

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

**SİSTEİN TÜREVLERİNİN TAT (TRANSKRİPSİYON
TRANSAKTİVATÖRÜ) AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Başak ÖKDEM**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN**

**Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Eylül 2008
KAYSERİ**

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

**SİSTEİN TÜREVLERİNİN TAT (TRANSKRİPSİYON
TRANSAKTİVATÖRÜ) AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN
ARAŞTIRILMASI**

**Tezi Hazırlayan
Başak ÖKDEM**

**Tezi Yöneten
Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN**

**Eczacılık Biyokimya Anabilim Dalı
Yüksek Lisans Tezi**

**Bu çalışma Erciyes Üniversitesi Araştırma Fonu tarafından TSY-07-171 nolu
proje ile desteklenmiştir.**

**Eylül 2008
KAYSERİ**

II

Prof.Dr.İlhan DEMİRHAN danışmanlığında **Başak ÖKDEM** tarafından hazırlanan “**Sistein Türevlerinin Tat (Transkripsiyon Transaktivatörü) Aktivitesi Üzerindeki Etkilerinin Araştırılması**” konulu çalışma jürimiz tarafından Erciyes Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü **Eczacılık Biyokimya** Anabilim Dalı’nda **Yüksek Lisans** tezi olarak kabul edilmiştir.

05 / 09 / 2008

JÜRİ

İmza

Başkan : Prof. Dr. İlhan DEMİRHAN (Danışman)

Üye : Prof. Dr. Sabahattin MUHTAROĞLU

Üye : Yrd.Doç.Dr. Behzat ÇİMEN

ONAY

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

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

Enstitü Müdürü
Prof. Dr. Meral AŞÇIOĞLU

TEŞEKKÜR

Tez çalışmalarım sırasında benden bilgi ve tecrübelerini esirgemeyen, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli danışmanım Prof.Dr. İlhan Demirhan'a içten teşekkürlerimi sunarım.

Çalışmalarımda her zaman yanımda olan ve benden hiçbir emeğini esirgemeyen çalışma arkadaşım Arş.Gör.Canan Aslan'a,

Çalışmalarım sırasında bilimsel ve manevi desteğini esirgemeyen Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Farmakoloji Anabilim Dalı Başkanı M. Betül Aycan'a, manevi desteklerinden dolayı Farmasötik Mikrobiyoloji ve Analitik Kimya Anabilim Dalı Öğretim Üyeleri'ne,

Ve her zaman yanımda olan, benden maddi-manevi hiçbir desteğini esirgemeyen sevgili aileme ve eşime sonsuz teşekkürler.

SİSTEİN TÜREVLERİNİN TAT (TRANSKRİPSİYON TRANSAKTİVATÖRÜ) AKTİVİTESİ ÜZERİNDEKİ ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

ÖZET

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromunun (AIDS) temel etkenidir. AIDS 1981'de ilk olarak gözlemlendiğinden beri, dünyanın dört bir yanındaki değişik bölgelerde aralıksız olarak yayılmaktadır. Uygun tedavi yaklaşımı henüz bulunamamıştır.

HIV yapısal genlerin dışında regülatör genleri taşır. Bunlardan en önemlisi transkripsiyon transaktivatörüdür. Tat-protein, virüsün yapısal proteinlerinin ekspresyonunu sağlar. Ayrıca virüsün patolojik etkisinde önemli bir yer teşkil eder. Bu nedenle Tat fonksiyonunun bloke edilmesi veya Tat-proteininin ekspresyonunun durdurulması, HIV replikasyonunun inhibe edilmesine ve virüsün patolojik etkilerinin en aza indirilmesine yol açacaktır.

Bu çalışmada, Tat-proteininin fonksiyonunu durduracak sistein türevleri denenmiştir. Bu maddelerin Tat-proteini aktivitesi üzerine etkileri hücre kültüründe araştırılmıştır. Bu araştırmalarda Jurkat hücreleri kullanılmıştır. Jurkat hücreleri iki farklı plazmit ile transfekte edilmiştir. Plazmitlerin kaliteleri agaroz jel elektroforezi ile test edilip görüntülenmiştir. Transfeksiyon yapılan hücrelerde inhibitörler ilk olarak tek dozda (50 µg/ml) denenmiş ve hücrelerde CAT ELISA kiti ile CAT (Kloramfenikol Asetil Transferaz) ekspresyonu tesbit edilmiştir. Bu dozda inhibisyon oluşturan inhibitörlerin dozları artırılarak (50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml) tekrar denenmiştir.

50 µg/ml dozda inhibisyon gözlenen aminoasit türevleri, L-sistein metil ester hidroklorid ve L-sistein S-sülfat'tır. Bu dizilerde inhibisyon olduğu ancak bu inhibisyonun doza bağımlı olmadığı, L-sistein metil ester hidroklorid'in CAT aktivasyonunu en iyi inhibe ettiği dozun 75 µg/ml, L-sistein S-sülfat'ın CAT aktivasyonunu en iyi inhibe ettiği dozun ise 50 µg/ml olduğu saptanmıştır.

Sonuç olarak, "L-sistein metil ester hidroklorid" ve "L-sistein S-sülfat" aminoasit türevlerinin, HIV 'in replikasyonunu aktive eden Tat üzerinde inhibe edici etkilerinin olduğu bu çalışma ile gösterilmiştir. Çalışma bu nedenle HIV'e karşı geliştirilecek inhibitörler açısından oldukça önemlidir.

Anahtar Kelimeler: AIDS, HIV, Tat-protein, Sistein türevleri

**INVESTIGATION OF THE EFFECTS OF CYSTEINE DERIVATIVES ON TAT
(TRANSACTIVATOR OF TRANSCRIPTION) ACTIVITY**

ABSTRACT

Human immunodeficiency virus (HIV) is the main factor of acquired immuno deficiency syndrome (AIDS). Since the world first became aware of AIDS in 1981, the disease is spreading continuously in various regions around the globe. Appropriate treatment approaches still have not been discovered.

HIV contain the genes namely regulator genes, in addition to the structural ones. The most crucial regulator gene is transactivator of transcription. Tat-protein provides the expression of the structural proteins. Besides that function, it has important roles in the pathogenesis of the virus. For this reason, blocking the Tat function or the expression of this protein would inhibit the replication of the HIV and reduce the pathological effects of the HIV.

In this project, cysteine derivatives that could inhibit the function of this Tat-protein were tried. The effects of this substances on the activity of Tat-protein were investigated in cell cultures. In this study we used the Jurkat cells. The Jurkat cells were transfected by two different plasmids. The qualities of the plasmids were monitorized and tested on agarose jel. In the transfected cells, the inhibitors were initially tried in one dose (50 µg/ml) and the CAT (Chloramphenicol Acetyl Transferase) expressions were analyzed by the help of CAT ELISA kit. The inhibitors that were decided to be effective in this dose, were then prepared in three different doses (50 µg/ml, 75 µg/ml, 100 µg/ml).

The amino acid sequences that has inhibitor effects in 50 µg/ml dose were L-cysteine methyl ester hydrochloride and L-cysteine S-sulphate and their inhibition were not dose dependent. The best inhibitor dose of the L-cysteine methyl ester hydrochloride on CAT expression was 75 µg/ml and it was 50 µg/ml for the L-cysteine S-sulphate.

In conclusion, it was shown that, the inhibitor effects of amino acid derivatives "L-cysteine methyl ester hydrochloride" and "L-cysteine S-sulphate" have inhibitor activity on the Tat, which activate the HIV replication were shown in this study. Therefore, this study is very important from the point of development of new inhibitors for HIV infection.

Key words: AIDS, HIV, TAT-protein, cysteine derivatives

İÇİNDEKİLER

	<u>Sayfa No</u>
İÇ KAPAK	I
KABUL VE ONAY SAYFASI	II
TEŞEKKÜR	III
ÖZET	IV
ABSTRACT	V
İÇİNDEKİLER	VI
TABLO, ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ	VIII
KISALTMALAR	IX
1. GİRİŞ VE AMAÇ	1
2. GENEL BİLGİLER	3
2.1. RETROVİRÜSLER.....	3
2.1.1. Tarihçe.....	4
2.2. HIV VE AIDS.....	4
2.2.1. Tarihçe.....	4
2.2.2. HIV Tip ve Alt tipleri.....	5
2.2.3. HIV Virion Yapısı	5
2.2.4. HIV Genom Yapısı.....	6
2.2.4.1. LTR Promotor.....	7
2.2.4.2. Yapısal Proteinler.....	7
2.2.4.3. Regülatör (Düzenleyici) Proteinler.....	9
2.2.4.4. Yardımcı Genler (Aksesuar genler).....	10
2.2.5. HIV'in Replikasyonu	10
2.2.6. Epidemiyoloji	12
2.2.7. Klinik Belirti ve Bulgular	12
2.2.8. Patogenez ve İmmünite.....	13
2.2.9. HIV Enfeksiyonu Bulaşma Yolları ve Korunma.....	14
2.2.10. Tedavi.....	15

VII

	<u>Sayfa No</u>
3. GEREÇ VE YÖNTEM	18
3.1. PLAZMİTLER.....	18
3.1.1. Plazmit İzolasyonu.....	20
3.1.2. Plazmit DNA Saflık ve Miktar Tayini.....	21
3.1.3. Agaroz Jel Elektrofrezisi.....	22
3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ	25
3.3. DEAE-DEXTRAN YÖNTEMİ İLE TRANSFEKSİYON	27
3.4. KULLANILAN SİSTEİN TÜREVİ AMİNOASİTLER.....	28
3.5. TRYPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ (SİTOTOKSİSİTE TESTİ).....	29
4. BULGULAR.....	30
4.1. AGAROSUZ JEL ELEKTROFOREZİ BULGULARI.....	30
4.2. FARKLI SİSTEİN TÜREVLERİNİN ETKİLERİ.....	31
4.3. L-SİSTEİN METİL ESTER HİDROKLORİD'İN ARTAN DOZLARDAKİ ETKİSİ.....	33
4.4. L-SİSTEİN S-SÜLFAT'IN ARTAN DOZLARDAKİ ETKİSİ.....	34
4.5. TRYPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ (SİTOTOKSİSİTE TESTİ).....	34
5. TARTIŞMA VE SONUÇ.....	36
6. KAYNAKLAR	42
ÖZGEÇMİŞ	

VIII

TABLO, ŞEKİL VE GRAFİK LİSTESİ

	<u>Sayfa No</u>
Tablo 3.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler.....	20
Tablo 3.2. Tris EDTA Tamponu.....	20
Tablo 3.3. Tris Asetat EDTA Tamponu.....	22
Tablo 3.4. 6X Yükleme Tamponu.....	22
Tablo 3.5. EcoRI ve PstI enzimleri kesim noktaları ve parçalama reaksiyonu kurma oranları.....	23
Tablo 3.6. HindIII, BamHI ve HindIII+BamHI RE enzimleri kesim noktaları ve parçalama reaksiyonu kurma oranları.....	24
Tablo 3.7. DNA Ladder Mix içeriği	24
Tablo 3.8. Hücre kültürü besiyeri	26
Tablo 3.9. PBS tamponu	26
Tablo 3.10. Krio çözeltisi	26
Tablo 3.11. DNA transfeksiyon çözeltisi	27
Tablo 3.12. Kullanılan sistein türevi aminoasitler	28
Tablo 4.1. 48 saat inkübasyon sonunda 1 ml’de tesbit edilen hücre sayıları	35
Şekil 2.1. HIV’in şematik yapısı.....	6
Şekil 2.2. HIV genom yapısı.....	6
Şekil 2.3. Tat	10
Şekil 3.1. pCV plazmit, SV40-ori, Adenovirüs büyük geç promotörü	19
Şekil 3.2. pC15CAT plazmit; C-15 DNA-Klon (HIV-1 LTR).....	20
Şekil 4.1. pC15 CAT ve pCV1 plazmitlerinin agaroz jel elektroforezi fotoğrafı.....	30
Grafik 4.1. İnhibitörlerin 50µg/ml’lik tek dozda etkileri	32
Grafik 4.2. L-sistein metil ester hidroklorid’in artan dozlardaki etkisi	33
Grafik 4.3. L-sistein S-sülfat’ın artan dozlardaki etkisi	34

IX

KISALTMALAR

AIDS	: Acquired Immuno Deficiency Syndrome
ADCC	: Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity
ARC	: AIDS Related Complex
CAT	: Chloramphenicol Acetyl Transferase
DMSO	: Dimetilsülfoksit
EDTA	: Etilendiamintetraasetik Asit
EtBr	: Etidyum bromür
FBS	: Fetal Bovin Sera
gag, pol, env	: HIV virüsü yapısal genler
HIV	: Human Immunodeficiency Virus
HTLV	: Human T-Lymphotropic Virus
HAART	: Highly Active Anti-Retroviral Therapy
LAV	: Lymphadenopathy Assasiated Virus
LTR	: Long Terminal Repeat
nef, vif, vpr, vpu	: HIV virüsü aksesuar genler
PBS	: Fosfat Buffer Saline
PCP	: Pneumocystis Carini Pnömonisi
RE	: Restriksiyon Endonükleaz
RSV	: Rous Sarcoma Virüs
RT	: Revers Transkriptaz
TAE tamponu	: Tris Asetat EDTA
tat, rev	: HIV düzenleyici (regülatör) genler
TCGF	: T Cell Growth Factor
TE	: Tris-EDTA Tamponu

1. GİRİŞ VE AMAÇ

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV), kazanılmış bağışıklık yetmezliği sendromunun (AIDS) etkenidir. Retroviridae ailesinden Lentivirinae alt ailesinde yer alır.

HIV; *gag*, *pol*, *env* yapısal genlerinin dışında, “regülatör genler” olarak isimlendirilen düzenleyici genleri de içerir. Düzenleyici genlerden en önemlileri *tat* ve *rev* genleridir. Bu genlerin ürettikleri proteinler HIV’in replikasyonunu kontrol ederler. Tat-protein ayrıca, CD4+ hücrelerinin yok olmasından ve HIV’in diğer patolojik etkilerinin ortaya çıkmasından da sorumludur. Bu yönüyle, Tat-proteini yeni anti-HIV etkili bileşiklerin geliştirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Tat-proteinini inhibe eden bileşiklerle HIV’in replikasyonu engellenebileceğinden, AIDS tedavisinde yeni bir yol açabilme şansı doğacaktır.

Tat-proteini peptit zincirinin 22. ve 37. aminoasitleri arasında yedi adet sistein bulunmaktadır. Bu bölge metal iyonlar ile bağ oluşturarak proteinin aktivitesini sağlar. Tat-proteinin aktivitesini bloke edebilmek için metal iyonlarıyla veya sisteinler ile bağ kurabilecek kimyasal maddelerin kullanılması inhibisyonu sağlamada önemlidir.

Günümüzde HIV tedavisinde uygulanan en etkili yöntem HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) denilen kombinasyon tedavisidir. Bu tedavide kullanılan ilaçlar, revers-transkriptaz ve proteaz inhibitörlerini içerir. Böylece hem HIV genomunun DNA'ya kopyalanması ve dolayısıyla hücre genomuna entegre olması, hem de yeni oluşan virüsün olgunlaşarak enfeksiyon yapıcı duruma gelmesi inhibe edilebilmektedir.

Fakat bu kombinasyon tedavisi kesildiğinde, hücre genomuna entegre olmuş virüs genomu tekrar aktif duruma gelmekte ve HIV replikasyonu tekrar başlamaktadır. Bu nedenle etkili bir tedavi yöntemi geliştirebilmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır.

Bu çalışmada, sistein türevlerinin AIDS oluşmasından sorumlu olan HIV'in replikasyonunu sağlayan Tat-proteini aktivitesi üzerindeki etkilerinin araştırılması amaçlanmıştır.

Bu araştırmaların yürütülebilmesi için kullanılacak Jurkat hücreleri devamlı kültürde tutulmuştur. Oluşturulan plazmidler ile bakterilerin transformasyonu, plazmidlerin amplifikasyonu ve arındırılması sağlanmıştır. DEAE-Dextran yöntemi ile transfeksiyon yapılmıştır. Son olarak da sistein türevlerinin toksisite testleri yapılmıştır.

2. GENEL BİLGİLER

2.1.RETROVİRÜSLER

Retrovirüsler, reverz transkriptaz içeren, zarflı, (+) sarmallı RNA virüsleridir.

Bu grupta bulunan virüslerin ilgi çeken en önemli özelliği insan ve hayvanlarda yaptıkları hastalıklar ve replikasyon şekilleridir. Retrovirus grubunda hayvanlarda kesin olarak kanser oluşturduğu kanıtlanmış bazı virüs gruplarının yanı sıra, insan retrovirusları da yer almaktadır. İnsanlarda kazanılmış immün yetmezlik sendromu (Acquired immunodeficiency syndrome:AIDS) etkeni olan HIV grubun onkojenik olmayan bir üyesidir (1).

Retrovirüslerin üç alt ailesi Onkornavirus, Lentivirus ve Spumavirus'dür. Onkornaviruslar içinde hastalık yaptığı gösterilen virüsler HTLV-1, HTLV-2'dir. Lentivirus alt ailesi içinde HIV-1 ve HIV-2 vardır. Spumaviruslar ilk izole edilen retrovirüsler olmakla birlikte insanlarda hastalık oluşturdukları gözlenmemiştir (2).

Retrovirüsleri diğer virüslerden ayıran en önemli özellik genetik bilgi akışını tersine çevirerek RNA'dan DNA sentezlemeleridir. Bu virüsler, 80-110 nm çapında, lipid zarflı, ikosahedral simetrik iç çekirdeğe ve sarmal simetrik bir nükleokapsit yapısına sahiptirler (3).

2.1.1.Tarihçe

İlk retrovirüs, Rous sarcoma virüs (RSV) olup, Peyton Rous tarafından tavuklarda solid tümör (sarkom) oluşturduğu gösterilmiştir. Bunu kanser oluşturan ve RNA tümör virüsleri ya da onkornavirüsler olarak adlandırılan virüslerin farklı hayvan türlerinden izolasyonu izlemiştir.

İnterlökin-2 (IL-2) olarak bilinen T hücre büyüme faktörü (T Cell Growth Factor, TCGF)'nin keşfi, insan T lenfositlerini uzun süre kültürde çoğaltma imkanı vermiş, ilk insan retrovirüsü HTLV (Human T-cell Leukemia/Lymphoma Virus)'nin keşfedilmesi için önemli bir vasıta olmuştur (4).

2.2. HIV VE AIDS

İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü (HIV), kazanılmış immün yetmezlik sendromu (AIDS)'in etkenidir.

2.2.1.Tarihçe

1981 yazında, New York ve California'daki çeşitli kliniklerde önceden sağlık problemi olmayan, genç homoseksüel erkekler arasında, özellikle Pneumocystis carinii pnömonisi (PCP) ve Kaposi sarkomu (KS) gibi nadir görülen fırsatçı enfeksiyonlarda anormal bir artış gözlenmiştir. Yapılan ilk epidemiyolojik çalışmalar, immün yetmezliğe neden olan etkenin kan transfüzyonu, intravenöz ilaç kullanımı ve seksüel yolla primer olarak bulaşabileceğini göstermiştir (5).

AIDS etkeni olan virüs, ilk defa 1983 yılında iki ayrı grup tarafından bağımsız olarak saptanmış ve etkene farklı isimler verilmiştir. Pasteur Enstitüsü'ndeki araştırmacılar genç bir eşcinsel erkekten retrovirus izole ederek hastada tipik bir lenfadenopatinin varlığı nedeniyle virüse "lenfadenopati ilişkili virüs (Lymphadenopathy Associated Virus:LAV)" adını verdiler. Daha sonra bu virüsün diğer insan retrovirusları gibi T-lenfositlerine tropizmi gözönüne alınarak "insan T lenfotropik virüsü (Human T Lymphotropic Virüs:HTLV)" adı verildi (6). İnsanlardan izole edilen diğer iki HTLV'den erişkin T hücre lösemisi yapan HTLV-I ve saçlı hücre (hairy celi) lösemisinden sorumlu HTLV-II'den sonra, AIDS etkeni olan virüse HTLV-III adı verildi. Ancak 1986 yılında Uluslararası Virüs Taksonomi Komitesi, AIDS etkeni olan bu retrovirüsü HTLV-III yerine, insan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus:HIV) olarak adlandırdı. Kuzey Amerika ve Avrupa'da yaygın

olan tip HIV-1 olarak adlandırılırken, Batı Afrika'da seropozitif asemptomatik bireylerden izole edilen yeni subtip HIV-2 adı verildi. HIV-2 daha sonraları Avrupa, Brezilya ve bazı Asya ülkelerinde de saptanmaya başlandı.

2.2.2.HIV Tip ve Alt tipleri

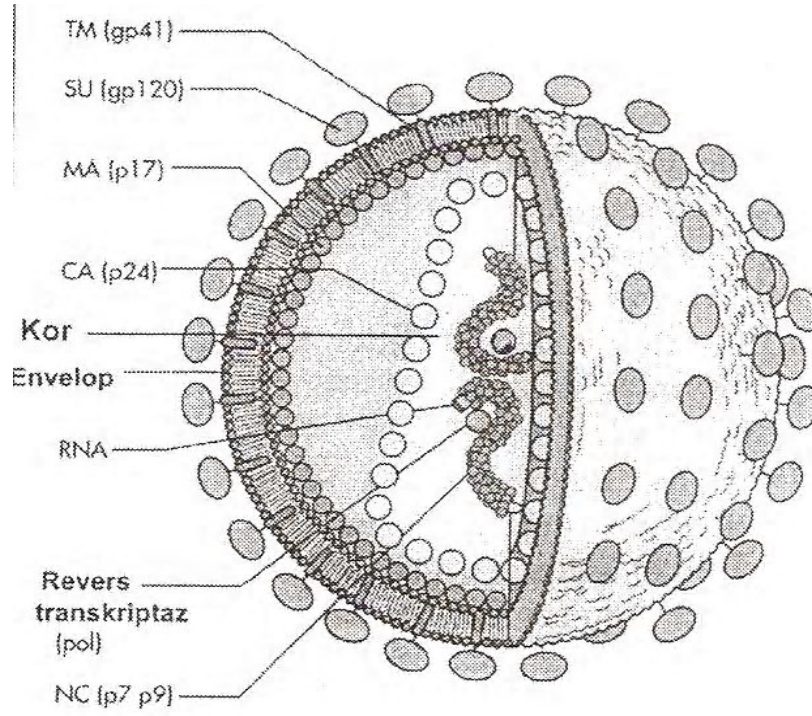
Sitopatik etkiye sahip bir retrovirüs olan HIV'in, HIV-1 ve HIV-2 olmak üzere iki ayrı tipi vardır.

HIV-1 ve HIV-2 suşlarının birçok yapısal ve biyolojik karakterleri benzer olmasına karşın bazı farklılıklar da mevcuttur. Örneğin, HIV-2 HIV-1'e göre seksüel yolla üç defa, vertikal yolla on defa daha az bulaşma olasılığına sahiptir. HIV-2 de HIV-1 gibi insan immün sistemini baskılayarak hastalık oluşturmaya rağmen, infekte olan bireylerde saptanan kandaki serbest virüs miktarı (viral load), HIV-1 ile infekte bireylerden daha azdır. HIV-1 ve HIV-2 serolojik yöntemlerle ve moleküler yapı olarak kolayca ayrılabilirler. Her iki virüsün yapısal proteinleri arasında çapraz reaksiyon mevcuttur (1,7).

HIV; M (Major), N (New) ve O (Outlier) olmak üzere üç gruba ayrılır. İnsanlarda AIDS yapan virüsler homojen bir grup oluşturmazlar, özellikle HIV-1'in birçok varyantları saptanmıştır. HIV "env" geni dizilerine göre alt tiplere ayrılmıştır. Buna göre HIV-1'in 9 alt tipi (A-I), HIV-2'nin 5 alt tipi (A-E) saptanmıştır. HIV-1 ve HIV-2 arasında yapılan nükleotid analiz kıyaslanmasında %40 genom benzerliği saptanmıştır (1,8).

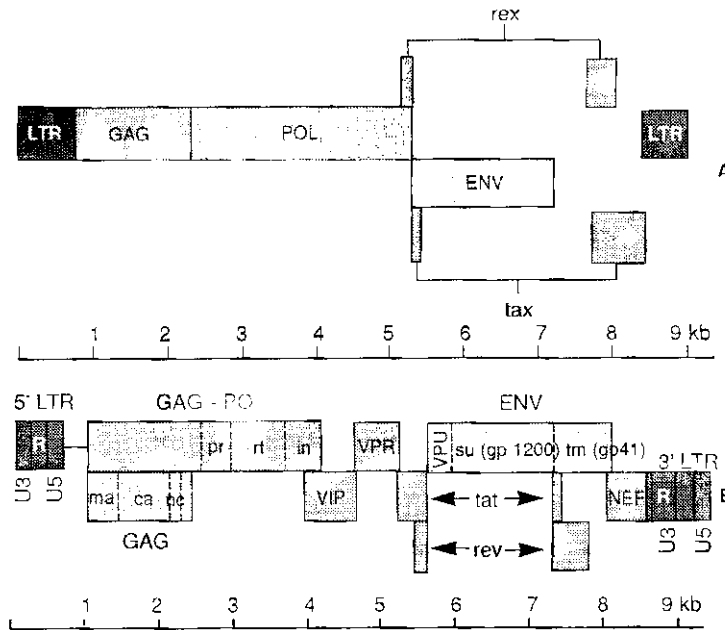
2.2.3. HIV Virion Yapısı

HIV 110 nm çapında sferik, koni şekilli nükleokapsidin lipitten yapılmış iki tabakalı zarfla çevrildiği bir virüsdür. Virion nükleokapsid yapısı 100 nm büyüklüğünde olup, ikozahedral bir yapı içerir. Tipik bir retrovirus olan HIV enfeksiyöz virion yapısı pozitif polariteli iki adet birbirinin aynı olan tek iplikli RNA içerir yani diploiddir. Zarf üzerinde uzantılar yer alır (Şekil 2.1.). Bu uzantılar iki glikoproteinden oluşur. Bunlara gp120 ve gp41 adı verilir. gp41 iki tabakalı lipit içinde yer alan transmembran glikoproteindir. gp120 ise gp41'e bağlıdır ve virüsün yüzeyinde yer alır. Ana fonksiyonu uygun hücre yüzeyi reseptörlerini taşıyan hücreleri bağlamaktır (9,10).



Şekil 2.1. HIV'in şematik yapısı (2)

2.2.4. HIV Genom Yapısı



Şekil 2.2. HIV genom yapısı (A:HTLV-1, B: HIV-1) (8)

HIV genomunda birçok gen mevcut olup *gag*, *pol* ve *env* yapısal genler, *tat* ve *rev* regülatör genler, *vpu*, *vpr*, *vif* ve *nef* aksesuar genlerdir. HIV genom yapısı Şekil 2.2'de gösterilmiştir.

2.2.4.1. LTR Promotor

Viral genomun her iki ucunda promotor/güçlendirici (enhancer) aktiviteye sahip LTR (Long Terminal Repeat) sekanları yer alır. Ayrıca bu bölge hücre transkripsiyon faktörleri için bağlanma dizileri içerir.

LTR üç fonksiyonel bölgeden oluşur. Bu bölgeler 5'-U3, R ve U5-3' olarak adlandırılır. 5' bölgesi transkripsiyonun başlama ve düzenlenmesinden, 3' bölgesi viral mRNA'ya poli A kuyruğunun eklenmesinden sorumludur. Transkripsiyon faktörleri ve regülatör elementler kompleks bir sırayla U3 bölgesine bağlanırlar. Transkripsiyon U3/R sınırından başlar ve R/U5 sınırında sonlanır (11).

2.2.4.2. Yapısal Proteinler

a) Gag: Gag-pol prekürsörü olgunlaşma sırasında matriks (MA:p17), kapsit (CA:p24), nükleokapsit (NC:p7) proteinlerine ve p1, p2, p6 ürünlerine parçalanırlar. Bütün bu proteinler virion morfogenezinde rol oynarlar.

MA (matriks) proteini virion nükleokapsidi ve zarfı arasındaki matriks'de yer alır. MA özellikle virionun hedef hücre membranına füzyonu ile penetrasyonunda rol oynamaktadır. CA (kapsid) proteini p24 olup hidrofobik özellik taşıyan kapsid yapı elemanıdır. CA özellikle viral morfogenezde virionun olgunlaşmasında aktif rol alır. NC (nükleokapsid) proteini bazik, hidrofilik bir protein olup en önemli fonksiyonu viral RNA'yı paketlemektir. Ayrıca virüsün konak hücreden olgunlaşmasında da önemli rol oynamaktadır (1).

b) Pol: *pol* geni, viral enzimleri kodlamaktadır. Bu enzimler PR (proteaz), RT (revers transkriptaz) ve IN (integraz) olup nükleokapsid içerisinde paketlenirler (12).

Proteaz (PR): 10 kDa molekül ağırlığına sahiptir ve dört antiparalel iplik içeren β -plaka yapısından oluşur. Viral olgunlaşma sırasında Gag ve Gag-Pol poli proteinlerinin prekürsörlerini bölerek olgunlaşmalarına katkı sağlar (13).

Revers transkriptaz: Revers transkriptaz tek iplikli viral RNA'nın çift iplikli linear DNA'ya çevrilmesi için önemli olan bir enzimdir. HIV-1 RT p66 ve p51 olmak üzere iki altbirimden oluşur. p 66'nın N-ucundaki 440 aminoasit polimeraz bölgesini oluşturur, C-ucundaki 120 aminoasit ise RNase H bölgesini oluşturur. HIV-1 RT'nin p51 alt birimi p66 alt biriminin polimeraz bölgesine benzemektedir (14). RT ayrıca replikasyon sırasında sentezlenen RNA: DNA hibridindeki RNA'yı parçalayan ribonükleaz aktivitesi (Rnase) içerir. RT ve Rnase H aktiviteleri HIV replikasyonu için gereklidir.

Integraz: İntegraz (IN) replikasyon sırasında oluşan çift iplikli proviral DNA'nın konak hücre genomuna birleştirilmesini (integrasyonunu) sağlar. IN'ın varlığı viral replikasyon için şarttır. İntegrazın ekzonükleaz aktivitesi, endonükleaz aktivitesi ve ligaz aktivitesi olmak üzere üç farklı görevi vardır (15).

c) Env: Zarf glikoproteini gp160 gp120 ile gp41 olmak üzere iki kısımdan oluşur.

Yüksek derecede glikozillenmiş olan gp 120, aynı zamanda yüzey glikoprotein ünitesi (surface:SU) olarak da bilinir. gp120, çok iyi çalışılmış ve yapısında 18 sistein sırası saptanmıştır. Bu sistein yapıları ile oluşan disülfid bağları gp 120'nin yapısında ve fonksiyonunda çok kritik bir rol oynamaktadır. Zira sisteinler arasındaki disülfid bağları 5 adet değişken (variable) domain oluşturmaktadır (V1, V2, V3, V4 ve V5). Zarf (env) geninde revers transkripsiyon sırasında oluşan bölgeye özgül mutasyonlar, gp120'nin değişik bölgelerinde CD4 reseptörüne bağlanmak için çok kısıtlı sayıda konsere bölgenin varlığını ortaya koymuştur. Özellikle çalışmalar gp120'de bulunan V3 bölgesinde (V3 loop'u) yoğunlaşmıştır. V3 epitopu 36 aminoasitten oluşmakta ve en fazla değişken bölgeyi temsil etmektedir. V3 loop'u hücrelere tutunma epitopu olarak bilinmektedir (13,16).

Transmembran proteini olan gp41, glikolizasyon için 4 bölge ve 3 sistein aminoasiti içermektedir. gp 41'in N-terminal bölgesi 20 aminoasitten oluşan hidrofobik bir yapıya sahiptir ve bu kısım füzyon peptidi olarak bilinir. Bu bölge virüsün hücre içerisine girişinde membranlar arası füzyon yapma özelliğine sahiptir (16).

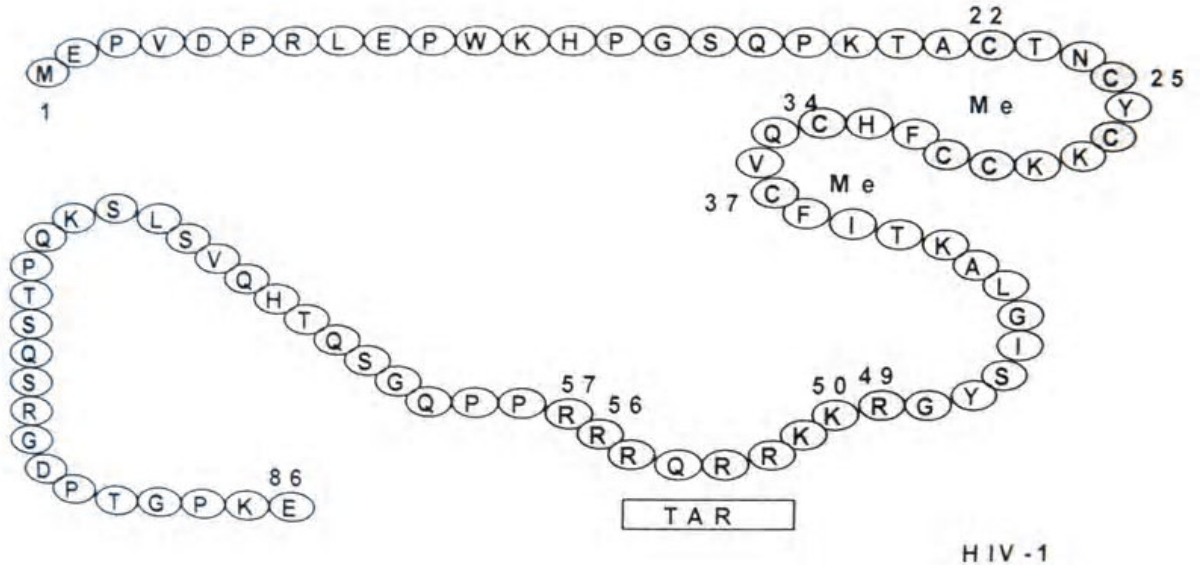
2.2.4.3. Regülatör (Düzenleyici) Proteinler

a)Rev: Rev proteini, virüsün yapısal proteinlerinin ekspresyonu için önemlidir. *rev* transkripsiyonun erken döneminde oluşturulan regülatör bir gendir. *env* geni üzerinde bulunan RNA dizi elementi Rev yanıt elementi (Rev Response Element, RRE) ile etkileşerek viral mRNA' nın nükleus dışına transportunu sağlar (17).

b) Tat: HIV-1 transaktivatör Tat protein etkin viral gen ekspresyonu ve virüs replikasyonu için gerekli olan küçük bir polipeptittir. Tat transkripsiyonel aktivitelerin yanında, hücre dışına salınır ve farklı hücre-membran ilgili reseptörlerle etkileşir. Tat proteinin yapısı hakkındaki mevcut bilgi NMR'ye dayanır. Tat proteini asidik amino ucu, sisteince zengin bölge, çekirdek ve temel alandan oluşan doğrusal bir yapıdadır (18-20).

Tat 1 iki ekson tarafından kodlanan 86-101 aminoasitten oluşur (Şekil 2.3.). Ekson 1, 1-72 arasındaki aminoasitleri kodlamaktadır. Ekson 2 ek olarak viral ayrıma bağlı olarak boyu değişen 14-32 arasındaki aminoasitleri kodlar. İlk ekson (Tat1-72) viral LTR' nin transkripsiyonel aktivasyonu için önemlidir. Bu ekson 1-20 arasındaki aminoasitlere yayılmış olan asidik bölgeyi, 20 ila 40 aminoasit arasında bulunan sisteince zengin bölgeyi, 35 ila 48 aminoasitler arasındaki merkez bölgeyi ve karboksil ucundaki temel bölgeyi kapsamaktadır. Yapılan çalışmalar sadece ilk eksonu içeren Tat'ın transfeksiyon denemelerinde viral LTR'nin transkripsiyonunda tamamen aktif olduğunu göstermiştir. Tat tarafından LTR'nin aktivasyonu için amino ucu ve sisteince zengin bölge önemlidir, amino ucunun uzaklaştırılması veya sisteince zengin bölgenin aminoasitle yer değiştirmesi Tat aktivasyonu üzerinde olumsuz etki göstermektedir (21,22).

Tat proteinindeki ilk işlevsel alan, HIV-1 LTR içine lokalize olmuş TAR bölümüdür ve DNA segmentinin negatif yüklü omurgasına bağlanmaya aracılık eden asidik kalıntıları bolca içermektedir. İkinci işlevsel alan ise nükleik asit bağlanması için önemli metal bağlayıcı bölgeyi kapsayan 7 sistein kalıntısını içeren bölgedir (23). Bu bölge çinko ve kadmiyuma bağlanma özelliği gösterir. Ayrıca Tat' ın bu metal iyonları üzerinden dimer yapı oluşturduğu gözlenmiştir.



Şekil 2.3. Tat , C harfi sistein, R harfi Arjinin, K harfi Lizin, Q harfi Glisin olarak sembolize edilmiştir.

2.2.4.4. Yardımcı Genler (Aksesuar genler)

HIV replikasyonu için gerekli olmayan ve "accessory" olarak adlandırılan bazı genler mevcuttur. Bunlar "*vif*", "*vpr*", "*vpu*" ve "*nef*" genleridir. Nef proteini sitotoksik T hücrelerinin, HIV'le enfekte hücreleri öldürme yeteneğini azaltır. Vpr, bölünmeyen hücrelerde viral özü sitoplazmadan çekirdeğe taşır. Vpu hücreden virion salınmasını şiddetlendirir. Vif proteini virüsün toplanması ve olgunlaşmasından sorumludur (13).

2.2.5. HIV'in Replikasyonu

Viral replikasyon kademelerini aşağıdaki şekilde sıralamak mümkündür:

- a) Virüsün hücre reseptörüne tutunması ve adsorbsiyonu:** HIV'nin hücreye tutunması ve adsorbsiyonu, zarf proteini gp120'nin T yardımcı lenfosit ve makrofajların yüzeyinde bulunan hücresel glikoprotein CD4 antijenine tutunması ile başlar. Hücre yüzeyinde bulunan glikoprotein CD4, virüsün hücreye bağlanmasına böylece füzyon yolu ile virüsün hücre içerisine girmesine yardımcı olur. HIV'in CD4+hücrelere girişi için CXCR4 ve CCR5 proteinleri gibi kemokin almaçları gerekir.
- b) Virüsün hücre içerisine girişi:** HIV-1'in konak hücre içerisine girişi pH'ya bağımlı bir olaydır. Ayrıca virüsün hücre içerisine girişte hücre yüzeyinde bulunan proteazın da rolü vardır. Normalde Env protein virion zarfında dimerik formdadır. Non-kovalan protein-protein ilişkisi gp 120 ve gp 41 arasında mevcuttur. Füzyon sırasında Env'nin

gp 120 altünitesi CD4 reseptörüne bağlanır ve konak hücre plazma membranındaki proteaz tutunmadan sonra gp 120'deki V3 loop'unu tanır. Gp 120'de meydana gelen proteolitik parçalanmadan sonra Env de konformasyonel bir değişiklik oluşur. Bu değişiklik sonucunda gp 41 füzyon proteininin N. terminal bölgesi konak hücre membranı ile temasa geçer ve viral zarf ile hücre membranı arasında oluşan füzyon domaini birleşmeye neden olur.

c) Revers transkripsiyonla oluşan viral DNA sentezi: İlk DNA iplikçığı RT tarafından viral RNA genomun 5' bölgesine doğru sentez edilir (negatif iplik DNA). Bunu takiben p51/p66 heterodimerinde bulunan Rnase H aktivitesi ile RNA: DNA hibridindeki RNA parçalanır. Pozitif iplikçik DNA'nın sentezi için HIV iki primer kullanmaktadır. Pozitif iplik DNA sentezinden sonra çift iplikli DNA (provirus) sentezi tamamlanmış olur. Linear çift iplikli DNA, çembersel DNA haline (cDNA) dönüşür.

d) Viral DNA'nın integrasyonu: Proviral HIV-1 DNA'nın konak hücre genomuna integrasyonu için integrase (IN) enzimi gereklidir. Viral integrasyon için başlama noktası sitoplazmada viral nükleokapsid içinde bulunan linear çift iplikli DNA (provirus)'dur. DNA'nın kesilmesi ve integras tarafından integrasyon sonucunda proviral DNA kovalent bağlarla hücre genomuna bağlanır.

e) Viral m-RNA genomik RNA transkripsiyonu ve protein sentezi: Viral m-RNA ve genomik RNA integre olmuş proviral DNA'dan sentez edilir. Viral m-RNA ve genomik RNA sentezinin miktarı HIV düzenleyici (regülatör) genler olan *tat*, *rev*, *nef* ve *vpr* ekspresyonuna bağlıdır. Viral proteinler polisistronik ve parçalanmış m-RNA'lardan sentez edilirler. Viral RNA hücre membranına yakın bir bölgede kapsid içerisine paketlenir. Gag ve gag-pol poliproteinleri hücre sitoplazmik membranında protease tarafından yüzeye birleştirilecek şekilde monte edilirler.

f) Tüm virus partikülü oluşumu, tomurcuklanma ve salınım: Özellikle gp 120 ve gp 41 hücre membranına monte edildikten sonra tomurcuklanma işlemi başlar. Tomurcuklanma sırasında hücre yüzeyinde bulunan bazı konak hücre antijenleri de viral zarfta yer alır (1).

2.2.6.Epidemiyoloji

Antiretroviral tedavinin yaygın kullanımı ve fırsatçı enfeksiyonlara karşı profilaksi verilmesi ile 1980'li yıllardan bu yana AIDS epidemiyolojisinde önemli değişiklikler olmuştur. Günümüzde AIDS tüm dünyayı etkileyen bir pandemi haline gelmiştir. Özellikle genç erişkinlerde önemli bir morbidite ve mortalite nedenidir. HIV enfeksiyonunun yayılımı esas olarak heteroseksüel ilişki yoluyla olur. AIDS, bildirimi zorunlu bir hastalıktır.

Gelişmiş ülkelerde AIDS'den korunmayı sağlayan antiretroviral tedaviye rağmen epideminin başlangıcından itibaren meydana gelen artış herhangi bir yıldakinden daha fazladır. WHO ve Birleşmiş Milletler HIV/AIDS Programı'nın 2007 yılında yayınladıkları rapora göre AIDS 2007 yılı sonu itibariyle 33 milyondan fazla insanı etkisi altına almıştır (24).

2.2.7.Klinik Belirti ve Bulgular

AIDS hastalarında dikkate değer derecede bir immün baskılanma mevcuttur. Bunun nedeni infekte bireylerde virüsün T4 helper lenfositlerinde replikasyonu sonucunda bağışık sistem kontrolünün kaybolmasıdır. Hastalık klasik olarak 3 dönemden oluşur:

a) Akut Primer Enfeksiyon: Bu dönem genellikle semptomsuz ortaya çıkar, ancak bazen infeksiyöz mononükleozise benzer bir hastalık oluşabilir. Ağız ve genital bölgede ülserler gelişebilir. Bunu takiben semptomlar tamamıyla kaybolur ve özgül antikorlar ortaya çıkar.

b) Asemptomatik Period: Bu dönem genellikle 1-10 yıl arasında değişmektedir ve bu dönemde hastaların CD4+ lenfosit sayıları giderek azalmaktadır. Özellikle bu dönemin sonunda normalde 800-1200 hücre/mikrolitre olan T4 yardımcı lenfosit sayısı 400'ün altına iner. Plazma ve lenfoid dokuda yüksek titrede HIV bulunur.

c) Semptomatik Dönem: Bu dönem AIDS belirtilerinin ortaya çıkmasından önceki dönemdir. Bu döneme ayrıca ARC (AIDS Related Complex) dönemi adı da verilir. Bu dönemde hastalarda yaygın ve uzun süren (6 aydan fazla) bir lenfadenopati mevcuttur.

ARC dönemini takiben "full-blown AIDS" adı verilen terminal dönem başlar. Bu dönemde CD4 lenfositlerinin sayısı 400 hücre/mikrolitrenin altına inmiştir ve daha önceki dönemde saptanmayan viral özyapı antijeni p24 periferik kanda saptanmaya başlanır. AIDS hastalığının bu son döneminde ağır derecede bir immün yetmezlik söz

konusudur. Bunun sonucunda hastalarda immün mekanizmanın koruyamadığı bazı mikroorganizmalar ile oluşan fırsatçı enfeksiyonlar ortaya çıkar. AIDS hastalarının çoğunluğunda saptanan iki hastalık Kaposi sarkoma ve Pneumocystis carinii pnömonisidir. Özellikle bu iki hastalığın saptanması AIDS tanısı için en önemli kriterler arasında yer alır. Hastalarda birden fazla fırsatçı enfeksiyonun aynı anda görülmesi mümkündür. Bu hastalıkların birçoğu fatal seyretmektedir. HIV enfeksiyonu sırasında hasta kanında saptanan virus miktarı (viral load), hastalığın takibi için prognostik bir değer taşır.

2.2.8.Patogenez ve İmmunite

HIV enfeksiyonunun en önemli özelliği CD4+T hücrelerinin sayısında progresif azalmaya neden olmasıdır. Fırsatçı enfeksiyonlar ve neoplazmlar genellikle CD4+ hücre sayısının 200/mm³'ün altına indiğinde ortaya çıkar (25).

HIV enfeksiyonunun akut döneminde CD8+T hücrelerinin de sayısı azalır. Ancak 3-4 hafta içinde sayı artar, normale hatta normalin üzerine çıkar. Enfeksiyonun asemptomatik döneminde CD8+T hücre sayısı genellikle normalin üzerinde kalır (25).

AIDS'li hastalarda belirgin bir B hücre aktivasyonu göze çarpar. Antikorların büyük bir kısmı virüsün zarf proteinlerine karşı gelişir. HIV enfeksiyonunun erken döneminde dolaşımdaki B hücrelerinin sayısı azalır. Hastalık ilerledikçe sayıda artış olur. HIV seropozitif kişilerde NK (Natural killer) hücreler hedef hücrelere bağlanabilirler. Fakat sitotoksiteleri azalmıştır.

HIV ile infekte kişilerde hem humoral hem de hücrel immün cevap oluşmaktadır.

Humoral İmmün Cevap

- a) Bağlanan antikorlar (binding antibodies) savunmada rol oynamazlar, fakat enfeksiyonun tanısında yardımcıdırlar.
- b) Nötralizan antikorlar tipe ve gruba özgü olabilirler. Viral zarf proteinlerine (gp120 ve gp41) bağlanarak virüsü nötralize ederler.
- c) Antikora bağlı hücrel sitotoksitede (ADCC [antibody-dependent cellular cytotoxicity]) rol oynayan sitotoksik antikorlar bir taraftan virüsle infekte CD4+ hücrelerin naturel killer (NK) hücreler tarafından sitolizini sağlayıp koruyucu rol üstlenirken, diğer taraftan infekte olmayan hücrelerin de sitolizine neden olarak patojenik rol oynarlar.

- d) Subnötralizan düzeylerdeki antikorlar (Enfeksiyonu arttırıcı antikorlar [Enhancing antibodies]) ya virüsün Fc reseptörleri ya da komplemanla birleşerek kompleman reseptörleri aracılığı ile hücre içine alınmalarını artırarak hücrelerin infekte olmasına neden olurlar (2).

Hücreyel İmmün Cevap: Vireminin kontrol altına alınmasında hücreyel immün yanıt, humoral immün yanıtta daha önemlidir.

- a) CD4+ T helper (Th) hücreler, humoral ve hücreyel immünitenin kontrolünde merkezi bir rol oynar. Antijen sunan hücreler MHC sınıf 2 antijenleri ile viral antijeni Th lenfositlere sunarlar. Sonuçta bir taraftan Th lenfositler aktive olup çoğalırken, diğer taraftan da sitokinler aracılığı ile B lenfositler, CD4+ ve CD8+ lenfositler, monositler ve naturel killer hücreler gibi immün sistemin diğer hücrelerini uyarırlar.
- b) Uyarılan sitotoksik CD8+ T lenfositleri, infekte hücrelerin MHC sınıf 1 antijenlerini tanıyarak hücrenin sitolizine neden olur.
- c) NK hücreler bir taraftan antikora bağlı sitotoksisite gösterirken diğer taraftan da antikor yokluğunda HIV ile infekte hücreleri öldürür. Bu etki, monositlerde de vardır (2).

2.2.9.HIV İnfeksiyonunun Bulaşma Yolları ve Korunma

Cinsel Yolla Bulaşma: Cinsel temas HIV enfeksiyonunun en önemli geçiş yoludur. Virus tükürükte çok düşük konsantrasyonlarda bulunduğundan, HIV enfeksiyonu taşıyan kişilerin tükürüğüyle enfeksiyon bulaşma riski çok azdır. Cinsel yolla bulaşan tüm hastalıklar HIV enfeksiyonunun geçiş riskini arttırır.

İntravenöz (i.v) İlaç Kullanımına Bağlı Bulaşma: IV ilaç bağımlılarında HIV geçişi genelde kontamine aletlerin kullanılmasıyla olur (iğne, şırınga, vb.).

Perinatal Bulaşma: İnfekte kadından bebeğe HIV geçişi gebelikte, doğum sırasında ya da emzirme yoluyla olur. Hem vajinal hem de operatif doğum sırasında geçiş riski yüksektir.

Sağlık Personeline Bulaşma: Kanla kontamine olmuş vücut sıvılarıyla temas sonucunda sağlık personeline HIV geçişi mümkündür.

HIV'den korunmada, kondom kullanımı önemli bir faktördür. Devamlı kullanım ve kondomun yırtık ya da delik olmaması etkinlik açısından önemlidir. IV ilaç

bağımlılığının önlenmesi, tedavi edilmesi, ortak iğne ve şırınga kullanımının tehlikelerinin anlatılması, dezenfeksiyonla ilgili bilgi verilmesi bu gruptaki riski azaltabilecek önlemlerdir. Tüm kan ve kan ürünlerinin HIV antikoru (HIV Ab) yönünden test edilmesi, uygun tekniklerle hazırlanması, organ ve doku nakilleri öncesinde gerekli serolojik testlerin yapılması bu yollarla enfeksiyon geçiş riskini minimuma indirir. Sağlık personeli için eldiven giyme, el yıkama, tüm vücut sıvılarının enfekte olabileceğini düşünerek hareket etme, iğne batmasını engelleyecek şekilde dikkatli davranma enfeksiyon riskini azaltabilecek önlemlerdir.

2.2.10.Tedavi

AIDS tedavisinde sorun yaratan iki durumdan biri hastanın immun yetmezliği nedeniyle ilacın antiviral etkinliğine konakçının immünesinin yardım edememesidir. Diğer sorun, virüsün beyni de enfekte edebilmesi ve ilaca karşı kan-beyin engeli nedeniyle, buradaki enfeksiyonun tedavisinin zorluk arz etmesidir.

Antiretroviral ilaçların AIDS hastalarındaki terapötik etkinliğinin başlıca objektif göstergeleri şunlardır:

- a) Hastanın ömrünü uzatmaları,
- b) Kanda düşmüş olan CD4+ lenfosit sayısını yükseltmeleri,
- c) Hastanın virüs yükünü (serumun mililitresindeki viral mRNA kopyalarının RP PCR yöntemiyle ölçülen sayısını) azaltmaları,
- d) Oportunistik enfeksiyon ve diğer komplikasyonların insidensini azaltmaları,
- e) Hastanın genel durumunu düzeltmeleri,
- f) Cildin kaybolmuş olan gecikmiş-tipteki aşırı-duyarlılık reaksiyonlarını geri getirmeleri,
- g) Serumda HIV p24 antijeni titresini (p24 antijenemisini) azaltmaları,
- h) Vücut ağırlığında artma yapmaları (26).

HIV enfeksiyonu tedavisinde rezistans gelişmesi sorunu: HIV-1'in antiretroviral ilaçlara rezistans geliştirmesi viral revers transkriptaz ve proteazda, viral genlerdeki mutasyon nedeniyle normal amino asitlerin yerine başka amino asitlerin gelmesi sonucu bu enzimlerin ilaç tarafından inhibe edilme yeteneklerinin azalmasına bağlıdır. HIV-1'in genlerinde spontan mutasyon hızı oldukça yüksektir. Virüsün her bir replikasyonu sırasında ortalama 0.2-1 tane nokta mutasyonu yani normal nükleotid yerine başka bir nükleotidin gelmesi olayı olur (26).

Rezistans gelişmesini önlemek için antiretroviral ilaçlar üçlü veya dörtlü kombinasyonlar halinde yeterli dozda, uzun süre kullanılmalı ve hasta tedaviye, yeterli derecede uyunc göstermelidir.

Günümüzde en çok kullanılan tedavi şekli HAART (Highly active anti-retroviral therapy)'dir.

Kullanılan antiretroviral ilaç grupları, Nükleozit-analog reverse transkriptaz inhibitörleri (NRTIs), Nonnükleozit reverse transkriptaz inhibitörleri (NNRTIs), proteaz inhibitörleri (PIs), füzyon ve olgunlaşma inhibitörleri olarak sınıflandırılırlar.

Tat viral replikasyon ve AIDS'in ilerlemesi için önemli olan küçük, çok amaçlı bir viral proteindir. HIV-1 Tat-protein, HIV-1 transkripsiyonundaki temel görevi ve HIV ilerlemesindeki çoklu ilişkisi yüzünden AIDS patojenitesinde ana rolü oynamaktadır. Tat antagonistlerinin yeni sınıfı aminoglikozid-arjinin konjugatlarıdır ve bunlar sadece HIV replikasyonunu inhibe etmekle kalmazlar, aynı zamanda HIV için önemli olan Tat'ın fonksiyonlarıyla yarışır. Yeni HIV inhibitörlerinin gelişmesi ile, RT veya proteazdan daha çok viral komponentlere karşı hedeflenmiş anti-HIV kombinasyon terapilerinin kullanılma kapasitesi çok artmıştır. Tat'a karşı inhibitör geliştirilmesi çok önemlidir ve AIDS'e karşı mücadelede kritik rol oynamaktadır (27).

Ekstraselüler Tat-protein, Tat aşısı ve anti-Tat bileşenleri çalışmalarında AIDS ilerlemesinin kontrolü için hedef olarak düşünülmektedir. Birçok *in vivo* çalışma HIV-1 enfekte hastaların serumunda anti-Tat antikorun yüksek titrelerde bulunmasının önemli miktarda HIV-1 hastalığının ilerlemesiyle ilgili olduğunu göstermiştir (28).

Birçok deneysel ve klinik çalışma, HIV enfeksiyonun ilerlemesini geciktirmekte terapötik aşı oluşturulması için etkili aday olarak HIV-Tat proteinini kullanmayı önermektedir. Hastalığı geliştiren HIV-Tat proteinin hücrel aktivasyonuna sistince zengin ve arjinince zengin bölgelerin aracılık ettiği gösterilmiştir. Yapılan çalışmalar göstermektedir ki, yüksek derecede korunan sistin ve arginince zengin bölgeler HIV-Tat protein araçlı viral patojenite ve hücrel düzensizlikte anahtar bölgelerdir. Tat proteinin bu fonksiyonel bölgelerinin immünolojik araçlarla inaktive edilmesi, ekstraselüler Tat protein tarafından patojenik etkilerin indüklenmesini azaltır, yavaşlatır ve HIV enfekte kişilerde hastalığın ilerlemesini önler (29).

Bu alışmada, HIV replikasyonu için gerekli olan Tat'ın sistein türevleri ile inaktive edilmesi istenmektedir. Bu amaç doğrultusunda, elde edilen verilerin AIDS tedavisinde yeni bir yol aması hedeflenmektedir.

3. GEREÇ VE YÖNTEM

Bu çalışma, Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalı Araştırma Laboratuvarında gerçekleştirildi. HIV-1 Tat aktivasyonunun inhibisyonu için kullanılacak sistein türevi bileşikler, “NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, USA” programından temin edilen Jurkat (ATTC, TIB-152) hücre kültüründe çalışıldı. Bu çalışmada, biri Tat geni (pCV1), ikincisi ise HIV-1-LTR ile CAT (Kloramfenikol asetiltransferaz) geni (pC15CAT) içeren iki farklı plazmit kullanıldı. Bu plazmitler “NIH AIDS Research & Reference Reagent Program, USA” programından temin edildi. Ayrıca plazmit izolasyonu için Genopure Plazmit Maxi Kit (Roche) kullanıldı. Kullanılan bütün kimyasallar gerekli oda sıcaklıklarında saklandı. Deneylerde UV-VIS spektrofotometre (CHEBIOS), soğutmalı santrifüj (Nüve NF 1200R), hassas terazi (OHAUS), pHmetre (WTWİ 320), su banyosu (Nüve ST402), CO₂ li inkübatör (Sanyo) ve Laminar Flow (Nüve) kullanıldı.

Kullanılan tüm cam ve sarf malzemeler çalışma öncesi otoklavda (Nüve032) sterilize edildi.

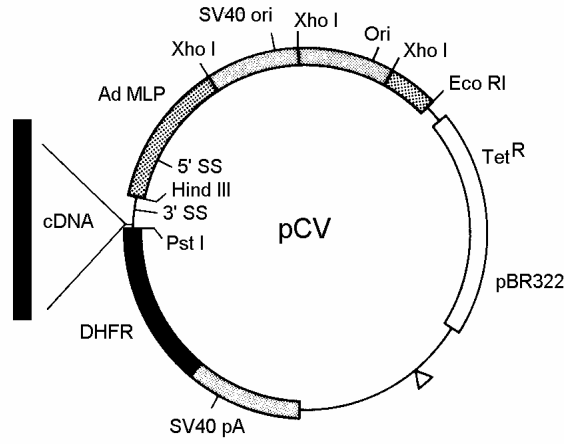
3.1. PLAZMİTLER

Bu çalışmada HIV-1'in *tat* geni, *rev* geni ve tetrasiklin direnç genini taşıyan “pCV1” plazmiti ile Kloramfenikol asetil transferazı (CAT) kodlayan gen bölgesini, HIV-1 LTR ve ampisilin direnç genini taşıyan “pC15CAT” plazmiti kullanıldı (30,31). İzole edilen plazmitlerin DEAE-Dextran transfeksiyon yöntemi (23) ile jurkat hücrelerine

transfeksiyonları sağlandı. İnhibitörlerin Tat aktivasyonu üzerine olan etkileri CAT ELISA (Roche, 11363727001) Kiti ile tesbit edildi.

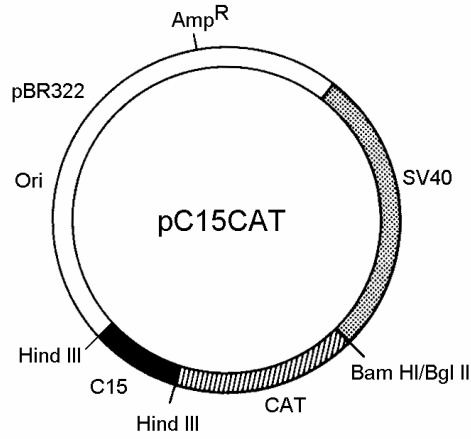
Plazmitlerin Özellikleri

-pCV1 : pCV1, pstI ve EcoRI restriksiyon endonükleazları ile kesilir. EcoRI pCV1'i bir noktadan keser, 9,2 kBp uzunluğunda tek bir parça oluşur. pstI ise iki noktadan keser, 3,0 ve 6,2 kBp büyüklüğünde iki parça oluşur. 3,0 kBp büyüklüğündeki bölgenin 1,6 kBp'lik bölümü cDNA ve tat protein genini, 1,4 kBp'lik bölümü ise pBR322 bölgesini içerir. pCV plazmiti Şekil 3.1.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.1. pCV Plazmit, SV40-ori, Adenovirüs büyük geç promotörü (Adenovirüs Major late promotör, Ad MLP), Fare immünglobulin geni (Mouse Immünglobulin gen, SS), Fare dihirofolat redüktaz gen bölgesi (Mouse – Dihydrofolat –Reduktase, DHFR) (30,31).

-pC15CAT : pC15CAT BamHI ve Hind III restriksiyon endonükleazları ile kesilir. Hind III plazmiti iki noktadan keser, 0,3 kBP ve 4,5 kBP'lik iki parça oluşur. BamHI bir noktadan keser, 4,8 kBP' lik tek bir parça oluşur. İki enzim birlikte kullanılarak kesim yapıldığında 0,3, 1,5 ve 4,0 kBP'lik parçalar oluşur. pC15CAT plazmit Şekil 3.2.'de gösterilmiştir.



Şekil 3.2. pC15CAT Plazmit; C-15 DNA-Klon (HIV-1-LTR), Kloramfenikol asetil transferaz geni (Chloramphenicol acetyl transferase =CAT) (30,31).

3.1.1. Plazmit İzolasyonu

Escherichia coli bakterisine transforme edilmiş plazmit DNA'ların izolasyonu Genopure Plazmit Maxi Kit (Roche) protokolüne göre yapıldı. Stok çözeltiler -20 °C'de saklandı. Plazmit izolasyonunda kullanılan çözeltiler Tablo 3.1.'de, Tris-EDTA Tamponu Tablo 3.2.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.1. Plazmit İzolasyonunda Kullanılan Çözeltiler

Antibiyotik	Stok solüsyonlar	Çalışma Konsantrasyonu
	Konsantrasyon	
Ampisilin	1000mg/20ml su içinde	100 µg/ml
Tetrasiklin	100mg/20ml Abs. Ethanol	25 µg/ml
Kloramfenikol	34 mg/ml Abs. Ethanol	170 µg/ml

Tablo 3.2. Tris-EDTA Tamponu

Tris – EDTA Tamponu (TE, pH: 7.5)	
Tris- HCl	10 mM
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	1 mM

a) pCV1 ve pC15CAT Plazmit DNA'ları için Escherichia coli Bakteri Kültürünün Hazırlanması

Kullanılan plazmitlerden pCV1 tetrasiklin, pC15CAT ise ampisilin direnç geni taşır. İki plazmit için de kullanılan antibiyotik konsantrasyonları dışında aynı işlemler uygulanmıştır.

10 ml Lennox L Broth (LB, acumedia) besi yerine, antibiyotik stok çözeltisinden çalışma konsantrasyonuna uygun şekilde eklendi. Antibiyotik direnç geni taşıyan plazmite sahip E.coli bakterisi, dirençli olunan antibiyotiği içeren kültüre ekim yapılarak +37°C' de çalkalayıcı su banyosunda bir gece inkübe edildi.

İnkübasyon sonunda kültür, 500 ml LB Broth besi yerine aktarıldı. Tablo 3.1'de belirtilen çalışma konsantrasyonlarına göre plazmit türüne uygun antibiyotik eklendi ve aynı koşullarda inkübasyona devam edildi. Yarım gün inkübasyondan sonra, kültüre protein sentezini durdurup, sadece plazmit amplifikasyonunu arttırmak amacıyla çalışma konsantrasyonu 170µg/ml olacak şekilde kloramfenikol eklendi ve bir gece inkübe edildi. Elde edilen bakteri kültürü ertesi gün plazmit izolasyonunda kullanıldı.

b) Escherichia coli Hücrelerinden Plazmit DNA İzolasyonu

Çalışmada Genopure Plasmid Maxi Kit (Roche) kullanıldı ve kitin "Low Copy Number Plasmids" prosedürüne uyuldu. Kitin ilk kullanımında kit içinde liyofilize halde küçük bir şişede bulunan RNase A yine kite ait olan süspansiyon tamponu içinde çözüldü ve iyice karışmaları sağlandı. Elde edilen DNA çözeltisinin saflık ve miktar tayini 3.1.2. bölümünde anlatılan yöntemle yapıldı ve kullanılıncaya kadar -20°C' de saklandı.

3.1.2. Plazmit DNA Saflık ve Miktar Tayini

Elde edilen plazmit DNA çözeltilerinin saflık ve miktar tayinleri spektrofotometrik yöntemle yapıldı. TE tamponuna karşı örneklerin 260 nm, 280 nm ve 320 nm'deki optik dansite (OD) değerleri ölçüldü.

260 nm/280 nm'deki OD oranları hesaplanarak, DNA çözeltisinin saflığı tayin edildi (Çözeltinin saflığı için bu oranın 1,8 – 2,00 arasında olması gerekir. 1 OD'nin 50 µg/ml çift sarmal DNA'ya eşdeğer olduğu bilinmektedir).

DNA Konsantrasyonu (µg/ml)=260 nm'de okunan OD değeri X Seyreltme Faktörü X 50

3.1.3. Agaroz Jel Elektrofrez

Agaroz jel elektrofrez ile E. coli hücresinden izole edilen pCV1 ve pC15CAT plazmit DNA'larının jel üzerindeki görüntü ve büyüklükleri tesbit edildi (32).

a) Agaroz Jel Elektrofrezinde Kullanılan Tampon Çözeltiler

- **Tris Asetat EDTA (TAE) Tamponu** : Tamponun içeriği ve 100 ml için gerekli miktarları Tablo 3.3'de gösterilmiştir. Elektrofrez için 1 X TAE tamponu kullanıldı.

Tablo 3.3. Tris Asetat EDTA Tamponu

50 X TAE (pH=8.5) Tampon İçeriği	
Trizma baz	2M
Glasiyal Asetik Asit	17,4 M
EDTA	100 mM
Distile Su	100 ml

- **Örnek Yükleme Tamponu** : Örnekleri jel oyuklarına yüklemek için örnek yükleme tamponu kullanıldı. 6 X yükleme tamponu stok olarak hazırlandı ve 1X yükleme tamponu stoktan seyreltilerek kullanıldı. Örnek yükleme tamponu içeriği Tablo 3.4'de gösterilmektedir.

Tablo 3.4. 6X yükleme tamponu

6 X yükleme Tamponu	Miktar
Bromfenol mavisi	% 0,25
Gliserol	% 30

- **Etidyum Bromür Stok Çözeltisi** : Etidyum bromür (EtBr) stok çözeltisi distile suyla 10 mg/ml konsantrasyonda hazırlandı.

b) Agaroz Jel Elektroforezi

pCV1 İçin Parçalama (Digestion) Reaksiyonu Kurma : pCV1, EcoRI (Fermentas® ER0271) ve PstI (Fermentas® ER0611) isimli iki restriksiyon endonükleaz (RE) ile kesilerek 37°C'de 1 saat inkübe edildi. EcoRI ve PstI enzimleri kesim noktaları ve parçalama reaksiyonu kurma oranları Tablo 3.5.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.5. EcoRI ve PstI enzimleri kesim noktaları ve parçalama reaksiyonu kurma oranları

EcoRI (Fermentas ® ER0271)	PstI (Fermentas® ER0611)
5'.....G↓A-A-T-T-C.....3'	5'.....C-T-G-C-A↓G.....3'
3'.....C-T-T-A-A↑G.....5'	3'.....G↑A-C-G-T-C.....5'
Nükleaz- içermeyen su16 µl	Nükleaz- içermeyen su44 µl
10X Buffer EcoRI..... 2 µl	10X Buffer O5 µl
DNA(0,5-1µg/ml)..... 1 µl	DNA(0,5-1µg/ml)..... 1 µl
EcoRI.....1 µl	PstI.....1 µl

pC15CAT İçin Parçalama (Digestion) Reaksiyonu Kurma : pC15CAT, HindIII (Fermentas®ER0501) ve Bam HI (Fermentas®ER0051) olmak üzere iki restriksiyon endonükleazla kesildi. Bu çalışmada enzimler ile ayrı ayrı ve iki enzim aynı tüpte olacak şekilde üç reaksiyon kuruldu (HindIII + Bam HI) ve 37°C'de 1 saat inkübe edildi. HindIII, BamHI ve HindIII+ BamHI RE enzimleri kesim noktaları ve parçalama reaksiyonu kurma oranları Tablo 3.6.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.6. HindIII, BamHI ve HindIII+ BamHI RE enzimleri kesim noktaları ve parçalama reaksiyonu kurma oranları

HindIII (Fermentas®ER0501)	BamHI (Fermentas®ER0051)	HindIII + Bam HI
5'.....A↓A-G-C-T-T.....3' 3'.....T-T-C-G-A↑A.....5'	5'.....G↓G-A-T-C-C.....3' 3'.....C-C-T-A-G↑G.....5'	
Nükleaz- içermeyen su.....44 µl 10X Buffer R.....5 µl DNA(0,5-1µg/ml)..... 1 µl HindIII..... 1µl	N. içermeyen su.....44 µl 10X Buffer BamHI.....5 µl DNA(0,5-1µg/ml)..... 1 µl Bam HI.....1µl	N. içermeyen su.....44 µl 10X BufferR.....5 µl DNA(0,5-1µg/ml)..... 1µl HindIII.....1 µl BamHI..... 1 µl

DNA Ladder Mix (Fermentas ® SM0331) : “DNA Ladder Mix” 100bp 10000 bp aralığında çift sarmal DNA parçalarının boyutlarının ve kalitelerinin agaroz jel üzerinde belirlenmesini sağlar. DNA Ladder Mix Hazırlanışı Tablo 3.7.'da gösterilmiştir.

Tablo 3.7. DNA Ladder Mix Hazırlanışı

DNA Ladder Mix (Fermentas ® SM0331)
DNA Ladder.....1 µl
6X Loading Dye Solution1 µl
Deionized Water4 µl

Agaroz Jelin Hazırlanması : Elektroforez işlemi sırasında %1 konsantrasyonda agaroz kullanıldı. 1 g agaroz tartılıp 100 ml 1X TAE üzerine eklendi. 5 dakika bekletildi, ardından mikrodalga fırında tamamen çözünmesi sağlandı. Agaroz çözeltisi 50-55°C'ye kadar soğutulduktan sonra, içerisine tarak yerleştirilmiş olan yatay agaroz jel sistemi (Owl®) kaseti içine döküldü. Jel polimerleştikten sonra kaset elektrik akımının geçiş yönüne uygun konuma çevrildi ve tarak yavaşça çıkarıldı. Tank TAE tamponu ile jelin üzeri tamamen kapanana kadar dolduruldu. Jelin tampon ile dengeye gelmesi için 10 dakika beklendi.

1 saat inkübasyon sonrasında örneklerden 13 µl alıp, üzerlerine 2 µl yükleme tamponu eklendi. İyice karışmaları sağlandı. Kuyucuklara örnekler sırayla TAE tamponu üzerinden yüklendi.

90V'luk gerilimde, jelin 2/3'lük kısmına gelinceye kadar izleme boyası ile yürütüldü, ardından jel EtBr çözeltisi içine yavaşça bırakıldı ve 5 dakika bekletildi. 5 dakika sonunda jel saf su ile yıkandı. Sonrasında UV görüntüleme cihazında fotoğrafı çekildi.

3.2. HÜCRE KÜLTÜRÜ

Çalışmada “Jurkat (Clone E6-1) hücreleri” kullanıldı. Hücreler + 37°C’ de CO₂ 'li inkübatörde, delikli kapaklı hücre kültür kapları içinde tutuldu. Çoğalan hücrelerin bir kısmı – 80°C’de krio yöntemi ile dondurularak saklandı.

a) Jurkat Hücre Kültürü : Krio tüp içinde dondurulmuş olan jurkat hücreleri - 80°C’den çıkarıldıktan sonra, + 37 °C’ de çözüldü. Hücrelerin üzerine 5 ml PBS eklendi ve 1600 rpm (20°C)'de 5 dakika santrifüj edildi. Süpernatant kısmı atıldı. Ardından hücre pelleti üzerine 5 ml taze besi yeri eklenip yavaşça pipetleyerek homojenize edildi ve delikli hücre kültür kabına aktarılıp CO₂ 'li inkübatöre yerleştirildi.

b) Jurkat Hücrelerinin Pasajı : Çalışma süresince kullanılacak olan Jurkat hücrelerinin devamının sağlanması ve canlılığının korunması için pasajlar yapıldı. Flask içindeki besi yeriyle birlikte hücreler 15 ml’lik falkon tüplere aktarıldı. 600g’de +20 C°’de 5 dakika santrifüj edilip, süpernatant kısım atıldı. Pelet 5 ml penisilin içeren Fosfat Buffer Saline (PBS, pH; 7,3) tamponu içinde çözüldü ve aynı koşullarda tekrar santrifüj edildi. Süpernatant kısım ayrılıp, oluşan pellet önceden hazırlanmış besi yeri içinde çözüldü ve kültür kabına aktarıldı.

c) Hücre Dondurma ve Saklama : Hücreler besi yerleri değiştirilirken yapıldığı gibi santrifüj ve yıkama işlemlerinden geçirildi. Son aşamada oluşan pellet krio çözeltisi içinde çözüldü. Steril ependorflara 1'er ml olacak şekilde alındı ve kademeli olarak donmaları sağlandı.

Hücreler ilk olarak +4C°’de yarım saat, -20C°’de 3 saat bekletildikten sonra -80C°’ye kaldırılarak uzun bir süre saklanabilir. Hücre kültürü besi yeri içeriği Tablo 3.8’de, PBS tamponu içeriği Tablo 3.9.’da, krio çözeltisi içeriği Tablo 3.10’da gösterilmiştir.

Tablo 3.8. Hücre kültürü besi yeri

Hücre Kültürü Besiyeri İçeriği	Saklama Koşulu
RPMI-1640(Sigma®) 2mM L-glutamin %1 penicillin/streptomisine %10 Inactivated Fetal Bovine Sera (FBS)	+ 4C°

Tablo 3.9. PBS tamponu

PBS Tamponu, 1L (PH:7,4)	Saklama Koşulu
136 mM NaCl 2 mM KCL 8mM Na ₂ HPO ₄ .H ₂ O 1,5 mM KH ₂ PO ₄	Oda ısısı 15-25 C°

Tablo 3.10. Krio çözeltisi

Krio Çözeltisi	Saklama Koşulu
%10DMSO (Dimetilsülfoksit) %90Inactivated Fetal Bovine Serum	- 20C°

d) Fetal Bovine Sera'un İnaktivasyonu

Fetal Bovin Sera (FBS), besiyerinin en önemli protein kaynağıdır. İnaktivasyon işlemi ile ısıya duyarlı komplement proteinler denatüre edilir. Ayrıca ortamda mikoplazma gibi mikroorganizmalar mevcut olabilir. Isıyla gerçekleştirilen bu inaktivasyon prosesi sayesinde besiyeri kontaminasyon riski azaltılmış olur.

İNaktivasyon sırasında -20C°'de muhafaza edilen FBS alınıp 37C°'lik su banyosuna koyuldu ve burada ara ara çalkalamak suretiyle erimesi sağlandı. Tamamen eridikten sonra 15 dakika kadar yine aralıklı olarak karıştırılarak FBS'nin ısısının 37C°'ye gelmesi sağlandı ve su banyosunun ısısı +56C°'ye çıkarıldı. Isı tamamen yükselince her 10 dakikada bir karıştırmak suretiyle yarım saat su banyosunda bekletildi. Tamamen soğumadan steril tüplere alındı ve -20C°'ye kaldırıldı.

3.3. DEAE-DEXTRAN YÖNTEMİ İLE TRANSFEKSİYON

DEAE-dextran nükleik asitin negatif yükleri ile bağlantı kuran katyonik bir polimerdir. Yüksek oranda pozitif yüke sahip olduğu için DNA'ya bağlanıp hücre membranının negatif yüklü bölgelerine taşır. Kompleks endositozla hücre içine alınır. Ancak DEAE-dextran hücreler için toksik olduğundan hücreye göre uygun konsantrasyonda olmalı ve reaksiyon süresi iyi ayarlanmalıdır.

DNA transfeksiyon çözeltisi içeriği Tablo 3.11.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.11. DNA transfeksiyon çözeltisi

DNA Transfeksiyon Çözeltisi
50mM Tris-HCl (pH:7.3)
RPMI-1640 Medium (Serum ve L-Glutamin içermeyen)
250µg/ml DEAE-dextran
Bir kuyucuk için 1×10^7 hücre
10µg/ml Plazmit (Plazmitlerin her biri için)

Transfeksiyon için steril 6 kuyucuklu hücre kültürü kabı kullanıldı. Her kuyucuğa eşit sayıda hücre (1×10^7) koymak için hücreler Tyrpan mavisini ile boyanıp, Thoma lamında sayıldı. Sayılan hücreler transfeksiyon çözeltisi içinde 1 saat 37°C 'de inkübe edildikten sonra 5 dakika $800g$ 'de santrifüj edildi. Ardından serumsuz besi yeri ile iki kere yıkandı. Hücre pelleti taze besiyeri içinde çözülerek eşit hacimlerde kuyucuklara dağıtıldı. Etkisi araştırılan sistein türevleri kuyucuklara eklendi ve CO_2 'li inkübatörde 48 saat inkübe edildi (23).

İnkübasyon sonunda CAT ELISA kiti (Roche) prosedürüne uyularak hücrelerde kloramfenikol asetil transferaz (CAT) aktivitesi ölçüldü. Sonuçlar ELISA cihazında (BioTek, Synergy HT) 405 ve 490 (referans dalga boyu) nm'de, 10- 40 dakika içinde okundu. CAT ekspresyonundaki artışın Tat protein aktivitesi ile doğru orantılı olması esasına dayanılarak sonuçlar değerlendirildi.

CAT ELISA'nın çalışma prensibi sandviç ELISA modeline dayanmaktadır. "Microplate modul (MP)" yüzeyine CAT antikorları (anti-CAT) tutturulmuştur. Transfekte hücreler parçalandıklarında CAT içeren hücre ekstraktı MP modüllere eklenir. CAT anti-CAT'a

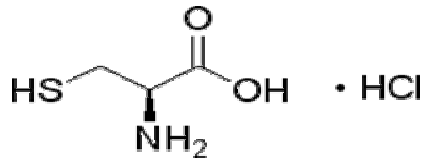
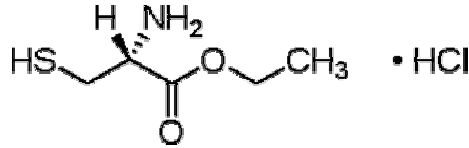
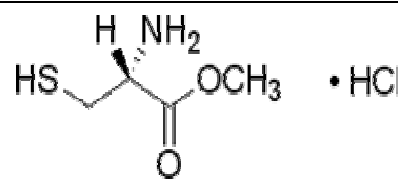
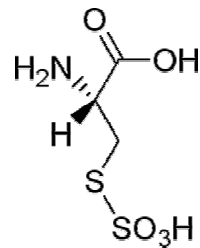
bağlanır. Daha sonra eklenen antikor (anti-CAT-DIG) CAT'a bağlanır. Üçüncü aşamada peroksidaz içeren (anti-DIG-POD) antikor eklenir. Son olarak peroksidaz substratı eklendiğinde renk reaksiyonu oluşur.

MP modüllere eşit konsantrasyonda protein koymak için hücre ekstraktlarına Bradford yöntemi ile protein miktar tayini yapıldı.

3.4. KULLANILAN SİSTEİN TÜREVİ AMİNOASİTLER

Çalışmada kullanılan sistein türevleri Tablo 3.12.'de gösterilmiştir.

Tablo 3.12.Kullanılan sistein türevi aminoasitler

Sistein Türevinin Adı	Kimyasal Formülü
1.L- Cysteine hydrochloride	
2. L- Cysteine ethyl ester hydrochloride	
3. L- Cysteine methyl ester hydrochloride	
4. L- Cysteine S-sulfate	
5.L- Cysteine sulfinic acid	$\text{HO} - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{S} - \text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2) - \overset{\text{O}}{\parallel} \text{C} - \text{OH} \cdot \text{H}_2\text{O}$

3.5. TRYPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ (SİTOTOKSİSİTE TESTİ)

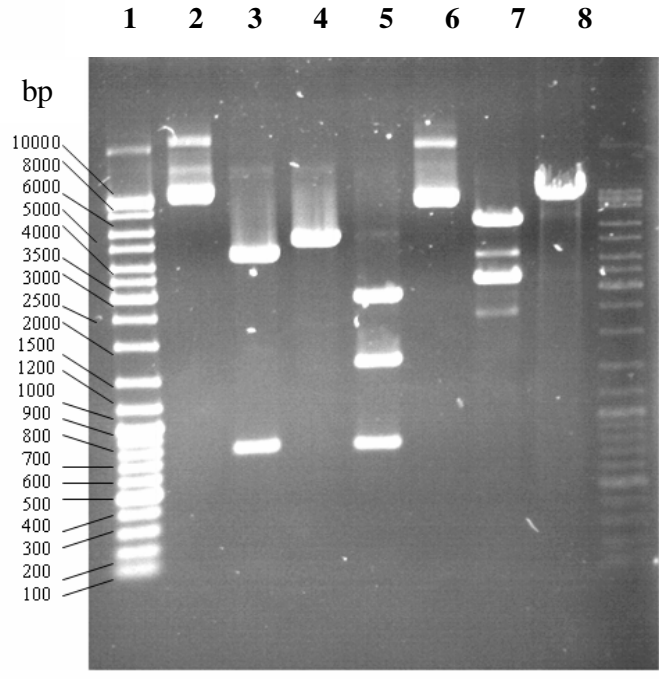
Tat üzerindeki etkileri araştırılan sistein türevlerinin, hücreler üzerindeki toksik etkileri incelendi. Transfeksiyonun gerçekleştirildiği koşullarda, transfekte edilmemiş hücelere, her inhibitör için tek bir konsantrasyonda çift kontrollü olarak inhibitörler verilip, CO₂'li inkübatörde 37C°de 48 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrasında her bir kuyucuktaki canlı ve ölü hücre sayısı trypan mavisi ile boyama yapılarak Thoma lamında sayıldı. Bu sonuçlara göre aminoasit türevlerinin hücreler üzerindeki toksik etkileri incelendi. Bu testte her inhibitör için ayrı kuyucuğa on milyon hücre ve 100µg/ml oranında inhibitör koyuldu. Kontrol hücre grubuna inhibitör yerine aynı oranda steril distile su koyuldu. Boyanan hücreler ölü hücre olarak sayıldı ve sonuçlar yorumlandı (32).

4. BULGULAR

4.1. AGAROZ JEL ELEKTROFOREZİ BULGULARI

E.coli bakterisi içine transforme edilmiş, HIV-1'in *tat* ve LTR DNA dizisini taşıyan plazmitler izole edildi ve arındırıldı. Daha sonra bu plazmitler restriksiyon endonükleazlar (RE) ile kesilerek kaliteleri agaroz jel elektroforezi ile saptandı (Şekil 4.1.).

Agaroz jel elektroforezi



Şekil 4.1. pC15 CAT ve pCV1 plazmitlerinin agaroz jel elektroforezi fotoğrafı

1. Kuyucuk: DNA- Ladder Mix, 2. kuyucuk: RE ile kesilmemiş pC15CAT, 3. Kuyucuk: Hind III, 4. Kuyucuk: BamHI, 5.Kuyucuk: HindIII+ BamHI, 6.Kuyucuk: RE ile kesilmemiş pCV1 7. Kuyucuk: PstI, 8. Kuyucuk: EcoRI

İki plazmit de aynı agaroz jel üzerinde yürütüldü. Agaroz jel elektroforez işlemi birkaç kez yapıldı ve aynı bant oluşumları gözlemlendi.

pC15CAT'ın Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

HindIII ile yapılan kesim sonucunda büyüklükleri yaklaşık 4,6 kBp ve 0,8 kBp olan iki bant, BamHI ile yapılan kesim sonucu büyüklüğü 5,4 kBp olan tek bir bant, HindIII + BamHI ile yapılan kesim sonucunda büyüklükleri yaklaşık 3,0 kBp, 1,6 kBp ve 800 kBp olan üç bant gözlemlendi (Şekil 4.1.).

pCV1'in Agaroz Jel Elektroforezi Bulguları

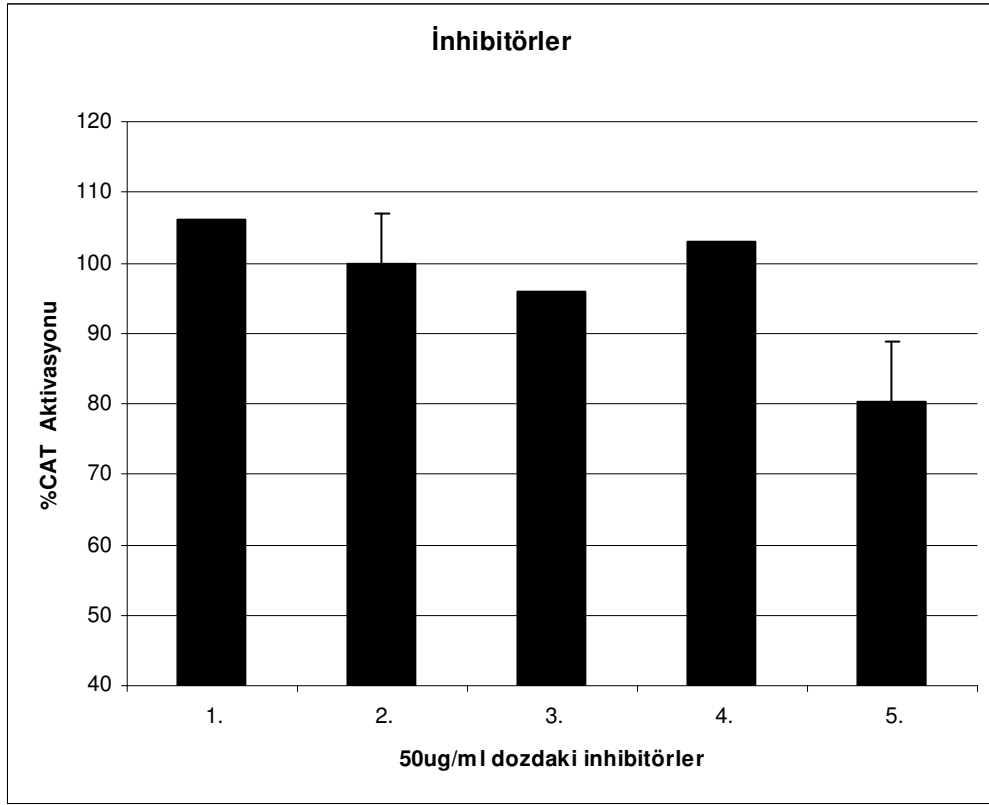
EcoRI ile yapılan kesim sonucunda büyüklüğü yaklaşık 9,2 kBp olan tek bir bant, PstI ile yapılan kesim sonucunda biri yaklaşık 6,2 kBp, diğeri 3,0 kBp olan iki bant gözlemlendi (Şekil 4.1.).

4.2. FARKLI SİSTEİN TÜREVLERİNİN ETKİLERİ

Çalışmada öncelikle, L-sistein hidroklorid, L-sistein etil ester hidroklorid, L-sistein metil ester hidroklorid, L-sistein S-sülfat ve L-sistein sülfonik asit aminoasit türevlerinin 50 µg/ml'lik tek konsantrasyonda CAT aktivasyonu üzerine etkileri incelenmiştir.

Tat-proteinin aktivitesinin CAT ekspresyonu ile doğru orantılı olduğu esasına dayanılarak, Tat protein aktivitesinin inhibe olması durumu CAT aktivasyonunun 100' den az olması ile açıklanmıştır.

Farklı inhibitörlerin % CAT aktivasyonu Grafik 4.1'de gösterilmiştir.



Grafik 4.1. İnhibitörlerin 50µg/ml'lik tek dozda etkileri

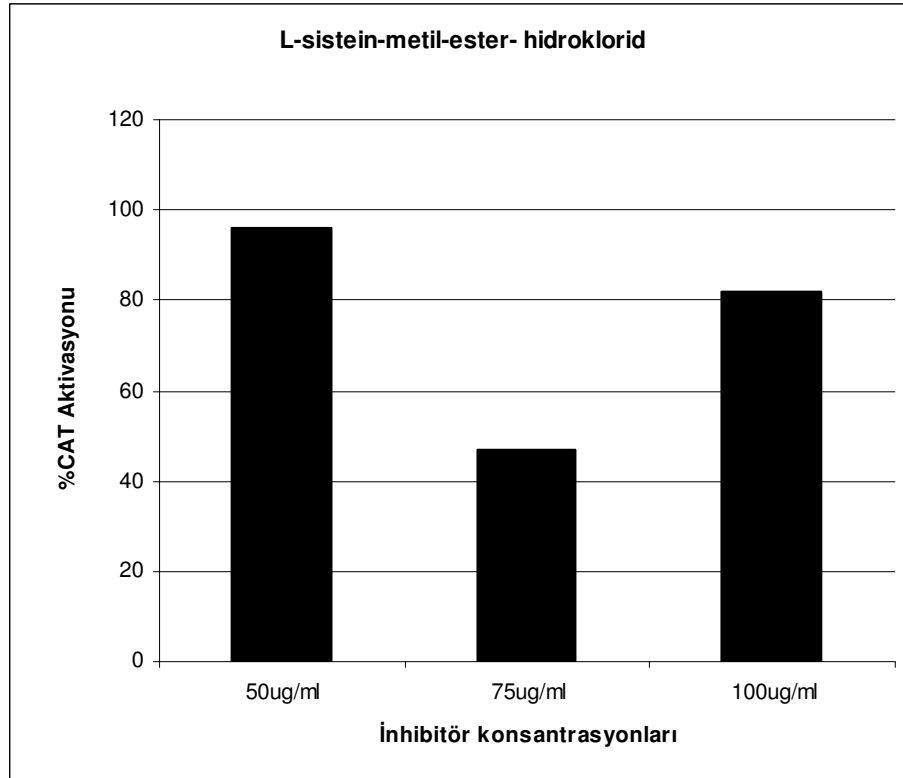
- 1.L-sistein hidroklorid, 2. L-sistein etil ester hidroklorid,
 3.L-sistein metil ester hidroklorid, 4.L-sistein sülfonik asit, 5.L-sistein S-sülfat

CAT aktivasyonları karşılaştırıldığında "L-sistein metil ester hidroklorid", CAT aktivasyonunu %96'ya düşürürken, "L-sistein S-sülfat" dizisi %80.2'ye düşürmüştür. "L-sistein etil ester hidroklorid" ile artış ya da azalış gözlenmemiştir. Bunun yanında "L-sistein hidroklorid" enzim aktivasyonunu %6 arttırmıştır, "L-sistein sülfonik asit" ise %3 arttırmıştır.

Bu bulgular ile sadece "L-sistein metil ester hidroklorid" ve "L-sistein S-sülfat"ın Tat aktivitesi için gerekli olan etkileşimi bloke edebildiği görülmüştür. Bu nedenle L-sistein metil ester hidroklorid ve L-sistein S-sülfat'ın inhibitör etkilerinin doza bağımlı olup olmadığını tespit etmek üzere inhibitörlerin 3 farklı dozdaki etkileri incelenmiştir.

4.3. L-SİSTEİN METİL ESTER HİDROKLORİD'İN ARTAN DOZLARDAKİ ETKİSİ

L-sistein metil ester hidroklorid'in 50µg/ml, 75µg/ml ve 100 µg/ml dozları denenmiş ve CAT enzim aktivasyonu üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması Grafik 4.2'de gösterilmiştir.

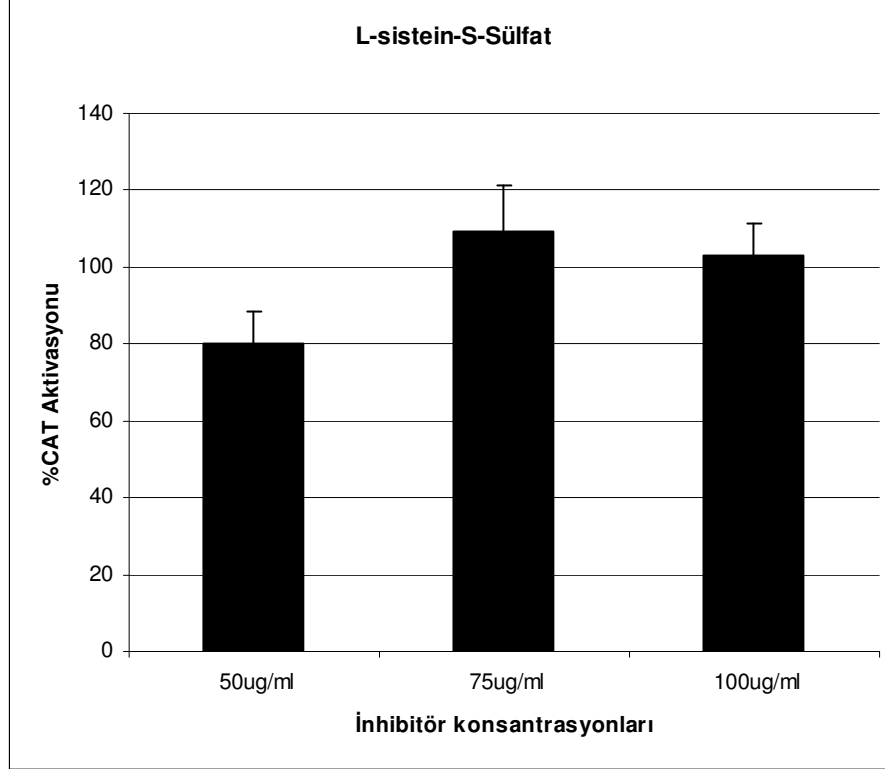


Grafik 4.2.L-sistein metil ester hidroklorid'in artan dozlardaki etkisi

L-sistein metil ester hidroklorid CAT aktivasyonunu 50µg/ml dozda %96'ya, 75µg/ml dozda %47'ye, 100 µg/ml dozda ise %82'ye düşürmüştür.

4.4. L-SİSTEİN S-SÜLFAT'IN ARTAN DOZLARDAKİ ETKİSİ

L-sistein S-sülfat'ın 50µg/ml, 75µg/ml ve 100 µg/ml dozları denenmiş ve CAT enzim aktivasyonu üzerine olan etkilerinin karşılaştırılması Grafik 4.3'de gösterilmiştir.



Grafik 4.3. L-Sistein S-Sülfat'ın artan dozlardaki etkisi

L-Sistein S-Sülfat 50µg/ml dozda CAT aktivasyonunu %80.2'ye düşürürken, 75 µg/ml ve 100µg/ml dozlarda inhibisyon gözlenmemiştir.

4.5. TRİPAN MAVİSİ CANLILIK TESTİ (SİTOTOKSİSİTE TESTİ)

48 saat inkübasyon sonunda yapılan canlılık testinde kuyucuklardaki hücreler tripan mavisi ile boyanıp Thoma lamında sayıldı, canlı ve ölü hücre sayıları tespit edildi. Bu testte her inhibitör için ayrı kuyucuğa on milyon hücre ve 100µg/ml oranında inhibitör koyuldu. Kontrol hücre grubuna inhibitör yerine aynı oranda steril distile su koyuldu. Kontrol ve inhibitörlerin deneme grupları çift kontrollü olduğu için sayılan değerlerin ortalamaları alındı. Elde edilen veriler Tablo 4.1'de gösterilmiştir.

Tablo 4.1. 48 saat inkübasyon sonunda 1ml'de tespit edilen hücre sayıları, 1.inhibitör: L-sistein hidroklorit, 2. inhibitör: L-sistein etil ester hidroklorid, 3. inhibitör: L-sistein metil ester hidroklorid, 4. inhibitör : L-sistein sülfonik asit, 5. inhibitör: L-sistein S-sülfat

Kontrol Hücre Grubu K1+K2/2		1. İnhibitör K1+K 2/2		2. İnhibitör K1+K 2/2		3. İnhibitör K1+K 2/2		4. İnhibitör K1+K 2/2		5. İnhibitör K1+K2/2	
Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı	Ölü	Canlı
5x10 ⁵	3,6x10 ⁶	6x10 ⁵	3.2x10 ⁶	8x10 ⁵	2,8x10 ⁶	6x10 ⁵	3,6x10 ⁶	4x10 ⁵	3,4x10 ⁶	6x10 ⁵	3,4x10 ⁶

5. TARTIŞMA VE SONUÇ

HIV, AIDS'in majör sebebidir. Dünyada tahmini 40 milyon HIV pozitif kişi vardır ve buna her yıl yaklaşık 4 milyon yeni enfekte kişi eklenmektedir.

Yapılan çalışmalar sonucunda HIV enfeksiyonuna karşı revers transkriptaz inhibitörleri (33-36), virüs spesifik proteaz inhibitörleri (37-39), integraz inhibitörleri (40), transaktivatör protein (Tat) inhibitörleri (41-43) ve füzyon inhibitörleri (44) geliştirilmiştir.

Günümüzde HIV'e karşı uygulanan en etkin tedavi şekli HAART (Highly Active Anti-Retroviral Therapy) yöntemidir ve çeşitli inhibitörlerin kombinasyonu şeklinde uygulanmaktadır. HAART tedavisi ile hastalarda virüs konsantrasyonu tesbit edilemeyecek seviyelere inmektedir, fakat bir hafta gibi kısa bir süre aradan sonra, virüs replikasyonu hızla tekrar yükselmektedir (45).

HIV enfeksiyonuna karşı daha etkin bir tedavi yöntemi geliştirebilmek için yoğun çalışmalar yapılmaktadır, bu tedavi yöntemlerinden biri de Tat aktivasyonunun inhibe edilmesidir.

HIV'in replikasyonunu ve virüsün enfektivitesini düzenleyen sisteme katkıda bulunan çeşitli genleri vardır. Bu genlerden biri de *tat*'tır. HIV-Tat protein HIV-enfekte hücreler tarafından üretilir ve HIV-1 replikasyonunun transaktivasyonunda kritik rol oynar. Bu da AIDS tedavisinde transaktivasyonun potansiyel anti-HIV ajanları için ideal hedef

olabileceğini göstermektedir. Aynı zamanda HIV-1 ekstraselüler Tat protein HIV enfeksiyonunun ilerlemede kritik rol oynayan enfekte olmamış hücrelerde çeşitli konakçı faktörlere de neden olur. Tat'ın immunolojik inhibisyonu HIV enfekte hastalarda hastalığın ilerlemesini azaltan terapötik şekil sağlar ve AIDS'in ilerlemesini geciktirir (23,46).

Tat-proteinin başlıca iki fonksiyonu vardır. Birincisi olduğu hücrede, hücre DNA'sına entegre olmuş HIV-genomunu transkriptif ederek yapısal genlerin ekspresyonunu ve yeni virüslerin oluşmasını sağlamaktır (hücre içi işlevi) (47,48). Bu proteinin ikinci fonksiyonu olduğu hücreden çıkıp hücre dışında gösterdiği etkidir (hücre dışı işlevi). Hücre dışı işlevini iki bölümde incelemek mümkündür. Birincisi HIV ile enfekte olmuş, fakat latent evrede olan hücrelere girerek entegre olmuş HIV-genomunu transkriptif edip yeni virüslerin oluşmasını sağlar. İkincisi henüz HIV ile enfekte olmamış hücrelerde çeşitli genlerin ekspresyonunu sağlayarak immunsupresyona veya apoptoza yol açarak immun sistemdeki hücrelerin yok olmasına neden olur ve kalıtım sisteminin çökmesini sağlar (49). Bu da çeşitli tümörlerin ve oportunistik enfeksiyonların oluşmasına neden olur.

Tat-protein 86-101 aminoasitten oluşmaktadır ve iki ekson tarafından kodlanır (33,50). Birinci eksondaki kodların translasyonu ile 72 amino asit içeren polipeptit sentezlenir ve bu polipeptidin 3 fonksiyonel bölgesi vardır. Polipeptidin açık amino ucuna yakın bölgesinde, asidik karakterdeki amino asitler fazla miktarda bulunmaktadır. Ayrıca 2. ve 18. aminoasitler arasında üç kez tekrarlanan prolinxxxprolin zinciri mevcuttur. 22. ve 37. aminoasitler arasındaki bölge fazla sayıda sistein içerir ve aktivitesi için önemli olan metal iyonlar ile bağ oluşturma özelliğine sahiptir (51). 48. ve 56. aminoasitler arasındaki kısım bazik aminoasitlerin yoğun olduğu bir bölgedir ve Tat-protein bu aminoasitler üzerinden nükleik asit zinciri ile bağ kurar ve HIV-genomunu transkriptif eder (52).

Tat-proteinin 22-37 aminoasit zinciri arasında bulunan sisteinlerin bulunduğu bölge yeni anti-HIV etkili bileşiklerin geliştirilmesinde önemli bir yer tutmaktadır. Bu bölgenin bloke edilerek, HIV'in replikasyonunun engellenmesi, AIDS tedavisine yeni bir yol açabilme şansı doğuracaktır.

Tat aktivasyonunun sistein türevleri ile inhibe edilmesine yönelik birçok çalışma yapılmıştır.

1988 yılında yapılan bir çalışmada Chandra ve ark (23), sistein benzeri olan D-Penicillamin'in Tat-protein (Transactivator of Transcription) ile katalize edilen HIV-1-LTR transaktivasyonunu konsantrasyona bağlı olarak inhibe ettiğini tespit etmişlerdir.

Başka bir çalışmada Demirhan ve ark (53), tiyol grubu taşıyan değişik bileşiklerin Tat-proteini ile yönlendirilen HIV-1-LTR transaktivasyonu üzerine olan etkilerini incelemişlerdir. N-(2-merkaptopropiyonil)glisin (MPG), 2,3-dimerkaptopropanol (DMP) ve 2,3-dimerkaptopropan sulfonik asit (DMPS) ile Jurkat ve U937 hücrelerinde yapılan testlerde transaktivasyon değişik derecelerde inhibe edilebilmiştir. Bu bileşiklerden DMP ve DMPS'nin, H9-hücreleri ile yapılan araştırmalarda, antiviral etki göstermekle beraber yüksek derecede sitotoksik oldukları da tespit edilmiştir.

Diğer bir araştırmada Demirhan ve ark (54), D-penisilaminin L isomerine göre Tat araçlı inhibisyonda, daha etkili bir inhibitör olduğunu tesbit etmişlerdir. Çalışmada HIV-1 Tat'a D ve L penisilaminin bağlanması sağlanmış ve Tat proteinin 20-38 aminoasitleriyle kaplanmış olan sisteince zengin bölgesine D-penisilaminin seçici olarak bağlandığı, L-isomerin bu seçiciliği göstermediği gözlenmiştir. Ayrıca anti-HIV aktiviteye sahip ilk rapor edilen Tat araçlı transaktivasyon inhibitörü D-penisilamindir ve D-penisilamin sisteinin yapısal analogudur. L-isomerler ise hücre proteinlerin içlerine girmeleri yüzünden yüksek toksisite gösterirler. L-penisilaminin nörotoksitesite literatürle belgelenmiştir.

Shogo Misumi ve ark (28), ekstraselüler HIV-1 Tat proteinin sisteince zengin bölgesine Zn'nin bağlanmasının, Tat- proteinin indüklediği hücre ölümüyle ilgili olduğunu göstermişlerdir. Zn bağlanmış sisteince zengin bölge, HIV-1'in ilerlemesine sebep olan ekstraselüler Tat protein araçlı patojenezin kontrolü için anti-Tat aşısı ve ajanların geliştirilmesinde moleküler bir hedeftir.

Krishnakumar Devadas ve ark (29), modifiye TAT 21-40 ve TAT 53-68 peptitlerini kapsayan çoklu peptit konjugat sistemi sentezlemişlerdir ve böylece potansiyel antijen olarak fonksiyonel aktif peptitlerin kullanılması ile Tat proteinin fonksiyonel bölgelerine bağlanabilen ve viral replikasyonda Tat indükleyici etkiyi inhibe eden antikolar üretilebilmiştir. Bu çalışmada HIV-1 Tat proteinin modifiye fonksiyonel bölgelerinden oluşan yeni, sentetik, çoklu peptit konjugat sistemi kullanılmıştır. Sisteince zengin Tat'ın 21-40 peptitinde serbest sülfidril metil veya t-butil grupları ile bloke edilir ve arjinince zengin Tat'ın 53-68 peptitinde guanidin grupları üre zinciriyle

yer değiştirir. Bu modifikasyonlar bu peptitlerle alakalı birçok patolojik özelliği bloke eder.

Tat HIV enfekte insanların serumunda ortaya çıkan saklanmış bir proteindir ve elektrostatik etkileşimlerle, kemokin reseptleriyle veya hücre yüzeyindeki integrinlerle hücre yüzeyine bağlanır. Sisteince zengin bölge (aa 22-37) ve çekirdek bölgesi (1-48) beraberce invitro transkripsiyon için kuk aktivasyon bölgesini oluşturur. Sisteince zengin bölge HIV-1 in farklı izolatları arasında yüksek derecede korunmuştur ve invitro koşullarda monositlerde HIV enfeksiyonunun patojenitesine aracılık etmektedir. Lin Zheng ve ark (55) ekstraselüler HIV Tat ve Tat'ın sisteince zengin peptitinin monositlerdeki CCR5 ekspresyonunu arttırdığını göstermişlerdir. CCR5, HIV enfeksiyonunda anahtar koreseptrdr.

Tez çalışmasında kullanılan pC15CAT ve pCV1 plazmitleri Arya ve ark'nın (31) alışmasından faydalanarak seçilmiştir. Bu plazmitlerin kalitelerini belirlemek üzere yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunda elde edilen jel fotoğrafı Şekil 4.1.'de gösterilmiştir. Oluşan bant büyüklükleri literatür ile kıyaslanmıştır.

Literatüre göre pC15CAT plazmiti BamHI ile tek noktadan kesilir ve büyüklüğü 4.8 kBp olan bir bant oluşumu gözlenir. Yaptığımız agaroz jel elektroforezinde ise 5.4 kBp'lık bir bant gözlenmiştir. HindIII ile iki noktadan kesilen pC15CAT literatüre göre biri 4.5 kBp 'lık diğer 0.3 kBp'lık iki bant oluştururken, yaptığımız agaroz jel sonucunda yaklaşık 4.6 kBp ve 0.8 kBp 'lık iki bant oluşumu gözlenmiştir (Şekil 4.1).

Literatüre göre pCV1 EcoRI ile tek noktadan kesilir ve büyüklüğü 9.2 kBp olan bir bant oluşumu gözlenir. pCV1 PstI ile iki noktadan kesilir, biri yaklaşık 6.2 kBp, diğer 3.0 kBp olan iki bant gözlenir. pCV1 plazmiti için oluşan bantlar literatür ile uyumlu bulunmuştur (Şekil 4.1).

Bu tez çalışmasında, sistein türevlerinin Tat aktivitesi üzerindeki inhibe edici etkileri araştırılmıştır. Çalışma için yapısında sistein içeren beş farklı aminoasit türevi seçilmiştir. Bunlar L-sistein hidroklorid, L-sistein etil ester hidroklorid, L-sistein metil ester hidroklorid, L-sistein slfinik asit ve L-sistein S-sülfattır.

Yapılan alışmalar doğrultusunda, sistein türevleri kullanılarak Tat aktivitesinin inhibe edilmesi amaçlanmıştır. Tat protein aktivitesinin %CAT aktivasyonu ile doğru orantılı olduğu esasına dayanarak elde edilen bulgular değerlendirilmiştir.

Tez çalışmasında %CAT aktivasyonu CAT ELISA kiti ile ölçülmüştür. Sonuç olarak, CAT aktivasyonları karşılaştırıldığında "L-sistein metil ester hidroklorid" CAT aktivasyonunu %96'ya düşürürken, "L-sistein S-sülfat" %80.2'ye düşürmüştür. "L-sistein etil ester hidroklorid" ile artış ya da azalış gözlenmemiştir. Bunun yanında "L-sistein hidroklorid" enzim aktivasyonunu %6 arttırmıştır, "L-sistein sülfonik asit" ise %3 arttırmıştır (Grafik 4.1.).

İnhibisyon gözlemlenen inhibitörlerde, inhibitörlerin 50µg/ml, 75µg/ml ve 100 µg/ml dozları denenmiştir. L-sistein metil ester hidroklorid CAT aktivasyonunu 50µg/ml dozda %96'ya, 75µg/ml dozda %47'ye, 100 µg/ml dozda ise %82'ye düşürmüştür. (Grafik 4.2.) .

L-Sistein S-Sülfat 50µg/ml dozda CAT aktivasyonunu %80.2'ye düşürürken, 75 µg/ml ve 100µg/ml dozlarda inhibisyon gözlenmemiştir (Grafik 4.3.).

Bu sonuçlara göre, her iki inhibitörün de inhibe edici etkilerinin doza bağımlı olmadığı görülmüştür. L-sistein metil ester hidroklorid'in CAT aktivasyonunu en iyi inhibe ettiği dozun 75µg/ml, L-Sistein S-Sülfat'ın CAT aktivasyonunu en iyi inhibe ettiği dozun ise 50µg/ml olduğu görülmüştür.

Tez kapsamında yapılan toksisite testi sonucu kontrol grubundaki canlı hücre sayısı %100 olarak alınıp sonuçlar değerlendirilmiştir. Toksikite sonuçları Tablo 4.1.'de verilmiştir.

İnhibitör etkisi araştırılan bileşiklerden L-sistein etil ester hidroklorid'le yapılan toksisite testi sonucunda kontrol grubuna göre ölü hücre sayısı fazla çıkmıştır. Bu da bu inhibitörün toksik etkisi olabileceği şeklinde yorumlanabilir. Diğer inhibitörlerin toksik etkileri olmadığı düşünülmektedir.

Bu çalışmada HIV replikasyonu için önemli olan Tat aktivasyonu, sistein türevleri ile inhibe edilmeye çalışılmıştır. Bu amaçla yapılan çalışma sonucunda L-sistein S-sülfat ve L-sistein metil ester hidroklorid'in inhibe edici etkileri olduğu gözlenmiş ve bu bileşikler artan dozlarda denenmiştir. Bu çalışmalar sonucunda her iki bileşik için de inhibisyonun doza bağlı olmadığı gözlenmiştir.

Sonuç olarak L-sistein S-sülfat'ın CAT aktivasyonunu en iyi inhibe ettiği dozun 50µg/ml, L-sistein metil ester hidroklorid'in CAT aktivasyonunu en iyi inhibe ettiği

dozun 75µg/ml olduğu saptanmıştır. Bu alışma sonucunda elde edilen verilerin AIDS tedavisi için geliştirilecek ilaçlar açısından önemli olduğu düşünülmektedir.

6. KAYNAKLAR

1. Ustaçelebi Ő. Temel ve Klinik Mikrobiyoloji. GüneŐ Kitapevi Ltd.Şti.,1999:987-994.
2. Korkmaz T. Mikrobiyoloji 2000. Asya Tıp Yayıncılık,1998:315-320.
3. Sharma A. Molecular pathogenesis of Human Retroviruses HIV-1 and HTLV-1. Master of Science, Sophia College, India, December 9, 2006.
4. Popovic M, Sarngadharan MG, Read E, Gallo RC. A method for the detection, isolation, and continuous production of cytopathic human T-lymphotropic retroviruses of the HTLV family (HTLV-III) from patients with AIDS and pre-AIDS. Science 1984;224:497-500.
5. Lewthwaite P, Wilkins E. Natural History of HIV/AIDS. Medicine 2005;33:6.
6. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, et al. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk for acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 1983;220:868-871.
7. Jawez E, Melnick JL, Adelberg EA, Brooks GF, Butel JS. Medical Microbiology, Appleton&Lange,1989:351-354, 513-515.
8. Lemey P, Pybus OG, Rambaut A, Drummond AJ, Robertson DL. The molecular population genetics of HIV-1 group O. Genetics 2004;167:1059-1068.
9. Murray PR, Rosenthal KS, Kobayashi GS, Pfaller MA. Medical Microbiology. St Louis.

- Mosby, 1998.
10. Ustaçelebi Ş. İnsan immün yetmezlik virüsü: Yapı ve genel özellikler. HIV/AIDS 1998;1:45-51.
 11. Cherrington J, Ganem D. Regulation of polyadenylation in Human Immuno Deficiency Virus (HIV): Contributions of Promoter Proximity and Upstream Sequences. EMBO Journal 1992;4:1513-1524.
 12. Rizzuto CD. Molecular interactions in HIV-1 Entry. Doctor of Philosophy. Harvard University, Cambridge, Massachusetts, 1999.
 13. Turner BG, Summers MF. Structural Biology of HIV. J. Mol. Biol. 1999;285:1-32.
 14. Molina AJ, Ding J, Nanni RG, Clark AD, et al. Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. Biochemistry 1993;90:6320-6324.
 15. Muler PH, Varmos HE. DNA Bending Creates Favored Sites for Retroviral Integration: an Explanation for Preferred Insertion Sites in Nucleosomes, EMBO Journal 1994;13:4704-4714.
 16. Chandra P, Gerber T, Chandra A. Novel features of retroviruses associated with human diseases. FEBS Letters 1990;2:415-421.
 17. Campo IA, Cochrane A. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Rev Function Requires Continued Synthesis of Its Target mRNA. Journal of Virology 1996;70:8332-8339.
 18. Brigati C, Giacca M, Noonan D, Albin A. HIV Tat, its Targets and the control of viral gene expression. FEMS Microbiology Letters 2003;220:57-65.
 19. Kahanchı F, Sadaie R, Brady J. Inhibition of HIV-1 Transcription and Virus Replication Using Soluble Tat Peptide Analogs. Virology 1997;227:431-438.
 20. Bitterlich G, Tretiakova A, Richardson MW, Khalili K, et al. Structure and function of HIV-1 and SIV Tat proteins based on carboxy-terminal truncations, chimeric Tat constructs, and NMR modeling. Biomed&Pharmacother 1998;52:421-30.
 21. Pagtakhan S, Starksen T. Interactions between Tat of HIV-2 and Transcription Factor Sp1. Virology 1997;238:221-230.
 22. Sawaya B, Thatikunta P, Denisova L, Brady J, et al. Regulation of TNF α and TGF β -1 gene transcription by HIV-1 Tat in CNS cells. Journal of Neuroimmunology 1998;87:33-42.

23. Chandra A, Demirhan İ, Arya S.K., Chandra P. D-Penicillamine inhibits transactivation of human immunodeficiency virus type-1 (HIV-1) LTR by transactivator protein. *FEBS Letters* 1988;236:282-286.
24. Joint United Nations Programme on HIV/AIDS and World Health Organization 2007.
25. Ham RC, Finbery RW, Mullaney S, et al. Protective cellular retroviral immunity requires both CD4+ and CD8+ immune T cells. *J Virol.* 1991;65:220.
26. Kayaalp SO. *Tıbbi Farmakoloji. Hacettepe-Taş Kitapçılık Ltd. Şti.,2000;352-356.*
27. Lapidot A, Litovchick A. Novel HIV Tat Antagonists. *Drug Development Research* 2000;50:502-515.
28. Misumi S, Takamune N, Ohtsubo Y, Waniguchi K, Shoji S. Zn Binding to Cysteine-Rich Domain of Extracellular Human Immunodeficiency Virus Type 1 Tat Protein Is Associated with Tat Protein-Induced Apoptosis. *AIDS Research and Human Retroviruses* 2004;3:297-304.
29. Devadas K, Boykins R, Hewlett I, Wood O, et al. Antibodies against a multiple-peptide conjugate comprising chemically modified human immunodeficiency virus type-1 functional Tat peptides inhibit infection. *Peptides* 2007;28:496-504.
30. Yajima S, Shionaya H, Akagi T, Hamasaki K. Neamine derivatives having a nucleobase with a lysine or an arginine as a linker, their synthesis and evaluation as potential inhibitors for HIV-1 TAR-Tat. *Bioorganic&Medical Chemistry* 2006;14:2799-2809.
31. Arya SK, Guo C, Josephs SF, Wong-Staal F. Transactivator gene of human T-lymphotropic virus type III (HTLV III). *Science* 1985;229:69-73.
32. Sambrook J, Russell DW. *Molecular Cloning A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor Laboratory Pres. 2001;5.4-5.13,17.19-17.22.
33. De Clercq E. What can be expected from non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs) in the treatment of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infections? *Rev.Med. Virol.* 1996;6:97-117.
34. Doerr HW, Weber B. Antivirale Chemotherapie bei HIV-Infektion und AIDS. *Chemotherapie. J.*1995;4:185-193.
35. Groschel B, Meier C, Zehner R, Cinatl J, et al. Effects of cycloSald4TMP derivatives in H9 cells with induced AZT resistance phenotype. *Nucleosides Nucleotides* 1999a;18:933-936.

36. Groschel B, Himmel N, Cinatl J, Perigaud C, et al. ddC- and 3TC-bis(SATE) monophosphate prodrugs overcome cellular resistance mechanisms to HIV-1 associated with cytidine kinase deficiency. *Nucleosides Nucleotides* 1999b; 18:921-926.
37. Moyle G, Gazzard B. Current knowledge and future prospects for the use of HIV protease inhibitors. *Drugs* 1996;51:701-712.
38. Noble S, Faulds D. Saquinavir. A review of its pharmacology and clinical potential in the management of HIV infection. *Drugs* 1996;52:93-112.
39. Faulds D, Brogden RN. Didanosine a review of its antiviral activity, pharmacokinetic properties and therapeutic potential in human immunodeficiency virus infection. *Drugs* 1992;44:94-116.
40. De Clercq E. Antiviral therapy for human immunodeficiency virus infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 1995;8:200-239.
41. Hsu MC, Schutt AD, Holly M, Slice LW, et al. Inhibition of HIV replication in acute and chronic infections in vitro by a Tat antagonist. *Science* 1991;254:1799-1802.
42. Hsu MC, Dhingra U, Earley JV, Holly M, et al. Inhibition of type 1 human immunodeficiency virus replication by a tat antagonist to which the virus remains sensitive after prolonged exposure in vitro. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1993;90:6395-6499.
43. Witvrouw M, Pauwels R, Vandamme AM, Schols D, et al. Cell typespecific anti-human immunodeficiency virus type 1 activity of the transactivation inhibitor Ro5-3335. *Antimicrob. Agents Chemother* 1992;36:2628-2633.
44. Kilby JM, Hopkins S, Venetta TM, DiMassimo B, Cloud GA. Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.* 1998;4:1302-1307.
45. Fauci AS. Host Factors in the Pathogenesis of HIV Disease. *J. Human Virol.* 1999;2:176.
46. Devadas K, Boykins R, Hardegen N, Philp D, et al. Selective side-chain modification of cysteine and arginine residues blocks pathogenic activity of HIV-1-Tat functional peptides. *Peptides* 2006;27:611-621
47. Ensoli B, Buonaguro L, Barillari G, Fiorelli V, et al. Release, uptake, and effects of extracellular human immunodeficiency virus type 1 Tat protein on cell growth and viral transactivation. *J. Virol.* 1993;67:277-287.

48. Demirhan I, Chandra A, Hasselmayer O, Chandra, P. Intercellular traffic of human immunodeficiency virus type 1 transactivator protein defined by monoclonal antibodies. *FEBS Letters* 1999; 445: 53-56.
49. Zauli G, Davis BR, Re MC, Visani G, et al. Tat protein stimulates production of transforming growth factor-beta 1 by marrow macrophages: a potential mechanism for human immunodeficiency virus-1-induced hematopoietic suppression. *Blood* 1992;80: 3036-3043.
50. Sodroski J, Patarca, R, Rosen C, Wong-Staal F, Haseltine W. Location of the transactivating region on the genome of human T-cell lymphotropic virus type III. *Science* 1985;229: 74-77.
51. Frankel AD, Brecht DS, Pabo CO. Tat protein from human immunodeficiency. *Virus Forms a metal-linked dimer. Science* 1988; 240: 70-73.
52. Hauber J, Malim MH, Cullen BR. Mutational analysis of the conserved basic domain of human immunodeficiency virus tat protein. *J. Virol* 1989. 63: 1181-1187.
53. Demirhan I, Chandra A, Sarin PS, Hasselmayer O, et al. Inhibition of Tat-mediated HIV-1-LTR transactivation and virus replication by sulfhydryl compounds with chelating properties. *Anticancer Res* 2000; 20: 2513-2518.
54. Demirhan I, Kanyalkar M, Chandra A, Doerr HW, et al. Docking studies reveal a selective binding of D-penicillamine to the Transactivator Protein of human immunodeficiency virus type 1. *FEBS Letters* 2002;516(1-3):43-46.
55. Zheng L, Yang Y, Lu G, Salvato M. Extracellular HIV Tat and Tat cysteine rich peptide increase CCR5 expression in monocytes. *Journal of Zhejiang University Science* 2005; 6B(7):668-672.

ÖZGEÇMİŞ

1980 yılında Kayseri’de doğdu. İlkokulu 1987-1992 yılları arasında Ahmetpaşa İlkokulu’nda, ortaokulu 1992-1996 yılları arasında Sami Yangın Anadolu Lisesi’nde, liseyi 1996-1998 yılları arasında Kayseri Fen Lisesinde ve 1998-1999 yılları arasında Melikgazi Lisesinde tamamladı.

Lisans eğitimini 1999-2003 yılları arasında Hacettepe Üniversitesi Eczacılık Fakültesi’nde tamamladı. 2004 yılında Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesinde araştırma görevlisi olarak çalışmaya başladı. 2005-2006 eğitim-öğretim yılında Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Biyokimya Anabilim Dalında yüksek lisansa başladı. 2007 yılında Erciyes Üniversitesi Eczacılık Fakültesindeki görevinden istifa edip, eczane eczacısı olarak çalışmaya başladı. Halen eczane eczacısı olarak çalışmaktadır.

Adres

Mimarsinan Mah. Billur Cad.

No:83/C Kocasinan/KAYSERİ

Tel: 2236046