

---

# HIV Replikasyonunu Durdurabilmek Amacıyla HIV-1 *env* mRNA'sında “Hammerhead” Ribozimler İçin Giriş Yeri Tayini

Yüksel YILDIZ\*,\*\* , John J. ROSSI\*\*\*

\* Department of Physiology, Loma Linda University, Loma Linda, CA 92350

\*\* Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fiziyojji Anabilim Dalı, AYDIN

\*\*\* Department of Molecular Biology, Beckman Research Institute of the City of Hope, Duarte, CA, USA

## ÖZET

“Human Immunodeficiency Virus (HIV)” ve “Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS)” in vivo eradikasyonları açısından hala bilimsel bir aşılmaz olma özelliklerini korumaktadırlar. HIV genomunun sürekli değişmesi, mevcut tedavilerin zaman içinde etkinliklerinin kaybolmasına neden olduğu gibi etkili bir aşı geliştirilmesine de engel olmaktadır. Bu yüzden daha başka yeni tedavi yöntemlerinin araştırılması gündeme gelmiştir. Bu anlamda, bütün genler RNA molekülleri aracılığıyla eksprese edildiği ve ayrıca HIV bir RNA virüsü olduğu için, ribozimleri (RNA enzimlerini) kullanan gen tedavisi HIV ve AIDS için önemli bir alternatif haline gelmiştir. HIV'in hedef hücrelere bağlanmasını sağlayan gp120 ve gp41 proteinleri virüsün *env* (envelope) geni tarafından kodlandıkları için HIV enfeksiyonunu belirleyen faktörlerden biri *env* geni ekspresyonudur. HIV *env* mRNA ekspresyonu ribozimlerle azaltılarak HIV enfeksiyonu baskılanabilir. Ribozimlerin terapötik amaçla uygulanabilmeleri için öncelikle istenen hedefe girebilmeleri ve ona bağlanmaları şarttır. Bu çalışmada HIV virüsü ile infekte T-lenfositlerden hazırlanmış hücre ekstratlarında, “Antisense ve RNaseH ile haritalama metoduyla” HIV *env* geninin gp120 ve gp41 proteinlerini kodlayan bir bölgesinde ribozimler için en kolay giriş yerleri araştırılmıştır.

Anahtar Kelimeler: HIV, RNA, Ribozim, Girilebilir

## SUMMARY

### Investigation of the Most Accessible Sites for Hammerhead Ribozymes Targeting HIV-1 *env* mRNA to Inhibit Viral Replication

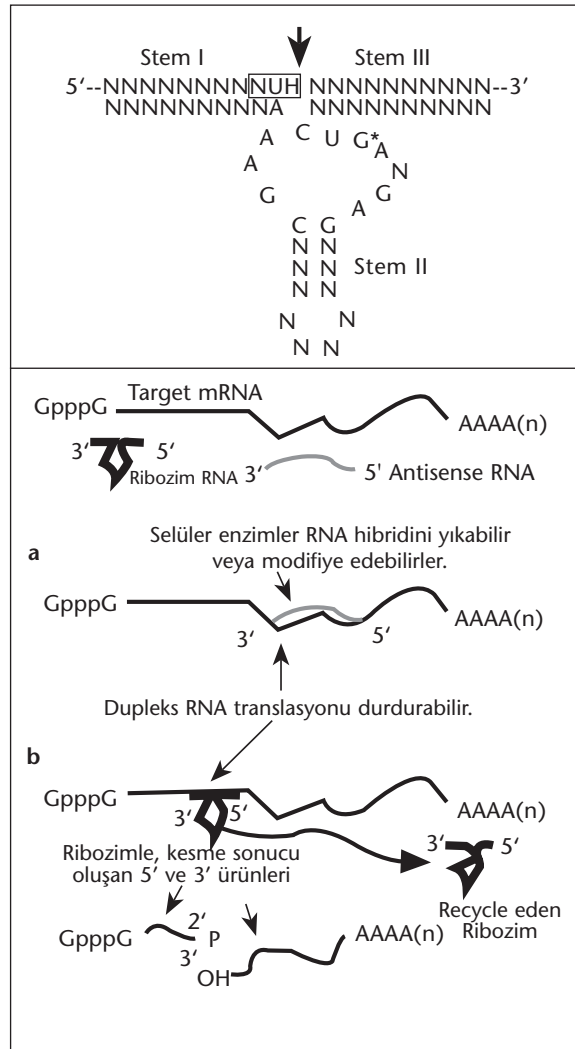
Human immunodeficiency virus (HIV) and acquired immunodeficiency syndrome (AIDS) are still a scientific challenge as to their in vivo eradication. Continuous variability of the HIV genome causes the present therapies to lose efficiency over the course of time and prevents the successful development of a vaccine. That's why; investigation of new therapy methods has come to agenda. In this respect, since all genes are expressed through RNA intermediates and since HIV is a RNA virus, gene therapy employing ribozymes (RNA enzymes) has gained important consideration as a possible treatment for AIDS. Since HIV-1 gp120 and

gp41 envelope glycoproteins which provide binding and fusion of HIV to target cells are encoded by HIV envelope (*env*) gene, one of the factors determining HIV infectivity is expression of the HIV *env* gene. By selectively decreasing of the HIV *env* mRNA expression with ribozymes, HIV infectivity can be inhibited. To effectively apply ribozymes as therapeutic agents, they have to be able to access and bind to target RNA. In this study, the most accessible sites for ribozyme targeting in a region of the HIV-1 *env* RNA encoding gp 120 and gp41 proteins has been investigated using antisense and RNaseH mapping in cell extracts prepared from HIV-1 infected CEM T-lymphocytes.

**Key Words:** HIV, RNA, Ribozyme, Accessibility

1980'li yılların başında Cech ve arkadaşları ile Altman ve arkadaşları, RNA moleküllerinin, DNA'dan protein sentezine doğru olan genetik bilgi akışı sırasında sadece taşıyıcı ara moleküller olmadığını, aynı zamanda onların başka RNA'lar üzerinde kesme, tahrip etme gibi enzimatik etkilere de sahip olduğunu buldular<sup>[1,2]</sup>. Keşfedilmelerinden sonra ribozimler, kanser, AIDS, hepatit vb. gibi pek çok ölümcül hastalığın tedavisinde terapötik ajan olarak kullanılmışlardır. Ribozimler; Grup I intron, Grup II intron, RNaseP, "hammerhead", "axehead" ve tRNA<sup>Phe</sup> şeklinde alt gruplara ayrılır. Hepsinin kesme yerleri ve şekilleri farklıdır. Grup I intronlar; doğada protist, mitokondri, kloroplast, bakteriyofaj ve siyanobakterlerin pre-rRNA'sında, Grup II intronlar; mantar mitokondrilerinde ve kloroplastlarda, RNaseP; tRNA'ların yapısında endojen olarak, "hammerhead" ribozimler; viroid, virüsoid ve newt'lerin yapısında, "axehead" ribozimler; hepatit delta virüslerinde ve tRNA<sup>Phe</sup> da mayalarda bulunur<sup>[3]</sup>. Doğal ribozimler daha çok "cis-acting" etkili iken (kesen ve kesilen RNA'ların aynı transkriptte olması), sentetik olanlar daha çok "trans-acting" (kesen ve kesilen RNA'ların farklı transkriptlerde olması) etkilidir. Sentetik olanlar istenirse "cis-acting" olarak da dizayn edilebilir. "Hammerhead" ribozimler bilinen en küçük ribozim motifidir ve gen tedavisinde büyük bir potansiyele sahiptir.

"Trans-acting hammerhead" ribozimler, iki antisense kol (kesilen hedef RNA'yı paralel ve ters yönde tamamlayan ve stem I ve III olarak adlandırılan) ve bir katalitik domainden (bölüm) ibarettir. Katalitik domain de, bir stem loop [tek zincirli bir halka ile onun her iki ucunu birleştiren çift zincirli yapının (stem II) tamamı] ile onu antisense kollarla birleştiren tek zincirli nükleotidlerden ibarettir (Şekil 1 üst panel). "Hammerhead" ribozimler, genellikle hedef RNA'daki NUH tripletlerini (N; A, U, C, G nükleotidlerinden herhangi biri, U: Urasil, H: G (Guanin) hariç A, U, C nükleotidlerinden herhangi biri) kesme yeri olarak seçerler ve buradaki H nükleotidi ile onu takip eden nükleotid arasındaki fosfodiester bağını parçalayarak hedef RNA'yı keserler<sup>[3]</sup>. "Hammerhe-



**Şekil 1. "Hammerhead" ribozim.** Kutu içine alınmış NUH "kesme yeri consensus dizisi"ni göstermektedir. NUH'ta N; A, C, G, U nükleotidlerini, H ise A, C, U nükleotidlerini göstermektedir. Okla gösterilen H ile ondan sonra gelen nükleotid arasındaki fosfodiester bağı Mg<sup>+2</sup> varlığında 11 sabit nükleotid ve stem loop II tarafından oluşturulan katalitik kor tarafından kesilir. \* İşareti ribozimin mutant formunu yapmak için değiştirilen nükleotidi göstermektedir. Genellikle G: A mutasyonu kullanılır. Ribozimde, hedef RNA ile stem I'i oluşturan kısım arm I, stem II'yi oluşturan kısım arm II diye adlandırılır.

ad" ribozimlerce doğada en yaygın olarak kullanılan ve en etkili olarak kesilen triplet GUC tripletidir<sup>[4]</sup>.

Antisense RNA'ların antisense etkisi, bu moleküllerin hedef RNA ile birleştiklerinde meydana gelen RNA/RNA hibridlerinin (çiftlerinin) hedef RNA'dan translasyonu ve protein sentezini engellemesi şeklinde görülür. Ribozimler, antisense kollarıyla antisense aktivitesine sahip oldukları gibi katalitik korları (domain) vasıtasıyla kesme etkisine de sahiptirler. Bundan dolayı sadece antisense etkiye sahip antisense RNA moleküllerine göre bir kesme üstünlükleri vardır. Antisense RNA'ların kullanıldığı durumlarda, RNA dupleksini (hibrid) oluşturan hedef RNA ve antisense RNA molekülleri selüler enzimlerce tahrip veya modifiye edilebilirken, ribozim RNA'larda, ribozim molekülleri bağlandıkları hedef RNA'yı kestikten sonra başka hedef RNA'lara giderek onları da kesebilirler. (Şekil 1 alt panel). Bir hedef RNA "hammerhead" ribozimlerce kesildikten sonra oluşan RNA ürünleri tekrar birleşmemekte ve bu RNA üzerinden olabilecek protein sentezi de engellenmektedir. "Hammerhead" ribozimler, RNA'nın aşırı ekspresyonundan kaynaklanan pek çok viral, neoplastik ve genetik hastalıklarda terapötik ajan olarak kullanılmışlardır<sup>[5-15]</sup>.

Hedefe girilebilirlik (accessibility), hedefe bağlanabilme (co-localization), ekspresyon seviyesi ve moleküler stabilite sırasıyla ribozimlerin etkinliğini belirleyen en önemli faktörlerdir. Ribozim çalışmalarında hedef kesme yeri tayini çok önemlidir. Seçilecek yer, ribozimlerin hedefe hem en kolayca ulaşabildiği hem de en etkili kesebildiği bir yer olmalıdır.

## MATERYAL ve METOD

### HIV-1 İnfeksiyonu ve HIV-1 ile İnfekte CEM T-lenfositlerinden Hücre Ekstrelerinin Hazırlanması

Weil ve arkadaşları ile Wu tarafından geliştirilen protokole göre hücre ekstrelerini hazırlamak için önce, CEM T-lenfosit hücreleri HIV-1 pNL4-3 süpernatantıyla infekte edildi<sup>[16,17]</sup>. Bunun için 200 µL RPMI 1640 + %10 FBS (Fetal Bovine Serum, Irvine Scientific) içindeki  $1 \times 10^5$  hücre  $12 \times 75$ 'lik bir tüpe transfer edildi ve sonrasında buna 100 µL virüs içeren süpernatant eklendi. Hücreler  $37^\circ\text{C}$  ve %5  $\text{CO}_2$ 'de gece boyunca inkübe edildi. Ertesi gün hücreler 4 kez HBSS (Hank's Balanced Salt Solution, Bio Whittaker) solüsyonu ile yıkandı ve 1 mL virüs + hücre karışımı 24 gözlü bir "plate"nin bir gözüne transfer edildi. Bütün işlemler boyunca kültür medyası (ortamı) hep RPMI 1640 + %10 FBS idi. Beş gün sonra hücre yoğunluğu transfer etmeye yeterli

seviyeye ulaştığı için hücreler toplam 10 mL kültür ortamı içinde bir T25 flask içine transfer edildi. Yaklaşık 10 gün sonra hücre yoğunluğu, hücreleri 15 mL kültür ortamı içinde bir T75 flaskına transfer edecek seviyede idi. Üç ile beş gün sonra kültür süpernatant örnekleri toplandı ve RT veya p24 assay (Beckman Coulter, Fullerton, CA; üretici firma açıklamalarına göre) ile HIV aktiviteleri ölçüldü<sup>[18]</sup>. Çıkan sonuçlar standart HIV süpernatantıyla karşılaştırıldığında yeterli seviyeye ulaşan hücrelerin tamamı deneyde kullanılmak üzere toplandı. Yaklaşık  $2 \times 10^7$  hücre iki kez soğuk PBS (phosphate buffered serum, fosfatla tamponlanmış serum) ile yıkandı. Hücreler otoklavlanmış bir mikrosantrifüj tübünde santrifüj edildikten sonra yaklaşık 50 µL'lik bir pellet (çökelti) elde edildi. Sonra bu pellete 100 µL Buffer A (7 mM Tris-HCl, pH 7.5, 7 mM KCl, 1 mM  $\text{MgCl}_2$ , 1 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) ilave edildi ve hücreler bu haliyle şişmeleri için 10 dakika buzda tutuldu. Şişen bu hücreler buz içerisinde bekletilen otoklavlanmış bir "dounce"a (cam havan) transfer edildikten sonra cihazın izin verdiği sınırlar içinde 20 vuru yapılarak nazik bir şekilde ezildi. Elde edilen yaklaşık 100 µL hücre ekstresi yeni bir otoklavlanmış mikrosantrifüj tüpüne transfer edildi. Sonra buna 10 µL Buffer B (neutralizing buffer: 21 mM Tris-HCl, pH 7.5, 116 mM KCl, 3.6 mM  $\text{MgCl}_2$ , 6 mM  $\beta$ -mercaptoethanol) ilave edildi ve tüp 10 dakika  $16.000 \times g$  ve  $4^\circ\text{C}$ 'de santrifüj edildi. Santrifüjden sonra hücre ekstresini içeren süpernatant toplanarak  $-80^\circ\text{C}$ 'de saklandı.

### HIV Env RNA'sının HIV ile İnfekte CEM Hücre Ekstrelerinde Antisense Oligolar ve RNaseH ile Kesilmesi ve RT-PCR Analizi

Bu çalışmada kullanılan oligodeoksiribonükleotidler (oligolar) aşağıdaki şekildedir. Her antisense oligo aynı yer için kullanılacak ribozimin kesme yerine göre adlandırıldı. Mesela, AS (antisense) 7386 aynı yer için kullanılacak ribozimin HIV 4-3 RNA'sını 7386. nükleotidden sonra keseceğini göstermektedir.

(AS1=AS 7386).

5'-AGTACTATTAACAGTTGTGTTG-3';

(AS2=AS 7462).

5'-TTCTGCATGGGAGTGTGATTGTG-3';

(AS3=AS 7518).

5'-GGGAGGGGCATACATTGCTTTTC-3';

(AS4=AS 7637).

5'-TTGTCCCTCATATCGCCTCCTCC-3';

(AS5=AS 7678).

5'-CAATTTTACTACTTTATATTTA-3';

(AS6=AS 7858).

5'-GCTGCTGCACTATATCAGACAAT-3';

(AS7=AS 7918).

5'-CCCAGACTGTGAGTTGCAACAGA-3';

(AS8=AS 8010).

5'-GAGTTTTCCAGAGCAACCCCAAA-3';

Kontrol Sense oligo (7278-7298).

5'-AATAATAAAACAATAATCTT-3'.

[altı çizili triplet (üçlü) nükleotidler hedef HIV RNA'da ribozimlerin kesme yerlerini göstermektedir]

HIV-1 polimeraz zincir reaksiyonu (PCR) için 5'-primer oligo (7228-7251) (24 nt):

5'-GAATGCCACTTTAAACAGATAGC-3'

HIV-1 PCR'si için 3'-primer oligo (8049-8030) (20 nt):

5'-GCATTCCAAGGCACAGCAGT-3'

Human  $\beta$ -Actin PCR'si için 5'-primer oligo (26 nt):

5'-GCCCCCTGAACCCCAAGGCCAACCG-3'

(Human  $\beta$ -Actin geninin ekson 3'ündeki 1372-1397 arası nükleotidlerin antisense tamamlayıcısıdır)

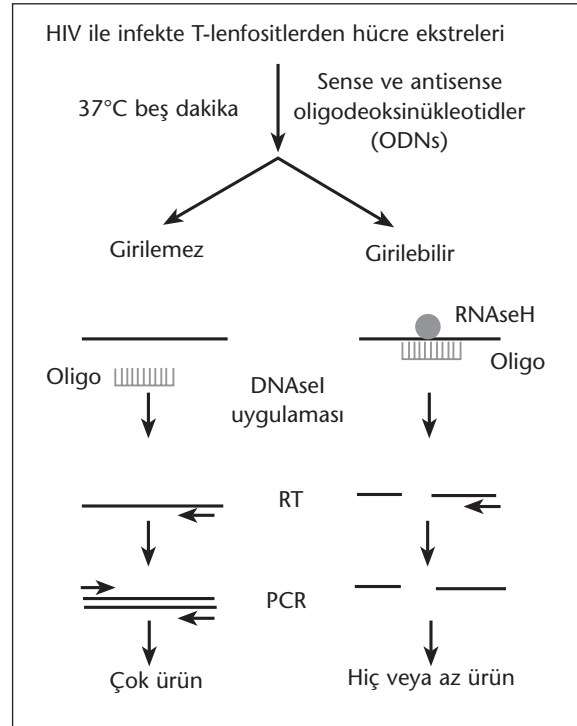
Human  $\beta$ -Actin PCR'si için 3'-primer oligo (24 nt):

5'-GAAGTCCAGGGCGACGTAGCACAG-3'

(Human  $\beta$ -Actin geninin ekson 4'ündeki 2160-2137 arası nükleotidlerin antisense tamamlayıcısıdır ve PCR ürününün uzunluğu "spliced" form için 348 nt, "unspliced" form için ise 789 nükleotiddir.)

**a. Antisense ve RNaseH ile kesme reaksiyonu:** 20  $\mu$ L'lik bir reaksiyon aşağıdaki gibi hazırlanmıştır: 10  $\mu$ L hücre ekstresi, 2  $\mu$ L 10x buffer (40 mM Tris-HCl pH 7.5; 10 mM MgCl<sub>2</sub>; 1 mM DTT), 1  $\mu$ L RNasin (40 U/ $\mu$ L) (Promega), 1500 nM antisense oligo ve DEPC su (dietilpirokarbonat ile sterilize edilmiş su) yumuşak ve yavaş bir şekilde karıştırıldı ve beş dakika 37°C'de inkübe edildi. Sonra 10  $\mu$ L 3x proteinaz K buffer'ı (0.6 mg/mL proteinase K, 30 mM Tris-HCl pH 7.5, 60 mM EDTA, %1 SDS ve 0.02 mM CaCl<sub>2</sub>) ilave edildi ve 15 dakika daha 37°C'de inkübe edildi. Fenol-kloroform ekstraksiyonu ve alkol presipitasyonundan sonra numunelere oligoları uzaklaştırmak için 1  $\mu$ L DNase I (Roche) eklendi ve 30 dakika 37°C'de inkübe edildi. İkinci fenol-kloroform ekstraksiyonu ve alkol presipitasyonundan sonra total RNA miktarı spektrofotometre ile ölçüldü (Şekil 2).

**b. RT-PCR reaksiyonu:** Template olarak 500-1000 ng total RNA'nın kullanıldığı 20  $\mu$ L revers



Şekil 2. HIV-1 ile infekte CEM T-lenfositlerinden hazırlanmış hücre ekstratlarında girilebilirlik (accessibility) çalışmaları şeması.

Şekil, teknik boyunca izlenen bütün basamakları özetlemektedir. Özetle, antisense oligoların sadece girilebilir yer veya yerlerde hedef RNA'ya bağlanabileceği beklenir. RNaseH enzimi de sadece RNA/DNA hibridlerinde RNA'yı keser. Daha sonra kesme yerlerini içeren bölge için yapılacak olan RT-PCR'de, girilebilir yer veya yerlerde ürün oluşumunun azaldığı görülürken, girilemeyen yerlerde ise ürün oluşumunun çok olduğu görülür.

transkripsiyon (RT) reaksiyonu aşağıdaki gibi hazırlanmıştır: 4  $\mu$ L 5x RT buffer, 1.6  $\mu$ L 0.1 M DTT, 0.4  $\mu$ L RNasin, 1  $\mu$ L Hexamer (altılı) random primer (50 ng/ $\mu$ L), 8  $\mu$ L dNTP ve 1  $\mu$ L MMLV (Moloney murine Leukemia Virus) Revers Transkriptaz (200 U/ $\mu$ L) (Gibco BRL) enzimi ve hacmi 20  $\mu$ L'ye tamamlayıncaya kadar DEPC su karıştırıldı ve 42°C'de bir saat inkübe edildi. Sonra 50  $\mu$ L PCR reaksiyonu aşağıdaki gibi hazırlandı: 20  $\mu$ L RT reaksiyon karışımı, 5  $\mu$ L 10X Buffer, 10 pmols HIV 5' ve 3' primerleri ve 10 pmols of human  $\beta$ -actin 5' ve 3' primerleri ve 48.5  $\mu$ L'ye kadar DEPC su karıştırıldı ve beş dakika süresince 94°C'ye yerleştirildi. Numuneler daha sonra iki dakika buza kondu. Daha sonra her tübe 2  $\mu$ L dNTP ve 0.5  $\mu$ L Taq DNA polimeraz (Boehringer Mannheim) ilavesinden sonra PCR işlemi 94°C 1 dakika; 62°C 1 dakika; 72°C 1 dakika şartlarında 26 tur ve en sonunda da 72°C 10 da-

kika uzatma olarak hazırlandı. RT-PCR işleminde human  $\beta$ -actin bandları, internal kontrol olmak üzere çoğaltıldı (Şekil 2).

### Southern Blot Hibridizasyonu

10  $\mu$ L RT-PCR ürünü %0.8 agaroz jelde ayrıştırıldı ve kapiller blot yoluyla bir Hybond™-N naylon membrana (Amersham) transfer edildi. Membrana geçen RT-PCR ürünleri daha sonra bir Stratagene UV Stratalinker aracılığıyla membrana sabitleştirildi (crosslinkage). Membran bir hibridizasyon tüpüne yerleştirilerek prehibridizasyon için 6X SSC (sodyum klorür + sodyum sitrat solüsyonu), %7 SDS (sodyum dodesil sülfat) solüsyonunda 55°C'de iki saat döndürüldü. Daha sonra hem HIV hem de  $\beta$ -actin için probe olarak kullanılacak antisense oligonükleotidlerin 10 pmol'ü [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P]ATP ve T4 PNK (polinükleotid kinaz) (New England Biolabs) enzimi kullanılarak radyoaktif hale getirildi. Bu reaksiyon için 1  $\mu$ L (10 pmol) oligonükleotid, 1  $\mu$ L 10X T4 PNK buffer, 6.5  $\mu$ L DEPC su, 1  $\mu$ L [ $\gamma$ -<sup>32</sup>P ATP] ve 0.5  $\mu$ L T4 PNK karıştırıldı ve 37°C'de 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra reaksiyon karışımının tamamı (10  $\mu$ L) prehibridizasyon solüsyonuna ilave edildi ve membran ile problu hibridizasyon solüsyonunu içeren tüp 55°C'de gece boyunca döndürülerek hibridizasyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Membran daha sonra yıkanarak hem X-ray filme hem de kantitatif analiz yapabilmek için fosforlu görüntüleme ekranına (phosphoimager screen) tabi tutuldu. Daha sonra ImageQuant Tools software (Molecular Dynamics) ile analiz edildi. HIV probu "antisense ve RNaseH ile kesme reaksiyonu"nda kullanılan antisense oligonükleotidlerin birinden (AS 7518) ve human  $\beta$ -actin probu ise  $\beta$ -actin bandlarını elde etmek için yapılan PCR'de kullanılan 3' primer oligodan hazırlandı. Phosphoimager ile elde edilen HIV sinyal değerleri  $\beta$ -actin sinyal değerleri ile normalize edildi (normalizasyon).

### İstatistiksel Analiz

Bulguların istatistiksel analizi "SPSS 10.0 for Windows" programı kullanılarak yapıldı.

### BULGULAR

RNA molekülleri tek zincirli ve dinamik oldukları için sürekli katlanmakta ve şekil değiştirmektedir. Bu yüzden ribozimlerin girip bağlanabileceği ve etkisini gösterebileceği yerleri bulmak zordur. 9.7 kb gibi genomu çok büyük ve üstelik sürekli değişen HIV gibi RNA virüsleri söz konusu olduğunda bu durum oldukça güçleşir. Girilebilirlik, bilinmeyen pek çok faktörün etkili olduğu ve bugün için henüz çözümlenememiş bir problemidir.

Ancak yine de ribozim ve antisense (DNA/RNA) moleküllerin hedef RNA'ya girebilecekleri yerleri tayin etme konusunda bazı in vitro teknikler mevcuttur. Bunlar;

1. Mfold gibi bilgisayar RNA katlanma programları<sup>[19]</sup>,

2. Nükleaz S1, "lead acetate", imidazol, DMS (dimetil sülfat) ve CMCT (1-cyclohexyl-3-(2-morpholinoethyl) carbodiimide metho-p-toluenesulfonate) gibi RNA'nın tek zincirli olduğu yerlerde RNA ile reaksiyona giren spesifik proplar<sup>[20]</sup>,

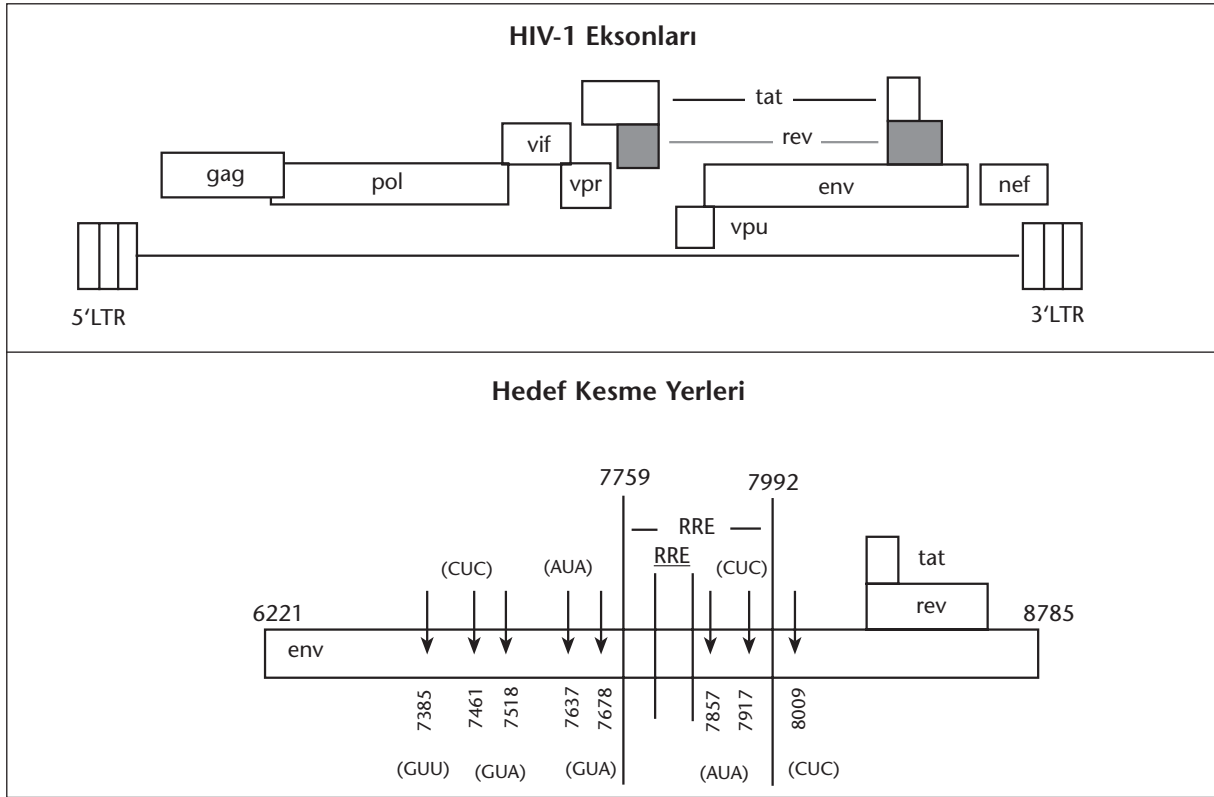
3. Antisense oligodeoksiribonükleotidler (AS ODNs) ve AS ODN kütüphaneler ile RNaseH kesme reaksiyonlarının kullanılması<sup>[21]</sup>,

4. Ribozim kütüphanelerinin kullanılması<sup>[22,23]</sup>. Şimdiye kadar yapılan çalışmalar göstermiştir ki, son iki teknik en etkili ve doğru sonuçlar veren tekniklerdir. Ribozim kütüphaneleri antisense oligolara göre çok daha doğru neticeler vermesine rağmen hem çok daha pahalı hem de çok daha zor uygulanabilir olmalarından dolayı bu çalışmada "antisense oligodeoksiribonükleotidler (AS ODNs) ve RNaseH ile kesme reaksiyonu" tekniği kullanıldı.

Bu anlamda, HIV-1 4-3 suşunun *env* genindeki 7250 ile 8131. nükleotidler arası bölgeyi "belli bir yere hedefli antisense ve RNaseH enzimi ile RNA'yı kesme" tekniği ile araştırdık (Şekil 2). Bu amaçla 881 nt'lik bu bölgede "National Institute of Health (NIH) Human Retroviruses ve AIDS 1990" veri tabanından faydalanarak buranın geneli içinde korunmuş (en az değişken) yerlerden sekiz olası yeri "hedef kesme yerleri" olarak seçtik (Şekil 3).

Materyal ve Metod bölümünde açıklandığı şekilde HIV-1 ile infekte CEM T-lenfositlerinden hazırlanmış hücre ekstratlarında yapıldı. Şekil 4'teki sonuçlar iki farklı zamanda hazırlanmış hücre ekstratlarıyla yapılmış dokuz ayrı deneyden elde edilmiştir. Bir deney triplet şeklinde yani her kesme yeri için aynı anda üç örnek hazırlanarak yapılmıştır (data gösterilmemiştir).

RT-PCR ürünlerin "southern" hibridizasyonunu takiben radyoaktif bandlar "Molecular Dynamics Phosphorimager" kullanılarak görsel hale getirilmiş ve kantitatif olarak analiz edilmiştir. Bu çalışma, HIV-1 *env* RNA'sının söz konusu kısmını ribozimlere giriş yeri açısından tarayan ilk çalışmadır. Sonuçlarımız 7386 (AS1), 7462 (AS2), 7518 (AS3), 7637 (AS4) ve 7678 (AS5) no'lu yerlerin "hammerhead" ribozimlerce kesme yapmak için en girilebilir yerler olduğunu göstermektedir (Şekil 5). İki tarafı



Şekil 3. HIV-1 haritası ve hedef kesme yerleri.

(Şekildeki üst panel "NIH Human Retroviruses and AIDS 1990" veri tabanından alınmıştır)

Kodlayan bölgeler hakkındaki kısa bilgi aşağıdaki gibidir:

LTR: "Long terminal repeat". Selüler transkripsiyon faktörlerini içerir.

tat: HIV *Tat* proteininin HIV transkripsiyonunu transaktif etmek üzere bağlandığı "target" nükleotid dizisi. Transkripsiyon başlangıç yerinden 50 nükleotid aşağıda lokalizedir.

Gag: HIV nükleokapsid, "core" ve matriks proteinlerini kodlayan gen.

Pol: İçerisinde proteaz, revers transkriptaz ve endonükleaz/integraz proteinlerini kodlayan genleri de içeren polimeraz polipeptid gen.

Vif: Viral yayılma hızını belirleyen viral maturasyon ve infektivite faktörü.

Vpr: Nükleusta lokalize ve viral maturasyonda rol oynayan gen.

Tat: Nükleus ve nükleolusta lokalize ve tipik olarak HIV transkripsiyonunu transaktif edici ve HIV replikasyonunda rol oynayan *Tat* regülatuar proteinini kodlayan gen.

Rev: Nükleus ve nükleolusta lokalize ve HIV *env* RNA'sında bulunan RRE (Rev responsive element)'ye bağlanarak strüktürel protein sentezini kolaylaştıran *Rev* proteinini kodlayan gen.

Vpu: Viral maturasyon ve CD4 downregülasyonunda rol oynayan sitoplazmik protein.

*Env*: CD4 reseptörlerine bağlanma ve membran füzyonunda rol oynayan gp120 ve gp41 membran glikoproteinlerini kodlayan gen.

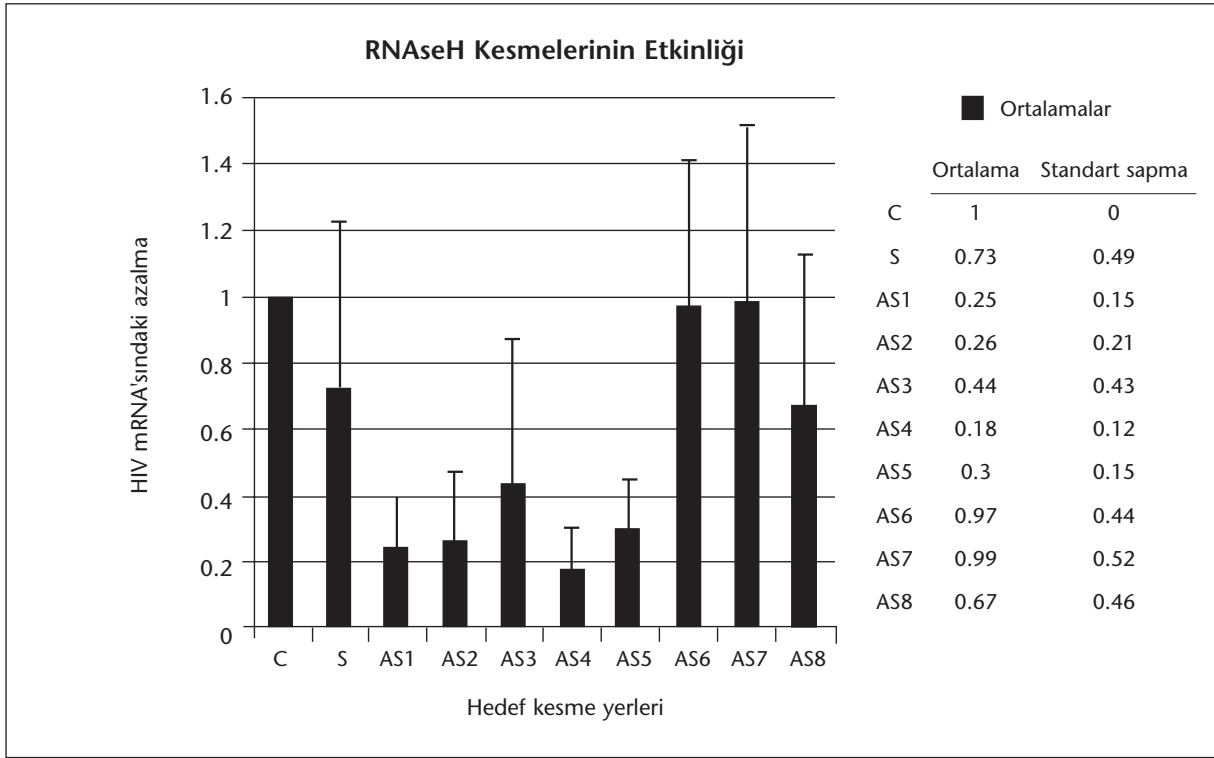
Nef: Sitoplazmada lokalize bu proteinin fonksiyonu tam bilinmemektedir. Fakat CD4 downregülasyonu ile ilgili ve aksesuar proteinlerin en immünojenliği olduğu kesindir.

Student's t-testi ile yapılan analizler sonucu bu yerlerin her birinde HIV mRNA'sında meydana gelen azalma istatistiksel olarak anlamlıydı ( $p < 0.01$ ). Şekil 4'teki değerlerle 7386 (AS1) no'lu yer 7678 (AS5) no'lu yere göre daha girilebilir olmasına rağmen 7678'e göre daha az korunmuş (nükleotidleri daha değişken) olduğu için ikinci uygun yer olarak 7678 seçildi. Bu bulgularımıza göre 7637, 7678 ve

7918 no'lu yerler, ribozimlerin girebildiği yerler açısından sırasıyla en uygun, orta derecede uygun ve en az uygun (negatif kontrol olarak) yerler olarak saptandı (Şekil 4).

### TARTIŞMA

HIV hala AIDS'in ilerlemesinde santral bir rol oynamaktadır. Bu yüzden etkili ve uzun vadeli antiviral



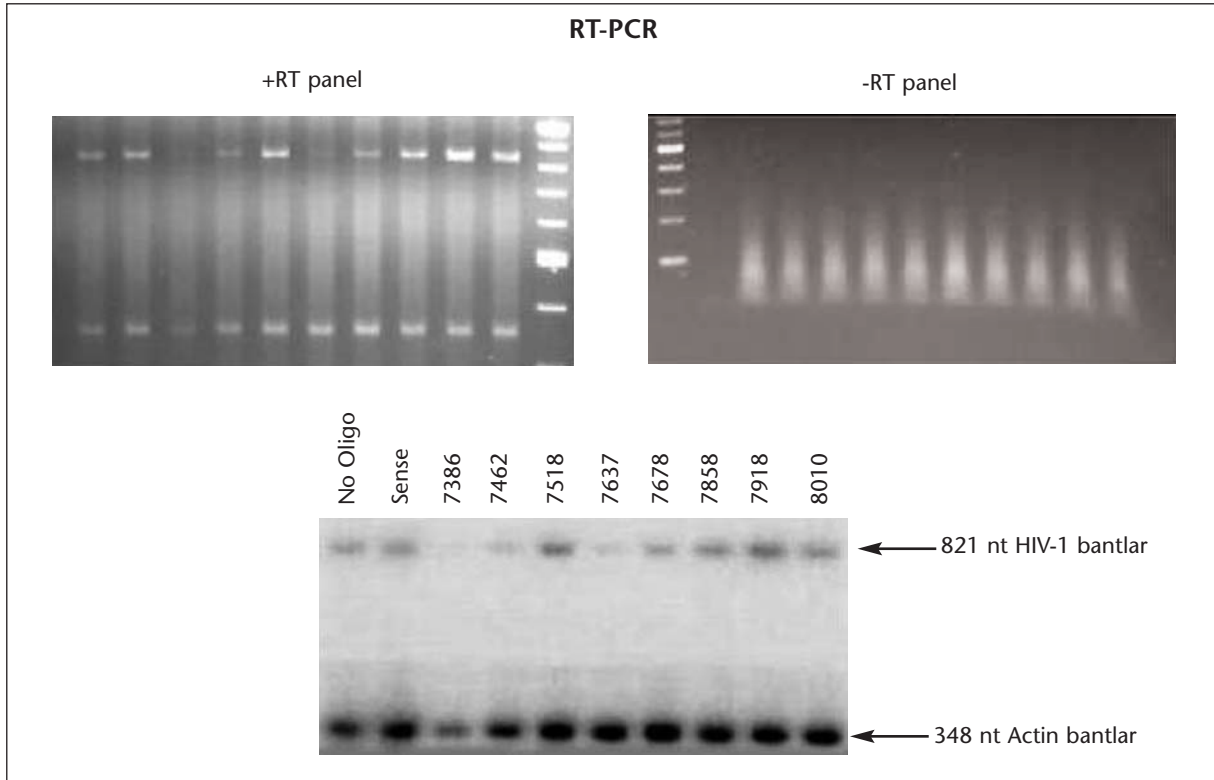
**Şekil 4.** Antisense oligo ve RNaseH aracılığıyla olan kesme reaksiyonlarının karşılaştırılması ve normalizasyon sonrası RT-PCR ürünlerinin analizi.

Şekil, antisense oligo ve RNaseH aracılığıyla HIV-1 mRNA'da oluşan azalmaların istatistiksel analizini göstermektedir. İki taraflı Student's t-testi ile yapılan analizler, HIV-1 mRNA'da anlamlı azalmaların AS1 (7386), AS2 (7462), AS3 (7518), AS4 (7637) ve AS5 (7678) ile meydana geldiğini göstermektedir. Bu dört yerin her birindeki p değeri 0.01'den azdı ( $p < 0.01$ ).

bir tedavinin geliştirilmesi gerçeği tekrar güncellik kazanmıştır. Bütün genler RNA aracılığıyla eksprese edildiği ve HIV da bir RNA virüsü olduğu için ribozimler kullanan anti-HIV gen tedavisi AIDS tedavisi için olası bir seçenek haline gelmiştir.

HIV genomunun en değişken yerlerinden biri HIV *env* genidir. Bundan dolayıdır ki, şimdiye kadar etkili bir aşı geliştirilememiştir. Bu durumda ribozimlerle neden *env* geni hedeflenmelidir? Öncelikle, HIV virüsünün hedef hücrelerin yüzey reseptörlerine bağlanmasında rol oynayan HIV gp120 ve gp41 proteinleri, HIV'in *env* geninden geliştikleri için HIV enfeksiyonu *env* geninin ekspresyonuna bağlıdır. Bu yüzden ribozimlerle *env* mRNA'sını seçici bir şekilde tahrip ederek envelop proteinlerinin yapılması dolayısıyla HIV enfeksiyonu baskılanabilir. Bu bağlamda Chen ve arkadaşları *env* genini korunmuş yerlerinden kesen anti-*env* ribozimlerin, HIV replikasyonunu etkili bir şekilde baskıladığını gösterdiler<sup>[24]</sup>. Benzer şekilde Ramezani ve arkadaşları da HIV enfeksiyonuna karşı anti-*env* ribozimlerinin, anti-*gag*, anti-*proteaz*, anti-*reverse transkriptaz* ve anti-*tat* ribozimlerine göre 15 gün daha fazla koruma sağladığını gözlemlədiler<sup>[25]</sup>. Fakat her iki grubun çalıştıkları kesme yerleri bu çalışmada kullanılan yerlerin proksimalinde (öncesinde) yer almaktaydı. Bu yüzden bu çalışmamız 7250 ile 8131. nükleotidler arasındaki bölgeyi ribozimlerle kesme açısından tarayan ilk çalışmadır. Bundan sonra atılacak adım, tespit edilen bu girilebilir yerlerden HIV-1 *env* RNA'sını kesen ribozimler hazırlamak ve onları hücrelere göndererek HIV ile karşılaştırmak için bir retroviral veya pol III vektöre klonlamaktır.

Önceki çalışmalar göstermiştir ki, ribozimler human T-lenfositlerinde virüs replikasyonunu önlemede etkili olabilirler<sup>[7,26-29]</sup>. Bununla birlikte viral replikasyonun yüksek oranda olması, tedavilerden kaçabilen mutantların (escape mutant) varlığı hala anti-HIV gen tedavisinde büyük problemlerdir. Ribozimlerin antiviral gücünü arttırmak ve aynı zamanda mutantların tedaviden kaçma şansını azaltmak için Yamada ve arkadaşları ribozim genlerine başka antiviral genleri ilave etme olasılığını araştırmışlardır<sup>[30]</sup>. HIV RBE'yi (Rev binding element, HIV Rev prote-



Şekil 5. RT-PCR ve "southern" hibridizasyonu.

Şekil, dokuz RT-PCR deneyinden birinin +RT ve -RT agaroz jel resimleri ile +RT agaroz jel için yapılmış "southern" hibridizasyon resmini göstermektedir. +RT; revers transkripsiyon reaksiyonu boyunca revers transkriptaz enziminin var olduğunu, -RT ise bulunmadığını belirtmektedir. "Southern" hibridizasyon kantitatif analiz yapabilmek için yapılmış olup, sonuçta 7637 nolu yer, ribozimlerin girebildiği en uygun yer olarak ortaya çıkmıştır.

ininin bağlandığı nükleotid dizisi) bir "hairpin" ribozime bağladıklarında "hairpin ribozim + RBE" birleşik molekülünün antiviral etkisinin sadece ribozimlere göre anlamlı bir şekilde arttığını buldular. Browning ve arkadaşları ise ribozimlere HIV TAR dizisini (HIV *Tat* proteininin bağlandığı nükleotid dizisi) bağladıklarında aynı şekilde HIV replikasyonunun anlamlı biçimde baskılandığını gözlemlediler<sup>[31]</sup>. İlave edilen bu RBE ve TAR nükleotid dizilerinin etkisi yem veya tuzak mekanizmasına dayanmaktadır. Normal HIV replikasyonunda rol oynayan *Rev* ve *Tat* proteinlerinin replikasyon sürecinde seyredirken karşılıklarına çıkan terapötik genlere ilave edilmiş tuzak sun'i nükleotitlere bağlanması onları normal replikasyon yollarından alıkoymakta ve etkinliklerinin azalmasına neden olmaktadır. Benzer şekilde, girilebilir yerler olarak bulduğumuz 7637 ve 7876 no'lu yerlerden HIV-1 RNA'yı kesen ribozimlere RBE veya TAR tuzak nükleotitleri eklenebilir ve sadece ribozimlerle birlikte ribozim + RBE veya ribozim + TAR füzyon (birleşik) moleküllerinin HIV replikasyonunu

baskılamaları karşılaştırılabilir. Bunun için de öncelikle test edilecek ribozimlerin ve ribozim + RBE veya TAR birleşik moleküllerinin pMND gibi bir retroviral vektör veya U6 + 27 gibi bir pol III vektöre yerleştirilmesi gerekir. Bundan sonra yapılacak işlem HIV virüsünü içeren infekte hücrelere (T-lenfositler gibi) terapötik genleri içeren vektörleri transfer ederek "HIV challenging assay" yapmak ve bu şekilde terapötik genlerin anti-HIV kapasitelerini test etmektir.

**TEŞEKKÜR:** HIV-1 ile infekte T-lenfositlerden hücre ekstratlarını hazırlayan postdoc'lar Dr. Laurence CAGNON, Dr. Ingrid BAHNER ve Dr. Gerhard BAUER'e çok teşekkür ederiz. Bu çalışma Dr. John J. ROSSI'ye verilen "National Institute of Health (NIH)" grantı ile desteklenmiştir.

Ayrıca, makalenin hazırlanmasında dil ve teknik konulardaki yardımlarından dolayı Dr. Gülserap YILDIZ, Dr. Hayrullah KÖSE, Dr. Filiz ERGİN ve Ecz. İsmet YILDIZ'a da ayrıca teşekkür ederiz.



**KAYNAKLAR**

1. Kruger K, Grabowski P, Zaug A, Sands J, Gottschling D, Cech T. Autoexcision and autocyclization of the ribosomal RNA intervening sequence of Tetrahymena. *Cell* 1982;31:147-57.
2. Guerrier-Takada C, Gardiner K, Marsh T, Pace N, Altman S. The RNA moiety of ribonuclease P is the catalytic subunit of the enzyme. *Cell* 1983;35:849-57.
3. Castanotto D, Rossi J, Deshler J. Biological and functional aspects of catalytic RNAs. *Critical Revs. In Eukaryotic Gene Expression* 1992;2:331-57.
4. Ruffner DE, Stormo GD, Uhlenbeck OC. Sequence requirements of the hammerhead RNA self-cleavage reaction. *Biochemistry* 1990;29:10695-702.
5. Hsieh SY, Taylor J. Delta virus as a vector for the delivery of biologically-active RNAs: Possibly a ribozyme specific for chronic hepatitis B virus infection. *Adv Exp Med Biol* 1992;312:125-8.
6. Netter HJ, Hsieh SY, Lazinski D, Taylor J. Modified HDV as a vector for the delivery of biologically-active RNAs. *Prog Clin Biol Res* 1993;382:373-6.
7. Sarver N, Cantin EM, Chang PS, et al. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 1990;247:1222-5.
8. Zhou C, Bahner IC, Larson GP, Zaia JA, Rossi JJ, Kohn EB. Inhibition of HIV-1 in human T-lymphocytes by retrovirally transduced anti-tat and rev hammerhead ribozymes. *Gene* 1994;149:33-9.
9. Lorentzen EU, Wieland U, Kuhn JE, Braun RW. In vitro cleavage of HIV-1 vif RNA by a synthetic ribozyme. *Virus Genes* 1991;5:17-23.
10. Sioud M, Drlica K. Prevention of human immunodeficiency virus type 1 integrase expression in *Escherichia coli* by a ribozyme. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7303-7.
11. Weerasinghe M, Liem SE, Asad S, Read SE, Joshi S. Resistance to human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) infection in human CD4+ lymphocyte-derived cell lines conferred by using retroviral vectors expressing an HIV-1 RNA-specific ribozyme. *J Virol* 1991;65:5531-4.
12. Tone T, Kashani-Sabet M, Funato T, et al. Suppression of EJ cells tumorigenicity. *In Vivo* 1993;7:471-6.
13. Kashani-Sabet M, Funato T, Tone T, et al. Reversal of the malignant phenotype by an anti-ras ribozyme. *Antisense Res Dev* 1992;2:3-15.
14. Wright L, Wilson S, Milliken S, Biggs J, Kearney P. Ribozyme-mediated cleavage of the bcr-abl transcript expressed in chronic myeloid leukemia. *Exp Hematol* 1993;21:1714-8.
15. Shore S, Nabissa PM, Reddy E. Ribozyme-mediated cleavage of the BCRABL oncogene transcript: In vitro cleavage of RNA and in vivo loss of P210 protein-kinase activity. *Oncogene* 1993;8:3183-8.
16. Weil PA, Segall J, Harris B, Ng SY, Roeder RG. Faithful transcription of eukaryotic genes by RNA polymerase III in systems reconstituted with purified DNA templates. *J Biol Chem* 1979;254:6163-73.
17. Wu GJ. *J Biol Chem* 1980;255:251-8.
18. Goldstein S, Engle R, Olmsted RA, Hirsch VM, Johnson PR. Detection of SIV antigens by HIV-1 antigen capture immunoassays. *J Acq Immune Defic Syndr* 1990;3:98-102.
19. Zuker M. Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:303-10.
20. Campbell TB, McDonald CK, Hagen M. The effect of structure in a long target RNA on ribozyme cleavage efficiency. *Nucleic Acids Res* 1997;25:4985-93.
21. Scherr M, Rossi JJ. Rapid determination and quantitation of the accessibility to native RNAs by antisense oligodeoxynucleotides in murine cell extracts. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5079-85.
22. Pierce ML, Ruffner DE. Construction of a directed hammerhead ribozyme library: Towards the identification of optimal target sites for antisense-mediated gene inhibition. *Nucleic Acids Res* 1998;26:5093-101.
23. Lieber A, Strauss M. Selection of efficient cleavage sites in target RNAs by using a ribozyme expression library. *Mol Cell Biol* 1995;15:540-51.
24. Chen CJ, Banerjee AC, Harmison GG, Haglund K, Schubert M. Multitarget-ribozyme directed to cleave at up to nine highly conserved HIV-1 env RNA regions inhibits HIV-1 replication--potential effectiveness against most presently sequenced HIV-1 isolates. *Nucleic Acids Res* 1992;20:4581-9.
25. Ramezani A, Joshi S. Comparative analysis of five highly conserved target sites within the HIV-1 RNA for their susceptibility to hammerhead ribozyme-mediated cleavage in vitro and in vivo. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1996;6:229-35.
26. Michienzi A, Cagnon L, Bahner I, Rossi JJ. Ribozyme-mediated inhibition of HIV-1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *PNAS* 2000;97:8955-60.
27. Westaway SK, Cagnon L, Chang Z, et al. Virion encapsidation of tRNA<sup>Lys</sup>-Ribozyme chimeric RNAs inhibit HIV infection. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998;8: 185-97.
28. Yamada O, Kraus G, Leavitt MC, Yu M, Wong-Staal F. Activity and cleavage site specificity of an anti-HIV-1 hairpin ribozyme in human T cells. *Virology* 1994;205: 121-6.
29. Yu M, Ojwang J, Yamada O, et al. A hairpin ribozyme inhibits expression of diverse strains of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci USA* 1993;90:6340-4.
30. Yamada O, Kraus G, Luznik L, Yu M, Wong-Staal F. A chimeric human deficiency virus type 1 (HIV-1) minimal Rev response element-ribozyme molecule exhibits dual antiviral function and inhibits cell-cell transmission of HIV-1. *J Virol* 1996;70:1596-601.
31. Browning C, Cagnon L, Good P, Rossi J, Engelke D, Markowitz D. Potent inhibition of human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) gene expression and virus production by an HIV-2 tat activation response RNA decoy. *J Virol* 1999;73:5191-5.

**Yazışma Adresi:**

Dr. Yüksel YILDIZ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Fizyoloji Anabilim Dalı

AYDIN

e-mail: yyildiz2000@hotmail.com

Makalenin Geliş Tarihi: 30.01.2003

Kabul Tarihi: 08.07.2003