

**T.C.  
HACETTEPE ÜNİVERSİTESİ  
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ**

**DOĞAL BAĞIŞIKLIK FAKTÖRLERİNE  
ETKİ EDEN ANTI-HIV NÖTRALİZAN  
ANTİKORLARIN EFEKTÖR  
FONKSİYONLARI**

**Uz. Dr. R. Gülşen ÖZKAYA ŞAHİN**

**Mikrobiyoloji Programı  
DOKTORA TEZİ**

**TEZ DANIŞMANI  
Prof. Dr. A. Dürdal US**

**ANKARA  
2009**

Sağlık Bilimleri Enstitüsü M¼d¼rl¼ę¼'ne

Bu alışma j¼rimiz tarafından Mikrobiyoloji Programında Doktora tezi olarak kabul edilmiştir.

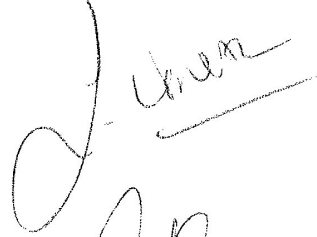
J¼ri Başkanı: Prof.Dr.Sibel Erg¼ven  
Hacettepe niversitesi



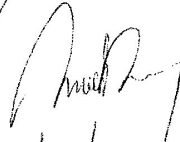
Danışman: Prof.Dr.D¼rdal Us  
Hacettepe niversitesi



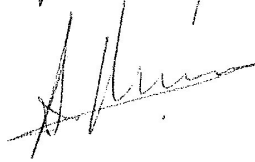
¼ye: Prof.Dr.Serhat nal  
Hacettepe niversitesi



¼ye: Prof.Dr.Murat Aksoy  
Ankara niversitesi



¼ye: Doç.Dr.Ahmet Pınar  
Hacettepe Üniversitesi



Onay: Bu tez, Hacettepe Üniversitesi Lisans¼st¼ Eğitim-ğretim ve Sınay Yönetmeliğinin ilgili maddeleri uyarınca yukarıdaki j¼ri ¼yeleri tarafından uygun gr¼lm¼ř ve Enstit¼ Yönetim Kurulu kararıyla kabul edilmiştir.

Prof.Dr.Hakan S.Orer

Enstit¼ M¼d¼r¼



## TEŞEKKÜR

Öncelikle, öğrenciliğimden bu yana bilimsel duruşu ve özgün kişiliğiyle daima bana örnek olan, her zaman bana güvendiğini hissettiren, Mikrobiyoloji Bölümü'nde bana doktora yapma şansını veren, ancak ne yazık ki 2008 yılında aramızdan sonsuza dek ayrılan değerli hocam **Prof. Dr. Şemsettin Ustaçelebi**'ye sonsuz teşekkürlerimi ve aziz anısına saygılarımı sunarım.

Sevgili tez danışmanım **Prof. Dr. Gürdal Us**'a, bana verdiği daimi destek ve dostluğunun yanı sıra, bilimsel önerileriyle çalışmamın olgunlaşmasında ve tezimin yazım aşamasında uzak mesafelerden dahi gösterdiği katkılar için çok teşekkür ederim.

Sevgili hocam **Prof. Dr. Yakut Akyön Yılmaz**'a, bana İsveç'in kapılarını açarak doktora tezimi İsveç'te yapabilme olanağı verdiği, beni hep desteklediği ve gösterdiği içten dostluğu için çok teşekkür ederim.

Sevgili hocam **Prof. Dr. Sibel Ergüven**'e disiplinli bilimsel kişiliğiyle bana hep örnek olması ve dostluğu nedeniyle çok teşekkür ederim.

İnfeksiyon Hastalıkları Ünitesi'nden değerli hocalarım **Prof. Dr. Serhat Ünal**, **Prof. Dr. Ömrüm Uzun** ve **Prof. Dr. Murat Akova**'ya "fellow"luğum sırasında bana Mikrobiyoloji Doktorası yapma şansını verdikleri ve beni destekledikleri için çok teşekkür ederim.

Lund Üniversitesi'nin kapılarını bana açan **Prof. Dr. Torkel Wadström**'e; beni Viroloji Bölümü'ne kabul eden ve bilimsel kişiliğiyle beni daima çok etkilemiş olan hocam **Prof. Dr. Eva Maria Fenyö**'ye; beni grubuna dahil eden ve çalışma azmiyle bana hep örnek olan hocam **Doç. Dr. Hans Norrgren**'e; dostluğu, azmi ve hırslı kişiliğiyle bana hep model olan Karolinska Enstitüsü'ndeki hocam **Doç. Dr. Marianne Jansson**'a ve beni bu projeye dahil ederek tez çalışmamın gerçekleşmesini sağlayan, beni hiç tanımadığı halde en başından beri bana güvenen hocam **Doç. Dr. Anna-Lena Spetz**'e gönülden teşekkür ederim.

Ayrıca, laboratuvar ortamında dahi sosyal ilişkilerin değerini bana tattıran ve "bilim yapmanın" keyfine varmamı sağlayan sevgili İsveçli dostlarım **Birgitta Holmgren**, **Anna Lauren**, **Johanna Repits**, **Enas S. Khalil**, **Mattias Mild** ve **Joakim Esbjörnsson**'a çok teşekkür ederim.

Son olarak da özeşim **Uz. Dr. Gürdal Şahin**'e ve hayatımın lokomotifini, canım oğlum **Doruk Ada Şahin**'e sadece benimle oldukları için çok teşekkür ederim.

## ÖZET

**Özkaya Şahin, G. Doğal bağışıklık faktörlerine etki eden anti-HIV nötralizan antikorların efektör fonksiyonları. Hacettepe Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü Mikrobiyoloji Doktora Tezi, Ankara, 2009.** Tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu olmaya devam eden HIV enfeksiyonuna yönelik aşı çalışmaları hızla devam etmektedir. Bugün için kabul edilen görüş, HIV aşısının etkin olabilmesi için hem doğal hem de kazanılmış immün yanıt mekanizmalarının uyarılabilmesidir. Bu çalışmada, doğal bağışıklık faktörlerine etki eden anti-HIV nötralizan antikorların (Nak) efektör fonksiyonlarının araştırılması amacıyla, SIVmac239 ile enfekte edilen ve erken dönemde tedavi başlanan 12 sinomolgus makakta enfeksiyon prognozunun, viral parametrelerin ve konak hümmoral immün yanıtının izlenmesi ve nötralizan aktiviteye sahip IgG antikorlarının irdelenmesi planlanmıştır. Nak yanıtının değerlendirilmesinde, makak plazmasından saflaştırılan IgG ve transgenik GHOST(3)-CCR5 hücreleri kullanılmıştır. FMPA (tenofovir) tedavisine verdikleri virus yükü yanıtına ve tedavi sonrası virus yüklerinde gözlenen değişikliğe göre üç gruba ayrılan makaklarda [kontROLSÜZ (K-) (n=1), geçici kontrollü (GK) (n=4) ve kontrollü (K+) (n=7)], enfeksiyon sonrası (ES) 7. günde ölçülen virus yükü ile tedavi sonrası saptanan virus yükleri arasında pozitif bir korelasyon olduğu saptanmıştır. Bu sonuç, erken viral yük düzeyinin enfeksiyonun prognozunu belirlemede önemli rolü olduğunu göstermektedir. Ayrıca virus yükü yüksek seyreden makaklarda (K-/GK) CD4+ T hücre sayısında daha belirgin azalma olduğu ve hipergammaglobulinemi geliştiği de gözlenmiştir. SIVmac239 virusuna karşı homolog Nak yanıtı, GK/K+ gruplardaki 11 makakta ortalama olarak ES 5.5. ayda ortaya çıkarken, K- gruptaki makakta bunun ES 2. aydan itibaren mevcut olduğu saptanmıştır. ES 4.5. ayda makaklardan izole edilen virus re-izolatlarına yönelik Nak yanıtı değerlendirildiğinde, K+ makakların başarılı olduğu, buna karşılık K-/GK makaklarda virusun Nak'lardan kaçabildiği gözlenmiştir. Nötralizasyona doğal duyarlı olduğu bilinen SIVsm virusuna karşı erken heterolog Nak yanıtı değerlendirildiğinde, özellikle K-/GK makaklarda erken ve potent bir Nak yanıtının geliştiği gözlenmiştir. Çeşitli HIV-1 ve HIV-2 izolatlarına karşı ileri heterolog Nak yanıtı incelendiğinde, K-/GK makaklarda potent bir Nak yanıtı gelişirken, kontrollü makaklarda geniş etkili bir Nak yanıtının olduğu saptanmıştır. Virus yükü ile Nak yanıtı arasında böyle bir ilişkinin ilk kez gösterildiği bu çalışmanın, ileri aşı çalışmalarında yol gösterici olacağı düşünülmektedir. Bu çalışmada ayrıca SIVmac239 virusu zarfının etkin bir immünojen olarak kullanılabileceği anlaşılmış ve SIVmac239 ile enfekte sinomolgus makak modeli, yeni bir AIDS hayvan modeli olarak bilim dünyasına kazandırılmıştır.

Anahtar kelimeler: SIVmac239, sinomolgus makak, nötralizan antikor, genişlik, potens

Destekleyen kurumlar: TÜBİTAK, ERASMUS, ESCMID, EUROPRISE



## ABSTRACT

**Özkaya Şahin, G. Effector functions of anti-HIV neutralizing antibodies and their effects on natural immunity factors. Hacettepe University Institute of Health Sciences, Ph.D. Thesis in Microbiology, Ankara, 2009.** Vaccine studies targeting HIV infection, which still continues to be a major health problem in all over the world, are in quick progress. A desirable goal for an HIV vaccine would be to induce both innate and acquired immune responses. In this study, effector functions of anti-HIV neutralizing antibodies (Nab) on natural immunity factors were evaluated in SIVmac239 infected cynomolgus macaques (n=12) which received PMPA (tenofovir) treatment in the early period. Furthermore, the role of viral parameters and humoral immune response as well as neutralizing capacity of IgG antibodies on disease prognosis was assessed. In the neutralization assays, IgG purified from macaque plasma samples and transgenic GHOST(3)-CCR5 cells were used. The animals were divided into three groups [non-controller (NC) (n=1), transient-controller (TC) (n=4), and longterm controller (LC) (n=7)] according to the viral load response during and after treatment. Interestingly, a positive correlation between 7 days post-infection (PI) and after treatment interruption viral loads was observed, which indicates the role of viral set point on the prognosis of infection. Furthermore, a marked decline in CD4<sup>+</sup> T cell counts and hypergammaglobulinemia were observed in only NC/TC macaques. Homologous Nab response against SIVmac239 virus was mounted by 5.5. months PI in 11 out of 12 macaques (TC/LC groups), however, it was only the NC macaque which developed Nab response earlier (2 months PI). Interestingly, Nab response against the 1<sup>st</sup> re-isolates obtained 4.5. months PI were neutralized only by LC macaques which indicates the importance of Nab response on the control of viral load. However, Nab escape mutants appeared in NC/TC macaques. Heterologous Nab response was also tested against SIVsm, which is generally considered to be neutralization sensitive. Interestingly, early as well as potent Nab responses were observed especially in NC/TC macaques compared to LC macaques. Further heterologous Nab response testing against several HIV-1 and HIV-2 viruses indicated the importance of high viral load on the appearance of potent Nab response, whereas broader Nab activity correlated with low viral load. According to our knowledge, this kind of relationship between the viral load and the potency and breadth has not been published before. This knowledge would have a potential effect to guide further vaccination studies. According to our results, SIVmac239 envelope would be used as an effective immunogen. Furthermore, SIVmac239 infection in cynomolgus macaques seems to be a new and useful animal model for AIDS.

Keywords: SIVmac239, cynomolgus macaque, neutralizing antibodies, breadth, potency

Supported by TUBITAK, ERASMUS, ESCMID, EUROPRISE

**İÇİNDEKİLER**

	<b>Sayfa</b>
ONAY SAYFASI	<i>iii</i>
TEŞEKKÜR	<i>iv</i>
ÖZET	<i>v</i>
ABSTRACT	<i>vi</i>
İÇİNDEKİLER	<i>vii</i>
SİMGELER VE KISALTMALAR DİZİNİ	<i>ix</i>
ŞEKİLLER DİZİNİ	<i>xi</i>
TABLolar DİZİNİ	<i>xv</i>
1. GİRİŞ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. Tarihçe	3
2.2. HIV'in Kökeni	4
2.3. HIV Pandemisinde Son Durum	6
2.4. HIV Patogenezi	8
2.5. Virus Yapısı, Genom Organizasyonu ve Sınıflandırması	9
2.6. Replikasyon Döngüsü	13
2.6.1. Hücreye Giriş	13
2.6.2. Transkripsiyon, Entegrasyon ve Translasyon	15
2.6.3. Virus Montajı (Assembly)	16
2.6.4. Tomurcuklanma ve Olgunlaşma	17
2.7. Antijenik Çeşitlilik	17
2.8. HIV/SIV Zarf Yapısı ve İmmünojenisitesi	18
2.9. HIV-1'e Özgül Nötralizan Antikor Yanıtı	23
2.10. HIV Enfeksiyonunda B Hücre Anormallikleri	26
2.11. HIV için Primat Hayvan Modelleri	26
3. GEREÇ VE YÖNTEM	28
3.1. Makak Çalışma Programı	28
3.2. Plazmada SIV Yüğü Ölçümü	29
3.3. CD4+ T Hücre Sayısı ve Yüzdesinin Akım Sitometrisi ile Ölçümü	35

3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH)'nin Hazırlanması	36
3.5. PKMH'den Virus Kültürü	37
3.6. Çalışmada Kullanılan Viruslar	38
3.7. Plazma Örnekleri ile Negatif ve Pozitif Kontrollerden IgG Saflaştırılması	39
3.8. ELISA Yöntemiyle IgG Kantitasyonu	40
3.9. GHOST(3)-CCR5 Hücreleri	41
3.10. GHOST(3)-CCR5 Hücrelerinde Virus Titasyonu	42
3.11. Virus Nötralizasyon Deneyinde Kullanılacak IgG Miktarının Belirlenmesi	45
3.12. GHOST(3)-CCR5 Hücrelerinde Virus Nötralizasyonu	45
3.13. Nötralizan Antikorların Genişlik ve Potensi	46
3.14. İstatistiksel Analiz	47
4. BULGULAR	48
4.1. Plazma SIV Yüğü ve Buna Göre Makakların Gruplandırılması	48
4.2. Klinik Bulgular	50
4.3. CD4+ Yardımcı T Hücre Sayısı	53
4.4. Plazma IgG Düzeyi	55
4.5. Plazmadan IgG Saflaştırması	56
4.6. Birinci ve İkinci SIVmac239 Re-izolatları	56
4.7. SIVmac239 İnokulum Suşu ile 1. ve 2. Re-izolatların Nötralizasyonu	57
4.8. Heterolog Virus Nötralizasyonu	60
4.8.1. SIVsm Stok ve SIVsm 1. ve 2. Re-izolatların nötralizasyonu	60
4.8.2. HIV-2 Nötralizasyonu	64
4.8.3. HIV-1 Nötralizasyonu	67
4.9. Nötralizan Antikorların Genişlik ve Potensi	70
5. TARTIŞMA	75
6. SONUÇ VE ÖNERİLER	83
7. KAYNAKLAR	84

## SİMGELER VE KISALTMALAR

AIDS	Kazanılmış immün yetmezlik sendromu (Acquired Immunodeficiency Syndrome)
ALP	Alkalen fosfataz
ART	Antiretroviral tedavi
BC	Lökositten zengin tam kan (Buffy Coat)
BGD3	Biyogüvenlik düzeyi 3
CD4-BB	CD4'e bağlanma bölgesi
CDC	Hastalık Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention)
D-FTS	Dulbecco fosfat tampon solüsyonu
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EÖ	Enfeksiyon öncesi
ES	Enfeksiyon sonrası
FDS	Fetal dana serumu
FHA	Fitohemaglütinin
FITC	Floresan izotiyosiyanat
FMPA	(R)-9-(2-fosfonilmetoksipropil) adenin
GİS	Gastrointestinal sistem
GFP	Yeşil floresan proteini (Green Fluorescent Protein)
GK	Geçici kontrollü
Gp	Glikoprotein
HAART	İleri derecede aktif antiretroviral tedavi (Highly-Active Antiretroviral Therapy)
HIV	İnsan immün yetmezlik virusu (Human Immunodeficiency Virus)
K-	Kontrolsüz
K+	Kontrollü
LAV	Lenfadenopati ile ilişkili virus (Lymphadenopathy Associated Virus)
LTR	Uzun uç tekrarlar (Long Terminal Repeats)
MHC	Majör doku uygunluk kompleksi (Major Histocompatibility Complex)

Nak	Nötralizan antikor
NK	Nötralizasyon kapasitesi
ORF	Açık okuma çerçevesi (Open Reading Frame)
PerCP	Peridinin klorofil proteini
PeSt	Penisilin-streptomisin
PKMH	Periferik kan mononükleer hücreleri
PrtGSHAt	Protein G-sefaroza hızlı akım tanecikleri
RT	Revers transkriptaz
RYE	Rev yanıt elemanı
SIV	Maymun immün yetmezlik virusu (Simian Immunodeficiency Virus)
TAR	Transaktivasyon bölgesi
Th	Yardımcı (helper) T hücresi
UNAIDS	HIV/AIDS birleşik uluslar programı (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS)
VSP	Viral yük düzeyi (Viral Set Point)

## ŞEKİLLER

	<b>Sayfa</b>
2.1. HIV ile SIV arasındaki evrimsel ilişki	6
2.2. HIV-1 M grubunun dünyadaki dağılımı	7
2.3. HIV enfeksiyonuna global bakış	7
2.4. HIV enfeksiyonunun seyri	9
2.5. HIV-1 virionunun yapısı	11
2.6. HIV ve SIV'in genomik organizasyonu	11
2.7. HIV'in konak hücre membranına tutunması ve füzyon	13
2.8. HIV'in replikasyon döngüsü	16
2.9. İnfluenza hemaglutininin genindeki genetik varyasyonla HIV C2-V5 <i>env</i> sekanslarındaki genetik varyasyonun filogenetik analizi	18
2.10. HIV üzerindeki çıkıntılar ve bir çıkıntıyı oluşturan gp120 ve gp41 trimerleri	19
2.11. CD4 bağlayan bölgenin açık olduğu durumdaki gp120 yapısı (a); CD4 bağlayan bölgeye CD4'ün bağlanması sonucu ortaya çıkan yapısal değişiklik (b)	20
2.12. CD4 bağlanmamış gp120 trimerine CD4 bağlanması sonucu oluşan yapısal değişiklik	20
2.13. SIVmac32H ve HIV-1 HxBc2 gp120 kor sekansları	22
2.14. gp120-gp41 trimerinin üstten görünümü	22
2.15. Geniş etkili Nak'ların gp120-gp41 trimerine bağlanma yerleri	25
3.1. Makak çalışma programı	29
3.2. Ayırma ekipmanı	30
3.3. Reaksiyon karışımlarının plağa konulması	32
3.4. Toplayıcı tüp tabağına saklama tüplerinin yerleştirilmesi	33
3.5. Lizatın saklama tüplerinden RT reaksiyon tüplerine aktarılması	33
3.6. Enfeksiyondan bir gün önce (-1. gün) hazırlanan 96 çukurlu plak	43
3.7. Enfeksiyon günü (0. gün) hazırlanan 48 çukurlu plakta virus sulandırım işlemi	43
3.8. 96 çukurlu plakta triplikatlar	44
3.9. SIV ile enfekte hücrelerin floresan mikroskopik görüntüleri	44
4.1. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen plazma SIV RNA kopya sayısı (kopya/ml plazma)	49

**Sayfa**

4.2. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen vücut ağırlığı (gram)	51
4.3. Kontrollü ve geçici kontrollü/kontrolsüz makakların izlemi sürecinde saptanan lenfadenopati skoru	52
4.4. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen CD4+ Th hücre sayısı (hücre/ $\mu$ l kan)	54
4.5. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makaklarda enfeksiyon sürecinde gözlenen total IgG miktarındaki değişiklik yüzdeleri	56
4.6. K-/GK grubundaki makakların SIVmac239 inokulüm suşuna ve 1 ve 3 no'lu makakların 4.5. ayda kendilerinden izole edilen 1. re-izolatlara (1' ve 3') yönelik nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda)	58
4.7. K+ gruptaki makakların SIVmac239 inokulüm suşuna ve 2, 4, 7, 9 ve 10 no'lu makakların 4.5. ayda kendilerinden izole edilen 1. re-izolatlara (2', 4', 7', 9' ve 10') yönelik nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda)	58
4.8. Ksüz/ GK grubundaki 3, 5, 8 ve 11' no'lu makaklardan izole edilen 2. re-izolatlara (3', 5', 8' ve 11') yönelik nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda)	59
4.9. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların SIVsm stok virusuna karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda)	60
4.10. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü 12 makaktan ES 4.5. ayda elde edilen IgG'nin plazma IgG'si temel alınarak yapılan ileri dilüsyonlarında SIVsm stok virusuna karşı ölçülen Nak aktivitesi	62
4.11. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağın SIVsm stok virusuna karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:2560 plazma IgG dilüsyonunda)	62
4.12. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 4.5. ay) SIVsm:C39 <sup>sens</sup> ve SIVsm:C39 <sup>res</sup> re-izolatlarına karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:2560 plazma IgG dilüsyonunda)	63

**Sayfa**

- 4.13. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 1682 no'lu HIV-2 virusuna karşı nötralizan antikör aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda) 65
- 4.14. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 1812 no'lu HIV-2 virusuna karşı nötralizan antikör aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda) 65
- 4.15. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makaktan ES 14. ayda elde edilen IgG'lerin, plazma IgG'si temel alınarak yapılan ileri dilüsyonlarında 1682 no'lu virusa karşı Nak aktivitesi 66
- 4.16. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makaktan ES 14. ayda elde edilen IgG'lerin, plazma IgG'si temel alınarak yapılan ileri dilüsyonlarında 1812 no'lu virusa karşı Nak aktivitesi 66
- 4.17. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) SF162 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda) 67
- 4.18. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 92Br025 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda) 68
- 4.19. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 92UG024 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda) 68
- 4.20. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) CC030 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda) 69
- 4.21. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) CC048 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda) 69
- 4.22. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makakta ES 6.5-ES 14. aylar arasında gözlenen Nak genişlik değişim kinetiği 71



4.23. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG örneklerinin potens puanı

## TABLOLAR

	<b>Sayfa</b>
2.1. <i>Retroviridae</i> ailesinin üyeleri	10
2.2. HIV ve SIV'in en sık kullandıkları reseptörler ve eksprese edildikleri hücreler	14
4.1. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen plazma SIV RNA kopya sayısı (kopya/ml plazma)	49
4.2. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen vücut ağırlığı (gram)	51
4.3. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde saptanan ortalama lenfadenopati sayısı	52
4.4. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen CD4+ Th hücre sayısı (hücre/ $\mu$ l)	53
4.5. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde enfeksiyon öncesine kıyasla gözlenen CD4+ Th hücre sayısındaki değişiklik (%)	54
4.6. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen IgG düzeyleri (gr/ml)	55
4.7. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin genişliği (ES 6.5. ay)	71
4.8. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin genişliği (ES 14. ay)	71
4.9. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin potensisi (SIV için ES 4.5. ay ve HIV için ES 14. ay)	73

## 1. GİRİŞ

Dünyada hızla yayılan insan immün yetmezlik virusuna (human immunodeficiency virus; HIV) yönelik ileri derecede aktif antiretroviral tedavi (highly-active antiretroviral therapy; HAART) seçeneklerinin günümüzde mevcut olmasına rağmen, ne yazık ki, en azından şu an için virusun ilaçlarla eradike edilmesi mümkün değildir (www.unaids.org). Ayrıca HAART'ın yüksek maliyetli oluşu, gelişmekte olan ülkelerde yaşayan hastaların ilaca erişimini hemen hemen olanaksız kılmaktadır. Dünyada HIV ile enfekte kişilerin üçte ikisinin Sahra-altı Afrika'da yaşadığı göz önüne alındığında, HIV enfeksiyonunu kontrol altına almada acilen başka önlemlerin alınmasının gerekliliği de ortaya çıkmaktadır. Bu önlemlerin başında da, elbette bulaşın önlenmesine yönelik bilinçlendirme eğitim programları ve profilaktik aşular gelmektedir.

İlk aşı çalışmaları 1980'li yılların ikinci yarısında başlamış ve öncelikle hümmoral immün yanıtın oluşturulması amaçlanmıştır (10, 39). Ancak olumsuz yanıt alınması üzerine bu sefer de HIV'e yönelik hüccresel immün yanıt oluşturma çabalarına girişilmiş ancak yine başarı elde edilememiştir (115). Günümüzde HIV'e yönelik aşı çalışmalarında hem doğal hem de kazanılmış (hüccresel ve hümmoral) immünitinin uyarılması gerektiği konusunda fikir birliği sağlanmıştır (22, 90, 120).

HIV'in, immün sistemin seçici baskısı ve revers transkriptaz (RT) enziminin hata düzeltme (proof-reading) özelliğinin olmaması nedeniyle çok hızlı mutasyona uğramasına bağlı olarak immünojenik epitopların hızla değişmesi, şu anda geniş ve potent bir immün yanıt oluşturulmasının önündeki en büyük engeldir (101). Her ne kadar, HIV zarfı üzerinde bazı sabit epitopların yerleri belirlenmiş olsa da, bunlara karşı oluşmuş nötralizan antikörlerin (Nak) yüksek dozlarda kullanılması gerekliliği ve bu antikörlerin otoimmün hastalıkları uyarması, insanlarda kullanılmasını olanaksız kılmaktadır (11, 64). Günümüzde, HIV ile enfekte hastalarda geniş etkili ve potent Nak'ların araştırılması ve bu antikörlerin bağlandığı epitopların incelenmesi ile ilgili kapsamlı çalışmalar yapılmakta ve bu epitopların Nak yanıtı oluşturmak için kullanılması amaçlanmaktadır (141).

Maymun immün yetmezlik virusu (simian immunodeficiency virus; SIV) ile enfekte makaklarla yapılan hayvan çalışmaları, HIV patogenezinin ve HIV'e yönelik immün yanıtın anlaşılmasında önemli katkılarda bulunmuştur (1).

SIVmac239 virusu ile intravenöz yoldan enfekte edilen ve enfeksiyonun erken döneminde antiretroviral tedavi uygulanan 12 sinomolgus makak ile yapılan ve Nak yanıtı kinetiğinin araştırılmasının amaçlandığı bu çalışmada, geniş etkili ve potent bir Nak yanıtı saptanmış ve ayrıca bu yanıt ile virus yükü arasında bir ilişki olduğu da kanıtlanmıştır. Ayrıca sinomolgus makakların SIVmac239 virusu ile enfeksiyonunun, hümorale immünite kinetiğinin çalışılmasında uygun bir hayvan modeli olduğu da ilk kez gösterilmiştir.

## 2. GENEL BİLGİLER

### 2.1. Tarihçe

İlk kez 1981 yılında Amerika’da Hastalık Kontrol Merkezi (Centers for Disease Control and Prevention; CDC) tarafından, bilinen herhangi bir altta yatan hastalığı olmayan sağlıklı kişilerde *Pneumocystis jiroveci* (eski adıyla *P. carinii*) pnömonisi, ağır mukozal kandidoz ve Kaposi sarkomu geliştiği bildirilmiştir (25-27). Bu 31 hastanın tümünün homoseksüel olması, bu “sendromun” dünya kamuoyu tarafından başlangıçta, toplumun normlarına aykırı düşen cinsel tercihlere Tanrı’nın verdiği bir ceza olarak yorumlanmıştır. Ancak aylar içinde, bu sendromun cinsel tercihlerden bağımsız olarak damar içi ilaç kullanan kadın ve erkeklerde, kan transfüzyonu öyküsü olan kişilerde, hemofili hastalarında ve bebeklerde de görülmesi üzerine bu sendromla ilgili önyargılar yatışmış, buna karşın korkular artmıştır. Günümüzde hastalık etkeninin cinsel tercih gözetmeksizin her türlü cinsel temas yoluyla, anneden bebeğe vertikal olarak ya da emzirme yoluyla ve kan/kan ürünleri ile teması sonrasında geçebildiği bilinmektedir.

İlk kez 1983 yılında Fransa’da Pasteur Enstitüsü’nden François Barré-Sinoussi ve Luc Montagnier tarafından, yaygın lenfadenopatisi olan genç bir homoseksüel erkekte etken virus izole edilmiş ve ekip bu yeni virusa “lenfadenopati ile ilişkili virus” (lymphadenopathy associated virus; LAV) adını vermiştir (7). Ancak daha sonra Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi, elektron mikroskopisi çalışmalarında retrovirusların lentivirus alt grubuna ait olduğu gösterilen bu virüsü “insan immün yetmezlik virusu” (human immunodeficiency virus; HIV) olarak yeniden adlandırmış (35) ve bu virüsün neden olduğu “sendrom” a da kazanılmış immün yetmezlik sendromu (acquired immunodeficiency syndrome; AIDS) adını vermiştir. 1983 yılında yapılan virus izolasyonu, 25 yıl sonra, 2008 yılında Sinoussi ve Montagnier’e Nobel Tıp ödülünü getirmiştir.

1985 yılında Senegalli seks işçisi kadınlardan elde edilen serum örneklerinin, HIV’den çok külrengi mangabeylerden izole edilmiş maymun immün yetmezlik virusu (simian immunodeficiency virus; SIV) ile reaksiyona girdiğinin gösterilmesinin ardından (5), Clavel ve arkadaşları, Batı Afrikalı AIDS hastalarından etken virüsü izole etmeyi başarmış (33) ve ilk virüsün ismi HIV-1 olarak değiştirilerek bu yeni keşfedilen virüse da HIV-2 adı verilmiştir.

HIV'in izolasyonundan sonraki yıllarda bilim dünyası çok önemli gelişmeler kaydetmiştir. 1985 yılında lisans alan ELISA testi ile tüm kan ve kan ürünlerinin HIV varlığı açısından taranması zorunlu hale getirilmiş (86) ve serokonversiyon öncesi pencere dönemini kısaltmak amacıyla p24 antijen testi uygulanmaya başlanmıştır (146). 1987 yılında ilk antiretroviral tedavi (ART) ajanı olan zidovudin klinik kullanıma sunulmuş, 1995 yılından itibaren de ileri derecede aktif ART (highly-active antiretroviral therapy; HAART) uygulanmaya başlanmıştır. Şu anda, her ne kadar bu viral enfeksiyonun eradikasyonu mümkün olmasa da, etkin tedavi uygulandığında yaşam süresi sağlıklı insanların yaşam süresine yaklaşabilmektedir. Ancak AIDS pandemisinin merkezi olan Afrika kıtasında ilaca ulaşımdaki sorunların hala devam etmesi, HAART'taki gelişmelerin HIV'in kontrolü üzerindeki etkilerini ne yazık ki görünmez kılmaktadır. Günümüzde henüz etkili bir HIV aşısı geliştirilememiş olsa da, bilim dünyasında artan bir performansla devam eden araştırmalar, yakın bir gelecekte etkili bir aşının geliştirileceği yönünde umut vermektedir.

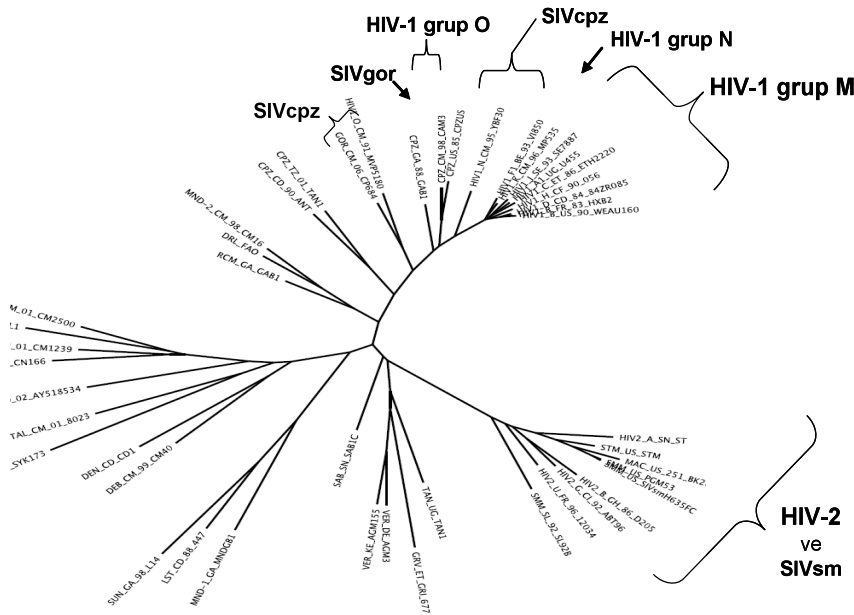
## 2.2. HIV'in Kökeni

HIV'in kökenine yönelik ilk çalışmalar, HIV'in izole edilmesinden 2 yıl sonra yani 1983'te başlamış, ancak standart "moleküler saat" analiz yöntemlerinin HIV'e uygulanamayacağı anlaşılmıştır. Zira nokta mutasyonlarına dayanarak yapılan standart moleküler saat analizinin, HIV replikasyonu sırasında gerçekleşen gen rekombinasyonlarını analiz etmede yetersiz kaldığı anlaşılmıştır. Ayrıca virusun farklı genlerinin farklı ayrılma (divergence) hızlarına sahip olması, hangi genin seçilmesi gerektiği konusunda karmaşaya neden olmuştur. Son olarak da, virusun enfekte ettiği konağın HLA tiplerinin ve bağışıklık sisteminin virus üzerinde oluşturduğu seçici baskıya göre virusun çeşitlilik (diversity) ve ayrılmasındaki farklılıklar da standart testin uygulanmasını imkansız kılmıştır (117). Daha esnek bir hale getirilmesi başarılan moleküler saat analiz yöntemi, bu kez de, eski dönemlere ait bir HIV örneği saptanamadığından, virusun insana ilk ne zaman bulaştığı konusuna açıklık getirememiştir. Buna karşın 1986 yılında başlatılan immün sistem genetiği ile ilgili bir çalışma için Afrika'nın çeşitli bölgelerinden toplanan geçmiş döneme ait 1200 plazma örneğinin bir tanesinden şans eseri nükleik asit eldesi başarılmıştır (111). 1959 yılında Zaire'de yaşamış bir hastaya ait olduğu belirlenen

bu plazma örneği esnek moleküler saat analizinde incelenmiş ve *pol* geni analizi sonucuna göre virusun insanlara ilk kez 1931±15 yılında geçtiği belirlenmiştir (82). Fakat Kongo’lu bir erişkin kadın hastadan 1960 yılında alınan parafinli lenf nodu biyopsisinin analizinde saptanan HIV sekansının, 1959 Zaire HIV sekansı ile birlikte değerlendirilmesi sonucunda HIV’in insana bulaş tarihi 1880’lere değin geriletilmiştir (157). Franchini ve arkadaşlarının 1987 yılında şempanze, makak, yeşil makak ve mangabeylerden izole ettikleri SIV’in tam sekans analizini yapıp, HIV-1 ve HIV-2 ile olan ilişkilerini filogenetik olarak analiz etmeleri sonucunda, HIV-1 M ve N gruplarının şempanzelerden (*Pan troglodytes troglodytes*, SIV<sub>cpz</sub>) HIV-1 O ve P gruplarının gorillerden (*Gorilla gorilla*, SIV<sub>gor</sub>) ve HIV-2’nin de 1940-50’li yıllarda külrenge mangabeylerden (*Cercocebus atys*, SIV<sub>sm</sub>) insana geçtiği gösterilmiştir (56, 123). Şempanze ve gorillerin doğal yaşam alanları Kongo, Kamerun ve Gabon, külrenge mangabeylerin ise Gine Bisau olduğundan, ilk insan enfeksiyonlarının bu bölgelerde gerçekleştiği düşünülmektedir. Ayrıca makaktan insana HIV-1 bulaşının üç, HIV-2 bulaşının ise dört farklı seferde gerçekleştiği de gösterilmiştir (63). HIV ile SIV arasındaki evrimsel ilişki Şekil 2.1’de görülmektedir. Primattan insana bulaş sonrası HIV-1 epidemisinin yaklaşık 50-100 yıl sonra ortaya çıkmasının nedenleri arasında; şehirleşme, uluslararası seyahatlerin yaygınlaşması ve korunmasız cinsel ilişki sıklığında artış gibi faktörlerin olduğu düşünülmektedir (63). Gine Bisau’daki HIV-2 epidemisi, bu ülkedeki bağımsızlık savaşı (1963-1974) sırasında ortaya çıkmıştır (91). Bu da savaşa bağlı sosyokültürel değişikliklerin de epidemiy üzerinde etkisi olduğunu göstermektedir.

HIV-1 genetik olarak M (“main”, ana), O (outlier), N (“non-M, non-O”) ve P olmak üzere 4 farklı gruba ayrılabilir (123). M grubu içinde de 11 alt tip (A1, A2, B, C, D, F1, F2, G, H, J, K) ve şu ana dek saptanmış 34 rekombinant form bulunmaktadır (<http://www.hiv.lanl.gov/content/index>). HIV-2 ise A’dan G’ye olmak üzere toplam 7 gruba ayrılır. HIV-1 M grubunun dünyadaki dağılımı Şekil 2.2’de gösterilmektedir.

Primat türüne özgü şu ana dek tanımlanmış 21 SIV varyantı mevcut olup bu varyantlar doğal konaklarında iken patojenik özellik göstermezler (63).

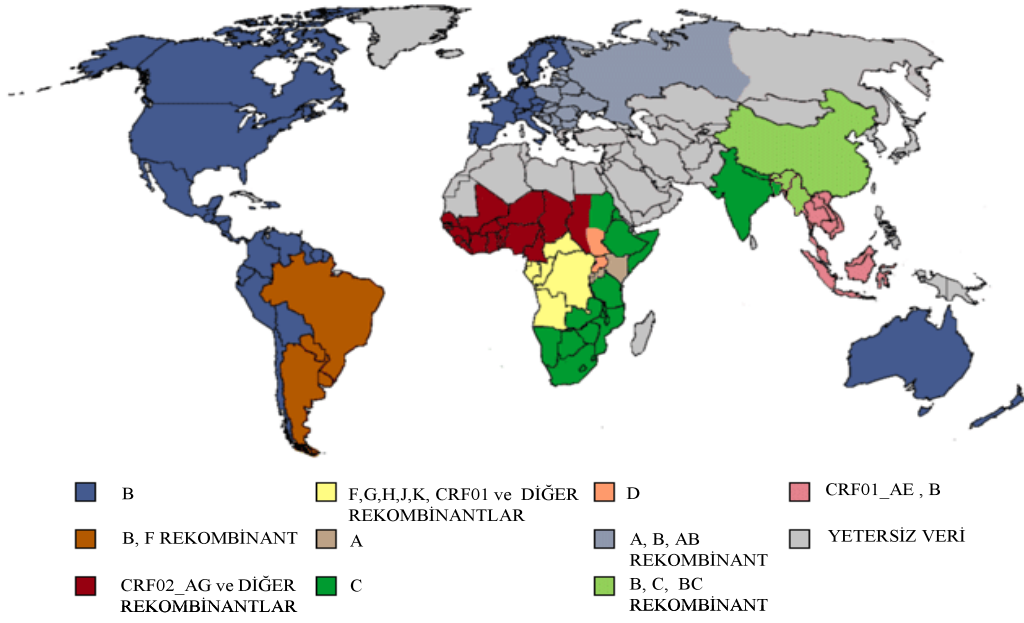


**Şekil 2.1.** HIV ile SIV arasındaki evrimsel ilişki. Filogenetik ağaç analizi *pol* geni temel alınarak yapılmıştır. (J.Repits'in izniyle; Lund Üniversitesi, Viroloji Doktora Tezi)

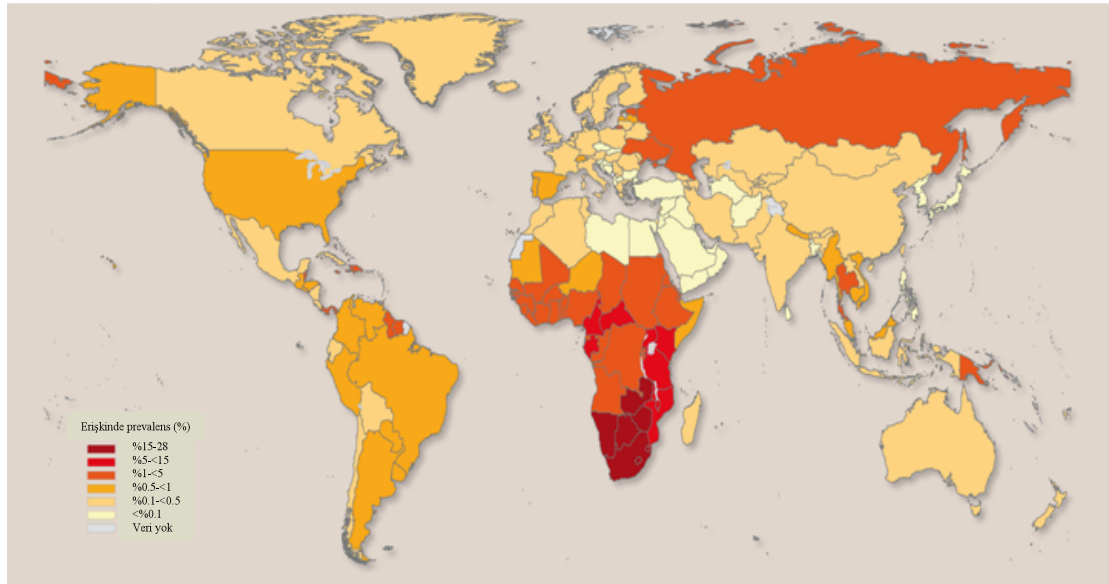
### 2.3. HIV Pandemisinde Son Durum

UNAIDS (Joint United Nations Programme on HIV/AIDS) 2007 verilerine göre ([www.unaids.org](http://www.unaids.org)) tüm dünyada HIV ile enfekte kişi sayısı 33 milyondur ve bunun üçte ikisini Sahra-altı ülkelerde yaşayanlar oluşturmaktadır. 2007 yılı içinde 2.7 milyon kişi, başka bir deyişle her 1 dakikada yaklaşık 5 kişi HIV ile enfekte olmuştur (24). Bu sayıda önceki yıllara kıyasla azalma olduğu dikkati çekmektedir. Bunun en önemli nedeninin UNAIDS ve Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'nün düzenlediği eğitim kampanyaları olduğu düşünülmektedir. AIDS'e bağlı olarak da 2007 yılında 2 milyon kişi, 1981 yılından itibaren de 28 milyon kişi yaşamını yitirmiştir. Tüm dünyada HIV ile enfekte kişilerin %50'sini kadınlar oluştururken Sahra-altı bölgede bu oran %70'lere ulaşmaktadır. Günümüzde HIV ile mücadelede dikkati çeken en önemli sorun, özellikle Sahra-altı Afrika'da olmak üzere ilaca erişimde hala yaşanan güçlüklerdir. Şekil 2.3'te UNAIDS 2007 verilerine göre dünyadaki HIV prevalansı gösterilmektedir.





**Şekil 2.2.** HIV-1 M grubunun dünyadaki dağılımı. (www.wisdomofwhores.com'dan uyarlanmıştır)

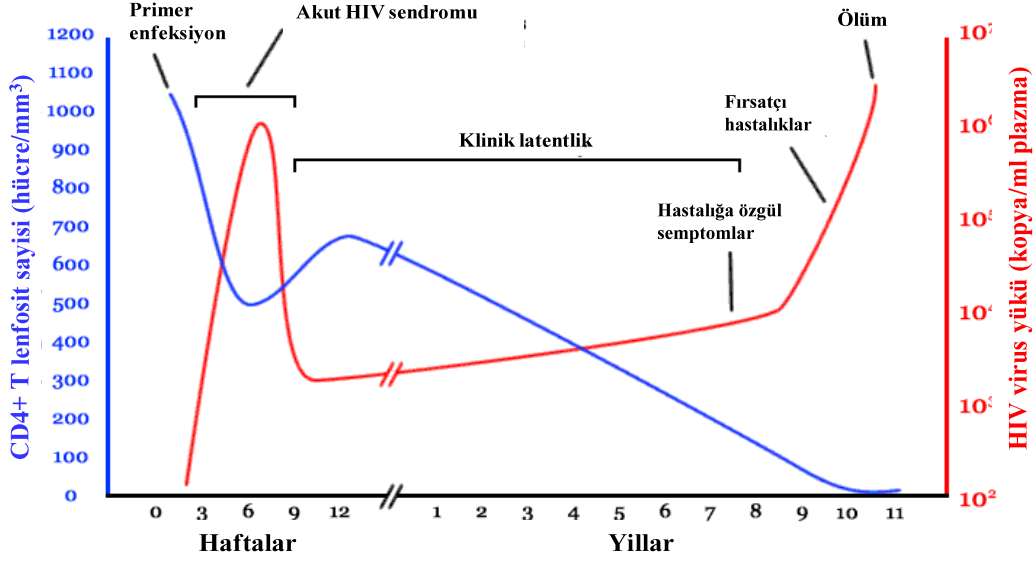


**Şekil 2.3.** HIV enfeksiyonuna global bakış. (www.unaids.org'dan uyarlanmıştır)

## 2.4. HIV Patogenezi

HIV bulaşı, korunmasız cinsel temas yoluyla, anneden bebeğe konjenital yolla ya da emzirme yoluyla, enfekte kan ve kan ürünlerinin transfüzyonu yoluyla veya kontamine iğne kullanımı yoluyla gerçekleşir. Primer enfeksiyon subklinik olabilir ya da antikorun olduğu (serokonversiyon) 2. hafta civarında ateş, yorgunluk, bitkinlik, cilt döküntüsü ve lenfadenopati ile karakterize enfeksiyöz mononükleozis benzeri bir tabloyla ortaya çıkabilir (124). Bulaş en sık korunmasız cinsel temas yoluyla olduğundan, hayvan enfeksiyonları da en çok genital mukoza yoluyla oluşturulmuştur. HIV/SIV, genital mukozadaki intraepitelyal lenfositleri veya dendritik hücre (DH)'leri enfekte ederek ya da sadece DH'lere tutunarak mukozadan geçer. Virusun bu ilk enfeksiyonu sonrasında mukozanın altındaki CD4+ yardımcı T hücreleri (Th)'ne (istirahat halinde veya aktif) antijen sunumu gerçekleşir. Enfekte hücreler veya bu hücrelerden salınan serbest virus partikülleri lenf bezine göç ederek bu bölgelerdeki CD4+ Th ile DH'leri enfekte eder. Lenf bezlerinden gelişen viremi sonrasında enfeksiyon, gastrointestinal sistem (GİS) mukozasına, dalağa, diğer periferik lenf nodlarına ve beyne yayılır. Enfeksiyonun bu akut dönemi sırasında CD4+ Th sayısı hızla düşer ve plazma virus yükü hızla yükselir (46, 67, 121). SIV modelinde, bulaştan hemen sonra hem aktive hem de istirahat halindeki CD4+ Th hücrelerinde üretken (productive) enfeksiyonun olduğu gösterilmiştir (96, 104). Bu çalışmalara göre, CD4+ Th hücre kaybının en yoğun olduğu bölge GİS mukozasıdır. Bu durum, HIV enfeksiyonunun ilk dönemlerinden itibaren orofaringiyal kandidoz ve diğer GİS enfeksiyonlarının neden bu kadar sık görüldüğünü açıklamaktadır. Birkaç hafta devam eden viral replikasyon, daha sonra sitotoksik T hücreleri ve nötralizan olmayan antikor-kompleman sistemi tarafından kontrol altına alınır ve "viral yük düzeyi" (viral set point; VSP) belirlenir. VSP, enfeksiyonun prognozunda önemli bir role sahip olup, VSP ayarından sonra enfeksiyon kronik ve asemptomatik bir sürece girer (107, 148). Bu dönem, her ne kadar "asemptomatik" olsa da, viral replikasyon ve CD4+ Th kaybı devam eder. İmmün sistemin "tükenmesi" sonrasında da AIDS gelişir (24). VSP belirlenmesi ile AIDS gelişimi arasında geçen süre 2-18 (ortalama 8) yıldır. HIV-2 ile enfekte kişilerde CD4+ Th hücre sayısı daha yüksek, virus yükü daha düşük ve AIDS gelişim süresi de daha uzundur. İmmün sistemin tükenmesine bağlı olarak ortaya çıkan

fırsatçı enfeksiyonlar ve malignansi ölümün en sık nedenidir. HIV enfeksiyonunun seyri Şekil 2.4’de gösterilmektedir.



Şekil 2.4. HIV enfeksiyonunun seyri. (www.microbiology.bytes)

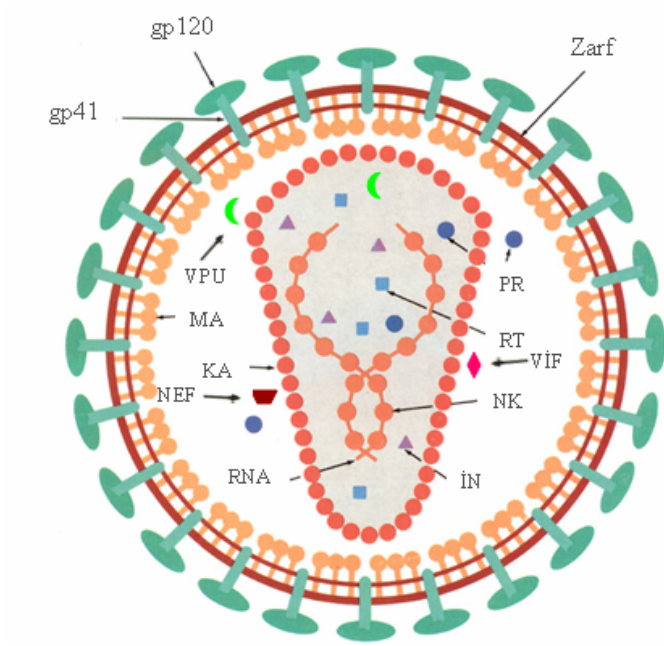
## 2.5. Virus Yapısı, Genom Organizasyonu ve Sınıflandırması

*Retroviridae* ailesi tüm omurgalıları enfekte edebilen büyük bir virus grubunu içinde barındırır. Doğadaki biyolojik bilginin DNA→RNA→protein yönündeki akışının bir dogma olduğu düşüncesi retrovirusların keşfiyle sona ermiş ve bu buluş 1975 yılında David Baltimore ve Howard Martin Temin'i Nobel Tıp Ödülü ile buluşturmuştur (3, 147). Uluslararası Virus Taksonomi Komitesi'ne göre *Retroviridae* ailesi basit ve karmaşık olmak üzere iki gruba ayrılır. Basit grup içinde yer alan alfa-, beta-, ve gama-retroviruslarda sadece Gag, Pro, Pol ve Env gen ürünleri bulunurken, karmaşık grup içinde yer alan delta-, epsilon-, lenti- ve spuma-retroviruslar diğer gruba ek olarak küçük regülatör ve aksesuar gen ürünlerini de içerir (53). Tablo 2.1'de *Retroviridae* ailesinin üyeleri gösterilmektedir.

**Tablo 2.1.** *Retroviridae* ailesinin üyeleri.

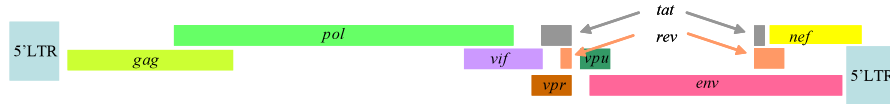
GEN YAPISI	RETROVİRUS	ÖRNEK	OMURGALI	
<b>Basit</b>	Alfaretrovirus	Kuş lökoz virusu	Kuşlar	
		Rous sarkom virusu		
	Betaretrovirus	Fare meme tümörü virusu	Fare, primat, koyun	
		Mason-Pfizer maymun virusu		
<b>Gamaretrovirus</b>	Gamaretrovirus	Jaagsiekte koyun retrovirusu	Fare, kedi, primat, kuş, koyun, sürüngen	
		Fare lösemi virusu		
		Kedi lösemi virusu		
		Gibbon maymunu lösemi virusu		
<b>Karmaşık</b>	Deltaretrovirus	Retiküloendotelyoz virusu	Sığır, primat, insan	
		İnsan T hücre lösemi virusu 1 ve 2		
		Sığır lösemi virusu		
	Epsilon retrovirus	Epsilon retrovirus	Maymun T hücre lösemi virusu 1, 2 ve 3	Balık, sürüngen
			Walleye dermal sarkom virusu	
	Lentivirus	Lentivirus	Walleye epidermal hiperplazi virusu 1	Kedi, at, primat, insan
			HIV-1 ve HIV-2	
			SIV	
			At infeksiyöz anemi virusu	
			Kedi immün yetmezlik virusu	
			Kaprin artrit ensefalit virusu	
			Visna maedi virusu	
			İnsan köpüklü virusu	
	Spumavirus	Spumavirus		

Lentiviruslar ortalama 100 nm büyüklüğünde, zarflı ve sferik yapıda RNA viruslarıdır. Viral zarf, konak hücre membranına ait integrin ve tetraspanin gibi hücre proteinlerinin yanı sıra, virus genomu tarafından kodlanan glikoprotein (gp) çıkıntılardan (spike) oluşmaktadır. Bunlardan gp120 trimeri, virusun tutunma proteini olup gp41 transmembran proteinine bağlı olarak bulunur. Zarfın hemen altında yer alan matriks proteini (p17) ise, virionun olgunlaşmasında ve yapısının idamesinde rol oynar. Koni şeklinde olan kapsid proteini (HIV-1’de p24, HIV-2 ve SIV’de p26) de, viral genomu ve virusun kodladığı enzimleri çevreler. Nükleokapsidin (p7) içinde pozitif polariteli 2 adet (diploid) tek zincirli RNA bulunur. Bu RNA zincirlerine, konak hücreden alınan ve transkripsiyon sırasında primer görevi gören tRNA bağlıdır. Virion içinde virus tarafından kodlanan proteaz, revers transkriptaz (RT) ve integraz enzimleri ile bunlara ek olarak bazı aksesuar proteinler (HIV-1’de Vif, Vpr, Vpu; HIV-2 ve SIVsm’de Vpu yerine Vpx) yer alır. HIV-1 virionunun yapısı Şekil 2.5’de, HIV ve SIV’in genomik organizasyonu ise Şekil 2.6’da gösterilmektedir.

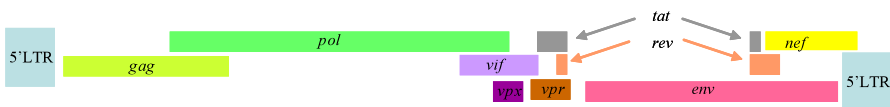


**Şekil 2.5.** HIV-1 virionunun yapısı. MA: matris, KA: kapsid, İN: integraz, NK: nükleokapsid, RT: revers transkriptaz, PR: proteaz. (www.chm.tcu.edu/HIV.jpg)

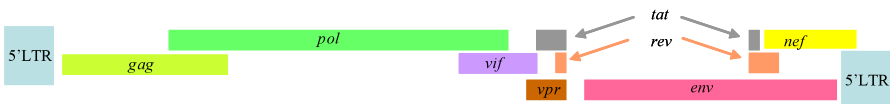
#### HIV-1 ve SIVcpz



#### HIV-2 ve SIVsm



#### Diğer SIV'ler



**Şekil 2.6.** HIV ve SIV'in genomik organizasyonu (65). (SIVcpz: şempanze varyantı; SIVsm: külrengi mangabey varyantı)

Uzunluğu  $10^4$  baz çifti olan HIV genomu, uzun uç tekrarlarla (long terminal repeats, LTR) çevrelenmiştir ve bir düzine açık okuma çerçevesi (open reading frame; ORF) içerir (65). Majör ORF'lerde yapısal ve enzimatik proteinler (*gag*, *pol* ve *env*), minör ORF'lerde ise yapısal olmayan, RNA'ya bağlanan proteinler (*tat*, *rev* ve *nef*) ile aksesuar proteinler [*vif*, *vpr*, *vpu* (veya *vpx*)] kodlanır. HIV-1, HIV-2 ve SIV genomu birbirine çok benzer. Bu viruslar arasındaki majör fark, HIV-1'de hem *vpr* hem de *vpu* genlerinin bulunması, HIV-2 ve SIVsm'de hem *vpr* hem de *vpx* genlerinin bulunması, diğer SIV'lerde ise sadece *vpr* geninin bulunmasıdır (Şekil 2.6).

*Gag* genomik bölgesi p55 protein öncülünü kodlar. Bu protein viral proteaz aracılığıyla kapsid (p24 veya p26), matriks (p17), nükleokapsid (p7) ve Vpr bağlayan proteinlere (p6) ayrılır. *Pol* bölgesi 3 viral enzimi kodlar: proteaz, revers transkriptaz (RT) ve integraz. Bu enzimler, translasyon sırasında Gag-Pol öncül poliprotein olarak üretilir ve daha sonra viral proteaz tarafından kesilirler. Zarfla ilişkili proteinler, *env* geni tarafından gp160 prekürsör proteini şeklinde üretildikten sonra, yüzey proteini gp120 ve transmembran proteini gp41'e ayrılırlar.

HIV gen ekspresyonu hücrel ve viral faktörler tarafından kontrol edilmektedir. Viral kontrol faktörleri olan Tat ve Rev enfekte hücrenin nükleusunda bulunur. Minör (Tat-1) ve majör (Tat-2) ekzon formunda bulunan Tat proteini, LTR promotorundaki viral transaktivasyon bölgesine (TAR) bağlanarak transkripsiyonu başlatır. LTR'de ayrıca hücrel proteinler tarafından tanınan kolaylaştırıcı (enhancer) ve promotor bölgeler de bulunmaktadır. Bu proteinler, integrasyondan sonra provirusun transkripsiyonunu düzenlerler. Bir fosfoprotein olan Rev, *env* bölgesindeki Rev yanıt elemanına (RYE) bağlanır ve viral mRNA'nın nükleustan taşınmasına, stabilizasyonuna ve fonksiyonuna katkıda bulunur. Ayrıca Rev'in RYE'na bağlanması sonucu erken regülatör protein transkripsiyonundan geç viral yapısal protein transkripsiyonuna geçilir.

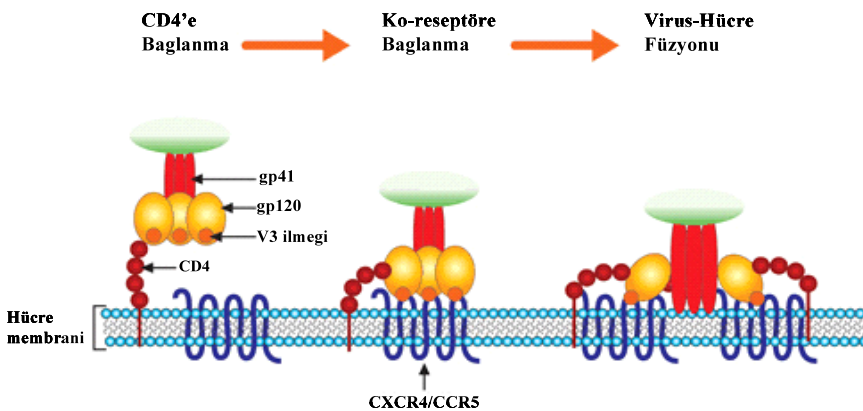
Virusun enfektivitesini artıran bir protein olan Nef, CD4+ Th lenfositlerinin aktivasyon durumunu değiştirmekte ve ayrıca enfekte hücrenin yüzeyindeki CD4 ve MHC (major histocompatibility complex) -1 ekspresyonunu azaltarak immün yanıtta kaçışta rol oynamaktadır. Yine bir viral enfektivite faktörü olan Vif'in ise virus partikülü yapımı üzerine etkisi yoktur; ancak Vif yokluğunda oluşan virus

partikülleri defektiftir. Vif'in bir diğer önemi, hücrel antiviral proteinler olan APOBEC3G ve APOBEC3F'yi inhibe etmesidir. Bir sitidin deaminaz olan APOBEC enzimi, *vif* geninden yoksun ( $\Delta vif$ ) HIV-1'de viral revers transkriptlerin negatif zincirini deamine etmek suretiyle viral replikasyonu durdurmaktadır. Virusun diğer aksesuar proteinlerinden biri olan Vpu, endoplazmik retikulumda CD4 molekülünü parçalayarak ve enfekte hücrelerden virion salınımını hızlandırarak işlev görürken; bir diğeri olan Vpr (homoloğu Vpx) enfekte hücrenin nükleusuna yerleşerek pre-integrasyon kompleksinin nükleusa taşınmasını, hücre büyümesinin durdurulmasını, hücrel genlerin transaktivasyonunu ve hücre farklılaşmasının indüksiyonunu sağlamaktadır (53).

## 2.6.Replikasyon Döngüsü

### 2.6.1. Hücreye giriş

HIV replikasyonu viral zarf glikoproteinleri ile hücre reseptörlerinin etkileşimi sonucu başlar (Şekil 2.7). Virus, gp120'nin V3 ilmeğinde bulunan CD4'e bağlanma bölgesi (CD4-BB) ile CD4 molekülüne tutunur ve bu bağlanma gp120 trimerinde yapısal bir değişikliğe neden olur. Bunun sonucunda gp120'de ko-reseptör bağlanma bölgesi oluşur ve ko-reseptör (sıklıkla CCR5 veya CXCR4) ile bağlanma gerçekleşir (85). Daha sonra, gp120 trimeri yanlara açılır, gp41'de yapısal değişim olur ve füzyon peptidi hücre membranına girerek füzyonu sağlar (52). Füzyon sonrası zarfından ayrılan nükleokapsid sitoplazma içine geçer (61).



**Şekil 2.7.** HIV'in konak hücre membranına tutunması ve füzyon. (www.salvagertherapies.org 'dan uyarlanmıştır)

Her ne kadar insan ve primat lentiviruslarının hücreye girmek için kullandığı ana reseptör CD4 olsa da, HIV-2 ve SIV'in hücre içine CD4'ten bağımsız olarak da girebildiği bilinmektedir (32, 50, 128). HIV-1'de ise durum biraz farklı olup, HIV-1 laboratuvar suşları CD4'e gerek duymadan hücre içine girebilirlerken, primer HIV-1 izolatlarında bu durum son derece nadirdir (68, 159).

Lentiviruslar hücre membranı ile füzyon yapabilmek için mutlaka ko-reseptörlere gereksinim duyarlar. Ko-reseptörler genellikle fiçı şeklinde bir yapıya sahip olan, plazma membranını 7 kez geçen ve G proteinine bağlanan kemokin reseptörleridir (132). Kendilerine bağlanan ligandların moleküler yapılarına göre kemokin reseptörleri C, CC, CXC ve CX3C grupları altında sınıflandırılırlar. Tablo 2.2'de HIV ve SIV tarafından kullanılan temel reseptörler ve eksprese edildikleri hücreler görülmektedir.

**Tablo 2.2.** HIV ve SIV'in en sık kullandıkları reseptörler ve eksprese edildikleri hücreler (13, 44, 51, 69).

RESEPTÖR	HÜCRE
CD4	CD4+ Th lenfosit, monosit, makrofaj, dendritik hücre
CCR3	Eosinofil, nötrofil, bazofil, monosit, makrofaj, dendritik hücre, kemik iliği hücreleri, T lenfositler, trombosit, keratinosit
CCR5	Monosit, makrofaj, NK hücresi, bazofil, dendritik hücre, kemik iliği hücreleri, T hücresi (özellikle aktive/hafıza)
CXCR4	T hücresi (naif), kemik iliği stromal hücreleri, progenitör lenfosit, dendritik hücre, B hücresi, plazma hücreleri
CXCR6	T hücresi, dendritik hücre, kolorektal epitelyal hücreler, kemik iliği stromal hücreleri
gpr15	CD4+ Th lenfosit, makrofaj, ince barsak epiteli

HIV-1'in genital mukozadan bulaşı sırasında virus çeşitliliğinde %99'a varan bir azalma olduğu ve bulaştan CCR5 reseptörünü kullanan virusların (HIV-1 R5) sorumlu olduğu bilinmektedir (1, 45). Yeni konağa bu "darboğaz"dan (bottleneck) giriş sonrasında kronik asemptomatik fazda HIV-1 R5 virus baskınlığı devam eder. AIDS tablosunun gelişmesinden hemen önce de R5 fenotipinden daha patojenik olduğu bilinen CXCR4 (X4) formuna %50 sıklıkta geçiş olur (129). R5 fenotipinde kalmaya devam eden virusların da patojenitesinin arttığı bilinmektedir (12).

CXCR4 ve CCR5 ko-reseptörlerinin yanı sıra HIV-1'in kullandığı minör ko-reseptörler olarak; CCR2b, CCR3, CCR8, CXCR6, gpr1, gpr15, RDC1 ve APJ (30,

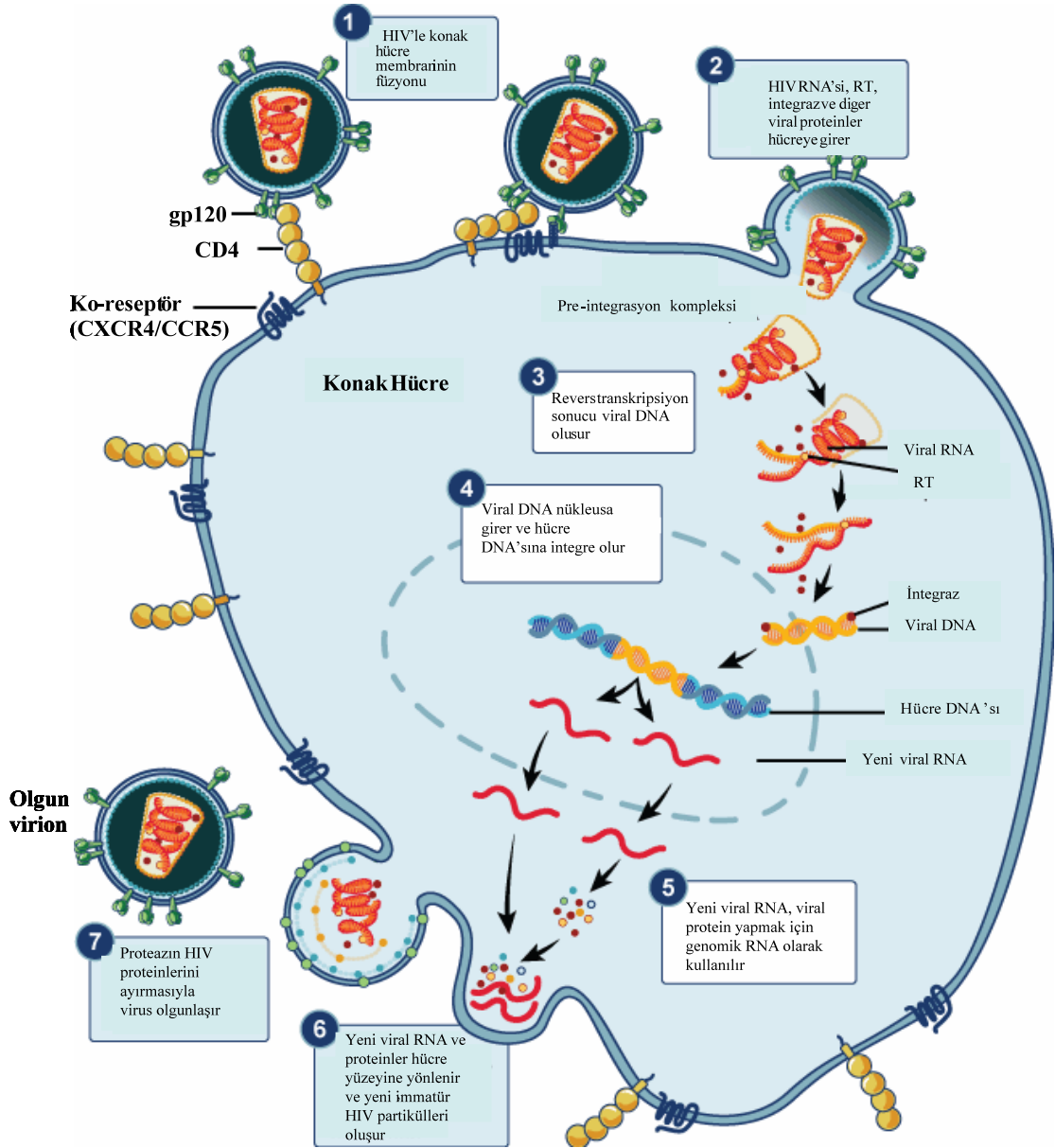


44, 48, 72, 140); HIV-2 için ise CCR1, CCR2b, CCR3 ve gpr15 molekülleri tanımlanmıştır (15, 106, 110).

SIV'in en sık kullandığı ko-reseptör CCR5 olup, ikinci sırayı CXCR6 ve gpr15 ko-reseptörleri almaktadır (44, 51, 116). SIV'in ancak insan periferik kan mononükleer hücrelerinde üretildiğinde CXCR4 reseptörünü kullandığı bilinmektedir (116). SIV'in kullandığı diğer ko-reseptörler de CCR1, CCR2b, CCR3, CCR8, CX3CR1, gpr1, APJ, ChemR23 ve RDC1 olarak sayılabilir (50, 79, 103, 134).

### **2.6.2. Transkripsiyon, entegrasyon ve translasyon**

Kapsidin parçalanması sonucu serbest kalan diploid RNA genomu, RT enzimi aracılığıyla önce tek iplikli DNA'ya sonra da RT enziminin polimeraz işlevi ile çift iplikli DNA'ya dönüştürülür (Şekil 2.8) (53). RT enziminin hata düzeltme (proof-reading) özelliği olmadığından ve her iki RNA zincirinden atlayarak farklı parçaları kodlayabildiğinden, replikasyon sırasındaki mutasyon frekansı çok yüksektir. Sitozol içinde oluşan viral DNA, Vpr proteini ve viral integras ile birlikte "pre-integrasyon kompleksi"ni oluşturarak nükleusa doğru ilerler. Nükleus içine giren viral DNA integras enziminin yardımıyla hücre genomuna yerleşir. Entegre olan virus genomuna "provirus" adı verilmektedir. Provirustan mRNA transkripsiyonu, hem viral hem de hücresel faktörler tarafından kontrol edilen hücresel RNA polimeraz II enzimi ile olur. Viral mRNA kopyaları nükleus porlarından sitoplazmaya geçip, hücre ribozomları aracılığıyla viral proteinlerin sentezlenmesini sağlarlar.



Şekil 2.8. HIV'in replikasyon döngüsü.. (www.web-books.com'dan uyarlanmıştır)

### 2.6.3. Virus montajı (assembly)

Virus partiküllerinin montajı plazma membranında gerçekleşir. Montajın önemli bir kısmı Gag ve Gag-Pro-Pol proteinleri aracılığıyla olur ancak partikül oluşumu için Gag varlığının yeterli olduğu da bilinmektedir (17). Translasyon sonrası Gag'ın N-ucuna miristik asit bağlanır ve plazma membranına Gag'ın

bağlanması miristik asit aracılığıyla gerçekleşir (131). Viral RNA'nın paketlenmesinde yine Gag ve viral RNA'daki paketleme sinyali ( $\Psi$ ) rol alır. Daha sonra Gag ve viral glikoprotein trimerleri, içinde tomurcuklanma için gerekli hücre proteinleri bulunan multiveziküler cisimcikler içinde plazma membranına taşınırlar. Bu veziküllerin lipid raftların yoğunlaştığı bölgelerde plazma membranı ile füzyon yaptığı düşünülmektedir.

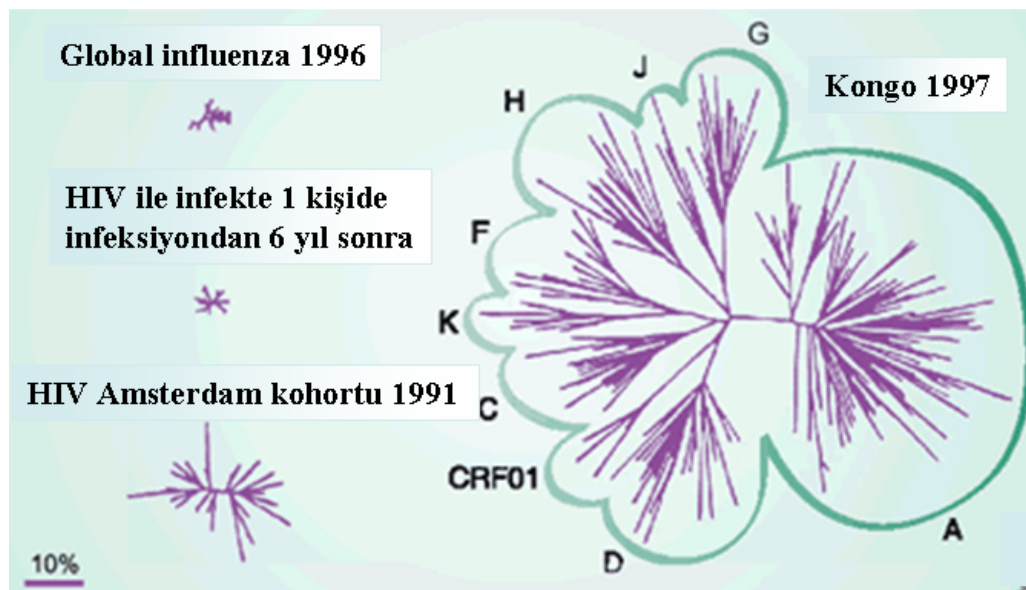
#### 2.6.4. Tomurcuklanma ve olgunlaşma

Plazma membranından tomurcuklanarak çıkan “zarflı partikül”lerin içinde viral proteinler ve genomik RNA bulunur (53). Bu partiküller enfeksiyöz olmayan, immatür viral progeni partikülleridir ve sferik kor içerir. Tomurcuklanma sonrası, Gag ve Gag-Pro-Pol polipeptidleri viral proteaz tarafından kesilerek aktivite kazanmaktadır. Gag öncül proteininin kesimiyle p6, p7, p17 ve p24 proteinlerini oluşturur. P24 viral kapsidi, p17 ise matriksi oluşturarak zarf stabilizasyonunu sağlar. Olgunlaşma sonucunda sferik olan kapsid koru, koni şeklini alır.

#### 2.7. Antijenik Çeşitlilik

HIV'in sahip olduğu yüksek antijenik çeşitlilik, konağın immün yanıtından kaçışta büyük öneme sahiptir. Bu durum en sık ve doğal olarak immün sistemin etkisinin en yoğun olduğu bölgede yani zarf yapısında ortaya çıkmaktadır. Bu bölgenin HIV/SIV'deki karşılığı gp120 zarf proteindir. RT'nin hata düzeltme mekanizması olmadığından, HIV/SIV'in replikasyonu sırasında her 10.000 baz çiftinde 1 adet mutasyon olmaktadır (101). Hücresel DNA polimerazdaki mutasyon sıklığının 1.000.000.000 baz çiftinde 1 mutasyon olduğu göz önüne alınırsa HIV/SIV'deki mutasyon hızının ne kadar yüksek olduğu daha iyi anlaşılabilir. HIV enfeksiyonu sırasında günde yaklaşık  $10^{10}$  yeni virus partikülü yapıldığı düşünülürse bu hergün  $10^6$  mutant virusun oluştuğuna işaret eder (67, 121). HIV/SIV'de görülen mutasyonların bir diğer nedeni de, hücrenin birden fazla virusla enfekte olması durumunda gen alışverişinin (rekombinasyon) ortaya çıkmasıdır. HIV ile enfekte hastalardan alınan splenositlerin ortalama 3 farklı virusla (aralık 1-8 virus) enfekte olduğunun gösterilmesi rekombinasyonların da antijenik çeşitlilikte ne kadar önemli olduğunu ifade etmektedir (62, 75). Gp120 proteininde bu mutasyonlara bağlı olarak aminoasit dizilerinde uzama, glikozilasyon sayısında artış ve aminoasit yükünde

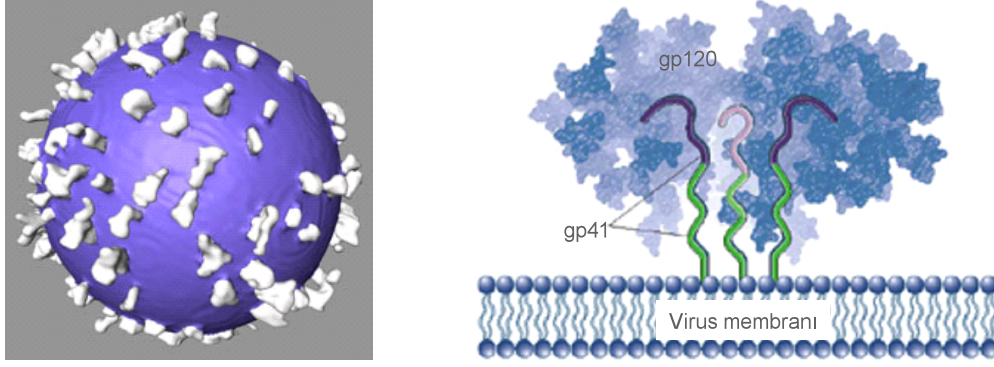
değişme ortaya çıkmaktadır (54, 142). HIV'deki mutasyon hızının ne denli sıra dışı olduğu, influenza virusu ile karşılaştırılmalı olarak Şekil 2.9'da görülmektedir (81). Buna göre, 1996 yılında 96 kişiden izole edilen H3N2 insan influenza virusunun HA1 kangalında 1 yıl içinde görülen genetik değişim, HIV ile enfekte sadece 1 hastada 6 yıl içinde görülen *env* sekansındaki genetik değişim ile hemen hemen aynıdır. Amsterdam'da yaşayan HIV pozitif 23 hastanın bir yıllık izleminde görülen genetik değişim, Kongo'da yaşayan 193 hastanın *env* sekansındaki genetik değişim ile çok büyük boyutlara ulaşmaktadır.



**Şekil 2.9.** İncelema A virus hemaglütinininin genindeki genetik varyasyonla HIV-1 C2-V5 *env* sekanslarındaki genetik varyasyonun filogenetik analizi (81).

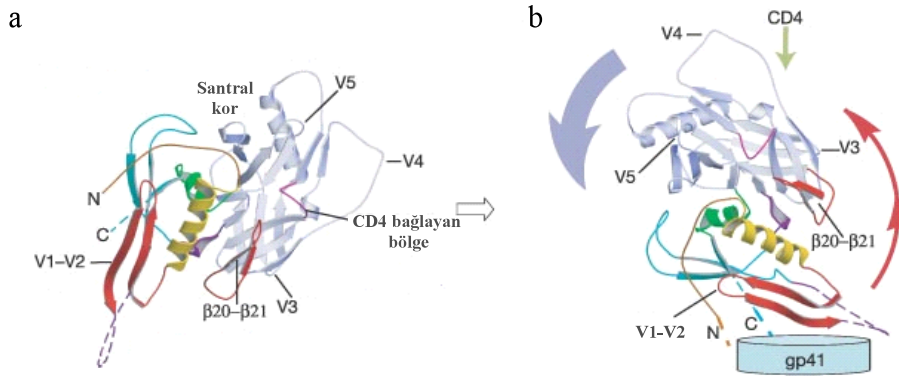
## 2.8. HIV/SIV Zarf Yapısı ve İmmünojenisitesi

Öncül zarf proteini olarak sentezlenen gp160, glikozilasyon (asparajine bağlı mannoz şekerleri), oligomerizasyon ve proteolitik parçalanma gibi translasyon sonrası modifikasyonlar ile gp120 ve gp41 proteinlerine ayrılır (133). Kendi arasında trimerler oluşturan gp120 ve gp41 proteinleri birbiriyle kovalent olmayan bağlar yaparak çıkıntılar (spike) şeklinde konak hücreden alınan zarf membranından dışarı doğru uzanır (160) (Şekil 2.10). Virion üzerinde monomer ya da dimer şeklinde de bulunabilen bu çıkıntılarının fonksiyonel formunu, sadece trimerik yapıda olanlar temsil etmektedir.



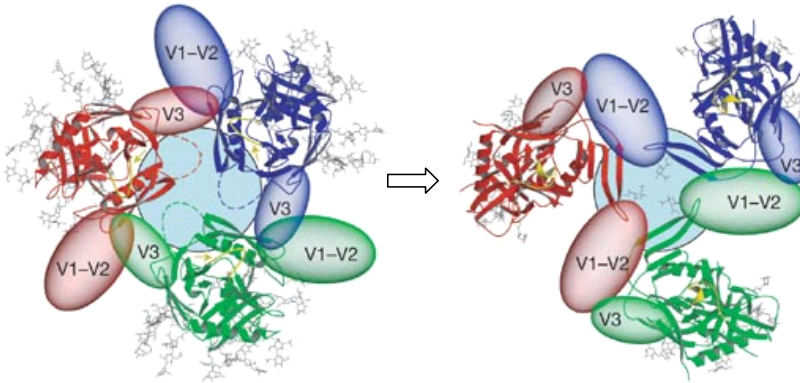
**Şekil 2.10.** HIV üzerindeki çıkıntılar (a) ve bir çıkıntıyı oluşturan gp120 ve gp41 trimerleri (b) (160).

Gp120, beş sabit (constant, C1-C5) ve beş değişken (variable, V1-V5) bölge içermektedir (28). C1-C5 bölgesi santral koru, V1-V4 bölgesi de gp120'nin dış kısmını oluşturur (Şekil 2.11). Gp120'nin V3 ilmeğinde bulunan CD4-BB, biri sığ, biri derin olmak üzere iki çukurdan oluşur. Sığ olan çukur su molekülleriyle doludur. Derin çukurun ortasına çözünür (soluble) CD4'te bulunan fenilalanin-43'ün bağlanmasıyla bu çukur açılır ve sonra gp120'de bulunan Asp368 ile CD4'teki Arg59 birbirleri arasında tuz köprüsü kurarlar. Bağlanmanın tamamlanmasını takiben gp120 yapısı, iç kangal, dış kangal ve bağlayan levha (bridging sheet) şeklinde ayrışır. Gp120'nin iç kangalını gp120'nin C ve N uçları oluşturur ve gp41'e kovalent olmayan bağlanma bu uçlarla olur. Dış kangal V1-V4 bölgelerinden oluşur ve ileri derecede glikozillenmiştir. Bağlayan levha ise V1-V2 bölgesinden paralel olmayan iki  $\beta$ -kılıfı ile V3 bölgesinden paralel olmayan iki  $\beta$ -kılıfının ( $\beta$ 20- $\beta$ 21) bir araya gelmesiyle oluşur ve bu bölge ko-reseptöre bağlanma bölgesidir. Bağlayan levhanın oluşması sırasında en büyük yapısal değişiklik iç kangalda gerçekleşir. Bu bağlanma sonucunda gp120'nin dış kangalı dışarı ve yukarı doğru hareket ederken, oluşan bağlayan levha hedef hücre membranına doğru yaklaşır (Şekil 2.11). Bağlayan levhayı oluşturan bölgelerden birisi olan V3 bölgesi, ko-reseptör özgüllüğünü de belirleyen bölgedir. Ko-reseptörün N ucu, bağlayan levhaya ve V3 halkasının köküne bağlandıktan sonra, V3'ün ucu ko-reseptörün 2. ekstraselüler halkasına bağlanır. V3'teki bu iki alan hem sekans hem de yapı olarak çok iyi korunmuştur ve bu nedenle de bu bölgedeki delesyon ve insersiyonlar sınırlı sayıdadır (71).



**Şekil 2.11.** CD4 bağlayan bölgenin açık olduğu durumdaki gp120 yapısı (a). V1-V4 bölgesi dış kangalı oluşturmaktadır. V1-V2 ve V3 bölgesindeki kırmızı alan paralel olmayan  $\beta$ -kılıfa aittir. Turkuaz mavisi gp41'e bağlanma bölgesini göstermektedir. Mor renkli alana CD4 bağlanmaktadır. CD4 bağlayan bölgeye CD4'ün bağlanması sonucu ortaya çıkan yapısal değişiklik (b) (28).

CD4'ün gp120'ye bağlanması gp41'de de yapısal değişikliğe neden olur ve toka öncülü yapı oluşur. Ko-reseptörün de bağlanması sonrası gp120 trimeri yanlara açılarak toka şeklini almış gp41'in ilerleyerek hedef hücre membranına tutunup füzyon yapmasına neden olur (Şekil 2.12) (6).



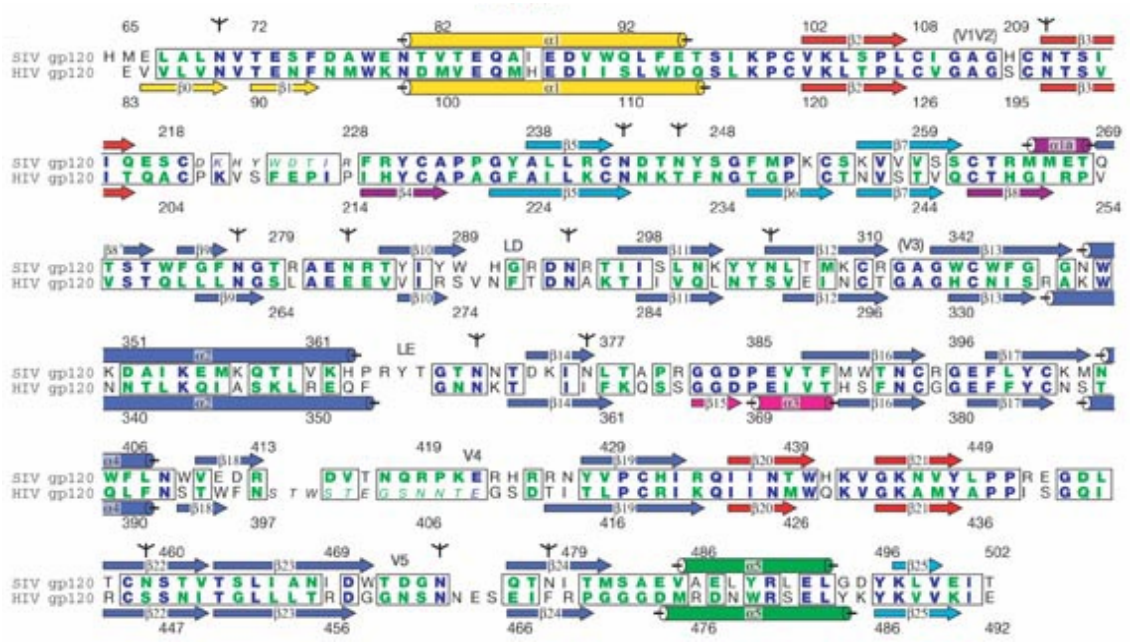
**Şekil 2.12.** CD4 bağlanmamış gp120 trimerine (monomerler pembe, yeşil ve mavi renklerde) CD4 bağlanması sonucu oluşan yapısal değişiklik. Gri renkli yapılar glikozillenmeyi göstermektedir. Şekillerin ortasındaki açık mavi renkli daire gp41'i temsil etmektedir (5).

SIV zarfı ile HIV zarfı birbirine çok benzer. Şekil 2.13'de SIVmac32H ve HIV-1 HxBc2 gp120 kor sekansı karşılaştırmalı olarak gösterilmektedir. Bununla

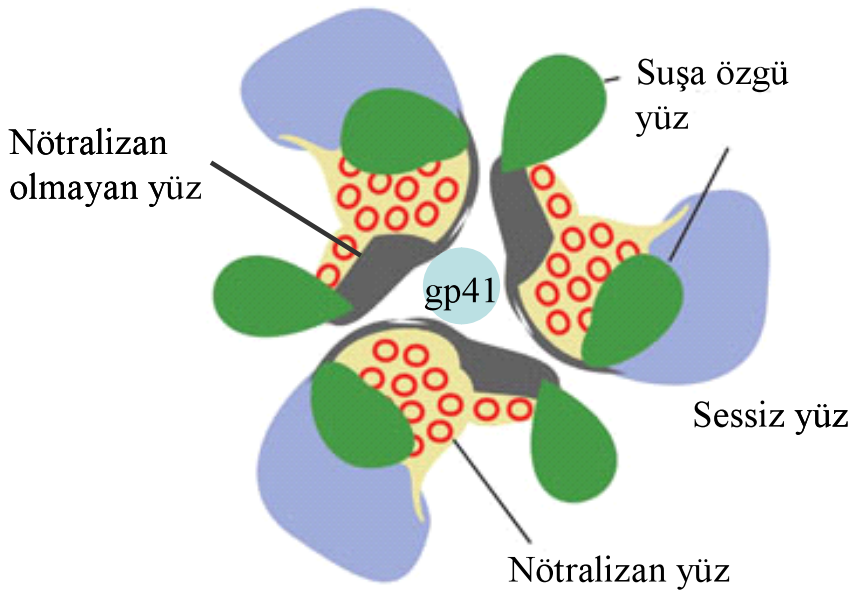
birlikte, SIVmac239 virus zarfı diğer SIV zarflarından nötralizasyona doğal dirençli olması nedeniyle ayrılır. SIVmac239'un bu direncinden sorumlu olduğu düşünülen faktörler arasında gp41 proteininin sitoplazmik kuyruğunun kısa olması; V1-V2 ilmeklerinin HIV-1'den 30-40 aminoasit daha uzun olması ve buna bağlı olarak epitoplara üzerini örtmesi; V4 bölgesindeki aminoasit mutasyonları; zarf üzerinde çok fazla sayıda fonksiyonel çıkıntı bulunması ve antikorun gp120'ye yavaş bağlanıp hızla ayrılması sayılabilir (31, 73, 74, 78, 145, 153, 158). Bir diğer önemli fark da zarfın kapalı bir yapıya sahip olmasıdır. Öyle ki, SIVmac239 gp120'sinde bağlayan levhanın oluşup ko-reseptöre bağlanabilmesi, yani yapının açılması için önce mutlaka sCD4, CD4-BB'ye bağlanmalıdır. Ama SIVsm gibi nötralizasyona doğal duyarlı virusların zarf yapısı zaten açık bir yapıya sahiptir ve bağlayan levhanın oluşması için CD4'e gerek yoktur; yani SIVsm ko-reseptörlere CD4'ten bağımsız olarak bağlanabilir (88, 152).

Gp120-gp41 trimerinin uzaysal konumu göz önüne alındığında, tam ortadan geçen aksise bakan gp120 yüzünü iç kangal, dış yüzünü de dış kangal oluşturmaktadır (Şekil 2.14) (84). Her ne kadar iç kangal sekansı göreceli olarak korunmuş olsa da, oligomerik zarf kompleksi içinde bulunduğundan bu bölgeye bağlanan antikorların nötralizan etkisi yoktur; dolayısıyla bu bölge "nötralizan olmayan yüz" olarak adlandırılır. Dış kangal antikorların ulaşabileceği bir konumda olmasına rağmen, ileri derecede glikozillenmiş olduğundan, antikorların "glikozil yastığını" geçip bu bölgeye ulaşması çok zordur; bu nedenle bu bölge "sessiz yüz" olarak isimlendirilir. Gp120'deki üçüncü yüz nötralizan yüz olarak adlandırılır çünkü bu bölgedeki epitoplara nötralizan antikor (Nak) yanıtını uyarabilirler.





**Şekil 2.13.** SIVmac32H ve HIV-1 HxBc2 gp120 kor sekansları. Mavi renkli harfler ortak sekansa, yeşil renkliler konservatif substitüsyonlara ve italik olanlar da farklılıklara işaret etmektedir.



**Şekil 2.14.** Gp120-gp41 trimerinin üstten görünümü.



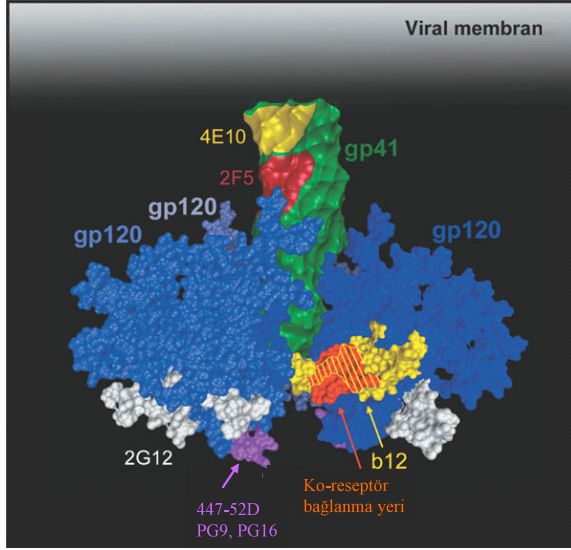
## 2.9. HIV-1'e Özgül Nötralizan Antikor Yanıtı

Nak'ların virus yükü üzerine etkisi tartışmalı olsa da, enfeksiyonun seyri sırasında Nak'ların seçici baskısından kaçabilen virusların varlığı, bu antikorların HIV üzerindeki etkisinin önemli bir göstergesi olarak kabul edilmektedir (144). Ayrıca, ART almaksızın en az 10 yıl boyunca virus yükünü 50 kopya/ml'nin altında tutmayı başaran "özel hastalar"da (elite controller) da etkin hücrel immüniteye eşlik eden Nak yanıtının olduğu gösterilmiştir (8, 136). Yine en az 1 yıldır HIV-1 ile enfekte olup ART almayan ve AIDS klinik bulguları gelişmeyen hastaların %25'inde orta-geniş düzeyde reaktiviteye sahip Nak varlığı da gösterilmiştir (49). Aslında HIV ile Nak'lar arasında sürekli bir yarış olduğu, ancak Nak'ların bu yarışta hep ikinci sırada yer aldığı söylenebilir. Gerçekten de, gp120-gp41 trimerinde ortaya çıkan mutasyonlar ve trimer üzerindeki yoğun glikozillenme virusun o anda varolan Nak'lardan bir süre kaçabilmesini sağlamakta ve bu durum, yeni virus tipinin immün sistem tarafından tanınarak ona karşı Nak oluşturulmasına kadar devam etmektedir. Daha sonra bu Nak'lara da direnç geliştirmekte ve bu süreç enfeksiyon boyunca devam etmektedir.

Şu ana dek izole edilmiş olan geniş etkili 7 Nak tipi mevcuttur. İlk bulunan geniş etkili Nak (b12), içerdiği çok uzun CDR-H3 (ağır zincirin 3. değişken bölgesi) ilmiği (loop) aracılığıyla gp120 üzerindeki CD4-BB'ye bağlanmaktadır (21). Bir diğer geniş etkili Nak olan 2G12 antikor, gp120'nin dış kangalındaki yoğun mannoz şekerleriyle glikozillenmiş epitopa bağlanır. Bu antikorun her iki ağır zinciri Y şeklinde değil U şeklindedir; bir başka deyişle birbirine paraleldir. Ayrıca bu antikorun yapısında, ikisi ağır ve hafif zincirin değişken bölgelerinde diğeri de iki ağır zincirin arasında olmak üzere toplam üç adet antijen bağlayan bölge bulunur (23). Bu durum, aslında son derece kaygan olan mannoz şekerlerine antikorun 3 koldan bağlandığını ve bunun da tutunmayı güçlendirerek aviditeyi artırdığını düşündürmektedir. Geniş etkili üçüncü Nak, V3 ilmiğinin ucunda bulunan GPGR sekansına bağlanan 447-52D antikorudur. HIV-1 grup B viruslarda korunmuş olarak bulunan bu bölgeye bağlanan antikorun genişliği, diğer gruplarda bu bölgenin olmaması nedeniyle sınırlıdır (38). 2009 yılında yeni keşfedilmiş olan PG9 ve PG16 antikorları da gp120'nin V2 ve V3 ilmeklerine bağlanmaktadır (154).

Gp41, gp120'ye kıyasla mutasyonlara yatkınlık açısından daha iyi korunmuştur ve füzyon olayı da tüm HIV gruplarında ortaktır. Buna ek olarak, gp41'in alt kangalının peptid analogu olan enfuvirtid günümüzde tedavide kullanılmakta olan etkin bir ilaçtır. Buna karşın, enfuvirtidin bağlandığı bölgeye özgül antikor dizaynı başarısızlıkla sonuçlanmıştır (70). Bunun nedeni, büyük antikor moleküllerinin bu dar bölgeye ulaşamaması ve bu bölgenin sadece füzyon sırasında açılıyor olması olabilir. Bütün bunlara rağmen şu ana kadar gp41'i hedefleyen ve 2F5 ve 4E10 olarak adlandırılan geniş etkili iki Nak tanımlanmıştır (21). gp41'in membrana yakın dış bölgesine bağlanan bu antikorlar sırasıyla ELDKWA ve NWFDITNWLW epitoplarını hedeflemektedirler. Geniş etkili Nak'ların gp120-gp41 trimerine bağlanma yerleri Şekil 2.15'de gösterilmektedir.

Geniş etkili NAK'lardan b12, 2G12, 2F5 ve 4E10'un HIV-1 enfeksiyonunu in vitro koşullarda ve in vivo hayvan modellerinde inhibe ettiği gösterilmiştir (11, 16, 95). Ayrıca AIDS hastalarında ART'nin kesilmesini takiben verilen 2G12, 2F5 ve 4E10 antikorlarının viral "rebound"u geciktirdikleri de bildirilmektedir (151). Ancak ne yazık ki, bu geniş etkili NAK'ların hedeflediği epitoplar kullanılarak hazırlanan aşılarda, istenilen Nak yanıtını indüklemeyi başaramamıştır. Yine de doğal trimerik zarf kompleksini ya da proteinleri taklit eden epitop geliştirme çalışmaları devam etmektedir (80, 118, 135, 143). Bu antikorlarla ilgili bir diğer sorun da (PG9 ve PG16 hariç) B grubu dışındaki virüslere yönelik genişlik ve potenslerinin kısıtlı olmasıdır (109, 137). 2F5 ve 4E10 antikorlarının da, etkin nötralizasyon için çok yüksek dozlarda kullanılması gerekliliği ve kardiyolipin otoantijenine bağlanarak otoimmün hastalıkları indüklemeleri önemli bir sorundur (11, 64).



**Şekil 2.15.** Geniş etkili Nak'ların gp120-gp41 trimerine bağlanma yerleri. Üç gp120 molekülü mavinin farklı tonlarında gösterilmiştir (21).

Yirmibeş yıl önceki ilk HIV ile enfekte kişiler ile günümüz HIV virusu ile enfekte kişilerde gelişen Nak yanıtı karşılaştırıldığında, 1985 yılına ait izolatların daha iyi Nak indükleyicisi oldukları belirlenmiştir. Başka bir deyişle günümüz HIV izolatları Nak varlığına adapte olmayı başarmış viruslardır (E.Quakkelaar; Viroloji Doktora Tezi). Virusa karşı Nak yanıtı oluşmasında önemli bir diğer etken de, virusun ko-reseptör tercihidir. Şöyle ki, X4-viruslar nötralizasyona daha duyarlı iken, R5 viruslar daha dirençlidir (122). Bu da X4 virus varyantlarının ancak immün yanıtın iyice deprese olduğu hastalığın ileri dönemlerinde ortaya çıkmasını açıklayabilir. Bununla birlikte literatürde, yüksek Nak titresine rağmen kanında HIV-1 X4 virusu bulunan ya da NAK saptanamamasına rağmen kanında HIV-1 X4 virusu saptanamayan hastalar bildirilmektedir (19, 150). Ancak ilginç olarak, HIV-1 C alt tipi ile enfekte hastalarda diğerlerine kıyasla daha potent Nak varlığı görülür ve HIV-1 C alt tipi düşük X4 konversiyonu özelliği taşıyan bir virustur (94). Virusa karşı Nak yanıtında önemli bir diğer faktör de, virusun enfekte ettiği hücre tipidir. T hücrelerini enfekte eden virusların daha açık bir zarf yapısı vardır ve bu nedenle de nötralizasyona daha duyarlıdırlar (127).

## 2.10. HIV Enfeksiyonunda B Hücre Anormallikleri

HIV ile enfekte kişilerde, poliklonal B hücre aktivasyonuna bağlı hipergammaglobulinemiden B hücre lösemi/lenfomasına kadar değişebilen geniş spektrumlu B hücresi anormallikleri görülebilir (42, 43, 108). Bu anormalliklerin nedeni, HIV'in indüklediği tümör nekroz faktör (TNF) -alfa, interlökin (IL)-6, IL-10 ve IL-15 gibi sitokinlerin aşırı salınımına bağlı indirekt etki ile virus replikasyonu ve virus proteinlerinin direkt etkisine bağlı olarak özellikle CD27<sup>+</sup> naif B hücrelerinin özgül olmayan poliklonal uyarımıdır (76, 98). Öte yandan, CD4<sup>+</sup> Th hücre sayı ve fonksiyonundaki kayba bağlı olarak özgül humoral immünite uyarımında görülen azalma ve enfekte T hücreleri üzerindeki CD70'in aşırı ekspresyonuna bağlı bellek B hücrelerinde görülen apoptotik ölüm, HIV ile enfekte hastalardaki fırsatçı enfeksiyonlardan sorumlu önemli mekanizmalardan (29, 149, 156). Sonuç olarak, HIV ile enfekte kişilerde kontrolsüz viral replikasyon varlığında en sık görülen tablo, hipergammaglobulinemiye eşlik eden özgül humoral immünite eksikliğidir. HAART uygulamasının humoral immünitedeki bu fonksiyon bozukluklarını düzeltebildiği gösterilmiştir (55, 99, 112).

## 2.11. HIV için Primat Hayvan Modelleri

Şempanzeler HIV-1 ile enfekte olabilen tek primat türüdür (14, 113). HIV'in izolasyonundan kısa bir süre sonra şempanzeler hem serbest virusla hem de HIV-1 ile enfekte hücreler ile enfekte edilmeye başlanmıştır (2, 57, 59, 60). Ancak ilginç olarak, HIV-1 ile enfekte edilen 100'den fazla şempanzenin sadece bir tanesinde AIDS gelişmiştir (113). Bunun nedeni de, her ne kadar CD4 ve ko-reseptör varlığı hemen hemen aynı olsa da sadece CD4-CXCR4'ün aynı hücrede bulunması, CD4 ve CCR5'in ise farklı hücrelerde bulunmasıdır. X4 HIV-1'in de açık zarf yapısı nedeniyle nötralizasyona daha duyarlı olduğu bilindiğinden, AIDS gelişiminin bu nedenle çok nadir olduğu düşünülmektedir (E.Quakkelaar; *J Virol* manuskripti). Gerek bu nedenle, gerekse de şempanzelerin yok olma riski altındaki tür kapsamına alınması ve bakımının pahalı ve zor olması nedeniyle şempanzelerle çalışmalar durdurulmuştur. SIV'in doğal konağında patojenik olmadığı da bilindiğinden HIV için hayvan modeli bulma konusunda zorluklar yaşanmıştır. Fakat 1985 yılında ilk kez SIVmac ile enfekte Rhesus makaklarında (*Macaca mulatta*, SIVmac'ın doğal konağı değil) lenfoma ve immün yetmezliğe bağlı fırsatçı enfeksiyon varlığının

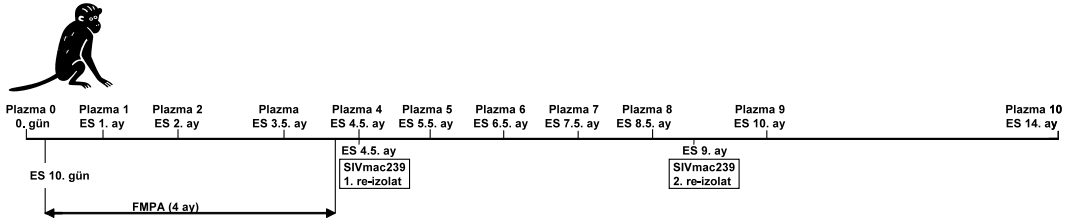
gözenmesiyle birlikte, HIV için hayvan modeli nihayet bulunabilmiştir (40, 92). Gerçekten de külrenge mangabeylerden makaklara geçen SIVsm, makaklarda SIVmac'a, güdük kuyruklu makaklarda (*Macaca arctoides*) SIVstm'ye ve domuz kuyruklu makaklarda (*Macaca nemestrina*) SIVmne'ye evrimleşmiş ve bu makaklarda patojenik özellik göstermiştir (66). Rhesus makaklarının, domuz kuyruklu makakların ya da sinomolgus makakların (*Macaca fascicularis*) SIVsm kökenli viruslarla enfeksiyonu AIDS çalışmaları için uygun hayvan modelleridir (9, 58, 83, 93, 105, 125, 126). Bu hayvan modellerinde CD4+ T hücrelerinin progresif kaybı sonunda birkaç ay-yıl içinde makak AIDS'i gelişmektedir.

### 3. GEREÇ VE YÖNTEM

#### 3.1. Makak Çalışma Programı

Çalışmada 12 adet Çin kökenli, 4 yaşında erkek *Sinomolgus* makağı (*Macaca fascicularis*) kullanıldı. Makaklar İsveç'e getirildiklerinde 4 ay karantinada tutuldu. Bu sırada SIV pol ve gag'a özgü polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) analizleriyle bu makakların SIV ile enfekte olmadıkları kanıtlandı. Hayvanlar, İsveç Tarım Komitesi, İsveç Hayvan Hakları Cemiyeti, Avrupa Konseyi Direktifi 86/609/EEC ve ETS 123 Konvansiyonu'nun önerilerine uygun olarak İsveç Enfeksiyon Hastalıkları Enstitüsü Primat Araştırma Merkezi'nde izlendi. Çalışma öncesi, Hayvan Deneyleeri Yerel Etik Komitesi'nin izni alındı. Çiftler halinde 4 m<sup>3</sup>'lük kafeslere konulan makakların fizyolojik ve davranışsal ihtiyaçlarını karşılamaya yönelik uygun ortamlar sağlandı. Çalışma sürecinde makaklar üzerinde gelişmesi olası stres faktörünü azaltmak amacıyla, makaklar çalışma başlamadan 6 hafta önce Primat Araştırma Merkezi'ne getirilerek ortama alışmaları sağlandı ve pozitif pekiştirme eğitimi uygulandı. Virus enjeksiyonu ve kan alma işlemleri öncesinde makaklar, 10-15 mg/kg dozunda ketaminle (Ketaminol, 100 mg/ml, Intervet, Hollanda) uyutuldu. Anestezi altında vücut ağırlıkları ölçüldü, inguinal ve aksiller lenf nod palpasyonu yapıldı ve dalak büyüklüğü belirlendi.

Çalışmanın ilk safhasında, makaklar 8000 MID50 (Monkey Infective Dose-50) miktarında SIVmac239 suşu ile enfekte edildi (Şekil 3.1). Enfeksiyon sonrası (ES) 7. günde tüm makaklarda yüksek düzeyde viremi gözlemlendi ve ES 10. günde, bir nükleotid revers transkriptaz inhibitörü olan (R)-9 (2-fosfonilmetoksipropil) adenin (FMPA, tenofovir) (Gilead Biosciences, Kaliforniya, ABD) günde bir kez 30 mg/kg/gün dozunda verilmek üzere subkütan yoldan başlandı (4). Dört haftalık tedavi sonrası, FMPA dozu 20 mg/kg/güne indirildi ve bu doz 12 hafta daha uygulandıktan sonra kesildi. Genel klinik durum açısından yakın gözetim altında tutulan makakların 4-6 hafta aralıklarla alınan kan örneklerinde virus yükü, CD4+ T hücre sayısı ve nötralizan antikor (Nak) kinetiği ölçümleri yapıldı.



**Şekil 3.1.** Makak çalışma programı.

### 3.2. Plazmada SIV Yüğü Ölçümü

Makaklardan alınan 7-10 ml'lik kan örnekleri 3 ml K<sub>2</sub>EDTA tüplerine (GP Supplies, Londra, İngiltere) paylaştırıldı ve 10 dakika 1300xg'de 4°C'de santrifüj edildi. Süpernatant yeni bir tüpe aktarıldıktan sonra, bu kez 15 dakika boyunca 2400xg'de 4°C'de santrifügasyon yapıldı. Elde edilen süpernatant (plazma) kriyotüplere konularak sıvı nitrojende saklandı. Dibe çöken hücrelerden akım sitometrisi yöntemi kullanılarak CD4<sup>+</sup> Th sayımı yapıldı.

Viral yükün saptanmasında, o anda laboratuvarında bulunan ve saptama alt sınırı 400 kopya/ml olan ExaVir®Load kiti (Cavidi Tech AB, Uppsala, İsveç; <http://www.cavidi.se/Templates/Cavidi/FileService>) kullanıldı. Ayırma ve revers transkriptaz (RT) ölçümü olmak üzere iki kısımdan oluşan bu kit izleğine göre, birinci günde yapılan ayırma işlemi sırasında öncelikle plazma içindeki hücreler enzimler inaktive edilip, jel yardımıyla virus partikülleri plazmadan ayrıldı. Ayrılan virusun lizisi sonucu elde edilen RT ile ikinci gün RT ölçümü yapıldı.

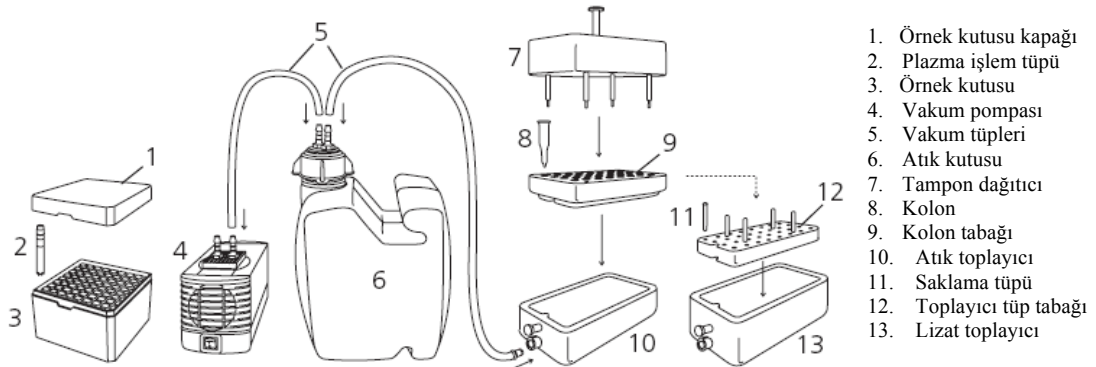
Tüm işlemler, biyogüvenlik düzeyi 3 (BGD3) olan laboratuvarında gerçekleştirildi.

#### **Kit Protokolü:**

##### **1. Gün: Virusun plazmadan ayrılması (Şekil 3.2):**

- a. *Hazırlık.* Sıvı nitrojende saklanan plazma örnekleri (en fazla 30 tane) ve -20°C'de saklanan kit negatif ve pozitif kontrolleri oda sıcaklığında eritildi. Kit içinde yer alan örnek reaktifleri, ayırma jeli, jel tamponu-1 konsantresi, jel tamponu-2 konsantresi, lizis tamponu, lizis tampon reaktifleri, RT reaksiyon plağı, RT reaksiyon tamponu, RT reaksiyon bileşenleri, seyreltme tamponu, seyreltme

tampon reaktifi ve HIV-1 rRT standardı 4°C'den oda sıcaklığına (18-33°C) getirildi.



**Şekil 3.2.** Ayırma ekipmanı.

- b. Plazma örneklerinin hazırlanması.** Örnek reaktifi 4 ml saf su ile çözülerek 10 saniye vortekslendi. Plazma işlem tüpleri 1'den 32'ye kadar numaralandırıldıktan sonra örnek kutusuna konuldu. Herbir tüpe 100 µl çözülmüş örnek reaktifi dağıtıldı ve daha sonra herbir tüpe 1 ml plazma örneği eklendi. Pozitif ve negatif kontroller sırasıyla 31 ve 32. tüplere konuldu. Kapakları kapatılmış tüpler 5 saniye vortekslendikten sonra 20 dakika boyunca karanlıkta oda sıcaklığında bekletildi.
- c. Ayırma aletlerinin hazırlanması.** Ayırma aletleri ve vakum tüplerinin %70 etanol ile dezenfeksiyonundan sonra, vakum pompası, atık kutusu ve atık toplayıcı vakum tüplerine bağlandı ve kolon tabağı atık toplayıcının üzerine yerleştirildi. Kolonlar ve saklama tüpleri 1'den 32'ye kadar numaralandırıldı ve kolon tabağıyla tüp tabağına yerleştirildi.
- d. Ayırma jelinin yerleştirilmesi.** Ayırma jeli şişesi homojenizasyonun sağlanması için hafifçe çalkalandıktan sonra, 20 dakika karanlıkta ve oda sıcaklığında bekletilmiş olan plazma ve kit kontrol örneklerinin herbirine 1 ml olacak şekilde konuldu. Tüplerin kapakları sıkıca kapatıldı, örnek kutusuna yerleştirildi ve kutunun

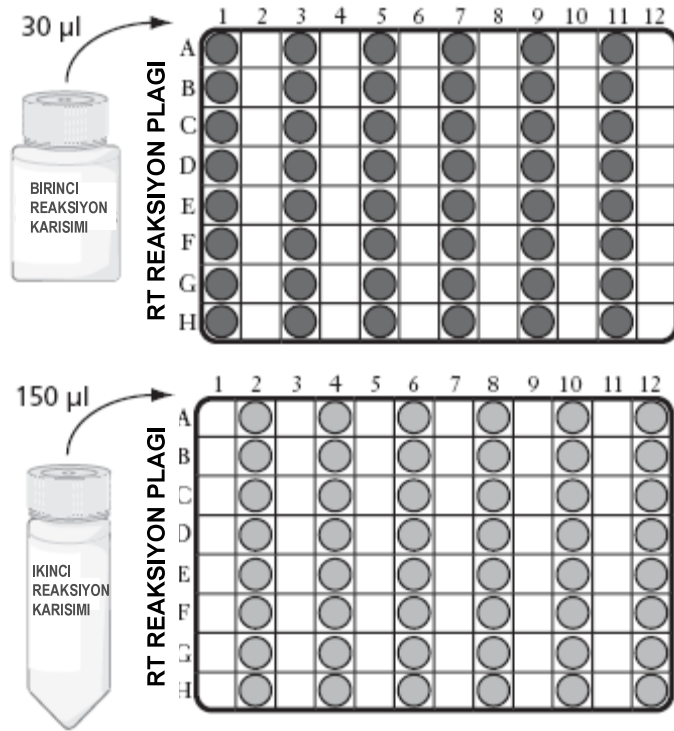


kapağı bantlandı. Örnek kutusu yan yatırılarak çalkalama tablasına yerleştirildi ve tüp içeriği oda sıcaklığında 30 dakika çalkalandı.

- e. *Tamponların hazırlanması.* Jel tamponu-1 konsantresinin içeriği, içinde 100 ml saf su bulunan 2 lt'lik bir şişeye boşaldıktan sonra çalkalandı. Sonra bu karışıma 1100 ml saf su daha eklenerek tampon hazırlandı. Jel tamponu-2 ise, içinde 260 ml saf su bulunan 500 ml'lik şişeye konsantre tampon içeriğinin eklenmesiyle hazırlandı. Lizis tamponu, 5 ml lizis tamponunun lizis tampon reaktifine eklenip 10 saniye vortekslenmesi sonucu elde edildi.
- f. *Jellerin jel tamponu-1 ile yıkanması.* 30 dakikalık inkübasyondan sonra örnek kutusundan çıkarılan tüpler vortekslenildikten sonra içerikleri kolon tabağındaki uygun kolonlara aktarıldı. Sonra atık toplayıcının valfi kapatılıp vakum pompası çalıştırılarak jel kurutuldu. Vakum pompası kapatıldıktan sonra, tampon dağıtıcı kolon tabağının üzerine yerleştirildi. Tampon dağıtıcının üstüne metal kapama plağı yerleştirildikten sonra jel tamponu-1 bu kapağın üzerinden tüplere ulaştığı kontrol edilerek döküldü. Daha sonra vakum pompası tekrar çalıştırılarak jel kurutuldu. Jel tamponu-1 ile yıkama işlemi iki kez daha tekrarlandı. Aynı işlem jel tamponu-2 ile bir kez daha tekrarlandı ve vakum pompası ile jel yeniden kurutuldu.
- g. *Virion lizisi.* İçine saklama tüplerinin konulduğu tüp tabağı lizat toplayıcıya yerleştirildi. Vakum tüpü, atık toplayıcıdan çıkarılıp lizat toplayıcıya bağlandı. İçinde kolonların olduğu kolon tabağı atık toplayıcıdan lizat toplayıcıya geçirildi. Lizis tamponu 10 saniye vortekslenildikten sonra ilk 16 kolonun herbirine 250 µl hacimde konuldu. Lizis tamponu 5 saniye daha vortekslenildikten sonra, geriye kalan 16 kolona yine aynı hacimde olacak şekilde konuldu. İki dakika beklendikten sonra vakum pompası çalıştırıldı ve valf 7 saniyelikliğine kapatıldı. Valf açılıp tekrar kapatıldı ve 7 saniye sonra valf yeniden açılarak vakum pompası kapatıldı. Daha sonra kolon tabağı kaldırılarak toplayıcı tüp tabağı yerinden

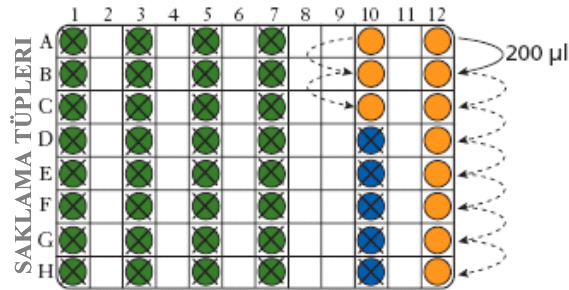
çıkarıldı ve tüpler tüp saklama tabağına konuldu. Birinci tüp A1, 2. tüp B1 pozisyonuna olacak şekilde tüpler sırasıyla yerleştirildi; 9. tüp ise A3 pozisyonuna yerleştirilerek tüp saklama tabağının üzeri kapatıldı.

- h.** *Seyreltme tamponunun hazırlanması.* Beş ml seyreltme tamponu, seyreltme tampon reaktifine konulduktan sonra 10 saniye vortekslendi.
- i.** *Reaksiyon karışımının hazırlanıp RT reaksiyon plağına eklenmesi.* Dört ml RT reaksiyon tamponu RT reaksiyon bileşenlerine eklendi ve 10 saniye vortekslendi. Elde edilen bu birinci reaksiyon karışımından 1.8 ml alınarak 15 ml'lik tüpe konuldu ve üzerine 7.2 ml'lik seyreltme tamponu eklenip 5 saniye vortekslenerek ikinci reaksiyon karışımı elde edildi. RT reaksiyon plağının 1., 3., 5., 7., ve 11. sütunlardaki çukurlarına birinci reaksiyon karışımından 30 µl; 2., 4., 6., 8., 10. ve 12. sütunlardaki çukurlarına ise ikinci reaksiyon karışımından 150 µl konulduktan sonra plak plastik kılıfla kapatıldı (Şekil 3.3).

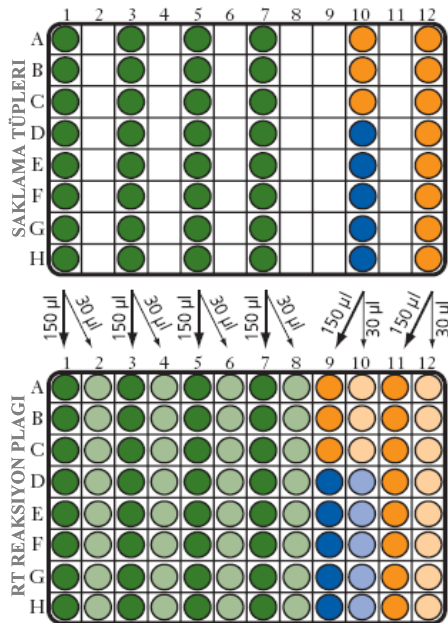


**Şekil 3.3.** Reaksiyon karışımlarının plağa konulması.

j. *HIV-1 rRT standartının seri sulandırımının hazırlanması.* HIV-1 rRT standartına 6 ml seyreltme tamponu eklenip 10 saniye vortekslendi. Toplayıcı tüp tabağının 10. ve 12. sütunlarına, herbir sütuna 8 saklama tüpü konacak şekilde toplam 16 tüp yerleştirildi (Şekil 3.4). D10-H10 saklama tüplerine sadece tampon konuldu. Çözülmüş HIV-1 rRT standardından 200 µl A12 tüpüne konulup 5 kez pipetle karıştırıldı. A12 saklama tüpünden B12 saklama tüpüne 200 µl aktararak seyreltme yapıldı. Bu işleme H12 tüpüne kadar devam edildi. H12 tüpünden yine 200 µl alınarak A10'a aktarıldı ve seyreltme işlemi bu sütunda C10'a kadar devam ettirildi.



Şekil 3.4. Toplayıcı tüp tabağına saklama tüplerinin yerleştirilmesi.



Şekil 3.5. Lizatın saklama tüplerinden RT reaksiyon tüplerine aktarılması.

k. *RT reaksiyon plağına lizat, tampon ve HIV-1 rRT standartının yerleştirilmesi.* Saklama tüplerindeki lizatlar pipetle 2 kez karıştırıldıktan sonra RT reaksiyon plağına aktarıldı. Birinci sütundaki saklama tüplerinden alınan 150 µl ve 30 µl lizat sırasıyla RT reaksiyon plağındaki 1. ve 2. sütunlara konuldu. Diğer sütunlara da Şekil 3.5.'de görüldüğü gibi lizatlar paylaştırıldı. RT reaksiyon plakları, üzerleri yapışkan bantla kapatıldıktan sonra 33°C'de 18-24 saat inkübe edildi.

## **2. Gün: RT ölçümü:**

**a.** *Deney materyallerinin hazırlanması.* Konsantre plak yıkama tamponu, RT ürün izleyicisi, RT ürün izleyici çözücüsü, substrat tableti, substrat tamponu 37°C sıcaklığa konuldu.

**b.** *Plak yıkama tamponunun hazırlanması.* Konsantre plak yıkama tamponu, toplam sıvı hacmi 5 lt olacak şekilde saf su ile sulandırıldı. Bu yıkama tamponundan, dört yıkama kovasının herbirine 500 ml konuldu.

**c.** *RT ürün izleyici çözücüsünün hazırlanması.* Ürün izleyici çözücüsü, RT ürün izleyicisine eklenip 10 saniye vortekslendi.

**d.** *Substrat tamponunun hazırlanması.* Erimiş substrat tamponuna substrat tableti eklenerek tampon hazırlandı ve kullanılmaya dek karanlıkta tutuldu.

**e.** *RT reaksiyonunun yıkama ile durdurulması.* RT reaksiyon plağı inkübatörden alınıp üzerindeki bant çıkarıldıktan sonra içeriği atık küvetine boşaltıldı. Daha sonra birinci yıkama kovasına alınan plak, çukurların ağzı yukarı bakacak şekilde yıkama tamponunun tabanından yukarı doğru yükseltildi ve sonra çukurlarda toplanan tampon tekrar kovaya döküldü. Birinci kovadaki bu yıkama işleminin 15 kez tekrarlandıktan sonra sırasıyla 2., 3. ve 4. kovalarda da yıkama işlemi yapıldı. Kuru emici kağıt üzerine çukurların ağzı aşağı bakacak şekilde yerleştirilen plak, 5 dakika boyunca kurumaya bırakıldı. Bu işlem sonrası, plak hafifçe deney masasına vurularak, çukurların içinde hava kabarcığı kalmadığından emin olundu. Yıkama kovaları, içlerindeki

yıkama tamponu atık kaplarına boşaltıldıktan sonra, önce musluk suyu, sonra saf suyla yıkanarak kurumaya bırakıldı.

**f. RT ürün izleyicisinin RT reaksiyon plağına eklenmesi.** RT ürün izleyicisi 5 saniye vortekslenerek liyofilize materyalin tamamen çözülmesi sağlandı ve RT reaksiyon plağındaki her bir çukura 100 µl konuldu. Bu sırada çukurların tabanına dokunmamaya özen gösterildi. Üzeri yapışkan bantla kapatılan plak 90 dakika 33°C’de inkübe edildi.

**g. RT ürün izleyicisinin yıkama ile uzaklaştırılması.** Artan plak yıkama tamponu her bir yıkama kovasına 0.5 litre konacak şekilde dağıtıldı. Etüvden çıkarılan RT reaksiyon plağı tekrar yıkandı.

**h. Substrat tamponunun eklenmesi.** Substrat tamponu 5 saniye vortekslendikten sonra her bir çukura 120 µl hacimde konuldu. Bu işlem sırasında kabarcık oluşmaması için ters pipetleme yapıldı ve çukurların tabanına dokunmamaya özen gösterildi. Kabarcık olduğunda temiz pipet ucuyla uzaklaştırıldı. Plağın üzerine plastik kapağı yerleştirildikten sonra oda sıcaklığında (18-33°C) ve karanlıkta inkübe edildi. Substrat konulduktan 10 dakika sonra A<sub>405</sub> dalga boyunda plağın okuması yapıldı (bazal okuma). 2-3 saat sonra ikinci ve 16-24 saat sonra da üçüncü okuma yapıldı. Okumalar arasında plak karanlıkta ve oda sıcaklığında tutulmaya devam edildi.

**ı. Sonuçların analizi.** ExaVir Load Analyzer isimli program kullanılarak RT analizi yapıldı.

### 3.3. CD4+ T Hücre Sayısı ve Yüzdesinin Akım Sitometrisi ile Ölçümü

Deneyin bu aşaması da, BGD3 olan laboratuvarında yapıldı. Kan örneğinin santrifügasyonu sonrası dibe çöken hücreler, 1 ml Dulbecco fosfat tampon solüsyonu (D-FTS) (pH 7.2, Invitrogen) ile seyreltildi. Hücre çözeltisinden 18 µl alınarak 96 çukurlu plağın bir çukuruna konuldu ve daha sonra içine 2 µl D-FTS ile sulandırılmış %0.4’lük tripan mavisi eklendi. Bu karışımdan 5-10 µl alınarak lam üzerine (Glasstick, Hycor, ABD) aktarıldı ve ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı. Daha sonra bu hücre çözeltisinden 500.000 hücre alınıp, 7 ayrı TrueCount tüpünde (5 ml, Becton Dickinson Biosciences, ABD) 100.000 hücre olacak şekilde konuldu. Tüplerin üzerine, “boyanmamış”, “anti-CD45 peridinin klorofil proteini (PerCP)

izotipi”, “anti-CD4 floresan izotiyosiyanat (FITC) izotipi”, anti-CD45 PerCP izotipi+anti-CD4 FITC izotipi, “anti-CD45 PerCP antikoru”, “anti-CD4 FITC antikoru” ve ‘anti-CD45 PerCP antikoru+anti-CD4 FITC antikoru’ yazılı etiketler yapıştırıldı. Beş dakika boyunca 4°C sıcaklıkta 2500 rpm’de santrifüj edilen tüplerdeki süpernatant atık kutusuna boşaltıldı. Tüplere, içinde %2 FDS olan D-FTS’den 2 ml konulup, vortekslendikten sonra tekrar santrifügasyon yapıldı. Tüp içeriği tekrar atık kutusuna döküldükten sonra PerCP bağlı anti-CD45, PerCP bağlı izotop, FITC bağlı anti-CD4 ve FITC bağlı izotop antikorlarından 20’şer µl etiketli tüplerin içine konuldu (BD Biosciences, ABD). Boyanmamış tüpe ise 20 µl D-FTS eklendi. Karanlıkta 45 dakika içi buz dolu kutuda bekletilen tüplere yeniden 2 ml %2 FDS içeren D-FTS konulup vortekslendikten sonra santrifügasyon işlemi uygulandı. Vorteksleme-santrifügasyon iki kez daha yapıldıktan sonra üstte kalan kısım atık kutusuna döküldü ve tüplere 200 µl %4’lük paraformaldehit konuldu. FACSCalibur cihazı ve CellQuest programı (BD Biosciences, ABD) kullanılarak veri analizi yapıldı.

#### **3.4. Periferik Kan Mononükleer Hücreleri (PKMH)’nin Hazırlanması**

Kanın içindeki eritrositlerin %80-90’ının ve plazmanın ayrıştırılması sonucu elde edilen lökosit zengin tam kan (buffy coat; BC) örneği, PKMH eldesi için kullanıldı. BC, Lund Üniversitesi Hastanesi Kan Bankası’ndan temin edildi. Dört HIV negatif vericiden alınan örneklere sınıf-2 kabinlerde aşağıdaki işlemler uygulandı:

- a. 40 ml’lik BC içeriği iki adet 50 ml’lik steril santrifüj tüpüne (TPP, İsviçre) paylaştırıldı. Tüplere 10’ar ml D-FTS eklenerek içeriğin yoğunluğu düşürüldü.
- b. Pipet ile çekilen 10 ml Ficoll-Paque (GE Healthcare, ABD) santrifüj tüplerine basınç uygulanmadan kendi akımıyla boşaltıldı ve tüplerin kapakları kapatıldı. Aynı işlem 2. tüpe de uygulandı. Daha sonra tüpler 1500 rpm’de 30 dakika santrifüj edildi.
- c. Tüplerde oluşan 4 katman arasından (en üstteki katmanda plazma, ikinci katmanda PKMH (buffy coat), üçüncü katmanda Ficoll-Paque ve en alt katmanda eritrosit-granülosit pelleti bulunmaktadır), üstten ikinci katmandaki PKMH pipetle dikkatlice

alınarak 50 ml'lik santrifüj tüpüne geçirildi. Tüp içine, PKMH ile aynı hacimde D-FTS eklenip hafifçe çalkalandıktan sonra, 1200 rpm'de 10 dakika santrifügasyon yapıldı. D-FTS ile yıkama işlemi bir kez daha tekrarlandı.

- d. Aynı gün kullanılmayacak hücreler, kriyotüpler içine 1 ml'de  $20 \times 10^6$  hücre olacak şekilde konularak sıvı nitrojende saklandı.

### 3.5. PKMH'den Virus Kültürü

- a. Çalışmanın bu basamağı sınıf-2 kabinde yapıldı. Sıvı nitrojen içinde saklanan PKMH tüpleri (2-4 adet) 18-22°C'deki sıcak su içinde hızla eritilip, içinde 10 ml RPMI 1640 Glutamax besiyeri [%10 fetal dana serumu (FDS), %0.5 penisilin-streptomisin (PeSt); Sigma-Aldrich, İsveç]] bulunan 50 ml'lik santrifüj tüplerine aktarıldı. 1000 rpm'de 10 dakika santrifügasyondan sonra üstte kalan kısım atıldı ve üzerlerine 10 ml RPMI 1640 Glutamax besiyeri konulup tekrar süspanse edildi.
- b. Eğer taze PKMH kullanılacaksa (2-4 vericiden alınan), D-FTS ile yıkama işlemi sonrası hücrelerin bulunduğu tüpe 10 ml RPMI 1640 Glutamax besiyeri konulup tekrar süspanse edildi.
- c. Doku kültürü şişesine (75 cm<sup>2</sup>) 35-55 ml RPMI 1640 Glutamax besiyeri konulduktan sonra 2-4 vericiden elde edilen PKMH örnekleri eklendi ve şişe içindeki son hacmin 75 ml olması sağlandı. Daha sonra şişe içine, hücre çoğalmasını indükleyici 75 µl fitohemaglutinin (FHA) (2.5 mg/ml, Invitrogen, İsveç) kondu. Kültür şişesi dik pozisyonda, nemli atmosferde (%5 CO<sub>2</sub>) 37°C'de inkübe edildi. Hücreler, FHA stimülasyonunun 2-5. günlerinde (optimum 3-4. günler) virus kültürü için kullanıldı.
- d. Şişeden alınan 90 µl'lik PKMH süspansiyonu, 96 çukurlu plağın bir çukuruna konuldu ve üzerine 10 µl tripan mavisi (%0.4) eklenerek pipetle karıştırıldı. Bu karışımdan 5-10 µl alınarak lam üzerine aktarıldı ve ışık mikroskobu altında hücre sayımı yapıldı. Herbir virus izolatıyla enfeksiyon için  $16 \times 10^6$  hücre kullanıldı. PKMH süspansiyonundan ihtiyaç duyulan miktar 15 ml'lik santrifüj tüpüne

aktarıldı ve 1400 rpm'de 5 dakika santrifügasyon yapıldı. Süpernatant atıldıktan sonra hücreler 1 ml RPMI 1640 Glutamax (%10 FDS, %0.5 PeSt, 1 ünite/100 ml IL-2 ve 2 µg/ml polibren) besiyeri içinde tekrar süspansiyon edildi. Hücre süspansiyonunun üzerine 1.8 ml virus eklendikten sonra, tüpler 45° eğimli pozisyonda ve kapakları hafif gevşetilmiş şekilde, nemli atmosferde (%5 CO<sub>2</sub>) 37°C'de bir gece inkübe edildi.

- e. Ertesi gün, enfektivite özelliği olmayan virusları uzaklaştırmak amacıyla hücre süspansiyonu 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi ve süpernatant atıldı. Virusla enfekte hücreler 10 ml RPMI 1640 Glutamax besiyeri içinde tekrar süspansiyon edildikten sonra 25 cm<sup>2</sup>'lik şişelere aktarıldı ve dik pozisyonda tutulan şişeler 37°C'de nemli atmosferde (%5 CO<sub>2</sub>) 6 gün inkübe edildi.
- f. Enfeksiyonun 7. gününde, şişenin tabanında yüzer halde bulunan PKMH'lere dokunmamaya dikkat ederek 5 ml süspansiyon pipete çekildi ve önceden üzerine tanımlayıcı bilgiler yazılmış olan tüplerin herbirine 500 µl konacak şekilde paylaştırıldı. Daha sonra şişeye 5 ml taze besiyeri eklendi. Tüpler ise kullanılıncaya dek -80°C'de saklandı.
- g. Enfeksiyonun 10. gününde, şişenin içindeki bütün süpernatant (hücreler dahil) 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı ve 1200 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant, tüpün dibindeki hücre peletine dokunmadan pipete çekildi ve önceden üzerine tanımlayıcı bilgiler yazılmış olan tüplerin herbirine 500 µl olacak şekilde paylaştırıldı. Tüpler kullanılıncaya dek -80°C'de saklandı.
- h. Virusların, PKMH'nde en fazla 3 kez kültürü yapıldı.

### 3.6. Çalışmada Kullanılan Viruslar

Nötralizasyon deneylerinde kullanılan viruslar aşağıda listelendi:

- a. Makakları enfekte etmek için kullanılan SIVmac239 inokulum virusu ve bu virusla enfekte makaklardan ES 4.5 ve 9'uncu aylarda elde edilen 2 re-izolat (sırasıyla; SIVmac239 1. ve 2. re-izolatları),



b. SIVsm stok virusu (külrengi mangabeylerden izole edilen SMM-3 türü) (P. Fultz ve H. McClure; Yerkes Ulusal Primat Araştırma Merkezi, Atlanta, ABD'den sağlandı) ve bu virusla enfekte C39 sinomolgus makağından ES 4. ve 18. aylarda elde edilen iki re-izolat (sırasıyla; SIVsm:C39<sup>sens</sup> ve SIVsm:C39<sup>res</sup>),

c. Beş HIV-1 izolatu [SF162 (B grubu), 92Br025 (C grubu), 92UG024 (D grubu), CC030 (CRF.02\_AG), CC048 (CRF.02\_AG)],

d. İki HIV-2 (1812 ve 1682) izolatu.

### 3.7. Plazma Örnekleri ile Negatif ve Pozitif Kontrollerden IgG Saflaştırılması

Çalışmanın bu basamağı BGD3 laboratuvarında yapıldı. SIVmac239 ile enfekte makakların 14 aylık izlem sürecinde, enfeksiyondan hemen önce ve enfeksiyondan sonra 1, 2, 3.5, 4.5, 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 10 ve 14. aylarda olmak üzere toplam 11 kez kan örneği alındı (Şekil 3.1). Kan örneklerinden elde edilen plazmalarla yapılan ilk nötralizasyon deneylerinde hücre toksisitesi gözlenmesi nedeniyle ve ES 1, 2 ve 3.5'uncu aylarda alınan kan örneklerinde bulunan FMPA'nın nötralizasyon üzerindeki potansiyel etkilerini ortadan kaldırmak amacıyla IgG saflaştırması yapıldı. Bu amaçla, 200 µl "Protein G-Sefaroz Hızlı Akım tanecikleri" (PrtGSHAt; GE Healthcare Bio-Sciences ABD, Kod no: 17-0618-02) mikrotüplere (1.5 ml, Sarstedt, Nümbrecht, Almanya) konup, 1 ml D-FTS'de 2 kez yıkandı. Daha sonra, sıcak plakta 56°C'de 30-60 dakika tutularak kompleman inaktivasyonunun yapıldığı 200 µl'lik plazma örneği, 200 µl D-FTS ile birlikte yıkanmış PrtGSHAt'ye eklenip tüp döndürücüye yerleştirildi. Bir saat boyunca oda sıcaklığında döndürülen karışım, 0.45 µm çaplı selüloz asetat filtresi Spin-X tüpüne (Costar, New York, ABD) aktarıldı ve 1000xg'de 1 dakika santrifüj edildi. Takiben 600 µl D-FTS eklenip 2000xg'de 5 dakika santrifügasyon yapılarak tanecikler kurutuldu. İçinde bu kurumuş tanecikleri bulunduran filtre, tabanında nötralizasyon tamponu (20 µl, 1 M Tris-HCl, pH 9.0) bulunan mikrotüplere aktarıldı. Filtreye elüsyon tamponu (90 µl, 0.1 M glisin-HCl) eklendikten sonra 1000xg'de 5 dakika santrifüj edildi. Elüsyon işlemi, 2000xg'de 5 dakika santrifügasyon yapılarak tekrarlandı. Saflaştırılan IgG (200 µl) kullanılmaya dek -20°C'de saklandı (47).

Çalışmada, negatif kontrol olarak SIV negatif makaktan elde edilen plazma örneği, pozitif kontrol olarak ise SIV-BK28 (SIVmac251'in moleküler bir klonu) ile enfekte olmuş 1YR kod adlı makaktan elde edilen serum örneği (Dr. Gerrit Kopman;

Biyomedikal Primat Araştırma Merkezi, Hollanda'dan sağlandı) kullanıldı. Bu örneklerden elde edilen saflaştırılmış IgG kullanılmaya dek  $-20^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı.

### 3.8. ELISA Yöntemiyle IgG Kantitasyonu

Saflaştırılmış IgG örnekleri içindeki IgG miktarı tarafımızca hazırlanan (in-house) ELISA yöntemi ile belirlendi (139). Bu amaçla, 96 çukurlu ELISA plağının (NUNC, Kopenhag, Danimarka) tüm çukurlarına karbonat tamponunda sulandırılan (saf suda  $0.015\text{M Na}_2\text{CO}_3$ ,  $0.03\text{M Na}_2\text{CO}_3$ , pH 9.8) keçide hazırlanmış anti-insan IgG'sinden (AffiniPure, Jackson Immunotech, ABD)  $50\ \mu\text{l}$  konuldu ve bir gece  $4^{\circ}\text{C}$ 'de bekletildi. Kaplanan çukurlar, ertesi gün yıkama tamponu ( $\%0.9\ \text{NaCl}$ ,  $\%0.05\ \text{Tween 20}$  içeren distile su) ile 6 kez yıkandı ve sonra çukurların herbirine  $100\ \mu\text{l}$  bloke edici tampon [ $\%1\ \text{sığır serum albümini}$  ve  $\%0.05\ \text{Tween 20}$  içeren Dulbecco'nun fosfat tampon solüsyonu (D-FTS)] eklendi.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edilen plaklar inkübasyondan sonra tekrar yıkandı. Çalışmada, pozitif standart kontrol olarak  $500\text{-}7.8125\ \text{ng/ml}$  arasında 2 katlık seri sulandırmaları hazırlanan ChromPure insan serum IgG'si (Jackson İmmün Araştırma Laboratuvarları, ABD) kullanıldı. IgG ölçümü yapılacak örnekler ise  $1:100.000\text{-}1:800.000$  oranında sulandırıldı. Tüm sulandırmalar dilüsyon tamponu ( $\%1\ \text{sığır serum albümini}$  ve  $\%0.02\ \text{Tween 20}$  içeren D-FTS) kullanılarak gerçekleştirildi. ELISA plağı çukurlarına kontrol ve örneklerden  $50$ 'şer  $\mu\text{l}$  konulduktan sonra  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saat inkübe edildi. Takiben 3 kez yıkama işlemi yapıldı ve çukurlara  $1:5000$  oranında sulandırılmış alkalin fosfat (ALP) ile konjuge anti-insan IgG'sinden (Jackson İmmün Araştırma Laboratuvarları, ABD)  $50$ 'şer  $\mu\text{l}$  dağıtıldı.  $37^{\circ}\text{C}$ 'de 2 saatlik inkübasyondan sonra çukurlar tekrar yıkandı. Daha sonra herbir çukura substrat tamponunda (steril suda  $1\text{M}$  dietanolamin,  $500\ \mu\text{M}$  magnezyum klorür,  $\%1.1\ \text{HCl}$ ) çözülmüş ALP substratından ( $5\ \text{ml}$  substrat tamponuna 1 ALP substrat tableti; Sigma-Aldrich, İsveç)  $100\ \mu\text{l}$  eklendi. Üzeri alimünyum folyo ile sarılan ELISA plağı 30 dakika boyunca oda sıcaklığında ve karanlıkta bekletildi. Bu sürenin sonunda, enzimatik reaksiyonu durdurmak amacıyla çukurlara  $50\ \mu\text{l}$   $3\text{M NaOH}$  eklendi. ELISA okuyucusunda  $405\ \text{nm}$ 'de optik dansite ölçümü yapıldı.

### 3.9. GHOST(3)-CCR5 Hücreleri

Çalışmada, virus titrasyonu ve nötralizasyon deneylerinde hedef hücre olarak transgenik GHOST(3)-CCR5 hücreleri kullanıldı (87). Bu hücreler, insan osteosarkom (Human OsteoSarcoma, GHOST) hücrelerine, insan CD4 ve CCR5 kemokin reseptörü genleri ile HIV-2ROD izolatının LTR (long-terminal repeats) bölgesi tarafından aktive edilen yeşil floresan protein (Green Fluorescent Protein, GFP; GHOST) geninin retroviral transdüksiyon aracılığıyla eklenmesiyle elde edilmektedir. Bu hücrelerin HIV/SIV ile enfeksiyonunu takiben, virusun oluşturduğu Tat proteininin HIV-2ROD LTR'ye bağlanması sonucu aktive olan GFP geninin GFP proteinini sentezlemesine bağlı olarak floresan mikroskopu altında parlak yeşil renkte görülen plakların sayılması ile virus enfeksiyonu izlendi.

Sıvı nitrojende ya da  $-130^{\circ}\text{C}$ 'de saklanan GHOST(3)-CCR5 hücresi sıcak su içinde hızla eritildikten sonra sınıf-2 kabinde, içinde kültür besiyeri (DMEM, %7.5 FDS, 2.5 ml PeSt) bulunan 15 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. 1400 rpm'de 5 dakika santrifügasyon sonrası süpernatant atılıp 5 ml taze kültür besiyeri eklendi ve hücreler tekrar süspanse edildi. İçinde 5 ml kültür besiyeri bulunan  $25\text{ cm}^2$ 'lik şişe içine 5 ml'lik hücre süspansiyonu eklenip  $37^{\circ}\text{C}$ 'de nemli atmosferde (%5  $\text{CO}_2$ ) inkübasyona bırakıldı. GHOST(3)-CCR5 hücreleri zemine yapışma özelliği taşıdığından şişelerin yatık pozisyonda tutulmasına dikkat edildi.

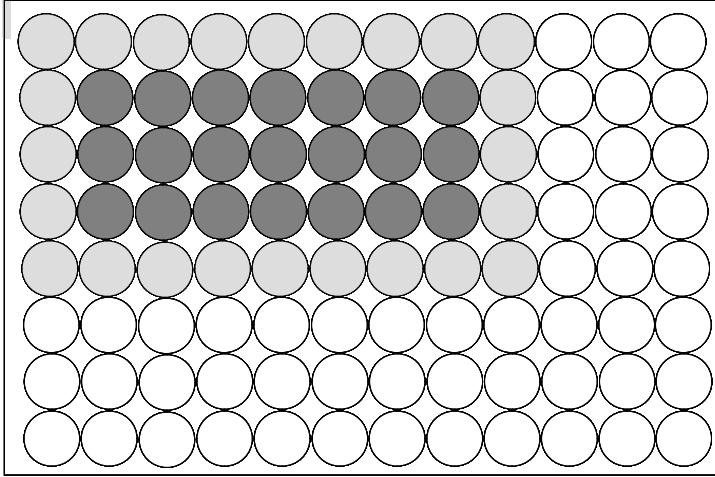
Hücreler, haftada iki kez pasaj yapılarak idame ettirildi. Bu amaçla şişelerin içindeki besiyeri pipetle çekilerek uzaklaştırıldı ve hücreler 2 ml D-FBS ile yıkandı. Daha sonra 0.5 ml EDTA eklenerek 2 dakika boyunca etüvde tutuldu ve hücrelerin yüzeyden ayrılması sağlandı. Şişenin kenarlarına elle vurularak hücrelerin tamamen dökülmesi sağlandıktan sonra ışık mikroskopu altında saptanan hücre miktarına göre uygun sayıdaki şişelere 7 ml taze besiyeri ile birlikte geçirilerek pasajları yapıldı.

GHOST(3)-CCR5 hücrelerini dondurmak için, en fazla 7-10 gün boyunca  $37^{\circ}\text{C}$ 'de saklanmış ve 1-2 kereden fazla pasajlanmamış hücreler kullanıldı. Bu amaçla, hücrelerin şişe zeminini tamamen kapladığı gün, hücreler yukarıda anlatıldığı şekilde yüzeyden ayrıştırılarak 50 ml'lik santrifüj tüpüne aktarıldı. Hücre süspansiyonu 1400 rpm'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant atıldıktan sonra tüpün içine yavaşça 1 ml %10 FDS içeren dimetilsülfoksit (Merck, Almanya) eklendi ve yine yavaşça pipetaj yapılarak hücreler süspanse edildi. Kriyotüpüne aktarılan

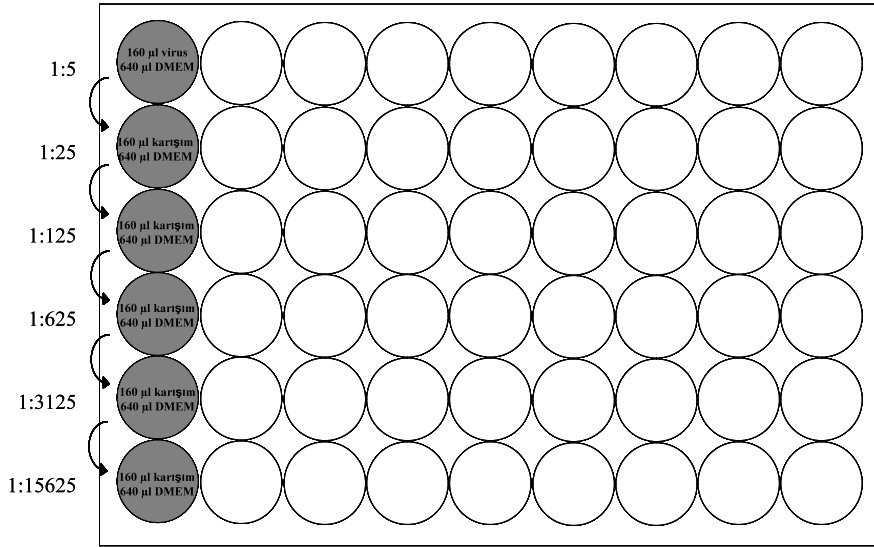
hücre süspansiyonu, içinde izopropranolol bulunan dondurma kabına konulup 3 gün boyunca  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de saklandı. Daha sonra tüpler  $-130^{\circ}\text{C}$ 'ye ya da sıvı nitrojene aktarıldı.

### 3.10. GHOST(3)-CCR5 Hücrelerinde Virus Titrasyonu

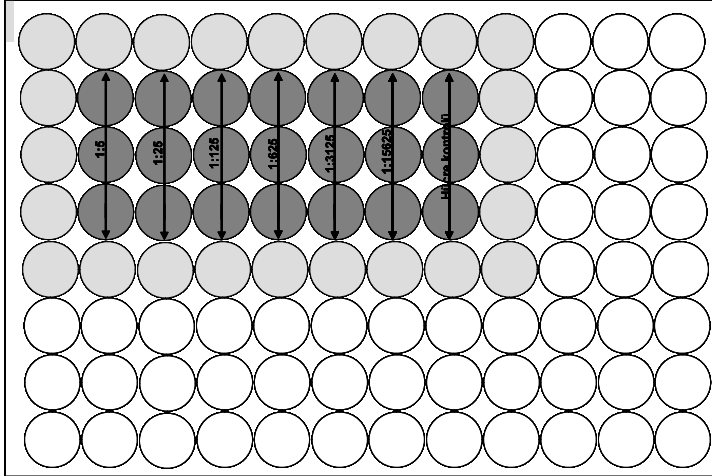
Hücrelerle ilgili tüm çalışmalar sınıf-2 kabinde, virus çalışmaları ise BGD3 laboratuvarında yapıldı. Enfeksiyondan bir gün önce (-1. gün) 96 çukurlu plak hazırlandı (87). Bunun için, titrasyonda kullanılacak her bir çukura içinde  $5 \times 10^3$  miktarda GHOST(3)-CCR5 hücresi bulunan 200  $\mu\text{l}$  DMEM (%7.5 FDS, 2.5 ml PeSt), bu çukurların çevresindeki çukurlara ise 200  $\mu\text{l}$  D-FTS konuldu. Böylelikle inkübasyon sırasında gelişebilecek sıvı buharlaşmasından hücrelerin korunması sağlandı (Şekil 3.6). Kapağı kapatılan plak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de nemli atmosferde (%5  $\text{CO}_2$ ) inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün (0. gün) BGD3 laboratuvarında  $-80^{\circ}\text{C}$ 'de bulunan ve titrasyonu yapılacak virus oda sıcaklığında erirken, 48 çukurlu plağın 6 çukuruna 640  $\mu\text{l}$  DMEM (%7.5 FDS, 2.5 ml PeSt ve 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  polibren) konuldu. Daha sonra ilk çukura 160  $\mu\text{l}$  virus eklenerek 1:5 oranında virus sulandırımı elde edildi. Pipetle karıştırıldıktan sonra bu çukurdan alınan 160  $\mu\text{l}$ 'lik karışım bir alttaki çukura geçirilerek virusun 1:25 oranında seyreltilmesi sağlandı. Seyreltme işlemine 1:15625 dilüsyona kadar devam edildi (Şekil 3.7). Etüvde bulunan 96 çukurlu plak çukurlarındaki kültür besiyeri alınarak yerine 50  $\mu\text{l}$  taze DMEM (%7.5 FDS, 2.5 ml PeSt, 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  polibren) eklendi. Besiyeri değiştirilirken, hücrelerin kurumasını önlemek için bir seferde en fazla 3 kolonda bu değişikliğin yapılmasına dikkat edildi. Sonra 48 çukurlu plağın 1:5 virus dilüsyonu içeren çukurundan, 96 çukurlu plaktaki 3 çukura (triplikat) karışımdan 150'şer  $\mu\text{l}$  dağıtıldı. Böylece her bir 96 çukurlu plak çukurunda son kültür besiyeri hacmi 200  $\mu\text{l}$  oldu. Bu işlem 1:15625 dilüsyona kadar tüm çukurlar için tekrarlandı. Hücre kontrol triplikatına ise sadece 200  $\mu\text{l}$  taze kültür besiyeri konuldu (Şekil 3.8). Kapağı kapatılan plak  $37^{\circ}\text{C}$ 'de nemli atmosferde (%5  $\text{CO}_2$ ) inkübasyona bırakıldı.



**Şekil 3.6.** Enfeksiyondan bir gün önce (-1. gün) hazırlanan 96 çukurlu plak. DMEM içeren çukurlar koyu gri, D-FTS içeren çukurlar ise açık gri renkle temsil edilmiştir.

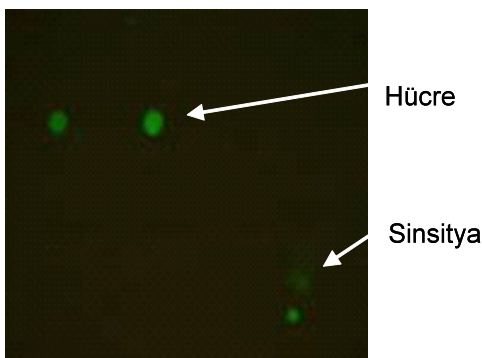


**Şekil 3.7.** Enfeksiyon günü (0. gün) hazırlanan 48 çukurlu plakta virus sulandırım işlemi.



**Şekil 3.8.** 96 çukurlu plakta triplikatlara. DMEM-virus karışımı içeren çukurlar koyu gri, D-FTS içeren çukurlar açık gri renklerle temsil edilmiştir.

Ertesi gün (+1. gün) triplikatlara yıkandı. Böylelikle hücreyi enfekte etme özelliği olmayan virusların uzaklaştırılması amaçlandı. Bunun için, herbir çukurdaki 200 µl kültür besiyeri alınıp yerine yine 200 µl taze besiyeri kondu. Kapağı kapatılan plak 37°C’de nemli atmosferde (%5 CO<sub>2</sub>) tekrar inkübasyona bırakıldı. İki gün sonra (+3. gün) floresan mikroskopu altında öncelikle hücre kontrol triplikatları incelendi. Kontrol hücrelerde yeşil renkli floresanın görülmemesi virus kontaminasyonunun olmadığını gösterdi ve bu durumda diğer çukurlar değerlendirildi. Herbir virus sulandırımındaki yeşil alanlar (plak=hücre veya sinsiya) sayıldı (Şekil 3.9) ve plak sayısının 10-90 arasında (genellikle 30-40 arasında plak tercih edildi) olduğu sulandırım nötralizasyon deneyinde kullanıldı.



**Şekil 3.9.** SIV ile enfekte hücrelerin floresan mikroskopik görüntüleri (yeşil renkli plaklar)

### 3.11. Virus Nötralizasyon Deneyinde Kullanılacak IgG Miktarının Belirlenmesi

Nötralizasyon deneylerinde 1:20'den daha yoğun plazma sulandırımıları kullanıldığında hücre toksisitesi görüldüğünden, deneylerde bu dilüsyonun baz alınmasına karar verildi. Bir triplikat çukuruna 3x150 µl (toplam 450 µl) virus-IgG karışımı konulduğundan, 48 çukurlu plak için 600 µl hacimde karışımın hazırlanması gerektiği; bu durumda gereken plazma miktarının da 1:20 dilüsyonu sağlamak için 30 µl olacağı hesaplandı. Daha sonra, plazmadaki ve saflaştırılmış IgG örneğindeki IgG miktarları karşılaştırılarak kullanılması gereken saf IgG miktarı belirlendi. Örneğin, plazma içindeki IgG miktarının 10 gr/ml, bu örnekten saflaştırılan IgG çözeltisindeki IgG miktarının ise 5 gr/ml olduğu kabul edilirse saflaştırma oranı  $(5/10)*100=\%50$  olacaktır. Bu durumda plazma kullanıldığında kullanılması gerekli hacim 30 µl iken, saflaştırılmış IgG çözeltisi kullanıldığında aynı miktardaki IgG miktarına erişmek için 60 µl kullanılması gerekecektir.

### 3.12. GHOST(3)-CCR5 Hücrelerinde Virus Nötralizasyonu

Enfeksiyondan bir gün önce (-1. gün), 96 çukurlu plak hazırlandı (bkz. 3.10. GHOST(3)-CCR5 Hücrelerinde Virus Titrasyonu) (Şekil 3.6) (87). Kapağı kapatılan plak 37°C'de nemli atmosferde (%5 CO<sub>2</sub>) inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün (0. gün) BGD3 laboratuvarında -80°C'de bulunan ve titrasyonu belirlenmiş olan virus, oda sıcaklığında eritildi. Herbir çukurdaki son hacmin 600 µl olması amaçlandı. Bunun için sadece virus çukuruna 120 µl virus ve 480 µl DMEM konuldu (virus sulandırımı böylelikle 1:5 oldu). Negatif kontrol çukuruna yine 120 µl virus, 30 µl negatif kontrol IgG'si (IgG saflaştırma oranını %100 kabul edersek) ve 450 µl DMEM kondu (çukurdaki son hacim 600 µl oldu). Aynı işlem pozitif kontrol çukuruna da uygulandı. Virus+IgG çukurlarının hazırlanmasında da yine IgG'nin saflaştırma oranı dikkate alındı. 48 çukurlu plak içeriği pipetle karıştırıldıktan sonra 1 saat etüvde bekletildi. Bir saatin sonunda etüvde tutulan 96 çukurlu plak kabine alındı ve çukurlardaki 200 µl eski kültür besiyeri pipetle alınıp 50 µl taze DMEM (%7.5 FDS, 2.5 ml PeSt, 2 µg/ml polibren) ile değiştirildi. Besiyeri değiştirilirken, hücrelerin kurumasını önlemek için bir seferde en fazla 3 kolonda bu değişikliğin yapılmasına dikkat edildi. Etüvden çıkarılan 48 çukurlu plak çukurlarındaki karışım tekrar pipetle karıştırıldıktan sonra, uygun triplikatlara, herbir çukura 150 µl konacak şekilde paylaştırıldı. Kapağı kapatılan plak 37°C'de nemli atmosferde (%5 CO<sub>2</sub>)

inkübasyona bırakıldı. Ertesi gün (+1. gün) yıkama işlemi yapıldı (bkz. 3.10. GHOST(3)-CCR5 Hücrelerinde Virus Titrasyonu) ve +3. günde floresan mikroskobu altında öncelikle hücre kontrol triplikatlari incelendi. Eğer yeşil renkli plak görülmemişse yani virus kontaminasyonu yoksa, sadece virus içeren triplikattaki çukurlarda plak sayımı yapıldı. Negatif kontrol varlığında plak sayısının değişmediği, pozitif kontrol varlığında plak sayısında %30'dan fazla azalma olduğu tespit edildikten sonra IgG içeren triplikatlarda plak sayımına geçildi. Plak sayımı sonrası aşağıdaki formüle göre nötralizasyon kapasitesi (NK) hesaplandı (87):

$$NK(\%) = \frac{(\text{Sadece virus triplikatındaki plak sayısı ortalaması} - \text{IgG içeren triplikattaki plak sayısı ortalaması})}{\text{Sadece virus triplikatındaki plak sayısı ortalaması}} \times 100$$

Örneğin sadece virus triplikatında sayılan plak sayısı 18, 22 ve 20; virus+IgG 1:20 triplikatında sayılan plak sayısı ise 6, 10 ve 8 olsun. Bu durumda sadece virus triplikatındaki plak sayısı ortalaması 20, virus+IgG 1 triplikatında ise 8 olacaktır.

Formüle göre:

$$NK(\%) = \frac{20-8}{20} \times 100 = \%60 \text{ 'tır ve eşik değeri olan \%30'un üzerinde}$$

olduğundan bu antikorun 1:20 dilüsyonda nötralizasyon kapasitesi vardır.

### 3.13. Nötralizan Antikor (Nak)'ların Genişlik ve Potensi

Nak genişliği, antikorun farklı "clade/CRF" gruplarına yönelik nötralizan aktivitesini belirlemeye yönelik bir tanımdır (141). Bu tanıma göre antikor, farklı gruplardaki virüslere nötralizan aktivite gösterdikçe genişliği artar. Bu çalışmadaki Nak'ların genişliğini saptamak amacıyla SIVmac239 inokulum, SIVsm stok, 5 HIV-1 (SF162, 92UG024, 92Br025, CC030 ve CC048) ve 2 HIV-2 (1812 ve 1682) virüsü kullanıldı. Yüzde 30 nötralizasyon eşığının üstündeki nötralizasyon değerlerine "1", altındakilere de "0" puan verildikten sonra herbir makak antikoru için toplam genişlik değeri hesaplandı.

Potens ise, nötralizan aktivitenin devam ettiği en yüksek titrasyonun belirlenmesine dayanır. Bir antikorun potensi şu formüle göre hesaplandı (141):



Nötralizasyon skoru=  $\log_3(\text{en yüksek IgG titrasyonu}/100)+1$

Örneğin 1:1280 dilüsyonunda %40 oranında nötralizan aktivite gösteren ama 1:2560 dilüsyonda bu yeteneğini kaybeden IgG'nin potensini  $\log_3(1280/100)+1$  formülüne göre 3.321'dir. Bu hesaplama göre, 1:33 dilüsyonda potens 0 olacağından, bu dilüsyonun altındaki dilüsyonların (1:20 gibi) potense katkısı olmaz. Bu çalışmadaki Nak'ların potensini saptamak amacıyla SIV (SIVmac239 ve SIVsm), 5 HIV-1 (SF162, 92UG024, 92Br025, CC030 ve CC048) ve 2 HIV-2 (1812 ve 1682) virüsü kullanıldı. Her bir makak IgG'sinin potensini, her bir virusa yönelik potenslerin geometrik ortalamasının alınmasıyla elde edildi.

### **3.14. İstatistiksel Analiz**

İstatistiksel analizlerde SPSS 14.0 for Windows ve GraphPad programları kullanıldı. Normal dağılım eğrisine sahip verilerin analizinde Student t testi ve Pearson bağıntı analizi, normal dağılım göstermeyen verilerin analizinde de Mann Whitney U testi ve Spearson bağıntı analizi kullanıldı. İki'den fazla değişken varlığında ise analiz yöntemi olarak çok değişkenli varyans analizi (MANOVA) uygulandı.

## 4. BULGULAR

### 4.1. Plazma SIV Yüğü ve Buna Göre Makakların Gruplandırılması

SIVmac239 ile intravenöz yoldan enfekte edilen makaklarda, enfeksiyonun yedinci gününde yapılan virus yükü ölçümüyle enfeksiyon varlığı doğrulandı (Tablo 4.1, Şekil 4.1). Virus yükü üçüncü makakta 9 milyon kopya/ml'ye kadar yükselirken, diğer makaklarda 10.000-400.000 kopya/ml arasında seyretti. Çalışma virusa karşı oluşan hümmoral immün yanıtı değerlendirmek amacıyla planlandığından ve bu yanıtın oluşabilmesi için B ve T hücrelerine ihtiyaç olduğundan, bu hücrelerin akut dönemde hızlı kaybını önlemek için makaklara ES 10. günde FMPA tedavisi başlandı ve bu tedaviye 4 ay boyunca devam edildi. Virus yükünün ES 7. günde en yüksek düzeye ulaştığı ve 3 no'lu makak hariç tüm makaklarda tedavinin 7. haftasında eşik değerin (400 kopya/ml) altına düşerek negatifleştiği izlendi. Üç no'lu makakta ise, FMPA tedavisinin 7. haftasında virus yükünde ancak 50 katlık bir düşüş oldu.

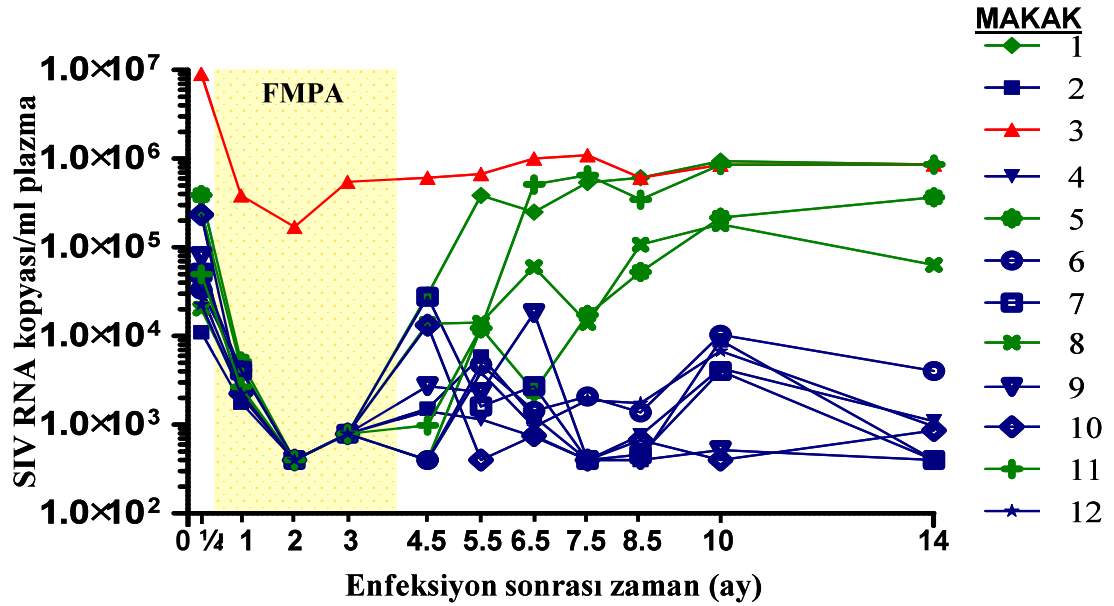
Çalışmada, izlem süreci boyunca saptanan virus yükü dikkate alınarak makaklar üç gruba ayrıldı. Tedavi altındayken bile virus yükü giderek yükselen ve tedavinin kesilmesinden itibaren virus yükü 600.000-1.100.000 kopya/ml civarında seyreden 3 no'lu makak, "kontROLSÜZ" (K-) olarak isimlendirildi ve kırmızı renk koduyla işaretlendi. Tedavi kesildikten sonra bile plazma virus yükü 10.000 kopya/ml'nin altında seyreden 2, 4, 6, 7, 9, 10 ve 12 no'lu makaklar "kontrollü" (K+) adı altında gruplandırıldı ve mavi renk koduyla işaretlendi. Geriye kalan 1, 5, 8 ve 11 no'lu makaklarda ise, FMPA tedavisiyle etkin virus yükü kontrolü sağlanmasına rağmen, tedavinin bitiminden itibaren virus yükünde progresif bir artış olduğu görüldü. Plasma virus yükünün 10.000-1.000.000 kopya/ml arasında seyrettiği bu makaklar, "geçici kontrollü" (GK) olarak gruplandırıldı ve yeşil renk koduyla işaretlendi.

Grupların virus yükleri ES 7. günde değerlendirildiğinde; en yüksek düzeyin K- makakta (9.000.000 kopya/ml) saptandığı, ilginç olarak bunu GK gruptaki makakların izlediği belirlendi. K- makanın virus yükü diğer iki grup makanın ortalama virus yüküne kıyasla istatistiksel olarak daha yüksek iken ( $p < 0.05$ , Mann-Whitney non-parametrik test), K+ ve GK gruplarındaki makakların virus yükleri

arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı ( $p=0.412$ , Mann-Whitney non-parametrik test).

**Tablo 4.1.** Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen plazma SIV RNA kopya sayısı (kopya/ml plazma)

Makak No	İNFEKSİYON SONRASI ZAMAN											
	0. GÜN	7. GÜN	1. AY	2. AY	3. AY	4.5. AY	5.5. AY	6.5. AY	7.5. AY	8.5. AY	10. AY	14. AY
2	Negatif	11065	1763	400	790	1519	5880	1227	400	400	8930	400
4	Negatif	29905	2411	400	790	1417	1152	734	401	761	4302	1092
6	Negatif	33410	4109	400	790	400	4762	1434	2084	1376	10350	4045
7	Negatif	51800	4070	400	790	27865	1601	2730	400	462	4042	400
9	Negatif	79550	2101	400	790	2720	2346	18210	400	400	518	400
10	Negatif	232800	2249	400	790	13270	400	751	400	674	400	861
12	Negatif	22700	2222	400	790	400	3902	952	1886	1760	6800	960
1	Negatif	260550	4349	400	790	29165	383350	250800	537000	610000	940000	860000
5	Negatif	386850	5180	400	790	400	12235	2373	17330	52600	215850	368300
8	Negatif	20355	2355	400	790	13770	14145	59950	14000	107050	181850	63200
11	Negatif	49800	2679	400	790	989	12330	513500	650500	347050	850000	860000
3	Negatif	9000000	386500	170000	550000	610000	670000	1000000	1100000	610000	850000	860000



**Şekil 4.1.** Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen plazma SIV RNA kopya sayısı (kopya/ml plazma). Sarı gölgeli alan uygulanan FMPA tedavisi periyodunu göstermektedir.

FMPA tedavisi kesildikten sonra herbir makaktan elde edilen virus yüklerinin aritmetik ortalaması, ES 7.gündeki virus yükleri ile karşılaştırıldığında aralarında korelasyon saptandı ( $p=0.042$ , Spearmans korelasyon katsayısı= 0.594). Ayrıca ES 5.5 aydan itibaren K+ ve GK gruplardaki makakların virus yükleri arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark belirlendi ( $p=0.008$ , Mann-Whitney non-parametrik test).

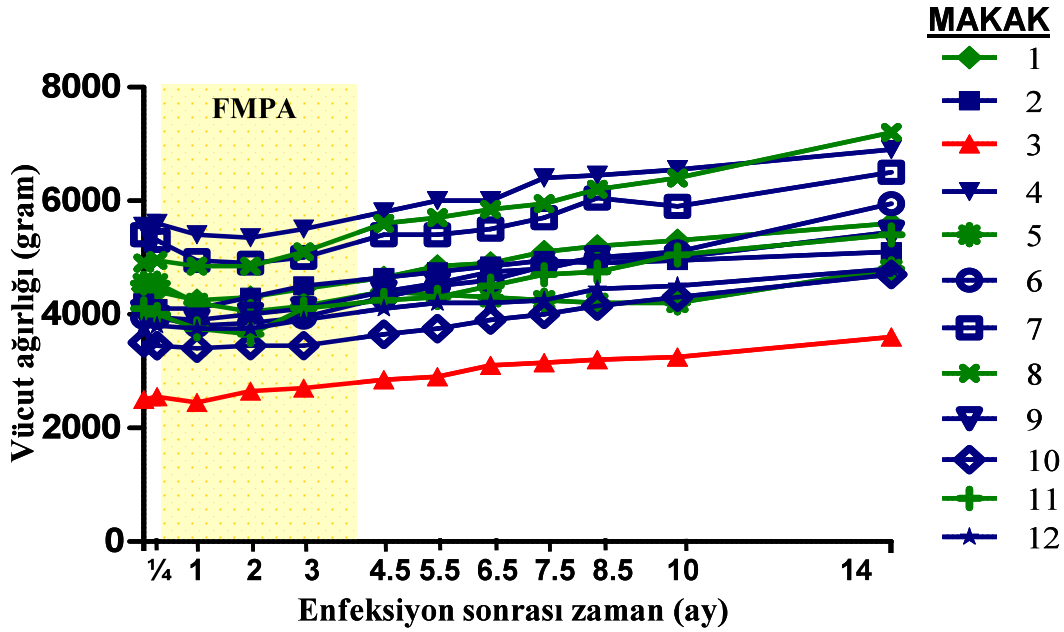
#### **4.2. Klinik Bulgular**

Enfeksiyondan hemen önce tartılan makakların ortalama vücut ağırlığı 4246 gr idi (aralık 2500-5550 gr). Çalışmanın başlamasından kısa bir süre önce 3 no'lu makak kafesinde bilinci kapalı, dehidrate ve hipotermik durumda bulundu. Aynı kafeste yaşadığı partneriyle anlaşamadığı farkedilen makak tek kişilik kafese alındıktan sonra hızla iyileşti, ancak çalışmanın yapılacağı günde ölçülen vücut ağırlığı düşük (2500 gr) idi. Tüm makaklarda, FMPA tedavisinin başlangıç döneminde gözlenen hafif kilo kaybı dışında vücut ağırlığında önemli bir düşüş gözlenmedi (Tablo 4.2, Şekil 4.2). K-/GK grup ile K+ grup arasında, enfeksiyon öncesi (EÖ) vücut ağırlığı ve izlem sürecindeki ağırlık değişikliği açısından önemli bir fark bulunamadı (her iki analizde de  $p=0.808$ , Mann Whitney U testi).

Her ne kadar çalışmanın başlangıcında vücut ağırlığı en düşük olan 3 no'lu makak, ES 7. günde en yüksek SIV RNA kopyasına sahip makak olsa da, EÖ vücut ağırlığı ile ES 7. gündeki virus yükleri arasında bir ilişki gösterilemedi (Spearman bağıntı katsayısı= -0.287,  $p=0.366$ ).

**Tablo 4.2.** Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen vücut ağırlığı (gram).

Makak No	ENFEKSİYON SONRASI ZAMAN											
	0. GÜN	7. GÜN	1. AY	2. AY	3. AY	4.5. AY	5.5. AY	6.5. AY	7.5. AY	8.5. AY	10. AY	14. AY
2	4200	4100	4100	4300	4500	4650	4750	4850	4950	4900	4950	5100
4	5550	5600	5400	5350	5500	5800	6000	6000	6400	6450	6550	6900
6	3950	3950	3800	3850	3950	4300	4500	4600	4850	5000	5100	5950
7	5400	5300	4950	4900	5000	5400	5400	5500	5700	6050	5900	6500
9	4050	3950	3900	4000	4100	4400	4550	4750	4800	5000	5000	5450
10	3500	3450	3400	3450	3450	3650	3750	3900	4000	4150	4300	4700
12	3800	3800	3750	3750	3900	4100	4200	4200	4250	4450	4500	4800
1	4450	4400	4250	4300	4450	4650	4850	4900	5100	5200	5300	5600
5	4550	4550	4200	4050	4150	4400	4350	4300	4250	4200	4200	4800
8	4900	4950	4850	4850	5100	5600	5700	5850	5950	6200	6400	7200
11	4100	4000	3750	3650	4100	4250	4300	4500	4700	4750	5050	5400
3	2500	2550	2450	2650	2700	2850	2900	3100	3150	3200	3250	3600



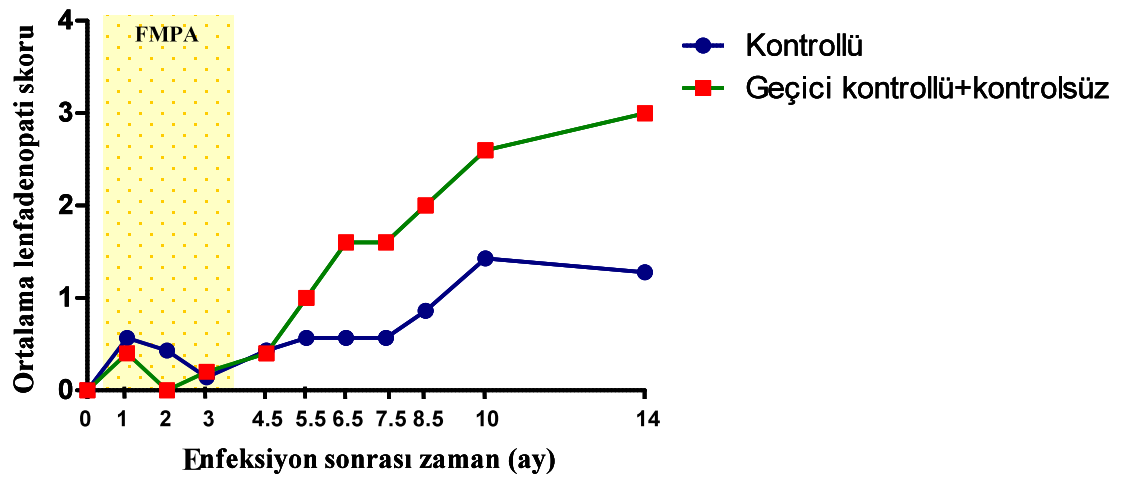
**Şekil 4.2.** Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen vücut ağırlığı (gram). Sarı gölgeli alan uygulanan FMPA tedavisi periyodunu göstermektedir.

Vücut ağırlığı ölçümüyle birlikte yapılan eşzamanlı aksiller ve inguinal lenf nodlarına ait veriler Tablo 4.3'de; K-/GK ve K+ gruplardaki makakların lenfadenopati sayısının aritmetik ortalamasının alınmasıyla hesaplanan lenfadenopati skoru ise Şekil 4.3'de gösterilmektedir. Her ne kadar, K-/GK grupta ES 14. ayda

ortalama lenfadenopati skoru 3'e kadar yükselirken, K+ grupta 1.28 olsa da, iki grup arasında istatistiksel olarak anlamlı bir fark bulunamadı (Student t testi  $p=0.134$ ). Ondört aylık çalışma sürecinde hiçbir makakta dalak palpe edilemedi.

**Tablo 4.3.** Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde saptanan ortalama lenfadenopati sayısı.

Makak No	İNFEKSİYON SONRASI ZAMAN										
	0. GÜN	1. AY	2. AY	3. AY	4.5. AY	5.5. AY	6.5. AY	7.5. AY	8.5. AY	10. Ay	14. AY
2	0	0	0	0	0	2	2	0	1	1	1
4	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	1
6	0	0	0	0	0	0	0	0	0	2	2
7	0	2	0	1	2	2	2	2	2	2	2
9	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	1
10	0	2	2	0	0	0	0	2	2	3	1
12	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1
1	0	0	0	0	0	1	2	2	2	2	3
5	0	0	0	0	0	2	2	0	1	2	3
8	0	2	0	1	1	0	2	2	3	2	4
11	0	0	0	0	0	0	0	2	2	4	3
3	0	0	0	0	1	2	2	2	2	3	2



**Şekil 4.3.** Kontrollü ve geçici kontrollü/kontrolsüz makakların izlemi sürecinde saptanan lenfadenopati skoru. Sarı gölgeli alan uygulanan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.

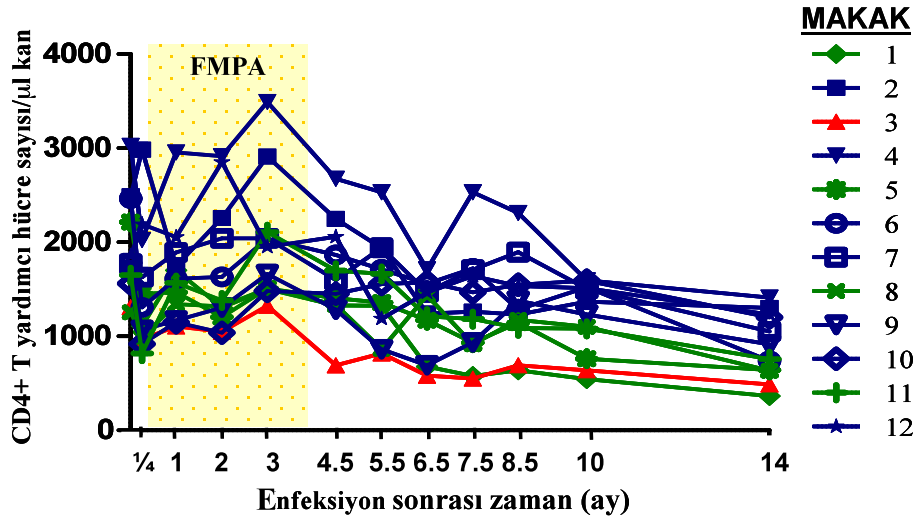
### 4.3. CD4+ Yardımcı T Hücre Sayısı

Tüm makakların 14 aylık izlemi boyunca saptanan CD4+ yardımcı Th sayıları Tablo 4.4 ve Şekil 4.4'de; EÖ ve ES dönemlerde Th sayısındaki değişimlerin yüzde oranları ise Tablo 4.5'de gösterilmektedir.

Çalışmada, ES 7. günde, K+ gruptaki 2, 7 ve 12. makaklar hariç tüm makaklarda Th hücre sayısında belirgin (>%20) bir düşüş saptandı. FMPA tedavisi sürecinde ise Th sayısındaki düşüş hızının genel olarak azaldığı, hatta enfeksiyon öncesi değerlere eriştiği izlendi. Ancak tedavinin sona ermesinden itibaren, K-/GK grupta daha belirgin olmak üzere, Th hücre sayısının progresif olarak azaldığı belirlendi. Buna karşın makakların hiçbirinde Th sayısında 200 hücre/ $\mu$ l'nin altına düşüş gözlenmedi. FMPA tedavisinin kesilmesinden sonra 2. haftadan itibaren (yaklaşık olarak ES 4.5. ay) K-/GK grupla K+ grup arasında Th sayısı açısından istatistiksel olarak anlamlı fark oluştuğu gözlemlendi (varyans modelinin 2 yoldan tekrarlanan ölçüm analizi,  $p < 0.000001$ ). Ayrıca ES 4.5. aydan itibaren makak Th sayısı ile plazma SIV RNA kopyası arasında negatif korelasyon olduğu saptandı (Spearman korelasyon katsayısı = -0.620,  $p = 0.032$ ).

**Tablo 4.4.** Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen CD4+ Th hücre sayısı (hücre/ $\mu$ l).

Makak No	ENFEKSİYON SONRASI ZAMAN											
	0. GÜN	7. GÜN	1. AY	2. AY	3. AY	4.5. AY	5.5. AY	6.5. AY	7.5. AY	8.5. AY	10. AY	14. AY
2	2489	2986	1744	2257	2913	2249	1937	1243	1263	1231	1367	1303
4	3024	2026	2956	2915	3490	2675	2533	1712	2532	2310	1594	1413
6	2465	1308	1613	1632	2038	1864	1712	1559	1723	1286	1520	737
7	1771	1627	1891	2040	2042	1597	1941	1467	1707	1895	1504	1052
9	1703	1069	1167	1305	1662	1285	862	691	935	1379	1231	915
10	1562	918	1147	1037	1482	1450	1555	1575	1469	1549	1590	1201
12	1857	2190	2056	2850	1950	2057	1188	1464	1640	1536	1511	1232
1	1657	1108	1703	1304	1500	1327	1324	677	577	639	546	366
5	2216	1451	1468	1204	1508	1404	1359	1172	930	1145	760	641
8	1255	993	1341	1317	1509	1336	866	1434	914	1175	1103	636
11	1652	817	1569	1380	2109	1698	1666	1213	1185	1087	1081	757
3	1311	967	1104	1049	1325	690	818	580	550	690	638	487



Şekil 4.4. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen CD4+ Th hücre sayısı (hücre/µl kan). Sarı gölgeli alan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.

Tablo 4.5. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde enfeksiyon öncesine kıyasla gözlenen CD4+ Th hücre sayısındaki değişiklik (%). Sarı alan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.

Makak No	CD4+ T hücre sayısında değişiklik (%)		
	ES 7. gün	Tedavi sırasında	Tedavi sonrası
2	20.0	-7.4	-39.2
4	-33.0	3.2	-30.2
6	-46.9	-28.6	-39.7
7	-8.1	12.4	-9.9
9	-37.2	-19.1	-38.8
10	-41.2	-21.8	-5.0
12	17.9	23.1	-18.2
1	-33.1	-9.3	-53.0
5	-34.5	-37.1	-52.2
8	-20.9	10.7	-15.0
11	-50.5	2.1	-24.9
3	-26.2	-11.6	-51.5



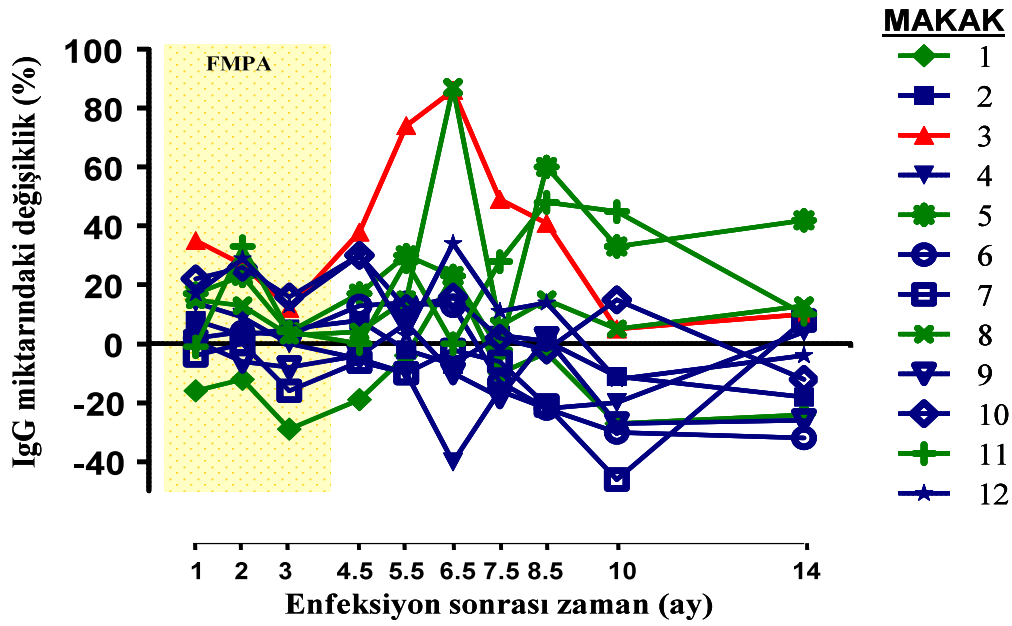
#### 4.4. Plazma IgG Düzeyi

Makak plazma örneklerinde ölçülen total IgG miktarı Tablo 4.6'de görülmektedir. Bu verilere göre, enfeksiyon öncesi ölçülen ortalama bazal IgG miktarı 16.7 gr/ml olarak saptandı (aralık 14.3-20.0 gr/ml).

**Tablo 4.6.** Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların izlemi sürecinde ölçülen IgG düzeyleri (gr/ml).

Makak No	ENFEKSİYON SONRASI ZAMAN (AY)										
	0	1	2	3	4.5	5.5	6.5	7.5	8.5	10	14
2	15.4	16.6	15.8	16.1	16.6	15.1	14.3	15.7	15.5	13.7	12.6
4	16.1	18.3	17.6	16.0	15.3	14.4	0.96	13.4	12.5	12.8	16.8
6	17.3	17.6	18.0	17.9	19.6	19.8	19.5	15.0	13.5	12.2	11.7
7	17.4	16.8	17.4	14.7	16.4	15.6	17.0	16.4	13.8	0.9	18.8
9	20.0	20.3	18.9	18.5	19.2	21.4	18.1	16.5	20.4	14.7	14.9
10	16.5	20.2	20.8	19.2	21.5	18.5	19.2	16.8	16.1	19.0	14.6
12	14.3	16.7	18.4	16.2	18.5	14.6	19.1	15.9	16.2	12.6	13.7
1	20.0	16.7	17.6	14.1	16.2	19.2	24.4	18.0	19.4	14.5	15.2
5	17.2	20.1	21.1	17.9	20.1	22.3	21.2	16.9	27.6	22.8	24.5
8	15.6	18.1	17.8	16.2	16.2	18.0	29.2	16.6	18.0	16.4	17.7
11	15.0	14.8	19.9	15.5	15.0	19.2	14.9	19.1	22.1	21.7	16.5
3	15.2	20.6	19.2	17.0	21.0	26.4	28.3	22.6	21.4	16.0	16.8

Enfeksiyon sonrası sürecin 6.5. ayında K- gruptaki 3 no'lu makakta total IgG miktarında bazal seviyeye göre %80.2'lik bir artış olduğu gözlemlendi (Şekil 4.5). Benzer şekilde GK grubundaki 4 makaktan üçünde de (5, 8 ve 11 no'lu makaklar) ES 6.5 ve 8.5 aylarda %37-50 oranında artış izlendi. Ancak çalışma süreci boyunca virus yükünü kontrol altında tutmayı başarabilen K+ grupta IgG artışına rastlanmazken, aksine IgG düzeylerinde progresif olarak düşüş olduğu gözlemlendi. Total IgG düzeyi ile SIV RNA kopya sayısı ve Th sayısı arasında bir ilişki gösterilemedi.



Şekil 4.5. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makaklarda enfeksiyon sürecinde gözlenen total IgG miktarındaki değişiklik yüzdeleri. (IgG miktarındaki değişiklik, enfeksiyon öncesi total IgG miktarına kıyaslama yapılarak hesaplanmıştır.) Sarı gölgeli alan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.

#### 4.5. Plazmadan IgG Saflaştırması

Plazmadan %20-100 (ortalama %62) arasında değişen oranlarda IgG saflaştırması yapıldı.

#### 4.6. Birinci ve İkinci SIVmac239 Re-izolatları

ES 4.5. ayda tüm makaklardan 1. virus re-izolasyonu için kan örneği alındı. K-/GK- gruptaki makaklardan sadece ikisinden (1. ve 3 no'lu makaklar) ve K+ gruptaki 7 makağın 5'inden (2, 4, 7, 9 ve 10) virus izolasyonu yapılabildi. Birinci re-izolatın elde edilemediği makakların ES 4.5. aydaki virus yükleri 1000 kopya/ml'nin altındaydı; ancak 8 no'lu makakta virus yükünün 10.000 kopya/ml'nin üstünde olmasına rağmen izolasyonun yapılamaması ilginç bir bulgu olarak değerlendirildi.

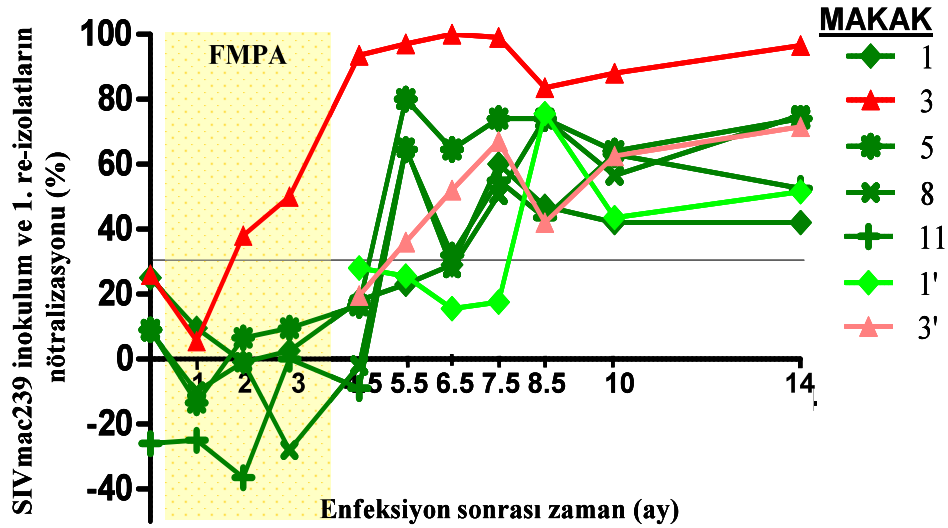
İkinci virus re-izolasyonu ES 9. ayda yapıldı. Sadece K-/GK gruptaki makaklardan (3, 5, 8 ve 11 no'lu makaklar) re-izolasyon yapılabilirken, virus yükü 400.000 kopya/ml olmasına rağmen 1 no'lu makaktan virus izole edilemedi. Her iki

virus re-izolasyonunun yapılabildiği tek makak çalışma boyunca virus yükü devamlı yüksek seyreden 3 no'lu makak oldu.

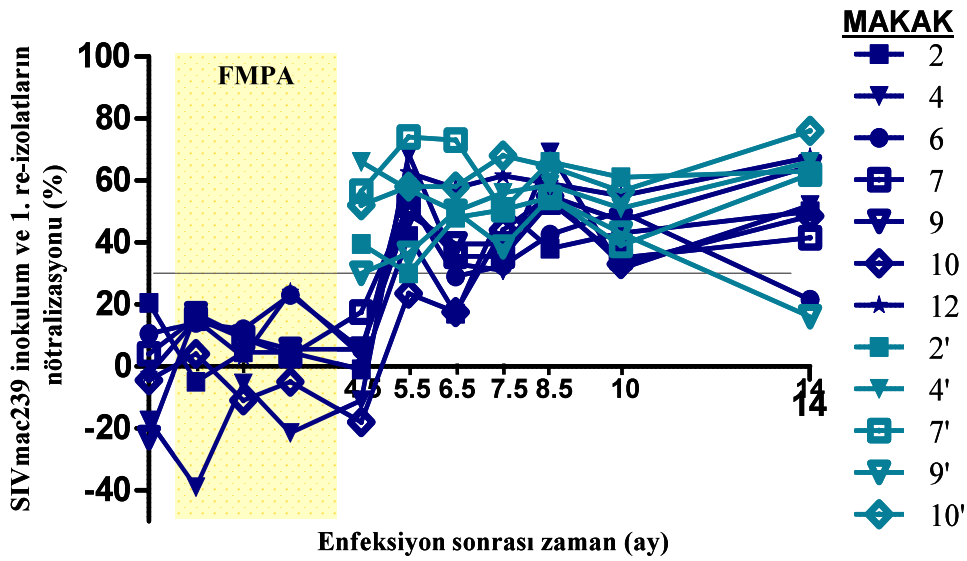
#### **4.7. SIVmac239 İnokulüm Suşu ile 1. ve 2. Re-izolatların Nötralizasyonu**

Enfeksiyondan hemen önce ve enfeksiyondan sonraki 10 farklı zamanda elde edilen plazma örneklerinden saflaştırılan IgG antikorlarının homolog nötralizan aktivitesi (1:20 plazma dilüsyonuna denk gelecek şekilde), SIVmac239 inokulüm suşuna ve re-izolatlara yönelik olarak değerlendirildi. K-/GK gruplarındaki 1, 3, 5, 8. ve 11 no'lu makakların SIVmac239 inokulüm virusuna ve 1 ve 3 no'lu makakların ES 4.5. ayda kendilerinden izole edilen 1. re-izolatlara karşı Nak yanıtları Şekil 4.6'da; K+ gruptaki 2, 4, 6, 7, 9, 10 ve 12 no'lu makakların SIVmac239 inokulüm virusuna ve 2, 4, 7, 9 ve 10 no'lu makakların kendilerinden elde edilen 1. re-izolatlara karşı Nak yanıtları ise Şekil 4.7'de görülmektedir.

SIVmac239'a yönelik en erken Nak yanıtını, virus yükü ES 7. günden itibaren çok yüksek düzeylerde seyreden K- gruptaki 3. no'lu makak verdi. Bu makakta Nak yanıtı 2. aydan itibaren mevcutken, diğer tüm makaklarda Nak yanıtı en erken ES 5.5. ayda gözlenebildi. Birinci re-izolatlara karşı Nak yanıtı değerlendirildiğinde, K-/GK gruptaki makaklardan ne 3. no'lu ne de 1 no'lu makağın, virusun izole edildiği 4.5. ayda Nak yanıtına sahip olmadığı saptandı. Nak etkisinden kaçabildikleri belirlenen bu re-izolatlar, virusun izolasyonundan ancak 1-4 ay sonra nötralize edilebildi. İlginç olarak K+ gruptaki 5 makaktan elde edilen 1. re-izolatların hepsinin, izole edildikleri anda (ES 4.5. ay), makakların tümü tarafından nötralize edilebildiği, yani Nak etkisinden kaçamadığı izlendi. Bu durumu daha da ilginç kılan, ES 4.5. ayda SIVmac239 inokulüm virusuna yönelik Nak yanıtının henüz gelişmemiş olmasıydı.

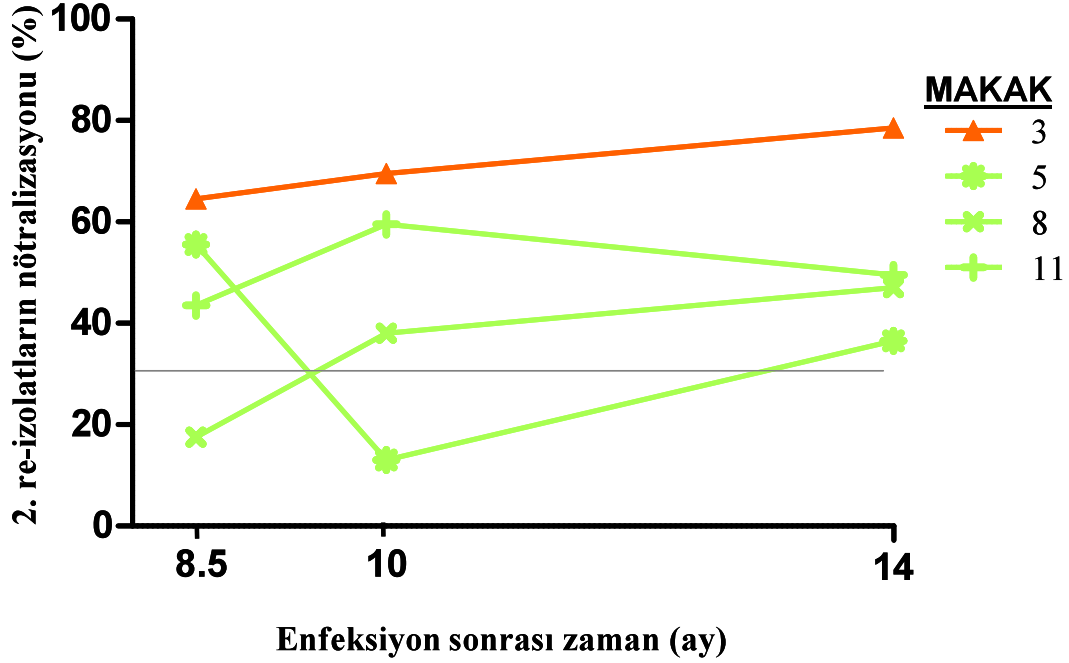


Şekil 4.6. K-/GK grubundaki makakların SIVmac239 inokulum suşuna ve 1 ve 3 no'lu makakların 4.5. ayda kendilerinden izole edilen 1. re-izolatlara (1' ve 3') yönelik nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir. Turuncu gölgeli alan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.



Şekil 4.7. K+ gruptaki makakların SIVmac239 inokulum suşuna ve 2, 4, 7, 9 ve 10 no'lu makakların 4.5. ayda kendilerinden izole edilen 1. re-izolatlara (2', 4', 7', 9' ve 10') yönelik nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir. Turuncu gölgeli alan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.

ES 9. ayda izole edilen 2. re-izolatlara Nak yanıtı Şekil 4.8'de gösterilmektedir.



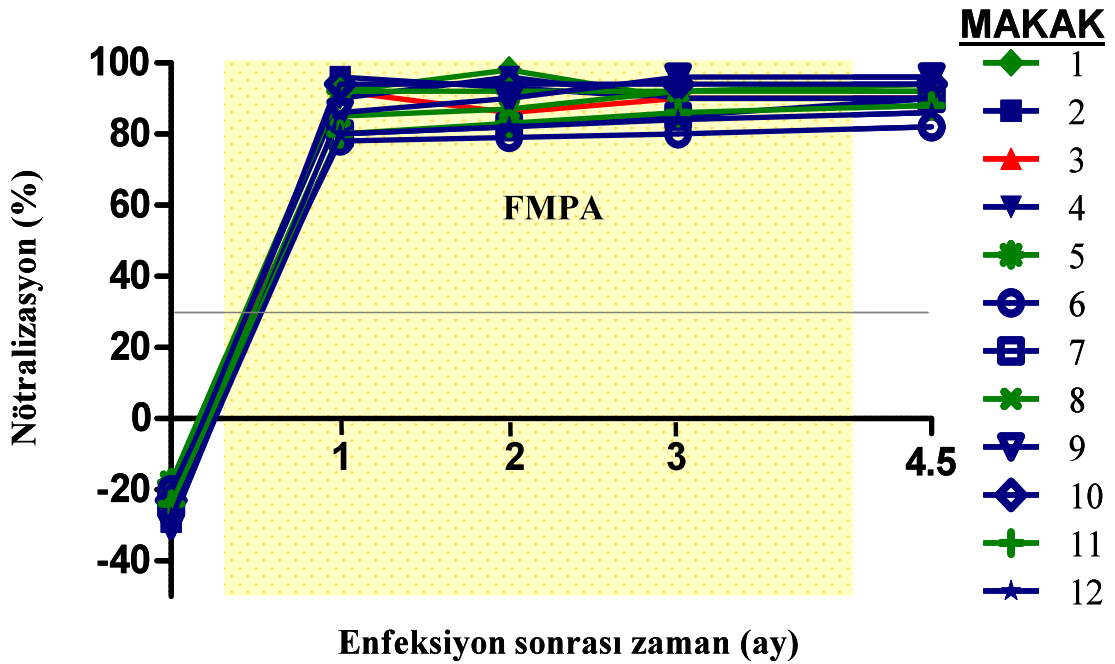
Şekil 4.8. K-/GK grubundaki 3, 5, 8 ve 11'no'lu makaklardan izole edilen 2. re-izolatlara (3', 5', 8' ve 11') yönelik nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.

Birinci re-izolatı re-izolasyon döneminde nötralize edemeyen K- gruptaki 3 no'lu makak, 2. re-izolatı re-izolasyon döneminde nötralize edebildi (Şekil 4.8). Benzer olarak, GK grubundaki 2 makağın 2. re-izolatı ES 8.5. ayda nötralize edebildiği; ancak bunlardan birinin (5 no'lu makak) ES 10. ayda Nak etkinliğini kaybedip sonra tekrar kazandığı izlendi. Sekiz no'lu makağın ise re-izolatı, ortaya çıktıktan ancak 1.5 ay sonra nötralize edebildiği saptandı. Her ne kadar K+ makakların hiçbirisinden 2. re-izolat elde edilememiş ve bu nedenle de nötralizasyon çalışması yapılamamış olsa da; GK grubu makaklardan elde edilen veriler, 2. re-izolatlara yönelik Nak yanıtının "dalgalı" olduğunu ve aralıklarla Nak kaçış mutantlarının ortaya çıktığını düşündürdü.

## 4.8. Heterolog Virus Nötralizasyonu

### 4.8.1. SIVsm stok ve SIVsm 1. ve 2. re-izolatlarının nötralizasyonu

SIVmac239 virusu nötralizasyona doğal dirençli kabul edildiğinden ve bu nedenle Nak yanıtı kinetiği ilk 5.5 aylık dönemde değerlendirilemediğinden nötralizasyon testleri bir kez de laboratuvarımızda nötralizasyona doğal duyarlı olduğu gösterilmiş SIVsm stok virusu ve bu virusla enfekte C39 kodlu sinomolgus makaktan ES 4. (SIVsm:C39<sup>sens</sup>) ve 18. aylarda (SIVsm:C39<sup>res</sup>) izole edilen re-izolatlarla tekrarlandı (89). Bu deneylerde, nötralizasyona doğal duyarlı SIVsm virusuna yönelik Nak yanıtının, ES 1. aydan itibaren %80 gibi çok yüksek bir orana ulaştığı belirlendi. SIVsm virusuna yönelik 12 makaktan ES 10 farklı dönemde elde edilen Nak yanıtı Şekil 4.9'da gösterilmektedir.

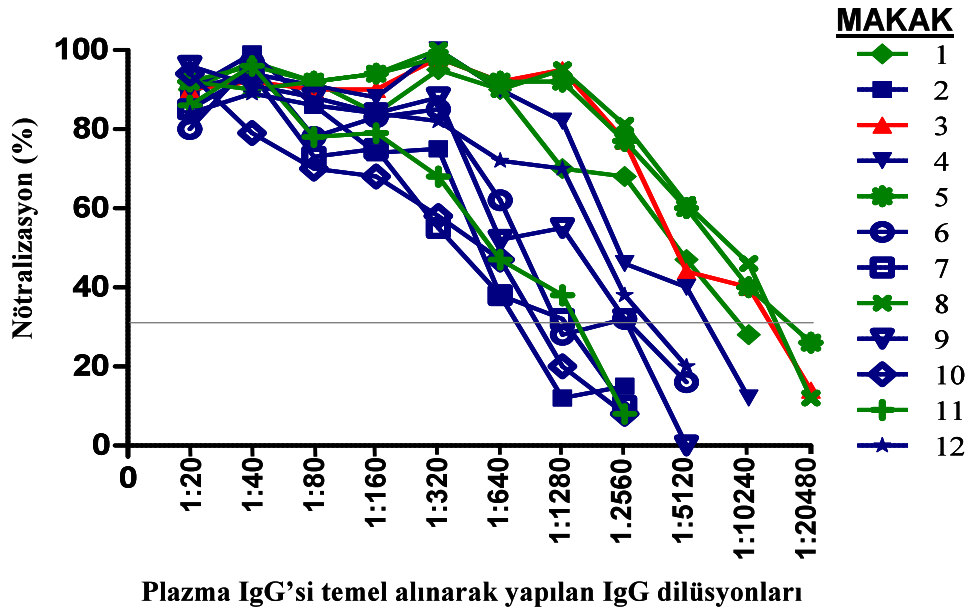


Şekil 4.9. Kontrollü, geçici kontrollü ve kontrolsüz makakların SIVsm stok virusuna karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir. Turuncu gölgeli alan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.

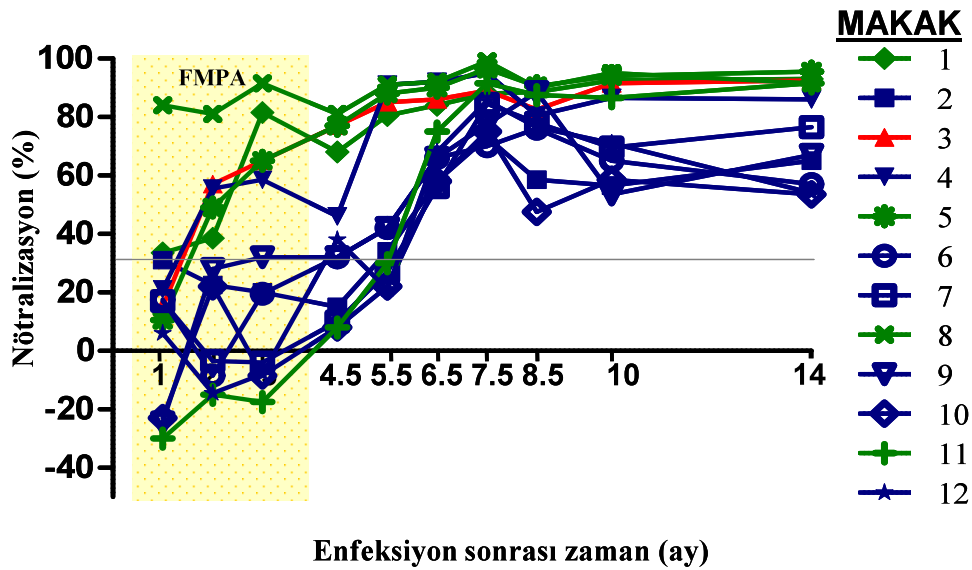
ES 4.5. aya kadar uygulanan ve %100'e varan oranların elde edildiği nötralizasyon testine, nötralizasyon kinetiğinin ileri değerlendirmesine katkıda bulunamayacağı düşüncesiyle bu süreden itibaren son verildi. Bunun yerine, nötralizasyon testi ES 4.5. aya ait IgG antikorlarının ileri dilüsyonlarında (1:20480'e kadar) tekrarlanarak antikorların yüksek sulandırım oranlarındaki nötralizan etkisi araştırıldı (Şekil 4.10) .

Şekil 4.10'da görüldüğü gibi, bütün makaklarda plazma IgG'sinin 1:640'a varan sulandırımalarında bile nötralizan aktivite gösterdiği belirlendi. K- gruptaki 3 no'lu makak ile GK gruptaki 5 ve 8 no'lu makaklarda ise bu etki 1:10240'a varan dilüsyonlarda bile devam etti. Buna karşılık, K+ gruptaki makaklarda en yüksek nötralizasyon dilüsyonunun 1:5120 olduğu ve bu değerinde sadece 4 no'lu makakta saptandığı gözlemlendi. Yapılan literatür taramasında –şu ana dek- bu kadar erken (ES 1. ay) ve bu kadar yüksek (>1:640) IgG dilüsyonlarında heterolog Nak yanıtının bildirildiği bir çalışmaya rastlanmadı.

SIVsm stok virusuna Nak yanıtı kinetiğinin 1:20 plazma IgG dilüsyonunda ölçümü, nötralizan etkinin çok yüksek olması ve erken gelişmesi nedeniyle yapılamamıştı (Şekil 4.9). Ancak 1:2560 plazma IgG dilüsyonunda bazı makak IgG'leri nötralizan aktivite gösterirken diğerlerinin bu etkinliklerini kaybetmeleri nedeniyle (Şekil 4.10), nötralizasyon testinin bu dilüsyondaki IgG ile tekrarlanmasına karar verildi. Bu deneylerin sonunda, IgG'nin 1:2560 dilüsyonda gösterdiği nötralizasyon etkisinin en erken ES 1. ayda ortaya çıktığı saptandı (Şekil 4.11). Bu erken dönemde 8 no'lu makakın %80'in üzerinde güçlü bir Nak aktivitesi gösterdiği, 1 no'lu makakın da %30'un hemen üzerinde olmakla birlikte Nak yanıtı veren ikinci makak olduğu izlendi.



Şekil 4.10. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** 12 makaktan ES 4.5. ayda elde edilen IgG'nin plazma IgG'si temel alınarak yapılan ileri dilüsyonlarında SIVsm stok virusuna karşı ölçülen Nak aktivitesi. Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.

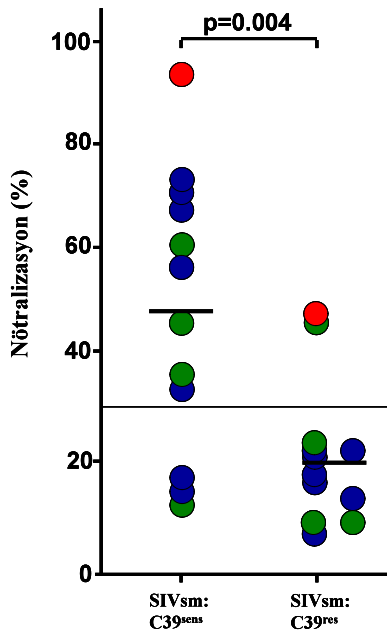


Şekil 4.11. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağın SIVsm stok virusuna karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:2560 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir. Turuncu gölgeli alan FMPA tedavi dönemini göstermektedir.



ES 2. aya bakıldığında; 3 no'lu makağın ve biri hariç tüm GK grubu makakların Nak aktivitesine sahip olduğu görüldü. K+ grupta ise sadece 4 no'lu makakta ES 2. ayda ortaya çıkan Nak aktivitesi, bu gruptaki diğer makaklarda ancak ES 5.5. ayda gelişebildi ve ve ES 6.5. ayda bu gelişim tamamlandı.

SIVsm stok virusu ile enfekte edilen C39 kodlu makaktan ES 4. (SIVsm:C39<sup>sens</sup>) ve 18. (SIVsm:C39<sup>res</sup>) aylarda izole edilen virüslara karşı Nak aktivitesi (1:2560 plazma IgG dilüsyonunda) Şekil 4.12'de görülmektedir.



**Şekil 4.12.** **KontROLSÜZ**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 4.5. ay) SIVsm:C39<sup>sens</sup> ve SIVsm:C39<sup>res</sup> re-izolatlarına karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:2560 plazma IgG dilüsyonunda). Siyah bantlar grup aritmetik ortalamasını göstermektedir. Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.

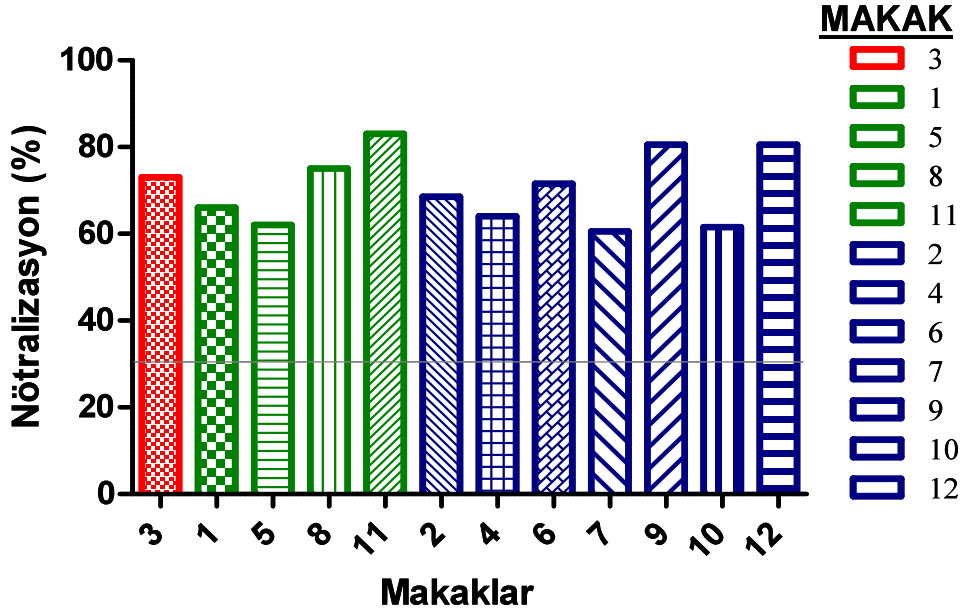
ES 4. ayda izole edilen SIVsm:C39<sup>sens</sup> virusunu 9 makağa ait IgG antikorları tarafından nötralize edilebildiği, buna karşın SIVsm:C39<sup>res</sup> virusunun sadece K-gruptaki 3 no'lu ve GK gruptaki 8 no'lu makağa ait IgG antikorları tarafından nötralize edilebildiği belirlendi. Bu iki virüslara karşı elde edilen Nak yanıtları arasındaki fark istatistiksel olarak anlamlı bulundu (Mann Whitney U testi, p=0.004). Duyarlı birinci izolatın (SIVsm:C39<sup>sens</sup>) 9 makak, dirençli ikinci re-izolatın (SIVsm:C39<sup>res</sup>) ise sadece 2 makak tarafından nötralize edilmesi, laboratuvarımızda

daha önceden bu viruslarla yapılmış çalışmanın sonuçlarıyla (89) uyumlu bulundu ve sonuçlarımızın güvenilirliğine bir kanıt olarak kabul edildi.

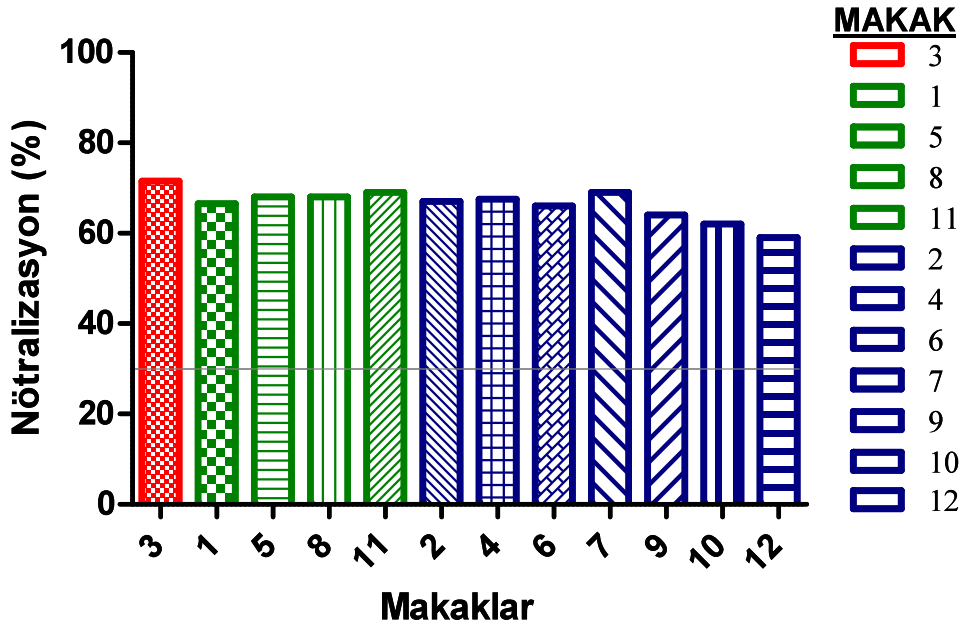
#### **4.8.2. HIV-2 nötralizasyonu**

Çalışmamızda, SIVsm stok virusuna karşı çok yüksek titrasyonlarda bile etkin heterolog Nak yanıtının saptanması nedeniyle, filogenetik olarak SIVsm'den köken aldığı bilinen HIV-2'ye karşı Nak yanıtının da irdelenmesine karar verildi. Bu amaçla, Stokholm'de yaşayan iki Gine Bisau'lu göçmenden izole edilmiş 1682 ve 1812 no'lu HIV-2 virusları ile makaklardan ES 14. ayda elde edilen plazma örnekleri kullanıldı. Şekil 4.13'de 1682, Şekil 4.14'de ise 1812 no'lu virusa karşı nötralizasyon sonuçları görülmektedir. Bu deneylerde, tüm makaklara ait IgG antikorlarının 1682 no'lu virusu etkin olarak nötralize edebildiği saptandı (Şekil 4.13).

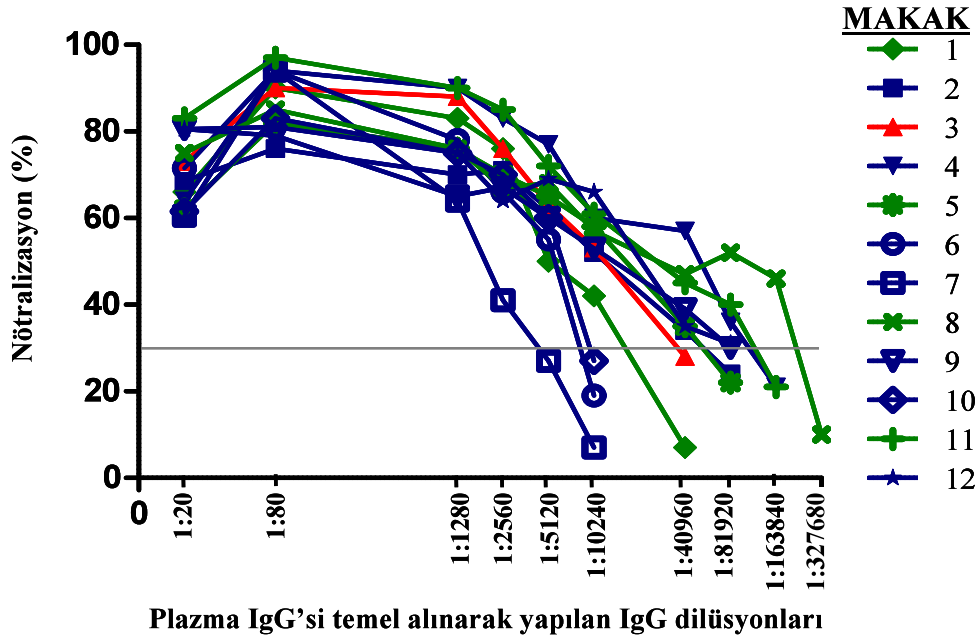
1812 no'lu virusa karşı 1:20 plazma IgG dilüsyonundaki Nak aktivitesinin 1682 no'lu virusta olduğu gibi yüksek bulunması üzerine, gruplar arasındaki farkın araştırılması amacıyla nötralizasyon testi 14. ay IgG örnekleriyle daha ileri dilüsyonlarda tekrarlandı. Bu deneylerde, her iki virusun da 1:2560 gibi çok yüksek IgG dilüsyonlarında bile tüm makaklar tarafından nötralize edilebildiği; 1682 no'lu virusun 8 no'lu makağa ait 1:163840 IgG dilüsyonunda bile nötralize edilebilen tek virus olduğu ve 1812 no'lu virusun 1:20480 IgG dilüsyonunda sadece GK gruptaki makaklar tarafından nötralize edilebildiği belirlendi (Şekil 4.15 ve 4.16).



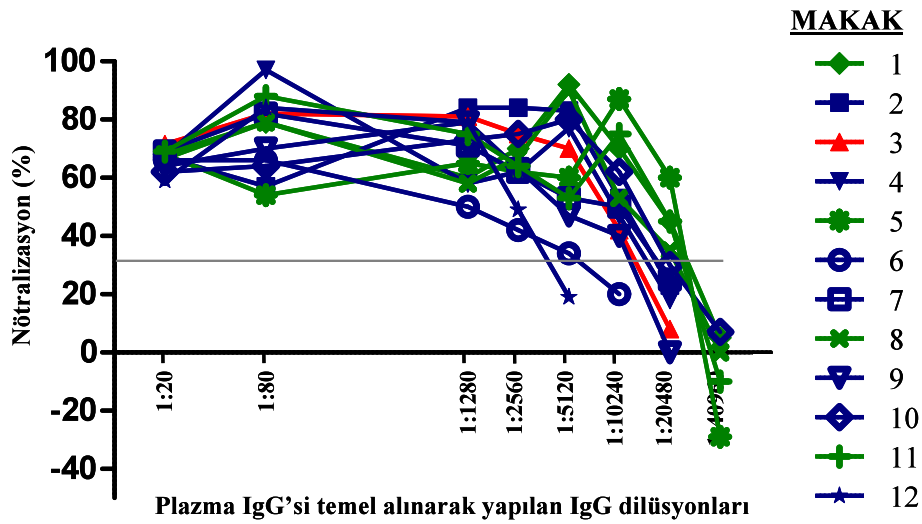
Şekil 4.13. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 1682 no'lu HIV-2 virusuna karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.



Şekil 4.14. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 1812 no'lu HIV-2 virusuna karşı nötralizan antikor aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.



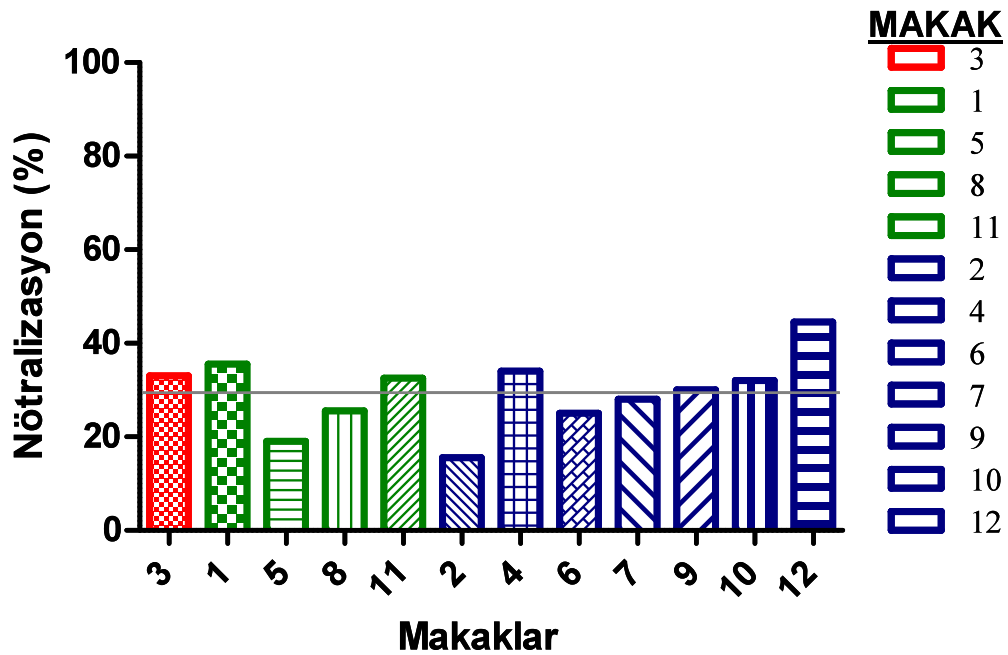
Şekil 4.15. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makaktan ES 14. ayda elde edilen IgG'lerin, plazma IgG'si temel alınarak yapılan ileri dilüsyonlarında 1682 no'lu virusa karşı Nak aktivitesi. Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.



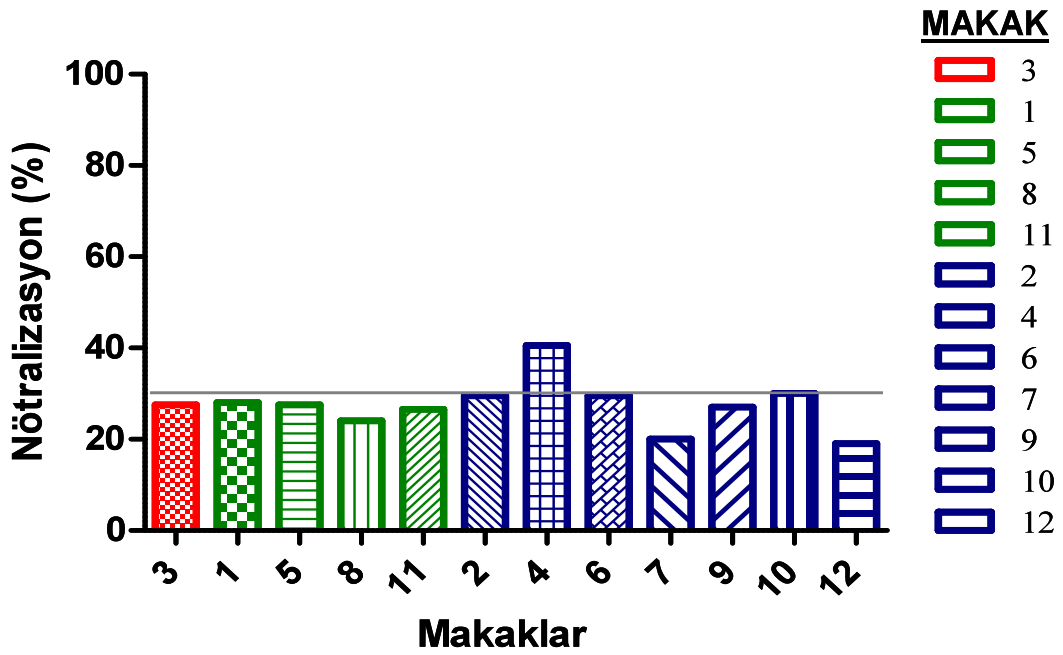
Şekil 4.16. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makaktan ES 14. ayda elde edilen IgG'lerin, plazma IgG'si temel alınarak yapılan ileri dilüsyonlarında 1812 no'lu virusa karşı Nak aktivitesi. Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.

### 4.8.3. HIV-1 nötralizasyonu

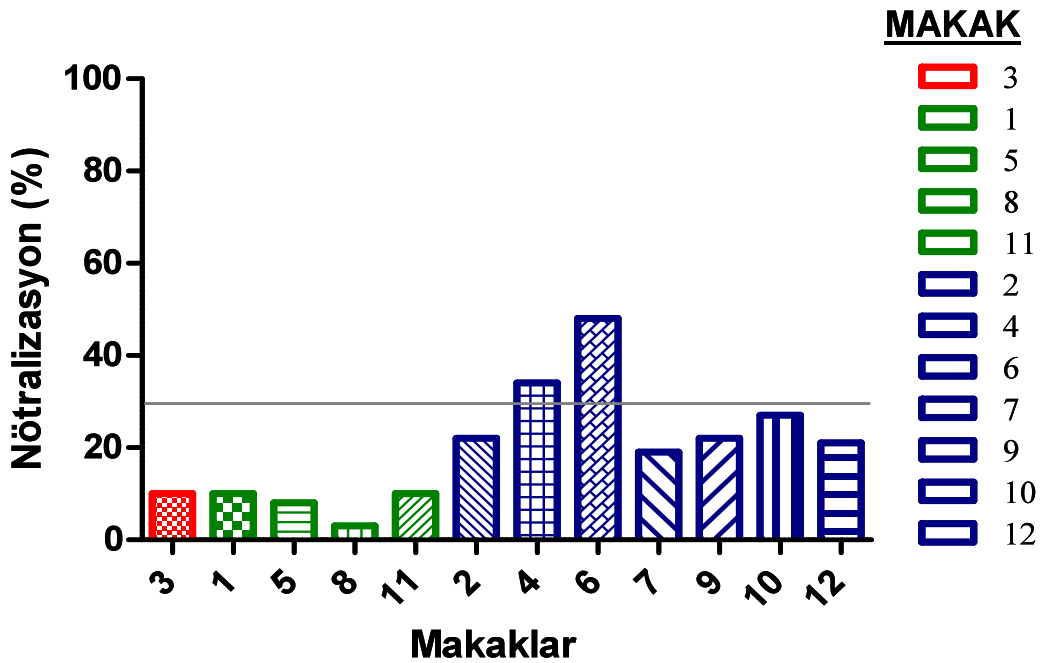
SIVmac239 ile enfeksiyon sonrası SIVsm ve HIV-2'ye yönelik etkin heterolog Nak aktivitesi gösteren IgG antikollarının bu aktivitesinin sınırlarının belirlenebilmesi için, bu kez farklı gruplardan HIV-1 virusları kullanarak nötralizasyon testlerine devam edilmesine karar verildi. Bu amaçla SF162 (B grubu), 92Br025 (C grubu), 92UG024 (D grubu), CC030 (CRF.02\_AG) ve CC048 (CRF.02\_AG) virusları ve ES 14. aya ait IgG örnekleri kullanıldı. Bu viruslara karşı elde edilen nötralizasyon sonuçları, sırasıyla Şekil 4.17, 4.18, 4.19, 4.20 ve 4.21'de gösterilmektedir.



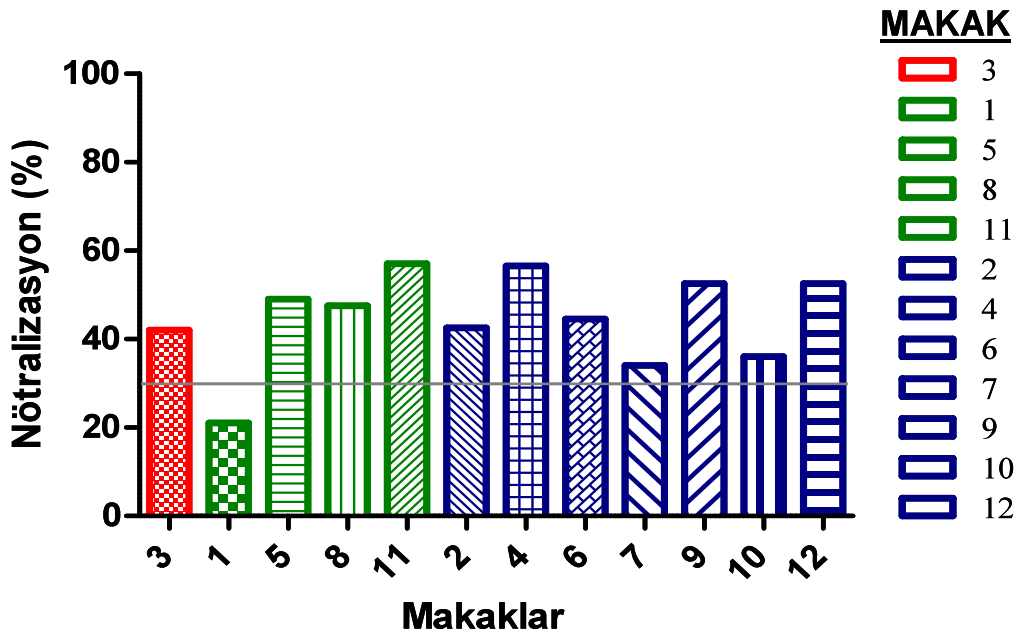
Şekil 4.17. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) SF162 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.



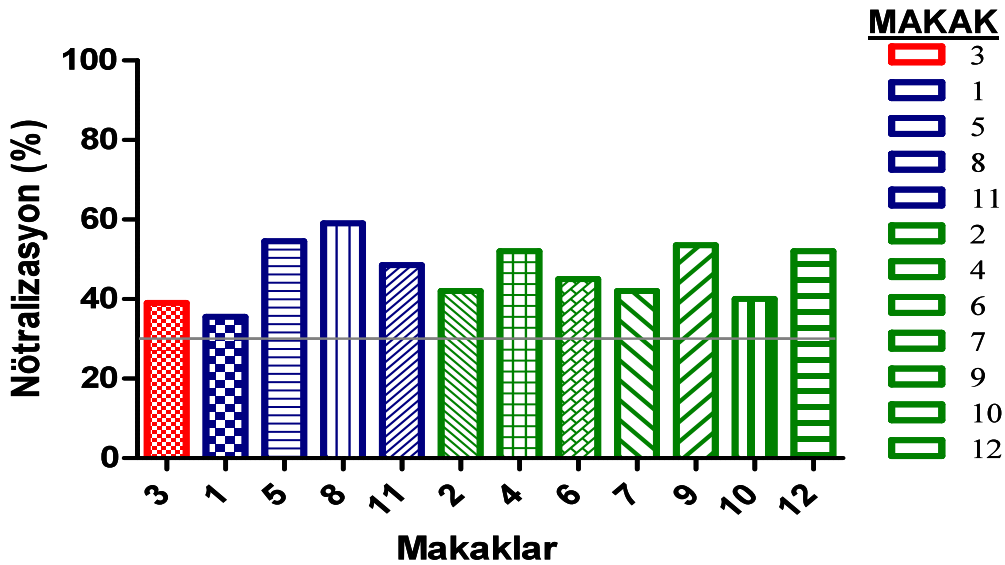
Şekil 4.18. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 92Br025 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.



Şekil 4.19. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) 92UG024 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.



Şekil 4.20. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) CC030 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.



Şekil 4.21. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makağa ait IgG'lerin (ES 14. ay) CC048 virusuna karşı nötralizan aktivitesi (1:20 plazma IgG dilüsyonunda). Nötralizasyon eşiği %30 olup gri çizgiyle belirtilmiştir.

Nötralizasyona doğal duyarlı olduğu bilinen ve Amerika'lı bir hastanın beyin omurilik sıvısından izole edilmiş olan SF162 virusunu (37) ancak K- gruptan 3 no'lu, GK gruptan 1 ve 5 no'lu, K+ gruptan ise 4, 9, 10 ve 12 no'lu makakları nötralize edebilirken, 92Br025 (Brezilya) ve 92UG024 (Uganda) viruslarını sadece K+ gruptaki makaklardan sırasıyla 4 ve 10 no'lu makaklar ile 4 ve 6 no'lu makaklar nötralize edebildi. HIV-2'nin endemik olduğu Gine Bisau'daki en yaygın HIV-1 grubu olan CRF02\_AG'nin içinde yer alan CC030 ve CC048 viruslarını ise GK gruptaki 1 no'lu makak hariç (CC030'u nötralize edemedi) tümü nötralize edebildi. Test edilen bütün HIV-1 viruslarını nötralize edebilen tek makağın K+ gruptaki 4 no'lu makak olduğu gözlemlendi.

#### **4.9. Nötralizan Antikorların Genişlik ve Potensi**

SIVmac239 virus zarfının kuvvetli heterolog Nak yanıtını indükleyen bir immünojenik yapıya sahip olduğunun anlaşılması üzerine, bu etkinin oluşmasında virus yükünün rolünün araştırılmasına karar verildi. Bu amaçla Nak'ların genişlik ve potensi ölçüldü. Nak genişliği, ES 6.5. ve 14. aylara ait IgG'lerin SIV (SIVmac239 inokulum ve SIVsm stok virusları), HIV-2 (1682 ve 1812) ve HIV-1 (SF162, 92UG024, 92Br025, CC030 ve CC048) viruslarına karşı Nak yanıtının değerlendirilmesiyle belirlendi (Tablo 4.7 ve 4.8). Tablo 4.7'de ES 6.5. aya, Tablo 4.8'de de ES 14. aya ait Nak genişlik sonuçları gösterilmektedir.

Tablo 4.7'de görüldüğü üzere, FMPA tedavisine olumlu yanıt veren ve tedavi kesildikten sonra da virus yükü 10.000 kopya/ml'nin altında seyreden K+ makaklarda, K-/GK makaklara kıyasla daha geniş Nak yanıtı oluştu (Mann-Whitney U testi,  $p=0.03$ ). Fakat enfeksiyonun ilerleyen dönemlerinde K-/GK makakların Nak yanıtındaki geç genişleme sonucunda aradaki bu fark kapandı (Tablo 4.8). Yine de ES 14. ayda en geniş Nak yanıtına sahip makağın (genişlik puanı 9) K+ gruptaki 4 no'lu makak olduğu dikkati çekti. ES 6.5. aydan ES 14. aya kadar olan süreçte Nak genişliğinde gözlenen değişim Şekil 4.22'de gösterilmektedir.



**Tablo 4.7. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin genişliği (ES 6.5. ay)\*.**

Makak no	SIV		HIV-2		HIV-1					Genişlik ES 6.5. ay
	SIVmac239	SIVsm stok	1682	1812	SF162	92UG024	92Br025	CC030	CC048	
3	100	100	76	8	20	5	21	20	7	3
1	29	100	73	19	26	10	21	7	-20	2
5	64.5	100	76	31	17	4	18	-25	5	4
8	28	100	73	35	12	6	8	-41	7	3
11	32	100	91	42	6	-44	29	9	27	4
2	17	100	85	30	25	30	20	4	-11	4
4	33	100	100	37	8	30	30	24	-15	6
6	29	100	73	39	4	33	12	-41	25	4
7	35.5	100	85	25	-19	26	11	-6	-9	3
9	39.5	100	82	55	-12	-16	20	-41	30	5
10	17.5	100	91	36	-6	-26	30	18	35	5
12	57.5	100	91	39	30	-2	7	19	40	6

p=0,03

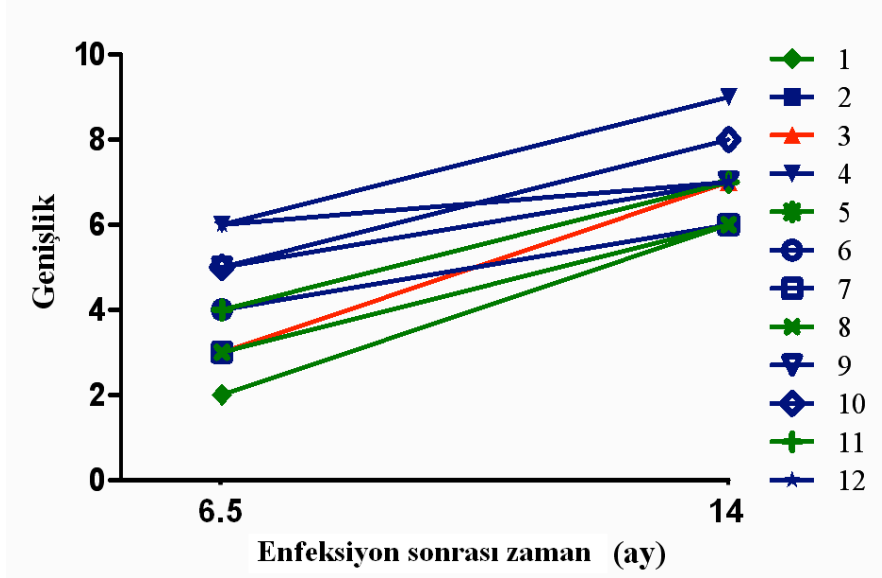
\* Nak varlığında (>%30) kutuların içi uygun renk kodlarıyla doldurulmuştur.

**Tablo 4.8. Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makağa ait IgG'lerin genişliği (ES 14. ay)\*.**

Makak no	SIV		HIV-2		HIV-1					Genişlik ES 14. ay
	SIVmac239	SIVsm stok	1682	1812	SF162	92UG024	92Br025	CC030	CC048	
3	96.5	92.5	73	71.5	33	10	27.5	42	39	7
1	42	93	66	66.5	35.5	10	28	21	35.5	6
5	74	95.5	62	68	19	8	27.5	49	54.5	6
8	75	91.5	75	68	25.5	3	24	47.5	59	6
11	52.5	91.5	83	69	32.5	10	26.5	57	48.5	7
2	50	65	68.5	67	15.5	22	29.5	42.5	42	6
4	52	86	64	67.5	34	34	40.5	56.5	52	9
6	21.5	57	71.5	66	25	48	29.5	44.5	45	6
7	41.5	76.5	60.5	69	28	19	20	34	42	6
9	64.5	67	80.5	64	30	22	27	52.5	53.5	7
10	48.5	53.5	61.5	62	32	27	30	36	40	8
12	67.5	54	80.5	59	44.5	21	19	52.5	52	7

p=0,376

\* Nak varlığında (>%30) kutuların içi uygun renk kodlarıyla doldurulmuştur.



Şekil 4.22. **Kontrolsüz**, **geçici kontrollü** ve **kontrollü** toplam 12 makakta ES 6.5-ES 14. aylar arasında gözlenen Nak genişlik değişim kinetiği.

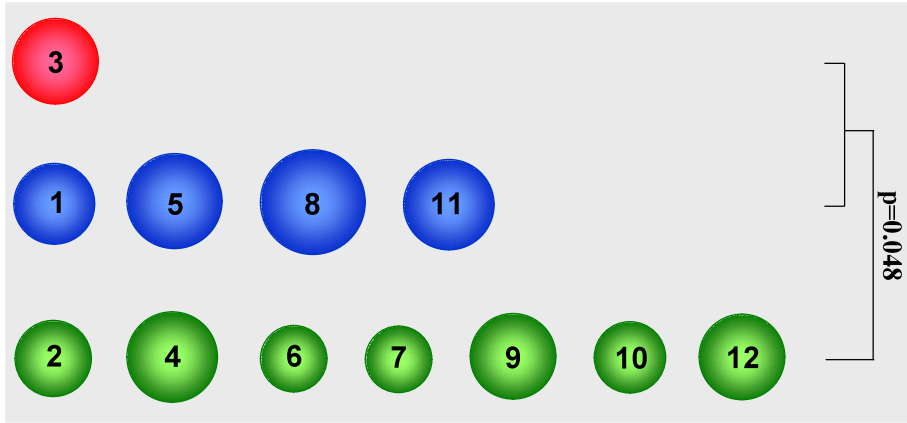
Potens analiziyle ilgili olarak SIV virüsü için ES 4.5. aya ait IgG örnekleri, HIV-1 ve HIV-2 için de ES 14. aya ait IgG örnekleri kullanıldı. Elde edilen potens sonuçları Tablo 4.9 ve Şekil 4.23’de görülmektedir.

Şekil 4.23’de görüldüğü üzere, FMPA tedavisine yanıtız olan ve/veya tedavinin sonlandırılmasından itibaren virus yükü artan K-/GK makaklara ait Nak potensi, virus yükü kontrol altında olan K+ makaklara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu (Mann Whitney U testi,  $p=0.048$ ).

Makak no	SIV		HIV-2		HIV-1		CC48 Titrasyon Potens	CC30 Titrasyon Potens	POTENS		
	SIVmac239 Titrasyon Potens	SIVsm stock Titrasyon Potens	1682 Titrasyon Potens	1812 Titrasyon Potens	SF162 Titrasyon Potens	92UG024 Titrasyon Potens				92Br025 Titrasyon Potens	
3	80	0.797	10240	5.213	10240	5.213	20	0	20	0	1.8
1	<20	0	10240	5.213	20480	5.844	20	0	<20	0	1.7
5	40	0.166	10240	5.213	20480	5.844	<20	0	<20	0	2
8	40	0.166	10240	5.213	163840	7.737	<20	0	<20	0	2.2
11	40	0.166	1280	3.321	81920	7.106	20	0	<20	0	1.9
2	20	0	640	2.69	40960	6.475	<20	0	<20	0	1.6
4	40	0.166	5120	4.582	81920	7.106	20	0	20	0	1.9
6	20	0	2560	3.952	5120	4.582	<20	0	20	0	1.4
7	20	0	1280	3.321	2560	3.952	<20	0	<20	0	1.4
9	20	0	2560	3.952	81920	7.106	20	0	<20	0	1.8
10	<20	0	640	2.69	5120	4.582	20	0	<20	0	1.5
12	40	0.166	2560	3.952	81920	7.106	20	0	<20	0	1.8

p=0.048

**Tablo 4.9.** Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makaka ait IgG'lerin potensi (SIV için ES 4.5. ay ve HIV için ES 14. ay).



**Şekil 4.23.** Kontrolsüz, geçici kontrollü ve kontrollü toplam 12 makale için IgG örneklerinin potans puanı. Dairelerin çapları potans puanı ile ilişkilidir.

Şekil 4.23'de görüldüğü üzere, FMPA tedavisine yanıtız olan ve/veya tedavinin sonlandırılmasından itibaren virus yükü artan K-/GK makaklara ait Nak potensi, virus yükü kontrol altında olan K+ makaklara kıyasla istatistiksel olarak anlamlı derecede daha yüksek bulundu (Mann Whitney U testi,  $p=0.048$ ).

## 5. TARTIŞMA

Tüm dünyada önemli bir sağlık sorunu haline gelen AIDS, günümüzde yaklaşık 40 milyona yakın kişiyi etkilemektedir. Etyolojik etken olan virusun (HIV) yapısal ve genetik özellikleri, immün sistemin temel hücrelerini doğrudan enfekte etme yeteneği ve immün sistemden başarılı kaçış mekanizmaları, enfeksiyonun eradikasyonunu sağlayan bir tedavinin ve etkin koruma sağlayan bir aşının geliştirilmesinde ciddi sorunlara neden olmaktadır.

Etkenin tanımlanmasından kısa süre sonra başlayan HIV aşısı geliştirme çalışmaları halen büyük bir hızla devam etmektedir. Çok sayıda aşı adayı, çeşitli değerlendirme aşamalarında yoğun olarak araştırılmaktadır. Bugün için kabul edilen görüş, HIV aşısının etkin olabilmesi için hem doğal hem de kazanılmış (hücrel ve hümorale) immün yanıt mekanizmalarını uyarabilmesidir (18).

Bu çalışmada, doğal bağışıklık faktörlerine etki eden anti-HIV nötralizan antikorların efektör fonksiyonlarının araştırılması amacıyla, SIVmac239 ile enfekte edilen ve erken dönemde tedavi başlanan 12 sinomolgus makakta enfeksiyon prognozunun, viral parametrelerin ve konak hümorale yanıtının izlenmesi ve nötralizan aktiviteye sahip IgG antikorlarının irdelenmesi planlanmıştır. Çalışmamızda, SIVmac239 ile enfekte edildikten sonra 14 ay boyunca izlenen ve FMPA (tenofovir) tedavisine verdikleri virus yükü yanıtına ve tedavi sonrası virus yüklerinde gözlenen değişikliğe göre üç gruba ayrılan (K-, GK ve K+) makaklarda temel olarak virus yükü ve CD4+ Th sayısının, hümorale immün yanıt kinetiği ile ilişkisi değerlendirilmiştir. Enfeksiyondan sonra (ES) 7. günde en yüksek virus yükü değerine sahip olan üç makaktan birinin K- (3 no'lu) grupta, diğer ikisinin ise GK (1 ve 5 no'lu) grupta olduğu izlenmiş; bu gruplarda yer alan toplam beş makağın ortak özelliğinin, tedavi sırasında ya da tedavi sonrasında viral replikasyonun kontrol altına alınamamış makaklar olduğu dikkati çekmiştir. Bu bulgu, erken dönemdeki virus yükünün, enfeksiyonun prognozunu belirlemede önemli rolü olduğuna dair literatür verileri ile uyumlu bulunmuştur (67, 107, 119).

ES 7. günde virus yükünün en yüksek değerlere ulaştığı 3 no'lu makağın en düşük vücut ağırlığına sahip olması, göreceli yüksek virus inokulumunun bu durumdan sorumlu olabileceğini düşündürmüştü; ancak tüm makaklar için (n=12) enfeksiyondan önceki vücut ağırlığı ile ES 7. gündeki virus yükleri arasında bir

korelasyon bulunamamıştır ( $p=0.366$ , Tablo 4.1. ve 4.2 ile Şekil 4.1 ve 4.2). Yine de, diğer makakların vücut ağırlığıyla kıyaslandığında ancak onların vücut ağırlığının yarısına ulaşabilen ve çalışma öncesi dönemde ciddi stres altında bulunan 3 no'lu makaktaki yüksek virus yükünden, bu makağa özgü immün yanıt ve HLA sisteminin yanı sıra vücut ağırlığının da sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

Subkütan yoldan verilebildiği için hayvan çalışmalarında sıklıkla tercih edilen bir nükleotid RT inhibitörü olan FMPA (tenofovir) tedavisi sırasında vücut ağırlığında görülen hafif düşüş bu ilacın gastrointestinal sistem üzerindeki bulantı, kusma ve ishal gibi olumsuz etkilerine bağlanmıştır (41).

Çalışmamızda, izlem sürecinde özellikle K-/GK gruplarda olmak üzere, lenfadenopati sayısında artış olduğu belirlenmiş (Tablo 4.3, Şekil 4.3), buna karşın hiçbir makakta CD4+ Th hücre sayısının 200 hücre/ $\mu$ l'nin altına düşmediği ve AIDS'in gelişmediği görülmüştür. Bu bulgu, SIVmac239 ile enfekte edilen Rhesus makaklarında 1 yıl içinde %50 olasılıkla AIDS geliştiğine ve SIVsm ile enfekte edilen sinomolgus makaklarda 2 yıl içinde %100 oranında AIDS geliştiğine dair literatür bilgisiyle uyumlu değildir (77, 102, 125). SIVsm'den daha patojen olduğu bilinen SIVmac239'un normalin çok üstünde bir dozda kullanıldığı bu çalışmada, makaklarda AIDS gelişmeme nedeninin, erken dönemde başlanan FMPA tedavisi olabileceği düşünülmüştür. Bu sonuç, akut retroviral sendrom döneminde tedavi başlandığında viral yük düzeyinin (set point) daha düşük olduğunu ve hastalık progresyonunun daha yavaş seyrettiğini bildiren çalışmalar ile uyumlu bulunmuştur (97, 100).

Hipergammaglobulinemi, özellikle pediatrik yaş grubundaki olgularda kontrolsüz HIV replikasyonunun önemli göstergelerinden biri olarak kabul edilmektedir (114, 138). Bizim çalışmamızda da K- ve GK gruplardaki makaklarda IgG düzeyinin enfeksiyon öncesi değerlerin çok üzerine yükseldiği, buna karşın K+ gruptaki makaklarda bazal düzeyin bile altına düştüğü saptanmıştır (Tablo 4.6, Şekil 4.5). Bu bulguya dayanılarak, kontrolsüz hiperinflamatuvar durumun, viral replikasyonun indirekt bir göstergesi olarak klinikte kullanılabileceği düşünülmüştür.

SIVmac239 inokulum virusuna yönelik nötralizan antikor (Nak) yanıtı değerlendirildiğinde, Nak'ların 3 no'lu makak hariç tüm makaklarda ancak ES 5.5. ayda ortaya çıktığı gözlenmiştir. Bu bulgu, lentivirusların bir hücreden diğerine,

hümorale yanıtı tetiklemeden, sinsityalar aracılığıyla geçebilme ve hızlı zarf mutasyonuna bağlı olarak plazma hücrelerinin "sınırlarını zorlama" özellikleri nedeniyle özgül antikor sentezini ES 5. aya kadar geciktirdiklerini bildiren çalışmalarla uyumlu bulunmuştur (20, 34, 36, 73). Üç no'lu makaktaki erken homolog Nak yanıtının ise, bu makaya özgü hümorale immün yanıt ve MHC antijenlerindeki farklılıklardan kaynaklanabileceği düşünülmüştür.

Çalışmamızda, enfekte edilen makaklardan virus re-izolatlarının elde edilebilmesi için ikişer kez (ES 4.5 ve 9. aylarda) periferik kan mononükleer hücre (PKMH) kültürleri yapılmıştır. Re-izolasyon sonuçları değerlendirildiğinde; ES hem 4.5. hem de 9. aylarda virus re-izolatlarının elde edilebildiği tek makanın, izlem süresince virus yükü çok yüksek düzeyde seyreden 3 no'lu makak olduğu görülmüştür. ES 4.5. aydaki birinci virus re-izolasyonu, 3 no'lu makanın yanı sıra, virus yükünün 1000 kopya/ml'nin üzerinde olduğu 1, 2, 4, 7, 9 ve 10 no'lu makaklar olmak üzere toplam 7 makakta başarılıdır (Tablo 4.1, Şekil 4.1). Buna karşın, anlaşılamayan ve yorumlanamayan bir nedenle, -yöntem yetersizliği olabilir- virus yükü yaklaşık 14.000 kopya/ml olan GK gruptaki 8 no'lu makaktan virus re-izolasyonu gerçekleştirilememiştir. ES 9. aydaki ikinci virus re-izolasyonu, 3 no'lu makanın yanı sıra GK gruptaki 5, 8 ve 11 no'lu makaklardan yapılabilmış; ancak bu gruptaki 1 no'lu makaktan re-izolasyon yapılamaması konusuna yine bir açıklama getirilememiştir. K+ gruptaki makakların hiçbirisinden ikinci virus re-izolasyonunun yapılamaması ise, virus yükünün düşük olması nedeniyle beklenen doğal bir durum olarak yorumlanmıştır.

Birinci re-izolatlara yönelik Nak yanıtı değerlendirildiğinde, K- gruptaki 3 no'lu ve GK gruptaki 1 no'lu makaklarda Nak yanıtının ancak virus re-izolasyonundan 1-4 ay sonra geliştiği gözlemlendi. Buna karşılık, K+ gruptaki makaklarda Nak yanıtının virus re-izolatlarının elde edildiği anda mevcut olduğu dikkati çekmiştir. Bu sonuçlar, K-/GK gruptaki makaklarda virusların Nak'ların seçici baskısından kaçmayı başarabildiği; oysa K+ makaklarda Nak'ların daha hızlı olgunlaşması nedeniyle virusun kaçamadığı ve böylece virus yükünün kontrol altında tutulabildiği yönünde yorumlanmıştır. K+ gruptaki makaklara ait birinci re-izolatların nötralizasyona duyarlı olması, bu hayvanlardaki hümorale immün yanıt farklılığının yanı sıra virusun kendisinden gelişen mutasyonlara da bağlı

olabileceğini düşündürmüştür. Örneğin, "açık zarf yapısı"na sahip virusların CD4'e gereksinim duymadan ko-reseptöre bağlanabildiği, ancak bu yapı nedeniyle nötralizasyona daha duyarlı hale geldikleri ifade edilmektedir (88). Çalışmamızda bu hipotezi test etmek amacıyla "ko-reseptör ve CD4'ten bağımsız enfeksiyon yetisi analizi" yapılmış, ancak ne yazık ki birinci re-izolatların replikasyon kapasitesi çok düşük olduğundan sonuç alınamamıştır. Bu suşlarda nötralizasyona duyarlılığın artışında gp120 üzerindeki glikozilasyonun azalmasının da potansiyel bir rol oynamış olabileceği düşünülmüştür. Nitekim, Nak'lardan kaçabilmek için virusun kullandığı glikan kılıfın, zarf yüzeyindeki negatif yükü artırarak virionun negatif yüklü hücre membranına yaklaşmasını engellediği ve böylelikle "viral uygunluğu" (viral fitness) azalttığı bilinmektedir (130). Viral uygunluğu artırmak ve hücreye tutunmak için glikan kılıfını inceltmek virusun bu avantaja karşılık ödediği bedel de, sıklıkla Nak'lara karşı duyarlı hale gelmesidir. Bu hipotezin doğruluğunu test etmek amacıyla, çalışmamızdaki örnekleri ileri araştırmalar için ilgili bir merkeze (E. Bowles, G.B.E. Stewart-Jones; Oxford University, John Radcliffe Hospital, Weatherall Molecular Medicine Institute, Human Immunology Unit, UK) gönderilmiştir ve sonuçlar beklenmektedir. Benzer olarak, 3 no'lu ve 1 no'lu makaklardan elde edilen birinci re-izolatların Nak'lardan kaçışından yine gp120 üzerindeki bazı mutasyonların sorumlu olabileceği düşüncesiyle, bu örnekler de incelenmek üzere aynı merkeze iletilmiştir.

İkinci re-izolatlara yönelik Nak aktivitesi değerlendirildiğinde; K-/GK gruptaki üç maağa (3, 8 ve 11) ait IgG'lerin ikinci virus re-izolatlarını ES 8.5. ayda nötralize edebildikleri saptanmıştır. Buna karşın, GK gruptan 5 no'lu maağın bu etkinliği ES 10. ayda kaybedip sonra tekrar kazandığı görülmüştür. Üç ve 11 no'lu makaklarda Nak yanıtı daha istikrarlı bulunmuştur. GK gruptaki makakların ikisinde re-izolatların Nak'lardan kaçtığı ve bu durumun da viral replikasyonun kontrol altına alınamamasından sorumlu olabileceği düşünülmüştür.

SIVmac239 virusunun nötralizasyona doğal dirençli olması nedeniyle enfeksiyonun ilk beş ayındaki Nak kinetiği değerlendirilememiştir. Enfeksiyonun bu erken dönemini değerlendirebilmek amacıyla, nötralizasyona doğal duyarlı olduğu bilinen SIVsm stok virusu ile nötralizasyon deneyleri tekrarlanmıştır. Ancak IgG örneklerinin 1:20 dilüsyonda, enfeksiyonun 1. ayından itibaren %100'e varan



oranlarda yüksek Nak aktivitesi göstermesi üzerine deneyler daha ileri dilüsyonlarda yeniden uygulanmıştır. Elde edilen sonuçlar, ES 4.5. aya ait IgG örneklerinin 1:640 dilüsyonda dahi SIVsm stok virusunu nötralize edebildiğini göstermiştir. ES 1. ay gibi erken bir dönemde ve yüksek dilüsyonlarda Nak yanıtının elde edilmiş olması, literatür bilgilerimize göre ilk kez gözlenen bir durumdur. İlginç olarak, 1:5120 kadar ileri IgG dilüsyonlarında dahi nötralizasyon kapasitesini koruyan makaklar, sadece K- ve GK gruplarındaki makaklardır (Şekil 4.10). Makakların yarısında (n=6) IgG antikörlerinin nötralizan aktivitesinin 1:2560 dilüsyonda dahi devam etmesi nedeniyle, Nak kinetiğinin daha iyi değerlendirilmesi için SIVsm stok virusu nötralizasyon testi bu dilüsyonda tekrarlanmıştır. Çalışmamızda, en erken (ES 1. ay) Nak aktivitesinin GK gruptaki 1 ve 8 no'lu makaklarda geliştiği görülmüş; K+ gruptaki makaklarda ise Nak yanıtının 4 no'lu makak hariç, tümünde ES 4.5. aydan itibaren ortaya çıktığı izlenmiştir. Bunun nedeninin, SIVmac239 virusuna yoğun olarak maruz kalan hayvanlardan elde edilen hümmoral immün yanıt ürünlerinin (IgG), SIVmac'ın evrimsel atası olan SIVsm'i daha kolay tanıyabilmesi olduğu düşünülmüştür.

Çok yüksek IgG dilüsyonlarında bile Nak aktivitesinin devam etmesi ve bu durumun daha önce literatürde bildirilmemiş olması, kullandığımız nötralizasyon yöntemlerinin doğruluğunu test etmemizi gerektirmiştir. Bu amaçla, SIVsm stok virusu ile enfekte edilmiş sinomolgus makaklardan ES 4. ve 18. aylarda elde edilen ve nötralizasyona sırasıyla duyarlı (SIVsm:C39<sup>sens</sup>) ve dirençli (SIVsm:C39<sup>res</sup>) oldukları bilinen re-izolatlarla nötralizasyon testleri tekrarlanmıştır. Gerçekten de, nötralizasyona duyarlı olan SIVsm:C39<sup>sens</sup> virusunu (ES 4. ay) 1:2560 plazma IgG dilüsyonunda 9 makak nötralize edebilirken, SIVsm:C39<sup>res</sup> virusunu (ES 18. ay) sadece 2 makak nötralize edebilmiştir. Nötralizasyon testlerimizin kontrolleri başarıyla tamamlandıktan sonra, heterolog Nak yanıtı analizlerine SIVsm'den köken alan ve SIVmac ile akraba olan HIV-2 ile devam edilmiştir. Bu deneylerde, 1682 ve 1812 kodlu iki adet HIV-2 izolatında, sırasıyla 1:327680 ve 1:20480 oranlarındaki IgG dilüsyonlarında bile Nak aktivitesinin devam ettirilebildiği gözlenmiştir. Elde ettiğimiz sonuçlar, HIV-1'e kıyasla AIDS tablosu daha yavaş gelişen, asemptomatik enfeksiyon evresinde virus yükü daha düşük düzeylerde seyreden ve CD4+ T hücre sayısındaki düşüş hızının daha yavaş olduğu HIV-2 enfeksiyonunda, Nak yanıtından

kaçışın daha nadir görüldüğü ve Nak yanıtının daha potent olduğu bilgisi ile uyumlu bulunmuştur (155).

Çalışmamızda, SIVmac239 ile enfekte edilmiş makaklarda gelişen Nak'ların genişlik sınırlarının belirlenebilmesi amacıyla bu kez de çeşitli HIV-1 klinik izolatları (SF162, 92UG024, 92br025, CC030 ve CC048) ile nötralizasyon testleri tekrarlanmıştır. Bu testlerde ES 14. aya ait IgG örneklerinin (1:20 dilüsyonda) nötralizan etkileri değerlendirildiğinde; nötralizasyona doğal duyarlı olduğu bilinen SF162 virusunu toplam 7 makağın (1, 3, 4, 9, 10, 11 ve 12) nötralize edebildiği belirlenmiştir (Tablo 4.8, Şekil 4.17). Genellikle nötralizasyona duyarlı olan C ve dirençli olan D gruplarından sırasıyla 92Br025 ve 92UG024 viruslarına karşı nötralizan aktivite analizinde, sadece K+ gruptan 4, 6 ve 10 no'lu makaklar başarılı olmuştur (Tablo 4.8, Şekil 4.18 ve 4.19). CRF.02\_AG rekombinan viruslar olan ve Gine Bisau'da endemik olan CC030 ve CC048'e karşı Nak aktivitesi değerlendirildiğinde ise, GK gruptan 1 no'lu makak hariç (CC030'u nötralize edemedi), diğer tüm makakların her iki virusu da etkin olarak nötralize edilebildiği gözlenmiştir (Tablo 4.8, Şekil 4.20 ve 4.21). Nötralizasyona genellikle dirençli olduğu bilinen bu virusların nötralize edilebilmesinin, Gine Bisau'da HIV-2'nin HIV-1 kadar yaygın olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür. Literatürde, HIV-1 ile HIV-2'nin aynı konağı enfekte etmeleri halinde gen alışverişi yapabildiklerine dair bir kanıt mevcut olmamasına rağmen, çalışmamızda Gine Bisau HIV-1 ve HIV-2 izolatlarının aynı Nak'lar tarafından nötralize edilebilmeleri nedeniyle, bu suşların zarf antijenlerindeki epitop benzerliğinin detaylı olarak araştırılması gerektiği düşünülmüştür.

Çalışmamızda ayrıca, SIV, HIV-2 ve HIV-1'e yönelik Nak yanıtının daha sistematik bir şekilde değerlendirilmesi amacıyla, son yıllarda tanımlanan potens ve genişlik ölçümleri yapılmış ve bu veriler virus yükü ile olan ilişkisi yönünden irdelenmiştir. Buna göre, virus yükü yüksek olan makaklarda daha potent, virus yükü kontrol altında olan makaklarda ise daha geniş bir Nak yanıtının ortaya çıktığı görülmüştür. ES 6.5. ayda Nak genişliği açısından daha başarılı olan K+ gruptaki makaklara, K-/GK gruptaki makakların ES 14. ayda yetiştikleri belirlenmiştir.

Günümüzde aşı çalışmalarıyla ilgili en büyük sorun, bir gruba ait virus zarfıyla yapılan aşılama sonrası oluşan Nak'ların başka bir gruptaki virusu nötralize

etmede başarısız kalması, yani genişliğinin yetersiz olmasıdır. Ancak bizim çalışmamızda görüldüğü üzere, enfeksiyonun göreceli olarak erken dönemlerinde uygun tedavi ile virus yükünün kontrol altına alınması, hümorale immün yanıtın daha kontrollü ve etkin biçimde olgunlaşmasını sağlamış ve sonuç olarak SIVmac239 virus zarfı, HIV-1 ve HIV-2'ye karşı oldukça geniş bir Nak yanıtı oluşturmada başarılı olmuştur. “En az 4 farklı virus grubuna yönelik etkin Nak yanıtı” varlığında kullanılan “geniş etkili Nak” tanımlamasına göre, çalışmamızda elde edilen ES 14. aya ait tüm IgG örnekleri birer geniş etkili Nak adayıdır. Özellikle K+ gruptaki 4 no'lu makak, en geniş Nak yanıtı oluşturan makak olma özelliği ile, üzerinde daha ileri çalışmalar yapılmasını gerektirmektedir. Bu makaya ait ES 14. ay Nak'larının, SIV, HIV-2 ve HIV-1 epitoplarına bağlanma bölgesi ile ilgili çalışmalar halen devam etmektedir. Elde edilecek sonuçlar, bu geniş Nak etkisinden, özgül bir epitopa bağlanan monoklonal bir antikor aktivitesinin mi, yoksa poliklonal sinerjistik bir antikor aktivitesinin mi sorumlu olduğunu ortaya koyacaktır.

Çalışmamızda Nak'ların potens analizi, IgG örneklerinin yetersiz kalması nedeniyle enfeksiyon sonrası farklı zamanlarda yapılamamış; bunun yerine SIV'e yönelik ES 4.5. ay nötralizasyon sonuçları ile HIV'e yönelik ES 14. ay nötralizasyon sonuçları birleştirilerek potens skoru hesaplanmıştır. Buna göre, virus yükü yüksek seyreden makaklarda (K-/GK grup), K+ makaklara göre daha potent bir Nak yanıtı oluşmuştur ( $p=0.042$ ) (Tablo 4.9, Şekil 4.23). Bu durumun, yüksek virus yükü nedeniyle hümorale immün sistemin sadece SIVmac239 virusuyla mücadele etmek zorunda kalmasına ve dolayısıyla sadece SIVmac239 ve atası SIVsm'e yönelik potent Nak yanıtı geliştirmiş olmasına bağlı olabileceği düşünülmüştür.

Sonuç olarak, bu çalışma ile ilk kez virus yükü ile Nak'ların genişlik ve potensi arasındaki ilişki ortaya konmuştur. Ancak virus çeşitliliğinin, bu antikorların genişlik ve potensi üzerindeki yadsınamaz etkisi nedeniyle, SIVmac239 virus zarfının immünojenisitesi ve sinomolgu makaklarının MHC sistemlerine yönelik daha detaylı çalışmaların yapılması gerekmektedir. Böylelikle, etkin Nak yanıtı geliştirmeye yönelik aşı çalışmaları daha akılcı bir biçimde ve hedefe yönelik olarak planlanabilir.

Bu çalışmada ayrıca ilk kez, SIVmac239 virusu sinomolgu makaklarda SIV enfeksiyon modeli olarak uygulanmış ve hem potent hem de geniş etkili Nak

yanıtları elde edilmiştir. Bu sonuçlara dayanarak, bu virus ve makak kombinasyonunun hümorale immünite araştırmalarında kullanılabileceği düşünölmüştür.

## 6. SONUÇ VE ÖNERİLER

SIVmac239 ile intravenöz yoldan enfekte edilen ve erken dönemde FMPA (tenofovir) tedavisi alan 12 sinomolgus makak ile yapılan bu çalışmada şu sonuçlar elde edilmiştir:

1. Enfeksiyon sonrası erken dönemde saptanan virus yükü, enfeksiyonun prognozunu belirlemede önemli role sahiptir.

2. SIV enfeksiyonunun erken döneminde başlanan etkili antiretroviral tedavi hastalığın seyrini yavaşlatabilir.

3. Hipergammaglobulinemi kontrolsüz viral replikasyonun önemli göstergelerinden birisidir.

4. SIV enfeksiyonunda, IgG antikorlarının avidite olgunlaşması 5-6 aya kadar uzayabilir.

5. SIV enfeksiyonunun seyri sırasında saptanan virus yükündeki değişiklikler, enfeksiyonun erken döneminde ortaya çıkan, re-izolatlarla karşı gelişen Nak yanıtı ile yakından ilişkilidir.

6. Virus yükü kontrol altında olan makaklarda daha geniş etkili, virus yükü yüksek seyreden makaklarda ise daha potent bir nötralizan antikor yanıtı saptanmıştır.

7. Geniş etkili ve potent Nak gelişiminde erken ART'nin rolünü değerlendirmek amacıyla benzer bir çalışma tedavi verilmeden tekrarlanmalıdır.

8. Özellikle kontrollü grupta yer alan bir makakta (4 no'lu) gelişen geniş etkili Nak yanıtı, bu antikorların viral zarf üzerindeki epitopa bağlanma yeri ve bağlanma kinetikleri açısından daha detaylı biçimde incelenmesi gerektiğini ortaya koymaktadır.

9. SIVmac239 zarfı güçlü bir immünojendir ve aşı çalışmalarında kullanılmak üzere değerlendirilebilir.

10. SIVmac239 ile enfekte edilen sinomolgus makaklar özellikle SIV'e karşı gelişen humoral immün yanıtın araştırılmasında uygun bir primat modeli teşkil etmektedir.

## 7. KAYNAKLAR

1. Alkhatib, G. (2009). The biology of CCR5 and CXCR4. *Curr Opin HIV AIDS*, 4:96-103.
2. Alter, H.J., Eichberg, J.W., Masur, H., Saxinger, W.C., Gallo, R., Macher, A.M., et al.(1984). Transmission of HTLV-III infection from human plasma to chimpanzees: an animal model for AIDS. *Science*, 226:549-52.
3. Baltimore, D. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of RNA tumour viruses. *Nature*, 226:1209-11.
4. Balzarini, J., Naesens, L., Slachmuylders, J., Niphuis, H., Rosenberg, I., Holy, A., et al. (1991). 9-(2-Phosphonylmethoxyethyl)adenine (PMEA) effectively inhibits retrovirus replication in vitro and simian immunodeficiency virus infection in rhesus monkeys. *AIDS*, 5:21-8.
5. Barin, F., M'Boup, S., Denis, F., Kanki P., Allan, J.S., Lee, T.H., Essex, M. (1985). Serological evidence for virus related to simian T-lymphotropic retrovirus III in residents of West Africa. *Lancet*, 2:1387-9.
6. Baroncelli, S., Negri, D.R, Michelini, Z., Cara, A. (2008). Macaca mulatta, fascicularis and nemestrina in AIDS vaccine development. *Expert Rev Vaccines*, 7:1419-34.
7. Barre-Sinoussi, F., Chermann, J.C., Rey, F., Nugeyre, M.T., Chamaret, S., Gruest, J., et al. (1983). Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science*, 220:868-71.
8. Bello, G., Velasco-de-Castro, C.A., Bongertz, V., Rodrigues, C.A., Giacoia-Gripp, C.B., Pilotto, J.H., et al. (2009). Immune activation and antibody responses in non-progressing elite controller individuals infected with HIV-1. *J Med Virol*, 81:1681-90.
9. Benveniste, R.E., Morton, W.R., Clark, E.A., Tsai, C.C., Ochs, H.D., Ward, J.M., et al. (1988). Inoculation of baboons and macaques with simian immunodeficiency virus/Mne, a primate lentivirus closely related to human immunodeficiency virus type 2. *J Virol*, 62:2091-101.
10. Berzofsky, J.A. (1988). Features of T-cell recognition and antigen structure useful in the design of vaccines to elicit T-cell immunity. *Vaccine*, 6:89-93.
11. Binley, J.M., Wrin, T., Korber, B., Zwick, M.B., Wang, M., Chappey, C., et al. (2004). Comprehensive cross-clade neutralization analysis of a panel of anti-human immunodeficiency virus type 1 monoclonal antibodies. *J Virol*, 78:13232-52.
12. Bjorndal, A., Deng, H., Jansson, M., Fiore, J.R., Colognesi, C., Karlsson, A., et al. (1997). Coreceptor usage of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates varies according to biological phenotype. *J Virol*, 71:7478-87.

13. Bleul, C.C., Wu, L., Hoxie, J.A., Springer, T.A., Mackay, C.R. (1997). The HIV coreceptors CXCR4 and CCR5 are differentially expressed and regulated on human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:1925-30.
14. Bogers, W.M., Koornstra, W.H., Dubbes, R.H., ten Haaf, P.J., Verstrepen, B.E., Jhagjhoorsingh, S.S., et al. (1998). Characteristics of primary infection of a European human immunodeficiency virus type 1 clade B isolate in chimpanzees. *J Gen Virol*, 79 (Pt 12):2895-903.
15. Bron, R., Klasse, P.J., Wilkinson, D., Clapham, P.R., Pelchen-Matthews, A., Power, C., et al. (1997). Promiscuous use of CC and CXC chemokine receptors in cell-to-cell fusion mediated by a human immunodeficiency virus type 2 envelope protein. *J Virol*, 71:8405-15.
16. Brown, B.K., Darden, J.M., Tovanabutra, S., Oblander, T., Frost, J., Sanders-Buell, E., et al. (2005). Biologic and genetic characterization of a panel of 60 human immunodeficiency virus type 1 isolates, representing clades A, B, C, D, CRF01\_AE, and CRF02\_AG, for the development and assessment of candidate vaccines. *J Virol*, 79:6089-101.
17. Bukrinskaya, A.G. (2004). HIV-1 assembly and maturation. *Arch Virol*, 149:1067-82.
18. Bunnik, E.M., Pisas, L., van Nuenen, A.C., Schuitemaker, H. (2008). Autologous neutralizing humoral immunity and evolution of the viral envelope in the course of subtype B human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 82:7932-41.
19. Bunnik, E.M., Quakkelaar, E.D., van Nuenen, A.C., Boeser-Nunnink, B., Schuitemaker, H. (2007). Increased neutralization sensitivity of recently emerged CXCR4-using human immunodeficiency virus type 1 strains compared to coexisting CCR5-using variants from the same patient. *J Virol*, 81:525-31.
20. Burns, D.P., Collignon, C., Desrosiers, R.C. (1993). Simian immunodeficiency virus mutants resistant to serum neutralization arise during persistent infection of rhesus monkeys. *J Virol*, 67:4104-13.
21. Burton, D.R., Desrosiers, R.C., Doms, R.W., Koff, W.C., Kwong, P.D., Moore, J.P., et al. (2004). HIV vaccine design and the neutralizing antibody problem. *Nat Immunol*, 5:233-6.
22. Cagigi, A., Nilsson, A., De Milito, A., Chiodi, F. (2008). B cell immunopathology during HIV-1 infection: lessons to learn for HIV-1 vaccine design. *Vaccine*, 26:3016-25.
23. Calarese, D.A., Scanlan, C.N., Zwick, M.B., Deechongkit, S., Mimura, Y., Kunert, R., et al. (2003). Antibody domain exchange is an immunological solution to carbohydrate cluster recognition. *Science*, 300:2065-71.
24. Centers for Disease Control and Prevention. (1992). 1993 revised classification system for HIV infection and expanded surveillance case definition for AIDS among adolescents and adults. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 41(RR-17): 1-19.

25. Centers for Disease Control and Prevention. (1981). Follow-up on Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30: 409-10.
26. Centers for Disease Control and Prevention. (1981). Kaposi's sarcoma and Pneumocystis pneumonia among homosexual men--New York City and California. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30:305-8.
27. Centers for Disease Control and Prevention. (1981). Pneumocystis pneumonia--Los Angeles. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 30:250-2.
28. Chen, B., Vogan, E.M., Gong, H., Skehel, J.J., Wiley, D.C., Harrison, S.C. (2005). Structure of an unliganded simian immunodeficiency virus gp120 core. *Nature*, 433:834-41.
29. Chirmule, N., Oyaizu, N., Kalyanaraman, V.S., Pahwa, S. (1992). Inhibition of normal B-cell function by human immunodeficiency virus envelope glycoprotein, gp120. *Blood*, 79:1245-54.
30. Choe, H., Farzan, M., Konkel, M., Martin, K., Sun, Y., Marcon, L., et al. (1998). The orphan seven-transmembrane receptor apj supports the entry of primary T-cell-line-tropic and dual tropic human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 72:6113-8.
31. Choi, W.S., Collignon, C., Thiriart, C., Burns, D.P, Stott, E.J., Kent, K.A., Desrosiers, R.C. (1994). Effects of natural sequence variation on recognition by monoclonal antibodies neutralize simian immunodeficiency virus infectivity. *J Virol*, 68:5395-402.
32. Clapham, P.R., McKnight, A., Weiss, R.A., (1992). Human immunodeficiency virus type 2 infection and fusion of CD4-negative human cell lines: induction and enhancement by soluble CD4. *J Virol*, 66:3531-7.
33. Clavel, F., Guetard, D., Brun-Vezinet, F., Chamaret, S., Rey, M.A., Santos-Ferreira, M.O., et al. (1986). Isolation of a new human retrovirus from West African patients with AIDS. *Science*, 233:343-6.
34. Clements, J.E., Montelaro, R.C., Zink, M.C., Amedee, A.M., Miller, S., Trichel, A.M., et al. (1995). Cross-protective immune responses induced in rhesus macaques by immunization with attenuated macrophage-tropic simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 69:2737-44.
35. Coffin, J., Haase, A., Levy, J.A., Montagnier, L., Oroszlan, S., Teich, N., et al. (1986). What to call the AIDS virus? *Nature*, 321:10.
36. Cole, K.S., Rowles, J.L., Jagerski, B.A., Murphey-Corb, M., Unangst, T., Clements, J.E., et al. (1997). Evolution of envelope-specific antibody responses in monkeys experimentally infected or immunized with simian immunodeficiency virus and its association with the development of protective immunity. *J Virol*, 71:5069-79.
37. Collman, R., Hassan, N.F., Walker, R., Godfrey, B., Cutilli, J., Hastings, J.C., et al. (1989). Infection of monocyte-derived macrophages with human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1). Monocyte-tropic and lymphocyte-



- tropic strains of HIV-1 show distinctive patterns of replication in a panel of cell types. *J Exp Med*, 170:1149-63.
38. Conley, A.J., Gorny, M.K., Kessler, J.A. 2nd, Boots, L.J., Ossorio-Castro, M., Koenig, S., et al. (1994). Neutralization of primary human immunodeficiency virus type 1 isolates by the broadly reactive anti-V3 monoclonal antibody, 447-52D. *J Virol*, 68:6994-7000.
  39. Dalgleish, A.G. (1988). Human trials of AIDS vaccines: novel means of passive and active immunotherapy. *AIDS*, 2 (Suppl 1):S129-31.
  40. Daniel, M.D., Letvin, N.L., King, N.W., Kannagi, M., Sehgal, P.K., Hunt, R.D., et al. (1985). Isolation of T-cell tropic HTLV-III-like retrovirus from macaques. *Science*, 228:1201-4.
  41. De Clercq, E. (2003). Clinical potential of the acyclic nucleoside phosphonates cidofovir, adefovir, and tenofovir in treatment of DNA virus and retrovirus infections. *Clin Microbiol Rev*, 16:569-96.
  42. De Milito, A., Morch, C., Sonnerborg, A., Chiodi, F. (2001). Loss of memory (CD27) B lymphocytes in HIV-1 infection. *AIDS*, 15:957-64.
  43. De Milito, A., Nilsson, A., Titanji, K., Thorstensson, R., Reizenstein, E., Narita, M., et al. (2004). Mechanisms of hypergammaglobulinemia and impaired antigen-specific humoral immunity in HIV-1 infection. *Blood*, 103:2180-6.
  44. Deng, H.K., Unutmaz, D., KewalRamani, V.N., Littman, D.R. (1997). Expression cloning of new receptors used by simian and human immunodeficiency viruses. *Nature*, 388:296-300.
  45. Derdeyn, C.A., Hunter, E. (2008). Viral characteristics of transmitted HIV. *Curr Opin HIV AIDS*, 3:16-21.
  46. Derdeyn, C.A., Silvestri, G. (2005). Viral and host factors in the pathogenesis of HIV infection. *Curr Opin Immunol*, 17:366-73.
  47. Dong, M., Zhang, P.F., Grieder, F., Lee, J., Krishnamurthy, G., VanCott, T., et al. (2003). Induction of primary virus-cross-reactive human immunodeficiency virus type 1-neutralizing antibodies in small animals by using an alphavirus-derived in vivo expression system. *J Virol*, 77:3119-30.
  48. Doranz, B.J., Rucker, J., Yi, Y., Smyth, R.J., Samson, M., Peiper, S.C., et al. (1996). A dual-tropic primary HIV-1 isolate that uses fusin and the beta-chemokine receptors CKR-5, CKR-3, and CKR-2b as fusion cofactors. *Cell*, 85:1149-58.
  49. Doria-Rose, N.A., Klein, R.M., Manion, M.M., O'Dell, S., Phogat, A., Chakrabarti, B., et al. (2009). Frequency and phenotype of human immunodeficiency virus envelope-specific B cells from patients with broadly cross-neutralizing antibodies. *J Virol*, 83:188-99.
  50. Edinger, A.L., Mankowski, J.L., Doranz, B.J., Margulies, B.J., Lee, B., Rucker, J., et al. (1997). CD4-independent, CCR5-dependent infection of brain capillary endothelial cells by a neurovirulent simian immunodeficiency virus strain. *Proc Natl Acad Sci USA*, 94:14742-7.

51. Farzan, M., Choe, H., Martin, K., Marcon, L., Hofmann, W., Karlsson, G., et al. (1997). Two orphan seven-transmembrane segment receptors which are expressed in CD4-positive cells support simian immunodeficiency virus infection. *J Exp Med*, 186:405-11.
52. Feng, Y., C. C. Broder, P. E. Kennedy, and E. A. Berger. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science*, 272:872-7.
53. Fields BN, Knipe, D.M., Howley, P.M. (ed.) (2006). *Fields Virology*, Fifth ed, Vol. 1. Lippincott Williams and Wilkins, Philadelphia.
54. Fouchier, R.A., Groenink, M., Kootstra, N.A., Tersmette, M., Huisman, H.G., Miedema, F., Schuitemaker, H. (1992). Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule. *J Virol*, 66:3183-7.
55. Fournier, A.M., Baillat, V., Alix-Panabieres, C., Fondere, J.M., Merle, C., Segondy, M., et al. (2002). Dynamics of spontaneous HIV-1 specific and non-specific B-cell responses in patients receiving antiretroviral therapy. *AIDS*, 16:1755-60.
56. Franchini, G., Gurgo, C., Guo, H.G., Gallo, R.C., Collalti, E., Fargnoli, K.A., et al. (1987). Sequence of simian immunodeficiency virus and its relationship to the human immunodeficiency viruses. *Nature*, 328:539-43.
57. Francis, D.P., Feorino, P.M., Broderon, J.R., McClure, H.M., Getchell, J.P., McGrath, C.R., et al. (1984). Infection of chimpanzees with lymphadenopathy-associated virus. *Lancet*, 2:1276-7.
58. Fultz, P.N., Anderson, D.C., McClure, H.M., Dewhurst, S., Mullins, J.I. (1990). SIVsm infection of macaque and mangabey monkeys: correlation between in vivo and in vitro properties of different isolates. *Dev Biol Stand*, 72:253-8.
59. Fultz, P.N., McClure, H.M., Daugharty, H., Brodie, A., McGrath, C.R., Swenson, B., Francis, D.P. (1986). Vaginal transmission of human immunodeficiency virus (HIV) to a chimpanzee. *J Infect Dis*, 154:896-900.
60. Gajdusek, D.C., Amyx, H.L., Gibbs, C.J.Jr., Asher, D.M., Rodgers-Johnson, P., Epstein, L.G., et al. (1985). Infection of chimpanzees by human T-lymphotropic retroviruses in brain and other tissues from AIDS patients. *Lancet*, 1:55-6.
61. Gomez, C., Hope T.J. (2005). The ins and outs of HIV replication. *Cell Microbiol*, 7:621-6.
62. Gratton, S., Cheynier, R., Dumaurier, M.J., Oksenhendler, E., Wain-Hobson, S. (2000). Highly restricted spread of HIV-1 and multiply infected cells within splenic germinal centers. *Proc Natl Acad Sci USA*, 97:14566-71.
63. Hahn, B.H., Shaw, G.M., De Cock, K.M., Sharp, P.M. (2000). AIDS as a zoonosis: scientific and public health implications. *Science*, 287:607-14.

64. Haynes, B.F., Fleming, J., St Clair, E.W., Katinger, H., Stiegler, G., Kunert, R., et al. (2005). Cardiolipin polyspecific autoreactivity in two broadly neutralizing HIV-1 antibodies. *Science*, 308:1906-8.
65. HIV sequence database. Los Alamos National Laboratory. <http://hiv.lanl.gov>.
66. Hirsch, V.M. (2004). What can natural infection of African monkeys with simian immunodeficiency virus tell us about the pathogenesis of AIDS? *AIDS Rev*, 6:40-53.
67. Ho, D.D., Neumann, A.U., Perelson, A.S., Chen, W., Leonard, J.M., Markowitz, M. (1995). Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV-1 infection. *Nature*, 373:123-6.
68. Hoffman, T.L., LaBranche, C.C., Zhang, W., Canziani, G., Robinson, J., Chaiken, I., et al. (1999). Stable exposure of the coreceptor-binding site in a CD4-independent HIV-1 envelope protein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 96:6359-64.
69. Honczarenko, M., Le, Y., Swierkowski, M., Ghiran, I., Glodek, A.M., Silberstein, L.E. (2006). Human bone marrow stromal cells express a distinct set of biologically functional chemokine receptors. *Stem Cells*, 24:1030-41.
70. Hrin, R., Montgomery, D.L., Wang, F., Condra, J.H., An, Z., Strohl, W.R., et al. (2008). Short communication: In vitro synergy between peptides or neutralizing antibodies targeting the N- and C-terminal heptad repeats of HIV Type 1 gp41. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 24:1537-44.
71. Huang, C.C., Tang, M., Zhang, M.Y., Majeed, S., Montabana, E., Stanfield, R.L., et al. (2005). Structure of a V3-containing HIV-1 gp120 core. *Science*, 310:1025-8.
72. Jinno, A., Shimizu, N., Soda, Y., Haraguchi, Y., Kitamura, T., Hoshino, H. (1998). Identification of the chemokine receptor TER1/CCR8 expressed in brain-derived cells and T cells as a new coreceptor for HIV-1 infection. *Biochem Biophys Res Commun*, 243:497-502.
73. Johnson, W.E., Morgan, J., Reitter, J., Puffer, B.A., Czajak, S., Doms, R.W., Desrosiers, R.C. (2002). A replication-competent, neutralization-sensitive variant of simian immunodeficiency virus lacking 100 amino acids of envelope. *J Virol*, 76:2075-86.
74. Johnson, W.E., Sanford, H., Schwall, L., Burton, D.R., Parren, P.W., Robinson, J.E., Desrosiers, R.C. (2003). Assorted mutations in the envelope gene of simian immunodeficiency virus lead to loss of neutralization resistance against antibodies representing a broad spectrum of specificities. *J Virol*, 77:9993-10003.
75. Jung, A., Maier, R., Vartanian, J.P., Bocharov, G., Jung, V., Fischer, U., et al. (2002). Recombination: Multiply infected spleen cells in HIV patients. *Nature*, 418:144.
76. Kacani, L., Stoiber, H., Dierich, M.P. (1997). Role of IL-15 in HIV-1-associated hypergammaglobulinaemia. *Clin Exp Immunol*, 108:14-8.

77. Kestler, H., Kodama, T., Ringler, D., Marthas, M., Pedersen, N., Lackner, A., et al. (1990). Induction of AIDS in rhesus monkeys by molecularly cloned simian immunodeficiency virus. *Science*, 248:1109-12.
78. Kinsey, N.E., Anderson, M.G., Unangst, T.J., Joag, S.V., Narayan, O., Zink, M.C., Clements, J.E. (1996). Antigenic variation of SIV: mutations in V4 alter the neutralization profile. *Virology*, 221:14-21.
79. Kirchhoff, F., Pohlmann, S., Hamacher, M., Means, R.E., Kraus, T., Uberla, K., Di Marzio, P. (1997). Simian immunodeficiency virus variants with differential T-cell and macrophage tropism use CCR5 and an unidentified cofactor expressed in CEMx174 cells for efficient entry. *J Virol*, 71:6509-16.
80. Koch, M., Pancera, M., Kwong, P.D., Kolchinsky, P., Grundner, C., Wang, L., et al. (2003). Structure-based, targeted deglycosylation of HIV-1 gp120 and effects on neutralization sensitivity and antibody recognition. *Virology*, 313:387-400.
81. Korber, B., Gaschen, B., Yusim, K., Thakallapally, R., Kesmir, C., Detours, V. (2001). Evolutionary and immunological implications of contemporary HIV-1 variation. *Br Med Bull*, 58:19-42.
82. Korber, B., Muldoon, M., Theiler, J., Gao, F., Gupta, R., Lapedes, A., et al. (2000). Timing the ancestor of the HIV-1 pandemic strains. *Science*, 288:1789-96.
83. Kuller, L., Morton, W.R., Benveniste, R.E., Tsai, C.C., Clark, E.A., Gale, M.J., et al. (1990). Inoculation of *Macaca fascicularis* with simian immunodeficiency virus, SIV<sub>mac</sub> immunologic, serologic, and pathologic changes. *J Med Primatol*, 19:367-80.
84. Kwong, P.D., Doyle, M.L., Casper, D.J., Cicala, C., Leavitt, S.A., Majeed, S., et al. (2002). HIV-1 evades antibody-mediated neutralization through conformational masking of receptor-binding sites. *Nature*, 420:678-82.
85. Kwong, P.D., Wyatt, R., Robinson, J., Sweet, R.W., Sodroski, J., Hendrickson, W.A. (1998). Structure of an HIV gp120 envelope glycoprotein in complex with the CD4 receptor and a neutralizing human antibody. *Nature*, 393:648-59.
86. Landesman, S.H., Ginzburg, H.M., Weiss, S.H. (1985). The AIDS epidemic. *N Engl J Med*, 312:521-5.
87. Lauren, A., Thorstensson, R., Fenyo, E.M. (2006). Comparative studies on mucosal and intravenous transmission of simian immunodeficiency virus (SIV<sub>sm</sub>): the kinetics of evolution to neutralization resistance are related to progression rate of disease. *J Gen Virol*, 87:595-606.
88. Lauren, A., Vincic, E., Hoshino, H., Thorstensson, R., Fenyo, E.M. (2007). CD4-independent use of the CCR5 receptor by sequential primary SIV<sub>sm</sub> isolates. *Retrovirology*, 4:50.
89. Lauren, A., Vodros, D., Thorstensson, R., Fenyo, E.M. (2006). Comparative studies on mucosal and intravenous transmission of simian

- immunodeficiency virus (SIVsm): evolution of coreceptor use varies with pathogenic outcome. *J Gen Virol*, 87:581-94.
90. Lehner, T., Wang, Y., Pido-Lopez, J., Whittall, T., Bergmeier, L.A., Babaahmady, K. (2008). The emerging role of innate immunity in protection against HIV-1 infection. *Vaccine*, 26:2997-3001.
  91. Lemey, P., Pybus, O.G., Wang, B., Saksena, N.K., Salemi, M., Vandamme, A.M. (2003). Tracing the origin and history of the HIV-2 epidemic. *Proc Natl Acad Sci USA*, 100:6588-92.
  92. Letvin, N.L., Daniel, M.D., Sehgal, P.K., Desrosiers, R.C., Hunt, R.D., Waldron, L.M., et al. (1985). Induction of AIDS-like disease in macaque monkeys with T-cell tropic retrovirus STLV-III. *Science*, 230:71-3.
  93. Letvin, N.L., King, N.W. (1990). Immunologic and pathologic manifestations of the infection of rhesus monkeys with simian immunodeficiency virus of macaques. *J Acquir Immune Defic Syndr*, 3:1023-40.
  94. Li, B., Decker, J.M., Johnson, R.W., Bibollet-Ruche, F., Wei, X., Mulenga, J., et al. (2006). Evidence for potent autologous neutralizing antibody titers and compact envelopes in early infection with subtype C human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 80:5211-8.
  95. Li, M., Gao, F., Mascola, J.R., Stamatatos, L., Polonis, V.R., Koutsoukos, M., et al. (2005). Human immunodeficiency virus type 1 env clones from acute and early subtype B infections for standardized assessments of vaccine-elicited neutralizing antibodies. *J Virol*, 79:10108-25.
  96. Li, Q., Duan, L., Estes, J.D., Ma, Z.M., Rourke, T., Wang, Y., et al. (2005). Peak SIV replication in resting memory CD4<sup>+</sup> T cells depletes gut lamina propria CD4<sup>+</sup> T cells. *Nature*, 434:1148-52.
  97. Lillo, F.B., Ciuffreda, D., Veglia, F., Capiluppi, B., Mastorilli, E., Vergani, B., et al. (1999). Viral load and burden modification following early antiretroviral therapy of primary HIV-1 infection. *AIDS*, 13:791-6.
  98. Macchia, D., Almerigogna, F., Parronchi, P., Ravina, A., Maggi, E., Romagnani, S. (1993). Membrane tumour necrosis factor-alpha is involved in the polyclonal B-cell activation induced by HIV-infected human T cells. *Nature*, 363:464-6.
  99. Malaspina, A., Moir, S., Kottlil, S., Hallahan, C.W., Ehler, L.A., Liu, S., et al. (2003). Deleterious effect of HIV-1 plasma viremia on B cell costimulatory function. *J Immunol*, 170:5965-72.
  100. Malhotra, U., Berrey, M.M., Huang, Y., Markee, J., Brown, D.J., Ap, S., et al. (2000). Effect of combination antiretroviral therapy on T-cell immunity in acute human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Infect Dis*, 181:121-31.
  101. Mansky, L.M., Temin, H.M. (1995). Lower in vivo mutation rate of human immunodeficiency virus type 1 than that predicted from the fidelity of purified reverse transcriptase. *J Virol*, 69:5087-94.

102. Marthas, M.L., Ramos, R.A., Lohman, B.L., Van Rompay, K.K., Unger, R.E., Miller, C.J., et al. (1993). Viral determinants of simian immunodeficiency virus (SIV) virulence in rhesus macaques assessed by using attenuated and pathogenic molecular clones of SIVmac. *J Virol*, 67:6047-55.
103. Marx, P.A., Chen, Z. (1998). The function of simian chemokine receptors in the replication of SIV. *Semin Immunol*, 10:215-23.
104. Mattapallil, J.J., Douek, D.C., Hill, B., Nishimura, Y., Martin, M., Roederer, M. (2005). Massive infection and loss of memory CD4<sup>+</sup> T cells in multiple tissues during acute SIV infection. *Nature*, 434:1093-7.
105. McClure, H.M., Anderson, D.C., Fultz, P.N., Ansari, A.A., Lockwood, E., Brodie, A. (1989). Spectrum of disease in macaque monkeys chronically infected with SIV/SMM. *Vet Immunol Immunopathol*, 21:13-24.
106. McKnight, A., Dittmar, M.T., Moniz-Periera, J., Ariyoshi, K., Reeves, J.D., Hibbitts, S., et al. (1998). A broad range of chemokine receptors are used by primary isolates of human immunodeficiency virus type 2 as coreceptors with CD4. *J Virol*, 72:4065-71.
107. Mellors, J.W., Rinaldo, C.R.Jr., Gupta, P., White, R.M., Todd, J.A., Kingsley, L.A. (1996). Prognosis in HIV-1 infection predicted by the quantity of virus in plasma. *Science*, 272:1167-70.
108. Moir, S., Malaspina, A., Li, Y., Chun, T.W., Lowe, T., Adelsberger, J., et al. (2000). B cells of HIV-1-infected patients bind virions through CD21-complement interactions and transmit infectious virus to activated T cells. *J Exp Med*, 192:637-46.
109. Montero, M., van Houten, N.E., Wang, X., Scott, J.K. (2008). The membrane-proximal external region of the human immunodeficiency virus type 1 envelope: dominant site of antibody neutralization and target for vaccine design. *Microbiol Mol Biol Rev*, 72:54-84.
110. Morner, A., Bjorndal, A., Albert, J., Kewalramani, V.N., Littman, D.R., Inoue, R., et al. (1999). Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates, like HIV-1 isolates, frequently use CCR5 but show promiscuity in coreceptor usage. *J Virol*, 73:2343-9.
111. Nahmias, A.J., Weiss, J., Yao, X., Lee, F., Kodzi, R., Schanfield, M., et al. (1986). Evidence for human infection with an HTLV III/LAV-like virus in Central Africa, 1959. *Lancet*, 1:1279-80.
112. Notermans, D.W., de Jong, J.J., Goudsmit, J., Bakker, M., Roos, M.T., Nijholt, L., et al (2001). Potent antiretroviral therapy initiates normalization of hypergammaglobulinemia and a decline in HIV type 1-specific antibody responses. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 17:1003-8.
113. Novembre, F.J., Saucier, M., Anderson, D.C., Klumpp, S.A., O'Neil, S.P., Brown, C.R.2nd, et al. (1997). Development of AIDS in a chimpanzee infected with human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 71:4086-91.

114. O'Gorman, M.R., DuChateau, B., Paniagua, M., Hunt, J., Bensen, N., Yogev, R. (2001). Abnormal CD40 ligand (CD154) expression in human immunodeficiency virus-infected children. *Clin Diagn Lab Immunol*, 8:1104-9.
115. Ostrowski, M.A., Yu, Q., Yue, F.Y., Liu, J., Jones, B., Gu, X.X., et al. (2006). Why can't the immune system control HIV-1? Defining HIV-1-specific CD4+ T cell immunity in order to develop strategies to enhance viral immunity. *Immunol Res*, 35:89-102.
116. Owen, S.M., Masciotra, S., Novembre, F., Yee, J., Switzer, W.M., Ostyula, M., Lal, R.B. (2000). Simian immunodeficiency viruses of diverse origin can use CXCR4 as a coreceptor for entry into human cells. *J Virol*, 74:5702-8.
117. Ozkaya, G. (2006). [The adventure of human immunodeficiency virus: from where to where?]. *Mikrobiyol Bul*, 40:435-43.
118. Pantophlet, R., Wilson, I.A., Burton, D.R. (2003). Hyperglycosylated mutants of human immunodeficiency virus (HIV) type 1 monomeric gp120 as novel antigens for HIV vaccine design. *J Virol*, 77:5889-901.
119. Perelson, A.S., Neumann, A.U., Markowitz, M., Leonard, J.M., Ho, D.D. (1996). HIV-1 dynamics in vivo: virion clearance rate, infected cell life-span, and viral generation time. *Science*, 271:1582-6.
120. Piacentini, L., Fenizia, C., Naddeo, V., Clerici, M. (2008). Not just sheer luck! Immune correlates of protection against HIV-1 infection. *Vaccine*, 26:3002-7.
121. Piatak, M. Jr., Saag, M.S., Yang, L.C., Clark, S.J., Kappes, J.C., Luk, K.C., et al. (1993). High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*, 259:1749-54.
122. Ping, L.H., Nelson, J.A., Hoffman, I.F., Schock, J., Lamers, S.L., Goodman, M., et al. (1999). Characterization of V3 sequence heterogeneity in subtype C human immunodeficiency virus type 1 isolates from Malawi: underrepresentation of X4 variants. *J Virol*, 73:6271-81.
123. Plantier, J.C., Leoz, M., Dickerson, J.E., De Oliveira, F., Cordonnier, F., Leme, V., et al. (2009). A new human immunodeficiency virus derived from gorillas. *Nat Med*, 15:871-2.
124. Pope, M., Haase, A.T. (2003). Transmission, acute HIV-1 infection and the quest for strategies to prevent infection. *Nat Med*, 9:847-52.
125. Putkonen, P., Kaaya, E.E., Bottiger, D., Li, S.L., Nilsson, C., Biberfeld, P., Biberfeld, G. (1992). Clinical features and predictive markers of disease progression in cynomolgus monkeys experimentally infected with simian immunodeficiency virus. *AIDS*, 6:257-63.
126. Putkonen, P., Warstedt, K., Thorstensson, R., Benthin, R., Albert, J., Lundgren, B., et al. (1989). Experimental infection of cynomolgus monkeys (*Macaca fascicularis*) with simian immunodeficiency virus (SIVsm). *J Acquir Immune Defic Syndr*, 2:359-65.

127. Quakkelaar, E.D., Beaumont, T., van Nuenen, A.C., van Alphen, F.P., Boeser-Nunnink, B.D., van 't Wout, A.B., Schuitemaker, H. (2007). T cell line passage can select for pre-existing neutralization-sensitive variants from the quasispecies of primary human immunodeficiency virus type-1 isolates. *Virology*, 359:92-104.
128. Reeves, J. D., Hibbitts, S., Simmons, G., McKnight, A., Azevedo-Pereira, J.M., Moniz-Pereira, J., Clapham, P.R. (1999). Primary human immunodeficiency virus type 2 (HIV-2) isolates infect CD4-negative cells via CCR5 and CXCR4: comparison with HIV-1 and simian immunodeficiency virus and relevance to cell tropism in vivo. *J Virol*, 73:7795-804.
129. Repits, J., Oberg, M., Esbjornsson, J., Medstrand, P., Karlsson, A., Albert, J., et al. (2005). Selection of human immunodeficiency virus type 1 R5 variants with augmented replicative capacity and reduced sensitivity to entry inhibitors during severe immunodeficiency. *J Gen Virol*, 86:2859-69.
130. Repits, J., Sterjovski, J., Badia-Martinez, D., Mild, M., Gray, L., Churchill, M.J., et al. (2008). Primary HIV-1 R5 isolates from end-stage disease display enhanced viral fitness in parallel with increased gp120 net charge. *Virology*, 379:125-34.
131. Resh, M.D. (2005). Intracellular trafficking of HIV-1 Gag: how Gag interacts with cell membranes and makes viral particles. *AIDS Rev*, 7:84-91.
132. Rollins, B.J. (1997). Chemokines. *Blood*, 90:909-28.
133. Roux, K.H., Taylor, K.A. (2007). AIDS virus envelope spike structure. *Curr Opin Struct Biol*, 17:244-52.
134. Rucker, J., Edinger, A.L., Sharron, M., Samson, M., Lee, B., Berson, J.F., et al. (1997). Utilization of chemokine receptors, orphan receptors, and herpesvirus-encoded receptors by diverse human and simian immunodeficiency viruses. *J Virol*, 71:8999-9007.
135. Sanders, R.W., Schiffner, L., Master, A., Kajumo, F., Guo, Y., Dragic, T., et al. (2000). Variable-loop-deleted variants of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein can be stabilized by an intermolecular disulfide bond between the gp120 and gp41 subunits. *J Virol*, 74:5091-100.
136. Sather, D.N., Armann, J., Ching, L.K., Mavrantoni, A., Sellhorn, G., Caldwell, Z., et al. (2009). Factors associated with the development of cross-reactive neutralizing antibodies during human immunodeficiency virus type 1 infection. *J Virol*, 83:757-69.
137. Scanlan, C.N., Offer, J., Zitzmann, N., Dwek, R.A. (2007). Exploiting the defensive sugars of HIV-1 for drug and vaccine design. *Nature*, 446:1038-45.
138. Shannon, K.M., Ammann, A.J. (1985). Acquired immune deficiency syndrome in childhood. *J Pediatr*, 106:332-42.
139. Shibata, R., Igarashi, T., Haigwood, N., Buckler-White, A., Ogert, R., Ross, W., et al. (1999). Neutralizing antibody directed against the HIV-1 envelope glycoprotein can completely block HIV-1/SIV chimeric virus infections of macaque monkeys. *Nat Med*, 5:204-10.



140. Shimizu, N., Soda, Y., Kanbe, K., Liu, H.Y., Jinno, A., Kitamura, T., Hoshino, H. (1999). An orphan G protein-coupled receptor, GPR1, acts as a coreceptor to allow replication of human immunodeficiency virus types 1 and 2 in brain-derived cells. *J Virol*, 73:5231-9.
141. Simek, M.D., Rida, W., Priddy, F.H., Pung, P., Carrow, E., Laufer, D.S., et al (2009). Human immunodeficiency virus type 1 elite neutralizers: individuals with broad and potent neutralizing activity identified by using a high-throughput neutralization assay together with an analytical selection algorithm. *J Virol*, 83:7337-48.
142. Simmonds, P., Balfe, P., Ludlam, C.A., Bishop, J.O., Brown, A.J. (1990). Analysis of sequence diversity in hypervariable regions of the external glycoprotein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol*, 64:5840-50.
143. Srivastava, I.K., Stamatatos, L., Kan, E., Vajdy, M., Lian, Y., Hilt, S., et al. (2003). Purification, characterization, and immunogenicity of a soluble trimeric envelope protein containing a partial deletion of the V2 loop derived from SF162, an R5-tropic human immunodeficiency virus type 1 isolate. *J Virol*, 77:11244-59.
144. Stamatatos, L., Morris, L., Burton, D.R., Mascola, J.R. (2009). Neutralizing antibodies generated during natural HIV-1 infection: good news for an HIV-1 vaccine? *Nat Med*, 15:866-70.
145. Steckbeck, J.D., Orlov, I., Chow, A., Grieser, H., Miller, K., Bruno, J., et al. (2005). Kinetic rates of antibody binding correlate with neutralization sensitivity of variant simian immunodeficiency virus strains. *J Virol*, 79:12311-20.
146. Stramer, S.L., Heller, J.S., Coombs, R.W., Parry, J.V., Ho, D.D., Allain, J.P. (1989). Markers of HIV infection prior to IgG antibody seropositivity. *JAMA*, 262:64-9.
147. Temin, H.M., Mizutani, S. (1970). RNA-dependent DNA polymerase in virions of Rous sarcoma virus. *Nature*, 226:1211-3.
148. Ten Haaft, P., Verstrepen, B., Uberla, K., Rosenwirth, B., Heeney, J. (1998). A pathogenic threshold of virus load defined in simian immunodeficiency virus- or simian-human immunodeficiency virus-infected macaques. *J Virol*, 72:10281-5.
149. Titanji, K., Nilsson, A., Morch, C., Samuelsson, A., Sonnerborg, A., Grutzmeier, S., et al. (2003). Low frequency of plasma nerve-growth factor detection is associated with death of memory B lymphocytes in HIV-1 infection. *Clin Exp Immunol*, 132:297-303.
150. Trkola, A., Dragic, T., Arthos, J., Binley, J.M., Olson, W.C., Allaway, G.P., et al. (1996). CD4-dependent, antibody-sensitive interactions between HIV-1 and its co-receptor CCR-5. *Nature*, 384:184-7.
151. Trkola, A., Kuster, H., Rusert, P., Joos, B., Fischer, M., Leemann, C., et al. (2005). Delay of HIV-1 rebound after cessation of antiretroviral therapy

- through passive transfer of human neutralizing antibodies. *Nat Med*, 11:615-22.
152. Vodros, D., Thorstensson, R., Doms, R.W., Fenyo, E.M., Reeves, J.D. (2003). Evolution of coreceptor use and CD4-independence in envelope clones derived from SIVsm-infected macaques. *Virology*, 316:17-28.
  153. Vzorov, A.N., Gernert, K.M., Compans, R.W. (2005). Multiple domains of the SIV Env protein determine virus replication efficiency and neutralization sensitivity. *Virology*, 332:89-101.
  154. Walker, L.M., Phogat, S.K., Chan-Hui, P.Y., Wagner, D., Phung, P., Goss, J.L., et al (2009). Broad and potent neutralizing antibodies from an African donor reveal a new HIV-1 vaccine target. *Science*, 326:285-9.
  155. Whittle, H.C., Ariyoshi, K., Rowland-Jones, S. (1998). HIV-2 and T cell recognition. *Curr Opin Immunol*, 10:382-7.
  156. Wolthers, K.C., Otto, S.A., Lens, S.M., Van Lier, R.A., Miedema, F., Meyaard, L. (1997). Functional B cell abnormalities in HIV type 1 infection: role of CD40L and CD70. *AIDS Res Hum Retroviruses*, 13:1023-9.
  157. Worobey, M., Gemmel, M., Teuwen, D.E., Haselkorn, T., Kunstman, K., Bunce, M., et al (2008). Direct evidence of extensive diversity of HIV-1 in Kinshasa by 1960. *Nature*, 455:661-4.
  158. Yuste, E., Johnson, W., Pavlakis, G.N., Desrosiers, R.C. (2005). Virion envelope content, infectivity, and neutralization sensitivity of simian immunodeficiency virus. *J Virol*, 79:12455-63.
  159. Zerhouni, B., Nelson, J.A., Saha, K. (2004). Isolation of CD4-independent primary human immunodeficiency virus type 1 isolates that are syncytium inducing and acutely cytopathic for CD8+ lymphocytes. *J Virol*, 78:1243-55.
  160. Zwick, M.B., Saphire, E.O., Burton, D.R. (2004). gp41: HIV's shy protein. *Nat Med*, 10:133-4.