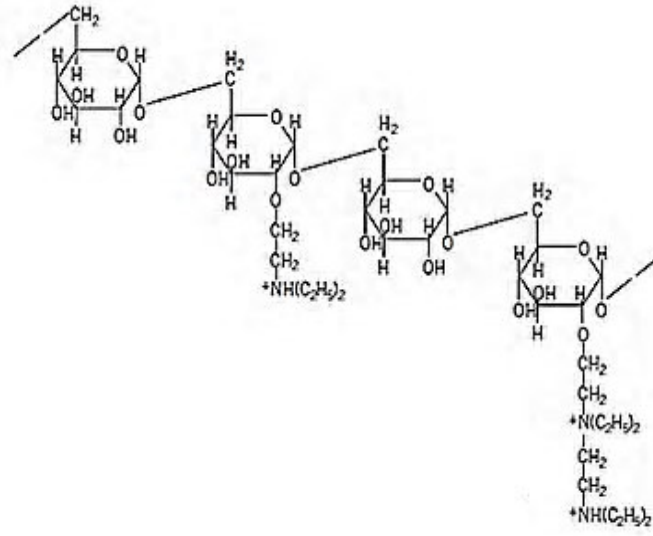
DNA Belirteci (Ladder Mix- Fermentas® SM0331)	
0,5µg	DNA Ladder
1µ	6X Loading Dye Solution (10 mM Tris-HCl (pH 7.6), 0.03% bromofenol mavisi, 0.03% ksilen siyanol FF, 60% gliserol ve 60 mM EDTA)
4µ	Deiyonize Su

Elektroforez Prosesi:

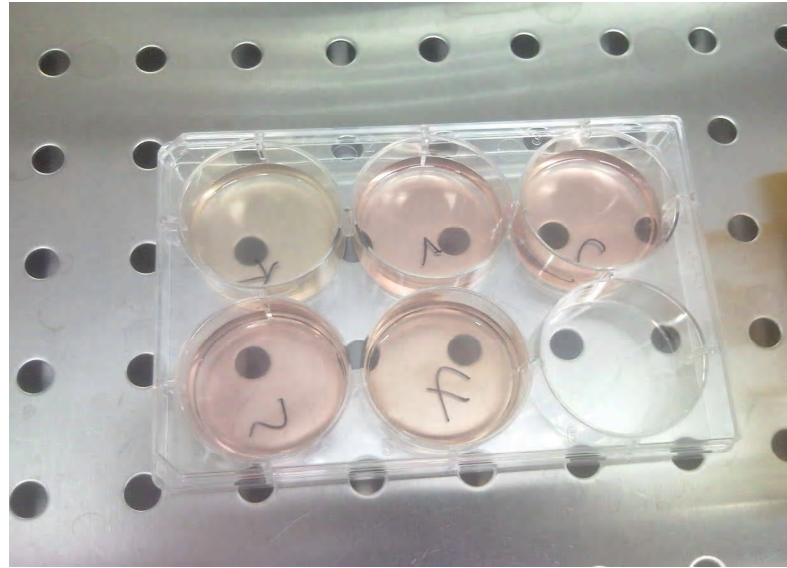
Öncelikle 1 g agaroz tartılıp 100 mL 1X TAE üzerine ilave edildi ve 5 dakika beklendi. Daha sonra agarozun ısıtılarak tamamen çözünmesi için karışım mikrodalga fırına alındı. Agaroz jel tam olarak çözüldükten sonra çözelti 50-55 °C'ye kadar soğutuldu. Çözelti, içerisine tarak yerleştirilmiş yatay agaroz jel sistemi kaseti içine aktarıldı. Burada jel polimerleştikten sonra kasetin konumu elektrik akımının geçiş yönüne uyacak şekilde ayarlandı ve tarak çıkarıldı. Tank jelin üzerini tamamen kaplayıncaya kadar TAE tamponu ile dolduruldu ve 10 dakika beklendi. İnkübe ettiğimiz örneklerin her birinden 13 µl alındı. Örneklerin üzerine 2'şer µl yükleme tamponu ilave edildi. İyice karıştırıldıktan sonra örnekler ve standartlar TAE tamponu üzerinden jele yüklendi. Örnekler, 90 V gerilim uygulanarak oluşturulan elektriksel alan içerisinde jelin 2/3'lük kısmına gelinceye kadar yürütüldü. Bu aşamada DNA fragmanları uygulanan elektriksel alanda hareket hızlarına göre birbirinden ayrılmış oldu. Daha sonra Jel UV altında floresan etki gösteren EtBr çözeltisi içine bırakıldı ve 5 dakika bekletildi. Bu süre sonunda jel saf su ile yıkandı ve UV görüntüleme cihazında görüntülendi.

3.3. TRANSFEKSİYON

Transfeksiyon yabancı DNA veya RNA moleküllerinin ökaryotik hücrelere aktarılmasıdır. Çalışmamızda DEAE-dekstran transfeksiyon yöntemi kullanıldı. Şekil 3.3.'de gösterilen pozitif yüklü DEAE-dekstran polimeri, negatif yüklü nükleik asitlere bağlanarak kompleks oluşturur. Bu yapı negatif yüklü hücre membranına adsorbe olduktan sonra endositozla hücre içine alınır. DEAE-dekstran hücreler için toksik olduğundan çalışma konsantrasyonu ve hücrelerin DEAE-dekstrana maruz kalma süresinin iyi ayarlanması gerekmektedir (174).



Şekil 3.3. DEAE-dekstran polimerinin moleküler yapısı (175).



Şekil 3.4. Kontrol hücreleri ile ASO'lerin ilave edildiği hücreleri içeren 6 kuyucuklu kültür kabının transfeksiyondan 48 saat sonraki görüntüsü.

Transfeksiyon işleminde Şekil 3.4'de gösterilen 6 kuyucuklu steril kültür kabı (6 well plate) kullanıldı. Her kuyucuğa eşit miktarda hücre (10×10^6) aktarmak için iyice süspanse edilmiş hücre kültüründen alınan hücre numunesi trypan mavisi ile boyandıktan sonra canlı hücreler thoma lamında sayıldı. Plazmid ve hücreleri içeren transfeksiyon solüsyonu Tablo 3.11.'deki gibi hazırlandıktan sonra steril bir tüpe alınarak 37°C 'de 1 saat inkübe edildi. Transfeksiyon solüsyonu 1 saatlik inkübasyon

sırasında her 15 dakikada bir dikkatlice çalkalandı. İnkübasyondan sonra solüsyon 5 dakika 250 x g'de santrifüj edildi. Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra hücre pelleti FBS'siz besiyeri ile iki kez yıkandı. İkinci yıkama işlemi sonunda hücre pelleti yeterli miktarda taze hazırlanmış FBS'li besiyeri içinde süspansiyon edildi. Süspansiyon edilen hücreler kültür kabının kuyucuklarına eşit miktarda aktarıldı. Etkilerini araştırdığımız ASO'ler, her kuyucukta araştırdığımız konsantrasyonlarda (1µM, 3µM, 5µM) bulunacak şekilde kuyucuklardaki FBS'li hücre kültürüne ilave edildi. Kültür kabı CO₂'li inkübatörde 48 saat inkübe edildikten sonra hücrelerin CAT ekspresyonunu ölçmek için CAT ELISA kiti prosedürü uygulandı. ELISA ölçümünde her örnek için eşit miktarda protein kullanmak üzere Bradford metodu ile hücrelerin protein miktarları tayin edildi. ELISA cihazı ile 405 ve 490 nm dalga boylarında gerçekleştirilen spektrofotometrik ölçümler 10-40 dakika süresince 10 dakikada bir kaydedildi. Elde edilen ELISA verileri aracılığıyla örneklerin CAT ekspresyonları yüzdesel olarak belirlendi. Oluşturduğumuz HIV-1 transaktivasyon modelinin tat proteini aktivitesi CAT ekspresyonu ile doğru orantılı olduğundan örneklerin yüzdesel olarak belirlenen CAT ekspresyonları, araştırılan ASO'lerin tat aktivitesi üzerine etkilerini değerlendirmek için kullanıldı. Elde ettiğimiz veriler değerlendirildi.

Tablo 3.11. DNA transfeksiyon çözeltisinin içeriği.

DNA Transfeksiyon Çözeltisi
RPMI-1640 Medium (FBS'suz)
50mM Tris-HCl (pH:7.3)
250µg/ml DEAE-dextran
Bir kuyucuk için 10x10 ⁶ hücre
10µg/ml pCV1 ve 10µg/ml pC15CAT

3.3.1. CAT ELISA Kit (Roche) Prosedürü

Çalışma öncesinde kit içerisinde liyofilize halde bulunan CAT enzim tip 1, anti CAT Digoksinen (Anti-CAT-DIG, 2a), Anti-DIG-Peroksidaz (Anti-DIG-POD, 3a) distile su içerisinde çözülerek homojenize hale getirildi. CAT ELISA kit prosedüründe kullanılan reaktifler ve tampon çözeltilerin içerikleri Tablo 3.12. ve 3.13'de verilmiştir.

Tablo 3.12. CAT ELISA kit prosedüründe kullanılan reaktiflerin içerikleri.

Reaktifler	İçerik
CAT (Kloramfenikol Asetil Transferaz) enzim tip I	<i>E. coli</i> 'den elde edilmiş liyofilize rekombinant protein.
Anti-CAT-DIG (Anti-CAT-Digoksinin)	CAT'a karşı geliştirilmiş, digoksinin ile konjuge poliklonal antikor.
Anti-DIG-POD (Anti-DIG-Peroksidaz)	Digoksinin'e karşı geliştirilmiş, peroksidaz ile konjuge poliklonal antikor.
POD (Peroksidaz) Substratı	2,2'-azino-bis(3-etilbenzotiazolin-6-sülfonik asit)
MP (Microplate)	Kuyucuklar, CAT'a karşı geliştirilmiş poliklonal antikor ile kaplı yüzeye sahiptir.

Tablo 3.13. CAT ELISA kit prosedüründe kullanılan tampon çözeltilerin içerikleri.

Tamponlar Çözeltiler	İçerik
Çalışma Tamponu (Sample Buffer)	10mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, 1% (a/h) BSA, pH 7.5
Yıkama Tamponu (Wash Buffer)	10mM sodium phosphate, 0.15M NaCl, 0.05% (h/h) Tween-20, pH 7.5
Liziz Tamponu (Lysis Buffer)	120 mM NaCl, 50 mM Tris HCl, pH 8.0, 0.5% Nonidet® P40

- Kullanılacak tüm solüsyonlar gözden geçirilerek uygun sıcaklıklarda muhafaza edildi.
- Transfekte edilen hücreler ayrı ayrı tüplere alınarak 250 x g'de 5 dakika +8°C'de santrifüjlendi.
- Süpernatant uzaklaştırıldıktan sonra pellet iki kez steril PBS ile yıkandı.
- Son yıkamada oluşan pelletler liziz tamponu içerisinde çözülerek, hücrelerin tamamen parçalanması sağlandı.
- Her örnek için eşit miktarda protein kullanmak üzere örneklerin protein miktarları, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edildi.
- Hücre lizatları 15000 x g'de, +8°C'da, 30 dakika boyunca santrifüjlendikten sonra süpernatantın bir kısmı protein miktarı tayini için diğer bir kısımda CAT ekspresyonu tayininde kullanıldı.
- Öncelikle porsiyonlara ayrılmış stok CAT enzim çözeltisi çalışma tamponu ile homojenize edilerek kit çalışma standardı hazırlandı.
- Protein miktarı tayin edilen hücre lizatları, yüzeyine CAT antikorları (anti-CAT) tutturulmuş microplate modul'e (MP) enjekte edilerek CAT'in anti-CAT'a bağlanması sağlandı.
- Örneklerin yüklendiği MP 1 saat 37°C CO₂'li inkübatör içerisinde inkübe edildi ve MP her inkübasyon basamağından sonra yıkama tamponu ile 5 kez yıkandı.
- MP'ye Anti-CAT-DIG eklendi ve CO₂'li inkübatör içerisinde 1 saat bekletildi. Böylece Anti-CAT-DIG'in CAT'a bağlanması sağlandı.
- Yıkamış MP'ye peroksidaz içeren Anti-DIG-POD eklendi ve 1 saat CO₂'li inkübatör içerisinde inkübe edildi. Bu aşamada Anti-DIG-POD CAT'a bağlı Anti-CAT-DIG yapısına bağlandı.
- Son olarak peroksidaz substratının eklenmesiyle renk reaksiyonu oluştu. Oluşan renkli kompleksin 405 ve 490 nm dalga boyundaki absorbansları spektrofotometrik olarak ölçüldü. Elde edilen veriler aracılığıyla CAT ekspresyonu yüzdesel olarak belirlendi.

3.3.2 Bradford Yöntemiyle Protein Miktarı Tespiti

Örneklerin protein miktarlarının belirlenmesi amacıyla kullanılan kantitatif analiz yöntemidir. Bu yöntemde Tablo 3.14.'ye göre hazırlanan serum albüminine göre standardize edilmiş Bradford çözeltisi kullanıldı. Bradford yöntemi Coomassie Brilliant Blue boyar maddesinin proteinlerin asidik yüzeyine bağlanmasıyla meydana gelen boyar madde-protein kompleksinin 595 nm'deki maksimum absorbansının ölçülmesi esasına dayanmaktadır. Örneklerimizin absorbansları blank'e karşı spektrofotometre yardımıyla ölçüldü. Blank'e hücre lizatlarında bulunan liziz tamponu konuldu ve örneklerin absorbansları kaydedildi (176).

Tablo 3.14. Bradford çözeltisinin içeriği.

Bradford Çözeltisi	
Coomassie Brilliant Blue	100 mg
%85'lik Fosforik Asit	100 mL
%95'lik Etanol	50 mL

3.3.3 ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLER (ASO)

HIV-1 terapisinde karşılaşılan en önemli sorunlardan biri, HIV'in yüksek oranda mutajenezine bağlı olarak tedavide kullanılan anti-HIV preparatlarına direnç gelişimidir. Bu nedenle ASO'lerin dizilimi, direnç gelişimini minimum düzeyde tutabilmek amacıyla tat mRNA'nın 5' ucu yakınındaki iyi korunmuş bölgenin farklı sekansları hedeflenerek belirlendi. Tat proteininin amino ucundaki amino asit dizilerini kodlayan bu bölge, tat mRNA'nın diğer bölgelerine kıyasla daha az mutasyon içerir. Hedef tat mRNA sekansı Tablo 3.15'de verilmiştir.

Çalışmamızda ASO'lerin 3' uçlarından kolesterol ile konjuge edilmiş formları kullanıldı. Bu lipofilik konjugasyonun amacı ASO'lerin hücre içine alımını ve hücre içi stabiliteilerini arttırmaktır. Ayrıca ASO'ler hücrel nükleazlara karşı dirençli olmaları için çeşitli modifikasyonlar içerecek şekilde dizayn edildi. Kontrol olarak fos

onkogenine hedeflendirilmiş ve herhangi bir modifikasyon içermeyen kolesterol ile konjuge anti-fos oligonükleotidi kullanıldı.

ASO'ler BO&GA medikal aracılığıyla Syngen (USA) firmasından HPLC saflığında ve liyofilize formda temin edildi. Liyofilize ASO'lerin, üretici tarafından sağlanan teknik verilere göre TE tamponunda süspanse edilerek 200 µM konsantrasyonda stok solüsyonları hazırlandı. Stok solüsyon eşit miktarlarda bölünerek ependorf tüplerine aktarıldı. Süspanse haldeki ASO'lerin stabiliteyi zayıf olduğundan çalışmanın kısa sürede bitirilmesi amaçlandı. ASO'ler jurkat hücre kültüründe 1 µM, 3 µM ve 5 µM konsantrasyonlarında denendi. Deneysel çalışma süresince süspanse edilmiş ASO'ler -20°C de saklandı. Tablo 3.16.'de ASO'lerin tat mRNA'ya affinitesini ve ASO-mRNA dubleksinin termal stabilitesini etkileyebilecek bazı parametreler gösterilmiştir.

Tablo 3.15. Hedeflediğimiz tat mRNA sekansı.

Hedef Tat mRNA Sekansı
5'-AUG GAG CCA GUA GAU-3'

Tablo 3.16. Araştırılan ASO'lerin dizilimi, uzunluğu, GC içeriği, erime derecesi (Tm) ve modifikasyonları.

Kod	ASO Dizileri	Uzunluğu (bç)	GC içeriği (%)	Tm derecesi (C)	Modifikasyon
Anti-fos (Kontrol)	Kol-3- TAC TAC AAG AGC CCA-5' (DNA)	15	46,7%	48,4	-
Anti-Tat-1	Kol-3- TAC CTC GGT CAT -5' (DNA)	12	50%	41,0	-
Anti-Tat-2	Kol-3- OMe(UAC CUC GGU CAU) -5' (RNA)	12	50%	25,1	2'-O-metil (OMe)
Anti-Tat-3	Kol-3- Fosforotiyoat (UAC CUC GGU CAU) -5' (RNA)	12	50%	25,1	Fosforotiyoat
Anti-Tat-4	Kol-3- Fosforotiyoat (TAC CTC GGT CAT)-5' (DNA)	12	50%	41,0	Fosforotiyoat
Anti-Tat-5	Kol-3- Fosforotiyoat (TAC CTC GGT CAT CTA)-5' (DNA)	15	50%	48,4	Fosforotiyoat

3.4. SİTOTOKSİSİTE TAYİNİ

Araştırdığımız ASO'lerin jurkat hücreleri üzerine toksik etkileri belirlendi. Bu amaçla transfekste edilmemiş hücrelerin bulunduğu kültür ASO uygulanmadan önce sayıldı. Transfeksiyon aşamasında olduğu gibi her kuyucuğa 10 milyon hücre aktarıldı. ASO'ler hücre kültürüne en yüksek deneme konsantrasyonunda (5 μ M) üç kontrollü olarak ilave edildi. Kontrol grubuna ASO'lerin yerine, birine PBS diğerine Tris-EDTA konuldu. 48 saatlik inkübasyondan sonra her bir kuyucuktaki canlı hücreler trypan mavisi ile boyanarak thoma lamında sayıldı. Sonuçlara göre ASO'lerin jurkat hücreleri üzerine toksik etkileri değerlendirildi.

4. BULGULAR

4.1. ELEKTROFOREZ BULGULARI

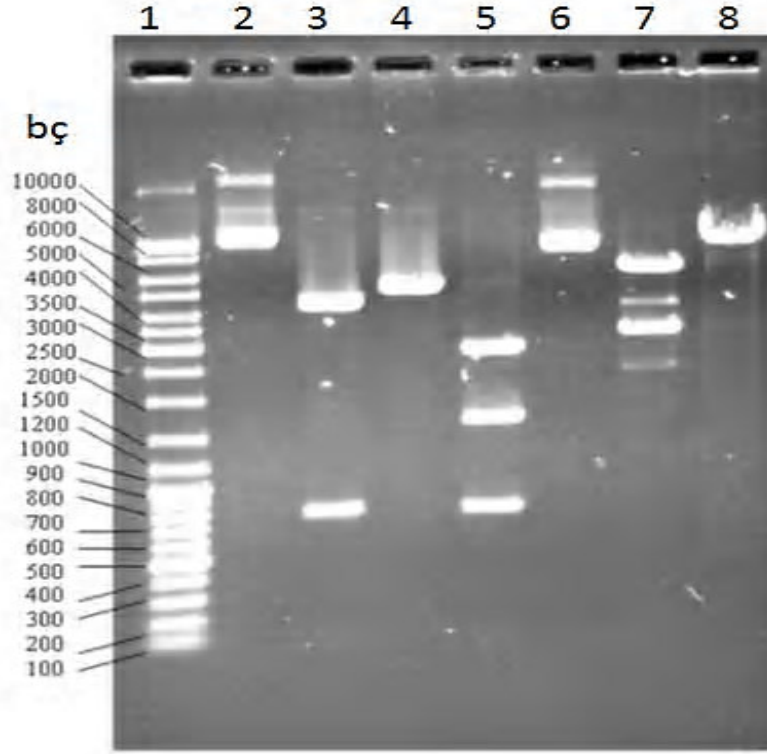
E.coli'den izole ettiğimiz pCV1 ve pC15CAT plazmidleri restriksiyon endonükleazlarla belirli noktalardan kesildikten sonra plazmid kalitelerini belirlemek için agaroz jel elektroforezi kullanılarak DNA fragmanlarının büyüklükleri tespit edildi. Her iki plazmid de aynı agaroz jel üzerinde yürütüldü. UV altında görüntülenen DNA fragmanları kılavuz DNA (DNA-Ladder Mix) ile karşılaştırılarak boyut ve kalite tespiti yapıldı. Elektroforez işlemi tekrarlandığında aynı bant oluşumları gözlemlendi. Bant oluşumları Şekil 4.1'de gösterilmiştir.

4.1.1. pC15CAT'ın Elektroforez Bulguları

Hind III restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonucunda yaklaşık 4,6 kBp ve 0,8 kBp büyüklüklerinde iki bant, Bam HI restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonucu yaklaşık 5,4 kBp büyüklüğünde tek bir bant, Hind III+BamHI restriksiyon enzimlerinin aynı hacimde kullanılmasıyla yapılan kesim sonucunda yaklaşık 3,0 kBp, 1,6 kBp ve 0,8 kBp büyüklüklerinde üç ayrı bant elde edildi (177).

4.1.2. pCV1'in Elektroforez Bulguları

EcoRI restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonucunda yaklaşık 9,2 kBp büyüklüğünde tek bir bant, Pst I restriksiyon enzimi ile yapılan kesim sonucunda yaklaşık 6,2 kBp ve 3,0 kBp büyüklüklerinde iki bant elde edilmiştir (177).



Şekil 4.1 Agaroz jel elektroforezinde pC15CAT ve pCV1 fragmanlarının, EtBr uygulandıktan sonra UV altındaki görüntüsü. 1. Kuyucuk: Kılavuz DNA (DNA-Ladder Mix), 2. Kuyucuk RE ile kesilmemiş pC15CAT, 3. Kuyucuk: Hind III, 4. Kuyucuk: Bam HI, 5. Kuyucuk: Hind III+Bam HI, 6. Kuyucuk RE ile kesilmemiş pCV1 7. Kuyucuk: Pst I, 8. Kuyucuk: EcoRI (177).

4.2. Plazmidlerin Kantitatif Ölçüm Sonuçları

pCV1 ve pC15CAT plazmidleri QIAGEN QIAfilter Plasmid Mega Kit aracılığıyla prosedüre uygun olarak izole edildikten sonra plazmidlerin konsantrasyonu UV spektrofotometresi aracılığıyla ölçüldü ve plazmid DNA konsantrasyonu “DNA Konsantrasyonu ($\mu\text{g/ml}$) = Abs x Çift sarmal DNA OD x Dilüsyon Katsayısı” eşitliğinden faydalanarak hesaplandı. Tablo 4.1’ye göre hesapladığımız pC15CAT plazmid konsantrasyonu 5626,5 $\mu\text{g/ml}$, Tablo 4.2’e göre hesapladığımız pCV1 plazmid konsantrasyonu 1742,4 $\mu\text{g/ml}$ ’dir. Hesapladığımız DNA konsantrasyonları, plazmidlerin çalışma için yeterli konsantrasyonda izole edildiğini göstermektedir.

pC15CAT ve pCV1'in spektrofotometrik ölçümünde elde edilen verilere göre [A260 - A320]/[A280 - A320] oranı 1.6-1.9 aralığında olduğundan DNA saflığı yeterli düzeydedir.

Tablo 4.1. İzole edilen pC15CAT'ın UV spektrofotometre sonuçları.

pC15CAT		
Dalga Boyu (nm)	Absorbans (A)	Dilüsyon Katsayısı
260	0,930	605/5
280	0,522	
320	0,051	

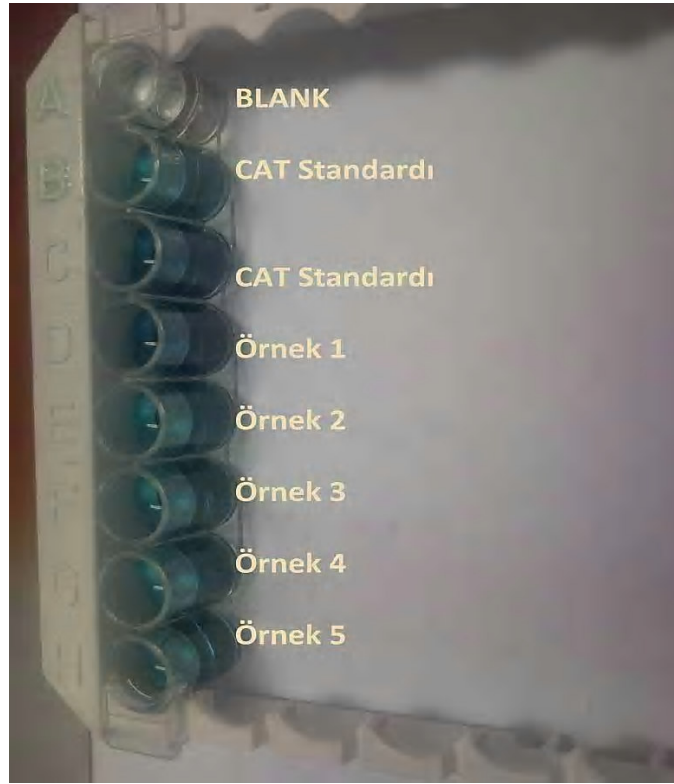
Tablo 4.2. İzole edilen pCV1'in UV spektrofotometre sonuçları.

pCV1		
Dalga Boyu (nm)	Absorbans (A)	Dilüsyon Katsayısı
260	0,288	605/5
280	0,151	
320	0,002	

4.3. ANTİSENS OLİGONÜKLEOTİDLERİN ETKİLERİ

4.3.1. Transaktivasyon Modelinin Denenmesi

Jurkat hücrelerinin izole ettiğimiz PCV1 ve pC15CAT plazmidleri ile transfekte edildiğinden emin olmak amacıyla ASO kullanılmadan transaktivasyon modelinin ön denemesi yapıldı. Çalışmada her kuyucuk da 10 milyon hücre ve her plazmidden (pCV1 ve pC15CAT) 10µg/ml konsantrasyonda bulunacak şekilde DEAE-Dextran metodu ile transfeksiyon yapıldı. Denemede kullanılan hücre sayısı önemli olduğu için hücreler deneme öncesinde trypan mavisi ile boyanıp thoma lamında sayıldı. 48 saatlik inkübasyon sonunda CAT ELISA Kiti ile örneklerin CAT enzim içeriği tespit edildi. ELISA prosedüründe her örnek için eşit miktarda protein kullanmak üzere örneklerin protein miktarları, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edildi. CAT ekspresyonuna bağlı olarak örneklerde meydana gelen renklenme Şekil 4.2'de gösterilmiştir. Transaktivasyon modelinin ön denemesi sonucunda elde edilen ELISA verileri Tablo 4.3.'de gösterilmiştir. Bu veriler transfeksiyon prosesinin başarılı bir şekilde gerçekleştiğini göstermektedir.



Şekil 4.2. Transaktivasyon modelinin ön denemesi sonucunda MP kuyucuklarındaki örneklerde CAT ekspresyonuna bağlı olarak meydana gelen renklenme.

Tablo 4.3. Plazmid transfeksiyonu yapılmış jurkat hücrelerinin ASO'ler kullanılmadan ölçülen ELISA değerleri.

405 nm/490nm	
Blank	0,119
CAT Standardı	1,849
CAT Standardı	1,715
Örnek 1	0,740
Örnek 2	1,007
Örnek 3	0,770
Örnek 4	0,940
Örnek 5	0,725

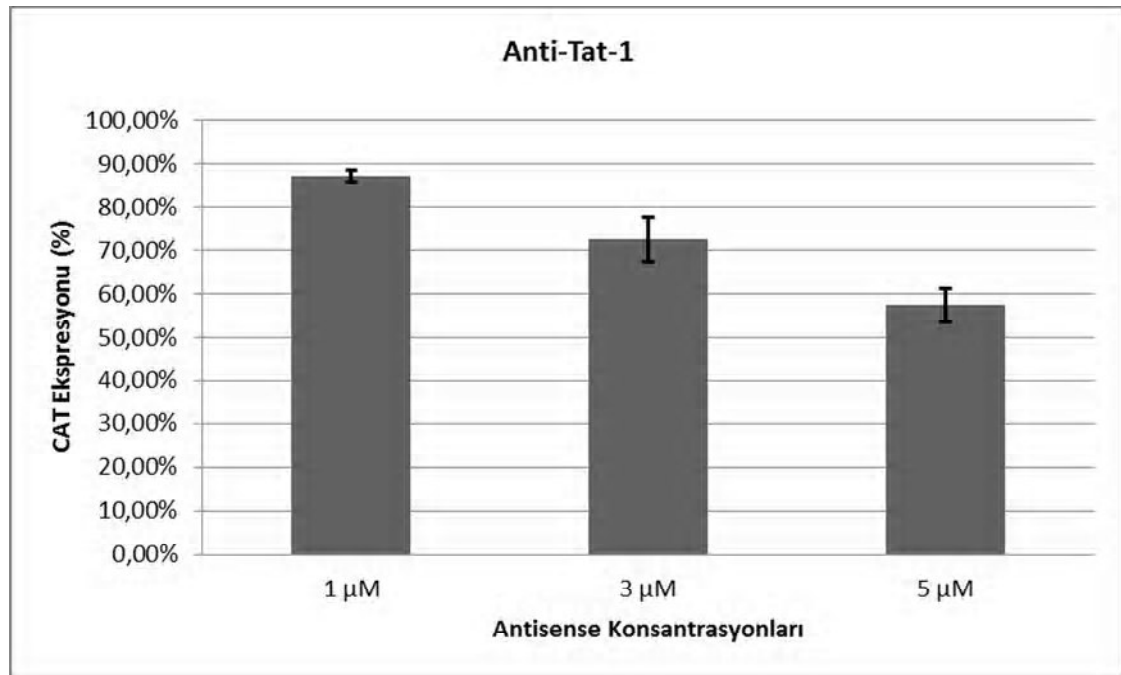
4.3.2. Antisens Oligonükleotidlerin Tat Aktivitesi Üzerine Etkileri

Tablo 3.16.'da verilen ASO'lerin CAT ekspresyonu üzerine etkileri, plazmid transfeksiyonu yapılmış jurkat hücre kültürüne ASO'lerin ilave edilip kültürün 48 saat inkübe edilmesi sonucunda elde edilen ELISA verileri değerlendirilerek belirlendi. ELISA basamağında her örnek için eşit miktarda protein kullanmak üzere örneklerin protein miktarları, Bradford yöntemi kullanılarak tayin edildi. 405-490 nm'de, 10-40 dk içerisinde okunan ELISA verileri aracılığıyla CAT ekspresyonu yüzdesel olarak belirlendi.

Tat proteini aktivitesinin CAT ekspresyonu ile doğru orantılı olduğu esasına dayanılarak, tat protein aktivitesinin inhibe edilme durumu CAT ekspresyonunun %100'den az olması ile açıklandı. Her ASO denemesi istatistiksel olarak güvenilir sonuçlar elde etmek amacıyla üç kere tekrarlandı.

4.3.2.1. Anti-Tat-1

İlk olarak Tablo 3.16.'da verilen modifiye edilmemiş DNA yapısındaki Anti-Tat-1 dizisinin 1 μ M, 3 μ M ve 5 μ M konsantrasyonlarda CAT ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Doza bağlı olarak elde edilen veriler Grafik 4.1'de gösterilmiştir.

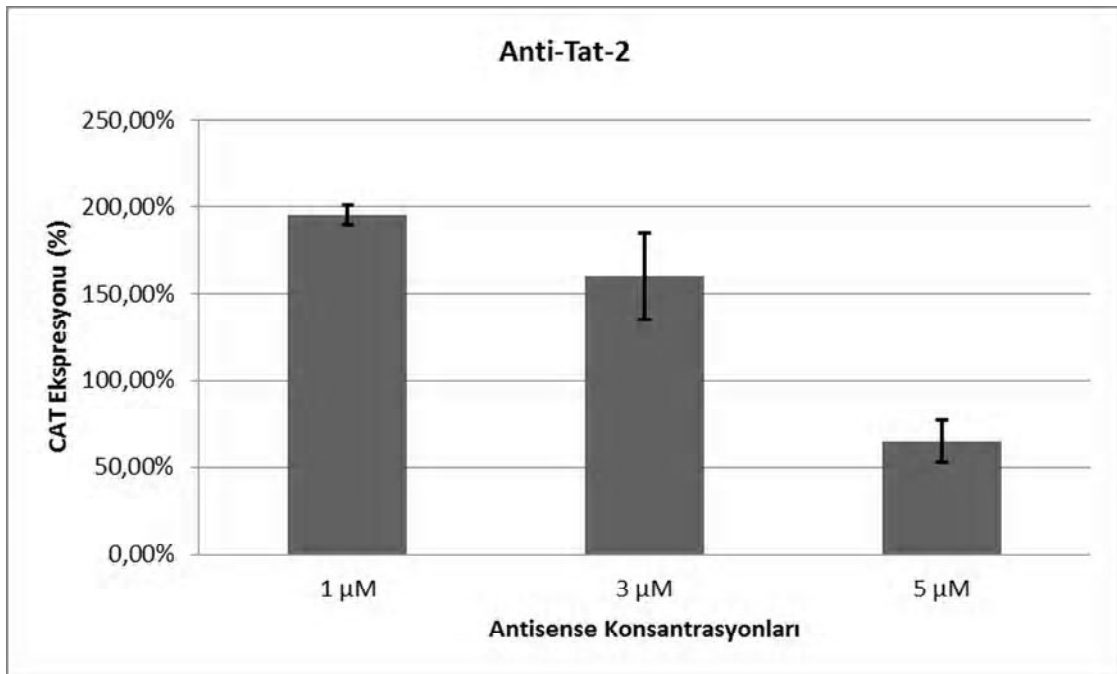


Grafik 4.1. Anti-Tat-1 oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi.

Anti-Tat-1 dizisi artan doza bağı olarak bütün konsantrasyonlarda CAT ekspresyonu üzerine inhibe edici etki göstermiştir. Deneme sonucunda 1 μM konsantrasyonda %13, 3 μM konsantrasyonda %27 ve 5 μM konsantrasyonda % 43 CAT ekspresyonu inhibisyonu tespit edildi.

4.3.2.2. Anti-Tat-2

İkinci jenerasyon modifikasyon (2-OMe) içeren RNA yapısındaki Anti-Tat-2 dizisi Tablo 3.16.'da gösterilmiştir. Anti-Tat-2'nin CAT ekspresyonu üzerine etkilerini araştırmak üzere ASO 1 μM , 3 μM ve 5 μM konsantrasyonlarda denendi. Doza bağı olarak elde edilen yüzdesel CAT ekspresyonu verileri Grafik 4.2'de gösterilmiştir.

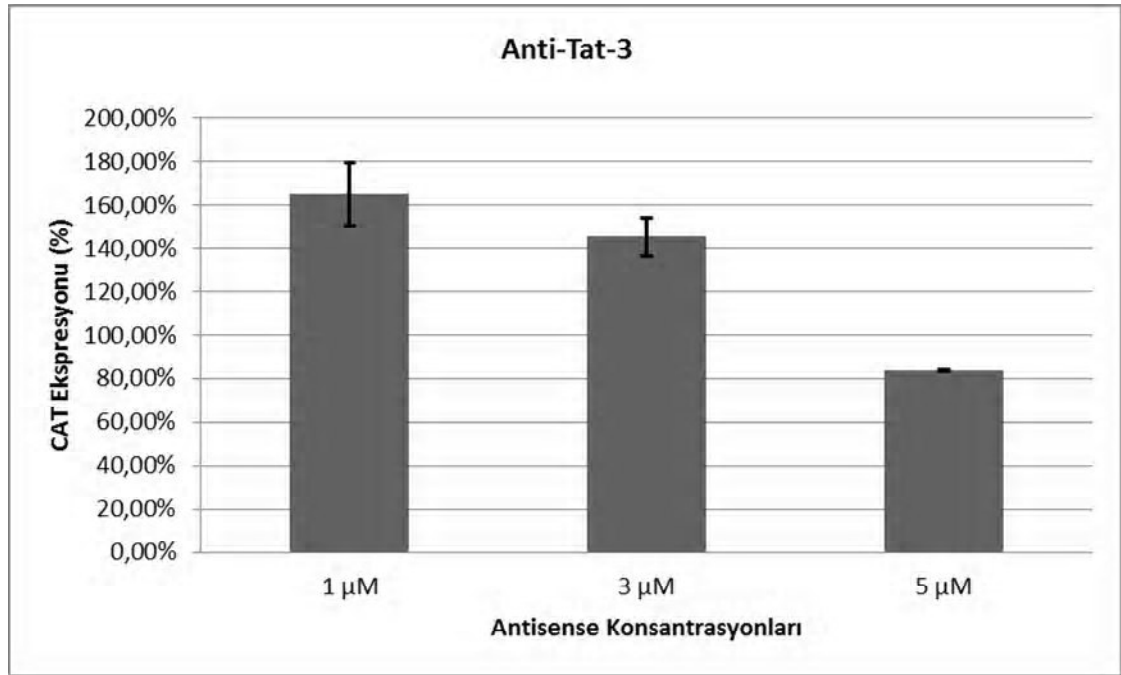


Grafik 4.2. Anti-Tat-2 oligonükleotidinin doza bağı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi.

Etkisini araştırdığımız Anti-Tat-2 dizisi sadece 5 μM dozda CAT ekspresyonun inhibe etmiştir. Oligonükleotid dozuna bağı olarak CAT ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. 1 μM konsantrasyonda % 95, 3 μM konsantrasyonda ise %60 CAT ekspresyonu artışı tespit edilmiştir. 5 μM konsantrasyonda ise % 35 CAT ekspresyonu inhibisyonu gözlenmiştir.

4.3.2.3. Anti-Tat-3

Tablo 3.16.'da verilen ASO'lerden RNA yapısındaki Anti-Tat-3 dizisinin CAT ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Birinci jenerasyon modifikasyon (fosforotiyoat) içeren bu ASO 1 μ M, 3 μ M ve 5 μ M konsantrasyonlarda hücre kültüründe denendi. Doza bağlı olarak elde edilen yüzdesel CAT ekspresyonu verileri Grafik 4.3'de gösterilmiştir.

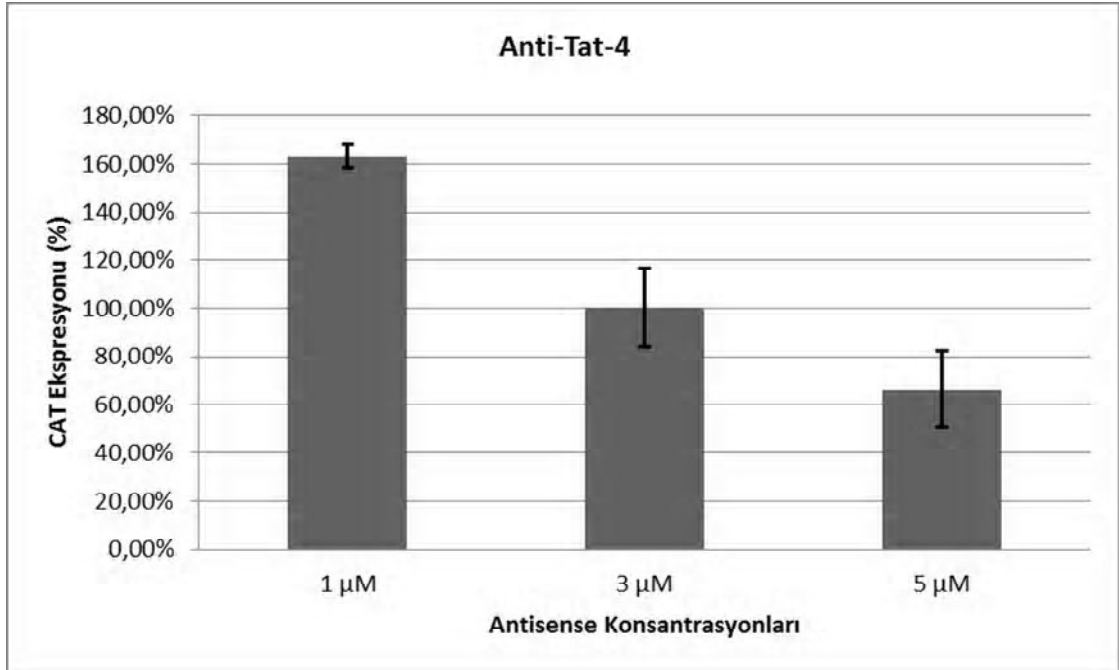


Grafik 4.3. Anti-Tat-3 oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi.

Etkisini araştırdığımız Anti-Tat-3 dizisi CAT ekspresyonunu sadece 5 μ M konsantrasyonda inhibe etmiştir. ASO dozuna bağlı olarak CAT ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. 1 μ M konsantrasyonda % 65, 3 μ M konsantrasyonda ise %45 CAT ekspresyonu artışı tespit edilmiştir. 5 μ M konsantrasyonda ise % 16 CAT ekspresyonu inhibisyonu gözlenmiştir.

4.3.2.4. Anti-Tat-4

Birinci jenerasyon modifikasyon içeren (fosforotiyoat) DNA yapısındaki Anti-Tat-4 dizisi Tablo 3.16.'da verilmiştir. Anti-Tat-4'ün CAT ekspresyonu üzerine etkilerini araştırmak üzere ASO 1 μ M, 3 μ M ve 5 μ M konsantrasyonlarda hücre kültüründe denendi. Doza bağlı olarak elde edilen yüzdesel CAT ekspresyonu verileri Grafik 4.4'de gösterilmiştir

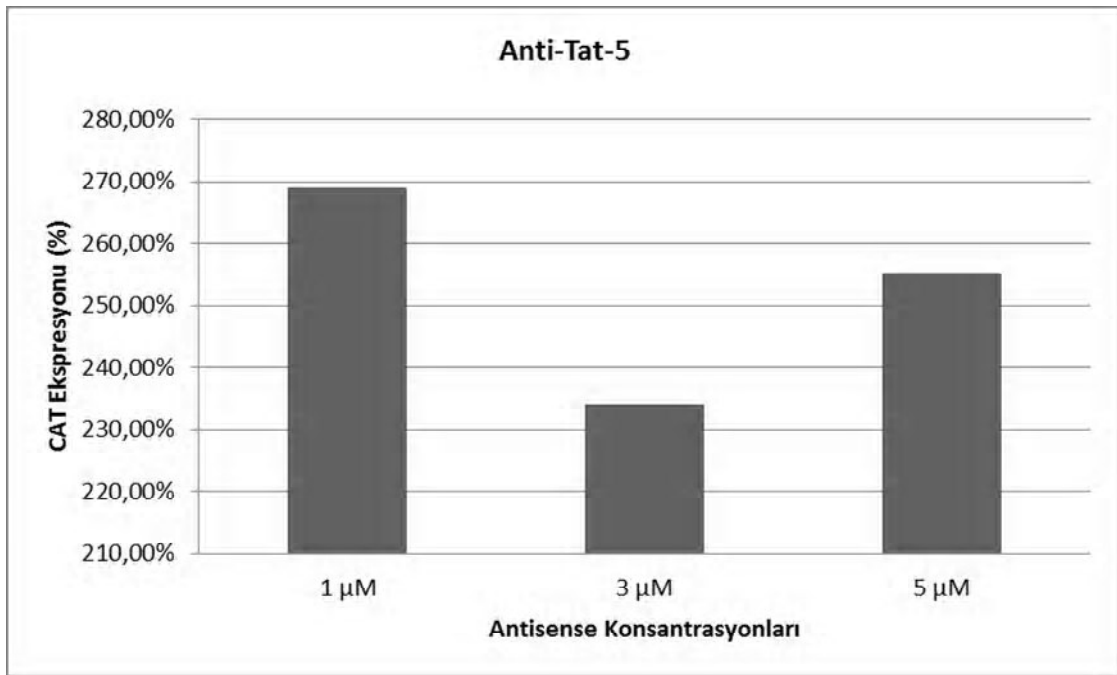


Grafik 4.4. Anti-Tat-4 oligonükleotidinin doza bağılı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkisi.

Etkisini araştırdığımız Anti-Tat-4 dizisi CAT ekspresyonunu sadece 5 µM konsantrasyonda inhibe etmiştir. ASO dozuna bağılı olarak CAT ekspresyonunda azalma gözlenmiştir. 1 µM konsantrasyonda % 63 CAT ekspresyonu artışı, 5 µM konsantrasyonda ise % 33 CAT ekspresyonu inhibisyonu gözlenmiştir. 3 µM konsantrasyonda CAT ekspresyonu üzerine herhangi bir etki gözlenmemiştir.

4.3.2.5. Anti-Tat-5

Tablo 3.16.'da verilen ASO'lerden DNA yapısındaki Anti-Tat-5 dizisinin CAT ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Birinci jenerasyon modifikasyon (fosforotiyoat) içeren bu ASO 5 µM konsantrasyonda hücre kültüründe denendi. Bu dozdaki denemelerden elde edilen yüzdesel CAT ekspresyonu verileri Grafik 4.5'de gösterilmiştir.

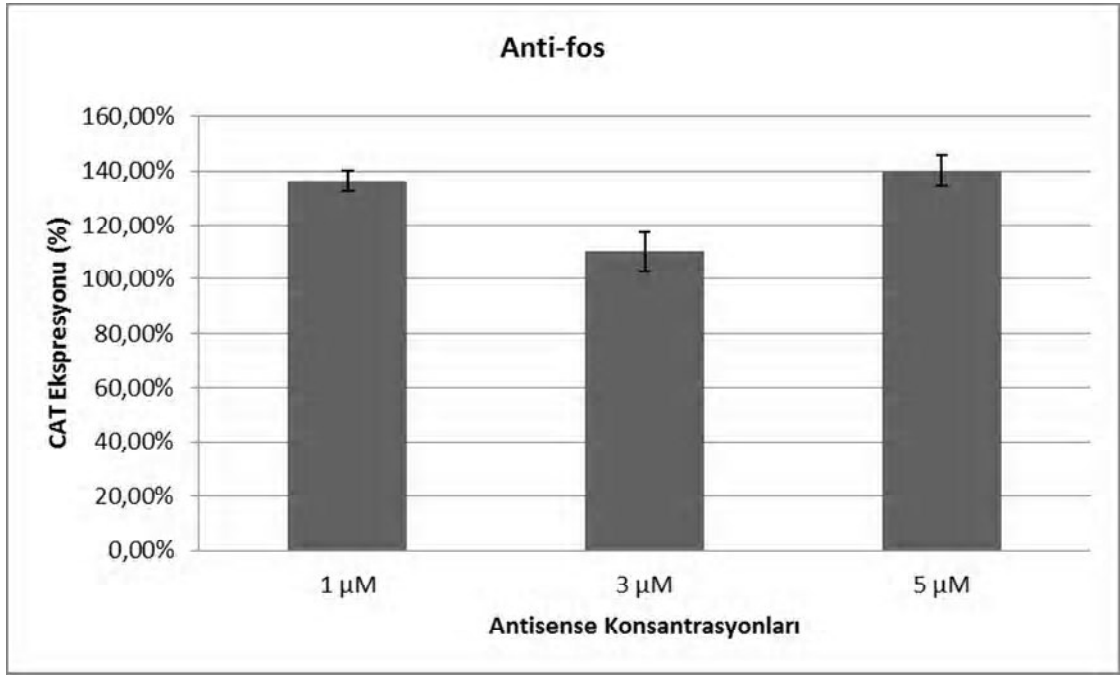


Grafik 4.5. Anti-Tat-5 oligonükleotidinin 5 µM konsantrasyonda üç farklı denemede elde edilen CAT ekspresyonu verileri.

5 µM konsantrasyondaki etkisini araştırdığımız Anti-Tat-5 dizisi, üç denemede de CAT ekspresyonu üzerine inhibe edici etki göstermedi. Bu nedenle Anti-Tat-5 düşük konsantrasyonlarda denenmedi. Birinci denemede %169, ikinci denemede %134 ve üçüncü denemede %155 CAT ekspresyonunda artış gözlemlendi.

4.3.2.6. Anti-Fos

Tablo 3.16.'da belirtilen ASO dizilerinden anti-fos dizisininin CAT ekspresyonu üzerine etkisi araştırıldı. Araştırılan dizi hücre kültüründe 1 µM, 3 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda denendi. Doza bağlı olarak elde edilen yüzdesel CAT ekspresyonu verileri Grafik 4.6'de gösterilmiştir.



Grafik 4.6. Anti-Fos oligonükleotidinin doza bağlı olarak CAT Ekspresyonu üzerine etkisi.

Anti-Fos dizisinin 1 µM, 3 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda CAT ekspresyonu üzerine inhibe edici etkisi gözlenmedi. 1 µM konsantrasyonda % 36, 3 µM konsantrasyonda % 10 ve 5 µM konsantrasyonda % 40 CAT ekspresyonu artışı gözlemlendi.

4.3.2.7. Antisens Oligonükleotidlerin Tat Aktivitesi Üzerine Etkilerinin Karşılaştırılması

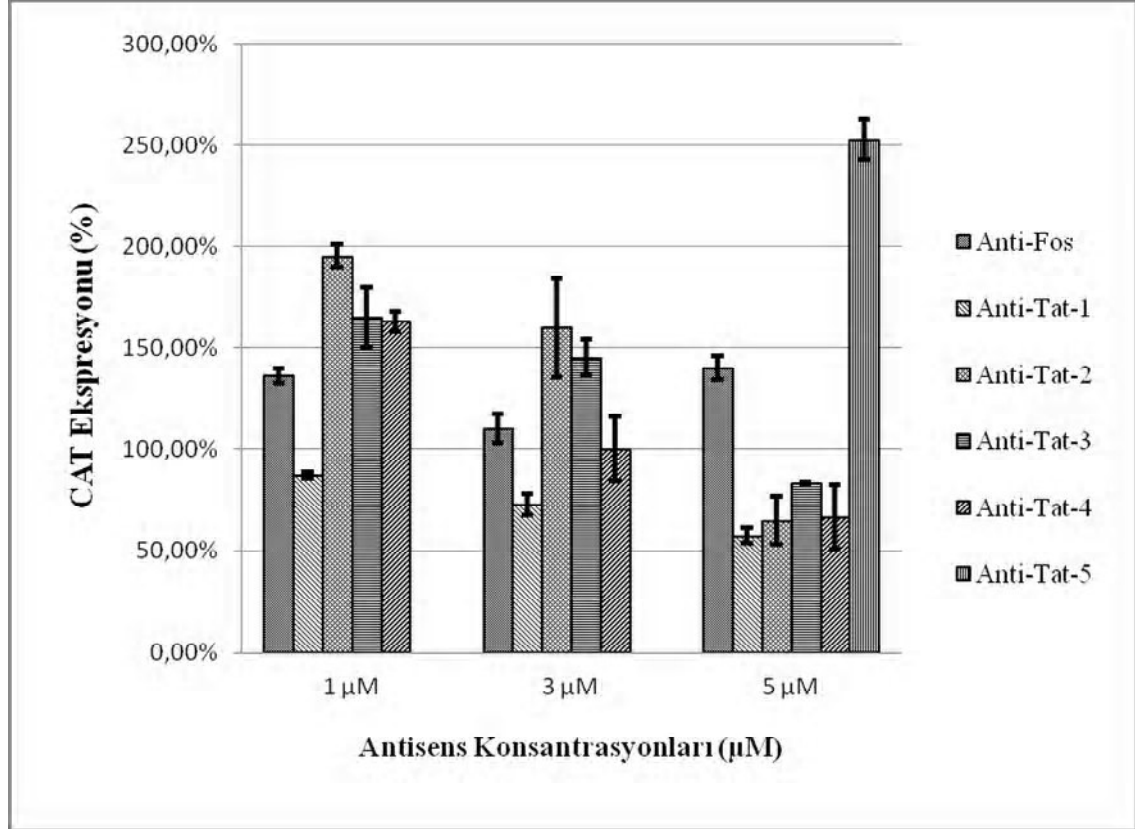
Araştırdığımız ASO'lerin 1 µM, 3 µM ve 5 µM dozlarında CAT ekspresyonu üzerine etkileri Grafik 4.7'de karşılaştırılmıştır.

1 µM konsantrasyonda Anti-Tat-1 dizisi CAT ekspresyonunu %13 oranında inhibe etmiştir. Aynı konsantrasyonda Anti-Tat-2 %95, Anti-Tat-3 %65, Anti-Tat-4 %63 ve Anti-Fos dizisi %36 oranında CAT ekspresyonunda artışa neden olmuştur.

3 µM konsantrasyonda Anti-Tat-1 dizisi %27 oranında CAT ekspresyonunu inhibe etmiştir. Bu konsantrasyonda Anti-Tat-2 %60, Anti-Tat-3 %45 ve Anti-Fos dizisi %10 oranında CAT ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Bu konsantrasyonda Anti-Tat-4'ün CAT ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir.

5 µM konsantrasyonda en yüksek inhibisyon Anti-Tat-1 dizisi ile elde edilmiştir. Aynı konsantrasyonda Anti-Tat-1 %43, Anti-Tat-2 %35, Anti-Tat-3 %16 ve Anti-Tat-4 %33 oranında CAT ekspresyonunu inhibe etmiştir. Anti-Tat-5 dizisi bu konsantrasyonda %153 CAT ekspresyonunda artışa neden olduğu için daha düşük konsantrasyonlarda

denenmemiştir. Aynı dozda Anti-Fos dizisi ise %40 oranında CAT ekspresyonu artışına neden olmuştur.



Grafik 4.7. Araştırdığımız ASO'lerin doza bağlı olarak CAT ekspresyonu üzerine etkilerinin karşılaştırılması.

1 µM ve 3 µM dozlarda CAT ekspresyonunda sekansa spesifik olmayan artışa neden olan Anti-Tat-2, Anti-Tat-3 ve Anti-Tat-4 dizilerinin ve bütün dozlarda CAT ekspresyonunu inhibe eden Anti-Tat-1'in artan dozlarına bağlı olarak CAT ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

4.4. SİTOTOKSİSİTE BULGULARI

Sitotoksosite tayini için ASO'ler transfekte edilmemiş hücrelerin bulunduğu kültüre en yüksek konsantrasyonda (5 µM) ilave edildi. 48 saatlik inkübasyondan sonra kuyucuklardaki hücreler tripan mavisi ile sayılarak PBS ve Tris EDTA kontrol grupları ve ASO deneme grupları için sayılan değerlerin ortalamaları alınarak elde edilen veriler Tablo 4.4.'de gösterilmiştir.

Tablo 4.4. Kontrol ve antisens gruplarının 48 saat inkübe edildikten sonra 1mL’de tespit edilen hücre sayıları.

Hücre Grupları		Canlı Hücre Sayısı
Kontrol	Tris EDTA	$3,3 \times 10^6$
Anti-Tat-1	Kol-3- TAC CTC GGT CAT -5'	$4,0 \times 10^6$
Anti-Tat-2	Kol-3- OMe(UAC CUC GGU CAU) -5'	$4,4 \times 10^5$
Anti-Tat-3	Kol-3- Fosforotiyoat (UAC CUC GGU CAU) -5'	$4,1 \times 10^6$
Anti-Tat-4	Kol-3- Fosforotiyoat (TAC CTC GGT CAT)-5'	$3,9 \times 10^6$
Anti-Tat-5	Kol-3- Fosforotiyoat (TAC CTC GGT CAT CTA)-5'	$4,2 \times 10^6$
Anti-Fos	Kol-3- TAC TAC AAG AGC CCA-5'	$3,4 \times 10^6$

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

HIV-1 ve AIDS halk sağlığını tehdid eden majör bir problemdir. WHO'nün (World Health Organisation) 2013 yılı verilerine göre dünya genelinde 35 milyon kişi HIV ile enfektendir ve her yıl yaklaşık 2 milyon kişi enfekte olmaktadır (178). HAART kombine ilaç tedavisinin geliştirilmesi HIV-1 enfeksiyonlarının morbidite ve mortalitesinde azalmaya neden olmuştur (111-113, 179). Ancak HAART, HIV-1 enfeksiyonunu tamamen elimine edemez. Bu nedenle hastaların ömür boyu HAART tedavisine devam etmesi gereklidir. Hastalara uygulanan HAART tedavisinin, hasta bireyin taşıdığı HIV-1 varyantları ile uyumlu olmaması, ilaçların uzun dönem kullanımı sonucunda kardiyovasküler riskde ve ilaç toksisitesinde artış, tedavi sırasında ilaca dirençli suşların ortaya çıkması ve ilaç tedavisi kesildiğinde viral yükün kısa sürede tedaviye başlamadan önceki seviyelere çıkması, alternatif tedavi seçeneklerinin araştırılmasına yol açmıştır (14-16). Bu süreçte geliştirilen çeşitli tedavi yaklaşımları arasında antisens teknolojisi kullanılarak yapılan çalışmalar da önem kazanmıştır. Antisens teknolojisi ile belirli bir gen hedeflenerek, Watson-Crick hibritleşme kuralları çerçevesinde hedefe selektif ilaçlar geliştirilebilir. Konvansiyonel ilaçların geliştirilmesinde karşılaşılan zorluklar, verimli şekilde ilaç geliştirilmesine olanak sağlayan antisens teknolojisine ilginin artmasına neden olmuştur (139). Ayrıca antisens oligonükleotidler (ASO) sekans bilgisinin direkt olarak kullanılabilirliği, geniş alanlarda uygulanabilirlik, hızlı ve düşük maliyetli üretim yapılabilmesi, başarı oranlarının ve spesifitelerinin yüksek olması gibi üstün özelliklere sahiptir (140).

ASO'ler, TAR RNA ve tat protein mRNA'sına yönelik sekans spesifik etkileşimleri nedeniyle potansiyel transaktivasyon inhibitörleri olarak bir çok çalışmada kullanılmıştır.

Demirhan ve arkadaşları (180), yaptıkları bir çalışmada, tat protein mRNA'sının 5' ucunda yer alan diziye komplementer, biri modifiye edilmemiş anti-tat (3'-TAC CTC GGT CAT CTA-5'), diğeri 3' ucunda kolesterol ile konjuge edilerek modifiye edilmiş lipofilik anti-tat-kol (Kol-3'-TAC CTC GGT CAT CTA-5') olan iki farklı antisens dizisinin tat aktivitesi üzerine etkilerini araştırmışlardır. Çalışmada Jurkat hücreleri kullanılmış olup hücreler tat ve rev genlerini içeren pCV1 ile HIV-1 LTR ve CAT genlerini içeren pC15CAT plazmidleri kullanılarak transfekte edilmiştir. Tat aracılı transaktivasyon HIV-1 LTR bölgesinin devamında bulunan CAT ekspresyonu ile ölçülmüştür. Bu çalışma iki türlü yapılmış ilkinde hücreler plazmidler ile transfekte edildikten sonra antisens diziler hücre kültürüne uygulanmış, 44 saat sonunda CAT ekspresyonu ölçülmüştür. Diğer denemede hücreler plazmidler ile transfekte edilip 24 saat beklenmiş daha sonra hücreler yıkanmış ve antisens diziler ile transfekte edilip 44 saat beklenmiştir. İlk çalışma sonucunda modifiye edilmemiş dizi ile 5 µM konsantrasyonda %30 inhibisyon gerçekleştiği, kolesterol ile modifiye edilmiş antisens dizisi ile ise %41 inhibisyon gerçekleştiğini göstermiştir. İkinci yöntem ile yapılan çalışmada ise anti-tat-kol dizisi ile 4 µM konsantrasyonda %96 inhibisyon gözlenmiştir.

Başka bir çalışmada Dinauer ve arkadaşları (181), hücre içine antisens dizinin transferini kolaylaştırmak için nanopartiküllerden faydalanmışlardır. Tat mRNA'sına özgü ASO'leri ve onların fosforotiyoat analoglarını (ASO-PTO) protamin ile kompleks yaptırılarak çapı yaklaşık 180 nm olan nanopartikül oluşturmuşlardır. Çalışmada Protamin/ASO nanopartikülünün antisens diziyi hücre içinde serbest bıraktığı ve inhibisyonun gerçekleştiği, bunun tam tersine Protamin/ASO-PTO nanopartikülünün 72 saat stabil kaldığı ve ASO-PTO bileşimini serbest bırakmadığı görülmüştür. Bu sonuçlar ışığında protamine/ASO nanopartikülünün, viral gen ekspresyonunun inhibe edilmesi amacıyla gelecekte uygulanacak terapötik yaklaşımlara katkıda bulunabileceği sonucuna varılmıştır.

Lo ve arkadaşlarının (182) yaptığı çalışmada, tat proteinini kodlayan mRNA'nın ilk ekson bölgesini spesifik olarak kesen anti-tat ribozimi oluşturulmuş, Moloney murine leukemia virüs (MMLV) vektörü kullanılarak jurkat hücrelerinin anti-tat RNA ribozimi

ile transdüksiyonu sağlanmıştır. Ayrıca oluşturulan ribozimin 48 nükleotidlik antisens bölgesinin (tat-antisens), retroviral vektör aracılığıyla jurkat hücrelerine transdüksiyonu sağlanmıştır. Bu işlemler sonucunda tat-antisens ve anti-tat RNA ribozimi üreten insan T-hücre hattı oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda hem tat-antisens üreten hücre grubu hem de anti-tat RNA ribozimi üreten hücre grubunun HIV-1 replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiş, HIV-1 replikasyonuna karşı antisens vektörün, anti-tat ribozim vektörüne göre daha dirençli olduğu gösterilmiştir.

Başka bir çalışmada Biasolo ve arkadaşları (183), anti-HIV-1 aktiviteye sahip antisense tRNA oluşturmayı amaçlamışlardır. Bu amaçla HIV-1 tat mRNA'sının iyi korunmuş ilk eksonunda bulunan 20 nükleotidlik bölge hedeflenmiş, tRNA^{pro}'nun antikodon ilmeğinde bulunan 9 nükleotidlik dizi, 20 nükleotidlik antisens dizisiyle değiştirilerek, antikodon ilmeğinde hedef bölgeye komplementer "anti-tat" antisens dizisi içeren ve 3' ucunda sonlanma sinyali taşıyan antisense tRNA oluşturulmuştur. Çalışmada dizayn edilen antisense tRNA'nın, hedef bölge ile spesifik olarak etkileştiği, retroviral vektör aracılığıyla transdüksiyon işlemi sonucunda anti-tat tRNA eksprese eden jurkat hücrelerinin HIV-1 enfeksiyonuna dirençli olduğu ve oluşturulan direncin antisens ekspresyonu seviyesi ile bağlantılı olduğu bildirilmiştir.

Chang ve arkadaşlarının (184) yaptığı başka bir çalışmada, antisens tat RNA eksprese eden vektörler aracılığıyla CD4+ hücrelerinin transfeksiyonu sonucunda tat protein ekspresyonunun inhibe edildiği, buna bağlı olarak HIV promotörünün transkripsiyonel aktivasyonunu engellendiği ve HIV-1 replikasyonunun %70 oranında inhibe edildiğini bildirmişlerdir. Ayrıca antisens tat RNA vektöründen farklı olarak ve polimerik TAR decoy yapısı (poly-TAR) kullanılarak ekstrasellüler tat aktivitesi inhibe edilse de viral gen ekspresyonu ve replikasyonun tam olarak bloke edilemediği, ancak antisens tat ve poly-TAR yapısı kombine edilerek uygulandığında HIV-1 gen ekspresyonu %94-98 oranında bloke edildiği bildirilmiştir.

Boden ve arkadaşlarının (185) yaptığı çalışmada, RNA girişimi (RNAi) prosesi aracılığıyla HIV-1 replikasyonunun post-transkripsiyonel inhibisyonu amaçlanmıştır. Çalışmada, HIV-1 tat mRNA'sını hedefleyen siRNA sekansı, insan miR-30 pre-mikro RNA (pre-miRNA) iskeletine entegre edilerek hücrelerde tat siRNA eksprese edilebilmiştir. Hücrelere pre-miRNA prekürsörü aracılığıyla aktarılan tat siRNA'nın, konvansiyonel shRNA (short hairpin RNA) aracılı siRNA ekspresyonuna göre HIV-1

p24 antijen üretimini inhibe etmede %80 daha efektif olduğu, bu sonuca göre HIV-1 spesifik siRNA'ların miR-30 prekürsör saç tokası aracılığıyla eksprese edilerek antiviral RNAi potansiyelinin arttırılabileceği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada, HIV-1 tat mRNA'sının birinci splay birleşme noktasında bulunan belirli bir sekansı (5'-AGAAUUGG-3') hedeflenerek antisense (3'-TCTTAACC-5') ve sense (5'-AGAATTGG-3') dizileri metilfosfonat modifikasyonu içerecek şekilde sentezlenmiştir. Çalışmada antisens oligodeoksiribonükleotidin syncytia oluşumunu engellediği, hem sense hem de antisens dizilerin HIV replikasyonunu doza bağlı olarak inhibe ettiği gösterilmiştir (186).

Donahue ve arkadaşlarının (187) yaptığı çalışmada potansiyel bir anti-HIV gen terapisi stratejisinin etkilerini araştırmak üzere primat modeli kullanılmıştır. Bir grup primatdan alınan CD4 lenfositlerine retroviral vektör aracılığıyla antisens tat ve rev genlerinin transferi gerçekleştirilmiştir. Daha sonra kontrol ve antiviral gen taşıyan primat modelleri SIV_{mac239} ile enfekte edilmiş, bir yıl boyunca enfeksiyonun ilerleyişi primatların kan ve lenf nodüllerinden alınan örneklerle takip edilmiştir. Antisens taşıyıcı vektör ile transfekte edilen lenfositlerin verildiği primat grubunun viral yükünün kontrol grubuna kıyasla hem periferik kan dolaşımında hem de lenf nodüllerinde anlamlı olarak azaldığı bildirilmiştir.

Çalışmalarda dikkat çeken diğer bir antisens oligonükleotid hedefi ise TAR-RNA dizileri olmuştur. Tat'ın TAR-RNA üzerinde bağlandığı bölgeye komplementer diziler aracılığıyla, Tat-TAR etkileşmesi engellenerek önemli bulgular elde edildiği görülmüştür (188-190).

Arzumanov ve arkadaşlarının (188) yaptığı bir çalışmada, HIV-1 TAR RNA'sının tat ile etkileştiği urasilce zengin çıkıntı (bulge) yapısı ve saç tokası sekansını kapsayan bölgeye komplementer 12 nükleotid uzunluğunda ve tamamı 2-OMe modifikasyonlu, sitozin rezidülerinde 5-propinil içeren 2-OMe modifikasyonlu, sitozin rezidülerinde LNA modifikasyonu içeren 2-OMe modifikasyonlu ve tamamı PNA modifikasyonlu eş dizilimli 4 farklı ASO, tat-TAR etkileşmesini inhibe etmek amacıyla HeLA hücrelerinde denenmiştir. Denenen bütün dizilerle konsantrasyona bağlı tat-TAR etkileşimi inhibisyonu tespit edilmiştir. Kimerik dizayn edilen ASO'ler, tamamı 2-OMe modifikasyonlu ASO'den daha yüksek inhibe edici etkiye sahip olduğu, en yüksek inhibe edici etkiyi PNA modifikasyonlu ASO'nun gösterdiği bildirilmiştir.

Başka bir çalışmada, TAR RNA hedeflenerek 16 bazlık anti-TAR nükleotidinin α -fosfodiester, fosforotiyoat, metilfosfonat, PNA, 2-OMe ve (N3'-P5') fosforamid analogları kullanılmıştır. Çalışmada PNA, 2-OMe ve (N3'-P5') fosforamid oligomerlerinin, modifiye edilmemiş ASO'ye kıyasla cDNA sentezini daha güçlü inhibe ettikleri, bu inhibisyonun mismatched kontrol oligonükleotid verilerine göre sekansa spesifik olduğu, 2-OMe ve (N3'-P5') fosforamid ASO'lerinin yüksek Tm dereceleri bu ASO'lerin cDNA sentezini güçlü bir şekilde inhibe etmesi ile uyumlu olduğu rapor edilmiştir (189).

Turner ve arkadaşlarının yaptığı çalışmada (190), TAR'nın 24.-35. saç tokası rezidülerinin hedeflendiği bir seri CPP (Cell Penetrating Peptide) ile konjuge 16 bazlık anti-TAR PNA analogları kullanılarak tat aracılı transaktivasyonun inhibe edilmesi amaçlanmıştır. Çalışma sonucunda disülfid içeren PNA konjugatlarından Transportan-PNA ve R₆-PNA, lusiferaz işaretleyici gen bölgesi entegre edilmiş HeLa hücrelerinde 24 saatlik inkübasyondan sonra doza bağlı olarak tat aracılı transaktivasyonun inhibe edildiği bildirilmiştir.

Antisens dizi anaologları ile yapılan çalışmalar yanında antisens peptidler kullanılarak da tat aktivitesi hedeflenmiştir. Choudhury ve arkadaşları (191) yaptıkları bir çalışmada, Tat proteininin TAR RNA'ya bağlanma bölgesinde bulunan bazik amino asit dizisini içeren peptid diziler kullanarak, Tat proteininin TAR RNA'ya bağlanmasını inhibe etmeye çalışmışlardır. Tat 10-Biotin adı verilen bu peptid yapılan çalışmada yüksek inhibisyon göstermiştir. Bu çalışmanın ışığında yapılan diğer bir araştırmada, başka bir bazik bölge antagonisti peptid, Tat 9K-Biyotin dizisi kullanılmış, bu dizi kullanımı ile de Tat'ın Tar RNA'ya bağlanma oranında yüksek oranda inhibisyon gözlenmiştir. Çalışma sonucunda elde edilen veriler göz önünde bulundurularak Tat proteininin TAR-RNA'ya bağlanma bölgesindeki bazik peptid dizisinin AIDS tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılabileceği sonucuna varılmıştır (192).

Tat'ın sisteince zengin bölgesi, bivalan (Zn⁺⁺ ve Cd⁺⁺) metallerle dimer oluşturarak HIV-1 LTR transaktivasyonunda rol alır (82). Chandra ve arkadaşlarının 1988 yılında yaptığı bir çalışmada (173), Tat'ın fonksiyonel sistein rezidüleri ile disülfid bağı kurarak, tat'ın bivalan metallerle dimer oluşturmasına engel olmak amacıyla, sistein amino asidinin analogu olan D-Penicillamin kullanılmıştır. Çalışmada HIV-1 transaktivasyon modeli oluşturularak, D-Penicillamin'in tat aktivitesi üzerine etkisi

araştırılmıştır. Bu amaçla Jurkat hücreleri, pCV1 ve pC15CAT plazmidleri kullanılarak DEAE Dextran metoduyla transfekte edilmiştir. Transfekte edilmiş hücrelerin, 40 µg/ml dozda D-Penicillamin ile 48 saat inkübe edilmesi sonucunda CAT aktivitesinin %90 inhibe edildiği rapor edilmiştir.

D-Penicillamin'in, tat'ın sistein rezidüleri ile reaksiyona girerek tat aktivitesini inhibe ettiğinin gösterilmesi üzerine Demirhan ve arkadaşlarının (193) sistein rezidülerini hedeflediği başka bir çalışmada, sülfidril grubu taşıyan farklı bileşiklerin tat proteini aracılı HIV-1-LTR transaktivasyonu üzerine etkilerini incelenmiştir. N-(2-merkaptopropiyonil)glisin (MPG), 2,3-dimerkaptopropanol (DMP) ve 2,3-dimerkaptopropan sulfonik asit (DMPS) bileşikleri Jurkat ve U937 hücrelerinde denenmiştir. Çalışmada DMP jurkat hücrelerinde %50, U937 hücrelerinde %80 inhibisyon göstermiştir. DMPS'nin U937 hücreleri üzerine inhibe edici etkisi gözlenmemiş, jurkat hücrelerinde ise %50 transaktivasyon inhibisyonu tespit edilmiştir. MPG ise viral antijen ekspresyonunu %70 inhibe etmiştir. H9-hücreleri ile yapılan araştırmalarda DMP ve DMPS'nin denenilen konsantrasyonda yüksek oranda sitotoksik olduğu, MPG'nin ise yüksek deneme dozuna rağmen sitotoksik olmadığı rapor edilmiştir.

Fraisier ve arkadaşlarının (194) yaptığı çalışmada, bazı mutant tat proteinlerinin HIV replikasyonu üzerine etkileri araştırılmıştır. Bu amaçla wild tip tat'ın 58. rezidüsünden itibaren karboksi terminalinin çıkarılarak oluşturulan Tat delta 58, Tat'ın 53. rezidüsünden itibaren karboksi terminaline kadar çıkarılmış formu (Tat delta 53) ve Tat delta 53 ile Drosophila Engrailed (eng) transkripsiyon represör bölgesi arasında füzyon gerçekleştirilerek oluşturulan Tat delta 53/Eng mutant proteinleri kullanılmıştır. Füzyon mutanti, eng kaynaklı transkripsiyonel baskılamanın, HIV-1 promotörüne uygulanabilirliğini test etmek amacıyla oluşturulmuştur. Çalışma sonucunda bütün mutantların HIV-1 replikasyonu inhibe ettiği, Tat delta 58 ve tat delta 53/eng mutantlarının inhibisyon potansiyelinin anlamlı olarak yüksek olduğu, bu nedenle tat mutantlarının basic domainini bütünüyle içermesinin veya represör bölge içermesinin HIV-1 replikasyonu inhibisyonunu arttırabileceği bildirilmiştir.

Çalışmamızda Jurkat hücrelerine, tat ve rev geni içeren pCV1 plazmidini ile HIV-1 LTR ve CAT işaret genini içeren pC15CAT plazmidleri DEAE-dextran metodu kullanılarak transfekte edilmiştir (174). Kullandığımız plazmidler Arya ve arkadaşlarının yaptığı

çalışmadan faydalanarak seçilmiştir (172). ASO'lerin Tat aktivitesi üzerine etkilerini araştırmak amacıyla, ASO'ler plazmid transfeksiyonu yapılmış jurkat hücre kültürüne 1 µM, 3 µM ve 5 µM konsantrasyonlarda ilave edildikten sonra hücre kültürü 48 saat inkübe edilmiş, inkübasyon süresi sonunda oluşan CAT enzim ekspresyonu CAT ELISA kiti aracılığıyla tespit edilmiştir.

Bu çalışmada elde edilen bulgulara göre, 1 µM konsantrasyonda Anti-Tat-1 dizisi CAT ekspresyonunu %13 oranında inhibe etmiştir. Aynı konsantrasyonda Anti-Tat-2 %95, Anti-Tat-3 %65, Anti-Tat-4 %63 ve Anti-Fos dizisi %36 oranında CAT ekspresyonunu arttırmıştır.

3 µM konsantrasyonda Anti-Tat-1 dizisi %27 oranında CAT ekspresyonunu inhibe etmiştir. Bu konsantrasyonda Anti-Tat-2 %60, Anti-Tat-3 %45 ve Anti-Fos dizisi %10 oranında CAT ekspresyonunda artışa neden olmuştur. Bu konsantrasyonda Anti-Tat-4'ün CAT ekspresyonu üzerine herhangi bir etkisi gözlenmemiştir.

5 µM konsantrasyonda en yüksek inhibisyon Anti-Tat-1 dizisi ile elde edilmiştir. Aynı konsantrasyonda Anti-Tat-1 %43, Anti-Tat-2 %35, Anti-Tat-3 %16 ve Anti-Tat-4 %33 oranında CAT ekspresyonunu inhibe etmiştir. Aynı dozda Anti-Fos dizisi ise %40 oranında CAT ekspresyonu artışına neden olmuştur. Anti-Tat-5 dizisi bu konsantrasyonda %153 CAT ekspresyonunda artışa neden olduğu için daha düşük konsantrasyonlarda denenmemiştir. Çalışmamızda etkisini araştırdığımız Anti-tat-5 dizisi Demirhan ve arkadaşlarının (180) kullandığı anti-tat-kol dizisi ile aynı dizilime sahiptir. Modifikasyon içermeyen Anti-tat-kol dizisinden farklı olarak Anti-Tat-5 dizisi, yapısında fosforotiyoat modifikasyonu içermektedir.

Çalışmada tespit edilen CAT ekspresyonundaki sekansa spesifik olmayan artışların, ASO'lerin hücrel proteinlerle etkileşimi sonucu ortaya çıktığı düşünülmektedir.

1 µM ve 3 µM dozlarda CAT ekspresyonunda sekansa spesifik olmayan artışa neden olan Anti-Tat-2, Anti-Tat-3 ve Anti-Tat-4 dizilerinin ve bütün dozlarda CAT ekspresyonunu inhibe eden Anti-Tat-1'in artan dozlarına bağlı olarak CAT ekspresyonunda azalma gözlenmiştir.

Sitotoksiste testinde elde edilen bulgular göz önüne alındığında sadece OMe modifikasyonlu Anti-Tat-2'nin hücreler üzerinde toksik etki yarattığı anlaşılmıştır.

En yüksek CAT ekspresyonu inhibisyonu, 5 µM dozda CAT ekspresyonunu %43 inhibe eden Anti-Tat-1 dizisi ile elde edilmiştir. Sitotoksiste testi sonucu hücreler üzerinde

toksik etki yarattığı tespit edilen Anti-Tat-2 ise aynı dozda CAT ekspresyonunu %35 inhibe etmiştir.

Bu çalışmada, antisens oligonükleotid teknolojisi kullanılarak Tat aktivitesinin inhibe edilebileceği gösterilmiştir. Tat geninin farklı korunmuş bölgeleriyle etkileşim gösterebilecek farklı dizilime ve modifikasyonlara sahip sitotoksik olmayan ASO'lerin dizayn edilmesinin, tat aktivitesinin daha efektif olarak inhibe edilmesinde ve alternatif AIDS tedavilerinin geliştirilmesinde önemli olacağı düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS (UNAIDS) and World Health Organization (WHO) 2007.
2. Costin MJ. Cytopathic Mechanisms of HIV-1. *Virology* 2007; 4:100.
3. Calnan BJ, Biancalana S, Hudson D, et al. Analysis of arginine-rich peptides from the HIV Tat protein reveals unusual features of RNA-protein recognition, *Genes Dev* 1991; 5: 201-210.
4. Turner BG, Summers MF. Structural Biology of HIV. *JM Biol* 1999; 285: 1-32.
5. Noonan D, Albin A. From the outside in: Extracellular activities of HIV Tat. *Adv Pharmacol* 2000; 48: 229-50.
6. Westendorp MO, Frank R, Ochsenbauer C. et al. Sensitization of T cells to CD95-mediated apoptosis by HIV-1 Tat and gp120. *Nature* 1995; 375: 497-500.
7. Ghezzi S, Noonan DM, Aluigi MG et al. Inhibition of CXCR4-dependent HIV-1 infection by extracellular HIV-1 Tat. *Biochem Biophys Res Commun* 2000; 270: 992-6.
8. Liu Y, Jones M, Hingtgen CM et al. Uptake of HIV-1 tat protein mediated by low-density lipoprotein receptor-related protein disrupts the neuronal metabolic balance of the receptor ligands. *Nat Med* 2000; 6: 1380-7.
9. Tyagi M, Rusnati M, Presto M, Giacca M. Internalization of HIV-1 Tat requires cell surface heparan sulfate proteoglycan. *J Biol Chem* 2001; 276: 3254-61.
10. Dewhurst S, Gelbard HA, Fine SM. Neuropathogenesis of AIDS. *Mol Med Today* 1996; Ocak: 16-23.
11. Nielsen MH, Pedersen FS, Kjems J. Molecular Strategies To Inhibit HIV-1 Replication. *Retrovirology* 2005; 2: 10.

12. Karn J. Tackling Tat. *J Mol Biol* 1999; 293: 235-25.
13. Gottfredsson M, Bohjanen PR. *Front Biosci* 1997; 2: 619-634.
14. May MT, Sterne JA, Costagliola D et al. HIV treatment response and prognosis in Europe and North America in the first decade of highly active antiretroviral therapy: A collaborative analysis. *Lancet* 2006; 368: 451-458
15. Clotet B. Strategies for overcoming resistance in HIV-1 infected patients receiving HAART. *AIDS Rev* 2004; 6: 123-130.
16. Marcello A, Lusic M, Pegoraro G et al. Nuclear organization and the control of HIV-1 transcription. *Gene* 2004; 326: 1-11.
17. Gillespie D, Spiegelman S. A quantitative assay for DNA-RNA hybrids with DNA immobilized on a membrane. *J Mol Biol* 1965; 12: 829-842.
18. Thompson JD, Gillespie D. Current concepts in quantitative molecular hybridization. *Clin Biochem* 1990; 23: 261-266.
19. Crooke ST. Progress in antisense technology. *Annu Rev Med* 2004; 55: 61-95.
20. Klug SW, Cummings RM. *Genetik Kavramlar*. Palme Yayıncılık 2002; 372-373.
21. Wu H, Lima WF, Zhang H et al. Determination of the role of the human RNase H1 in the pharmacology of DNA-like antisense drugs. *J Biol Chem* 2004; 279: 17181-189.
22. Andronescu M, Zhang ZC, Condon A. Secondary structure prediction of interacting RNA molecules. *J Mol Biol* 2005; 345: 987-1001.
23. Kurreck J. Antisense technologies. Improvement through novel chemical modification. *Eur J Biochem* 2003; 270: 1628-44.
24. Agrawal N, Dasaradhi PVN, Mohammed A et al. RNA interference: Biology, mechanism, and applications. *Micbiol Mol Biol Rev* 2003; 67(4): 657-685.
25. Karaboz İ, Çolak C. Antisens Teknolojisi, *OrLab Online Mikrobiyoloji Dergisi* 2007; 2: 14-37.
26. Sierra S, Kupfer B, Kaiser R. Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *J Clin Virol* 2005; 34: 233-244.
27. Greene WC. A history of AIDS: Looking back to see ahead. *Eur J Immunol* 2007; 37: 94-102.
28. Clavel F, Guetard D, Brun-Vezinet F, et al. Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science* 1986; 233: 343-346.

29. Chakrabarti L, Guyader M, Alizon M, et al. Sequence of simian immunodeficiency virus from macaque and its relationship to other human and simian retroviruses. *Nature* 1987; 328: 543-547.
30. Huet T, Cheynier R, Meyerhans A, Roelants G, Wain-Hobson S. Genetic organization of a chimpanzee lentivirus related to HIV-1. *Nature* 1990; 345: 356-359.
31. Hirsch VM, Olmsted RA, Murphey-Corb M, Purcell RH, Johnson PR. An African primate lentivirus (SIVsm) closely related to HIV-2. *Nature* 1989; 339: 389-392.
32. Sharp PM, Hahn BH. Origins of HIV and the AIDS pandemic. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2011; 1: a006841.
33. Heeney JL, Dalgleish AG, Weiss RA. Origins of HIV and the evolution of resistance to AIDS. *Science* 2006; 313: 462-466.
34. De Leys R, Vanderborght B, Vanden Haesevelde M, et al. Isolation and partial characterization of an unusual human immunodeficiency retrovirus from two persons of west-central African origin. *J Virol* 1990; 64: 1207-1216.
35. Greene WC. AIDS and the immune system. *Sci Am* 1993; 269: 98-105.
36. Sundquist WI, Kräusslich HG. HIV-1 Assembly, Budding, and Maturation. *Cold Spring Harb Perspect Med* 2012: a006924.
37. Fanales-Belasio E, Raimondo M, Suligoj B, Buttò S. HIV virology and pathogenetic mechanisms of infection: a brief overview. *Ann Ist Super Sanita* 2010; 46: 5-14.
38. Gallo R, Wong-Staal F, Montagnier L, et al. HIV/HTLV gene nomenclature. *Nature* 1988; 333: 504.
39. Lever AML. HIV: the virus. *Medicine* 2009; 37: 313-316.
40. Pereira LA, Bentley K, Peeters A, Churchill MJ, Deacon NJ. A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 663-668.
41. Gaynor R. *AIDS*. 1992; 6: 347-363.

42. Krebs FC, Hogan TH, Quiterio SJ, Gartner S, Wigdahl B. Lentiviral LTR-directed expression, sequence variation, and disease pathogenesis. In: HIV Sequence Compendium 2001. Kuiken CL, Foley B, Hahn B, Korber B, McCutchan F, Marx PA, Mellors JW, Sodroski J, Wolinsky S. Theoretical Biology and Biophysics Group, Los Alamos National Laboratory: Los Alamos NM. 2001: 1-42.
43. Groen JN, Morris KV. Chromatin, Non-Coding RNAs, and the Expression of HIV. *Viruses*, 2013; 5: 1633-1645.
44. Jones KA, Peterlin BM. Control of RNA initiation and elongation at the HIV-1 promoter. *Annu Rev Biochem* 1994; 63: 717-743.
45. Majello B, Luca P, Hagen G, Suske G, Lania L. Different members of the Sp1 multigene family exert opposite transcriptional regulation of the long terminal repeat of HIV-1. *Nucleic Acids Res* 1994; 22: 4914-4921.
46. Graeble MA, Churcher MJ, Lowe AD, Gait MJ, Karn J. Human immunodeficiency virus type 1 transactivator protein, Tat, stimulates transcriptional read-through of distal terminator sequences in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 6184-6188.
47. Bryant M, Ratner L. Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 523-527.
48. Gottlinger 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 USA* 1989; 86: 5781-5785.
49. Gallay P, Swingler S, Song J, et al. HIV nuclear import is governed by the phosphotyrosine-mediated binding of matrix to the core domain of integrase. *Cell* 1995; 83: 569-576.
50. Lewis P, Hensel M, Emerman M. Human immunodeficiency virus infection of cells arrested in the cell cycle. *EMBO J* 1992;11: 3053-3058.
51. De Iaco A, Luban J. Cyclophilin A promotes HIV-1 reverse transcription but its effect on transduction correlates best with its effect on nuclear entry of viral cDNA. *Retrovirology* 2014; 11:11.

52. Poznansky M, Lever A, Bergeron L, et al. Gene transfer into human lymphocytes by a defective human immunodeficiency virus type 1 vector. *J Virol* 1991; 65: 532-536.
53. Von Schwedler UK, Stuchell M, Müller B, et al. "The protein network of HIV budding". *Cell* 2003; 114: 701-13.
54. Jacks T, Power MD, Masiarz FR. Characterization of ribosomal frameshifting in HIV-1 Gag-Pol expression. *Nature* 1988; 331: 280-283.
55. Dyda F, Hickman AB, Jenkins MT, et al. Crystal structure of the catalytic domain of HIV-1 integrase: similarity to other polynucleotidyl transferases. *Science* 1994; 266: 1981-1986.
56. Cai M, Zheng R, Caffrey M, et al. Solution structure of the N-terminal zinc binding domain of HIV-1 integrase. *Nature Struct Biol* 1997; 4: 567-577.
57. Low A, Muesing MA. Understanding and inhibiting integrase in the treatment of HIV disease. *PRN Notebook* 2006; 11: 6-11.
58. Pryciak PM, Varmus HE. Nucleosomes, DNA-binding proteins, and DNA sequence modulate retroviral integration target site selection. *Cell* 1992; 69: 769-780.
59. Wlodawer A, Erickson JW. Structure-based inhibitors of HIV-1 proteinase. *Annu Rev Biochem* 1993; 62: 543-585.
60. Miller M, Schneider J, Sathyanarayana BK, et al. Structure of a complex of synthetic HIV-1 protease with a substrate-based inhibitor at 2.3 Å resolution. *Science* 1989; 246, 1149- 1152.
61. Kim EE, Navia MA, Baker CT et al. Crystal structure of HIV-1 protease in complex with VX-478, a potent and orally bioavailable inhibitor of the enzyme *J Am Chem Soc* 1995; 117: 1181-1182.
62. Kohlstaedt LA, Wang J, Friedman JM, Rice PA, Steitz TA. Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science* 1992; 256: 1783-1790.
63. Sarafianos SG, Marchand B, Das K, et al. Structure and Function of HIV-1 Reverse Transcriptase: Molecular Mechanisms of Polymerization and Inhibition. *J Mol Biol* 2009; 385: 693-713.

64. Huang H, Chopra R, Verdine GL, Harrison SC. Structure of a covalently trapped catalytic complex of HIV-1 reverse transcriptase: implications for drug resistance. *Science* 1998; 282: 1669-1675.
65. Capon DJ, Ward RH. The CD4-gp120 interaction and AIDS pathogenesis. *Annu Rev Immunol* 1991; 9: 649-78.
66. Bernstein HB, Tucker SP, Kar SR, et al. Oligomerization of the hydrophobic heptad repeat of gp41. *J Virol* 1995; 69: 2745-50.
67. Yuan T, Li J, Zhang MY. HIV-1 Envelope Glycoprotein Variable Loops Are Indispensable for Envelope Structural Integrity and Virus Entry. *PloS one* 2013; 8: e69789.
68. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, et al. HIV-1 entry cofactor: Functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 1996; 272: 872-877.
69. Geijtenbeek TB, Kwon DS, Torensma R, et al. DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells. *Cell* 2000; 100: 587-97.
70. Camerini D, Seed B. A CD4 domain important for HIV-mediated syncytium formation lies outside the virus binding site. *Cell* 1990 ;60: 747-754.
71. Malim MH, Hauber J, Le SY, et al. The HIV-1 rev trans-activator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989; 338: 254-257.
72. Felber BK, Drysdale CM, Pavlakis GN. Feedback regulation of human immunodeficiency virus type 1 expression by the Rev protein. *J Virol* 1990; 64: 3734-3741.
73. Fischer U, Huber J, Boelens WC, et al. The HIV-1 Rev activation domain is a nuclear export signal that accesses an export pathway used by specific cellular RNAs. *Cell* 1995; 82: 475-483.
74. Charnay N, Ivanyi-Nagy R, Soto-Rifo R, et al. Mechanism of HIV-1 Tat RNA translation and its activation by the Tat protein. *Retrovirology* 2009; 6: 74.

75. Lin X, Irwin D, Kanazawa S, et al. Transcriptional profiles of latent human immunodeficiency virus in infected individuals: effects of Tat on the host and reservoir. *J Virol* 2003; 77: 8227-8236.
76. Rusnati M, Presta M. HIV-1 Tat protein A target for the development of anti-AIDS therapies. *Drug Future* 2002; 27: 481-493.
77. Watson, K, Edwards RJ. HIV-1-trans-activating (Tat) protein: both a target and a tool in therapeutic approaches. *Biochem Pharm* 1999; 58, 1521-1528.
78. Kuppuswamy M, Subramanian T, Srinivasan A, et al. Multiple functional domains of Tat, the trans-activator of HIV-1, defined by mutational analysis. *Nucl Acids Res* 1989; 17: 3551-3561.
79. Villet S, Bouzar BA, Morin T, et al. Maedi-visna virus and caprine arthritis encephalitis virus genomes encode a Vpr-like but no Tat protein. *J Virol* 2003; 77.17: 9632-9638.
80. Loret EP, Vives E, Ho PS et al. Activating region of HIV-1 Tat protein: vacuum UV circular dichroism and energy minimization. *Biochemistry* 1991; 30: 633-640.
81. Hamy F, Brondani V, Florsheimer A, et al. A new class of HIV-1 Tat antagonist acting through Tat-TAR inhibition. *Biochemistry* 1998; 37: 5086-5095.
82. Dingwall C, Ernberg I, Gait MJ, et al. HIV-1 tat protein stimulates transcription by binding to a U-rich bulge in the stem of the TAR RNA structure. *Embo J* 1990; 9: 4145-153.
83. Cordingley MG, LaFemina RL, Callahan PL, et al. Sequencespecific interaction of Tat protein and Tat peptides with the transactivation-responsive sequence element of human immunodeficiency virus type 1 in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 1990; 87: 8985-8989.
84. Wei P, Garber ME, Fang SM, et al. A novel CDK9-associated C-type cyclin interacts directly with HIV-1 Tat and mediates its high-affinity, loop-specific binding to TAR RNA. *Cell* 1998; 92: 451-462.
85. Richter S, Cao H, Rana TM. Specific HIV-1 TAR RNA loop sequence and functional groups are required for human cyclin T1-Tat-TAR ternary complex formation. *Biochemistry* 2002; 41: 6391-6397.

86. Yuguang M, Gerhard S. Conformational dynamics of RNA-peptide binding: a molecular dynamics simulation study. *Biophys J* 2006; 90.2: 391-399.
87. Zhou Q, Sharp PA. Novel mechanism and factor for regulation by HIV-1 Tat. *Embo J* 1995; 14: 321-328.
88. Strebel K. Virus-host interactions: role of HIV proteins Vif, Tat, and Rev. *Aids* 2003; 17: 25-34.
89. Garber ME, Jones KA. HIV-1 Tat: coping with negative elongation factors. *Curr Opin Immunol* 1999; 11: 460-465.
90. Dahmus ME. Phosphorylation of the C-terminal domain of RNA polymerase II. *Biochim Biophys Acta* 1995; 1261: 171-182.
91. Peng J, Zhu Y, Milton JT, et al. Identification of multiple cyclin subunits of human P-TEFb. *Genes Dev* 1998; 12: 755-762.
92. Bieniasz PD, Grdina TA, Bogerd HP, et al. Recruitment of a protein complex containing Tat and cyclin T1 to TAR governs the species specificity of HIV-1 Tat. *Embo J* 1998; 17: 7056-7065.
93. Col E, Caron C, Seigneurin-Berny D, et al. The histone acetyltransferase, hGCN5, interacts with and acetylates the HIV transactivator, Tat. *J Biol Chem* 2001; 276: 28179-28184.
94. Huo L, Li D, Sun X, et al. Regulation of Tat acetylation and transactivation activity by the microtubule-associated deacetylase HDAC6. *J Biol Chem* 2011; 286: 9280-9286.
95. Zheng YH, Irwin D, Kurosu T, et al. Human APOBEC3F is another host factor that blocks human immunodeficiency virus type 1 replication. *J Virol* 2004; 78.11: 6073-6076.
96. Barraud P, Paillart JC, Marquet R. Advances in the structural understanding of Vif proteins *Curr HIV Res* 2008; 6: 91-99.
97. Nomaguchi M, Fujita M, Adachi A. Role of HIV-1 Vpu protein for virus spread and pathogenesis. *Microbes Infect* 2008; 10: 960-7.
98. Cordes F, Kukol A, Forrest LR, et al. The structure of the HIV-1 Vpu ion channel: Modelling and simulation studies. *Biochimica et Biophysica Acta* 2000; 1512: 291-298.

99. Re F, Braaten D, Franke EK, Luban J. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr arrests the cell cycle in G2 by inhibiting the activation of p34cdc2-cyclin B. *J Virol* 1995; 69: 6859-64.
100. Bourbigot S, Beltz H, Denis J, et al. The C-terminal domain of the HIV-1 regulatory protein Vpr adopts an antiparallel dimeric structure in solution via its leucine-zipper-like domain. *Biochem J* 2005; 387: 333-341.
101. Raney A, Shaw AY, Foster JL, Garcia JV. Structural constraints on human immunodeficiency virus type 1 Nef function. *Virology* 2007; 368: 7-16.
102. Roeth JF, Williams M, Kasper MR, Filzen TM, Collins KL. HIV-1 Nef disrupts MHC-I trafficking by recruiting AP-1 to the MHC-I cytoplasmic tail. *J Cell Biol* 2004; 167: 903-13.
103. Stevenson M. HIV-1 pathogenesis. *Nat Med* 2003; 9.7: 853-860.
104. Melikyan GB. Common principles and intermediates of viral protein-mediated fusion: the HIV-1 paradigm. *Retrovirology* 2008; 5: 111.
105. Suzuki Y, Suzuki Y. *Gene Regulatable Lentiviral Vector System*. 2011; ISBN: 978-953-307-539-6.
106. Arhel N. Revisiting HIV-1 uncoating. *Retrovirology* 2010; 7: 96.
107. Basu VP, Song M, Gao L, et al. Strand transfer events during HIV-1 reverse transcription. *Virus Res* 2008; 134: 19-38.
108. Ono A. Relationships between plasma membrane microdomains and HIV-1 assembly. *Biol Cell* 2010; 102: 335-350.
109. Wu X, Liu H, Xiao H, et al. Functional RT and IN incorporated into HIV-1 particles independently of the Gag/Pol precursor protein. *Embo J* 1997; 16: 5113-5122.
110. Vogt VM. Proteolytic processing and particle maturation. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; 214: 95-131.
111. Collier AC, Coombs RW, Schoenfeld DA, et al. Treatment of human immunodeficiency virus infection with saquinavir, zidovudine, and zalcitabine. AIDS Clinical Trials Group. *N Engl J Med* 1996; 334: 1011-1017.

112. D'Aquila RT, Hughes MD, Johnson VA, et al. Nevirapine, zidovudine, and didanosine compared with zidovudine and didanosine in patients with HIV-1 infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. National Institute of Allergy and Infectious Diseases AIDS Clinical Trials Group Protocol 241 Investigators. *Ann Intern Med* 1996; 124: 1019-1030.
113. Staszewski S, Miller V, Rehmert S, et al. Virological and immunological analysis of a triple combination pilot study with zidovudine, lamivudine and zalcitabine in HIV-1-infected patients. *AIDS* 1996; 10: 1-7.
114. Autran B, Carcelain G, Li TS, et al. Positive effects of combined antiretroviral therapy on CD4+ T cell homeostasis and function in advanced HIV disease. *Science* 1997; 277: 112-116.
115. Finzi D, Blankson J, Siliciano JD et al. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat Med* 1999; 5: 512-517.
116. Ji JP, Loeb LA. Fidelity of HIV - 1 reverse transcriptase copying RNA in vitro. *Biochemistry* 1992; 31: 954-8.
117. Bishop KN, Holmes RK, Sheehy AM, Malim MH. APOBEC - mediated editing of viral RNA. *Science* 2004; 305: 645.
118. Desterro JM, Keegan LP, Lafarga M, et al. Dynamic association of RNA - editing enzymes with the nucleolus. *J Cell Sci.* 2003; 116: 1805-18.
119. U.S. FDA, 25/09/2014, Antiretroviral Drugs Used in the Treatment of HIV Infection, <http://www.fda.gov/forpatients/illness/hivaids/treatment/ucm118915.htm> (Erişim Tarihi 25/10/2014)
120. Richman DD. HIV chemotherapy. *Nature* 2001; 410: 995-1001.
121. Boyer PL, Sarafianos SG, Arnold E, Hughes SH. Selective excision of AZTMP by drug-resistant human immunodeficiency virus reverse transcriptase. *J Virol* 2001; 75: 4832-4842.
122. Marcelin AG, Delaugerre C, Wirden M, et al. Thymidine analogue reverse transcriptase inhibitors resistance mutations profiles and association to other

- nucleoside reverse transcriptase inhibitors resistance mutations observed in the context of virological failure. *J Med Virol* 2004; 72: 162-165.
123. Quan Y, Gu Z, Li X, et al. Endogenous reverse transcription assays reveal high-level resistance to the triphosphate of (-)2'-dideoxy-3'-thiacytidine by mutated M184V human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* 1996; 70: 5642-5645.
 124. Garcia-Lerma JG, MacInnes H, Bennett D, et al. A novel genetic pathway of human immunodeficiency virus type 1 resistance to stavudine mediated by the K65R mutation. *J Virol* 2003; 77: 5685-5693.
 125. Spence RA, Kati WM, Anderson KS, Johnson KA. Mechanism of inhibition of HIV-1 reverse transcriptase by nonnucleoside inhibitors. *Science* 1995; 267: 988-993.
 126. Sluis-Cremer N, Temiz NA, Bahar I. Conformational changes in HIV-1 reverse transcriptase induced by nonnucleoside reverse transcriptase inhibitor binding. *Curr HIV Res* 2004; 2: 323-332.
 127. de Béthune MP. Non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs), their discovery, development, and use in the treatment of HIV-1 infection: a review of the last 20 years (1989-2009). *Antiviral res* 2010; 85: 75-90.
 128. Lambert DM, Petteway SR, McDanal CE et al. Human immunodeficiency virus type 1 protease inhibitors irreversibly block infectivity of purified virions from chronically infected cells. *Antimicrob. Agents Chemother* 1992; 36.5: 982-988.
 129. Shafer RW, Dupnik K, Winters MA, Eshleman SH. A guide to HIV-1 reverse transcriptase and protease sequencing for drug resistance studies. *HIV sequence compendium* 2000:1.
 130. Condra JH, Schleif WA, Blahy OM et al. In vivo emergence of HIV-1 variants resistant to multiple protease inhibitors, *Nature* 1995; 374: 569.
 131. Grobler JA, Stillmock K, Hu B, et al. Diketo acid inhibitor mechanism and HIV-1 integrase: Implications for metal binding in the active site of phosphotransferase enzymes. *Proc Natl Acad Sci* 2002; 99: 6661-6666.

132. Hare S, Vos AM, Clayton RF, et al. Molecular mechanisms of retroviral integrase inhibition and the evolution of viral resistance. *Proc Natl Acad Sci* 2010; 107: 20057-20062.
133. Perros M. CCR5 antagonists for the treatment of HIV infection and AIDS. *Adv Antiviral Drug Des* 2007: 185-212.
134. Pugach P, Marozsan AJ, Ketas TJ, et al. HIV-1 clones resistant to a small molecule CCR5 inhibitor use the inhibitor-bound form of CCR5 for entry. *Virology* 2007; 361: 212-228.
135. Hardy H, Skolnik PR. Enfuvirtide, a new fusion inhibitor for therapy of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy* 2004; 24: 198-211.
136. Reeves JD, Lee FH, Miamidian JL, et al. Enfuvirtide resistance mutations: Impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J Virol* 2005; 79: 4991-4999.
137. Stevenson ML, Zamecnik PC. Inhibition of Rous sarcoma viral RNA translation by a specific oligodeoxyribonucleotide. *Proc Natl Acad Sci USA* 1978; 75: 285-288.
138. Dias N, Stein CA. Antisense oligonucleotides: basic concepts and mechanisms. *Mol Cancer Ther* 2002; 1: 347-355.
139. Brysch W, Rifai A, Tischmeyer W, Schlingensiepen KH. Antisense-mediated inhibition of protein synthesis. *Antisense Therapeutics*. Humana Press 1996; 159-182.
140. Bennett CF, Cowser LM. Antisense oligonucleotides as a tool for gene functionalization and target validation. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 19-30.
141. Marwick C. First antisense drug will treat CMV retinitis. *Jama* 1998; 280: 871.
142. Merki E, Graham MJ, Mullick AE, et al. Antisense oligonucleotide directed to human apolipoprotein B-100 reduces lipoprotein(a) levels and oxidized phospholipids on human apolipoprotein B-100 particles in lipoprotein(a) transgenic mice". *Circulation* 2008; 118: 743-53.
143. Jiang K. Biotech comes to its' antisenses' after hard-won drug approval. *Nat Med* 2013; 19: 252-252.

144. Vaerman, JL, Moureau P, Deldime F, et al. Antisense oligodeoxyribonucleotides suppress hematologic cell growth through stepwise release of deoxyribonucleotides. *Blood*, 1997; 90: 331-339.
145. Fisher TL, Terhorst T, Cao X, Wagner RW. Intracellular disposition and metabolism of fluorescently-labeled unmodified and modified oligonucleotides microinjected into mammalian cells. *Nucleic Acids Res* 1993; 21: 3857-3865.
146. Yang SP, Song ST, Tang ZM, Song HF. Optimization of antisense drug design against conservative local motif in stimulant secondary structures of HER-2 mRNA and QSAR analysis. *Acta Pharmacol Sin* 2003; 24: 897:902.
147. Matveeva OV, Tsodikov AD, Giddings M et al. Identification of sequence motifs in oligonucleotides whose presence is correlated with antisense activity. *Nucleic Acids Res* 2000; 28: 2862-5.
148. Miller PS, McParland KB, Jayaraman K, Ts'o PO. Biochemical and biological effects of nonionic nucleic acid methylphosphonates. *Biochemistry* 1981; 20: 1874-1880.
149. Bramsen JB, Kjems J. Development of therapeutic-grade small interfering RNAs by chemical engineering. *Non-Coding RNA* 2012; 3: 154.
150. Campbell JM, Bacon TA, Wickstrom E. Oligodeoxynucleoside phosphorothioate stability in subcellular extracts, culture media, sera and cerebrospinal fluid. *J Biochem Biophys Methods* 1990; 20: 259-267.
151. Stein CA, Cheng YC. Antisense oligonucleotides as therapeutic agents-is the bullet really magical? *Science* 1993; 261: 1004-1012.
152. Altmann KH, Fabbro D, Dean NM et al. Second-generation antisense oligonucleotides: Structure-activity relationships and the design of improved signal-transduction inhibitors. *Biochem Soc Trans* 1996; 24: 630-637.
153. Sierakowska H, Sambade M, Agrawal S, Kole R. Repair of thalassemic human β -globin mRNA in mammalian cells by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1996; 93: 12840-12844.
154. Singh J, Kaur H, Kaushik A, Peer S. A review of antisense therapeutic interventions for molecular biological targets in various diseases. *Int J Immunopharmacol* 2011; 7: 294-315.

155. Larsen H, Bentin J, Nielsen T, Peter E. Antisense properties of peptide nucleic acid. *Biochim Biophys Acta* 1999; 1489: 159-166.
156. Chen X, Dudgeon N, Shen L, Wang JH. Chemical modification of gene silencing oligo-nucleotides for drug discovery and development. *Drug Discov. Today* 2005;10: 587-93.
157. Kurreck J, Wyszko E, Gillen C, Erdmann VA. Design of antisense oligonucleotides stabilized by locked nucleic acids. *Nucleic Acids Res* 2002; 30: 1911-8.
158. Dominski Z, Kole R. Restoration of correct splicing in thalassemic pre-mRNA by antisense oligonucleotides. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993; 90: 8673-8677.
159. Zalachoras I, Evers MM, van Roon-Mom WM, Aartsma-Rus AM, Meijer OC. Antisense-mediated RNA targeting: versatile and expedient genetic manipulation in the brain. *Front Mol Neurosci* 2011; 4.
160. Sazani P, Kole R. Therapeutic potential of antisense oligonucleotides as modulators of alternative splicing. *J Clin Invest* 2003; 112: 481-486.
161. Crooke ST. Basic principles of antisense technologies. In *Antisense Drug Technology: Basic Principles, Strategies, and Applications* 2001: 1-28.
162. Iverson P. Morpholinos. In *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* 2007; 565-582.
163. Brown EA, Zhang H, Ping LH, Lemon SM. Secondary structure of the 5' nontranslated regions of hepatitis C virus and pestivirus genomic RNAs. *Nucleic Acids Res* 1992; 20: 5041-5045.
164. Vickers T, Baker BF, Cook PD, et al. Inhibition of HIV-LTR gene expression by oligonucleotides targeted to the TAR element. *Nucleic Acids Res* 1991; 19: 3359-3368.
165. Westermann P, Gross B, Hoinkis G. Inhibition of expression of SV40 virus large T antigen by antisense oligodeoxyribonucleotides. *Biomed Biochim Acta* 48, 1989: 85-93.
166. Vickers TA, Wyatt JR, Burckin T, Bennett CF, Freier SM. Fully modified 2-MOE oligonucleotides redirect polyadenylation. *Nucleic Acids Res* 2001; 29: 1293-1299.

167. Lima W, Wu H, Crooke ST. The RNase H mechanism. In *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* 2007: 47-74.
168. Meister G, Tuschl T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature* 2004; 431: 343-349.
169. Petrova NS, Zenkova MA, Chernolovskaya EL. Structure-Functions Relations in Small Interfering RNAs. *InTech* 2013; 187-228.
170. De Fougères AR, Maraganore JM. Discovery and development of RNAi therapeutics. *Antisense Drug Technology: Principles, Strategies, and Applications* (2nd edn) 2007: 465-484.
171. Liang X, Hart CE, Crooke ST. Transfection of siRNAs can alter miRNA levels and trigger non-specific protein degradation in mammalian cells. *Gene Regul Mech* 2013; 1829: 455-468.
172. Arya SK, Guo C, Josephs SF, Wong-Staal F. Transactivator gene of human Tlymphotropic virus type III (HTLV III). *Science* 1985; 229: 69-73.
173. Chandra A, Demirhan I, Arya SK, Chandra P. D-penicillamine inhibits transactivation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) LTR by transactivator protein. *FEBS lett* 1988; 236: 282-286.
174. Yang YW, Yang JC. Studies of DEAE-dextran-mediated gene transfer. *Biotechnol Appli Biochem* 1997; 25, 47-51.
175. Icoz DZ, Kokini JL. Probing the boundaries of miscibility in model carbohydrates consisting of chemically derivatized dextrans using DSC and FTIR spectroscopy. *Carbohydr Polym* 2007; 68: 68-76.
176. Antharavally BS, Mallia KA, Rangaraj P, Haney P, Bell PA. Quantitation of proteins using a dye-metal-based colorimetric protein assay. *Anal Biochem* 2009; 385: 342-345.
177. Aslan C, TAT-TAR Etkileşmesini İnhibe Edebilecek Bileşiklerin Araştırılması, Yüksek Lisans Tezi, Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Kayseri, 2008.
178. Walensky RP, Auerbach JD. Focusing NIH HIV/AIDS Research for Maximum Population Impact. *Clin Infect Dis* 2014: 942.

179. Palella FJ, Delaney KM, Moorman AC, et al. Declining morbidity and mortality among patients with advanced human immunodeficiency virus infection. HIV Outpatient Study Investigators. *N Engl J Med* 1998; 338: 853-860.
180. Demirhan I, Hasselmayer O, Hofmann D, et al. Gene-targeted inhibition of transactivation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1)-LTR by antisenseoligonucleotides. *Virus Genes* 1994; 9: 113-119.
181. Dinauer N, Lochmann D, Demirhan I. et al. Intracellular tracking of Protamine/antisense Oligonucleotide Nanoparticles and Their Inhibitory Effect on HIV-1 Transactivation. *J Control Release* 2004; 96: 497-507.
182. Lo KM, Biasolo MA, Dehni G, Palú G, Haseltine WA. Inhibition of replication of HIV-1 by retroviral vectors expressing tat-antisense and anti-tat ribozyme RNA. *Virology* 1992; 190: 176-183.
183. Biasolo MA, Radaelli A, Del Pup L, et al. A new antisense tRNA construct for the genetic treatment of human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol* 1996; 70: 2154-2161.
184. Chang HK, Gendelman R, Lisziewicz J, Gallo RC, Ensoli B. Block of HIV-1 infection by a combination of antisense tat RNA and TAR decoys: a strategy for control of HIV-1. *Gene Therapy* 1994; 1: 208-216.
185. Boden D, Pusch O, Silbermann R et al. Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res* 2004; 32: 1154-1158.
186. Zaia JA, Rossi JJ, Murakawa GJ et al. Inhibition of human immunodeficiency virus by using an oligonucleoside methylphosphonate targeted to the tat-3 gene. *J Virol* 1988; 62: 3914-3917.
187. Donahue RE, Bunnell BA, Zink MC, et al. Reduction in SIV replication in rhesus macaques infused with autologous lymphocytes engineered with antiviral genes. *Nat Med* 1998; 4: 181-186.
188. Arzumanov A, Walsh AP, Liu X et al. Oligonucleotide analogue interference with the HIV-1 Tat protein-TAR RNA interaction. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 2001; 20: 471-480.

189. Boulmé F, Freund F, Moreau S et al. Modified (PNA, 2'-O-methyl and phosphoramidate) anti-TAR antisense oligonucleotides as strong and specific inhibitors of in vitro HIV-1 reverse transcription. *Nucleic Acids Res* 1998; 26: 5492-5500.
190. Turner JJ, Ivanova GD, Verbeure B et al. Cell-penetrating peptide conjugates of peptide nucleic acids (PNA) as inhibitors of HIV-1 Tat-dependent trans-activation in cells. *Nucleic Acids Res* 2005; 33: 6837.
191. Choudhury I, Wang, J, Rabson, A, et al. Inhibition of HIV-1 Replication by a Tat RNA-Binding Domain Peptide Analog. *J. Acquir. Immune Defic Syndr Hum Retrovirol* 1998; 17: 104-111.
192. Choudhury I, Wang J, Stein S et al. Translational effects of peptide antagonists of Tat protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Gen Virol* 1999; 80: 777-782.
193. Demirhan I, Chandra A, Sarin PS et al. Inhibition of tat-mediated HIV-1 LTR transactivation and virus replication by sulfhydryl compounds with chelating properties. *Anticancer Res* 2000; 20: 2513-2518.
194. Fraasier C, Abraham DA, van Oijen M et al. Inhibition of Tat-mediated transactivation and HIV replication with Tat mutant and repressor domain fusion proteins. *Gene Therapy* 1998; 5: 946-954.

ÖZGEÇMİŞ

KİŞİSEL BİLGİLER

Adı, Soyadı: Ömer faruk ARICI

Uyruğu: T.C.

Doğum Tarihi ve Yeri: 1982/ Ş.Urfa

Medeni Durumu: Evli

Tel: 0352 231 95 55

E-mail: farici82@yahoo.com

Yazışma Adresi: Sahabiye Mah. Mete Cad. No. 10 Arıcı Eczanesi Kocasinan /KAYSERİ

EĞİTİM

Derece	Kurum	Mezuniyet Tarihi
Yüksek lisans	Erciyes Üniversitesi	2009
Lisans	Ankara Üniversitesi	2004
Lise	N.M. Baldöktü Anadolu Lisesi	2000

YABANCI DİL

İngilizce