

TÜBİTAK

2007-436



TÜRKİYE BİLİMSEL VE TEKNOLOJİK ARAŞTIRMA KURUMU
THE SCIENTIFIC AND TECHNOLOGICAL RESEARCH COUNCIL OF TURKEY

Temel Bilimler Araştırma Grubu
Basic Sciences Research Grant Group

92914

**HIV REGÜLATÖR GENLERİNİ EKSPRESE EDEN HÜCRELERİN SEÇİCİ OLARAK
ÖLDÜRÜLMESİ**

PROJE NO: TBAG-2277 (102T204)

**Yrd. Doç. Dr. Alper ARSLANOĞLU
Zeynep YEĞİN**

Nisan 2007

Önsöz

HIV ile enfekte olmuş hücreler, normal hücrelere göre genetik düzeyde bir farklılık gösterirler ki, bu da enfekte olmuş hücrenin kromozomuna entegre olmuş HIV genomundan kaynaklanmaktadır. Bu farklılığın, enfekte olmuş hücrelerin seçici olarak öldürülebilmelerini sağlayacak stratejilerin geliştirilmesinde yardımcı olabileceğini düşünmekteyiz. HIV, kendi gen ekspresyonunu denetleyen proteinler üretmektedir. Bunlardan iki tanesi “rev” ve “tat” proteinleridir. Bu iki denetleyici protein olmadan virüs genomunun kodladığı ve virüsün çoğalmasında görev alan proteinler üretilmemektedir. Bu nedenle HIV’in çoğalması “rev” ve “tat” proteinlerine bağlıdır. Bu iki proteinin denetleyici özellikleri sadece HIV genomu üzerinde etkilidir ve enfekte olmuş hücre genomunun gen ekspresyonuna etki etmemektedir. Bunun nedeni, HIV genomunda ve mRNA’larında bulunan özel RNA dizileridir ve “tat” ile “rev” proteinleri bu dizilere bağlanarak etkilerini göstermektedirler. Proje, hücrelerde toksik etki yapan bir proteinin (bakteri endotoksinleri veya HSV timidin kinaz gibi proteinler) üretiminin yukarıda bahsedilen özel DNA dizilerinin kullanımıyla HIV “rev” ve “tat” proteinlerine bağımlı bir hale getirilmesini ve bu toksik proteini kodlayan DNA molekülünün “rev” ve “tat” proteinlerini üreten (enfekte olmuş bir hücredeki gibi) veya üretmeyen (enfekte olmamış hücredeki gibi) hücrelere aktarımını önermektedir. Proje süresince karşılaşılan sorunlardan dolayı ne yazık ki ancak hücreleri oluşturmada kullanılacak DNA molekülleri ile toksik etkinin deneneceği DNA molekülleri hazırlanabilmiş ve doğrulukları DNA dizi analiziyle teyit edilmiştir. Hücre hatlarının oluşturulmasına yönelik çalışmalar ve vektörlerin seçici öldürülebilirlikteki etkilerinin gözlenmesi bundan sonra kendi olanaklarımızla ileriki dönemlerde devam edecektir. Proje, TÜBİTAK tarafından desteklenmiştir.

İçindekiler:

Özet	1
Abstract	2
1.0. Giriş	3
2.0. Genel Bilgiler	3
3.0. Gereç ve Yöntem	5
4.0. Bulgular	7
5.0. Tartışma ve Sonuç	37
Yararlanılan kaynak	38
Proje özet bilgi formu	40

Özet:

Günümüzde, HIV'e karşı etkin bir mücadele geliştirilemediğinden AIDS'in tedavisi yoktur. HIV ile enfekte olmuş hastalarda kullanılmakta olan ilaçlar virüsün hasta içinde yayılmasını engellemek amacıyla yöneliktir ve sadece AIDS hastalığının ortaya çıkmasını geciktirmektedir. Netice olarak, HIV'e karşı etkin bir koruma getirebilmek için, sadece HIV'in yayılmasını önlemeye çalışmak yerine, aynı zamanda HIV ile enfekte olmuş hücrelerin de öldürülmesinin (dolayısıyla virüsün de yok edilmesinin) çok daha etkili olacağını düşünmekteyiz. Planladığımız bu çalışmada, sadece HIV regülatör genleri olan rev ve tat'ı ekspres eden hücrelerde üretilecek ve o hücrelerin ölmesini sağlayacak bir proteini kodlayan özel bir DNA molekülünün dizaynı ve bu DNA molekülünün HIV enfeksiyonuna açık hücrelere aktarımı amaçlanmıştır.

Anahtar Sözcükler

HIV, rev, tat, HSV-TK, seçici öldürme.

Abstract:

Currently, there is no cure for AIDS, because there have not been any fully effective anti-HIV strategies developed. The medications used for the treatment of HIV infected patients is for the prevention of the virus spread and thus only helps to delay the patient's progression into AIDS. In order to provide an effective protection against HIV, we reasoned that, killing of cells infected with HIV together with the use of drugs that prevent virus spread will be a much more effective strategy. The work here aims to design and transfer into the permissive cells of a specific DNA molecule, which encodes a toxic gene that will only be expressed in cells expressing HIV regulatory genes rev and tat, and achieve selective killing of those cells without giving any harm to normal cells.

Keywords

HIV, rev, tat, HSV-TK, selective killing.

1.0. Giriş

Günümüzde AIDS (Acquired Immuno-deficiency Syndrome) hastalarında kullanılan tedavi yöntemleri, hastalığa sebebiyet veren HIV (Human Immuno-deficiency Virus)'in hasta vücudunda çoğalıp, yayılmasını engellemeye yöneliktir. Bu yöntemler, enfekte olmuş hücrelerin virüs üretebilme potansiyellerini ortadan kaldıramadıklarından, kullanılan ilaçların varlığında virüs üretimi sadece azaltılmakta ve buna bağlı olarak virüsün başka hücrelere yayılabilme süreci uzatılmaktadır. Bunun neticesinde, tedavi gören hastaların ömürleri, tedavi görmeyenlere göre ortalama olarak birkaç yıl daha uzatılabilmekte fakat AIDS'den ölmeleri engellenememektedir.

AIDS hastalarının tamamen tedavi edilebilmeleri için HIV'in hasta vücudundan yok edilmesi gerekmektedir ki, bu da ancak HIV ile enfekte olmuş ve aktif olarak bu virüsü üreten hücrelerin ortadan kaldırılmasıyla mümkündür. Bunu başarmaktaki zorluk, HIV'in hedef olarak kullandığı hücrelerden enfekte olanları, enfekte olmamış hücrelerden ayrı olarak seçip, yok edilememekten kaynaklanmaktadır. Benzer bir zorluk, kanser hastalarındaki tümörlü dokuların kemoterapi ve radyoterapi gibi yöntemlerle seçici olarak yok edilmeye çalışılmasında da yaşanmaktadır. Bu projede planlanan çalışma, HIV ile enfekte olmuş hücrelerin seçici olarak öldürülebilmelerini sağlayacak bir yöntemin in vitro olarak doku kültürü ortamında oluşturulmasını amaçlamaktadır.

2.0. Genel Bilgiler

Son yıllarda, enfekte olmuş hastalarda yapılan virüs dinamiği çalışmalarında HIV replikasyonunun, AIDS patogeneziindeki önemi bir kez daha doğrulanmıştır (Grossman, 1998; Chun, 1999; Pierson, 2000). Enfekte olmuş hastalardaki HIV üretimi, yeni enfeksiyonlar ile virüs ve virüsle enfekte olmuş hücrelerin yenilenmesinin neticesi olarak görünmektedir. Bu yüzden, etkili bir HIV enfeksiyonu tedavisi, bağışıklık sisteminin yeniden yapılanmasına olanak verecek olan virüs yükünün büyük çaplı ve uzun süreli azaltılmasını gerektirmektedir.

Günümüzde, HIV yaşam döngüsündeki farklı noktaları bloke eden revers transkriptaz ve proteaz gibi inhibitörleri çoklu ilaç kombinasyonları şeklinde kullanılarak, hasta kanındaki virüs miktarı önemli oranlarda azaltılabilmektedir (Finzi, 1999; Ortiz, 2002; Dybul, 2001). Fakat, yapılan çalışmalarda, çoklu ilaç kombinasyonuna tabi tutulan bütün hastalardan, uzun yıllar boyunca alınan kan hücrelerinden virüs izole edilebildiği gösterilmiştir (Chun, 1999; Finzi, 1999). Kan ve lenf dokularının analizleri, aktif olmayan bazı CD4+ hafıza T hücrelerin ve makrofajların entegre olmuş HIV provirüsü taşıdıklarını ortaya çıkarmıştır (Finzi, 1998; Finzi, 1997; Hezareh, 1997). Bu hücreler virüs rezervuarı gibi görev yapmakta ve herhangi bir şekilde aktif duruma geçtiklerinde bulaşıcı virüs partiküllerini üretebilmektedirler. Bu durum, tedavinin sürecinin ilk hesaplamalara göre çok daha uzun olabileceğini göstermektedir (Perelson, 1997). Ayrıca, bu hastaların kanlarındaki virüs miktarları teşhis edilebilen sınırın altında olmasına rağmen, zamanla genetik farklılık taşıyan HIV türlerinin oluştuğu gözlemlenmiştir (Ortiz, 2002). Bu da tedavi gören hastalarda dahi, virüs replikasyonunun sürekliliğini göstermektedir ki, bu durum zamanla, kullanılan ilaçlara dirençli HIV suşlarının seçilmesine yol açarak tedavinin imkansızlaşmasına sebebiyet verebilmektedir. Bu virüs replikasyonu, büyük bir olasılıkla, ya ilaçların ulaşmadığı anatomik bölgelerde devam etmektedir ya da bu ilaçlar tüm HIV replikasyonunu bloke etmekte tamamiyle etkili

değildirler.

HIV'in yok edilmesindeki birincil engelin, potansiyel virüs rezervuarlarından kaynaklandığı düşüncesinden yola çıkılarak, birçok araştırmacı bu rezervuarların ortadan kaldırılmasına yönelik değişik yaklaşımlar üzerinde çalışmaktadır. Bunlardan bir tanesi kombinasyonlu ilaç terapisinin yoğunlaştırılmasını içermektedir (Pierson, 2000). Bunda amaçlanan, dozaj artırımıyla düşük seviyede var olan virüs replikasyonunu tamamen engelleyebilmektir. Fakat bu durumda hastalar, yüksek miktarlarda kullanılan ilaçların oluşturduğu toksik yan etkilere maruz bırakılmaktadır.

Başka bir yaklaşım da, kombinasyonlu ilaç tedavisi gören hastalarda rezervuar görevi yapan gizli enfekte olmuş hücreleri sitokinler yardımıyla aktif hale getirerek, bu hücrelerdeki virüs replikasyonunu uyarmaktır. Burada yatan fikir de, aktif haldeki virüs üreten hücreleri bağışıklık sistemi tarafından tanınır hale getirmek ve aynı zamanda da ürettikleri virüslerin yayılmalarını kullanılan ilaçlar sayesinde engelleyebilmektir. Bu çalışmalar neticesinde HIV rezervuarlarında bir azalma sağlanmış fakat tamamen eliminasyonu mümkün olmamıştır.

Üzerinde çalışılan üçüncü bir yöntem de, nükleik asit ve proteinlere dayalı gen terapisi. AIDS'de gen terapisi kullanımı, CD4⁺ T lenfositlerini yeniden yapılandırarak HIV enfeksiyonuna karşı dirençli hale getirmeyi amaçlamaktadır. Bu amaca ulaşmak için kullanılabilir yöntemler, CD4⁺ T lenfositlerinin ex vivo olarak transduze edilerek hastaya geri aktarılması ya da lenfositlerin projenitör kök hücrelerini in vivo olarak kalıcı bir şekilde manipüle edilmesi olabilir.

HIV enfeksiyonuna karşı, yukarıda anılan gen terapisi ve anti-HIV ilaç kullanımı yaklaşımlarının hemen hemen hepsi, hücrelerin yeni enfeksiyonlardan tamamen korunmasından ziyade, provirüsün hücre kromozomuna entegrasyonundan sonraki virüs replikasyonun engellenmesine yöneliktir. Böyle bir durum da, bulaşıcı provirüs taşıyan enfekte olmuş hücrelerin oluşmasına neden olmaktadır. Virüsün yayılmasının engellenmesinin daha etkili bir yolu da öldürücü bir genin, enfekte olmuş hücrelerde koşullu olarak eksprese edilmesini sağlamak olabilir. Bu tür çalışmalar, HIV enfeksiyonu başta olmak üzere bazı bulaşıcı hastalıklar üzerinde yapılmıştır (Venkatesh, 1990; Brady, 1994; Caruso, 1992; Caruso, 1995; Marcello, 1998; Smith, 1996; Caruso, 1996; Caruso, 1997; Miyake, 2001). Bu tür deneylerde amaçlanan, öldürücü bir genin HIV regülatör dizinlerinin transkripsiyonel kontrolü altına yerleştirilmesi ve aktarılan hücrelerde HIV replikasyonu şartına bağlı olarak aktif hale geçirilmesidir. Önerilen proje benzer bir yaklaşımın geliştirilmesini amaçlamaktadır.

Gen terapisine dayalı tüm tedavi yaklaşımları tarafından paylaşılan ortak bir problem, etkili gen transferi yöntemlerine duyulan ihtiyaçtır. Gen terapisi günümüzde deneme aşamasındadır ve çözülmesi gereken bir takım sorunları vardır. Bunlar, kullanılan vektöre karşı hastada oluşan immün reaksiyonlar, vektörlerin hedef hücrelere yönlendirilebilmesi, aktarılması amaçlanan genlerin kontrollü olarak arzu edilen seviyelerde eksprese edilebilmesi ve büyük boyutlardaki genlerin vektörler tarafından taşınabilmesi kapasitesinin artırılabilmesidir. Henüz bu sorunların üstesinden tamamen gelinememişse de, ABD ve Avrupa'da bir çok hastalığın tedavisine yönelik olarak gen terapisi denemeleri hastalar üzerinde klinik olarak başlatılmış ve halen de sürmektedir.

Son yıllarda yapılan çalışmalarda, HIV'in de içinde bulunduğu lentivirus genus'unda bulunan

viral vektörlerin HIV enfeksiyonu için kullanımının öteki yöntemlere göre çok daha olumlu sonuçlar verebileceği gösterilmiştir (Poeschla, 1996; Buchschacher, 2000; Gao, 2001; Kowolik, 2001; Berkowitz, 2001; Hanazono, 2001) ve bu vektörler AIDS hastalığının gen terapisi yoluyla tedavisi için gelecek vaad etmektedirler.

3.0. Gereç ve Yöntem

A. HIV-1 “rev” ve “tat” proteinlerine bağımlı olarak eksprese olacak toksin geni içeren DNA molekülünün hazırlanması.

a) HIV-1 genomu üzerinde bulunan ve “tat” ile “rev” proteinlerinin etkilerini göstermesi için gerekli olan DNA bölgeleri PCR yöntemiyle çoğaltılacaktır.

i. HIV-1 “tat” proteinin etkisi için gerekli olan HIV-1 5’ LTR promotor ve HIV-1 birinci *splice* verici (*splice* donor) dizinleri, HIV-1 moleküler klonu olan pNL4-3 (NIH AIDS reagent program) plazmidinden, aşağıdaki primer çifti kullanılarak PCR’la çoğaltılacaktır.

LTR5 : 5’ CCTTCTCGTCTAGATGGAAGGGCTAATTTGGTCCC 3’

LTR3 : 5’ CCTTCTCGGGTACCCTCCTTCTAGCCTCCGCTAG 3’

Bu primer çifti sırasıyla özgün (unique) *Xba* I ve *Kpn* I restriksiyon bölgelerini içermektedirler. Restriksiyon bölgelerinin önünde 8’lik ek diziler konmuştur. Bunun nedeni restriksiyon enzimlerinin, çoğaltılmış DNA fragman uçlarını kesebilmelerini kolaylaştırarak, daha sonra yapılacak ligasyon işlemini mümkün olan etkinlik (efficiency) düzeyine ulaştırmaktır. pREP9 plazmidindeki, memelilerde ekspresyonu sağlayan promotor dizini, PCR ile çoğaltılmış ve *Xba* I, *Kpn* I restriksiyon enzimleriyle kesilmiş HIV-1-LTR promotor ve HIV-1 birinci *splice* verici dizinleriyle değiştirilecek ve ortaya çıkacak olan plazmid pREP-LTR olarak adlandırılacaktır.

ii. pNL4-3 plazmidini *Mun* I restriksiyon enzimiyle kesilip uçları DNA polimeraz enzimi kullanılarak doldurulduktan sonra self-ligasyon yöntemiyle tekrar birleştirilecektir. Ortaya çıkacak plazmid pNL4-3-Mun olarak adlandırılacaktır ve “rev” proteininin etkisi için gerekli olan HIV-1 INS, RRE ve HIV-1 yedinci *splice* alıcı (*splice* acceptor) dizinlerini PCR yöntemiyle çoğaltmak amacıyla templet olarak kullanılacaktır. Çoğaltma işlemi aşağıdaki primer çifti ile yapılacaktır.

INS 5: 5’ CCTTCTCGCTCGAGGAGATGGGTGCGAGAGCGTC 3’

RRE 3: 5’ AGTGCTAAGGATCCGTTCACTAATCG 3’

Bu primer çifti sırasıyla *Xho* I ve *Bam*H I restriksiyon bölgelerini içermektedir. Bu primer çiftinin kullanımıyla çoğaltılacak INS-RRE dizinleri adı geçen enzimlerle kesilerek, yine aynı enzimlerle kesilmiş pREP-LTR plazmidine klonlanacaktır. Elde edilen plazmid pREP-LTR-INS-RRE olarak adlandırılacaktır.

b) Toksik etki gösteren proteinleri kodlayan gen (HSV-TK) rekombinant DNA yöntemleriyle izole edilecektir.

i. Hücrelerde toksik etki gösterilmesini sağlayacak HSV-TK (Herpes Simplex Virus, Thymidine Kinase) genini içeren DNA dizisi HSV genomik DNA’sından aşağıda gösterilen primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılıp izole edilecektir.

TK 5: 5’ CCTTCTCGGGTACCATGGCTTCGTACCCCTGCCATC 3’

TK 3: 3’ CCTTCTCGTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCC 3’

Bu primer çifti sırasıyla *Kpn* I ve *Hind* III restriksiyon bölgelerini içermektedir. Çoğaltılan bu gen *Hind* III ve *Kpn* I enzimleri ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilmiş pREP-LTR-INS-RRE plazmidine klonlanacaktır. Yapılan plazmid pREP-LTR-INS-RRE-TK olarak adlandırılacaktır.

Paralel bir çalışmada, haberci gen (reporter gene) olan CAT (chloramphenicol acetyl transferase) geni, yine PCR ile çoğaltılarak (aynı enzim bölgelerini içeren farklı primer çiftiyle) pREP-LTR-INS-RRE plazmidinin *Kpn* I ve *Hind* III ile kesilmiş bölgesine klonlanacaktır. Oluşan plazmid pREP-LTR-INS-RRE-CAT olarak adlandırılacak ve bu konstrak ilerdeki deneyler için pozitif kontrol olarak kullanılacaktır.

ii. Hücrelere lipofeksiyon yöntemiyle aktarılacak olan pREP-LTR-INS-RRE-TK ve pREP-LTR-INS-RRE-CAT plazmidlerinin transfeksiyon verimliliklerinin ölçülebilmesi ve farklı hücre kültürlerinde standardizasyon yapılabilmesi amacıyla *Lac Z* haberci geni (reporter gene), sürekli (constitutive) olarak eksprese edilebilecek şekilde, adı geçen plazmidlerin *Bam* H I restriksiyon enzim bölgesine klonlanacaktır. Oluşacak olan plazmidler sırasıyla pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac ve pREP-LTR-INS-RRE-CAT-Lac olarak adlandırılacaktır.

B. HIV-1 Proteinlerini Üretecek Hücrelerin Hazırlanması

a) İnsan hücrelerinde iki farklı genin tek bir mRNA tarafından ekspresyonunu sağlayacak IRES (internal ribosome entry site) dizinlerini içeren ve bu hücrelerde epizomal olarak replike olabilecek, DNA plazmid vektörünün hazırlanması.

i. pIRES (clontech) plazmidinde bulunan encephalomyocarditis virus (ECMV) IRES ve CMV promotor DNA dizinleri, *Bgl* II ve *Not* I restriksiyon enzimleri kullanılarak elde edilmesi.

ii. Elde edilen CMV promotor ve IRES kasetinin aynı enzimlerle muamele edilmiş pMEP-4 (Invitrogen) plazmid molekülüne aktarılması. Böylelikle, memeli epizomal ekspresyon vektörü pMEP 4 de bulunan metallothionine promotörü daha güçlü bir promotor olan CMV promotörüyle değiştirilmiş ve de iki ayrı genin ekspresyonunu sağlayacak IRES kasetinin oluşturulması sağlanmış olacaktır. Oluşturulacak plazmid pMEP-IRES olarak adlandırılmıştır.

b) HIV-1 “rev” ve “tat” proteinlerini kodlayan genlerin DNA plazmid ekspresyon vektörüne klonlanması.

i. HIV-1 “rev” ve “tat” cDNA dizinlerini içeren pCV1 (NIH AIDS reagent program) plazmidini *Bsu*36 I restriksiyon enzimi ile kesilip, “rev” cDNAsını içeren fragmanın uçları küt (blunt) edilerek, *Nhe* I restriksiyon enzimiyle kesilip yine uçları kütleştirilmiş pMEP-IRES plazmidine aktarılacaktır. Oluşacak plazmid pMEP-IRES-rev olarak adlandırılacaktır.

ii. HIV-1 “rev” ve “tat” cDNA dizinlerini içeren pCV1 (NIH AIDS reagent program) plazmidini *Sal* I ve *Bam*H I restriksiyon enzimleri ile kesilip, “tat” cDNAsını içeren fragmanın uçları kütleştirilerek, *Not* I restriksiyon enzimiyle kesilip uçları kütleştirilmiş pMEP-IRES-rev plazmidine aktarılacaktır. Oluşacak plazmid pMEP-IRES-rev-tat olarak adlandırılacaktır.

c) HIV-1 genlerinin insan HeLa hücrelerinde ekspresyonu.

i. HIV-1 “rev” ile “tat” genlerini eksprese edecek plazmid (pMEP-IRES-rev-tat), lipofeksiyon yöntemiyle HeLa hücrelerine aktarılacak ve bu hücreler ekspresyon vektörü tarafından taşınan antibiyotik (higromisin) dirençlilik geni sayesinde seçilecektir.

ii. Bu hücreler anti-“rev” ve anti-“tat” monoklonal antikorları kullanılarak Western Blot veya immunopresipitasyon yöntemleriyle test edilecektir. Böylelikle, HIV-1 “rev/tat” proteinlerini üretebilen hücre hattı (HeLa-rev-tat) elde edilmiş ve HIV-1 enfeksiyonunun kısmı olarak simülasyonu yapılmış olacaktır.

C. Seçici Öldürülebilirliğin Testi

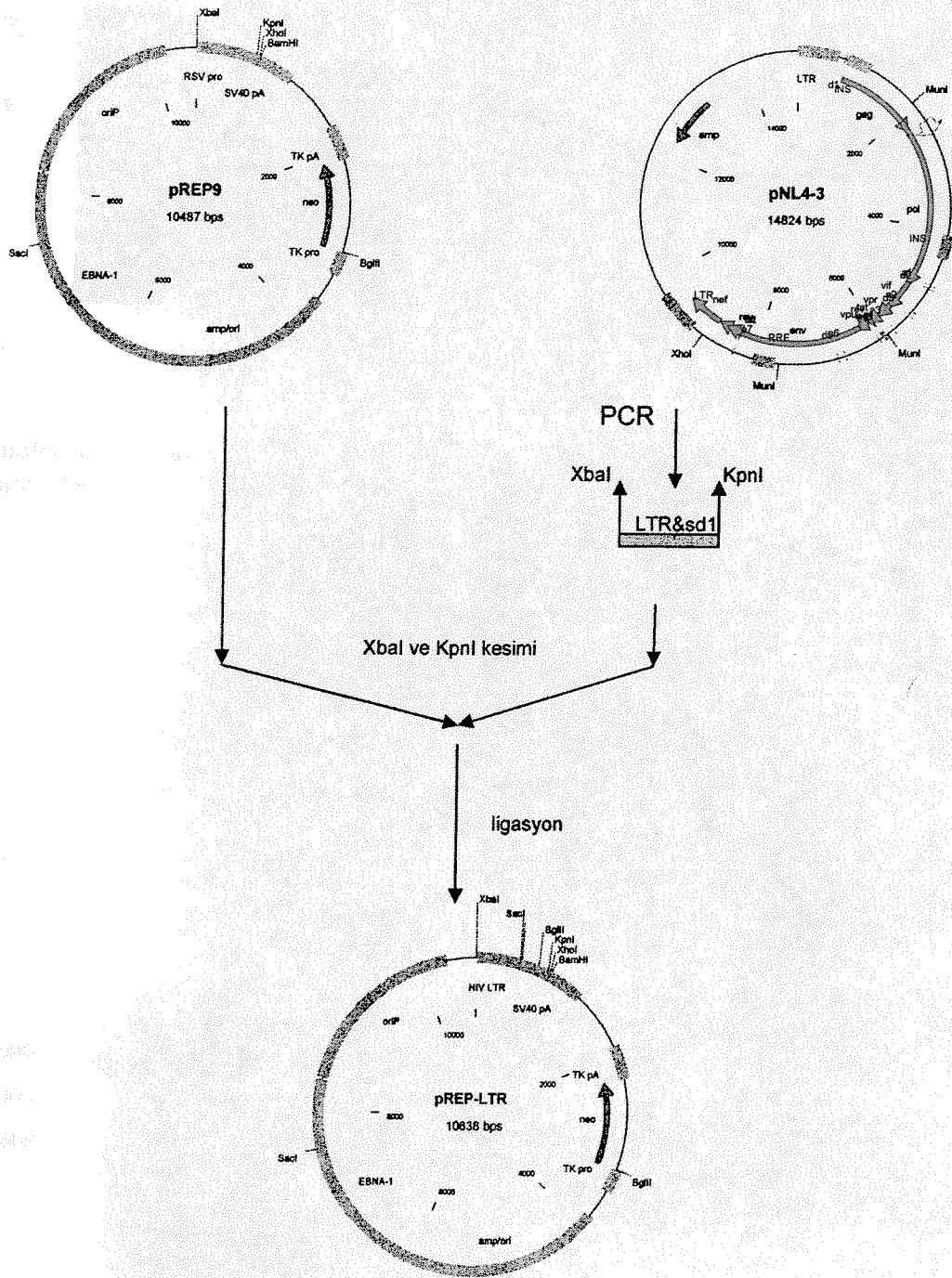
HIV-1 enfeksiyonunun simülasyonu ile Jurkat-rev-tat (“rev” ve “tat” üreten) hücrelerinin seçici olarak öldürülebilirliğini saptayabilmek için, toksik HSV-TK genin “rev” ve “tat” proteinlerine dayalı ekspresyonunu sağlayacak DNA vektörü (pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac), bu proteinleri üreten (HeLa-rev-tat) ve de üretmeyen (HeLa) hücrelere lipofeksiyon yöntemiyle aktarılacaktır. Bu hücreler daha sonra değişik konsantrasyonlarda gansiklovir içeren hücre kültürü ortamlarında, 7-8 jenerasyon süresince inkübe edilecektir. Toksik olmayan bir nükleosid analogu olan gansiklovir, HSV-TK enziminin etkisiyle fosforlandıktan sonra aktif hale geçmektedir. Aktif hale geçen fosforlanmış gansiklovir, replike olan ökaryot hücrelerin DNA’sına inkorpore edilir ve DNA replikasyonunun bloke olmasına neden olarak hücrelerin ölümüne yol açar. Yedi veya 8 jenerasyon boyunca inkübe edilen HeLa-rev-tat ve HeLa hücre kültürlerindeki canlı hücre sayıları belirlenecek ve birbirleriyle karşılaştırılacaktır.

4.0. Bulgular

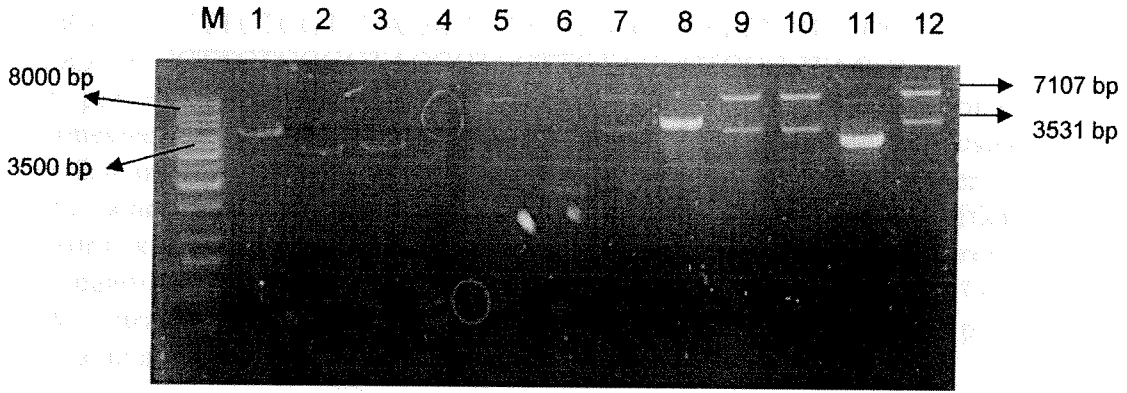
A. HIV-1 “rev” ve “tat” proteinlerine bağımlı olarak eksprese olacak toksin geni içeren DNA molekülünün hazırlanması.

a) HIV-1 genomu üzerinde bulunan ve “tat” ile “rev” proteinlerinin etkilerini göstermesi için gerekli olan DNA bölgelerinin PCR yöntemiyle çoğaltılarak memeli ekspresyon vektörü pREP9’a aktarılması.

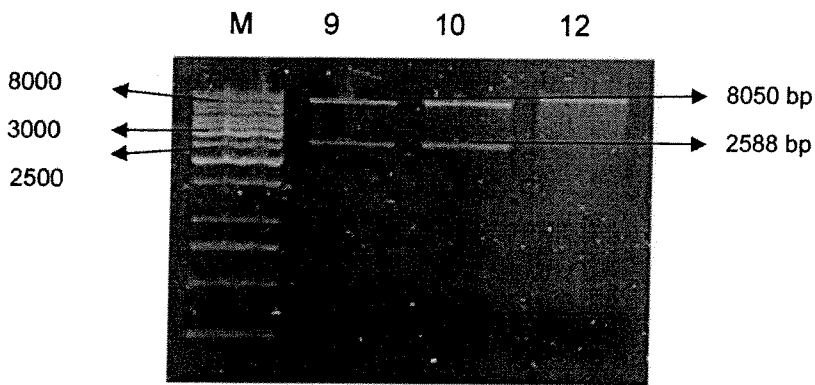
i- HIV-1 “tat” proteinin etkisi için gerekli olan HIV-1 5’ LTR promotor ve HIV-1 birinci *splice* verici (*splice* donor) dizinleri, HIV-1 moleküler klonu olan pNL4-3 (NIH AIDS reagent program) plazmidinden, aşağıdaki primer çifti kullanılarak PCR’la çoğaltılmıştır.



Şekil 1a: pREP-LTR plazmidinin oluşturulması



Şekil 1b: pREP-LTR oluşturulması sırasında ortaya çıkan kolonilerden 12'sinin plasmidlerinin *SacI* enzimi ile kesilerek yapılan analizi. M: DNA işaretleri; 1-12: analiz edilen koloniler (beklenen 2 bantın bantların boyutları: 7107 ve 3531 bp).



Şekil 1c: Şekil 1b'de beklenen bantları veren 5, 7, 9, 10 ve 12 no'lu kolonilerden 9, 10 ve 12 nolu kolonilerin ikinci bir teste tabi tutulması. Bu deneyde plasmidler *BglII* enzimi ile kesilmişlerdir (beklenen 2 bantın boyutları: 7844 ve 2588 bp).

LTR5 : 5' CCTTCTCGTCTAGATGGAAGGGCTAATTTGGTCCC 3'

LTR3 : 5' CCTTCTCGGGTACCCTCCTTCTAGCCTCCGCTAG 3'

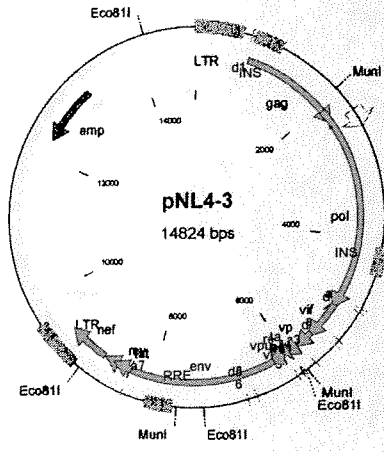
Bu primer çifti sırasıyla özgün (unique) *Xba* I ve *Kpn* I restriksiyon bölgelerini içermektedirler. Restriksiyon bölgelerinin önünde 8'lik ek diziler konmuştur. Bunun nedeni restriksiyon enzimlerinin, çoğaltılmış DNA fragman uçlarını kesebilmelerini kolaylaştırarak, daha sonra yapılacak ligasyon işlemi mümkün olan etkinlik (efficiency) düzeyine ulaştırmaktır. pREP9 plazmidindeki, memelilerde ekspresyonu sağlayan promoter dizini, PCR ile çoğaltılmış ve *Xba* I, *Kpn* I restriksiyon enzimleriyle kesilmiş HIV-1-LTR promoter ve HIV-1 birinci splice verici dizinleriyle değiştirildikten sonra ortaya çıkan plazmid pREP-LTR olarak adlandırılmıştır (şekil 1a, 1b, 1c).

ii- HIV-1 INS, RRE ve HIV-1 yedinci *splice* alıcı (splice acceptor) dizinlerinin bir arada çoğaltılabilmesi için iki bölgenin arasında kalan dizinler çıkartılmıştır. Bunun için, pNL4-3 plazmidinin *Mun* I restriksiyon enzimiyle kesilmesinden oluşan en büyük DNA fragmanı jelden izole edildikten sonra uçları self-ligasyon yöntemiyle tekrar birleştirilmiştir (şekil 2a, 2b). Oluşan plazmid pNL4-3-Mun olarak adlandırılmıştır. Bu plazmid, "rev" proteininin etkisi için gerekli olan HIV-1 INS, RRE ve HIV-1 yedinci *splice* alıcı (splice acceptor) dizinlerini PCR yöntemiyle çoğaltmak amacıyla templet olarak kullanılmıştır. Çoğaltma işlemi aşağıdaki primer çifti ile yapılmıştır.

INS 5: 5' CCTTCTCGCTCGAGGAGATGGGTGCGAGAGCGTC 3'

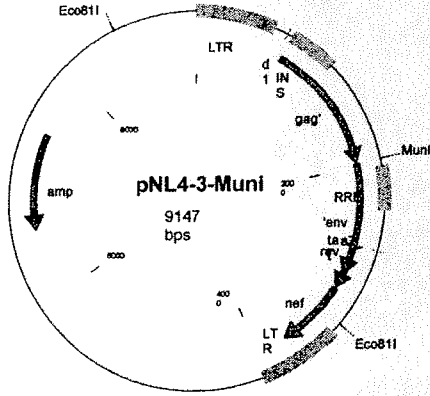
RRE 3: 5' AGTGCTAAGGATCCGTTCACTAATCG 3'

Bu primer çifti sırasıyla *Xho* I ve *Bam*H I restriksiyon bölgelerini içermektedir. Bu primer çiftinin kullanımıyla çoğaltılan INS-RRE dizinleri adı geçen enzimlerle kesilerek, yine aynı enzimlerle kesilmiş pREP-LTR plazmidine klonlanmıştır (şekil 3a, 3b). Elde edilen plazmid pREP-LTR-INS-RRE olarak adlandırılmıştır.

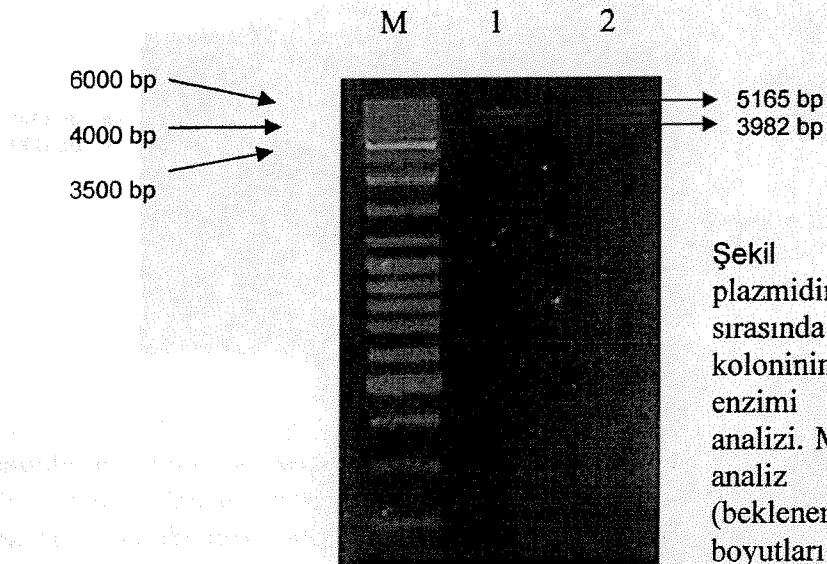


MunI
kesimi

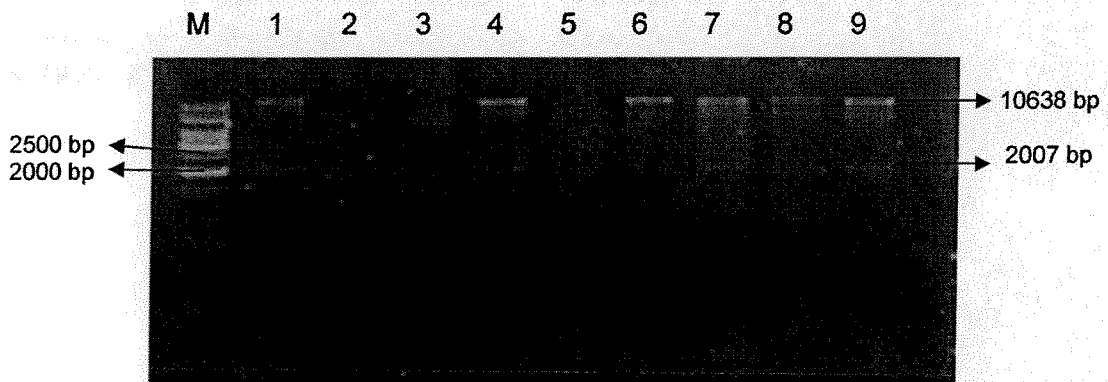
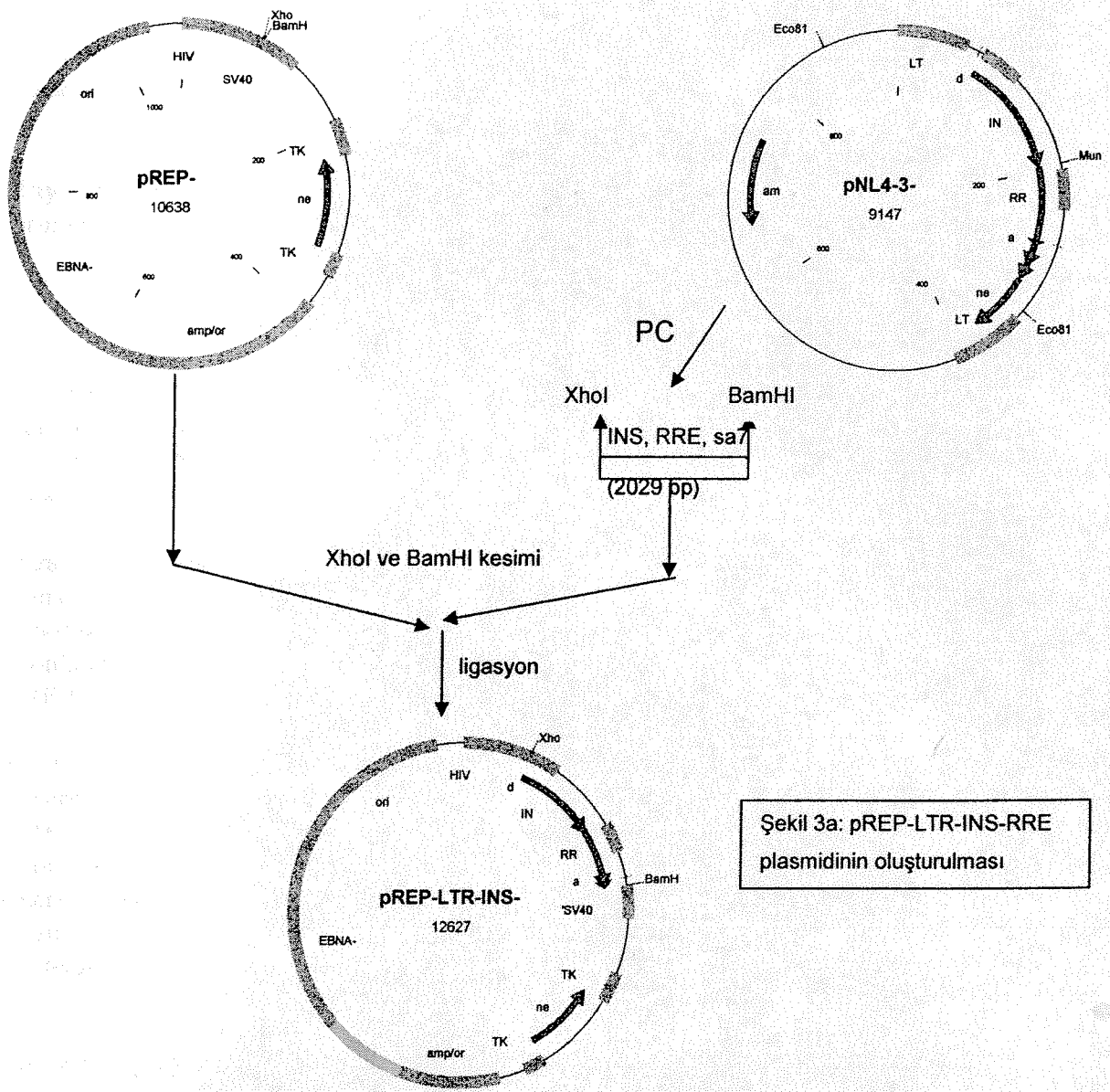
Jel izolasyonu ve
Self ligasyon



Şekil 2a: pNL4-3-Mun plazmidinin hazırlanışı



Şekil 2b: pNL4-3-Mun plazmidinin oluşturulması sırasında ortaya çıkan 2 koloninin plasmidlerinin Eco81I enzimi ile kesilerek yapılan analizi. M: DNA işaretleri; 1-2: analiz edilen koloniler (beklenen 2 bantın bantların boyutları: 5165 ve 3982 bp).



Şekil 3b: pREP-LTR-INS-RRE oluşturulması sırasında ortaya çıkan kolonilerden 9'unun plasmidlerinin XhoI ve BamHI enzimleri ile kesilerek yapılan analizi. M: DNA işaretleri; 1-9: analiz edilen koloniler (beklenen 2 bantın bantların boyutları: 10638 ve 2007 bp). 9 no'lu örnek daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır.

b) Toksik etki gösteren proteinleri kodlayan gen (HSV-TK) rekombinant DNA yöntemleriyle izole edilmesi.

i- Hücrelerde toksik etki gösterilmesini sağlayacak HSV-TK (Herpes Simplex Virus, Thymidine Kinase) genini içeren DNA dizisi HSV genomik DNA'sından aşağıda gösterilen primer çifti kullanılarak PCR ile çoğaltılıp izole edilmiştir.

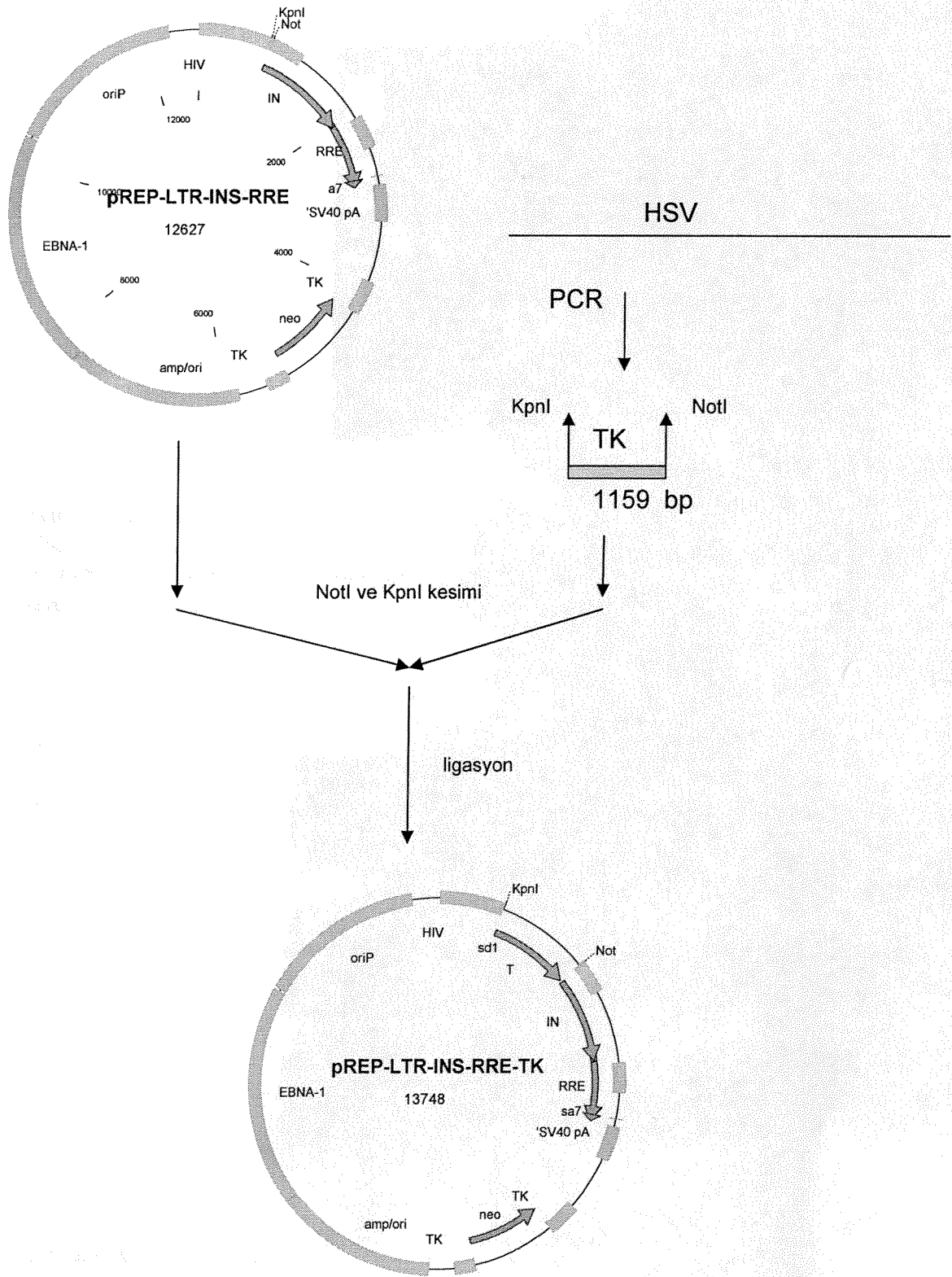
TK 5: 5' CCTTCTCGGGTACCATGGCTTCGTACCCCTGCCATC 3'
TK 3: 3' CCTTCTCGTCAGTTAGCCTCCCCCATCTCC 3'

Bu primer çifti sırasıyla *Kpn* I ve *Not* I restriksiyon bölgelerini içermektedir. Çoğaltılan bu gen *Not* I ve *Kpn* I enzimleri ile kesilip yine aynı enzimlerle kesilmiş pREP-LTR-INS-RRE plazmidine klonlanmıştır. Yapılan plazmid pREP-LTR-INS-RRE-TK olarak adlandırılmıştır (şekil 4a, 4b, 4c).

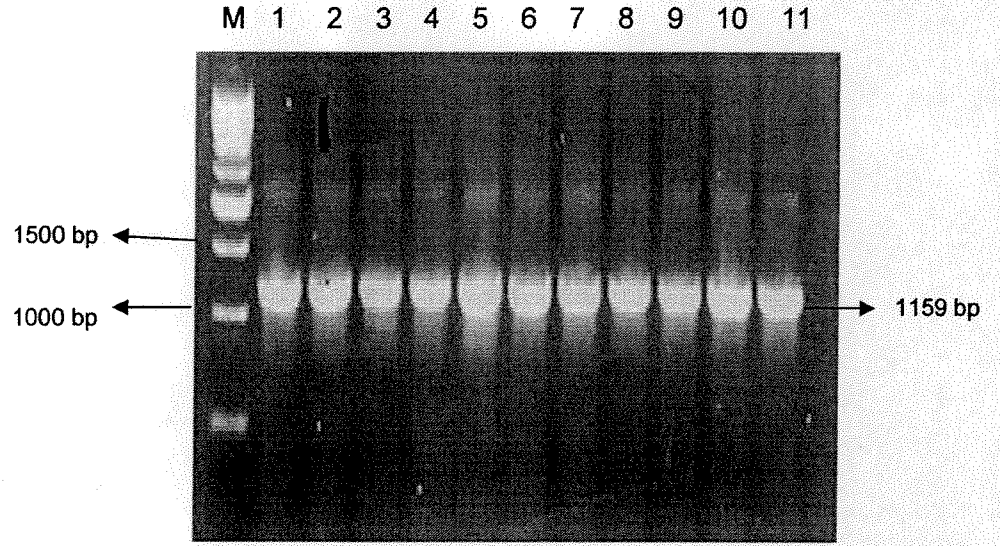
Paralel bir çalışmada, haberci gen (reporter gene) olan CAT (chloramphenicol acetyl transferase) geni, pCAT plazmidinden PCR ile çoğaltılarak (aynı enzim bölgelerini içeren farklı primer çiftiyle) pREP-LTR-INS-RRE plazmidinin *Kpn* I ve *Not* I ile kesilmiş bölgesine klonlanmıştır. İlerideki deneyler için pozitif kontrol olarak kullanılması planlanan bu plazmid pREP-LTR-INS-RRE-CAT olarak adlandırılmıştır (şekil 5a, 5b).

CAT geninin, sadece "rev" ve "tat" proteinlerine bağlı üretimine olanak verecek bu memeli ekspresyon plazmidi HeLa ve HeLa-rev-tat hücre hatlarına lipofeksiyon yöntemiyle aktarılmasından sonra hücre ekstratlarında ELISA ve Western Blot yöntemiyle CAT tayini yapılacaktır. HeLa-rev-tat hücrelerinde CAT enziminin varlığı ve aynı zamanda kontrol HeLa hücrelerinde bu enzimin üretilmemesi hazırlanmış olan plazmid vektörün ("rev" ve "tat" a bağımlı rekombinant protein ekspresyonu yapabilecek) amaca uygun olarak çalıştığına göstergesi olacaktır.

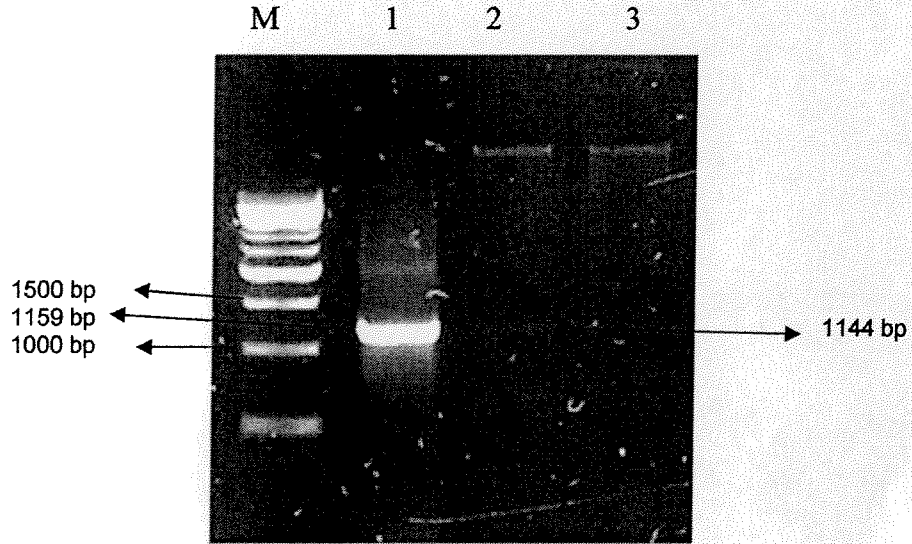
ii- Hücrelere lipofeksiyon yöntemiyle aktarılacak olan pREP-LTR-INS-RRE-TK ve pREP-LTR-INS-RRE-CAT plazmidlerinin transfeksiyon verimliliklerinin ölçülebilmesi ve farklı hücre kültürlerinde standardizasyon yapılabilmesi amacıyla *Lac Z* haberci geni (reporter gene), sürekli (constitutive) olarak eksprese edilebilecek şekilde, adı geçen plazmidlerin *Bam* H I restriksiyon enzim bölgesine klonlanmıştır. Oluşturulan plazmidler sırasıyla pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac ve pREP-LTR-INS-RRE-CAT-Lac olarak adlandırılmıştır (şekil 6a,6b,6c).



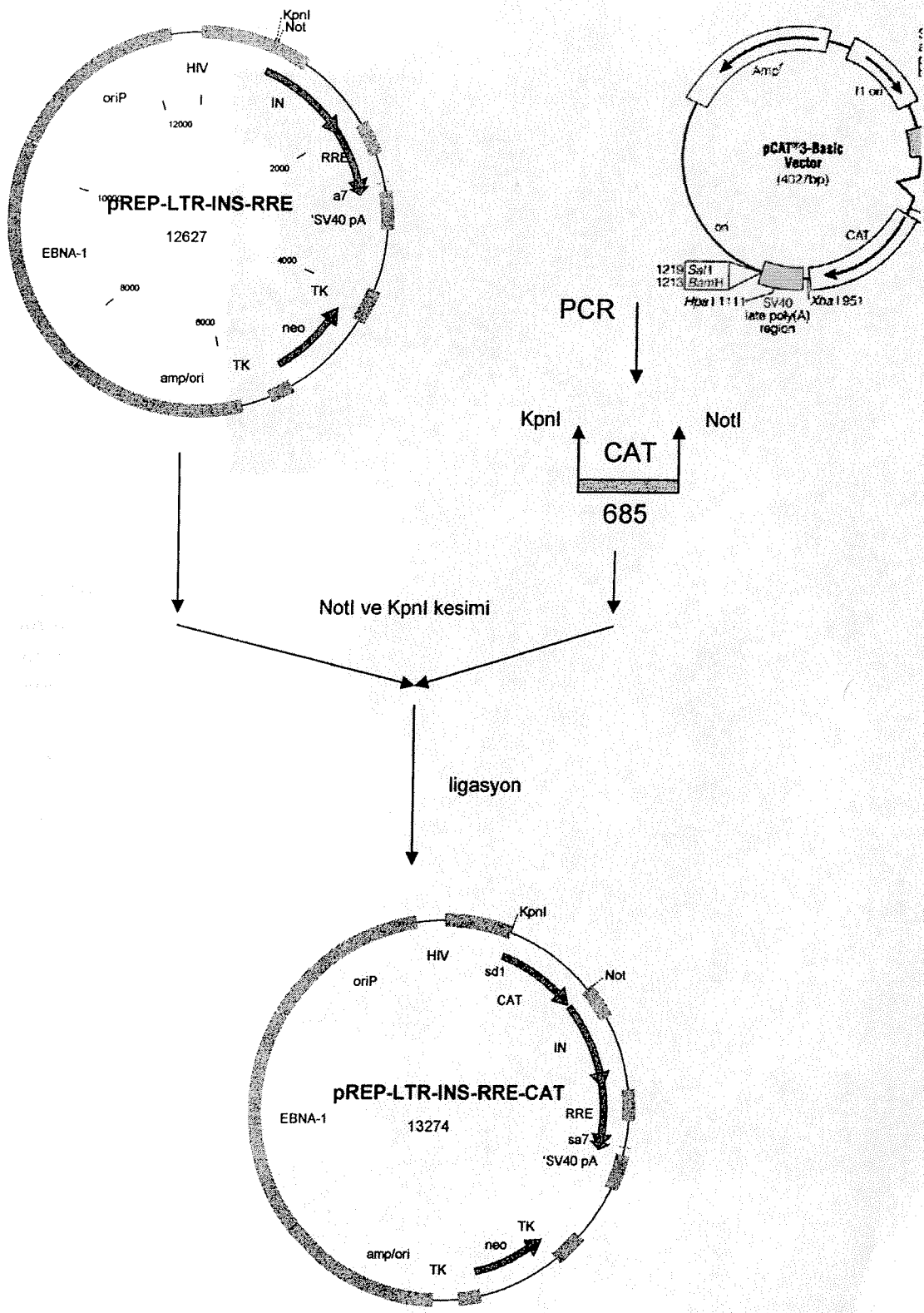
Şekil 4a: pREP-LTR-INS-RRE-TK plazmidinin hazırlanış şekli



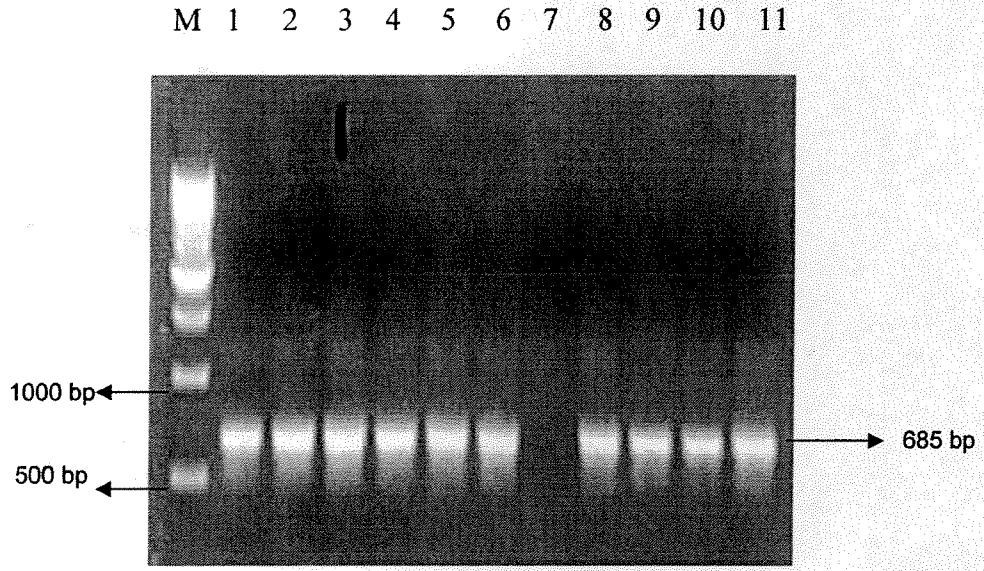
Şekil 4b: pREP-LTR-INS-RRE-TK plazmidinin oluşturulması sırasında ortaya çıkan 11 kolonilerden izole edilen plasmidlerinin TK5 ve TK3 primer çiftiyle PCR analizi. M: DNA işaretleri; 1-11: analiz edilen koloniler. 1 no'lu örnek daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır.



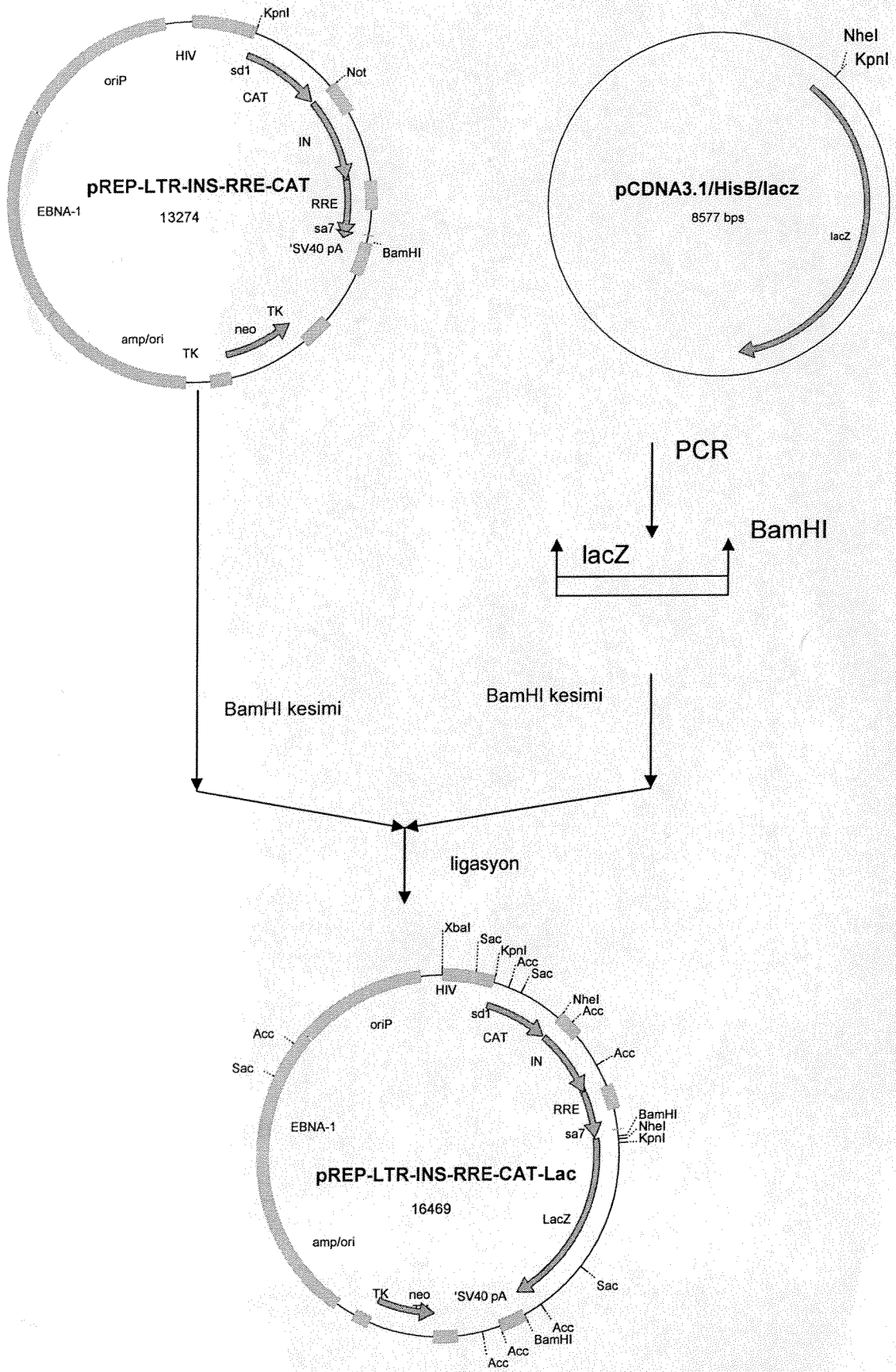
Şekil 4c: M: DNA işaretleri; 1: Şekil 4b'de açıklanan PCR analizinin 1 no'lu koloni plazmidinde (pLTR-INS-RRE-TK) tekrarı; 2: pLTR-INS-RRE-TK plazmidinin KpnI ve NotI enzimleri ile kesilmesi (beklenen 2 bantın boyutları: 12627 ve 1144 bp); 3: negative control. pLTR-INS-RRE plazmidinin KpnI ve NotI enzimleri ile kesilmesi (beklenen tek bantın boyutu: 12627 bp)



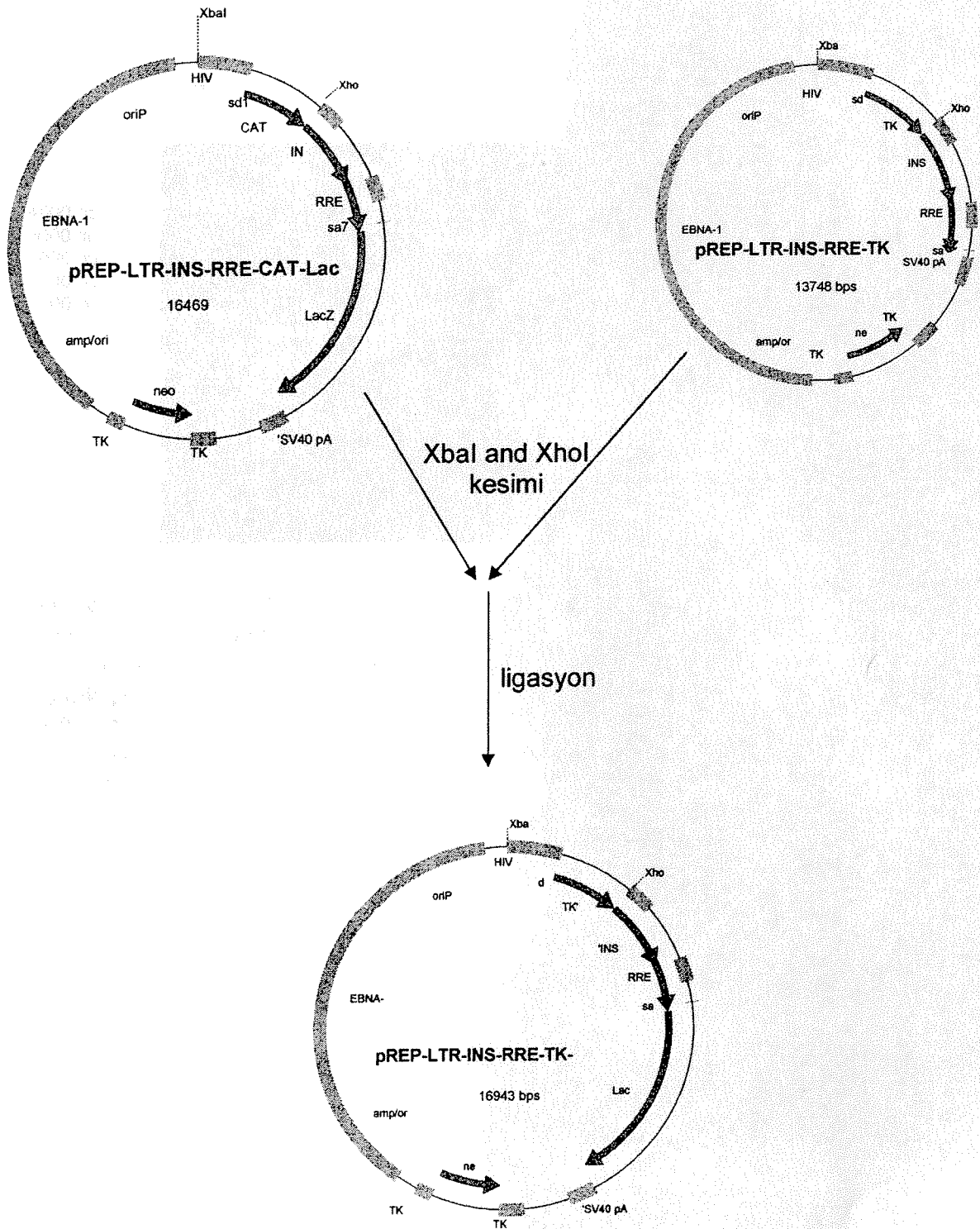
Şekil 5a: pREP-LTR-INS-RRE-CAT plazmidinin hazırlanış şekli



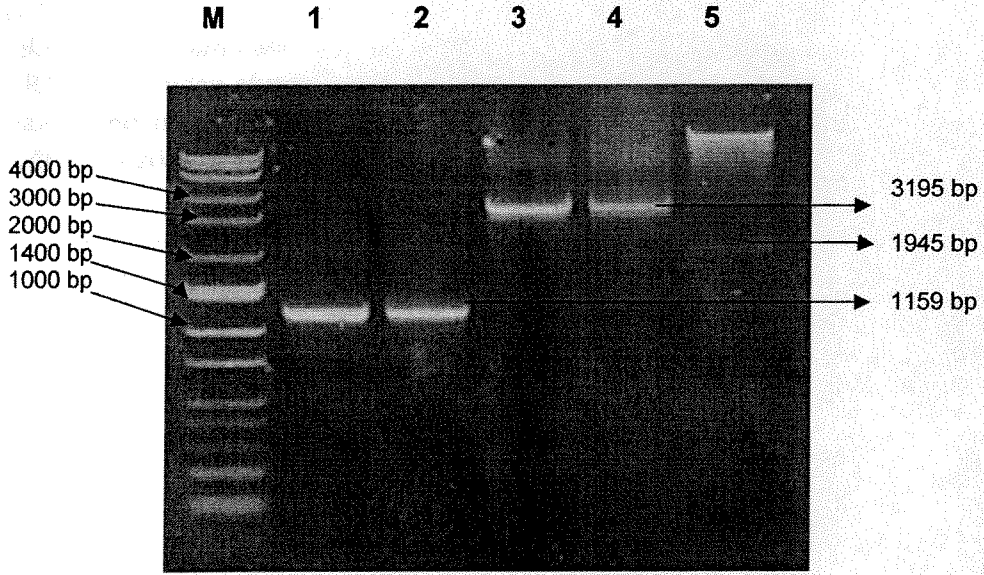
Şekil 5b: pREP-LTR-INS-RRE-CAT plazmidinin oluşturulması sırasında ortaya çıkan 11 koloniden izole edilen plazmidlerinin CAT5 ve CAT3 primer çiftiyle PCR analizi. M: DNA işaretleri; 1-11: analiz edilen koloniler. 1 no'lu örnek daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere saklanmıştır.



Şekil 6a: pREP-LTR-INS-RRE-CAT-Lac plazmidinin hazırlanışı



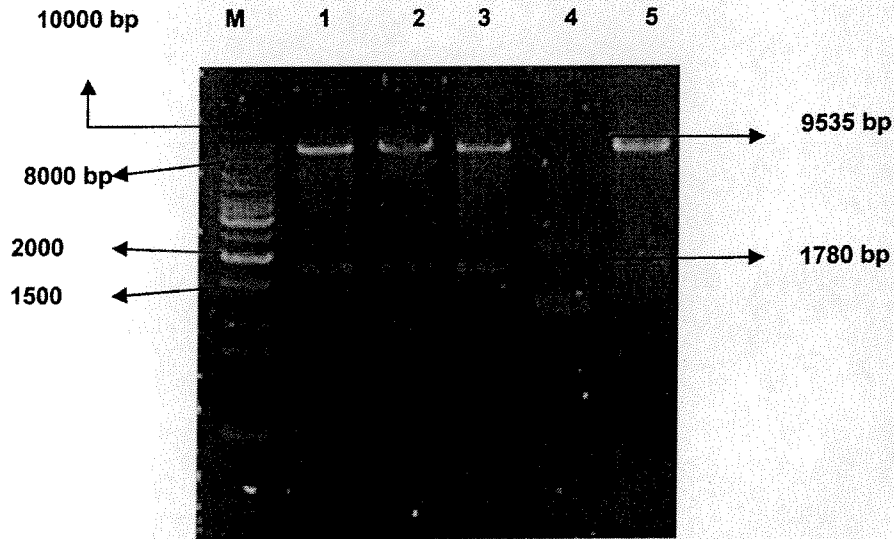
Şekil 6b: pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac plazmidinin hazırlanışı



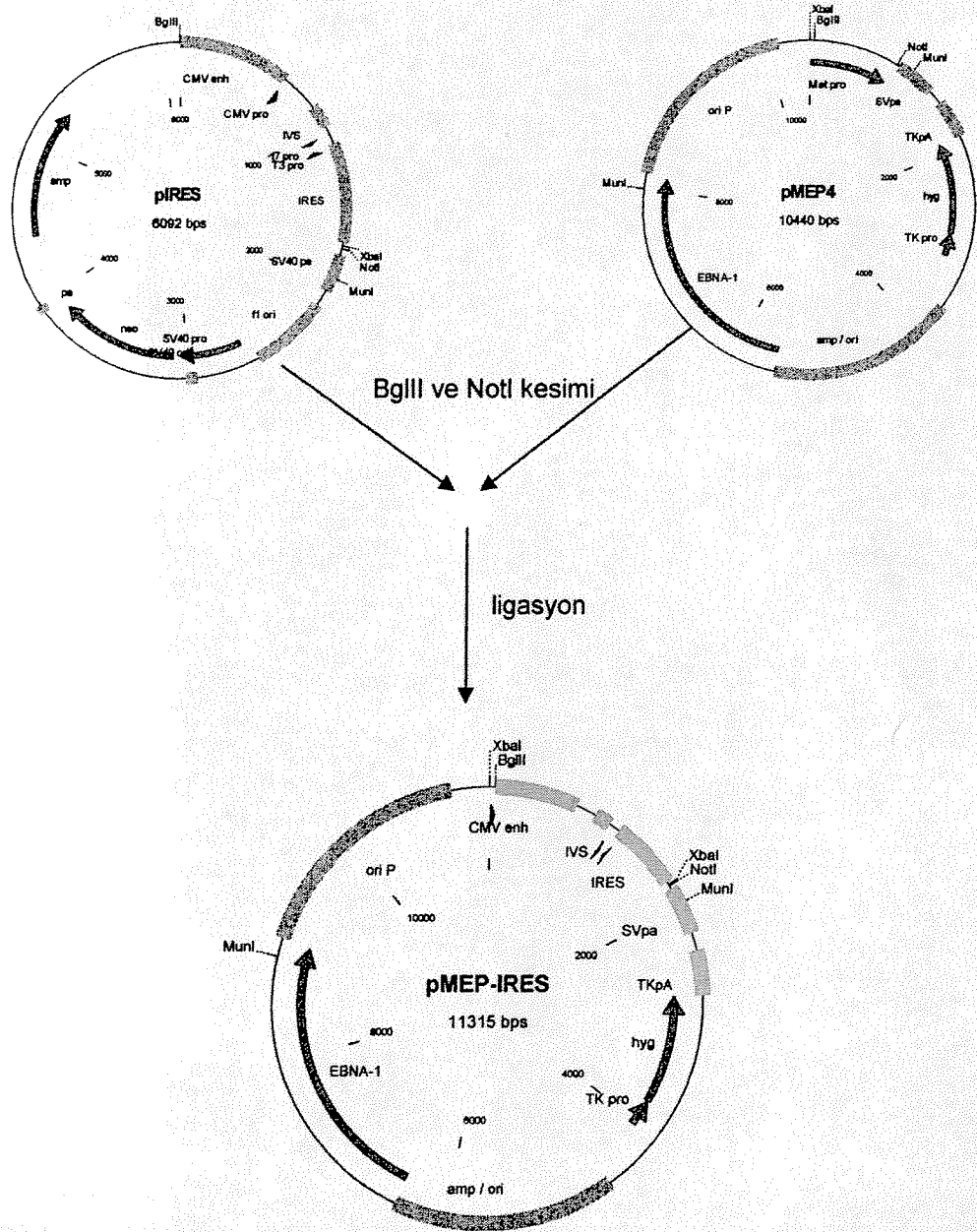
Şekil 6c : pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac plasmidinin PCR ve restriksiyon enzimi kesimi ile analizi. M: DNA işaretleri; 1: pozitif control. pREP-LTR-INS-RRE-TK'den timidin kinaz geni amplifikasyonu; 2: pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac'dan timidin kinaz geni amplifikasyonu; 3: pozitif control. pcDNA3.1/His/lacZ'den LacZ geni amplifikasyonu; 4: pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac'dan LacZ geni amplifikasyonu; 5: pREP-LTR-INS-RRE-TK-Lac'in XbaI ve XhoI enzimleri ile kesimi

B. HIV-1 Proteinlerini Üretecek Hücrelerin Hazırlanması

a) Memeli hücrelerinde episomal olarak çoğalıp, iki farklı geni aynı anda eksprese edecek vektörün hazırlanması için, elimizde var olan pMEP4 vektörüne iki farklı genin tek bir mRNA tarafından ekspresyonu sağlayacak IRES dizinleri ile CMV promotor dizinleri pIRES plazmidinden aktarılmıştır. Oluşturulan yeni vektör restriksiyon enzimleri kesimiyle doğruluğu gösterildikten sonra pMEP-IRES olarak adlandırılmıştır (şekil 7a, 7b).



Şekil 7a. pMEP-IRES plazmidinin oluşturulması aşamasında ortaya çıkan beş farklı transformant koloniden elde edilen plazmidler XbaI enzimi ile kesilerek yapılan analizi. 1, 2, 3 ve 5. plazmidler beklenen boyutta DNA fragmanlarını içermektedir.



Şekil 7b. pMEP-IRES plasmidinin oluşturulmasında izlenen yöntem

b) HIV-1 “rev” ve “tat” proteinlerini kodlayan genlerin pMEP-IRES ekspresyon vektörüne klonlanması. Bu iki geni klonlamak için yapılan ilk plan, her iki geni de pCV1 plazmidinden farklı restriksiyon enzimleri ile kesip, uçlarını kütleştirdikten sonra, yine uçları kütleştirilmiş pMEP-IRES plazmidine aktarılması yönünde idi. Ancak yapılan bir çok denemeye rağmen bu yöntem başarılı olmamıştır. Başarısızlığın ardındaki en büyük etken, uçları kütleştirilmiş pMEP-IRES plazmidinin alkaline phosphatase ile muamele edilmiş olmasına rağmen içine insert almadan kendi kendine ligasyon olmasıydı. Bunun üzerine rev ve tat genlerinin, içlerine uygun restriksiyon bölgelerinin eklendiği primerler kullanılarak PCR ile çoğaltıldıktan sonra klonlanması kararı alınmıştır. Dizayn edilen primerler aşağıda gösterilmiştir.

Rev primerleri:

REV-NHE5	5'-CCT TCT <u>CGG CTA GCA</u> TGG CAG GAA GAA GCG GAG AC-3'
REV-NHE3	5'-CCT TCT <u>CGG CTA GCC</u> TAT TCT TTA GCT CCT GAC TCC-3'

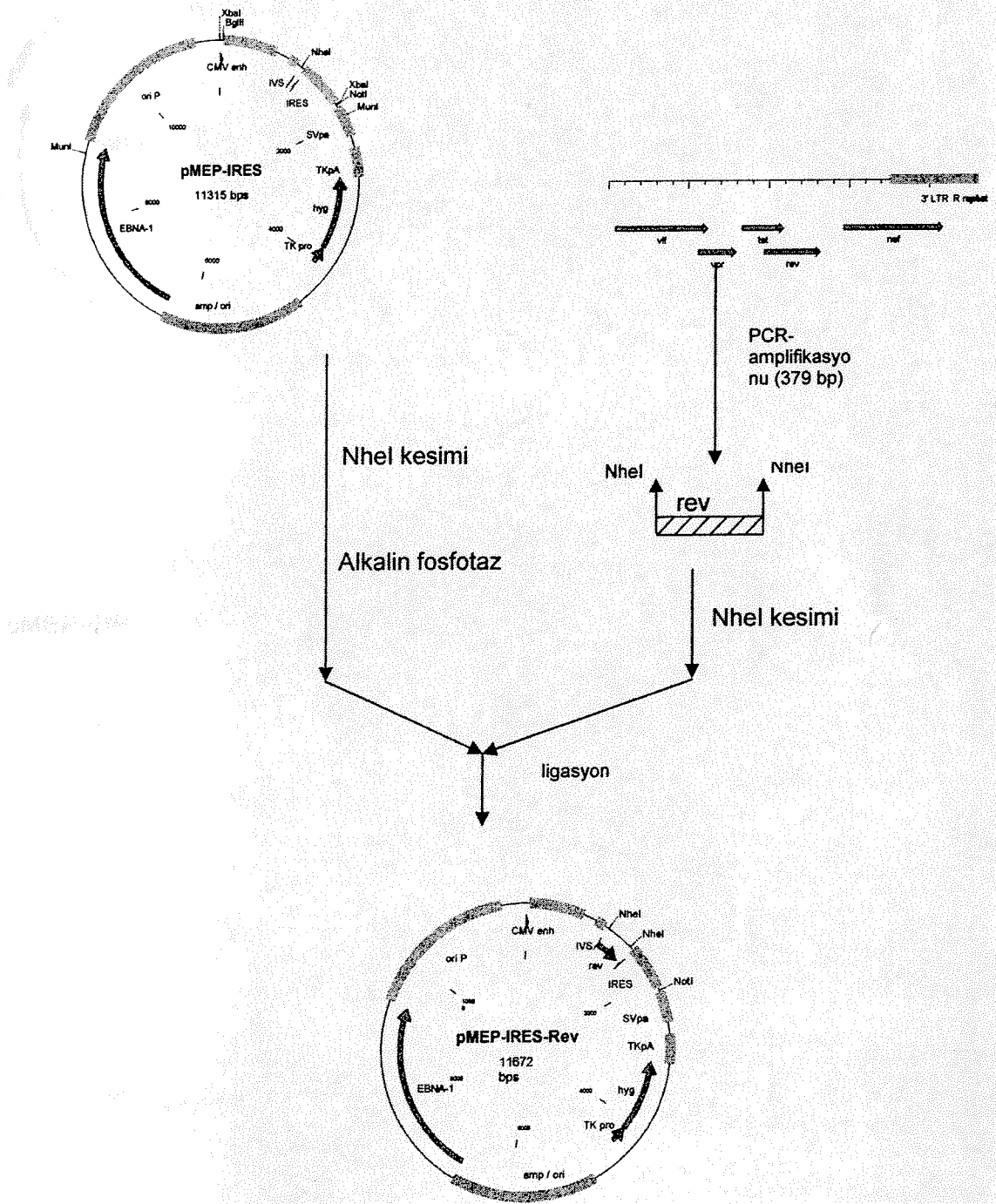
Tat primerleri:

TAT-NHE5	5'-CCT TCT <u>CGG CTA GCA</u> TGG AGC CAG TAG ATC CTA G-'
TAT-NHE3	5'-CCT TCT <u>CGG CTA GCC</u> TAT TCC TTC GGG CCT GTC GG-3'
TAT-Not5	5'-CCT TCT <u>CGG CGG CCG</u> CAT GGA CCC AGT AGA TCC TAG-3'
TAT-Not3	5'-CCT TCT <u>CGG CGG CCG</u> CCT ATT CCT TCG GGC CTG TCG-3'

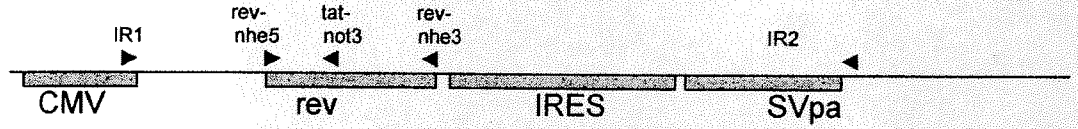
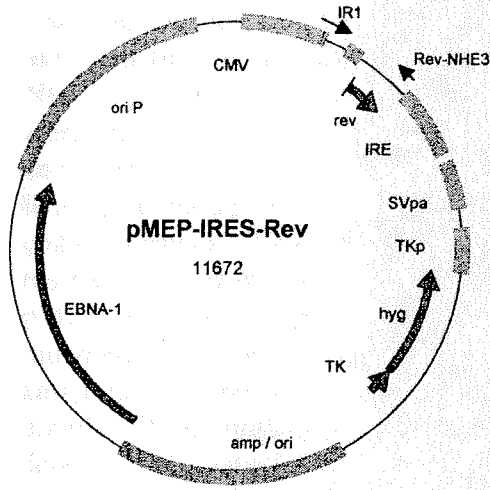
Klonların oryantasyon kontrolü için dizayn edilen primerler:

IR1	5'-GTT GAC GCA AAT GGG CGG TA-3'
IR2	5'-ACA CGA ACA CCG GGC GTC TG-3'

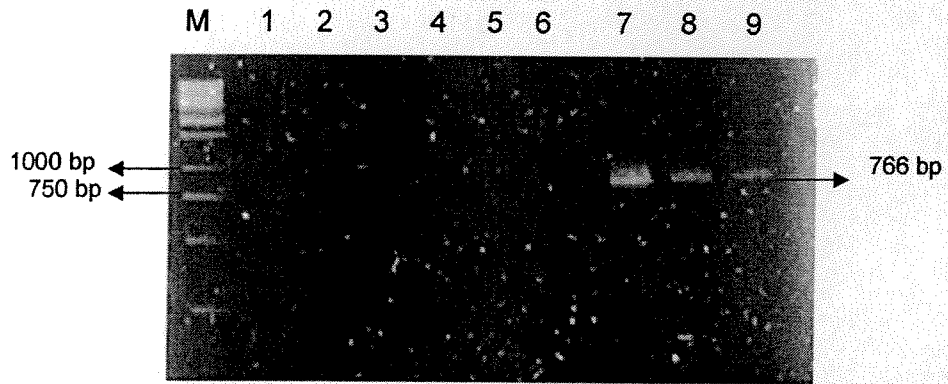
Rev-NHE5 ve rev-NHE3 primerleri nheI restriksiyon enzim bölgesi içermektedir. Bu primer çifti kullanılarak çoğaltılan rev geni ve pMEP-IRES vektörü nheI enzimleri kesildikten sonra, pMEP-IRES alkaline fosfatase enzimi ile muamele edildikten sonra ligasyona maruz bırakılmıştır. E. Coli'nin bu ligasyon karışımıyla transforme edilmesiyle oluşan ampisilin dirençli koloniler PCR yöntemiyle klonlanması amaçlanan rev genin doğru yönde oryantasyonu gösterecek primerlerin kullanılmasıyla test edilmiştir (şekil 8a, 8b). Bu test neticesinde kolonilerden üç tanesinin hedeflenen dizinleri içerdiği gösterilmiştir. Daha sonra olumlu sonuç veren kolonilerden birtanesinden elde edilen plazmid daha detaylı PCR analizine tabi tutulmuştur (şekil 10c).



Şekil 8a: rev geninin pMEP-IRES'e klonlama stratejisi

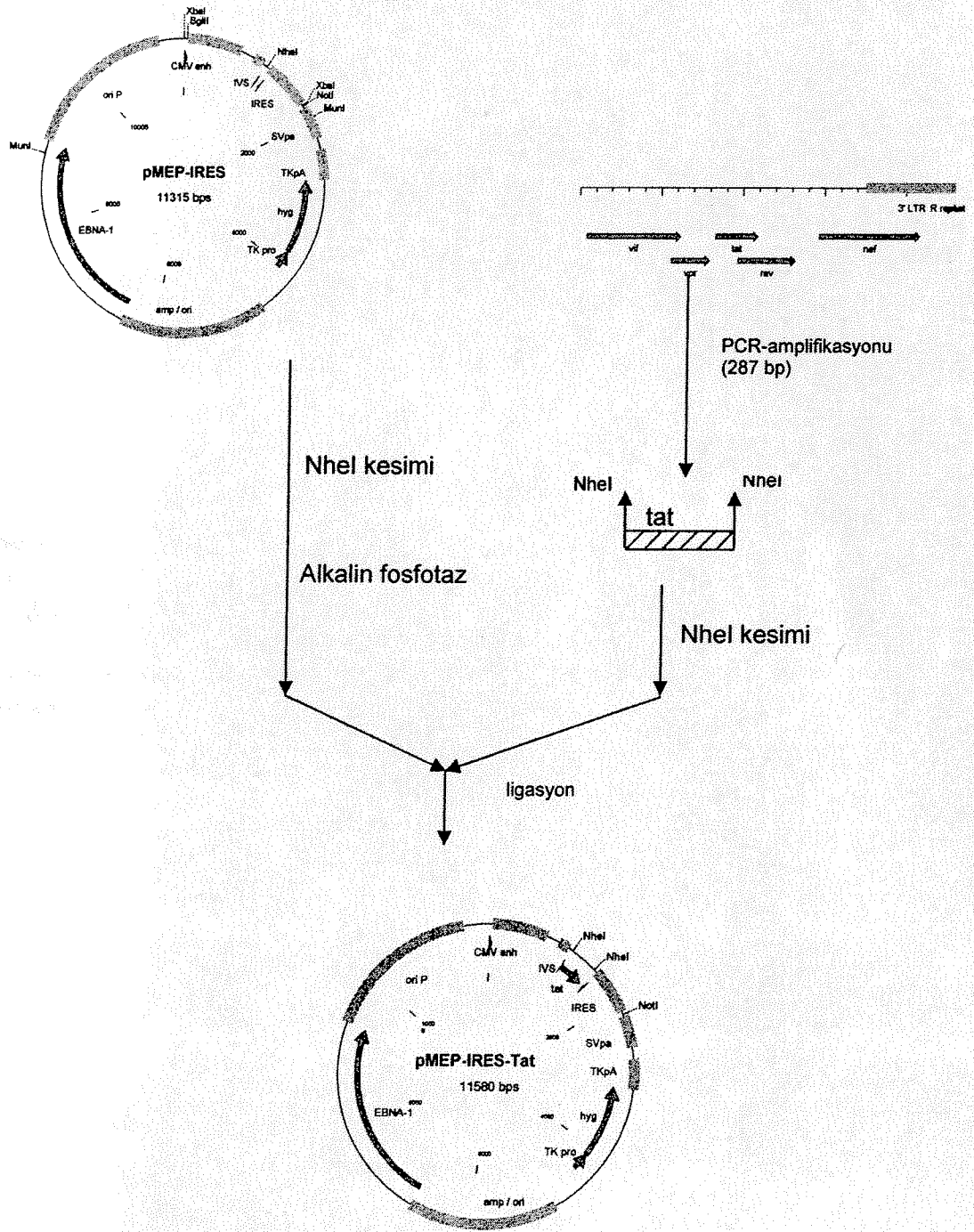


pMEP-IRES-rev

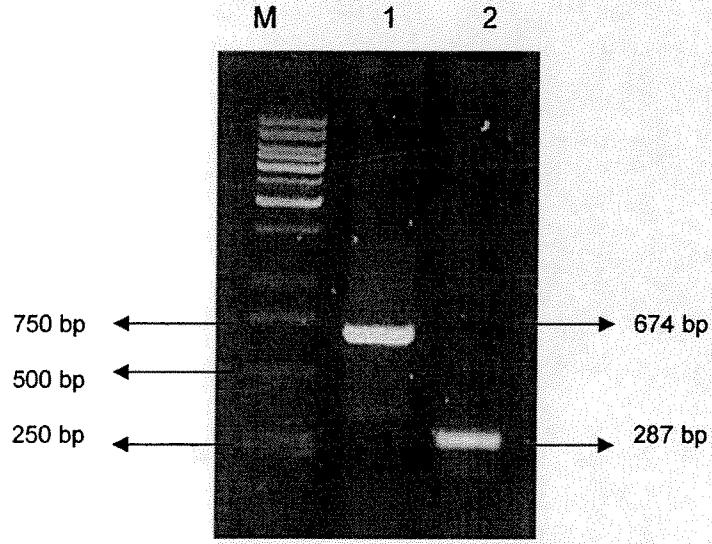


Şekil 8b. Ampisilin dirençli kolonilerden dokuzunun rev genini içerip içermediklerinin PCR ile analizi. Analizde kullanılan primerler: Vektör dizinlerine bağlanan IR1 primeri ile rev geninin amplifikasyonunda kullanılan Rev-NHE3 primeri. Doğru oryantasyondan beklenen amplifikasyon boyutu 766 bp.

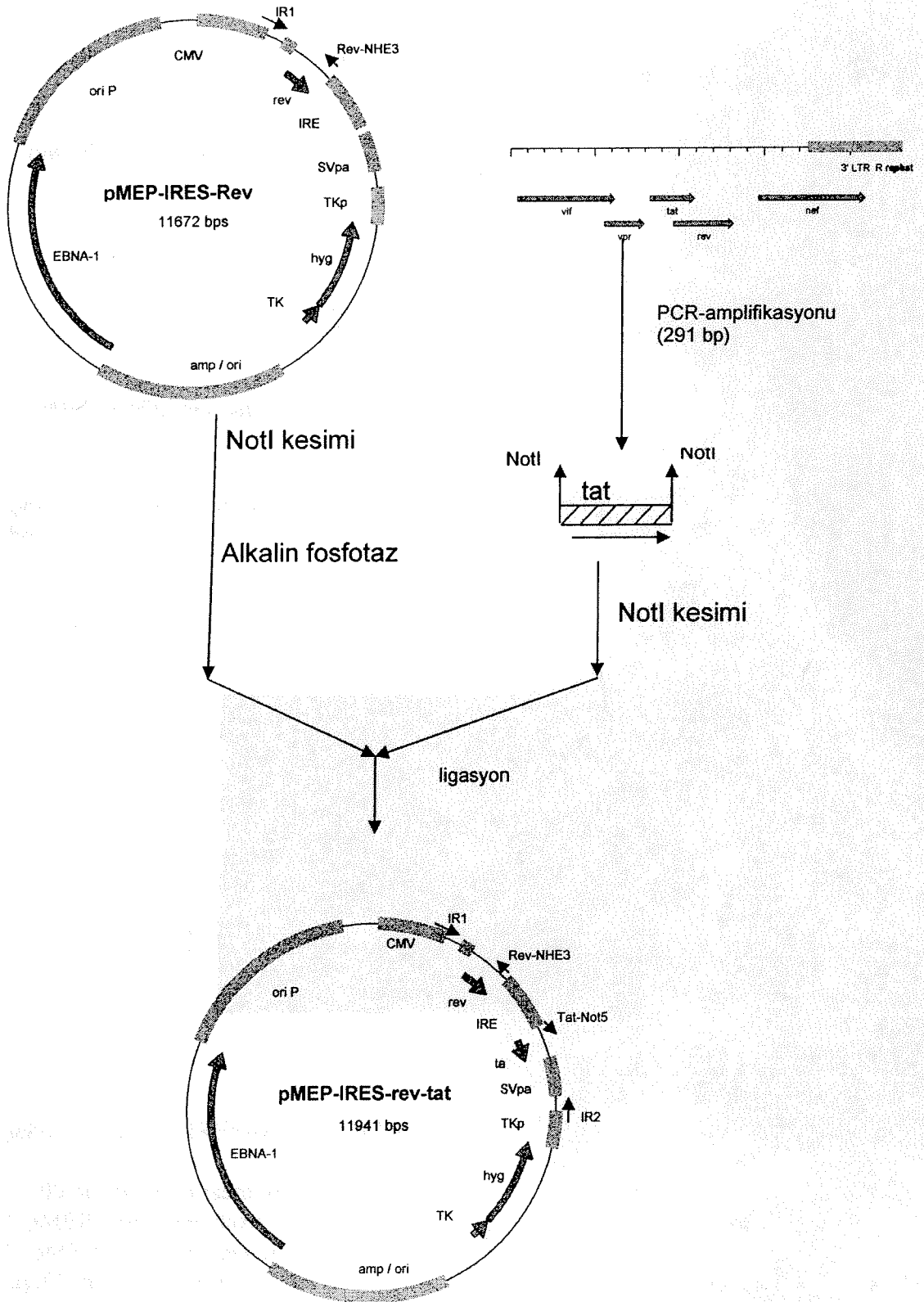
Tat geni de, benzer bir strateji ile hem pMEP-IRES hem de pMEP-IRES-rev plazmidine aktarılmıştır. Tat geninin pMEP-IRES'e aktarılmak üzere çoğaltılmasında Tat-NHE5 ve Tat-NHE3 primerleri kullanılmıştır. Her iki primer de nheI restriksiyon enzim bölgesi içermektedir. Bu primer çifti kullanılarak çoğaltılan tat geni ve pMEP-IRES vektörü nheI enzimleri ile kesilip, pMEP-IRES alkalın fosfotaz enzimi ile muamele edildikten sonra ligasyona maruz bırakılmıştır (şekil 9a). Tat geninin pMEP-IRES-rev'e aktarılmak üzere çoğaltılmasında Tat-Not5 ve Tat-Not3 primerleri kullanılmıştır. Her iki primer de notI restriksiyon enzim bölgesi içermektedir. Bu primer çifti kullanılarak çoğaltılan tat geni ve pMEP-IRES-rev plazmidini nheI enzimleri ile kesilip, pMEP-IRES alkalın fosfotaz enzimi ile muamele edildikten sonra ligasyona maruz bırakılmıştır (şekil 10a). E. Coli'nin bu ligasyon karışımlarıyla transforme edilmesiyle oluşan ampisilin dirençli kolonilerde rev ve/veya tat dizinleri PCR yöntemiyle taranmış ve her iki plazmid için olumlu sonuç veren birer örnek detaylı PCR analizlerine tabi tutulmuştur. Bu analizler neticesinde tat geninin pMEP-IRES (şekil 9b) ve pMEP-IRES-rev (şekil 10b ve 10c) plazmidlerinde doğru yönde oriyente olduğu gösterilmiştir. Oluşan plazmidler sırasıyla pMEP-IRES-tat ve pMEP-IRES-rev-tat olarak adlandırılmıştır.



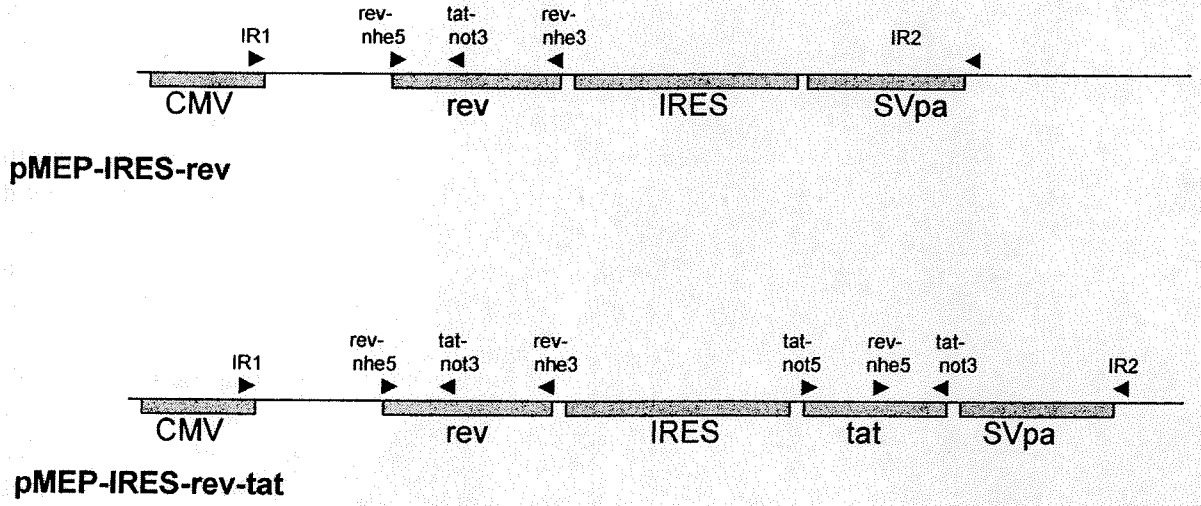
Şekil 9a: *tat* geninin pMEP-IRES'e klonlama stratejisi



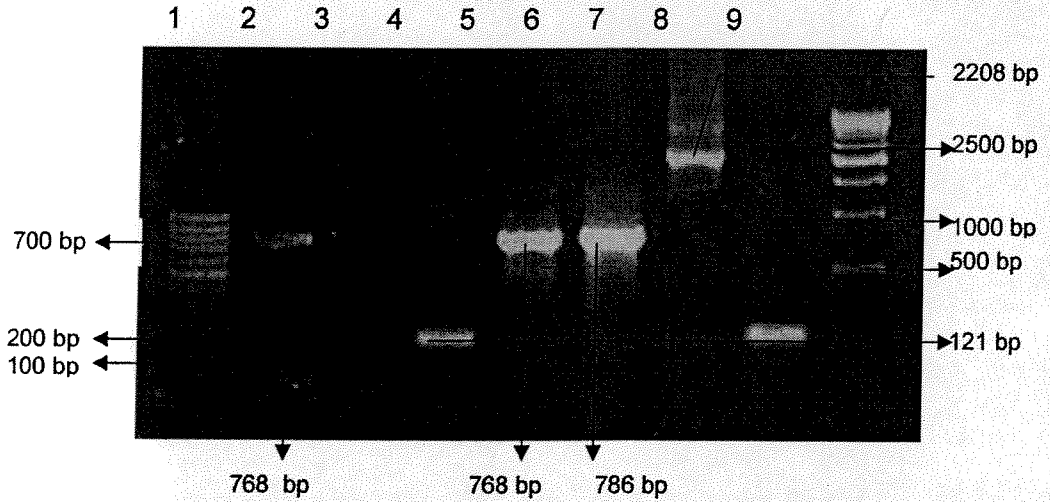
Şekil 9b: Ampisilin dirençli kolonilerden bir tanesinin PCR ile analizi. Analizde kullanılan primerler: Vektör dizinlerine bağlanan IR1 primeri ile tat geninin amplifikasyonunda kullanılan Tat-NHE5 ve Tat-NHE3 primerleri. Doğru oryantasyondan beklenen amplifikasyon boyutu 674 bp. M: marker fragmanları; 1: IR1 ve Tat-NHE3 primerleriyle yapılan amplifikasyon. Burada elde edilen 674 bp'lik fragman klonlamanın istenilen oryantasyonda olduğunun göstergesidir; 2: Tat-NHE5 ve Tat-NHE3 primerleriyle yapılan amplifikasyon.



Şekil 10a: *tat* geninin pMEP-IRES-*rev*'e klonlama stratejisi



Şekil 10b: şekil 10c de belirtilen analizlerde kullanılan primerler ve plazmidlere homolog bölgeleri

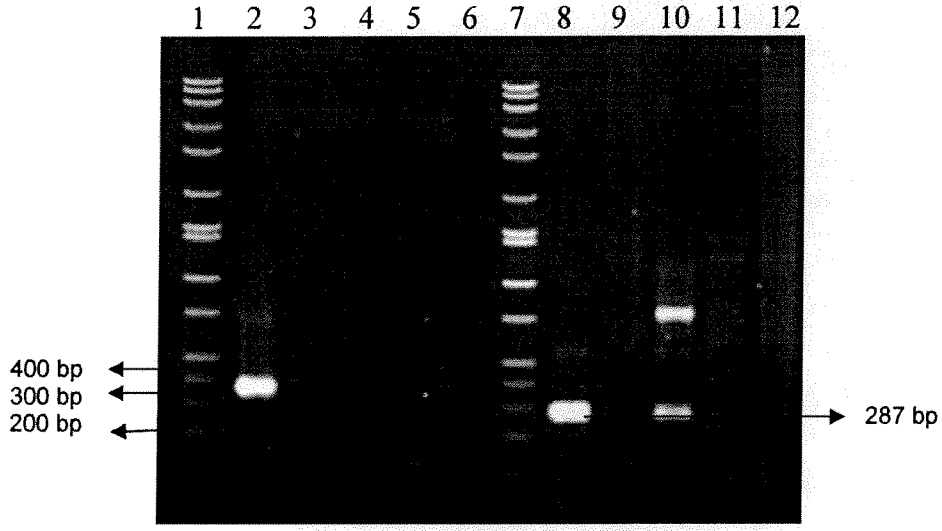


Şekil 10c: pMEP-IRES-rev ve pMEP-IRES-rev-tat plazmidlerinin PCR analizleri

- 1: 100 bp'lik DNA işaretleri
- 2: pMEP-IRES-rev plazmidinin Rev-NHE3 ve IR1 primerleriyle analizi
- 3: pMEP-IRES-rev plazmidinin Rev-NHE5 ve IR1 primerleriyle analizi (burada görünen zayıf band primerlerin spesifik olmayan bağlanmalarından kaynaklanmaktadır).
- 4: pMEP-IRES-rev plazmidinin Rev-NHE5 ve Tat-NOT3 primerleriyle analizi
- 5: pMEP-IRES-rev-tat plazmidinin Rev-NHE3 ve IR1 primerleriyle analizi
- 6: pMEP-IRES-rev-tat plazmidinin Tat-NOT5 ve IR2 primerleriyle analizi
- 7: pMEP-IRES-rev-tat plazmidinin IR1 ve IR2 primerleriyle analizi
- 8: pMEP-IRES-rev-tat plazmidinin Rev-NHE5 ve Tat-NOT3 primerleriyle analizi
- 9: 500 bp'lik DNA işaretleri

c) HIV regülatör genlerini eksprese hücre hatlarının oluşturulabilmesi için, pMEP-IRES-rev, pMEP-IRES-tat ve pMEP-IRES-rev-tat ekspresyon plazmidleri lipofeksiyon yöntemi kullanılarak HeLa hücrelerine ayrı ayrı aktarılmıştır. Daha önce insan T hücreleri (süspansiyon hücreler) kullanmayı planlanmış olsa da, çalışma kolaylığı ve higromisine dirençli hücre hatlarının seçiminin yapışkan hücrelerde daha kolay olmasından dolayı HeLa hücrelerinde karar kılınmıştır. Lipofeksiyonu takiben, higromisinli ortamda 2-3 haftalık inkübasyonu takiben dirençli hücrelerin oluştuğu gözlenmiş ve bunlar yeni kaplara aktararak hücre hatlarının oluşumu sağlanıp sırasıyla HeLa-rev, HeLa-tat ve HeLa-rev-tat olarak adlandırılmıştır.

Bu hücre hatları daha sonra rev ve tat proteinlerini ekspres edip etmediklerin araştırılması için anti-rev ve anti-tat fare monoklonal antikoları kullanılarak western blot yöntemiyle analiz edilmişlerdir. Bu analizler neticesinde ekspresyona dair herhangi bir bulgu edinilmemesi üzerine, hücre hatlarının ekspresyon plazmidlerini içerip içermediklerini anlaşılması amacıyla hücre DNA'ları izole edilip PCR yöntemiyle tat ve rev dizinlerinin varlığı araştırılmıştır (şekil 11).



Şekil 11. Hücre hatlarının PCR ile analizi. Rev amplifikasyonu için rev-NHE5 ve rev-NHE3, tat amplifikasyonu için ise tat-NHE5 ve tat-NHE3 primerleri kullanılmıştır.

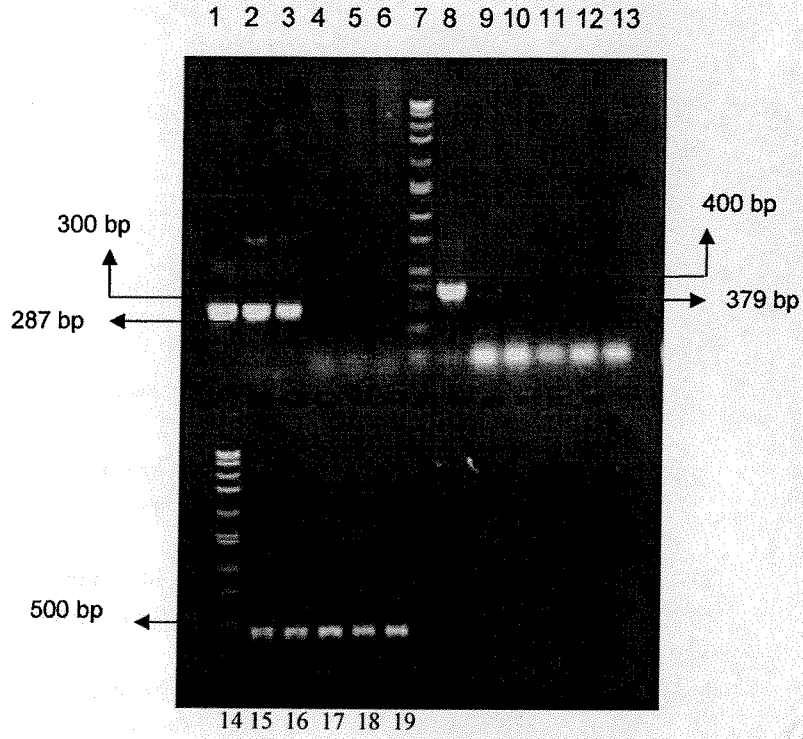
- 1: 10 kb'lık DNA işaretleri
- 2: pozitif kontrol. pCV1 plazmidinden rev amplifikasyonu
- 3: HeLa-rev DNA'sından rev amplifikasyonu
- 4: HeLa-tat DNA'sından rev amplifikasyonu
- 5: HeLa-rev-tat DNA'sında rev amplifikasyonu
- 6: negatif kontrol. HeLa DNA'sından rev amplifikasyonu
- 7: 10 kb'lık DNA işaretleri
- 8: pozitif kontrol. pCV1 plazmidinden tat amplifikasyonu
- 9: HeLa-rev DNA'sından tat amplifikasyonu
- 10: HeLa-tat DNA'sından tat amplifikasyonu
- 11: HeLa-rev-tat DNA'sında tat amplifikasyonu
- 12: negatif kontrol. HeLa DNA'sından tat amplifikasyonu

Şekil 11’te de görüldüğü üzere sadece HeLa-tat hücreleri aktarılan plazmidde var olan tat dizinlerini içermektedir. HeLa-rev ve HeLa-rev-tat hücreleri ise ne rev ne de tat dizinlerini içermektedir. Buradan anlaşılan sonuç HeLa-rev ve HeLa-rev-tat hücrelerinin oluşturulması aşamasında plazmid içeren hücreler değil de higromisine spontan olarak dirençlilik oluşturan hücreler seçildiğidir. Bir başka olasılık da plasmidlerde bulunan higromisin dirençlilik kasedinin hücre DNA’sına rekombiyonla entegre olmuş olmasıdır.

HeLa-tat hücrelerinin tat ekspresyon plazmidini içerip de western blot analizinde olumsuz sonuç vermesi, akla bu hücrelerde tat mRNA sentezinin olup olmadığı sorusunu getirmektedir. Bu soruyu cevaplayabilmek için oluşturulan hücre hatlarından mRNA izole edilip ters transkriptaz enzimiyle cDNA’ya dönüştürüldükten sonra PCR (RT-PCR) yöntemi kullanılarak tat mRNA’sının varlığı araştırılmıştır (şekil 12).

Buradan elde edilen sonuçlara HeLa-tat hücre hatları tat mRNA üretimi yaptığıdır. HeLa-rev ve HeLa-rev-tat hücre hatları ise rev ve/veya tat mRNA üretimi göstermemektedir. Tat mRNA’sını üreten HeLa-tat hücrelerinin western blot yöntemiyle tat proteinini ürettiğinin gösterilememesi birkaç nedene bağlı olabilir.

- i) üretilen protein miktarının western blot ile teşhis edilebilen limitlerin altına olması
- ii) tat mRNA’larının sitoplazmada ribozomlara etkin olarak bağlanamaması. Düşük bir ihtimal olsa da bu durum mRNA’daki tat başlama kodonundan hemen önce kozak dizinlerinin olmamasından kaynaklanabilir. Kozak dizinleri bazı durumlarda ökaryotlarda translasyon verimliliğini arttırabilmektedir.
- iii) Tat geninin PCR ile klonlanma aşamasında genin herhangi bir gölgesinde mutasyon (frameshift veya non-sense) oluşmasıyla proteinin anti-tat monoklonal antikolarıyla tanınmayacak hal alması ve fonksiyonelliğini kaybetmesi. PCR da kullanılan taq polimeraz prof-reading aktivitesinin olmaması enziminin mutasyon oranını yükselttiğinden dolayı amplifikasyon sırasında DNA’da bu tür mutasyonlar oluşma olasılığı artmaktadır.



Şekil 12. Hücre hatlarından elde edilen mRNA'ların RT-PCR analizi. Tat amplifikasyonu için tat-NHE5 ve tat-NHE3 primerleri kullanılmıştır.

- 1: pozitif kontrol. pCV1 plazmidinden tat amplifikasyonu
- 2: HeLa-tat mRNA'sından tat amplifikasyonu
- 3: HeLa-tat mRNA'sından tat amplifikasyonu (farklı hücre stoğu)
- 4: HeLa-rev mRNA'sında tat amplifikasyonu
- 5: HeLa-rev-tat mRNA'sında tat amplifikasyonu
- 6: negatif kontrol. HeLa mRNA'sında tat amplifikasyonu
- 7: 10 kb'lık DNA işaretleri
- 8: pozitif kontrol. pCV1 plazmidinden rev amplifikasyonu
- 9: HeLa-rev mRNA'sından rev amplifikasyonu
- 10: HeLa-tat mRNA'sından rev amplifikasyonu
- 11: HeLa-tat mRNA'sından rev amplifikasyonu (farklı hücre stoğu)
- 12: HeLa-rev-tat mRNA'sında rev amplifikasyonu
- 13: negatif kontrol. HeLa mRNA'sından rev amplifikasyonu
- 14: 10 kb'lık DNA işaretleri
- 15-19: internal kontrol. HeLa, HeLa-rev, HeLa-tat, HeLa-tat (farklı stok), HeLa-rev-tat hücrelerinden G3PDH gen mRNA'sının G3PDH5 ve G3PDH3 primerleriyle çoğaltılması.

Proje kapsamında oluşturulmuş plazmidlerdeki PCR ile klonlanmış DNA dizinlerinde herhangi bir mutasyonun oluşup oluşmadığı, bu dizinlerin analiz edilmesiyle yapılmıştır. Bu amaç için, bölümümüzde bulunan Beckman Coulter CEQ 8000 Genetic Analysis System cihazı ve bu cihaz ile uyumlu Dye Terminator Cycle Sequencing kiti üreticinin tavsiyesi doğrultusunda kullanılmıştır.

Oluşturulan plazmidler şunlardır:

1. pMEP-IRES-rev
2. pMEP-IRES-tat :(tat-290bp)
3. pMEP-IRES-rev-tat :(rev-380bp), (tat-290bp)
4. pREP-LTR-INSRRE-TK-LacZ :(LTR-743bp), (INSRRE-2kb), (TK-1150bp)
5. pREP-LTR-INSRRE-CAT-LacZ : (CAT-700bp), (LacZ-3200bp)

Bu plazmidlerde, klonlanması PCR ile çoğaltılarak yapılmış DNA dizileri parantez içinde boyutlarıyla belirtilmiştir.

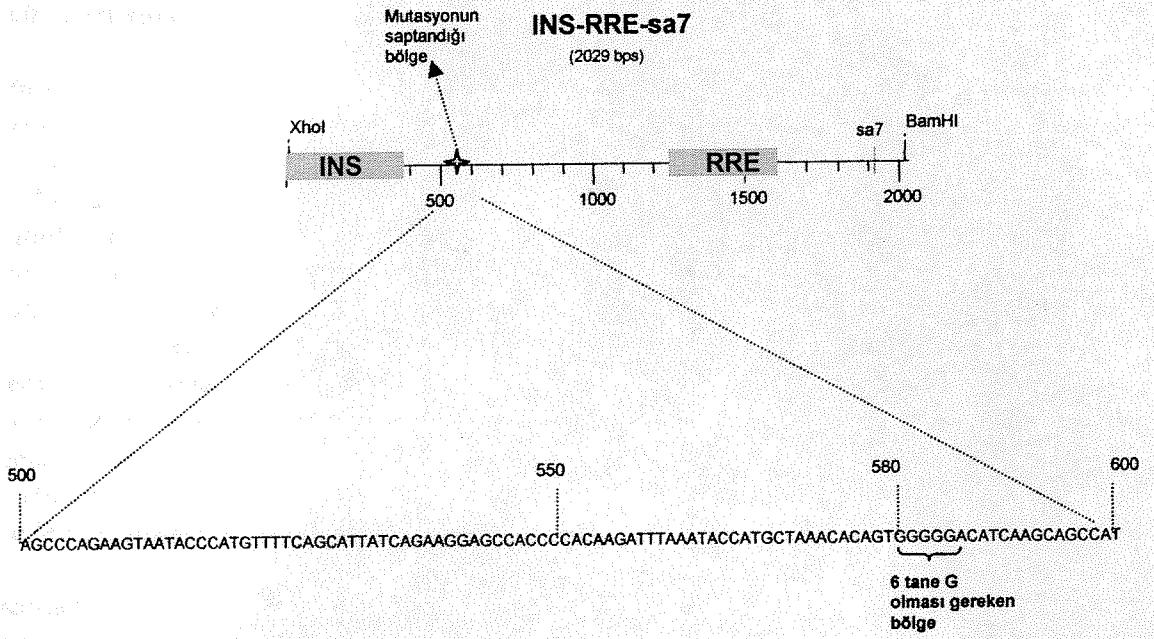
1 ve 3 numaralı plazmidlerde bulunan rev dizinleri ortak bir klondan geldikleri için sadece 3 numaralı plazmidde analiz edilmiştir.

2 ve 3 numaralı plazmidlerde bulunan tat dizinleri farklı PCR reaksiyonları sonucunda klonlandığı için iki plazmidten de tat'a yönelik dizin analiz edilmiştir.

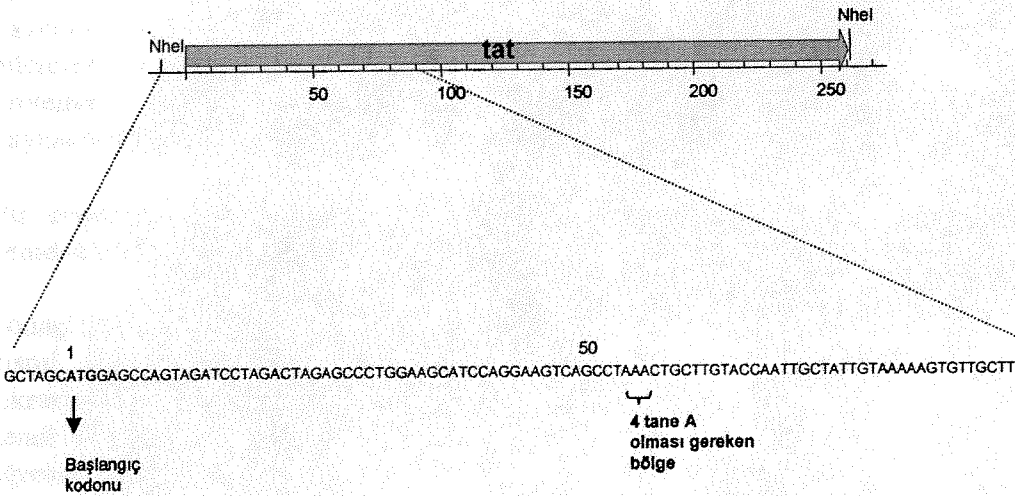
4 ve 5 numaralı plazmidlerde bulunan LTR, INSRRE ve LacZ dizinleri ortak bir klondan geldikleri için sadece bir plazmidde analiz edilmişlerdir.

Her bir genin DNA dizi analizlerinin yapılabilmesi için, ilgili bölgeye 400 bp aralıklarla bağlanacak primerler dizayn edilmiştir. Buna göre tat ve rev için 1'er adet, LTR ve CAT için 2'şer adet, TK için 3 adet, INSRRE için 5 adet, LacZ içinse 8 adet yeni primer (toplamda 22 adet) alınmıştır.

Yapılan analizler neticesinde 4. ve 5. plazmidlerde bulunan INSRRE (şekil 13) ve 2. plazmidde bulunan tat (şekil 14) dizinlerinde mutasyonların olduğu saptanmıştır. Bu bulgunun sağlanması yapılması amacıyla analizler tekrarlanmış ve aynı sonuçlar elde edilmiştir.



Şekil 13: INSRRE fragmentinde tesbit edilen mutasyonun bulunduğu yer. Altı tane guanin olması gereken yerde beş tane mevcuttur.



Şekil 14: tat geninde tesbit edilen mutasyonun bulunduğu yer. Dört tane adenin olması gereken yerde üç tane mevcuttur.

5.0. Tartışma ve Sonuç

Projenin yürütülmesi esnasında yaşanan gecikmelerden dolayı proje zamanında tamamlanmış ve bir yıllık uzatma istenmiştir. Gecikmenin nedenleri kısa şöyle sıralanabilir.

- Laboratuvar alt yapısının oluşturulması.
- Plazmidlerin oluşturulması aşaması öngörülen süreden çok daha uzun sürmesi. Birçok klonlama deneyi defalarca tekrarlanmıştır. Özellikle kütüçlü DNA fragmanlarının tek enzim ile kesilmiş plazmid vektörüne klonlanması defalarca denenmiş ama sonuç alınamamıştır. Daha sonra bu stratejiden vazgeçip farklı bir yöntem uygulanarak devam edilmiştir.
- Projede Jurkat hücrelerinin kullanılması amaçlanmıştı. Ancak bu hücrelerin yurt dışından temini sırasında hücrelerin bozulması nedeniyle bu işlemin birkaç kere tekrarlanması neticesinde oluşan zaman kayıpları. Sonuçta Jurkat hücrelerinin kullanılmasından vazgeçilmiştir. Onun yerine HeLa hücrelerinin kullanımına karar verilmiştir.
- Hücre hatlarının oluşturulması için yapılan deneyler sırasında yaşanan kontaminasyonlar nedeniyle hücrelerin kaybı ve deneylere tekrar baştan başlanması

Kullanılan bir yıllık uzatma süresinde, danışman görüşleri dikkate alınarak proje kapsamında oluşturulmuş olan plazmidlerin DNA dizinleri ortaya çıkarılmıştır. Bu çalışma neticesinde PCR ile klonlanmış INS-RRE ve tat fragmanlarında mutasyon tespit edilmiştir.

INSRRE fragmentinde tesbit edilen mutasyon, fragmentin 580. bazında başlayan ve ardışık 6 tane guanin baz dizininin olması gereken bölgede yalnızca 5 adet guaninin olmasından kaynaklanmıştır (şekil 13). Bu değişikliğin INS ve RRE dizinlerinin arasındaki bir bölgede bulunması bu mutasyonun zararsız olduğu anlamını taşımaktadır.

Ancak, pMEP-IRES-tat plazmidinde bulunan tat dizinindeki mutasyonun, tat proteinini kodlayan dizinin 55. bazında bulunan ardışık 4 adenin baz dizininin 3'e düşmesine neden olarak 1 bazlık delesyon oluşturmasından kaynaklandığı anlaşılmıştır. Bu da, protein kodlayan dizinin başlarında frameshift'e neden olacağı için üretilecek olan proteinin fonksiyonunun kaybolacağı anlamına gelmektedir. Nitekim, pMEP-IRES-tat plazmidinin aktarıldığı insan hücrelerinde tat'a özgü mRNA'ların varlığının gösterilebilmesine rağmen, aynı hücrelerde tat proteininin varlığı western blot yöntemiyle bir türlü gösterilememesinin bu mutasyondan kaynaklandığı anlaşılmıştır.

Bu durumda pMEP-IRES-tat plazmidini, raporun bulgular kısmında bahsedilen yöntemle yeniden oluşturularak tekrar DNA dizi analizine tabi tutulmuş ve doğruluğu gösterilmiştir.

Sonuç olarak proje kapsamında amaçlanan vektörler gecikmeli de olsa hazırlanarak proje kısmi olarak tamamlanmıştır. Hücre hatlarının oluşturulmasına yönelik çalışmaların tekrarlanması ve vektörlerin seçici öldürülebilirlikteki etkilerinin gözlenmesi bundan sonra kendi olanaklarımızla yeni bir yüksek lisans öğrencisiyle devam edecektir. Söz konusu öğrenci deneysel çalışmalarına Şubat 2007' de başlamıştır ve halen devam etmektedir.

Yararlanılan Kaynaklar:

- Grossman, Z., M. B. Feinberg, and W.E Paul. 1998. Multiple modes of cellular activation and virus transmission in HIV infection: a role for chronically and latently infected cells in sustaining viral replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95:6314-6319.
- Chun, T.W., and A. S. Fauci. 1999. Latent reservoirs of HIV: obstacles to the eradication of virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96:10958-10961.
- Pierson, T., J. McArthur, and R. F. Siliciano. 2000. Reservoirs for HIV-1: mechanisms for viral persistence in the presence of antiviral immune responses and antiretroviral therapy. *Annu. Rev. Immunol.* 18:665-708.
- Dybul, M., T. W. Chun, C. Yoder, B. Hidalgo, M. Belson, K. Hertogs, B. Larder, R. L. Dewar, C. H. Fox, C. W. Hallahan, J. S. Justement, S. A. Migueles, J. A. Metcalf, R. T. Davey, M. Daucher, P. Pandya, M. Baseler, D. J. Ward, and A. S. Fauci. 2001. Short-cycle structured intermittent treatment of chronic HIV infection with highly active antiretroviral therapy: effects on virologic, immunologic, and toxicity parameters. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 98:15161-15166.
- Ortiz, G.M., J. Hu, J. A. Goldwitz, R. Chandwani, M. Larsson, N. Bhardwaj, S. Bonhoeffer, B. Ramratnam, L. Zhang, M.M. Markowitz, and D. F. Nixon. 2002. Residual viral replication during antiretroviral therapy boosts human immunodeficiency virus type 1-specific CD8+ T-cell responses in subjects treated early after infection. *J. Virol.* 76:411-415.
- Finzi, D., J. Blankson, J. D. Siliciano, J. B. Margolick, K. Chadwick, T. Pierson, K. Smith, J. Lisziewicz, F. Lori, C. Flexner, T. C. Quinn, R. E. Chaisson, E. Rosenberg, B. Walker, S. Gange, J. Gallant, and R. F. Siliciano. 1999. Latent infection of CD4+ T cells provides a mechanism for lifelong persistence of HIV-1, even in patients on effective combination therapy. *Nat. Med.* 5:512-517.
- Wong, J.K., M. Hezareh, H. F. Gunthard, D. V. Havlir, C. C. Ignacio, C. A. Spina, and D. D. Richman. 1997. Recovery of replication-competent HIV despite prolonged suppression of plasma viremia. *Science.* 278:1291-1295.
- Finzi, D., M. Hermankova, T. Pierson, L. M. Carruth, C. Buck, R.E. Chaisson, T. C. Quinn, K. Chadwick, J. Margolick, R. Brookmeyer, J. Gallant, M. Markowitz, D. D. Ho, D. D. Richman, and R. F. Siliciano. 1997. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. *Science.* 278:1295-1300.
- Finzi, D., and R. F. Siliciano. 1998. Viral dynamics in HIV-1 infection. *Cell* 93:665-671.
- Perelson, A.S., P. Essunger, Y. Cao, M. Vesanen, A. Hurley, K. Saksela, M. Markowitz, and D. D. Ho. 1997. Decay characteristics of HIV-1-infected compartments during combination therapy. *Nature* 387:188-191.
- Venkatesh, L.K., M. Q. Arens, T. Subramanian, and G. Chinnadurai. 1990. Selective induction of toxicity to human cells expressing human immunodeficiency virus type 1 Tat by a conditionally cytotoxic adenovirus vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87:8746-8750.
- Brady, H. J., C. G. Miles, D. J. Pennington, and E. A. Dzierzak. 1994. Specific ablation of human immunodeficiency virus Tat-expressing cells by conditionally toxic retroviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 91:365-9.
- Caruso, M., and D. Klatzman. 1992. Selective killing of CD4+ cells harboring a human immunodeficiency virus-inducible suicide gene prevents viral spread in an infected cell population. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:182-186.
- Caruso, M., B. Salomon, S. Zhang, E. Brisson, F. Clavel, I. Lowy, and D. Klatzman. 1995. Expression of a Tat-inducible herpes simplex virus thymidine kinase gene protects acyclovir-treated CD4 cells from HIV-1 spread by conditional suicide and inhibition of reverse transcription. *Virology* 206: 495-503.

- Marcello, A., and I. Giaretta. 1998. Inducible expression of herpes simplex virus thymidine kinase from a bicistronic HIV1 vector. *Res Virol* 149:419-431.
- Smith, S.M., R. B. Markham, and K. T. Jeang. 1996. Conditional reduction of human immunodeficiency virus type 1 replication by a gain-of-herpes simplex virus 1 thymidine kinase function. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:7955-7960.
- Caruso, M. 1996. Gene therapy against cancer and HIV infection using the gene encoding herpes simplex virus thymidine kinase. *Mol. Med. Today* 2:212-217.
- Caruso, M., and Bank, A. 1997. Efficient retroviral gene transfer of a Tat-regulated herpes simplex virus thymidine kinase gene for HIV gene therapy. *Virus Res.* 52:133-143.
- Miyake, K., O. Iijima, N. Suzuki, M. Matsukura, and T Shimada. 2001. Selective killing of human immunodeficiency virus-infected cells by targeted gene transfer and inducible gene expression using a recombinant human immunodeficiency virus vector. *Hum. Gene. Ther.* 12:227-233.
- Poeschla, E., P. Carbeau, and F. Wong-Staal. 1996. Development of HIV vectors for anti-HIV gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 11395-11399.
- Buchschacher, G.L., Jr and F. Wong-Staal. 2000. Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases *Blood*, 95: 2499-2504.
- Gao, Z., J. Golob, V. M. Tanavde, C. I. Civin, R. G. Hawley, and L. Cheng. 2001. High Levels of Transgene Expression Following Transduction of Long-Term NOD/SCID-Repopulating Human Cells with a Modified Lentiviral Vector. *Stem Cells* 19: 247-259.
- Kowolik, C. M., J. Hu, and J. K. Yee. 2001. Locus Control Region of the Human CD2 Gene in a Lentivirus Vector Confers Position-Independent Transgene Expression. *J. Virol.* 75: 4641-4648.
- Berkowitz, R., H. Ilves, W. Y. Lin, K. Eckert, A. Coward, S. Tamaki, G. Veres, and I. Plavec. 2001. Construction and Molecular Analysis of Gene Transfer Systems Derived from Bovine Immunodeficiency Virus. *J. Virol.* 75: 3371-3382.
- Hanazono, Y., K. Terao, and K. Ozawa. 2001. Gene Transfer into Nonhuman Primate Hematopoietic Stem Cells: Implications for Gene Therapy. *Stem Cells* 19: 12-23.

**TÜBİTAK
PROJE ÖZET BİLGİ FORMU**

Proje No: TBAG-2277 (102T204)
Proje Başlığı: HIV REGÜLATÖR GENLERİNİ EKSPRESE EDEN HÜCRELERİN SEÇİCİ OLARAK ÖLDÜRÜLMESİ
Proje Yürütücüsü ve Araştırmacılar: Alper ARSLANOĞLU Zeynep YEĞİN
Projenin Yürütüldüğü Kuruluş ve Adresi: İzmir İleri teknoloji Enstitüsü, Fen Fakültesi, Biyoloji Bölümü, Gülbahçe kampusü, Urla, İZMİR
Destekleyen Kuruluş(ların) Adı ve Adresi: TÜBİTAK İzmir Yüksek Teknoloji Enstitüsü
Projenin Başlangıç ve Bitiş Tarihleri: Ocak 2003- Ocak 2007
Öz (en çok 70 kelime) HIV, kendi gen ekspresyonunu denetleyen proteinler üretmektedir. Bunlardan "rev" ve "tat" proteinleridir. Bu iki proteinin denetleyici özellikleri sadece HIV genomu üzerinde etkilidir. Bunun nedeni, HIV RNA'larında bulunan özel dizileridir. Proje, toksik bir proteinin üretiminin yukarıda bahsedilen özel dizilerinin kullanımıyla HIV "rev" ve "tat" proteinlerine bağımlı bir hale getirilmesini ve bu toksik proteini kodlayan DNA molekülünün "rev" ve "tat" proteinlerini üreten ve üretmeyen hücrelere aktararak seçici öldürülebilirlikteki etkisinin araştırılmasını amaçlamıştır.
Anahtar Kelimeler: HIV, rev, tat, HSV-TK, seçici öldürme
Projeden Yapılan Yayınlar: