



**Afrika Yeşil Maymunu CV-1 Hücre
Hatlarında, HIV-1 Tat Proteini Varlığında Üretilen
SLPI Proteininin İnsan Hücre Hatlarındaki
Üretiminin İncelenmesi ve HIV-1 LTR Promotoruna
Etkisinin Araştırılması**

Program Kodu: 1001

Proje No: 115S213

Proje Yürütücüsü:
Doç. Dr. Alper ARSLANOĞLU

Araştırmacılar:

Prof. Dr. Ahmet KOÇ
Doç. Dr. Çağlar H. KARAKAYA

Bursiyerler:

Dilara DEMİRCİ
Aysu ÖZKAN
Yavuz MERCAN



Önsöz

AIDS hastalığına sebebiyet veren HIV-1 virüsünün tanımlanmasının üzerinden 35 yıl geçmiş olmasına rağmen, enfeksiyonu engelleyici bir aşı veya virüsün enfekte ettiği bireylerden tamamen yok edilmesi sağlayan herhangi bir ilaç henüz geliştirilememiştir. Hastaların tedavisindeki yaklaşım, vücutlarındaki viral yükün HIV-1 enzimlerini hedef alan ilaç kombinasyonları ile kontrol altına alınmasıyla AIDS'e yakalanmalarının engellenmesidir. Ancak HIV-1 virüsü, uzun yıllar bu ilaçları alan bireylerde ilaçlara karşı direnç geliştirmekte ve hastalar AIDS' yakalanabilmektedir. Bu nedenle günümüzde hala HIV-1'e karşı etkili yeni ilaç ve yöntemler araştırılmaktadır. İnsanlar gibi primat olan eski dünya maymunları HIV-1'e karşı dirençlidirler. Bunun temel nedeni hücrelerinde, insan hücrelerinde bulunmayan HIV-1 engelleyici proteinlerin varlığıdır. Bu proteinlerin bir kısmının belirlenmiş olmasına rağmen, henüz ortaya çıkarılmamış başka proteinlerin de olabileceğini yapılan araştırmalar göstermiştir. Eski dünya maymunlarındaki bu direnç mekanizmaları, hem konakçı-patojen arasındaki etkileşimlerinin aydınlatılması hem de HIV-1'e karşı etkin bir yöntem geliştirilebileceği umuduyla yoğun ilgi çekmektedir. Biz de, TÜBİTAK tarafından desteklenmiş olan ve HIV-1 enfeksiyonuna dirençli oldukları bilinen maymun hücrelerinde yeni proteinlerin ortaya çıkarılmasını hedefleyen bu araştırma projemizin sonucunda, daha önce insan vücut salgılarında bulunan ve hücre dışı anti-HIV-1 etkileri olduğu gösterilmiş SLPI proteininin, maymun hücrelerinde HIV-1 enfeksiyonunun algılanmasıyla hücre içerisinde de üretilmeye başladığını ve daha önce tanımlanmamış farklı bir mekanizma ile hücre içerisinde anti-HIV-1 etki gösterdiğini ortaya çıkarmış bulunuyoruz.

İçindekiler

1. GİRİŞ.....	1
2. GENEL BİLGİLER.....	1
3. GEREÇ ve YÖNTEM.....	5
3.1 Plasmidler.....	5
3.2 Primerler.....	7
3.3 Hücre Hatları.....	7
3.4 DNA Transfeksiyonu ve Kalıcı Hücre Hattı Oluşturulması.....	7
3.5 cDNA sentezi.....	8
3.6 Western Blot ile protein tayini.....	8
3.7 LacZ Repoter Gen Aktivite Ölçümü.....	9
4. BULGULAR.....	9
4.1 HIV-1 Tat proteinini stabil (kalıcı) olarak eksprese eden insan ve maymun hücre hatlarının hazırlanması ve hem RNA hem de Western Blot ile protein seviyesinde analizi.....	9
4.2 Rekombinant HIV-Tat proteininin fonksiyonel analizinin 293-Tat hücrelerinde yapılması.....	11
4.3 İnsan ve Maymun hücre hatlarındaki SLPI üretiminin mRNA düzeyinde incelenmesi.....	12
4.4 İnsan ve maymun hücre hatlarındaki SLPI üretiminin protein düzeyinde incelenmesi.....	13
4.5 HIV-1 Tat üreten ve üretmeyen İnsan ve maymun hücrelerindeki NF-kB promotoru aktivitesinin araştırılması.....	13
4.6 HIV-1 Tat üreten ve üretmeyen İnsan ve maymun hücrelerindeki SLPI üretiminin HIV-1 LTR promotoru üzerindeki etkisinin araştırılması.....	14
4.7 HIV ile enfekte olmuş hücre hatlarındaki çalışmalar.....	15
5. TARTIŞMA ve SONUÇ.....	17
Kaynaklar.....	18

Tablolar

Tablo 1. Kullanılan primerler ve sekansları.....	6
Tablo 2. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri.....	7

Şekiller

Şekil 1. HIV-1 LTR promotoru transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri.....	4
Şekil 2. Çalışmada kullanılan plazmidlerin haritaları.....	6
Şekil 3. Oluşturulan kalıcı hücre hatların RNA'larının agaroz jelde kontrol edilmesi.....	8
Şekil 4. İnsan 293 Kalıcı hücre hatlarından elde edilen cDNA'ların PCR sonuçları.....	11
Şekil 5. Tavuk anti-HIV-1 tat primer poli-klonal antikoru ile yapılan Western Blot analizi.....	11
Şekil 6. Tat proteininin fonksiyonelliğinin incelenmesi.....	12
Şekil 7. Farklı maymun ve insan hücre hatlarındaki SLPI gen ifadenme seviyeleri.....	13
Şekil 8. HIV-1 Tat proteinini üreten ve üretmeyen hücre hatlarında SLPI proteini üretiminin Western Blot yöntemi ile analizi.....	14
Şekil 9. NFkB bağımlı lusiferaz reporter plazmidi transfekte edilmiş insan ve maymun hücrelerindeki lusiferaz aktivitesi seviyeleri.....	15
Şekil 10. HIV-1 LTR promotoruna bağımlı lusiferaz reporter plazmidi transfekte edilmiş insan ve maymun hücrelerindeki lusiferaz aktivitesi seviyeleri.....	16
Şekil 11. HIV-1 ile enfekte edilmiş insan ve maymun hücrelerindeki SLPI gen ifadenmesinin enfekte olmamış hücrelerle kıyaslanması.....	17
Şekil 12. HIV ile enfekte edilmiş hücrelerde SLPI proteininin aşırı ifadenmesinin virüs üretimine etkisi.....	17



Özet

Projemiz, HIV-1 enfeksiyonuna dirençli oldukları bilinen Afrika Yeşil Maymunu hücrelerinde daha önce varlığı tespit edilmemiş HIV-1 engelleyici protein veya proteinlerin varlığını araştırmayı amaçlamıştır. Söz konusu proteinlerin hücre içi bağışıklık mekanizmaları tarafından virüs varlığının algılanmasından sonra üretilmesi ihtimali göz önüne alındığında, HIV-1 ile enfekte olan hücrelerde ilk üretilen iki viral proteinden birisi olan Tat proteininin varlığı virüs enfeksiyonunun belirteci olabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi ve kütle spektrometrisi kullanılarak yapılan proteomik ön çalışmalarımız, ardından da proje kapsamında yaptığımız Western Blot ve gerçek zamanlı PZR çalışmaları neticesinde, maymun hücrelerinde SLPI proteininin HIV-1 Tat varlığında arttığı, ancak insan hücrelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. SLPI proteininin, raportör gen kullanımıyla yapılan transkripsiyon trans-aktivasyon analizleri neticesinde HIV-1 promotörü üzerine baskılayıcı etkisi olduğu anlaşılmış, enfeksiyon deneylerinde de HIV-1 üretimini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir.

Anahtar kelimeler: anti-HIV-1, SLPI, Tat



Abstract

Our Project is aimed at the investigation of the presence of previously unidentified anti-HIV-1 protein(s) in African Green Monkey cells that are known to be resistant to HIV-1 infection. we hypothesized that monkeys might have evolved resistance mechanism(s) against HIV-1 by switching specific genes on in response to synthesis of viral proteins in infected cells. This strategy would not only help cellular economy but could also protect the cells from potential side effects of viral induced genes unless the cells are infected with the virus. HIV-1 Tat is among the first viral proteins to be synthesized in the infected cells and it regulates HIV-1 gene expression. Our studies showed that, SLPI protein was overexpressed in monkey but not human cells in the presence of HIV-1 Tat protein. We also showed that, SLPI down regulated the HIV-1 LTR promoter and decreased the production of virus particles in the infected cells.

Keywords: anti-HIV-1, SLPI, Tat



1. GİRİŞ

Afrika yeşil maymununun (AYM) da içinde bulunduğu eski dünya maymunu türleri HIV-1'e karşı dirençlidirler. HIV-1 virüsü, bu maymunların hücrelerine girebilmesine rağmen hücre içinde viral genomun entegrasyonundan önceki aşamalarda bloke olmaktadır. Literatürdeki çalışmalar, bu blokajdan TRIM5-alfa proteininin sorumluğu olduğunu göstermiştir. Ancak daha sonra, yüksek dozdaki enfeksiyonlarda bazı virüs parçalarının bu proteinin etkisinden kaçıp hücre genomuna entegre ola bildiği gösterilmiştir. Buna rağmen, bu maymun türlerinin HIV-1'e karşı dirençli olması TRIM5-alfa proteini haricinde virüs üzerinde kısıtlayıcı etki gösterebilen başka protein/proteinlerin olabileceğinin güçlü bir kanıtıdır.

2. GENEL BİLGİLER

Virüs enfeksiyonlarının temizlenmesinde edinilmiş bağışıklık sistemi yanında doğal bağışıklığın mekanizmalarının bir şekli olan hücre içi (dahili) bağışıklık da önemli rol oynamaktadır. Dahili anti-viral bağışıklık, virüs replikasyonunu ve oluşumunu doğrudan kısıtlayarak hücreyi belirli bir virüs veya benzer virüslere karşı dirençli kılabilmektedir. Dahili bağışıklık, bazı hücre türlerinde genelde önceden var olan kısıtlayıcı faktörler tarafından sağlanır, ancak bu faktörler virüs enfeksiyonu ile daha da uyarılabilir. Dahili viral kısıtlama faktörleri virüse özgü molekül veya bileşenleri tanır, ancak interferonları ve diğer anti-viral molekülleri indükleyerek dolaylı olarak viral enfeksiyonu engelleyen diğer kalıp tanıma reseptörlerinin (PRR) aksine, dahili anti-viral faktörler viral çoğalmayı derhal ve doğrudan bloke eder (Yan ve Chen, 2012).

Retrovirüslerin konakçı organizmalarla karşılıklı etkileşimlerinin araştırılmaya başlanmasıyla dominant etki gösteren bazı engelleyici gen ürünlerinin bu canlıların virüslere karşı duyarlılığını kontrol ettiği keşfedilmiştir (Towers ve Goff, 2003; Bishop vd., 2006; Malim ve Bieniasz, 2012; Bieniasz, 2003). Kısıtlayıcı faktörler olarak da bilinen bu anti-retroviral proteinler (Bieniasz, 2003; Harris vd., 2012) retroviral enfeksiyonlara karşı hücre içi bağışıklık (intrinsic immunity) sağlarlar (Kaiser vd., 2007; Yan ve Chen, 2012; Bieniasz, 2004).

Uzun yıllar fare genomunda keşfedilen Fv1 (friend virus susceptibility factor 1) geninden başka kısıtlayıcı faktör bulunmaması nedeniyle bu retroviral kısıtlayıcı faktörlerin farelere özgü olduğu düşünülmekteydi (Best vd., 1996). Daha sonra yapılan çalışmalar ışığında, benzer engelleyici proteinlerin çok daha yaygın oldukları ve diğer memeli türlerinde de benzer proteinlerin bulunduğu



keşfedilmiştir. Memeli hayvanlarda Fv1 dışında retroviral enfeksiyonlara karşı böyle bağışıklık sağlayan başlıca dört protein daha bulunmuştur: TRIM5-alpha, APOBEC3G, tetherin ve SAMHD1 (Zhang vd., 2006; Harris ve Liddament, 2004; Passerini vd., 2006; Nisole vd., 2005; Wichroski vd., 2006; Neil vd., 2008).

HIV-1'e karşı böyle bir blok eski dünya maymunlarında bulunmaktadır. Resus makak ve Afrika yeşil maymunları en iyi bilinen eski dünya maymunu türlerindedir (Shibata vd., 1995; Munk vd., 2002; Strebel vd., 2009). Bu maymun hücrelerinde HIV-1 enfeksiyonunu engelleyen başlıca proteinin Trim5-alpha olduğu gösterilmiştir (Sawyer vd., 2006; Strebel vd., 2009; Stremlau vd., 2004). Trim5alpha proteininin, hücre içine giren HIV-1 virüsünün viral kapsitini tanıyarak, ters transkripsiyon aşamasından önce bloke ettiği ve enfeksiyonu engellediği bilinmektedir (Stremlau vd., 2004; Passerini vd., 2006). Aynı protein insan hücrelerinde de üretilmesine rağmen, insandaki versiyonu HIV-1'i etkin şekilde bloke edememektedir (Kaiser vd., 2007; Richardson vd., 2008; de Silva ve Wu, 2011; Aiken ve Joyce, 2011). Bu da TRIM5-alfa'nın HIV-1 kısıtlayıcı etki gösterebilmek için birçok hücrel faktöre ihtiyacı olduğunu ve kısıtlama kapasitesinin türe spesifik olduğunu göstermektedir (Kuroishi vd., 2010; Aiken ve Joyce, 2011) . Ayrıca, daha sonra yapılan çalışmalarda, yüksek dozda HIV-1 ile enfekte edilen maymun hücrelerindeki Trim5-alpha proteininin satüre olmasıyla, bazı virüs parçalarının bu engelden kurtulduğu ve hücrelerde ters transkripsiyonun oluşup virüs genomunun hücre kromozomuna entegre olduğu (provirüs oluştuğu) bildirilmiştir (Besnier vd., 2002; Hatzioannou vd., 2003; Kootstra vd., 2003). Yine maymun hücrelerinde yapılan çalışmalarda, Trim5-alpha proteininin sadece hücre dışı HIV-1 enfeksiyonunu engellediği, hücreler arası (enfekte hücreden dışarı çıkmadan başka bir hücreye direkt olarak geçmesi durumu) HIV-1 enfeksiyonunu engelleyemediği gösterilmiştir (Richardson vd., 2008). Buna rağmen, enfekte olan maymun hücrelerindeki HIV-1 üretimi ve HIV-1'in hücreler arasındaki yayılımı çok düşük seviyede gerçekleşmektedir (Richardson vd., 2008). Tüm bu veriler, maymun hücrelerinde, viral genomun entegrasyonundan sonraki aşamalarında da HIV-1'i engelleyici etki gösteren başka protein/proteinlerin olabileceğini işaret etmektedir (Nakayama vd., 2005).

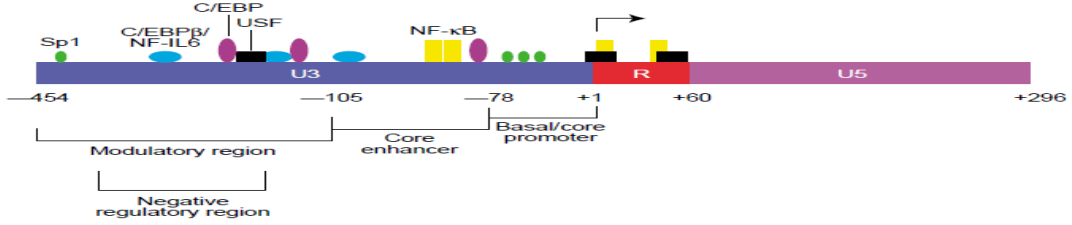
İnsan bağışıklık yetmezliği virüsü olarak bilinen HIV-1, AIDS (kazanılmış bağışıklık yetmezlik sendromu)'in nedeni olan Retroviridae ailesinin lentivirüs genusuna ait bir virüstür (Requejo, 2006; Kuciak vd., 2008). Tüm retrovirüslerle ortak olarak kodladığı genler dışında HIV-1 düzenleyici genler olarak da bilinen tat ve rev genlerini de kodladığı bilinmektedir (Cullen ve Malim, 1991). HIV-1 gen ekspresyonu hem viral tat ve rev hem de hücrel faktörler tarafından yönetilen son derece denetimli bir süreçtir (Jablonski vd., 2010; Wu ve Marsh, 2003).



HIV-1 Tat proteini, transkripsiyon trans-aktivatörü olarak bilinmektedir (Jablonski vd., 2010). Viral yaşam döngüsünün ilk basamaklarında eksprese olan bu protein, HIV-1 gen ekspresyonu için mutlaka gereklidir (Mayol vd., 2007; Hooker vd., 2002; Kuciak vd., 2008; Ponti vd., 2008). Bu küçük proteinin HIV-1 viral döngüsü üzerindeki büyük etkisinin yanı sıra, bazı hücrel genlerin ekspresyon seviyelerini de modüle ettiği kanıtlanmıştır (Mayol vd., 2007; Pugliese vd., 2005). Değişik hücre hatlarında yapılan çalışmalar birçok hücrel genin ekspresyon seviyelerinin bu protein varlığında değiştiğini göstermektedir (Pugliese vd., 2005; Romani vd., 2010). Trans-aktivasyon özelliğinin sadece HIV-1'le enfekte olmuş hücrelere özgü bir durum olmaması, hücre dışı Tat proteininin enfekte olmamış hücrelere de girebilme ve aktivitesini direkt olarak duyarlı genler üzerinden sürdürebilme yeteneğinin bulunması bu proteini benzer viral düzenleyici genlerden ayırmaktadır (Romani vd., 2010; Fittipaldi ve Giacca, 2005; Gupta ve Mitra, 2007).

LTR (long terminal repeat), tüm retrovirüslerde olduğu gibi HIV-1 virüsünde de viral promotor olarak görev almaktadır (Karn ve Stoltzfus, 2012). HIV-1 LTR promotoru yaklaşık 640 bp uzunluğundadır ve başlıca üç bölgeye ayrılmaktadır: U3, R ve U5 bölgeleri (Hiebenthal-Millow vd., 2003; Gaynor, 1992). Yapısında birçok farklı hücrel transkripsiyon faktörünün bağlanabileceği DNA dizileri mevcuttur (Şekil-1), ve gen ifadenmesi için gerekli tüm sinyal bölgelerini içerir. AP-1, COUP, NF-AT, USF ve NF κ B (nükleer faktör kappa-b) HIV-1 LTR promotor bölgesine bağlanabilen transkripsiyon faktörlerinden bazılarıdır (Pereira vd., 2000). Bu elementler HIV-1 ekspresyonunu hücre tipine göre pozitif veya negatif şekilde düzenleyebilmektedirler (Ventura vd., 1990; Karn ve Stoltzfus, 2012). Bu bölgeler arasından en çok çalışılmış olan, U3 bölgesinde bulunan 2 adet NF κ B bağlanma bölgesidir (Hiebenthal-Millow vd., 2003; Gaynor, 1992). NF κ B proviral aktivasyon yolağında önem arz eden bir transkripsiyon faktörüdür (O'Neill ve Kaltschmidt, 1997; Oeckinghaus ve Ghosh, 2009). NF κ B, uyarılmamış hücrelerde I κ B inhibitör proteinine bağlı olarak sitoplazmada bulunur (Lou vd., 2011). Çeşitli uyarılar karşısında proteinin ubiquitinasyon, fosforlanma gibi translasyon sonrası modifikasyonlara uğraması veya I κ B proteinin yıkımı sonucunda ortaya çıkan serbest NF κ B proteinleri daha sonra çekirdeğe geçer ve HIV LTR gibi birçok promotor bölgesinden transkripsiyonu aktive edebilir. Birçok değişik hücrel proteinin LTR promotoruna bağlanabildiği bilinmektedir (Garcia vd., 1989; Wu vd., 1988). HIV-1 Tat proteini de TAR (trans-aktivasyon yanıt bölgesi) RNA elementine bağlanır. TAR RNA'sı HIV-1 LTR promotorunun aktivasyonu için HIV-1 Tat ile ilişkideki hücrel faktörlere bağlanma bölgesi sağlamış olur. Böylece, HIV-1 Tat virüs transkripsiyonunu HIV-1 LTR

promotoruna dolaylı olarak etki ederek yüzlerce kata kadar arttırabilmektedir (Gatignol vd., 1989; Gaynor vd., 1989).



Şekil 1. HIV-1 LTR promotoru transkripsiyon faktörlerinin bağlanma bölgeleri

Tüm bu bilgiler ışığında, bazı retroviral kısıtlayıcı faktörlerin hücrede üretilibilmelerinin HIV-1 Tat ile ilişkili olabileceğini düşünmekteyiz. Ayrıca, HIV-1 provirüsü barındırmayan (HIV-1 ile enfekte olmamış) HIV-1'e dirençli maymun hücrelerinin, hücre kaynaklarını gereksiz olarak kullanmamak için HIV-1 enfeksiyonunu viral entegrasyon sonrası aşamalarda engelleyen proteinleri üretmiyor olabileceğini varsaymaktayız. Bu varsayımlardan yola çıkarak başlattığımız çalışmalarda, salgılanan lökosit proteaz inhibitörü (SLPI) proteininin HIV-1'e dirençli maymun hücrelerinde, HIV-1 Tat proteini varlığında indüklenmiş olduğunu bulmamız ve bu proteinin bilinen hücre dışı anti-HIV-1 etkisinin olması, SLPI'nın hücre içerisinde de farklı bir mekanizma ile kısıtlayıcı faktör olarak rol alabileceği ihtimalini araştırmamıza neden olmuştur.

SLPI, birçok mukozal yüzey tarafından salgılanan düşük moleküler ağırlıktaki bir serin proteaz inhibitörüdür (Abe vd., 1991). Bilinen ilk özelliği insan lökosit elastazı engelleyici etkisidir. Bunun dışında, anti-viral, anti-bakteriyel, anti-fungal ve anti-inflamatuar aktivite gösterdiği de bilinmektedir (Scott vd., 2011). Bilinen bu etkileri dışında, SLPI'nın bazı hücre türlerinde NFκB'nin aktivitesini azalttığı bilinmektedir (Malamud ve Wahl, 2010; Taggart vd., 2005). HIV-1'in nadiren ağız yoluyla bulaştığının keşfedilmesiyle (Lin vd., 2004; Jana vd., 2005) tükürükteki proteinler üzerinde çalışılmaya başlanmış ve bu hücre dışı anti-HIV-1 etkiden SLPI proteininin sorumlu olduğu gösterilmiştir (Lin vd., 2004; McNeely vd., 1997; Shugars vd., 1999; McNeely vd., 1995). Şimdiye kadar, SLPI'nın anti-HIV-1 özelliğiyle ilgili iki potansiyel mekanizma ortaya konmuştur. Bunlardan ilki, SLPI'nın CD4'le etkileşime giren ve plazma zarının hareketini kontrol eden bir membran proteini olan skramblaz 1'e bağlanarak HIV virüsünün T hücresi plazma zarına füzyonunu engellemesidir. Diğeri ise, anneksin II'ye bağlanarak viral füzyon ve girişi engellemesidir (Drannik vd., 2011; Malamud ve Wahl, 2010). Literatürdeki tüm bu çalışmalar, SLPI'nın hücre dışı anti-HIV-1



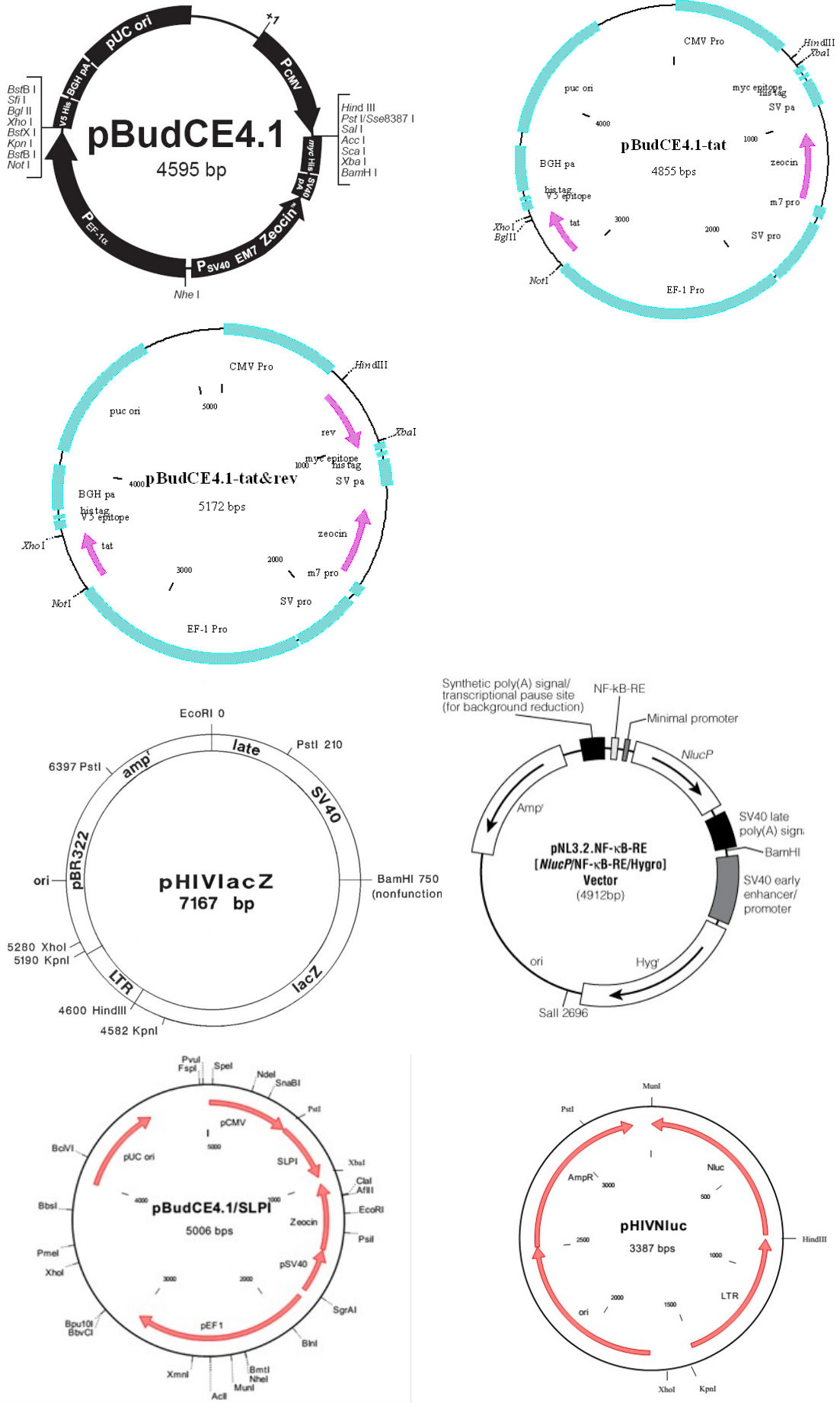
(virüsün hücre içerisine girmeden engel olunması durumu) özelliği üzerinde durmaktadır (Shugars vd., 1999; McNeely vd., 1995).

SLPI'nın hücre içi anti-HIV-1 etkisinin olup olmadığı, varsa bunun etki mekanizması hakkında bir bilgi bulunmamaktadır. Ancak, SLPI'nın NFkB aktivitesini azalttığına bilinmesi ve HIV-1 LTR bölgesinde de NFkB bağlanma bölgelerinin bulunması, HIV-1 Tat proteini varlığında NFkB 'ye bağımlı HIV-1 transkripsiyonunun azalabileceği fikrini akıllara getirmektedir. Bu nedenle projemizde, HIV-1 Tat proteini varlığında indüklenen SLPI'nın hücre içi anti-HIV özelliklerinin araştırılması ve bunun enfekte olmuş hücreler üzerinde de test edilmesi hedeflenmiştir.

3. GEREÇ ve YÖNTEM

3.1 Plazmidler

Çalışmada kullanılan plazmidlerin haritaları şekil 2'de gösterilmiştir. pBud-Tat plazmidi, önceki çalışmalarımızda oluşturulmuş olup, HIV-1 Tat proteinini kodlayan açık okuma zincirinin PZR ile çoğaltılıp ticari bir memeli ekspresyon vektörü olan pBudCE4.1 (ThermoFisher Scientific) plazmidindeki Ef-1 Promotor bölgesinin sonuna klonlanmış halidir. Memeli hücrelerine aktarıldığında HIV-1 Tat proteininin üretilmesini sağlamaktadır. pBud-SLPI_{AYM} plazmidini oluşturmak için, öncelikle CV-1 hücrelerinden toplam RNA saflaştırılmış ve sırasıyla PstI ve XbaI enzimleri tanıma bölgesi içeren özgün primerler çiftinin kullanımıyla ters transkriptaz PZR yöntemi kullanılarak AYM SLPI cDNA'sı çoğaltılmıştır. Daha sonra bu cDNA'lar, PstI ve XbaI enzimleriyle kesilmek suretiyle, aynı enzimlerle kesilmiş pBudCE4.1 ifadeleme vektörüne klonlanılmıştır. pHIVLacZ (NIH AIDS Reagent Program) plazmidi, LacZ raportör geninin HIV-1 LTR promotoru tarafından ifadenmesini sağlamaktadır. pNL3.2.NF-κB-RE[NlucP/NF-κB-RE/Hygro] (Promega) plazmidi, Lusiferaz raportör geninin ifadenmesini, NFkB duyarlı olarak gerçekleştirir.



Şekil 2. Çalışmada kullanılan plazmidlerin haritaları

3.2 Primerler

Çalışmada kullanılan primerlerin adları ve sekansları Tablo 1'de gösterilmiştir.

Tablo 1. Kullanılan primerler ve sekansları

Primer Adı	Primer Sekansı
Zeo F	5' TGATGAACAGGGTCACGTCGTC 3'
Zeo R	5' AAGTTGACCAGTGCCGTTCCG 3'
Tat F	5' AGATCCTAGACTAGAGCCCTGGAA 3'
Tat R	5' CAACTTGGCAATGAAAGCAACAC 3'
Rev F	5' AGCTACCACCGCTTGAGAGACTTA 3'
Rev R	5' ACCAATATTTGAGGGCTTCCCACC 3'
Lac F	5' ACAGCAAATGCGTCGGGATCTGTA 3'
Lac R	5' TGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGG 3'
SLPI _{AGM-Hum} -F	5' GCATCAAATGCCTGGATCCT 3'
SLPI _{AGM} -R	5' GCATCATACATTGGCCGTAAGCC 3'
SLPI _{Hum} -R	5' GCATCAAACATTGGCCATAAGTC 3'
GAPDH-F	5' TGCACCACCAACTGCTTAGC 3'
GAPDH-R	5' GGCATGGACTGTGGTCATGAG 3'

3.3 Hücre Hatları

Çalışmada kullanılan hücre hatları Tablo 2'de gösterilmiştir.

Tablo 2. Çalışmada kullanılan hücre hatları ve özellikleri

Hücre	Ait olduğu Tür	Doku
CV-1	Chlorosebus tantalus	Böbrek
Vero	Chlorosebus pygerythrus	Böbrek
293	Homo sapiens	Böbrek
HeLa	Homo sapiens	Rahim

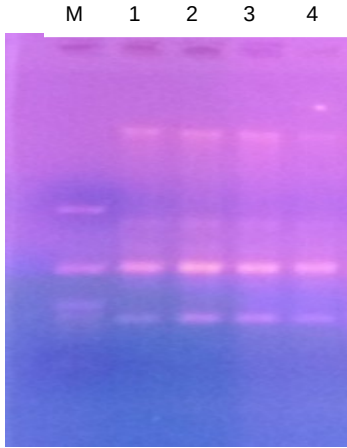
3.4 DNA Transfeksiyonu ve Kalıcı Hücre Hattı Oluşturulması

Hücreleri %10 FBS eklenmiş IMDM (Iscove's Modified Dulbecco's Medium) besi yerinde %5 CO₂ olan ortamda 37°C sıcaklıkta çoğaltıldı. Transfeksiyondan 24 saat önce, yeterli doluluk oranına ulaşmış hücrelerden yaklaşık 5 x 10⁴ hücre alınarak 1 ml IMDM besi yeri ile ekildi. IMDM besi yeri kullanılmasındaki temel neden, zeosinin hipertonic medyumda aktivitesinin azaldığının bilinmesi ve IMDM besi yerinin daha az tuz içeren bir besi yeri olmasıdır. Bir gün sonra, 1 g lineeriz edilmiş plazmid DNA'sı 100 µl serumsuz besi yeri içerisinde seyreltildi, 2 µl Turbofect transfeksiyon ajanı (ThermoFisher Scientific) eklenip, 15-20 dakika oda sıcaklığında inkübasyona bırakıldı. Daha sonra bu karışımdan 100 µl, yeterli doygunluğa ulaşmış hücreler üzerine eklendi ve transfeksiyon 48 saat sonra GFP transfekte edilmiş hücrelerde flüoresans

mikroskobu ile doğrulandı. Hücreler yeni besi yerine alınıp yapışması beklendi. Daha sonrasında hücreler, maksimum %25 yoğunluğa sahip olacak şekilde pasajlanıp bir gün sonra, konsantrasyon 150 µg/ml olacak şekilde zeosin içeren besi yeri eklendi ve her 3-4 günde bir zeosinli besi yeri yenilendi. Koloni oluşumu gözlemlendiğinde kuyucuk başına 0.3 hücre gelecek şekilde seyreltilerek, zeocin içeren IMDM içinde hücreler çoğaltılmaya devam ettirildi.

3.5 cDNA sentezi

GeneJET RNA Purification (ThermoFisher Scientific) kiti kullanılarak hücrelerden elde edilen toplam RNA'ların kalite kontrolleri agaroz jelde ayrıştırılıp, düzgün 28S ve 18S rRNA bantlarının gözlenmesiyle örnekteki gibi yapılmıştır (Şekil 3). RNA'lar, olası DNA kontaminasyonundan arındırılmak için DNase I enzimi ile muamele edildikten sonra, ters transkriptaz kullanılarak cDNA'ya çevrilmiştir. Elde edilen cDNA'lar kullanılarak aşağıda Tablo 1'de sekansları verilen primerlerle PZR yapıldı.



Şekil 3. Oluşturulan kalıcı hücre hatlarının RNA'larının agaroz jelde kontrol edilmesi. M: Markör RNA, 1: 293, 2: 293-pb, 3: 293-Tat, 4: 293-Tat-Rev.

3.6 Western Blot ile protein tayini

ProteoJET memeli hücre parçalayıcı kiti (ThermoFisher Scientific) kullanılarak parçalanmış hücrelerden elde edilen lizatlar, 95°C'de 5 dakika bekletildikten sonra, Laemmli protokolünde belirtilen yükleme boyası ile karıştırılıp, %15 ayrıştırıcı ve %4 toplayıcı jel içeren SDS poliakrilamid jele yüklendikten sonra elektroforez ile ayrıştırıldı. PVDF zarı %100'lük metanolde 30 dakika bekletildi ve transfer tampon çözeltisiyle 1-2 dakika yıkandı. Filtre kağıtları ve pedler de transfer tampon çözeltisinde 5-10 dakika bekletildi ve ultra arı suyla yıkandı. Malzemeler sünger ped, filtre kâğıdı, jel, zar, filtre kâğıdı, sünger ped sırasıyla olacak şekilde yerleştirildi. 2-3 saat 15 voltta proteinler zara aktarıldı. Sonrasında membran 3-4 saat boyunca oda sıcaklığında sürekli çalkalama ile engelleme tampon çözeltisine bırakıldı, 0.05 tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 5 dakika yıkandı ve %5'lik yağsız süt tozu içeren PBS içerisinde 1:3000 seyreltilmiş primer poli-klonal antikor ile 4°C'de sürekli çalkalamayla gece boyu inkübasyona bırakıldı. 0.05 Tween 20 içeren PBS çözeltisi ile 4 defa 15'er dakika boyunca yıkandı ve %1'lik yağsız süt tozu içeren PBS içerisinde 1:30000 seyreltilmiş HRP ile birleştirilmiş ikincil antikor eklendi ve zar 1 saat boyunca oda sıcaklığında sürekli çalkalamayla inkübe edildi. Zar yıkandı ve PBS ile durulandı. SuperSignal West Pico Chemiluminescent substrat (Promega) kullanılarak VersaDoc sistemi ile proteinler saptandı.

3.7 LacZ Raportör Gen Aktivite Ölçümü

Hücrelerin raportör gen içeren plazmid ile yukarıda anlatıldığı şekilde transfekte edilmesinden 48 saat sonunda, hücreler PBS ile yıkanıp, hücre kazıyıcı yardımı ile tüpe alındı ve santrifüj ile çöktürüldü. Hücre çökeltisi Tris-Cl ile çözünüp, -80°C'de donma ve oda sıcaklığında erime işlemi 3 kere tekrarlanarak hücreler parçalandı. Santrifüj yapıp hücre artıkları çöktürüldü ve süpernatant yeni bir tüpe alındı ve Bradford yöntemi ile protein konsantrasyonu ölçüldü. Daha sonra Mg⁺⁺ tampon çözeltisi, ONPG (LacZ enzimi substratı), hücre lizatı ve fosfat tampon çözeltisi reaksiyon tüplerine aktarıldı. Örnekler, 37°C'de renkleri sarımsı olana kadar inkübe edildi ve absorbansları 420 nm'de ölçüldü.

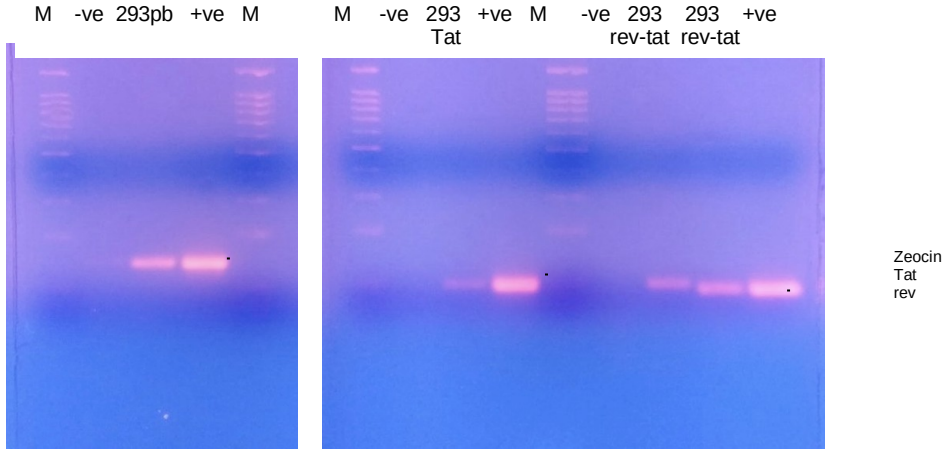
4. BULGULAR

4.1 HIV-1 Tat proteinini stabil (kalıcı) olarak eksprese eden insan ve maymun hücre hatlarının hazırlanması ve hem RNA hem de Western Blot ile protein seviyesinde analizi

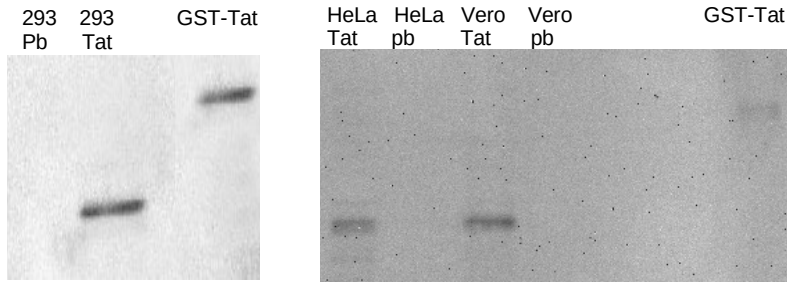
Afrika Yeşil Maymunu CV1 hücrelerinde yaptığımız ön çalışmada HIV-1 Tat proteinine bağlı olarak SLPI ekspresyonunda muhtemel bir indüklenme gözlemlemiştik. Aynı indüklenmenin bir başka maymun türüne ait Vero hücreleri ile insan 293 ve HeLa hücrelerinde de oluşup oluşmadığını araştırmak için bu hücrelerin de Tat proteinini kalıcı olarak ifade etmeleri sağlanmıştır. Bu amaçla, pBud-Tat plazmidini içeren Vero-Tat, 293-Tat (ayrıca 293-tat hücrelerinin oluşturulamama ihtimaline karşı, 293-tat-rev hücre hattı yedek olarak hazırlanmıştır. 293-tat hücreleri başarıyla oluşturulabildiği için ve Rev üretiminin SLPI ekspresyonunda bir etkisinin olmadığı yapmış olduğumuz ön çalışmalarda anlaşıldığı için bundan sonraki aşamalarda bu hücre hattı kullanılmamıştır) ve HeLa-Tat hücre hatları, HIV-Tat proteinini üretmeleri, pBudCE4.1 plazmidini içeren Vero-pb, 293-pb ve HeLa-pb hücre hatları ise kontrol amaçlı kullanılmak üzere oluşturulmuşlardır.

Oluşturulan hücre hatlarında, kalıcı transfeksiyonun gerçekleşip gerçekleşmediğini kontrol etmek için hücre hatlarından elde edilen cDNA'lar PZR ile gen ifadenmesinin analizi yapılmıştır. RNA seviyesindeki analiz sadece 293 hücre hatlarında yapılmıştır (Şekil 4). Vero ve HeLa hücrelerinde RNA seviyesinde analiz yapmamızın nedeni, bu hücre hatlarının oluşturulmasına sonradan karar verilmiş olması ve zaman kazanmak açısından, bu hücrelerin doğrudan Western Blot yöntemi ile protein seviyesinde analiz edilmiş olmalarından kaynaklanmaktadır. Ayrıca 293 hücrelerinde kalıcı ifadenmeyi sağlayan plazmidlerin transkripsiyonu sorunsuz olarak gerçekleştirdikleri gözlenmiş olduğu için doğrudan protein seviyesinde analizi yeterli olmuştur.

Daha sonra aynı hücre hatlarında, HIV-Tat proteinin varlığı, Western Blot yöntemiyle tavuk anti-HIV-1 Tat poli-klonal antikoru kullanılarak gösterilmiştir (Şekil 5). Laboratuvarımızda daha önceki çalışmalarda saflaştırılmış GST-Tat füzyon proteini pozitif kontrol olarak kullanılmıştır.



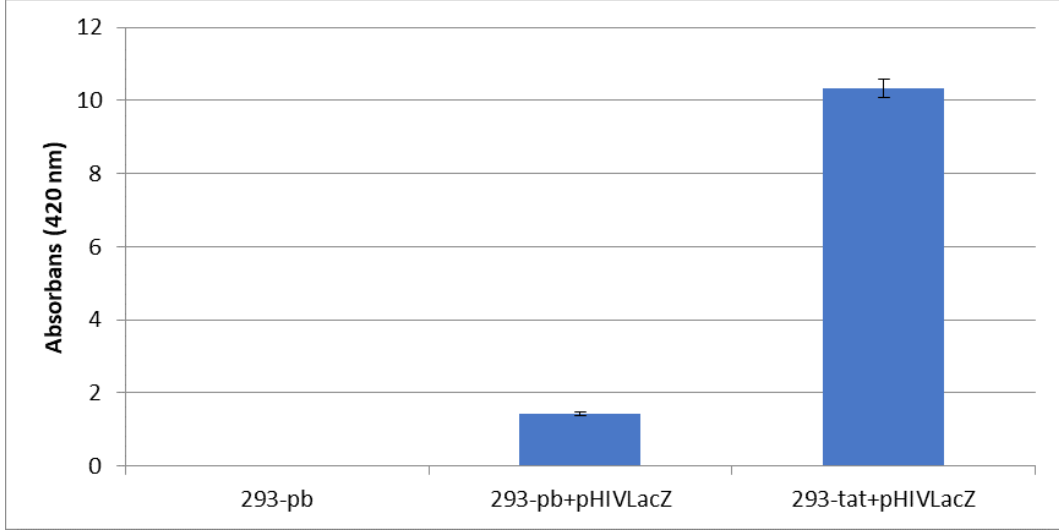
Şekil 4. İnsan 293 Kalıcı hücre hatlarından elde edilen cDNA'ların PCR sonuçları. Transfeksiyonda kullanılmış olan plazmidler, pozitif kontrol olarak kullanıldı. Negatif kontrollerde ise herhangi bir DNA şablonu eklenmemiştir. 293-pb hücre hattını kontrol etmek için plazmidde bulunan zeosin dirençlilik genine bağlanan Zeo primerleri, 293-tat hücre hattını kontrol etmek için Tat primerleri ve 293-tat-rev hücre hattını kontrol etmek için hem Tat hem de Rev primerleri kullanıldı.



Şekil 5. Tavuk anti-HIV-1 tat primer poli-klonal antikoruna ile yapılan Western Blot analizi

4.2 Rekombinant HIV-Tat proteininin fonksiyonel analizinin 293-Tat hücrelerinde yapılması

Hücre hatlarında rekombinant olarak üretilen Tat proteininin fonksiyonel olup olmadığı, LacZ raportör ifadenmesini HIV-1 Tat'a bağımlı olarak yapabilen pHIVLacZ plazmidinin hücrelere transfekte edilip, LacZ aktivitesinin ölçülmesi suretiyle araştırılmıştır. Bu plazmiddeki LacZ geni HIV-1 LTR promotor dizinleri sayesinde transkripte edilmektedir ve LTR promotorunun aktivitesi HIV-1 Tat proteini varlığında önemli ölçüde artmaktadır (Jablonski vd., 2010). pHIVLacZ ile transfekte olmuş HIV-1 Tat ekspres eden 293 hücrelerindeki LacZ enzim aktivitesinin, aynı plazmid ile transfekte olmuş boş vektör içeren 293 hücrelere kıyasla 10 kat arttığı gözlemlenmiştir (Şekil 6). Bu sonuç 293-Tat hücrelerince üretilen HIV-1 Tat proteininin fonksiyonel olduğu teyit etmiştir.



Şekil 6. Tat proteininin fonksiyonelliğinin incelenmesi

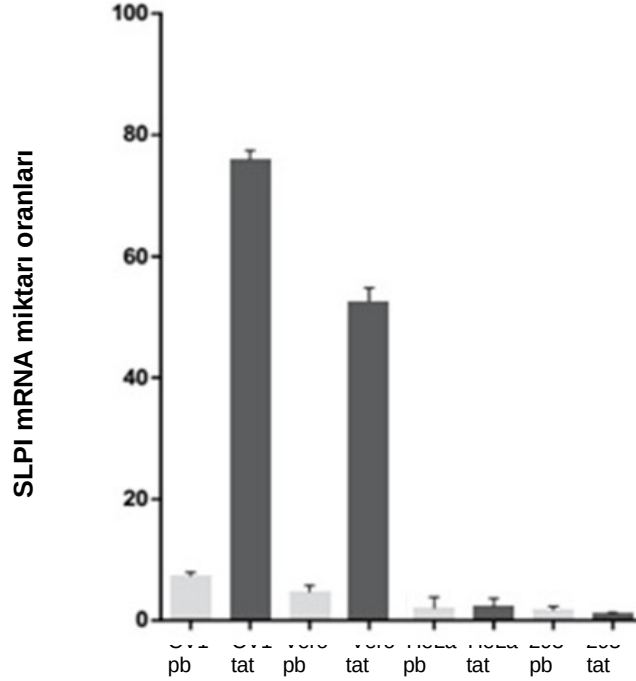
4.3 İnsan ve Maymun hücre hatlarındaki SLPI üretiminin mRNA düzeyinde incelenmesi

HIV-1 Tat proteinini üreten ve üretmeyen İnsan ve Afrika Yeşil Maymunu hücre hatlarındaki SLPI ifadenme seviyelerinin incelenmesi için gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılmıştır. Bu amaçla hücrelerden elde edilen toplam RNA'lar cDNA'ya çevrilmiş ve NCBI genom veri tabanında bulunan insan ve maymun genom sekansları baz alınarak dizayn edilen SLPI primerleri kullanılarak gerçek zamanlı PZR ile analiz edilmiştir (şekil 7). Aynı deney üç kez farklı zamanlarda tekrarlanmıştır. SLPI ekspresyonundaki değişimin ne kadar olduğu "housekeeping" gen olan GAPDH ekspresyonuyla karşılaştırılarak yorumlanmıştır. Gerçek zamanlı PZR sonucunda çıkan "ct" değerleri aşağıda belirtilen formülde kullanılarak gen ifadenmesi kıyaslanması (R) her hücre için ayrı ayrı hesaplanmıştır (şekil 7).

$$R = 2^{-[(ct \text{ SLPI CV1tat} - ct \text{ GAPDH CV1tat}) - (ct \text{ SLPI CV1} - ct \text{ GAPDH CV1})]}$$

(CV1 hücreleri için)

Diğer hücre hatları için de aynı formül kullanılmıştır.



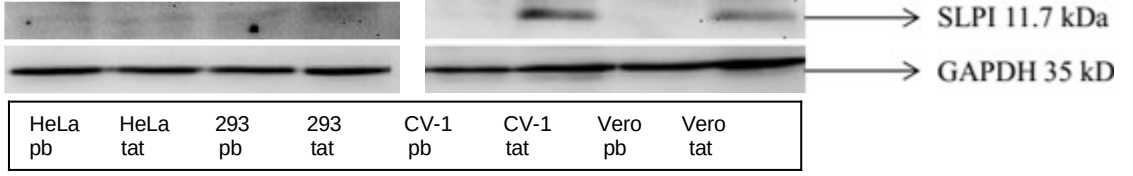
Şekil 7. Farklı maymun ve insan hücre hatlarındaki SLPI gen ifadenme seviyeleri. CV1-tat, Vero-tat, HeLa-tat, 293-tat: HIV Tat proteinini kalıcı olarak üreten hücre hatları. CV1-pb, Vero-pb, HeLa-pb, 293-pb: Boş ekspresyon vektörü (pBUDCE4.1) içeren kalıcı hücre hatları.

Şekil 7’de de görüldüğü üzere, İnsan hücrelerinin aksine, HIV-1 enfeksiyonuna dirençli oldukları bilinen maymun hücrelerinde SLPI transkripsiyon miktarı HIV-1 Tat proteininin varlığında belirgin bir şekilde artış göstermiştir.

4.4 İnsan ve maymun hücre hatlarındaki SLPI üretiminin protein düzeyinde incelenmesi

Gerçek zamanlı PZR yöntemi kullanılarak yaptığımız çalışmalarda, HIV-1 Tat üreten maymun hücrelerindeki SLPI mRNA seviyelerinin HIV-1 Tat üretmeyen maymun hücrelerine kıyasla yaklaşık 8 kat yükseldiğini ancak insan hücrelerinde SLPI mRNA seviyelerinde herhangi bir fark oluşmadığını gözlemledikten sonra (Şekil 8), benzer etkinin protein seviyesinde gerçekleşip gerçekleşmediği incelenmiştir.

Bunun için, HIV-1 Tat proteinini üreten ve üretmeyen İnsan 293, HeLa ve Maymun CV-1 ile Vero hücre hatlarındaki SLPI üretim seviyeleri Western Blot metoduyla, anti-SLPI tavşan poli-klonal antikoları (ThermoFisher Scientific) kullanılarak karşılaştırılmıştır. (Şekil 8).



Şekil 8. HIV-1 Tat proteinini üreten ve üretmeyen hücre hatlarında SLPI proteinini üretiminin Western Blot yöntemi ile analizi

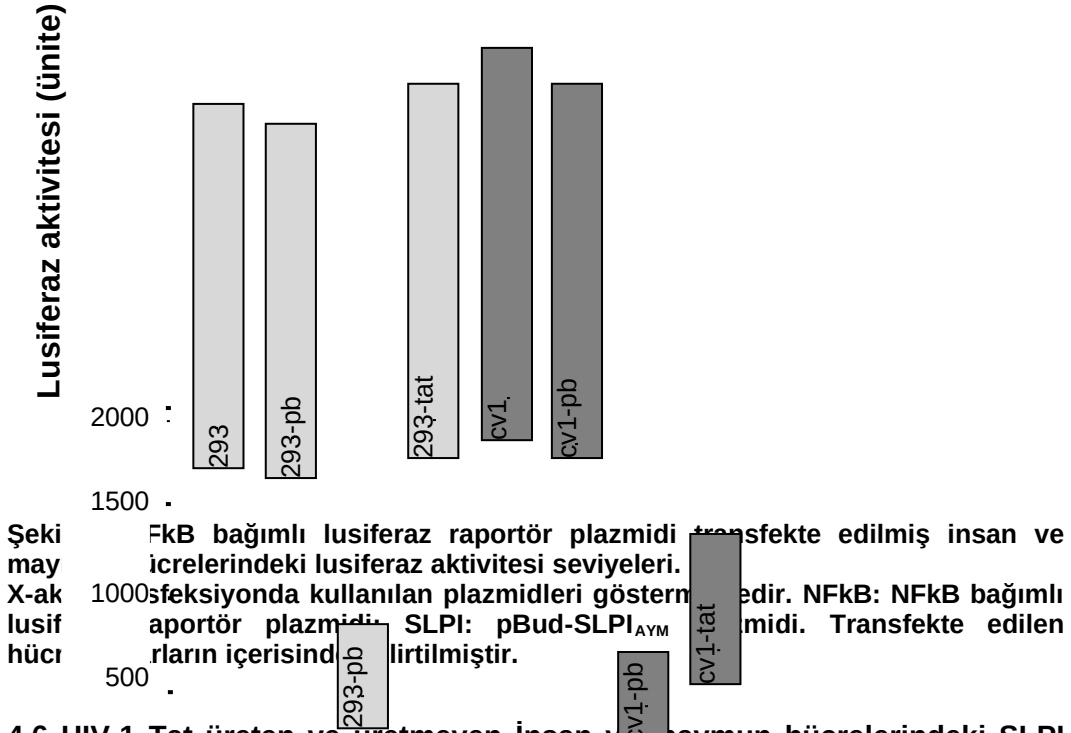
Bu deneyde elde edilen sonuç, gerçek zamanlı PZR sonuçlarını teyit etmektedir. HIV-1 Tat proteinini üreten AYM hücrelerindeki SLPI proteinini üretimi belirgin bir şekilde artış göstermektedir. İnsan hücrelerinde ise herhangi bir değişiklik olmamaktadır.

4.5 HIV-1 Tat üreten ve üretmeyen İnsan ve maymun hücrelerindeki NFkB promotörü aktivitesinin araştırılması.

SLPI proteininin epitel hücreler tarafından üretilip salgılandıktan sonra diğer hücrelere de difüz ederek transkripsiyon faktörü NFkB'ye bağımlı transkripsiyonu azalttığı yönünde bulgular mevcuttur. HIV LTR promotör bölgesinde de NFkB bağlanma bölgeleri bulunması bize SLPI'nın HIV-1 virüs transkripsiyonunu NFkB yoluyla azaltabileceğini düşündürmektedir. Bu nedenle, SLPI'nın oluşturduğumuz hücre hatlarında da benzer bir etkiyi yapıp yapmadığı araştırılmıştır. Deneylerde NFkB duyarlı lusiferaz raportör geni içeren pNL3.2.NF-κB-RE[NlucP/NF-κB-RE/Hygro] (Promega) plazmidi seçilmiştir. Bu plazmid, oluşturulan insan ve maymun hücrelerine transfeksiyon yöntemiyle aktarılmış ve hücreler lusiferaz aktivitesi yönünden, Promega "Luciferase assay system" kiti kullanılarak incelenmiştir. Bu deneydeki amaç, HIV-1 Tat proteinini üreten maymun hücrelerinde indüklenen SLPI'nın NFkB promotörüne etkisini gözlemektir. Etkinin gerçekten SLPI proteini tarafından gerçekleştiğini göstermek amacıyla, AYM SLPI geni aktarılmış hücreler kontrol olarak kullanılmıştır. Kontrol deneyindeki AYM SLPI gen ifadenmesi, söz konusu geninin cDNA'sının memeli hücreleri için ifadeleme vektörü olan pBudCe4.1'e klonlanması ile oluşturulan pBud-SLPI_{AYM} plazmidi ile gerçekleştirilmiştir.

Elde edilen sonuçlara (Şekil 9) göre, raportör plazmid ile beraber SLPI plazmidi aktarılan insan ve maymun hücrelerinde NFkB bağımlı lusiferaz aktivitesinde belirgin bir düşüş gözlenmiştir. Bu bulgu, literatürde anlatılan etkiyi doğrulamaktadır. Öte yandan, raportör plazmidi aktarılmış, HIV-1 Tat proteinini üreten insan ve maymun hücrelerindeki lusiferaz aktivitesi ise insan hücrelerinde Tat üretmeyen hücrelere göre değişiklik göstermezken, maymun hücrelerinde

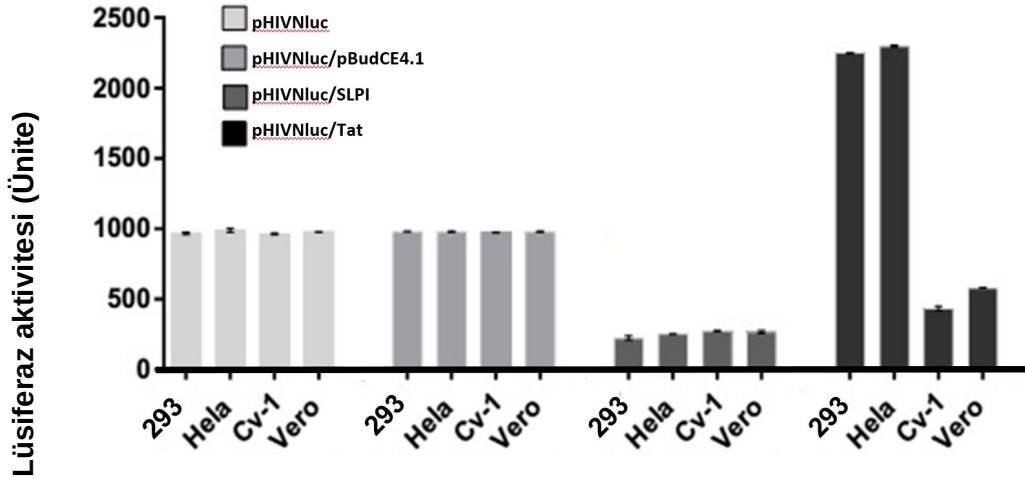
SLPI etkisine yakın bir düşüş göstermiştir. Bu durum maymun hücrelerinde HIV-1 Tat proteini varlığında SLPI üretiminin indüklenmesini doğrulamaktadır. İnsan hücrelerinde HIV-1 Tat proteini varlığında SLPI üretiminde bir değişiklik olmadığından elde edilen sonuçlar beklentilerimizi doğrulamaktadır.



4.6 HIV-1 Tat üreten ve üretmeyen insan ve maymun hücrelerindeki SLPI üretiminin HIV-1 LTR promotörüne etkisinin araştırılması

SLP nfk nfk nfk nfk nfk nfk nfk nfk nfk İtici etkisi
SLPI SLPI SLPI

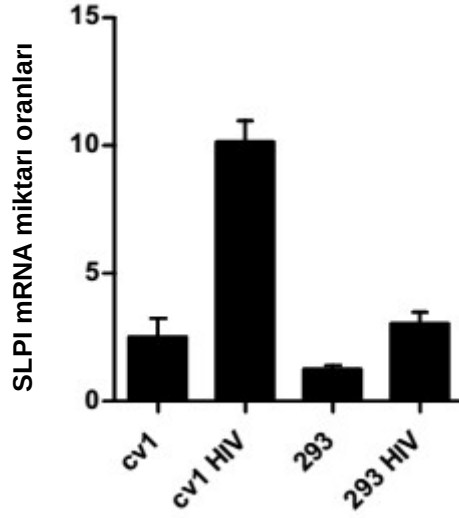
gösterildikten sonra benzer bir etkinin HIV-1 LTR promotörü üzerinde de olup olmadığı araştırılmıştır. Bu deney için, pNL3.2.NF-kB-RE[NlucP/NF-kB-RE/Hygro] vektöründeki NF-KB promotörü dizinleri uygun DNA kısıtlayıcı enzimleriyle kesilerek, daha sonra bu bölgeye PZR ile çoğaltılmış ve yine uygun DNA kısıtlayıcı enzimleriyle kesilmiş HIV-1 LTR promotör dizinleri yerleştirilmiştir. Oluşturulan plazmid pHIVNLuc olarak adlandırılmıştır. Bu plazmid, oluşturulan insan ve maymun hücrelerine transfeksiyon yöntemiyle aktarılmış ve hücreler lusiferaz aktivitesi yönünden, Promega Luciferase assay system kiti kullanılarak incelenmiştir (Şekil 10). Görüldüğü üzere pBud-SLPI_{AYM} plazmidini ile transfekte edilmiş bütün hücrelerde LTR promotör aktivitesi belirgin bir şekilde azalmıştır. Bu da bize SLPI proteininin hem maymun hem de insan hücrelerinde HIV-1 LTR promotörü üzerine azaltıcı etkisini göstermektedir. HIV-Tat üreten hücre hatlarına bakıldığında, LTR promotör aktivitesi insan hücrelerinde belirgin artış göstermiştir. Bu beklenen bir sonuçtur çünkü Tat proteini LTR promotöründen başlatılan transkripsiyonunun verimliliğini arttırdığı bilinmektedir. Diğer yandan maymun hücrelerindeki LTR promotör aktivitesi belirgin olarak azalmıştır.



Şekil 10. HIV-1 LTR promotoruna bağımlı lusiferaz raportör plazmidini transfekte edilmiş insan ve maymun hücrelerindeki lusiferaz aktivitesi seviyeleri. X- aksı transfeksiyonda kullanılan hücreleri göstermektedir. Hücreleri transfekte etmek için kullanılan plazmidler renkli kutularda gösterilmiştir. pHIVNLuc: LTR bağımlı lusiferaz raportör plazmidini. pBudCE4.1: Boş vektörü içeren hücre hatları. SLPI: pBud-SLPI_{AYM} plazmidini. Tat: Tat proteinini üreten hücre hatları.

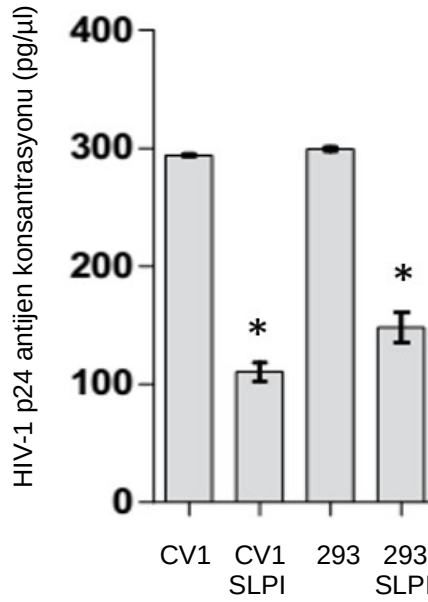
4.7 HIV ile enfekte olmuş hücre hatlarındaki çalışmalar

Elde edilen bu sonuçlar, maymun hücrelerinde SLPI üretiminin HIV-1 Tat proteini varlığında artış gösterdiğini ve SLPI'nin HIV-1 LTR promotorunu baskıladığını göstermiştir. Bu etkilerin HIV-1 ile enfekte olmuş maymun hücrelerinde de görülüp görülmeyeceği ve virüs üretimine olan etkileri incelenmiştir. CV-1 hücrelerinde bulunan ve anti-HIV-1 etkiye sahip Trim5-alpha proteinin virüs enfeksiyonunu engellemesinden kaçınmak amacıyla deneylerimizde, HIV-1'in moleküler klonlarını olan pNL4-3 plazmidini hücrelere transfekte ederek enfeksiyon gerçekleştirilmiştir. Çünkü Trim5alpha proteinin engelleyici etkisinin virüs partiküllerine yönelik olduğu bilinmektedir. Plazmidlere klonlanmış viral moleküler DNA klonları Trim5-alpha'dan etkilenmemektedir. Böylece maymun hücrelerinde ekspres olan kısıtlayıcı faktörlerin denemelerimiz üzerinde oluşturabileceği olumsuz sonuçlardan da kaçınılmıştır. Bu deneylerde yalnız insan 293 ve AYM CV1 hücreleri kullanılmıştır. Öncelikle, HIV-1 virüsüyle enfekte edilmiş CV-1 ve 293 hücrelerinde SLPI proteininin üretilip üretilmediği gerçek zamanlı PZR ile mRNA seviyesinde araştırılmış, sonuçlar enfekte olmamış hücrelerle kıyaslanmıştır (Şekil 11). Sonuçlar oluşturulmuş hücre hatlarında yapılan deneylerin bulgularına paralellik göstermiştir. SLPI üretimi, HIV-1 ile enfekte olmuş maymun hücrelerinde, enfekte olmamış hücrelere kıyasla belirgin bir artış göstermektedir. Enfekte olmuş insan hücrelerindeki artış ise düşük seviyelerde kalmıştır.



Şekil 11. HIV-1 ile enfekte edilmiş insan ve maymun hücrelerindeki SLPI gen ifadenmesinin enfekte olmamış hücrelerle kıyaslanması

Ayrıca, SLPI proteininin virüs üretimine olan etkilerinin değerlendirilmesi amacıyla HIV-1 ile enfekte edilen ve SLPI proteininin aşırı ifadelendirildiği insan ve maymun hücrelerindeki Viral p24 antijen seviyeleri enfekte edilmiş normal hücrelerdekiyle ELISA yöntemi ile kıyaslanmıştır (Şekil 12). Görüldüğü üzere transfeksiyon yöntemi ile SLPI'nın aşırı olarak ifadelendirildiği hem maymun hem de insan hücrelerinde virüs üretiminde sırasıyla yaklaşık üç ve iki kat azalma olmuştur.



Şekil 12. HIV ile enfekte edilmiş hücrelerde SLPI proteininin aşırı ifadenmesinin virüs üretimine etkisi

5. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnsan hücrelerinin aksine, HIV-1 enfeksiyonuna dirençli oldukları bilinen maymun hücrelerinde SLPI mRNA ve protein miktarları HIV-1 Tat proteininin varlığında belirgin bir şekilde artış göstermiştir (Şekil 7 ve 8). Bu artışın, Vero hücrelerinde, CV1 hücrelerine kıyasla daha az olduğu tespit edilmiştir. Bunun muhtemel nedenleri arasında, farklı AYM türlerinden elde edilmiş olan söz konusu hücrelerdeki türler arası farklılıklar olabileceği gibi, kalıcı hücre hatlarının oluşturulması sırasında DNA plazmidlerinin genomda herhangi bir bölgeye rastgele entegre olmaları da gösterilebilir. Genomda daha aktif bir bölgeye entegre olan genlerin ifadenme seviyeleri daha yüksek olabilmektedir.

Diğer yandan, Tat proteinini üreten CV1 (CV1-Tat) hücrelerindeki SLPI mRNA seviyelerindeki artış yaklaşık 8 kat iken, HIV-1 ile enfekte edilmiş CV1 maymun hücrelerindeki artış 4 kat civarında kalmıştır (Şekil 11). Bu durumun, CV1-Tat hücrelerindeki Tat üretiminin sürekli olarak yüksek miktarda üretilmesinden kaynaklı olduğunu düşünmekteyiz. Ayrıca enfekte olmuş hücrelerdeki protein üretiminin genel olarak düşmesi de nedenler arasında sayılabilir. Ayrıca, HIV-1 ile enfekte olmuş insan 293 hücrelerindeki SLPI mRNA seviyelerinde, Tat üreten kalıcı hücre hatlarından elde ettiğimiz sonucun aksine yaklaşık 2 kat bir artış gözlemlenmiştir. Bu artış, Jana vd.'lerinin (2005) yapmış oldukları çalışmanın bulgularıyla örtüşmektedir. Anılan çalışmada, insan ağız epitel hücreleri ile inkübe edilen HIV-1 virüs tanelerinin, virüs zarfında bulunan gp120 proteininin, enfeksiyondan bağımsız olarak hücre yüzeyi ile etkileşimi neticesinde SLPI ifadenmesini arttırdığı gösterilmiştir. Söz konusu etkileşim tamamen hücre dışında gerçekleşmekte ve ölü (aktif olmayan) virüs tanelerinin de aynı etkiye sahip olduğu gösterilmiştir.

Yukarıda da bahsedildiği üzere literatürde, SLPI'nın komşu hücrelere difüz ederek o hücrelerde de transkripsiyon faktörü NFkB'ye bağımlı transkripsiyonu azalttığı yönünde bulgular mevcuttur. Bu bilgiler ışığında, SLPI'nın, oluşturduğumuz hücre hatlarında da benzer bir etkiyi yapıp yapmadığını araştırdığımız deneyler neticesinde, SLPI'nın hem insan hem de maymun hücrelerinde NFkB bağımlı transkripsiyonu azalttığı gözlemlenmiştir. NFkB bağımlı transkripsiyonun azalmasının çalışmamız açısından iki ayrı önemi bulunmaktadır. Birincisi, HIV-1 LTR promotorunda da NFkB duyarlı olması ve SLPI'nın enfekte olmuş hücrelerde HIV-1 transkripsiyonunu engelleyerek virüs üretiminin azalmasına neden olabileceğidir. Bu durum literatürdeki daha önce yapılmış olan çalışmalarla da gösterilmiştir (Quinto vd., 1999; Palmieri vd., 2004; Victoriano vd., 2006; Asamitsu vd., 2008). Anılan çalışmalar, NFkB aktivitesinin

düşürülmüş olduğu insan hücrelerindeki HIV-1 replikasyonunun engellendiğini göstermiştir. Bizim de yaptığımız deneyler SLPI'nın aşırı üretildiği insan ve maymun hücrelerinde hem HIV-1 LTR promotor aktivitelerinde belirgin bir azaltmaya neden olmuş (Şekil 10) hem de enfekte olmuş hücrelerdeki virüs üretimini maymun hücrelerinde 3 kat, insan hücrelerinde ise 2 kat azaltmıştır (Şekil 12). Maymun hücrelerindeki azalmanın daha çok olması, muhtemelen enfekte olmuş hücrelerde üretilen Tat proteinin SLPI üretimini artırıcı etkisinden kaynaklanmaktadır (Şekil 11). Enfekte olmuş insan hücrelerindeki SLPI miktarındaki artışın maymun hücrelerine göre oldukça düşük seviyede gerçekleşmektedir. NFkB bağımlı transkripsiyonun azalmasının diğer bir önemi ise, hücrelerdeki NFkB tarafından aktive olan inflamasyondan sorumlu genlerin ifadenmesinin ve dolayısıyla bağışıklık sisteminin aktivasyonunun engellenmesidir (Lawrence, 2009; Oeckinghaus ve Ghosh, 2009). Yapılan birçok çalışmada, HIV-1 enfeksiyonu sırasında bağışıklık sisteminin kalıcı aktivasyonunun (kronik inflamasyonun) T hücre azalmasının ve AIDS'e ilerlemenin en önemli nedeni olduğu gösterilmiştir (Sousa vd., 2002; Hazenberg vd., 2003; Deeks vd., 2004; van Asten vd., 2004). AYM'lerde yapılan bir çalışmada ise, SIV ile enfekte olmuş maymunlarda oluşan anti-inflamatuar profilin bu maymunları AIDS'e karşı koruduğu tespit edilmiştir (Kornfeld vd., 2005). Maymunlardaki bu anti-inflamatuar profilin oluşması, enfeksiyondan sonra anti-inflamatuar etkiye sahip IL-10 seviyelerindeki aşırı artışa ve pro-inflamatuar sitokinlerin seviyelerinde artış olmamasından kaynaklandığı gösterilmiştir. İlginçtir ki, SLPI'nın, insan makrofajlarında IL-10'un üretimini arttığını gösteren bir çalışma mevcuttur (Sano vd., 2000). Bu bilgi SLPI'nın insanlarda da IL-10 üzerinden anti-inflamatuar profilin oluşmasına katkıda bulunup AIDS'i engelleyici etki gösterebileceğine bir örnek teşkil etmektedir.

Tüm bu veriler SLPI'nın HIV-1 üretimini azaltıcı etkilerinin yanında enfekte bireylerde AIDS'in ortaya çıkmasını önleyici etkilerinin olduğunu işaret etmektedir. Kolombiya'da HIV-1 elit kontrolcülerini (HIV-1 ile enfekte olup da uzun yıllar veya hiç AIDS'e yakalanmayan) diye bilinen bir hasta grubunda yapılmış çalışmada, bu bireylerin (Taborda vd., 2012) PBMC hücrelerinin diğer bireylere (elit kontrolcü olmayan) kıyasla çok daha yüksek miktarda SLPI ürettiklerinin ve bağışıklık sistemi aktivasyonunun düşük seviyede kaldığının bulunmuş olması bu savı destekler niteliktedir.

Yapılan birçok çalışmada tükürük ve vajinal sıvı gibi vücut salgılarında bulunan salgılanmış SLPI'nın, HIV-1'in hücrelere girmesini engelleyerek enfeksiyondan koruduğu yönündedir. Ancak bu tamamen hücre dışı, hatta vücut salgılarında olduğu için de vücut dışı bir etkidir. Halihazırda HIV-1 ile enfekte olmuş hücrelerde, SLPI proteininin hücre içi anti-HIV etkisi olduğu yönünde



hiçbir bulgu yoktur. Bu nedenle, HIV-1 enfeksiyonuna dirençli oldukları bilinen maymun hücrelerinde HIV-1 Tat proteini varlığında indüklendiğini gözlemlediğimiz SLPI'nın hücre içinde HIV-1 promotorunu baskılayarak virüs üretimini azalttığı önemli bir bulgudur.

Elde ettiğimiz sonuçlar, HIV-1'e dirençli oldukları bilinen maymun hücrelerinde şimdiye kadar ortaya çıkartılmış HIV-1 dirençlilik mekanizmalarına ek bir mekanizmaya işaret etmektedir. Ayrıca SLPI üretiminin HIV-1 Tat proteininin varlığında artış göstermesi, bu hücrelerin HIV-1 enfeksiyonunu algılayacak şekilde evrildiğini de göstermektedir. İki farklı AYM türünde de aynı sonuçların gözlemlenmesi bu kanıyı kuvvetlendirmektedir. Konunun, HIV-1'e dirençli oldukları bilinen diğer eski dünya maymun türlerinde de araştırılması bu kanıyı güçlendirmek açısından gereklilik arz etmektedir. Ayrıca elde ettiğimiz sonuçların, SLPI'nın HIV-1 enfeksiyonun kontrol altına alınması ve hastaların AIDS'e yakalanmasını engellemeye yönelik klinik çalışmaların yolunu açabileceğini de düşünüyoruz.

Kaynaklar

Abe, T., Kobayashi N., Yoshimura K., Trapnell B.C., Kim H., Hubbard R.C., Brewer M.T., Thompson R.C., Crystal R.G. 1991. "Expression of the secretory leukoprotease inhibitor gene in epithelial cells", *The Journal of clinical investigation*, 87, 2207-15.

Aiken, C., Joyce S. 2011. "Immunology: TRIM5 does double duty", *Nature*, 472, 305-6.

Asamitsu, K., Yamaguchi T., Nakata K., Hibi Y., Victoriano A.F., Imai K., Onozaki K., Kitade Y., Okamoto T. 2008. "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication by blocking I κ B kinase with noraristeromycin", *J Biochem*, 144, 581-9.

Besnier, C., Takeuchi Y., Towers G. 2002. "Restriction of lentivirus in monkeys", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99, 11920-5.

Best, S., Le Tissier P., Towers G., Stoye J.P. 1996. "Positional cloning of the mouse retrovirus restriction gene Fv1", *Nature*, 382, 826-9.

Bieniasz, P.D. 2003. "Restriction factors: a defense against retroviral infection", *Trends in Microbiology*, 11, 286-91.

Bieniasz, P.D. 2004. "Intrinsic immunity: a front-line defense against viral attack", *Nature Immunology*, 5, 1109-15.

Bishop, K.N., Mortuza G.B., Howell S., Yap M.W., Stoye J.P., Taylor I.A. 2006. "Characterization of an amino-terminal dimerization domain from retroviral restriction factor Fv1", *Journal of Virology*, 80, 8225-35.

Cullen, B.R., Malim M.H. 1991. "The HIV-1 Rev protein: prototype of a novel class of eukaryotic post-transcriptional regulators", *Trends in Biochemical Sciences*, 16, 346-50.

de Silva, S., Wu L. 2011. "TRIM5 acts as more than a retroviral restriction factor", *Viruses*, 3, 1204-9.

Deeks, S.G., Kitchen C.M., Liu L., Guo H., Gascon R., Narvaez A.B., Hunt P., Martin J.N., Kahn J.O., Levy J., McGrath M.S., Hecht F.M. 2004. "Immune activation set point during early HIV infection predicts subsequent CD4+ T-cell changes independent of viral load", *Blood*, 104, 942-7.

Drannik, A.G., Henrick B.M., Rosenthal K.L. 2011. "War and peace between WAP and HIV: role of SLPI, trappin-2, elafin and ps20 in susceptibility to HIV infection", *Biochemical Society Transactions*, 39, 1427-32.

Fittipaldi, A., Giacca M. 2005. "Transcellular protein transduction using the Tat protein of HIV-1", *Advanced Drug Delivery Reviews*, 57, 597-608.

Garcia, J.A., Harrich D., Soultanakis E., Wu F., Mitsuyasu R., Gaynor R.B. 1989. "Human immunodeficiency virus type 1 LTR TATA and TAR region sequences required for transcriptional regulation", *The EMBO journal*, 8, 765-78.

Gatignol, A., Kumar A., Rabson A., Jeang K.T. 1989. "Identification of cellular proteins that bind to the human immunodeficiency virus type 1 trans-activation-responsive TAR element RNA", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 86, 7828-32.

Gaynor, R. 1992. "Cellular transcription factors involved in the regulation of HIV-1 gene expression", *AIDS*, 6, 347-63.

Gaynor, R., Soultanakis E., Kuwabara M., Garcia J., Sigman D.S. 1989. "Specific binding of a HeLa cell nuclear protein to RNA sequences in the human immunodeficiency virus



transactivating region", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 86, 4858-62.

Gupta, S., Mitra D. 2007. "Human immunodeficiency virus-1 Tat protein: immunological facets of a transcriptional activator", Indian Journal of Biochemistry & Biophysics, 44, 269-75.

Harris, R.S., Hultquist J.F., Evans D.T. 2012. "The restriction factors of human immunodeficiency virus", The Journal of biological chemistry, 287, 40875-83.

Harris, R.S., Liddament M.T. 2004. "Retroviral restriction by APOBEC proteins", Nature reviews. Immunology, 4, 868-77.

Hatzioannou, T., Cowan S., Goff S.P., Bieniasz P.D., Towers G.J. 2003. "Restriction of multiple divergent retroviruses by Lv1 and Ref1", The EMBO journal, 22, 385-94.

Hazenbergh, M.D., Otto S.A., van Benthem B.H.B., Roos M.T.L., Coutinho R.A., Lange J.M.A., Hamann D., Prins M., Miedema F. 2003. "Persistent immune activation in HIV-1 infection is associated with progression to AIDS", AIDS, 17, 1881-88.

Hiebsenthal-Millow, K., Greenough T.C., Brettler D.B., Schindler M., Wildum S., Sullivan J.L., Kirchhoff F. 2003. "Alterations in HIV-1 LTR promoter activity during AIDS progression", Virology, 317, 109-18.

Hooker, C.W., Scott J., Apolloni A., Parry E., Harrich D. 2002. "Human immunodeficiency virus type 1 reverse transcription is stimulated by tat from other lentiviruses", Virology, 300, 226-35.

Jablonski, J.A., Amelio A.L., Giacca M., Caputi M. 2010. "The transcriptional transactivator Tat selectively regulates viral splicing", Nucleic Acids Research, 38, 1249-60.

Jana, N.K., Gray L.R., Shugars D.C. 2005. "Human immunodeficiency virus type 1 stimulates the expression and production of secretory leukocyte protease inhibitor (SLPI) in oral epithelial cells: a role for SLPI in innate mucosal immunity", Journal of Virology, 79, 6432-40.

Kaiser, S.M., Malik H.S., Emerman M. 2007. "Restriction of an extinct retrovirus by the human TRIM5alpha antiviral protein", Science, 316, 1756-8.

Karn, J., Stoltzfus C.M. 2012. "Transcriptional and posttranscriptional regulation of HIV-1 gene expression", Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2, a006916.

Kootstra, N.A., Munk C., Tonnu N., Landau N.R., Verma I.M. 2003. "Abrogation of postentry restriction of HIV-1-based lentiviral vector transduction in simian cells", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100, 1298-303.

Kornfeld, C., Ploquin M.J.Y., Pandrea I., Faye A., Onanga R., Apetrei C., Poaty-Mavoungou V., Rouquet P., Estaquier J., Mortara L., Desoutter J.F., Butor C., Le Grand R., Roques P., Simon F., Barre-Sinoussi F., Diop O.M., Muller-Trutwin M.C. 2005. "Antiinflammatory profiles during primary SIV infection in African green monkeys are associated with protection against AIDS", Journal of Clinical Investigation, 115, 1082-91.

Kuciak, M., Gabus C., Ivanyi-Nagy R., Semrad K., Storchak R., Chaloin O., Muller S., Mely Y., Darlix J.L. 2008. "The HIV-1 transcriptional activator Tat has potent nucleic acid chaperoning activities in vitro", Nucleic Acids Research, 36, 3389-400.

Kuroishi, A., Bozek K., Shioda T., Nakayama E.E. 2010. "A single amino acid substitution of the human immunodeficiency virus type 1 capsid protein affects viral sensitivity to TRIM5 alpha", Retrovirology, 7, 58.



Lawrence, T. 2009. "The Nuclear Factor NF-kappa B Pathway in Inflammation", Cold Spring Harbor perspectives in biology, 1.

Lin, A.L., Johnson D.A., Stephan K.T., Yeh C.K. 2004. "Salivary secretory leukocyte protease inhibitor increases in HIV infection", Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology, 33, 410-6.

Lou, X., Sun S., Chen W., Zhou Y., Huang Y., Liu X., Shan Y., Wang C. 2011. "Negative feedback regulation of NF-kappaB action by CITED2 in the nucleus", Journal of Immunology, 186, 539-48.

Malamud, D., Wahl S.M. 2010. "The mouth: a gateway or a trap for HIV?", AIDS, 24, 5-16.

Malim, M.H., Bieniasz P.D. 2012. "HIV Restriction Factors and Mechanisms of Evasion", Cold Spring Harbor perspectives in medicine, 2, a006940.

Mayol, K., Munier S., Beck A., Verrier B., Guillon C. 2007. "Design and characterization of an HIV-1 Tat mutant: inactivation of viral and cellular functions but not antigenicity", Vaccine, 25, 6047-60.

McNeely, T.B., Dealy M., Dripps D.J., Orenstein J.M., Eisenberg S.P., Wahl S.M. 1995. "Secretory leukocyte protease inhibitor: a human saliva protein exhibiting anti-human immunodeficiency virus 1 activity in vitro", The Journal of clinical investigation, 96, 456-64.

McNeely, T.B., Shugars D.C., Rosendahl M., Tucker C., Eisenberg S.P., Wahl S.M. 1997. "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 infectivity by secretory leukocyte protease inhibitor occurs prior to viral reverse transcription", Blood, 90, 1141-9.

Munk, C., Brandt S.M., Lucero G., Landau N.R. 2002. "A dominant block to HIV-1 replication at reverse transcription in simian cells", Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 99, 13843-8.

Nakayama, E.E., Miyoshi H., Nagai Y., Shioda T. 2005. "A specific region of 37 amino acid residues in the SPRY (B30.2) domain of African green monkey TRIM5alpha determines species-specific restriction of simian immunodeficiency virus SIVmac infection", Journal of Virology, 79, 8870-7.

Neil, S.J., Zang T., Bieniasz P.D. 2008. "Tetherin inhibits retrovirus release and is antagonized by HIV-1 Vpu", Nature, 451, 425-30.

Nisole, S., Stoye J.P., Saib A. 2005. "TRIM family proteins: retroviral restriction and antiviral defence", Nature reviews. Microbiology, 3, 799-808.

O'Neill, L.A., Kaltschmidt C. 1997. "NF-kappa B: a crucial transcription factor for glial and neuronal cell function", Trends in Neurosciences, 20, 252-8.

Oeckinghaus, A., Ghosh S. 2009. "The NF-kappaB family of transcription factors and its regulation", Cold Spring Harbor perspectives in biology, 1, a000034.

Palmieri, C., Trimboli F., Puca A., Fiume G., Scala G., Quinto I. 2004. "Inhibition of HIV-1 replication in primary human monocytes by the IkappaB-alphaS32/36A repressor of NF-kappaB", Retrovirology, 1, 45.

Passerini, L.D., Keckesova Z., Towers G.J. 2006. "Retroviral restriction factors Fv1 and TRIM5alpha act independently and can compete for incoming virus before reverse transcription", Journal of Virology, 80, 2100-5.



Pereira, L.A., Bentley K., Peeters A., Churchill M.J., Deacon N.J. 2000. "A compilation of cellular transcription factor interactions with the HIV-1 LTR promoter", *Nucleic Acids Research*, 28, 663-8.

Ponti, D., Troiano M., Belenchi G.C., Battaglia P.A., Gigliani F. 2008. "The HIV Tat protein affects processing of ribosomal RNA precursor", *BMC Cell Biology*, 9, 32.

Pugliese, A., Vidotto V., Beltramo T., Petrini S., Torre D. 2005. "A review of HIV-1 Tat protein biological effects", *Cell Biochemistry and Function*, 23, 223-7.

Quinto, I., Mallardo M., Baldassarre F., Scala G., Englund G., Jeang K.T. 1999. "Potent and stable attenuation of live-HIV-1 by gain of a proteolysis-resistant inhibitor of NF-kappa B (I kappa B-alpha S32/36A) and the implications for vaccine development", *Journal of Biological Chemistry*, 274, 17567-72.

Requejo, H.I. 2006. "Worldwide molecular epidemiology of HIV", *Revista de saude publica*, 40, 331-45.

Richardson, M.W., Carroll R.G., Stremlau M., Korokhov N., Humeau L.M., Silvestri G., Sodroski J., Riley J.L. 2008. "Mode of transmission affects the sensitivity of human immunodeficiency virus type 1 to restriction by rhesus TRIM5alpha", *Journal of Virology*, 82, 11117-28.

Romani, B., Engelbrecht S., Glashoff R.H. 2010. "Functions of Tat: the versatile protein of human immunodeficiency virus type 1", *The Journal of general virology*, 91, 1-12.

Sano, C., Shimizu T., Sato K., Kawauchi H., Tomioka H. 2000. "Effects of secretory leucocyte protease inhibitor on the production of the anti-inflammatory cytokines, IL-10 and transforming growth factor-beta (TGF-beta), by lipopolysaccharide-stimulated macrophages", *Clinical and Experimental Immunology*, 121, 77-85.

Sawyer, S.L., Wu L.I., Akey J.M., Emerman M., Malik H.S. 2006. "High-frequency persistence of an impaired allele of the retroviral defense gene TRIM5alpha in humans", *Current biology : CB*, 16, 95-100.

Scott, A., Weldon S., Taggart C.C. 2011. "SLPI and elafin: multifunctional antiproteases of the WFDC family", *Biochemical Society Transactions*, 39, 1437-40.

Shibata, R., Sakai H., Kawamura M., Tokunaga K., Adachi A. 1995. "Early replication block of human immunodeficiency virus type 1 in monkey cells", *The Journal of general virology*, 76 (Pt 11), 2723-30.

Shugars, D.C., Alexander A.L., Fu K., Freel S.A. 1999. "Endogenous salivary inhibitors of human immunodeficiency virus", *Archives of oral biology*, 44, 445-53.

Sousa, A.E., Carneiro J., Meier-Schellersheim M., Grossman Z., Victorino R.M.M. 2002. "CD4 T cell depletion is linked directly to immune activation in the pathogenesis of HIV-1 and HIV-2 but only indirectly to the viral load", *Journal of Immunology*, 169, 3400-06.

Strebel, K., Luban J., Jeang K.T. 2009. "Human cellular restriction factors that target HIV-1 replication", *BMC medicine*, 7, 48.

Stremlau, M., Owens C.M., Perron M.J., Kiessling M., Autissier P., Sodroski J. 2004. "The cytoplasmic body component TRIM5alpha restricts HIV-1 infection in Old World monkeys", *Nature*, 427, 848-53.

Taborda, N.A., Catano J.C., Delgado J.C., Rugeles M.T., Montoya C.J. 2012. "Higher SLPI Expression, Lower Immune Activation, and Increased Frequency of Immune Cells in a Cohort of Colombian HIV-1 Controllers", *J AIDS-Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 60, 12-19.



Taggart, C.C., Cryan S.A., Weldon S., Gibbons A., Greene C.M., Kelly E., Low T.B., O'Neill S. J., McElvaney N.G. 2005. "Secretory leucoprotease inhibitor binds to NF-kappaB binding sites in monocytes and inhibits p65 binding", *The Journal of experimental medicine*, 202, 1659-68.

Towers, G.J., Goff S.P. 2003. "Post-entry restriction of retroviral infections", *AIDS reviews*, 5, 156-64.

van Asten, L., Danisman F., Otto S.A., Borghans J.A.M., Hazenberg M.D., Coutinho R.A., Prins M., Miedema F. 2004. "Pre-seroconversion immune status predicts the rate of CD4 T cell decline following HIV infection", *AIDS*, 18, 1885-93.

Ventura, A.M., Arens M.Q., Srinivasan A., Chinnadurai G. 1990. "Silencing of human immunodeficiency virus long terminal repeat expression by an adenovirus E1a mutant", *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 87, 1310-4.

Victoriano, A.F.B., Asamitsu K., Hibi Y., Imai K., Barzaga N.G., Okamoto T. 2006. "Inhibition of human immunodeficiency virus type 1 replication in latently infected cells by a novel I kappa B kinase inhibitor", *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 50, 547-55.

Wichroski, M.J., Robb G.B., Rana T.M. 2006. "Human retroviral host restriction factors APOBEC3G and APOBEC3F localize to mRNA processing bodies", *Plos Pathogens*, 2, e41.

Wu, F.K., Garcia J.A., Harrich D., Gaynor R.B. 1988. "Purification of the human immunodeficiency virus type 1 enhancer and TAR binding proteins EBP-1 and UBP-1", *The EMBO journal*, 7, 2117-30.

Wu, Y., Marsh J.W. 2003. "Gene transcription in HIV infection", *Microbes and infection / Institut Pasteur*, 5, 1023-7.

Yan, N., Chen Z.J. 2012. "Intrinsic antiviral immunity", *Nature Immunology*, 13, 214-22.

Zhang, F., Hatzioannou T., Perez-Caballero D., Derse D., Bieniasz P.D. 2006. "Antiretroviral potential of human tripartite motif-5 and related proteins", *Virology*, 353, 396-409.

TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU

Proje Yürütücüsü:	Doç. Dr. ALPER ARSLANOĞLU
Proje No:	115S213
Proje Başlığı:	Afrika Yeşil Maymunu CV-1 Hücre Hatlarında, HIV-1 Tat Proteini Varlığında Üretilen SLPI Proteininin İnsan Hücre Hatlarındaki Üretiminin İncelenmesi ve HIV-1 LTR Promotoruna Etkisinin Araştırılması
Proje Türü:	1001 - Araştırma
Proje Süresi:	24
Araştırmacılar:	AHMET KOÇ, HÜSEYİN ÇAĞLAR KARAKAYA
Danışmanlar:	
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi:	İZMİR YÜKSEK TEKNOLOJİ ENSTİTÜSÜ FEN FAKÜLTESİ MOLEKÜLER BİYOLOJİ VE GENETİK BÖLÜMÜ
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri:	01/10/2015 - 01/10/2017
Onaylanan Bütçe:	473778.0
Harcanan Bütçe:	287316.67
Öz:	<p>Projemiz, HIV-1 enfeksiyonuna dirençli oldukları bilinen Afrika Yeşil Maymunu hücrelerinde daha önce varlığı tespit edilmemiş HIV-1 engelleyici protein veya proteinlerin varlığını araştırmayı amaçlamıştır. Söz konusu proteinlerin hücre içi bağışıklık mekanizmaları tarafından virüs varlığının algılanmasından sonra üretilmesi ihtimali göz önüne alındığında, HIV-1 ile enfekte olan hücrelerde ilk üretilen iki viral proteinden birisi olan Tat proteininin varlığı virüs enfeksiyonunun belirteci olabileceği düşünülmüştür. Bu bağlamda, iki boyutlu poliakrilamid jel elektroforezi ve kütle spektrometrisi kullanılarak yapılan proteomik ön çalışmalarımız, ardından da proje kapsamında yaptığımız Western blot ve gerçek zamanlı PZR çalışmaları neticesinde, maymun hücrelerinde SLPI proteininin HIV-1 Tat varlığında arttığı, ancak insan hücrelerinde herhangi bir değişiklik olmadığı gözlenmiştir. SLPI proteininin, Reporter gen kullanımıyla yapılan transkripsiyon transaktivasyon analizleri neticesinde HIV-1 promotörü üzerine baskılayıcı etkisi olduğu anlaşılmış, enfeksiyon deneylerinde de HIV-1 üretimini belirgin olarak azalttığı gösterilmiştir.</p>
Anahtar Kelimeler:	anti-HIV-1, SLPI, Tat
Fikri Ürün Bildirim Formu Sunuldu Mu?:	Hayır