
Hammerhead Ribozim ve HIV RNA'ların Rev Multimerizasyonu ile Co-Lokalizasyonu

Yüksel YILDIZ*,**, John J. ROSSI***

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

** Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi, Fizyoloji Anabilim Dalı, AYDIN

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

ÖZET

Hammerhead ribozimlerin (RNA enzimleri) terapötik amaçla uygulanabilmeleri için, istenilen hedefle bağlanmaları şarttır. İnsan immünyetmezlik virüsü (HIV) enfeksiyonu, virüsün *env* geninin ekspresyonuna bağlıdır. HIV Rev proteini; virüsün *env* RNA'sında bulunan karmaşık yapı "Rev Binding Element (RBE)"e bağlanır. Ribozimleri kullanan anti-HIV gen tedavisinde; HIV mRNA'sı ile anti-HIV ribozim moleküllerinin birbirlerine bağlanma (co-lokalizasyon) olasılığını arttırmak için aşağıdaki yöntem önerilmiştir: Orjinal HIV RBE nükleotid dizisi ribozim molekülüne eklendiğinde, Rev protein monomerlerinin hem HIV genomundaki hem de ribozim + RBE füzyon molekülündeki RBE'lere eşzamanlı bağlanmaları ve müteakip multimerizasyonları ile HIV RNA ve terapötik anti-HIV ribozim RNA'ların birbirlerine bağlanma olasılığı artırılabilir. Bu anlamda Yamada ve arkadaşları, HIV RBE molekülünü, HIV-I RNA'sını U5 bölgesinden kesen bir Hairpin ribozime birleştirdiler. "Sadece ribozim ve ribozim + RBE füzyon molekülü" ile yaptıkları karşılaştırmalı in vivo çalışmalarında, füzyon molekülüyle antiviral aktivitede ribozime göre önemli bir artış elde ettiler. Fakat yukarıdaki fikrin çalıştığını gösteren herhangi bir in vitro bulgu rapor etmediler. Bu çalışmamızda, in vitro olarak, Rev proteini aracılığıyla terapötik ribozim ve HIV RNA'ların biraraya gelip gelmediğini araştırdık. Bu amaçla HIV *env* geninin, HIV enfeksiyonunun yayılmasında önemli rol oynayan gp120 ve gp41 proteinlerini doğuran kısımda, ribozimlerin bağlanabileceği en uygun yeri saptadıktan sonra buradan HIV RNA'sını kesen bir Hammerhead ribozim hazırladık ve ona 3' ucundan HIV-I RBE molekülü ekledik. Rev bağlama ve "gel shift retardation assay"lerini kullanarak Rev multimer köprüsü ile, içerisinde HIV ve ribozim RNA'ları ile Rev proteini ve RBE moleküllerini (hem füzyon RNA hem de HIV genomundaki) içeren ribonükleoprotein (RNP) komplekslerinin oluşup oluşmadığını test ettik. Sonuçlarımız, Rev protein monomerlerinin, HIV genomundaki ve füzyon molekülündeki RBE'lere eşzamanlı bağlanma ve müteakip multimerizasyonlarıyla HIV ve ribozim RNA'larını biraraya getirebileceğini ve bu yöntemin ribozimlerin antiviral etkisini arttırmada etkin bir rol oynayabileceğini göstermektedir.

Anahtar Kelimeler: RNA, Hammerhead ribozim, HIV, Rev proteini

SUMMARY

Co-Localization of Hammerhead Ribozymes and HIV RNA's by Rev Multimerization

To effectively apply Hammerhead ribozymes as therapeutic agents it is necessary to co-localize them with the desired target. Human immunodeficiency virus type-I (HIV-I) infectivity is dependent on *env* gene expression. HIV-I Rev protein binds to a higher ordered RNA structure within the *env* transcript termed the Rev Binding Element (RBE). In anti-HIV gene therapy employing ribozymes to increase the co-localization of

anti-HIV ribozymes with target HIV mRNAs, it has been proposed that when the native HIV-I RBE is appended to a ribozyme as a decoy molecule, simultaneous binding of Rev monomers to the RBE sequences in both HIV-I genome and in the ribozyme-RBE fusion molecule and their subsequent multimerization may serve to increase the co-localization of ribozyme with HIV-I mRNA. In this respect, Yamada et al. have combined the native HIV-I RBE sequence with a Hairpin ribozyme targeted to the U5 region of HIV-I. Their data have demonstrated a substantial enhancement of antiviral activity in vivo when both RBE and ribozyme were present in comparison to either one alone. But their studies never demonstrated co-localization in vitro. In this study we have tested the concept of Rev mediated co-localization in vitro. After detection of the most accessible sites for Hammerhead ribozymes targeting a region of the HIV-I *env* gene encoding gp120 and gp41 proteins, we designed anti-*env* Hammerhead ribozymes against these sites and fused them with the native HIV-I RBE sequences. Using Rev binding and gel shift retardation assays we have tested whether or not RNP complexes which include Rev, the RBE, ribozyme and the HIV-I mRNA are formed as a result of Rev multimerization. Our results here demonstrate that simultaneous binding of Rev monomers to the RBE sequences in both HIV-I genome and in the fusion molecule and their subsequent multimerization can co-localize ribozyme and target RNAs and that this method can be effective in the enhancement of ribozyme's antiviral activity.

Key Words: RNA, Hammerhead ribozyme, HIV, Rev protein

Ribozimler bağlandıkları hedef RNA'larda fosfodiester bağlarını çok spesifik olarak kesebilen RNA molekülleridir^[1]. Hücre içinde ekspres edildiklerinde, gerek hücreye yeni girmiş gerekse de hücre içinde yeni yapılmış RNA'ları kesmek suretiyle insan immünyetmezlik virüsü (HIV) replikasyon sürecindeki pre ve post-integrasyon olaylarına müdahale edebilirler^[2].

HIV hayat siklusunun erken dönemlerinde sentez edilen HIV Rev proteini, kısmi "splicing (RNA'daki intronların uzaklaştırılması)"e uğramış veya hiç uğramamış HIV RNA'larında bulunan "Rev Response Element (RRE)"e bağlanarak HIV yapısal genlerinin (*gag*, *pol*, *env*) ekspresyonunu kontrol eder ve bu genlerin nükleus dışına taşınmalarını ve sitoplazma içinde kullanılmalarını kolaylaştırır^[3-5].

Bağlanmak için en uygun yeri bulma (accessibility) ve hedefe bağlanabilme (co-lokalizasyon) ribozim çalışmalarında aşılması gereken en öncelikli adımlardır. Her ikisi de ribozim ve hedef RNA'ların nükleotid dizi sıralanmalarına, sekonder yapılarına (katlanmalarına) ve RNA-protein interaksyonlarına çok sıkı bağlıdır.

Önceki çalışmalar, ribozim/hedef RNA co-lokalizasyonundaki bir artışın ribozimlerin hedef RNA'yı tahrip etmesinde de bir artışa neden olduğunu göstermiştir^[6,7]. Ribozimleri kullanan anti-HIV gen tedavisinde; HIV mRNA'sı ile anti-HIV ribozim moleküllerinin birbirlerine bağlanma (co-lokalizasyon) olasılığını arttırmak için aşağıdaki yöntem önerilmiştir: Orjinal HIV "Rev Binding Element (RBE)" nükleotid dizisi (RRE içinde HIV Rev proteininin bağlandığı asıl kısım, RBE) ribozim molekülüne birleştirildiğin-

de, Rev protein monomerlerinin hem HIV genomundaki hem de füzyon molekülündeki RBE'lere aynı anda bağlanmaları ve bunu izleyen multimerizasyonları ile HIV ve ribozim RNA'ların birbirlerine bağlanma olasılığı artırılabilir. Bu anlamda Yamada ve arkadaşları, HIV RBE molekülünü; HIV-1 RNA'sını U5 bölgesinden kesen Hairpin ribozime bağladıklarında, füzyon molekülünün antiviral etkisinin sadece ribozime göre anlamlı bir şekilde arttığını buldular^[8]. Fakat yukarıdaki fikrin gerçekleştiğini gösteren herhangi bir in vitro bulgu rapor etmediler.

Yamada ve arkadaşları çalışmalarında "decoy (yem-tuzak)" molekül olarak RRE'nin hemen hemen yarısını kullanırken biz de, "Rev bağlamak için yeterli olabileceği ve çok büyük nükleotid dizisi daha başka proteinler için de bağlanma yeri oluşturabilir" olasılığıyla sadece HIV-1 RRE'nin RBE kısmını "decoy" olarak kullandık. Bu amaçla HIV RBE, "ribozimin bağlanabileceği en uygun yeri bulma" çalışmalarından sonra tespit edilen 7637 no'lu yer için hazırlanan Hammerhead ribozime ilave edildi^[9].

Buradaki çalışma Rev multimerizasyonu ile co-lokalizasyonunun meydana geldiğini in vitro olarak ispatlamaktadır. Ayrıca, bu olayın Rev bağlama kapasitesine sahip olmak şartıyla sadece ribozim molekülüyle de mümkün olabileceğini göstermektedir. Öyle ki, ribozim, füzyon molekülünden daha kuvvetli co-lokalizasyon göstermiştir (Şekil 4).

7637 ribozimle alınan sonuçlar, Rev multimer köprüsü ile co-lokalizasyondan başka, Rev bağlama kabiliyetli bir ribozimin in vivo şartlarda hedefine ulaşarak bağlanamasa bile en kötü olasılıkla "decoy" mekanizmayla yine hedef üzerinde bir inhibitör etki

gösterebileceğini ve dolayısıyla bu da ribozimlerin antisense ve kesme etkilerinden başka “decoy” etkilerinin de olabileceğini göstermektedir.

İki RNA molekülünü bir protein köprüsiyle (Rev multimer köprüsü) biraraya getirme konusunda çalışmamız bir ilki teşkil etmektedir (Şekil 1).

MATERYAL ve METOD

Ribozim ve Ribozim-RBE Füzyon RNA'larının Dizaynı ve Hazırlanması

HIV *env* RNA'sını 7637 no'lu nükleotidden kesen ribozim molekülü hem normal (wild tip-wt) hem de mutasyonlu (mutant-mt) olarak hazırlandı ve füzyon molekülünü hazırlamak için HIV-1 RBE dizisi her iki tip ribozime eklendi. Bir ucunda Xho I ve diğerinde Mlu I “sınırlayıcı enzim kesme yerleri”ni içeren füzyon molekülü, pBS-SK II plazmid vektörü (Stratagen) içine klonlandı. Ekspresyon seviyesini arttırmak amacıyla ribozim ve füzyon genleri, Xho I ve Mlu I yerleri kullanılarak daha sonra Pol III ve Retroviral vektör gibi birçok ekspresyon vektörüne yerleştirilebilir.

5' uçlarında BamHI ve EcoRI “sınırlayıcı enzim kesme yerleri”ni içeren ve 3' uçlarında 10-12 nükle-

otidle birbirlerini antiparalel olarak tamamlayan “ribozim oligonükleotidleri”nin nükleotid dizisi aşağıdaki gibidir:

7637-5' oligo: 5'-CGGGATCCCGAGGAGGC-GATTCGTCCTCACGGACTCA-3'

7637-3' oligo: 5'-CGGAATTCGGTTGTCCCTCACTGATGAGTCCGTGAGGA-3'

(ribozimin mutantını hazırlamak için 3' oligoda altı çizili G nükleotidi A ile değiştirilmiştir.)

“Ribozim-RBE füzyon RNA”yı hazırlamak için kullanılan 5' ve 3' primerler aşağıdaki gibidir:

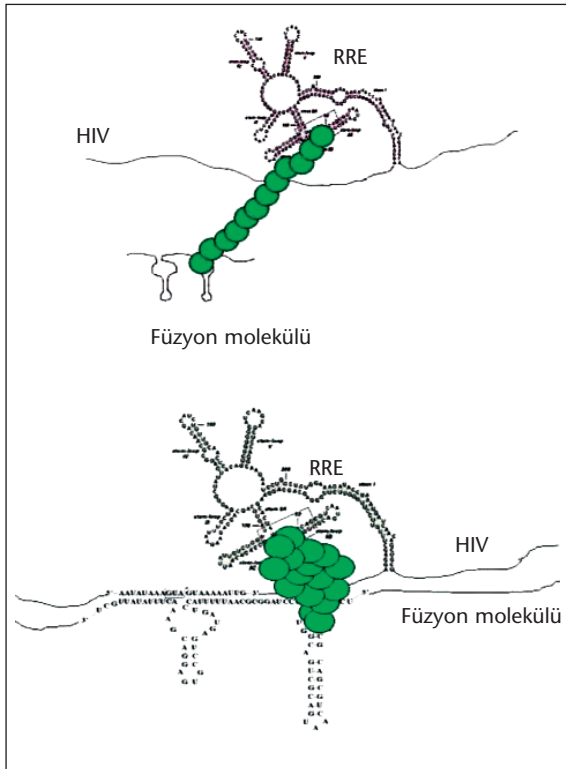
5' RBE oligo (57 nt): 5'-GCTCTAGAGCCTC-GAGTGGGCGCAGCGTCAATGACGCTGACG GTACACGGGATCCCG-3'

(altı çizili nükleotidler XbaI, XhoI ve BamHI yerlerini, koyu harfler ise wt RBE nükleotid dizisini göstermektedir.)

3' RBE oligo (26 nt): 5'-GGGGTACCCACGC-GTCGGAATTCCG-3'

(altı çizili nükleotidler KpnI, MluI ve EcoRI yerlerini göstermektedir.)

Ribozim moleküllerini elde etmek için 5' ve 3' ribozim oligoları, 50 µL polimeraz zincir reaksiyonu (PCR)'nda aşağıdaki gibi çoğaltıldı: Numune tüpüne ayrı ayrı 100 pmol (picomol) 5' ve 3' ribozim oligosu, 5 µL 10X polimeraz tampon solüsyonu (buffer) (NEB, New England Biolab) [100 mM KCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8.8), 100 mM (NH₄)₂SO₄, 20 mM MgSO₄, %0.1 Triton X-100], 4 µL dNTP (2.5 mM) ve 1 µL Vent DNA polimeraz (200 U/µL) (NEB) ve 50 µL'yi tamamlayıncaya kadar DEPC su (%0.1 di-etil-pirokarbonat ile sterilize edilmiş distile su) kondu. PCR, hot start tekniği kullanılarak 94°C'de üç dakika; 94°C'de bir dakika, 55°C'de bir dakika, 72°C'de bir dakika; 72°C'de on dakika şartlarında beş siklus olarak gerçekleştirildi. Ribozimleri içeren PCR bantlarının agaroz jelden izolasyonundan sonra, füzyon moleküllerini elde etmek için ikinci bir PCR aşağıdaki gibi yapıldı: 1-2 µL ilk PCR ürünü (bu miktar konsantrasyona bağlı olarak azalabilir veya çoğalabilir), ayrı ayrı 100 pmol 5' ve 3' RBE oligosu, 5 µL 10X polimeraz tampon solüsyonu (NEB), 4 µL dNTP (2.5 mM) ve 1 µL Vent DNA polimeraz (200 U/µL) (NEB) ve 50 µL'yi tamamlayıncaya kadar DEPC su PCR tüpüne kondu. PCR, birinci PCR şartlarıyla aynı şartlarda ve 20 siklus olarak yapıldı, agaroz jelde elektroforezden sonra füzyon molekülünü içeren PCR ürünleri jelden izole edildi. Ribozim ve füzyon genlerini pBS-SK II plazmidine yerleştir-



Şekil 1. HIV ve füzyon RNA'ların Rev multimer köprüsü ile biraraya getirilebileceğini ileri süren hipotezin temsili gösterimi.

mek (klonlamak) için, son PCR ürünü (insert) ve pBS-SK II plazmidi (vektör) XbaI ve KpnI sınırlayıcı enzimleriyle kesildikten sonra, 20 µL'lik bir ligasyon (bağlama) reaksiyonu 1:10 vektör/insert oranı ve T4 DNA ligaz (Promega) enzimi ile 16°C'de gece boyunca gerçekleştirildi. İçerisinde klonlanmış füzyon genlerini içeren plazmid çoğaltılıp bol miktarda elde edildikten sonra -80°C'de saklandı.

RNA/Protein Bağlama Çalışmaları ("Protein Binding" ve "Gel Retardation Assays")

Protein bağlama çalışmaları bazı değişikliklerle Brice ve arkadaşları tarafından tanımlanmış protokole göre yapıldı^[10]. Bağlama reaksiyonları silikonize Eppendorf tüplerinde 20 µL'de ve oda sıcaklığında yapıldı. Her numune şunları içeriyordu: 8 µL %2.5 Triton-100X (SIGMA); 1-4 µL RNA (HIV, ribozim, füzyon RNA'larından biri) (protokol gereği arzu edilen RNA konsantrasyonu bu hacim aralığında olmalı); 0.5 µL (20 units) RNasin (Promega); Rev proteini (arzu edilen miktar arzu edilen volümde) ve 20 µL'ye kadar bağlama reaksiyonu solüsyonu (binding buffer) [50 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 2 mg/mL "Bovine Serum Albumin (BSA)"] (protokol gereği minimum hacim 5.5 µL olmalı). "National Institute of Health (NIH)"den elde edilen Rev proteininin orjinal konsantrasyonu 2 µg/µL idi ve bu konsantrasyon, dilüsyon solüsyonu [500 mM NaCl, 10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 1 mM DTT, 2 mg/mL BSA] kullanılarak arzu edilen konsantrasyona ayarlandı.

a. Rev proteininin RNA'ya bağlanması:

Öncelikle RNA ve Rev proteini hariç diğer bütün reaksiyon elemanları silikonize eppendorf tüpüne konduktan sonra, ayrı bir tüpte bulunan RNA'nın (HIV, ribozim, füzyon ve tRNA'lardan biri) gerekli miktarı, 85°C'de dört dakika ısıtılarak ve buzda beş dakika soğutulularak denatüre ve renatüre edildi. Daha sonra, önce RNA sonra da gerekli miktarı ile Rev proteini çok yavaş ve dikkatli bir şekilde reaksiyon solüsyonuna ilave edildi. 37°C'de 20 dakika inkübasyondan sonra her tüpe 5 µL yükleme (loading) solüsyonu (%25 gliserol, %0.25 bromofenol blue, %0.25 ksilen siyanol) eklendi. Numuneler %3.5 nativ (non-denaturing) poliakrilamid jele (29:1; 10 cm x 15 cm x 1.5 mm) yüklendi ve 4°C'de 0.5X TBE (0.4M Tris-HCl, pH 8.0, 0.4M borik asit ve 0.012M EDTA, pH 8.3) solüsyonunda ve 20 mA sabit akımda elektroforez edildi. Bütün Rev bağlama deneylerinde jeller daima numuneler yüklenmeksizin bir saat boş olarak prerun edildi.

b. Rev bağlı iki ayrı RNA'nın aynı tüpte birleştirilmesi: Birbirinden bağımsız 20 µL'lik iki bağlama reaksiyonu yukarıdaki gibi gerçekleştirildi. 37°C'de 20 dakika inkübasyondan sonra, iki tüpün birisindeki materyalin tamamı yavaş ve çok dikkatli bir şekilde alınarak diğer tüpteki materyalle yine yavaş ve çok dikkatli bir şekilde karıştırıldı. 37°C'de 30 dakika daha inkübasyondan sonra üzerine 10 µL yükleme solüsyonu eklendi. Karışımın yarısı (25 µL) %3.5 nativ poliakrilamid jele (29:1; 10 cm x 15 cm x 1.5 mm) yüklendikten sonra 4°C'de 0.5X TBE solüsyonunda ve 15 mA sabit akımda run edildi.

HIV, ribozim ve füzyon RNA'ların Rev bağlama-sının spesifik olup olmadığını anlamak için kullanılan spesifik ve nonspesifik kompetitörler, yarışacağı RNA ile aynı şartlara tabi tutularak reaksiyona ilave edildiler. Tabii ki bütün kompetisyon deneylerinde 20 µL'lik bağlama reaksiyonu, tüm reaksiyon elemanları ile beraber kompetitörlerin işgal edeceği hacim de dikkate alınarak hazırlandı. Nonspesifik kompetitör olarak kullanılan tRNA, bütün deneylerde daima nonradyoaktif. Bütün kompetitörler bağlama reaksiyonu solüsyonuna, yarıştıkları RNA'nın konmasından hemen sonra ilave edildi. Reaksiyona eklenen son eleman daima Rev proteiniydi.

Kompütür RNA Katlanma (folding) Programı (Mfold)

İn vitro transkripsiyon reaksiyonundan sonra elde edilen, hem deneyler hem de kompütür katlanma programında kullanılan ribozim ve füzyon moleküllerinin nükleotid dizileri aşağıdaki gibidir:

Füzyon Molekülü

5'gcuuaacccauggggugcgcagccuuaaggcaacagggagugacuacucaggcacuccugcuuagcggaggugcccuagggcacauggcagucgcaguaacugcgacgcggugagcu 3'

Ribozim Molekülü

5'gcuuaacccauggggugcgcagccuuaaggcaacagggagugacuacucaggcacuccugcuuagcggaggugcccuag 3'

Ribozim ve füzyon RNA'larının kompütür tahminli katlanma ve bükülme profilleri Dr. Michael Zuker tarafından geliştirilen ve bir RNA/DNA katlanma programı olan Mfold (3.1)'dan elde edilmiştir (<http://bioinfo.math.rpi.edu/~zukerm/rna/>)^[11].

İn Vitro Transkripsiyon Reaksiyonu

Ribozimin bağlanıp keseceği hedef (substrat) RNA'yı elde etmek için, HIV-1 NL4-3 env geninin 7250 (Nhe I)-8131 (Hind III) nükleotidler arasındaki RRE'yi içeren 881 nt'lik kısmı, pBS-KS II vektörünün (Stratagene) Sma I ve Hind III yerleri arasına klonlan-

di. Hedef (substrat) RNA'yı elde etmek için, pBS-KS II-881 plazmid DNA'sı Hind III ile kesildikten sonra Qiaquick PCR pürifikasyon kiti ile temizlendi.

Ribozim ve füzyon RNA moleküllerini elde edebilmek için ise füzyon genini içeren pBS-KS II-7637 plazmid DNA'sı ayrı ayrı BamHI ve XhoI sınırlayıcı enzimleriyle kesilerek lineer hale getirildi ve sonra Qiaquick PCR pürifikasyon kiti ile temizlendi.

Nonradyoaktif (cold) in vitro transkripsiyon reaksiyonu: Reaksiyon tüpüne, 500-1000 ng template (kalıp) DNA; 2 µL 10X NEB RNA polimeraz tampon solüsyonu [400 mM Tris-HCl (pH 7.9), 60 mM MgCl₂, 20 mM spermidine, 100 mM dithiothreitol]; 1 µL NTP karışımı (her biri 10 mM olan ATP, CTP, GTP ve UTP); 1 µL 0.1 M DTT (dithiothreitol); 1 µL RNasin (40 U/µL); 1 µL T7 veya T3 RNA polimeraz enzimi (NEB, 50 U/µL) ve 20 µL'ye kadar DEPC su konarak 37°C'de iki saat inkübe edildi.

Radyoaktif (hot) in vitro transkripsiyon reaksiyonu: İçinde minimum 500-1000 ng template DNA; 2 µL 10X NEB RNA polimeraz tampon solüsyonu; 2 µL 100 mM DTT; 2 µL AGC karışımı (her biri 10 mM olan ATP, GTP, CTP); 3.125 µL 0.8 mM cold UTP; 2 µL α³²P-UTP (3000 Ci/mmol); 1.5 µL T7 RNA polimeraz enzimi ve 20 µL'ye kadar DEPC su içeren reaksiyon tüpü 37°C'de iki saat inkübe edildikten sonra 1 µL DNase I ilave edilerek 37°C'de 15 dakika daha inkübe edildi.

In vitro transkripsiyon reaksiyonlarından sonra hot ve cold RNA transkriptleri, substrat RNA'yı elde etmek için %5, ribozim ve füzyon RNA'ları elde etmek için ise %15 "denaturing" poliakrilamid jellerde elektroforez edildi ve beklenen nükleotid sayısına karşılık gelen bandlar jelden kesilip alınarak bir eppendorf tüpünde ezildi ve üzerine 350 µL elüsyon solüsyonu (0.5 M NH₄OAc, 1 mM EDTA, %0.2 SDS) eklendi ve oda sıcaklığında gece boyu (12-16 saat) sallanılarak RNA'ların jelden çıkması sağlandı. Daha sonra RNA içeren elüsyon solüsyonu bir Costar Spin-X santrifüj tüpüne alınarak bir mikrosantrifüjde maksimum hızda (14.000 g) üç dakika santrifüj edildi. Buradan elde edilen süpernatanta 1 µL glikojen (Boehringer Mannheim), mevcut olan hacmin 1/10'u kadar 3M NH₄OAc ve 2.5 katı kadar da %95'lik soğuk etanol eklendi ve 20 dakika 80°C'de bekletildikten sonra 4°C'de 20 dakika maksimum hızda santrifüj edildi. Daha sonra elde edilen pellet iki defa %70'lik soğuk etanolla yıkandıktan sonra 22 µL DEPC suda süspanse edildi. Daha sonra 1 µL'lik kü-

çük hacimlerle, RNA'ların konsantrasyon ve radyoaktifite ölçümleri yapıldı.

BULGULAR

1. Rev Proteininin Radyoaktif HIV RNA'ya Bağlanması

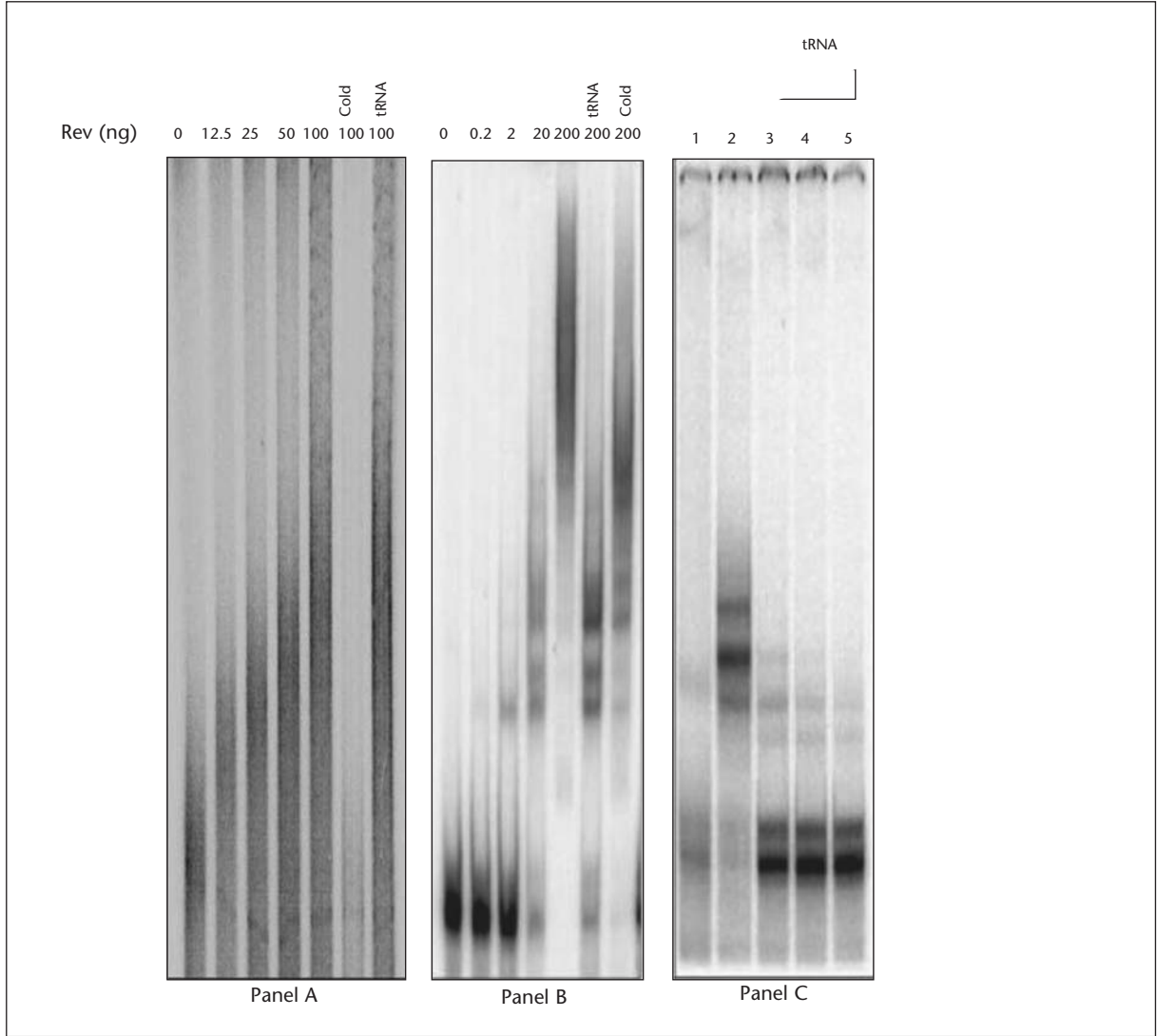
Rev bağlanma/bağlama deneyleri (Rev binding assays) bazı değişikliklerle beraber Brice ve arkadaşları tarafından belirlenen protokole göre yapıldı^[10]. Protein bağlama sonucu jelde gözlemlenen jel shift'ler (bandların yukarıya çıkışı) Rev protein konsantrasyonuna bağlıydı (Şekil 2 Panel A). Rev'in radyoaktif HIV RNA'ya bağlanmasının spesifik olup olmadığını göstermek için kompetisyon deneyleri, konsantrasyonları radyoaktif HIV RNA'sından 100 kat fazla olan (3 µM) nonradyoaktif (cold) HIV RNA [spesifik kompetitör (negatif kontrol)] ve *Escherichia coli* tRNA'sı (nonspesifik kompetitör) kullanılarak yapıldı. Şekil 2 Panel A'nın son iki hattında görüldüğü gibi Rev'in hedef HIV RNA'ya bağlanması spesifik.

2. Rev Proteininin Radyoaktif Ribozim ve Füzyon Moleküllerine Bağlanması

Şekil 3 Panel A, ribozim ve füzyon moleküllerinin hiçbir kompetitör bulunmadığı durumdaki Rev bağlama şekillerini göstermektedir. Bu deneyde kullanılan radyoaktif ribozim ve füzyon moleküllerinin konsantrasyonu 500 nM iken, Rev proteininin konsantrasyonu 100 ng'dır.

Şekil 2 Panel B ve C ise radyoaktif füzyon molekülünün Rev proteinini bağlayışının spesifik olup olmadığını anlamak amacıyla kompetitör varlığında yapılmış Rev bağlama deneylerini göstermektedir. Bu deneyler Rev'in HIV RNA'ya bağlanması deneyindeki aynı şartlarla yapıldı. Radyoaktif füzyon RNA konsantrasyonu, Panel B'deki deneyde 40 nM iken, Panel C'de 500 nM idi. Panel B'de spesifik kompetitör olarak kullanılan nonradyoaktif (cold) füzyon RNA'nın konsantrasyonu 800 nM (20 kat) iken, nonspesifik kompetitör olarak kullanılan *E. coli* tRNA konsantrasyonu 4 µM (100 kat) idi. Panel C'de ise nonspesifik kompetitör *E. coli* tRNA miktarı, 12.5 µM (25 kat); 25 µM (50 kat) ve 50 µM (100 kat) olarak üç farklı konsantrasyonda idi (hat 3, 4 ve 5).

Rev proteininin radyoaktif füzyon molekülüne bağlanması nonspesifik kompetitör *E. coli* tRNA'nın farklı konsantrasyonlarının hepsiyle inhibe olduğu için (Şekil 2 Panel C hat 3, 4 ve 5), Rev proteininin radyoaktif füzyon molekülüne bağlanması spesifik olarak gözükmemektedir.



Şekil 2. Panel A, Rev proteininin 933 nt'lik radyoaktif HIV RNA'ya bağlanması ile nonradyoaktif (cold) HIV RNA ve *Escherichia coli* tRNA ile olan kompetisyon deneylerini göstermektedir. Bantların gözlemlenen yukarıya çıkışı Rev konsantrasyonuna bağlıdır. Nonradyoaktif HIV RNA spesifik kompetitör, *E. coli* tRNA ise nonspesifik kompetitör olarak kullanılmıştır.

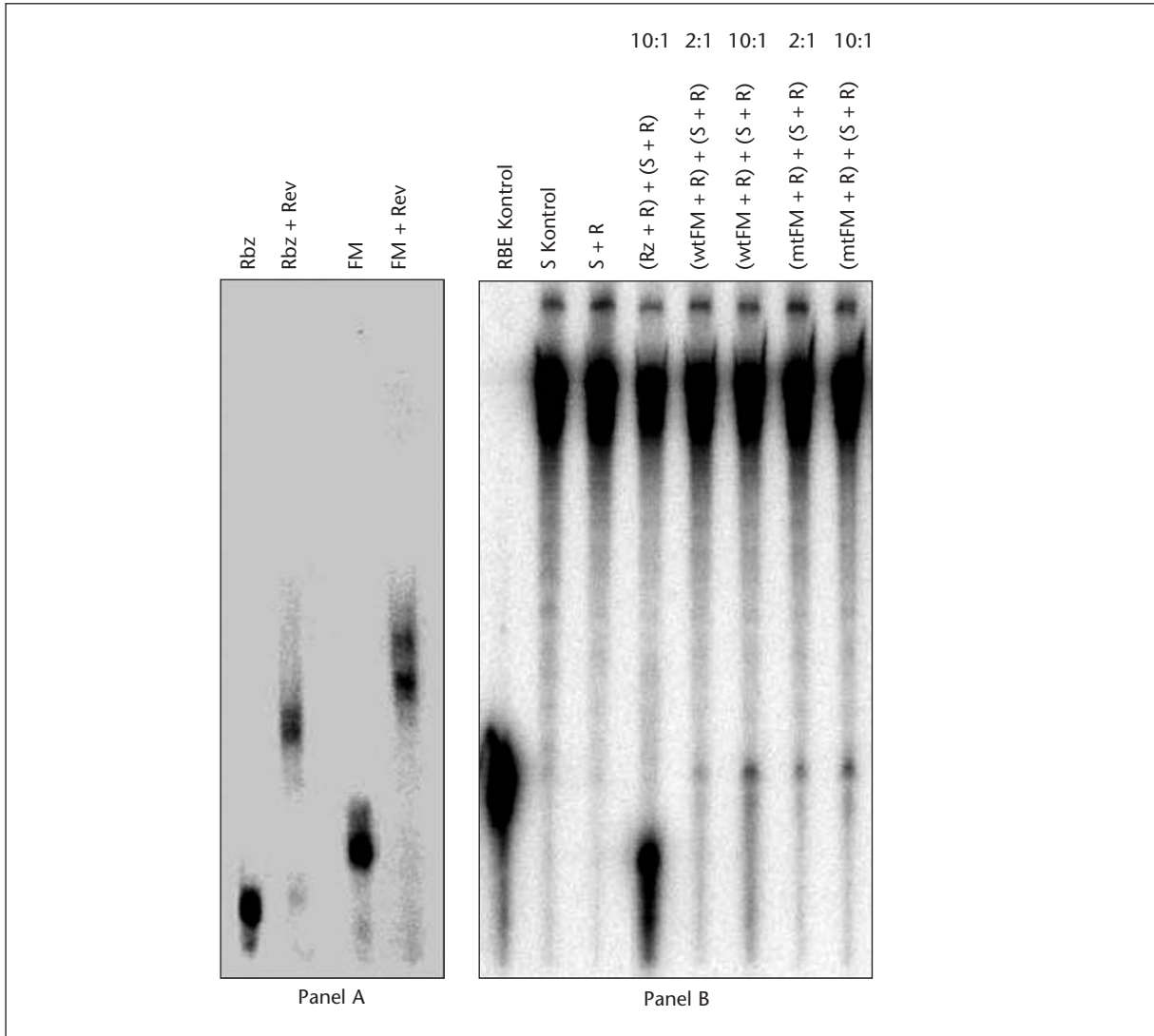
Panel B ve C ise Rev'in radyoaktif füzyon molekülüne bağlanması ile bunun spesifik ve nonspesifik kompetitörler varlığındaki değişimlerini göstermektedir (Panel B'de her iki kompetitör varken, Panel C'de ise sadece tRNA vardır). Panel C'de hat 1, 2 ve 3-5 sırasıyla şu şekildedir: Sadece radyoaktif füzyon RNA; füzyon RNA + Rev; füzyon RNA + Rev + farklı konsantrasyonlardaki tRNA'lar (sırasıyla 25, 50 ve 100 kat fazla)

3. Füzyon Molekülünün Substrat HIV RNA ile Rev Multimer Köprüsü Vasıtasıyla Co-Lokalizasyonu

Füzyon molekülünün HIV RNA ile Rev multimer köprüsü vasıtasıyla co-lokalizasyonunu gösterebilmek için 933 nt HIV RNA özellikle nonradyoaktif, ribozim ve füzyon RNA'lar ise özellikle radyoaktif olarak hazırlandıktan sonra, önce HIV, ribozim ve füzyon RNA'lara Rev proteininin ayrı ayrı bağlanması sağlandı (hot-cold metot). Daha sonra bu Rev

bağlı RNA'lar, HIV + füzyon ve HIV + ribozim kombinasyonları şeklinde "Materyal ve Metod" bölümünde belirtildiği gibi birleştirildi. Şekil 4 Panel A'da 790 nM nonradyoaktif HIV RNA ve 1380 nM radyoaktif füzyon RNA (1:1.7 oranı) kullanılırken deneyler, Rev ve BSA (negatif kontrol) proteinleri varlığında ve hiç proteinsiz olarak gerçekleştirildi.

Şekil 4 Panel A'da marker hattı hariç soldan 3. ve 4. hatlar ile Panel B'de 2. ve 3. hatlar hipotez



Şekil 3. Panel A, ribozim ve füzyon RNA moleküllerinin hiçbir kompetitör bulunmadığı durumdaki Rev bağlama şekillerini göstermektedir.

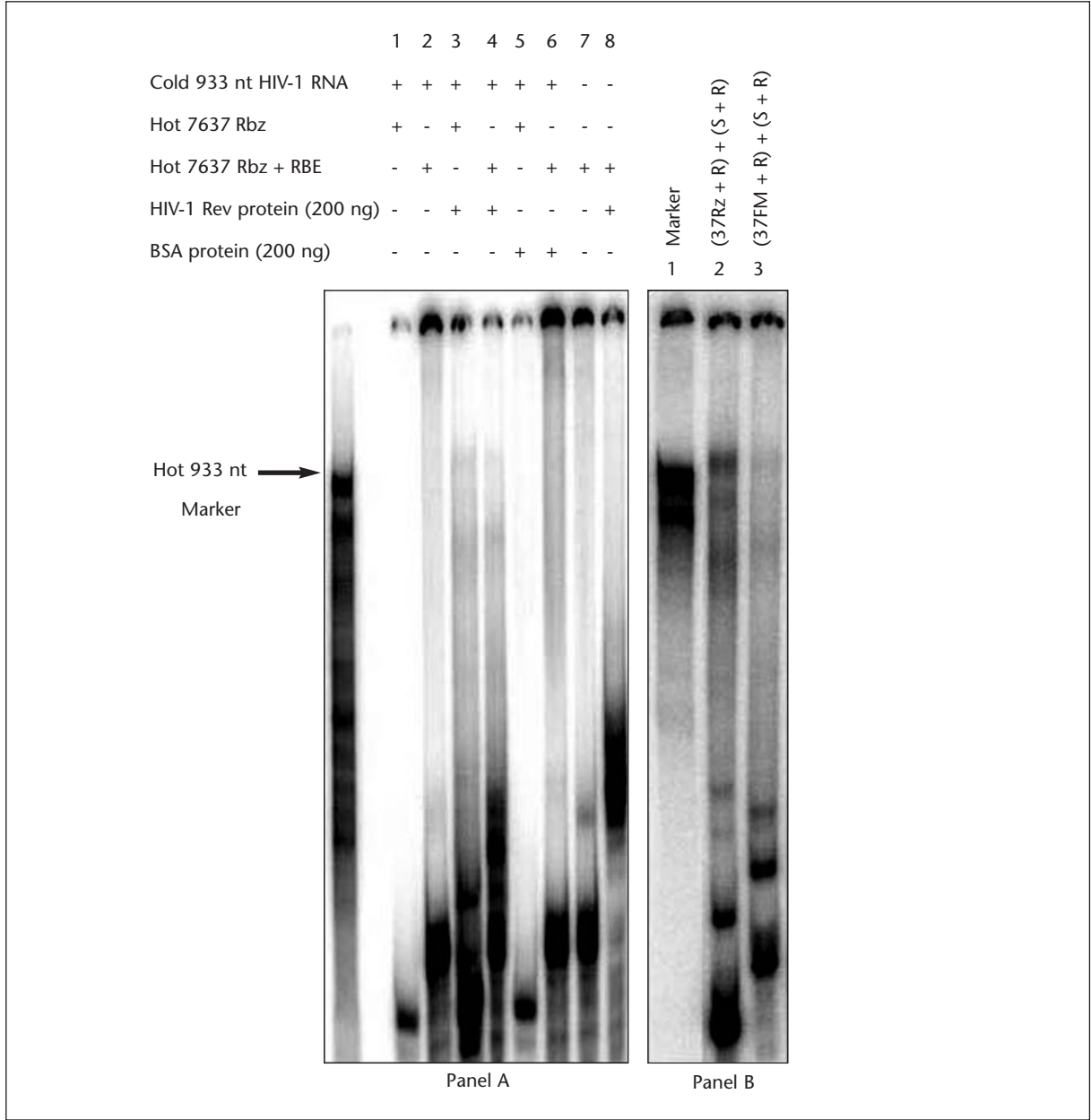
Panel B ise hepsi radyoaktif olan HIV, ribozim ve füzyon RNA'larla yapılmış Rev multimerizasyonu ile co-lokalizasyon deneyini göstermektedir (all-hot metot). Kompleks oluşumuna karşılık gelen bantlar jelden kesilip alındıktan ve içindeki RNA'lar jelden izole edildikten sonra, kompleks bileşenlerini görmek için tekrar %5 "denaturing" poliakrilamid jelde elektroforez edilmiştir. S Kontrol: 933 nt radyoaktif HIV RNA (substrate), R: Rev protein, wtFM: Wild tip (normal) füzyon molekülü, mtFM: Mutant füzyon molekülü, RBE Kontrol: 119 nt'lik füzyon RNA'sı (ribozim + RBE). Panel B'nin son 5 hattındaki aşağıdaki bantlar, Rev multimeri aracılığıyla HIV RNA'ya bağlanmış ribozim (4. hat) ve füzyon RNA'ları göstermektedir (5-8. hatlar).

edilen ve içerisinde HIV RNA, füzyon RNA ve köprü görevi yapan Rev monomerlerini içeren kompleks oluşumunu göstermektedir. Fakat ilginçtir ki, kendisinden böyle bir aktivite beklenmeyen ribozim de bu co-lokalizasyonu gösterdiği gibi, üstelik bu aktivitesi füzyon molekülünden daha kuvvetlidir. 933 nt seviyesinde yukarıya çıkan bantların ribozim hatında füzyon RNA hattındakinden daha kuvvetli ve net olması şu nedenlere bağlı olabilir:

- Ribozimin tek başına Rev proteine olan afinitesi, füzyon molekülünden daha fazladır.

- Ribozim molekülü (80 nt) füzyon molekülünden (119 nt) daha kısa olduğu için Rev multimer köprüsü ile füzyon molekülünden daha fazla ribozim molekülü taşınabilir ve bundan dolayı jelde ribozimle daha kuvvetli shift bandı görülebilir.

Her ne kadar Şekil 2 Panel B ve C'deki özgüllük deneylerinde Rev'in füzyon RNA'ya bağlanması,



Şekil 4. Radyoaktif ribozim, radyoaktif füzyon RNA ve nonradyoaktif HIV RNA (933 nt) ile Rev bağlama deneyleri (cold-hot metot).

Panel A'da marker hattı hariç soldan 3. ve 4. hatlar ile Panel B'de 2. ve 3. hatlarda 933 nt hizasındaki bantlar hipotez edilen kompleks oluşumunu göstermektedir. Rz + R: Ribozim + Rev proteini, S + R: Substrat (non-radyoaktif 933 nt HIV RNA) + Rev proteini, 37Rz: 7637 wt ribozim, 37FM: 7637 wt füzyon molekülü, Marker: Radyoaktif 933 nt HIV RNA (jelde koşma sırasında ribozim ve füzyon RNA'larla birlikte görünmeyen 933 nt nonradyoaktif HIV RNA'nın aynı zaman diliminde varacağı yeri anlamak için referans olarak kullanılan nonradyoaktif HIV RNA'nın radyoaktif).

spesifik olarak gözükmemesine rağmen Şekil 4 Panel A'da diğer hatlarda (hat 1, 2, 5, 6, 7 ve 8) yukarıya çıkan bantların görülmemesi Rev'in hem HIV RNA hem de füzyon RNA'ya spesifik olarak bağlandığını gösterir. Şekil 4 Panel B'deki deney Panel

A'dakiyle tamamen aynı şekilde yapılmış olup tek fark HIV/füzyon RNA oranının 1:1.7 yerine 1:1 (870 nM:870 nM) olmasıdır.

Rev multimerizasyonu ile co-lokalizasyon deneyleri ayrıca RNA'ların hepsi (ribozim, füzyon ve HIV)

radioaktif iken de yapıldı (all-hot metot). Rev proteinini her biri radioaktif olan HIV, ribozim ve füzyon RNA'lara ayrı ayrı bağlayıp HIV + ribozim ve HIV + füzyon kombinasyonları şeklinde birleştirdikten ve 37°C'de 30 dakika inkübe ettikten sonra numuneler %3.5 nativ (nondenaturing) poliakrilamid jelde elektroforez edildi. Kompleks oluşumunu gösteren bantlar jelden kesildi (data gösterilmemiştir) ve gece boyu sallamak suretiyle RNA'lar elüsyon solüsyonunda jelden çıkarıldı. Fenol-kloroformla ekstraksiyon ve alkolle presipitasyon işlemlerinden sonra izole edilen RNA'lar %5 "denaturing" poliakrilamid jelde elektroforez edildi. Şekil 3 Panel B'de alt taraftaki bantlar, Rev multimeri aracılığıyla HIV RNA ile biraraya gelmiş ribozim ve füzyon RNA'larını göstermektedir. Füzyon/HIV RNA oranı 2:1'den 10:1'e arttırıldığı zaman HIV RNA ile biraraya gelen füzyon RNA miktarında bir artış görülmektedir (Şekil 3 Panel B'de 6. ve 8. hatlar). All-hot metotla görülen bu sonuçlar, Şekil 4'teki cold-hot metotla görülen co-lokalizasyon sonuçlarını doğrulamaktadır.

TARTIŞMA

Önceki çalışmalar, insan T-lenfositlerinde HIV replikasyonunu inhibe etmede ribozimlerin etkili olabileceğini göstermiştir^[1,16-19]. 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 araştırdılar. HIV RBE'yi bir Hairpin ribozime bağladıklarında füzyon molekülünün antiviral etkisinin sadece ribozime göre anlamlı bir şekilde arttığını buldular.

Bu çalışmada, Yamada ve arkadaşlarının önerdiği ve denediği kombine yaklaşımı yani her ikisi de RBE içeren Hammerhead ribozim ve HIV RNA'ların bir Rev multimer köprüsü aracılığıyla biraraya getirilip getirilemeyeceğini in vitro olarak test etmek istedik^[8]. Bu amaçla öncelikle, HIV, füzyon ve ribozim RNA'ların ayrı ayrı Rev bağlama kapasitelerini ve özgüllüklerini ölçtük. Bu deneylerde HIV Rev proteinini, 933 nt HIV RNA'ya çok spesifik olarak bağlanırken, füzyon molekülüne bağlanması spesifik değildi. Çünkü Şekil 2 Panel B ve C'de görüldüğü gibi nonspesifik kompetitör *E. coli* tRNA, Rev'i bağlamada füzyon molekülüyle etkili bir şekilde yarışmaktadır. Bunun sebebi şunlar olabilir: HIV RNA (933 nt) ve tRNA (80 nt) arasında büyüklük ve sekonder yapı açısından önemli fark varken, ribozim (40 nt), füzyon

yon molekülü (119 nt) ve tRNA (80 nt) arasında büyüklük ve sekonder yapı açısından önemli fark yoktur. Bu noktada sonuçlarımız, Daly ve arkadaşlarının "ortak ve nonspesifik tanıma motifleri antisense RNA ve tRNA gibi birçok katlanmış RNA'larda mevcut olabilir" şeklindeki açıklamalarını desteklemektedir^[20,21]. Ayrıca, Hemmerich ve arkadaşları insan ribozomal proteini L7'nin L7 mRNA'ya spesifik olarak bağlanırken, rRNA ve poly(A)-rich mRNA'ya da spesifik olarak bağlandığını rapor etmişlerdir^[22]. Bütün bunlar çoğunlukla nonspesifik kompetitör olarak kullanılan tRNA, rRNA ve bazı RNA homopolimerlerinin bazen spesifik kompetitör de olabileceklerini göstermektedir.

İlginçtir ki, *E. coli* tRNA'nın A kutusu (Şekil 5) purin bazlarından zengin olmasıyla HIV RBE'nin Rev bağlamada çok kritik rol oynayan GUA-GG loop bölgesine (Şekil 5'te yeşil çizgiyle gösterilen nükleotidler ile onları içeren loop) çok benzemektedir. Ve yine ilginç olarak Lee ve arkadaşları, tRNA-RRE füzyon molekülünün CEM SS hücrelerinde HIV replikasyonunu %90'dan daha fazla inhibe ettiğini göstermişlerdir^[23].

Rev, argininden zengin motife sahip RNA bağlayan proteinlerden biridir^[24,25]. Daha evvel, Helene, Porschke ve Seeman ve arkadaşları, argininlerin guanin nükleotidlerine yüksek afiniteyle bağlandıklarını göstermişlerdir^[26-28]. Bu, Rev proteininin in vivo birçok nonspesifik bağlanma yerleri arasından nasıl oluyorsa RRE'yi spesifik olarak seçebildiğini açıkladığı gibi, deneylerimizde Rev'in neden guaninden zengin tRNA'ya da spesifik ve kuvvetli olarak bağlandığını da açıklar. Argininlerin guaninler için yüksek afiniteye sahip olmasından dolayı, herhangi bir RNA'nın Rev bağlama kapasitesinin olup olmadığını anlamak için o RNA'nın guanin içeriğine bakmak bir fikir verebilir. Bu anlamda ribozim ve füzyon moleküllerini içermiş oldukları guanin sayısı (indeksi) açısından incelediğimizde füzyon molekülünün 40/119 (0.3361) iken, ribozim molekülünün 25/80 (0.3125) idi. Bu haliyle ribozim ve füzyon molekülüleri guanin indeksi olarak yakın değere sahip olmasına rağmen yine de üstünlük füzyon molekülü lehinedir.

RNA bağlayan proteinler bağlandıkları RNA'da hem nükleotid dizisi hem de sekonder yapıyı tanıyabilirler. HIV Tat ve Rev proteinlerinin RNA'yı tanımlarındaki ortak bir özellik, normal bir A-form RNA'nın yapısında bir distorsiyonun (gevşeyip açılmanın, tek zincirli hale gelmenin) meydana gelmesidir. Green MR, Tat-TAR ve Rev-RRE Protein-RNA komplekslerinde, protein bağlamanın bulge (asimet-

rik şekilde genişlemiş tek zincirli bölge) ve/veya non Watson-Crik baz çiftleriyle genişletilmiş majör groove'larda gerçekleştiğini ileri sürmüştür^[29].

Ribozim ve füzyon moleküllerinin kompütür tahminli katlanma resimlerine baktığımızda aşağıdaki özellikleri görmekteyiz: İki tane internal loop ve bir bulge loop içeren ribozimin katlanma resminde, büyük internal loop iki tane G:A noncanonical (sıradışı) baz çiftleşmesi içerirken, küçük internal loop ve bulge loop sadece bir tane G:A noncanonical baz çiftleşmesi içermektedir (Şekil 5). Deneysel Rev bağlama sistemimizde, RNA'nın tanınması ve Rev monomerlerinin bağlanması için gerekli distorsiyonu ve majör groove oluşumunu sağlayan potansiyel yerler pürinden zengin bu üç loop olabilir.

Füzyon molekülünün katlanma resminde ise, ribozimin sekonder yapısının, ribozime RBE eklendikten sonra bile yine aynı kaldığını görmekteyiz (Şekil 5). Ayrıca, Rev'in spesifik olarak bağlanmasında rol oynayan RBE'nin pürinden zengin loop'undaki GUA ve GG nükleotidleri, füzyon molekülünün multibranch loop'unda (Şekil 5'te yeşil çizgilerle gösterilen) hala tek zincirli olma durumlarını korumaktadırlar.

Füzyon molekülünün Rev bağlama açısından bu güzel kapasitesine rağmen, Rev aracılığıyla HIV-füzyon molekülü co-lokalizasyonunun HIV-riboziminkine göre daha az olmasının (Şekil 4) sebepleri şunlar olabilir:

- Füzyon molekülünün multibranch loopu diğer looplardan büyük olduğu için bu loop füzyon RNA'da tersiyer bir yapı oluşmasına bu da Rev'in bazı yeni interaksiyonlar yaparak Rev'in füzyon RNA ile olan birçok bağlantılarının değişmesine neden olabilir.

- Oluşan Rev multimer köprüsünün moleküler büyüklükleri farklı iki RNA'yı taşıma kapasitesi çok kuvvetli olmayabilir. Moleküler ağırlık arttıkça Rev multimer köprüsünün taşıma kapasitesi yetersiz kalabilir.

Kompütür programıyla elde edilen ve RNA'ların sekonder yapılarını veren bu katlanma resimleri, in vitro sonuçlar için mantıklı açıklamalar verebilir. Fakat, literatürde RRE'nin katlanmalarını kullanan ve katlanma resimleri ile deneysel sonuçlar arasında çok yüksek korelasyonlara da sahip olan birçok çalışma olmasına rağmen, mutasyonel analizler yapmaksızın Rev'in ribozim ve füzyon moleküllerine farklı bağlanmasının, tamamen kompütür bulguları-

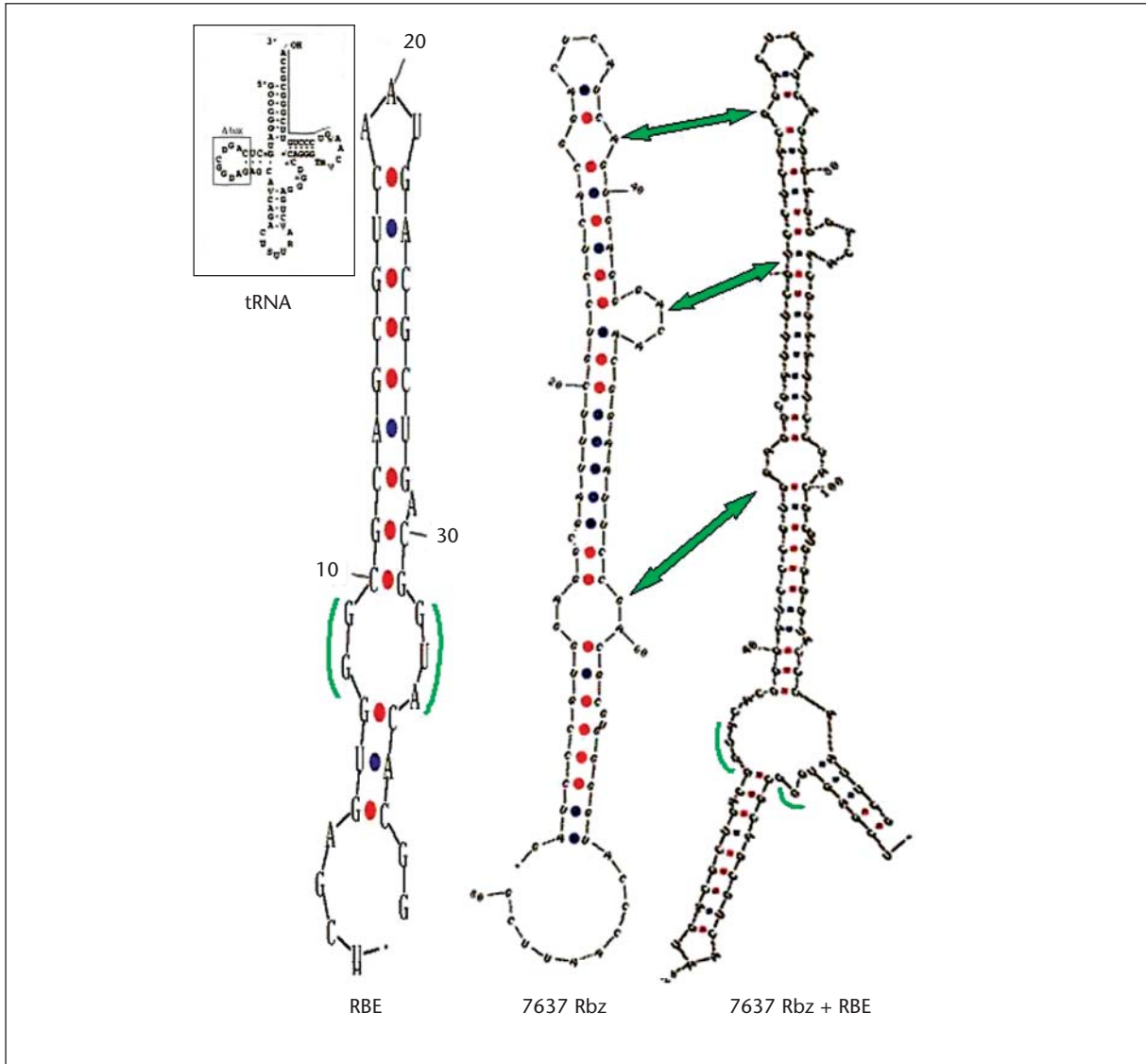
na dayanan yapısal belirleyicilere bağlı olduğu çok rahatlıkla söylenemez^[12-15].

HIV Rev ve Tat proteinlerinin yaşam döngüleri boyunca nükleolusta da lokalize oldukları gösterilmiştir^[30-35]. Michenzi ve arkadaşları bir Hammerhead ribozime RBE ilave ettiklerinde bu ribozimin nükleolusta toplandığını ve bu şekilde HIV replikasyonunda kuvvetli bir inhibisyon elde ettiklerini bildirdiler^[16]. Bu sonuçlarının ışığında HIV RNA, Rev, Tat ve diğer selüler faktörleri içeren bir ribonükleoprotein kompleksinin nükleolusta toplanabileceğini ve bu kompleksin HIV RNA'nın nükleustan sitoplazmaya taşınması ve daha sonra oradaki transkripsiyon ve paketlenmesi ile ilgili olabileceğini ileri sürdüler. Bu bilgi ışığında biz de, nükleolus içinden geçiş sırasında, Rev ve Tat multimerizasyonlarının direkt veya indirekt etkisiyle bütün bileşenlerin (Rev ve Tat proteinleri, HIV, ribozim ve füzyon RNA'lar) biraraya gelmesinin dolayısıyla ribonükleoprotein oluşumunun artabileceğini söyleyebiliriz. O yüzden in vitro deneylerimizde ribozim ve füzyon RNA'larla elde ettiğimiz zayıf ribonükleoprotein kompleks oluşumu, HIV, füzyon ve ribozim RNA'larının nükleolus içinden beraber geçişleri (co-trafficking) sırasında oldukça kuvvetli hale gelebilir (Şekil 4).

Yamada ve arkadaşlarının in vivo çalışmalarıyla HIV replikasyonunda elde ettikleri inhibisyon, ribozimin kesme ve RBE'nin "decoy" etkilerinin toplamıdır^[8]. Onların Rev multimer köprüsü ile ribozimlerin kesme etkisinde bir artış olduğuna dair herhangi bir delilleri yoktur. Bugün diğer fonksiyonları sabit olup sadece multimerizasyon yapma kabiliyeti iptal edilmiş herhangi bir Rev mutant proteinini (Rev multimerization mutant) mevcut olmadığı için, Rev multimer köprüsü ile co-lokalizasyon ve bu yol ile ribozimin kesme aktivitesinde herhangi bir artış olup olmadığı ile ribonükleoprotein (RNP) komplekslerindeki Rev, ribozim, füzyon ve HIV RNA miktarları, ancak aşağıdaki molekül ve teknikler kullanılarak gösterilebilir:

Moleküller: Ribozim-"decoy" molekül [ribozim etkiyi net olarak gösterebilmek için ribozim hem wild tip (wt) hem de mutant (mt) formda olmalı]; Plasebo-"decoy" molekül (plasebo molekül, ribozimle aynı uzunlukta olmalı ve herhangi bir ribozim ve Rev bağlama kapasitesine sahip olmamalı); sadece ribozim; sadece plasebo ve sadece "decoy" moleküller.

Teknikler: HIV, ribozim, füzyon RNA ve Rev bağlı ribonükleoprotein komplekslerinin selüler lokalizasyonlarının in situ hibridizasyon ve immüno floresan assaylarla birleşik in situ RT-PCR ile belirlenmesi.



Şekil 5. HIV-1 RBE, 7637 ribozim ve 7637 füzyon moleküllerinin Mfold (3.1)'dan elde edilen kompüter tahminli katlanma resimleri (sekonder yapıları).

Yeşil çizgiler, orijinal HIV RBE'de Rev bağlamada çok önemli rol oynayan nükleotidleri göstermektedir. Bu nükleotidler ribozim ve RBE birleştikten sonra da tek zincirli bölgede olma özelliklerini korumaktadırlar. Çift taraflı yeşil oklar, Rev bağlamada büyük olasılıkla rolü olan pürinden zengin loop'ları göstermektedir. Füzyon molekülünün ribozim kısmının sekonder yapısı, ribozimin RBE ile birleşmeden önceki sekonder yapısıyla tamamen aynıdır. Küçük resim içindeki yapı ise *Escherichia coli* tRNA^{Lys3'}'nin yonca yaprağı şeklindeki sekonder yapısını göstermektedir. tRNA'nın A kutusu içindeki pürinden zengin loop, kompetisyon deneylerinde Rev bağlayan kısım olabilir. D, dihidroüridin işaret etmektedir (Wilson and Abbots'tan adapte edilmiştir).

Sonuç olarak bu çalışma, RBE içeren ribozim ve HIV RNA'ların Rev multimer köprüsü ile bir araya getirilebileceğini göstermiştir. Bu in vitro dataya dayanarak Rev multimerizasyonunun, ribozim ve HIV RNA'ların co-lokalizasyonuna katkıda bulunan potansiyel bir faktör olduğu söylenebilir. Multimerizasyonla co-lokalizasyon, datamıza bakarak in vitro za-

yıf olarak gözükmemekte, in vivo büyüklüğü ise hiç bilinmemektedir. Fakat in vivo şartlarda aynı kompartmanlarda "co-trafficking" ile bu zayıf co-lokalizasyon önemli hale gelebilir.

TEŞEKKÜR

Wild tip (wt) HIV-1 Rev proteini sağlayan "AIDS Research and Reference Reagent Prog-

ram, Division of AIDS, NIAID, NIH”dan Dr. David Rekosh, Dr. Marie-Lousie Hammaraskjold ve Mr. Michael Orsini’ye çok teşekkür ederiz.

Bu çalışma Dr. John J. Rossi’ye verilen AI29329 no’lu “National Institute of Health grant”ı ile desteklenmiştir.

Makalenin hazırlanmasında dil ve teknik konulardaki yardımlarından dolayı Dr. Gülserap Akdemir Yıldız’a da ayrıca teşekkür ederiz.

KAYNAKLAR

1. Sarver N, Cantin EM, Chang PS, et al. Ribozymes as potential anti-HIV-1 therapeutic agents. *Science* 1990; 247:1222-5.
2. Yu M, Poeschla E, Wong-Staal F. Progress towards gene therapy for HIV infection. *Gene Therapy* 1994;1:13-26.
3. Felber BK, Hadzopoulou-Cladaras M, Cladaras C, Copeland T, Pavlakis GN. Rev protein of human immunodeficiency virus type 1 affects the stability and transport of the viral mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA* 1989; 86:1495-9.
4. Kjems J, Brown M, Chang DD, Sharp PA. Structural analysis of the interaction between the human immunodeficiency virus Rev protein and the Rev response element. *Proc Natl Acad Sci* 1991;88:683-7.
5. Malim MH, Hauber J, Le SY, Maizel JV, Cullen BR. The HIV-1 Rev transactivator acts through a structured target sequence to activate nuclear export of unspliced viral mRNA. *Nature* 1989;338:254-7.
6. Sullenger BA, Cech TR. Tethering ribozymes to a retroviral packaging signal for destruction of viral RNA. *Science* 1993;262:1566-9.
7. Samarsky DA, Ferbeyre G, Bertrand E, Singer RH, Cedergren R, Fournier MJ. A small nucleolar RNA: Ribozyme hybrid cleaves a nucleolar RNA target in vivo with near-perfect efficiency. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; 96:6609-14.
8. Yamada O, Kraus G, Luznik L, Yu M, Wong-Staal F. A chimeric human immunodeficiency 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.
9. Yıldız Y, Rossi JJ. HIV replikasyonunu durdurabilmek amacıyla HIV-1 *env* mRNA’sında Hammerhead ribozim için giriş yeri tayini. *Flora* 2003;8:278-86.
10. Brice PC, Kelly AC, Butler PJG. Sensitive in vitro analysis of HIV-1 Rev multimerization. *Nucleic Acid Research* 1999;27:2080-5.
11. Zuker M. Calculating nucleic acid secondary structure. *Curr Opin Struct Biol* 2000;10:303-10.
12. Jain C, Belasco JG. Structural model for the cooperative assembly of HIV-1 Rev multimers on the RRE as deduced from analysis of assembly-defective mutants. *Mol Cell* 2001;7:603-14.
13. Charpentier B, Stutz F, Roshbash M. A dynamic in vivo view of the HIV-1 Rev-RRE interaction. *J Mol Biol* 1997;266:950-62.
14. Mann DA, Mikaelian I, Zimmel RW, et al. A molecular rheostat. Co-operative rev binding to stem I of the rev-response element modulates human immunodeficiency virus type-1 late gene expression. *J Mol Biol* 1994;241:193-207.
15. Heaphy S, Finch JT, Gait MJ, Karn J, Singh M. Human immunodeficiency virus type 1 regulator of virion expression, Rev, forms nucleoprotein filaments after binding to a purine-rich “bubble” located within the Rev-responsive region of viral mRNAs. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88:7366-70.
16. Michienzi A, Cagnon L, Bahner I, Rossi JJ. Ribozyme-mediated inhibition of HIV-1 suggests nucleolar trafficking of HIV-1 RNA. *Proc Natl Acad Sci* 2000;97:8955-60.
17. Westaway SK, Cagnon L, Chang Z, et al. Virion encapsidation of tRNA^{Lys}-Ribozyme chimeric RNAs inhibit HIV infection. *Antisense Nucleic Acid Drug Dev* 1998;8:185-97.
18. 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.
19. 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.
20. Daly TJ, Doten RC, Rennert P, et al. Biochemical characterization of binding of multiple HIV-1 Rev monomeric proteins to the Rev responsive element. *Biochemistry* 1993;32:10497-505.
21. Daly TJ, Rennert P, Lynch P, et al. Perturbation of the carboxy terminus of HIV-1 Rev affects multimerization on the Rev response element. *Biochemistry* 1993;32: 8945-54.
22. Hemmerich P, Bosbach S, von Mikecz A, Krawinkel U. Human ribosomal protein L7 binds RNA with an alpha-helical arginine-rich and lysine-rich domain. *Eur J Biochem* 1997;245:549-56.
23. Lee TC, Sullenger BA, Gallardo HF, Ungers GE, Gilboa E. Overexpression of RRE-derived sequences inhibits HIV-1 replication in CEM cells. *New Biologist* 1992;4: 55-74.
24. Frankel AD, Bredt DS, Pabo CO. Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer. *Science* 1988;240:70-3.
25. Trono D, Feinberg MB, Baltimore D. HIV-1 Gag mutants can dominantly interfere with the replication of the wild-type virus. *Cell* 1989;59:113-20.
26. Helene C. Specific recognition of guanine bases in protein-nucleic acid complexes. *FEBS Lett* 1977;74:10-3.
27. Porschke D. Thermodynamic and kinetic parameters of oligonucleotide-oligopeptide interactions. Specificity of arginine inosine association. *Eur J Biochem* 1978;86: 291-9.
28. Seeman NC, Rosenberg JM, Rich A. Sequence-specific recognition of double helical nucleic acids by proteins. *Proc Natl Acad Sci USA* 1976;73:804-8.
29. Green MR. RNA bent for recognition. *Current Biology* 1991;1:245-7.

30. Cullen BR, Hauber J, Campbell K, Sodroski JG, Haseltine WA, Rosen CA. Subcellular localization of the human immunodeficiency virus transacting art gene product. *J Virol* 1988;62:2498-501.
31. Luznik L, Marton ME, Kraus G, et al. Localization of human immunodeficiency virus Rev in transfected and virus-infected cells. *AIDS Res Hum Retroviruses* 1995;11:795-804.
32. Dunder M, Leno GH, Hammariskjold ML, Rekosh D, Helga-Maria C, Olson MO. The roles of nucleolar structure and function in the subcellular location of the HIV-1 Rev protein. *J Cell Sci* 1995;108:2811-23.
33. Endo S, Kubota S, Siomi H, et al. A region of basic amino-acid cluster in HIV-1 Tat protein is essential for transacting activity and nucleolar localization. *Virus Genes* 1989;3:99-110.
34. Siomi H, Shida H, Maki M, Hatanaka M. Effects of a highly basic region of human immunodeficiency virus Tat protein on nucleolar localization. *J Virol* 1990;64:1803-7.
35. Stauber RH, Afonina E, Gulnik S, Erickson J, Pavlakis GN. Analysis of intracellular trafficking and interactions of cytoplasmic HIV-1 Rev mutants in living cells. *Virology* 1998;251:38-48.

Yazışma Adresi:

Dr. Yüksel YILDIZ

Adnan Menderes Üniversitesi Tıp Fakültesi

Fizyoloji Anabilim Dalı

AYDIN

e-mail: yyildiz2000@hotmail.com

Makalenin Geliş Tarihi: 26.02.2004

Kabul Tarihi: 14.05.2004