

**BAZI HIV-1 DÜŞÜK DÜZEY VİREMİ SUŞLARINDA
ETRAVİRİN'E KARŞI DİRENÇLERİN İN-SİLİCO VE İN-
VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI**

**RESEARCHING OF RESISTANCE TO ETRAVIRINE IN
SOME HIV-1 LOW-LEVEL VIREMIA STRAINS BY IN-
SILICO AND IN-VITRO METHODS**

OFCAN OFLAZ

PROF. DR. HATİCE MERGEN

Tez Danışmanı

Hacettepe Üniversitesi

Lisansüstü Eğitim-Öğretim ve Sınav Yönetmeliğinin

Biyoloji Anabilim Dalı için Öngördüğü

DOKTORA TEZİ olarak hazırlanmıştır.

2023

ÖZET

BAZI HIV-1 DÜŞÜK DÜZEY VİREMİ SUŞLARINDA ETRAVİRİN'E KARŞI DİRENÇLERİN İN-SİLİCO VE İN-VİTRO YÖNTEMLERLE ARAŞTIRILMASI

Ofcan OFLAZ

Doktora, Biyoloji Bölümü

Tez Danışmanı: Prof. Dr. Hatice MERGEN

2023, 87 sayfa

İnsan İmmünyetmezlik Virüsü (HIV) konağın immün sistem hücrelerine genetik materyalini aktaran ve kontrol altına alınamadığında Kazanılmış İmmünyetmezlik Sendromu (AIDS) isimli klinik duruma yol açan önemli bir virüstür. HIV enfeksiyonunun kontrol altına alınabilmesi ve bulaştırıcılığının ortadan kaldırılması için antiretroviral tedavi (ART) ajanları kullanılmaktadır. Bu ajanlar, HIV genomunu ve proteinlerin sentezini inhibe etmektedir. Etravirin (ETR) nükleozit olmayan ters transkriptaz (RT) enzim inhibitörlerinden birisidir. Düşük düzey viremi (LLV); ART kullanımı sürdürülen HIV pozitif bireylerde, viral yükün devamlılığının olması durumudur. Viral yükün devamlılığı HIV pozitif bireylerin bulaştırıcılığının devam ettiği ve ilerleyen süreçte AIDS ile sonuçlanabilecek önemli problemlerden biridir. LLV durumunun, virolojik başarısızlık, ilaç emilim problemleri ve mutasyon sebepli ilaç direnci durumu olduğu düşünülmektedir.

Tez çalışması kapsamında, LLV gösteren HIV pozitif bireylerin ters transkriptaz enzim geninde tespit edilmiş olan Lys104Gln, Lys102Gln, Lys101Arg-Lys104Arg, Ser191Phe, Ile94Leu-Lys104Arg, Lys104Glu-His235Leu, Ala98Ser ve Val179Ile mutasyonlarının ETR direncine neden olup olmadığı in-vitro yöntemler ve homoloji modelleme, moleküler yerleştirme ve protein-ligand etkileşim analizi yöntemleri kullanılarak araştırılmıştır.

Çalıřma sonucunda elde edilen veriler deęerlendirildięinde Ala98Ser ve Val179Ile mutasyonlarının RT enziminin ETR baęlanma bölgesinde konformasyonel deęiřiklik oluřturarak, dūřuk dūzeyde ETR direncine yol açabileceęi dūřunūlmektedir.

Anahtar Kelimeler: Protein Yapısı, Biyoinformatik, Tıbbi Genetik, Molekūler Biyoloji, Mikrobiyoloji, İlaç Direnci

ABSTRACT

RESEARCHING OF RESISTANCE TO ETRAVIRINE IN SOME HIV-1 LOW-LEVEL VIREMIA STRAINS BY IN-SILICO AND IN-VITRO METHODS

Ofcan OFLAZ

Doctor of Science, Department of Biology

Supervisor: Prof. Dr. Hatice MERGEN

2023, 87 pages

Human Immunodeficiency Virus (HIV) is a significant virus that, when left uncontrolled, leads to Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS), a clinical condition characterized by the transmission of its genetic material to host immune system cells. To manage HIV infection and eliminate its transmissibility, antiretroviral therapy (ART) agents are employed. These agents function by inhibiting HIV proteins. Etravirine (ETR) is one of the non-nucleoside reverse transcriptase enzyme inhibitors. Low-Level Viremia (LLV) refers to the persistence of viral load in HIV-positive individuals who are under ongoing ART. The sustained viral load is a significant concern, as it indicates the continued transmissibility of HIV in infected individuals and may ultimately progress to AIDS. LLV is believed to result from virological failure, drug absorption issues, and mutation-induced drug resistance.

In our study, we investigated Etravirine (ETR) resistance using in-silico methods, specifically focusing on the following mutations: Lys104Gln, Lys102Gln, Lys101Arg-Lys104Arg, Ser191Phe, Ile94Leu-Lys104Arg, Lys104Glu-His235Leu, Ala98Ser, and Val179Ile. These mutations were analyzed in the reverse transcriptase (RT) enzyme obtained from strains of HIV-positive individuals with Low-Level Viremia (LLV). These mutations are located in the vicinity of the ETR inhibition site.

The ETR resistance conferred by the Lys104Gln, Lys102Gln, Lys101Arg-Lys104Arg, Ser191Phe, Ile94Leu-Lys104Arg, Lys104Glu-His235Leu, Ala98Ser, and Val179Ile mutations was investigated using homology modeling, molecular docking, and protein-ligand interaction analysis methods.

Our study suggests that Ala98Ser and Val179Ile mutations, which have not been previously analyzed through in-silico methods, induce conformational changes in the binding region of the reverse transcriptase (RT) enzyme. These changes are believed to lead to a low level of resistance to Etravirine (ETR).

Keywords: Protein Structure, Bioinformatics, Medical Genetic, Molecular Biology, Microbiology, Drug Resistance

TEŞEKKÜR

Tezim süresince her zaman destek olan değerli danışmanım Prof. Dr. Hatice MERGEN'e,

Tez verilerimin temini konusunda ve klinik bilgisiyle tezime katkı sağlayan Doç. Dr. Tülin DEMİR'e,

Öğretileleriyle, teorik bilgisiyle ve manevi anne desteğiyle yanımda olan Prof. Dr. Betigül ÖNGEN'e,

Tez süresince destek veren LHÜ Dekan'ı Prof. Dr. Adile Berna DURSUN'a,

Tez süresince bilgisiyle destek olan ve fikir tartışmalarıyla ufkumu genişleten Prof. Dr. Müge TECDER'e, Prof. Dr. Belma TURAN'a ve Prof. Dr. Şükrü Volkan ÖZGÜVEN'e,

Tez sürecinin zorlu olabileceğini ve sağlam durmam gerektiğini öğütleyen ve çalışmalarımı 3D baskı ile basıp destek veren merhum Prof. Dr. Mustafa FEVZİ SARGON'a,

Her an imdadıma koşan dostlarım Ahsen Sevde ÇINAR KOÇ'a, Ceren ADALI'ya, Eda AKKIZ AĞAŞÇIOĞLU'na, Ekin ERDOĞMUŞ'a, Hasan GEDİKTAŞ'a, Mustafa ALTUNDAĞ'a, Heba ASKER'e, Kübra TAN ŞENER'e, Merve SAYIN'a, Zeynep KAVASOĞLU'na, Dr. Selen Güçlü DURGUN'a, Soygül Destina ULUSOY'a ve Tuna ÇETİN'e,

Manevi desteğini her zaman hissettiğim anneme, babama, kız kardeşime ve kızım İnci'ye,

Tez sürecimin bitmesini beklerken kaybettiğim ve tezimi ithaf ettiğim merhum dedem Ahmet Canbazoğlu'na sonsuz teşekkürlerimi sunarım.

İÇİNDEKİLER

ÖZET	i
ABSTRACT	iii
TEŞEKKÜR.....	v
İÇİNDEKİLER.....	vii
ŞEKİLLER DİZİNİ.....	ix
ÇİZELGELER DİZİNİ	xiii
SİMGELER VE KISALTMALAR	xv
1. GİRİŞ	1
2. İNSAN İMMÜN YETMEZLİK VİRÜSÜ-1 (HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1, HIV-1).....	2
2.1. Epidemiyoloji	2
2.2. HIV-1 Virolojisi ve Temel Hümorale Bağışıklık	5
2.3. HIV-1 Proteinleri	7
2.3.1. Yapısal Proteinler.....	9
2.3.2. Yardımcı ve Düzenleyici Proteinler	12
2.3.3. Viral Enzimler	15
2.3.3.1. İntegraz.....	15
2.3.3.2. Proteaz	16
2.3.3.3. Ters Transkriptaz	16
2.3.3.4. Ters Transkriptaz İnhibitörleri (RTI)	18
2.3.3.4.1. Nükleozit Ters Transkriptaz İnhibitörleri.....	18
2.3.3.4.2. Non-nükleozit Ters Trankriptaz İnhibitörleri... 20	
2.4. Düşük Düzey Viremi	23
2.5. Antiretroviral Direnç.....	24
2.5.1. Etravirin Direnci.....	25
3. HOMOLOJİ MODELLEME VE MOLEKÜLER YERLEŞTİRME	27
3.1. Protein Modelleme Yöntemleri ve Programları	27
3.2. Moleküler Yerleştirme (Docking), Protein Ligand Etkileşim Analizi ve Kullanılan Programlar	30
4. MATERYAL VE YÖNTEM.....	36
4.1. Sekansların Düzenlenmesi.....	36

4.2. Homoloji Modelleme	39
4.3. Moleküler Yerleştirme ve Etkileşim Analizi.....	39
4.4. Protein Ligand Etkileşim Analizi	40
4.5. Hücre Kültürü Çalışması	40
5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA.....	44
5.1. Homoloji Modelleme ve Görselleştirme Sonuçları	44
5.2. Moleküler Yerleştirme ve Analiz Sonuçları.....	58
5.3. Protein-Ligand Etkileşim Analizi Sonuçları.....	68
5.4. Hücre Kültürü Sonuçları.....	77
5.5. Sonuçların Tartışılması	77
KAYNAKLAR.....	79
ORJİNALLİK RAPORU.....	88
ÖZGEÇMİŞ	89

ŞEKİLLER DİZİNİ

Şekil 2.1.	1990 yılından itibaren küresel ölçekli yeni pozitif vaka sayısı	3
Şekil 2.2.	Küresel ölçekte 1990-2021 yılları arası AIDS ilişkili ölüm grafiği	4
Şekil 2.3.	HIV-1'in tam uzunluktaki genomunun şematik modeli	8
Şekil 2.4.	HIV-1 protein yapılarının yüzey alanı görselleştirmesi ve HIV-1 yapısının şematik görünümü.....	8
Şekil 2.5.	Matriks proteinin trimerik yapısı ve matriks proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri	9
Şekil 2.6.	Kapsid proteinin heksamerik yapısı ve kapsid proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri	10
Şekil 2.7.	Nükleokapsid proteini (turuncu) RNA (sarı) kompleksi ve nükleokapsid proteininin HIV-1'deki yerleşim yeri	11
Şekil 2.8.	SU proteini (mavi) TM proteini (mor) kompleksi ve zarf proteinlerinin HIV-1'deki yerleşim yeri	11
Şekil 2.9.	Vif proteini (yeşil) insan antiviral aktivite proteini (mor) kompleksi ve vif proteinlerinin HIV-1'deki yerleşim yeri	12
Şekil 2.10.	Vpr proteini ve Vpr proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri.....	12
Şekil 2.11.	Vpu proteinin yapısı.....	13
Şekil 2.12.	Nef proteinin yapısı ve NEF proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri	13
Şekil 2.13.	Viral RNA (sarı) ile Rev proteini (turuncu) kompleksi ve Rev proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri	14
Şekil 2.14.	Viral RNA (sarı) ile TAT proteini (turuncu) kompleksi ve TAT proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri	15
Şekil 2.15.	Viral integraz ve integrazın HIV-1'deki yerleşim yeri.....	15
Şekil 2.16.	Viral proteaz ve proteazın HIV-1'deki yerleşim yeri	16
Şekil 2.17.	Ters transkriptaz ve ters transkriptazın HIV-1'deki yerleşim yeri ..	17
Şekil 2.18.	Zincir sonlandırıcı olarak görev yapan RT inhibitörlerinin etki mekanizması	19
Şekil 2.19.	Onaylanmış NRT inhibitörlerinin kimyasal yapıları.	19
Şekil 2.20.	RNA/DNA hibrit kompleksi ile HIV RT enzimi. DNA polimeraz aktif bölgesi ve NNRTI bağlanma bölgesi ok işaretiyle gösterilmiştir.....	20
Şekil 2.21.	Etravirinin molekül yapısı.....	22

Şekil 4.1.	Yabanıl tip modelin üzerinde direnç geliştireceği düşünülen mutasyonların atomik (kırmızı) gösterimi ve ETR (siyah).....	39
Şekil 5.1.	A. Yabanıl Tip homoloji modelin hidropati yüzey görseli (beyaz: nötr,.....)	45
Şekil 5.2.	A. Etravirin cebini oluşturan amino asitler	46
Şekil 5.3.	A. Etravirin cebini oluşturan amino asitlerin yakınlarında bulunan amino	46
Şekil 5.4.	A. Mutasyon amino asiti olan 98. amino asitin ETR ile doğrudan ilişkili L100.....	47
Şekil 5.5.	Yabanıl (A.) ve mutant modelin (B.) hidropati yüzey analizi gösterimi ile görselleştirilmesi kırmızı ok mutasyon bölgeleri olan 94. ve 102. amino asitleri göstermektedir C. 94. ve 102. amino asitin atomik gösterimi. Yabanıl tip siyah, mutant tip mavi renk ile boyanmıştır.	49
Şekil 5.6.	Yabanıl tip (A) ve K102Q mutant tip (B) homoloji modellerinin hidropati	50
Şekil 5.7.	Yabanıl tip (A) ve K104Q mutant tip (B) homoloji modellerinin hidropati	51
Şekil 5.8.	Yabanıl tip (A.) ve K101R-K104R mutant tip (C.) homoloji modellerinin.....	52
Şekil 5.9.	Yabanıl tip (A-C) ve K104E-H235L (B-D) mutant tip homoloji modellerinin.....	54
Şekil 5.10.	Homoloji modellerinin hidropati yüzey analizi ile görselleştirilmesi (A.	55
Şekil 5.11.	Mutasyon amino asiti olan 191. amino asit ve ETR cebinde yer alan 190.	56
Şekil 5.12.	A. Mutasyon amino asiti olan 228. amino asitin atomik gösterimi ..	57
Şekil 5.13.	A. Yabanıl tip moleküler yerleştirme sonucu ETR – ETR ilişkili amino	58
Şekil 5.14.	Yabanıl (A.) ve A98S mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D	59
Şekil 5.15.	Yabanıl (A.) ve I94L-K102R mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D	60

Şekil 5.16. Yabanıl (A.) ve K102Q mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D.....	61
Şekil 5.17. Yabanıl (A.) ve K104Q mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D.....	62
Şekil 5.18. Yabanıl (A.) ve K101R-K104R mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi	63
Şekil 5.19. Yabanıl (A.) ve K104E-H235L mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme	64
Şekil 5.20. Yabanıl (A.) ve V179I mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D.....	65
Şekil 5.21. Yabanıl (A.) ve S191F mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D.....	66
Şekil 5.22. Yabanıl (A.) ve K104E-H235L mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme	67

ÇİZELGELER DİZİNİ

Çizelge 2.1.	5 yıllık HIV pozitif /AIDS vaka ve ölüm sayısı	5
Çizelge 2.2.	Klinik olarak anlamlı en yaygın NNRTI direncine yol açan mutasyonlar.....	26
Çizelge 3.1.	Çözünürlük değerleri ve açıklamaları (Huang, 2007).	29
Çizelge 3.2.	Etkileşimler ile ilişkili limit bilgileri.....	33
Çizelge 4.1.	Yabanıl ve Mutant Tip suşların sekans verileri. Suşlarda görülen	37
Çizelge 5.1.	Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 98. amino asitler ile ETR, L100, K101 ve Y318 amino asitlerine olan uzaklıkları	47
Çizelge 5.2.	Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 98. amino asitler ile ETR, L100, K101 ve K103 amino asitlerine olan uzaklıkları	48
Çizelge 5.3.	Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 104. amino asitler ile ETR, K101 ve	51
Çizelge 5.4.	Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 101. amino asitler ile ETR ve	52
Çizelge 5.5.	Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 104. amino asitler ile ETR, F227 ve	53
Çizelge 5.6.	Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 191. amino asitler ile ETR ve G190.....	56
Çizelge 5.7.	Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 228. amino asitler ile ETR ve F227	57
Çizelge 5.8.	Moleküler yerleştirme skorları.....	58
Çizelge 5.9.	Yabanıl Tip ve A98S mutant tip protein ligand etkileşim analizi. 68	
Çizelge 5.10.	Yabanıl Tip ve I94L-K102R mutant tip protein ligand etkileşim analizi	69
Çizelge 5.11.	Yabanıl Tip ve K102Q mutant tip protein ligand etkileşim analizi	70
Çizelge 5.12.	Yabanıl Tip ve K104Q mutant tip protein ligand etkileşim analizi	71
Çizelge 5.13.	Yabanıl Tip ve K101R-K104R mutant tip protein ligand etkileşim	72

Çizelge 5.14. Yabanıl Tip ve K104E-H235L mutant tip protein ligand etkileşim analizi.....	73
Çizelge 5.15. Yabanıl Tip ve V179I mutant tip protein ligand etkileşim analizi.....	74
Çizelge 5.16. Yabanıl Tip ve S191F mutant tip protein ligand etkileşim analizi.....	75
Çizelge 5.17. Yabanıl Tip ve S191F mutant tip protein ligand etkileşim analizi.....	76

SİMGELER VE KISALTMALAR

Simgeler

%	Yüzde
<	Küçük
>	Büyük
±	Artı eksi
°C	Santigrat derece
∞	Sonsuz
Å	Angstrom
α	Alfa
β	Beta

Kısaltmalar

AIDS	Edinsel immün yetmezlik sendromu
ART	Antiretroviral terapi
ATP	Adenozin trifosfat
bç	Baz çifti
cDNA	Komplementer DNA
EM	Kriyo-elektron mikroskopi
EMDB	Elektron mikroskopi veri bankası
ETR	Etravirin
HIV	İnsan İmmünyetmezlik Virüsü
HTM	High-throughput metot
kb	Kilobaz
kDa	Kilodalton
LLV	Düşük düzey viremi
NCBI	National center for biotechnology information
nm	Nanometre
NMR	Nükleer Manyetik rezonans
NT	Amino uç
pdb	Moleküler koordinat uzantısı

PDB	Protein veri bankası
pI	İzoelektrik nokta
pKa	Asit ayrışma sabitinin ters logaritması
PPI	Protein-protein etkileşimi
RT	Ters transkriptaz
TM	Transmembran domeyn
WHO	Dünya Sağlık Ögütü
wwPDB	Worldwide Protein Data Bank

1. GİRİŞ

İnsan immün yetmezlik virüsü (HIV) konağın immün sistem hücrelerine genetik materyalini aktaran ve kontrol altına alınamadığında edinsel immün yetmezlik sendromu (AIDS) isimli klinik duruma yol açan önemli bir virüstdür. HIV enfeksiyonunun kontrol altına alınabilmesi ve bulaştırıcılığının ortadan kaldırılması için antiretroviral tedavi (ART) ajanları kullanılmaktadır. Bu ajanlar HIV genomunun ve proteinlerinin sentezini inhibe etmektedir. Etravirin (ETR), nükleozit olmayan ters transkriptaz enzim inhibitörlerinden birisidir. Düşük düzey viremi (LLV); ART'si devam eden HIV pozitif bireylerde, viral yükün devamlılığının olması durumudur. Viral yükün devamlılığı, HIV pozitif bireylerin bulaştırıcılığının devam ettiği ve ilerleyen süreçte AIDS ile sonuçlanabilecek önemli problemlerden biridir. LLV durumunun nedeninin, virolojik başarısızlık, ilaç emilim problemleri ve mutasyon sebepli ilaç direnci durumu olduğu düşünülmektedir.

Çalışmamız kapsamında ETR direncinin daha önce *in-silico* yöntemlerle araştırılmamış Lys104Gln, Lys102Gln, Lys101Arg-Lys104Arg, Ser191Phe, Ile94Leu-Lys104Arg, Lys104Glu-His235Leu, Ala98Ser ve Val179Ile mutasyonları kullanılmıştır. Bu mutasyonlar, LLV durumundaki HIV pozitif bireylerden elde edilen suşlardan analiz edilmiş ve RT enziminde ETR inhibisyon bölgesi ve çevresinde yer alan mutasyonlardır.

Lys104Gln, Lys102Gln, Lys101Arg-Lys104Arg, Ser191Phe, Ile94Leu-Lys104Arg, Lys104Glu-His235Leu, Ala98Ser ve Val179Ile mutasyonlarının ETR direnci; homoloji modelleme, moleküler yerleştirme ve protein-ligand etkileşim analizi yöntemleriyle araştırılmıştır.

Çalışmamız sonucunda daha önce *in-silico* yöntemlerle analiz edilmemiş olan; Ala98Ser ve Val179Ile mutasyonlarının ters transkriptaz enziminin ETR bağlanma bölgesinde konformasyonel değişiklik oluşturarak, düşük düzeyde ETR direncine yol açabileceği düşünülmektedir.

2. İNSAN İMMÜN YETMEZLİK VİRÜSÜ-1 (HUMAN IMMUNODEFICIENCY VIRUS-1, HIV-1)

2.1. Epidemiyoloji

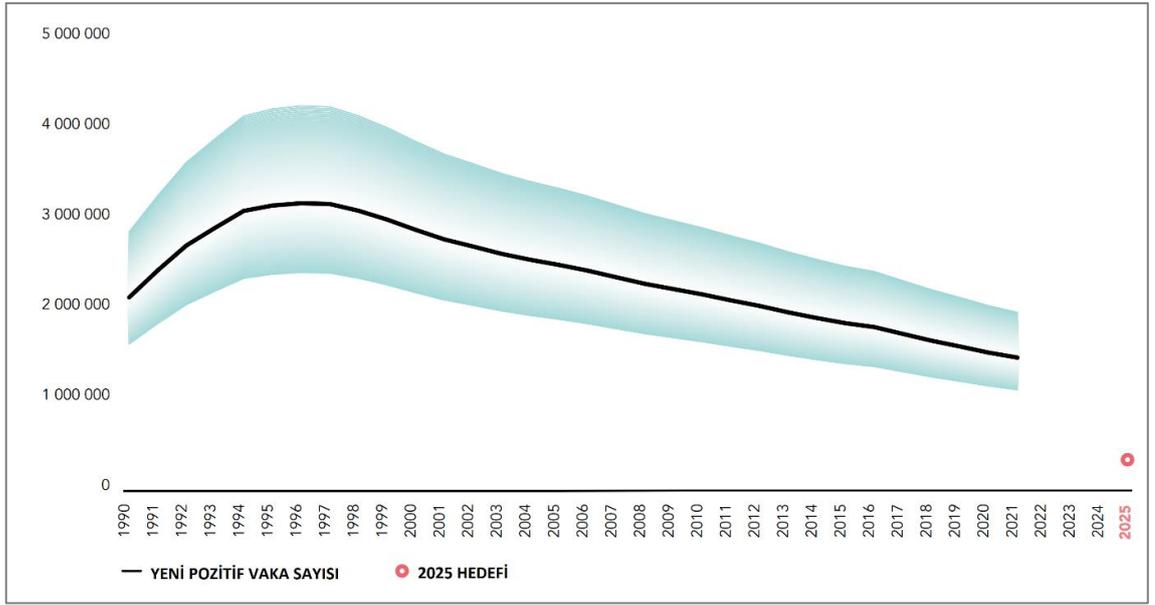
Çağımızın en büyük sağlık problemlerinden biri, enfeksiyon hastalıklarının tedavisidir. Özellikle viral enfeksiyonlarda artan antiviral direnç, enfeksiyon hastalıklarının tedavisine önemli ölçüde zarar vermektedir. İnsan immün yetmezlik virüsü (Human Immunodeficiency Virus-1, HIV-1) salgını son 40 yılın en önemli viral pandemilerinin başında gelmektedir.

AIDS, HIV enfeksiyonu sebebiyle ortaya çıkan en ciddi klinik durumdur. Etkili ART ve fırsatçı enfeksiyonları önleme, tespit ve tedavi etme araçlarına rağmen, 2021'de AIDS'e bağlı 650.000 ölümle her dakika bir can almıştır. Ayrıca, HIV enfeksiyonuna karşı küresel başarıdaki ilerleme hızlanmak yerine yavaşlamaktadır: UNAIDS Küresel AIDS Gelişmeler Raporu'nun 2021 verilerine göre, 2020 yılında küresel olarak yeni HIV pozitif vaka sayıları düşmüş, buna rağmen, bu düşüşün 2020'ye kıyasla 2021 yılında yalnızca %3,6 olduğu bildirilmiştir. Bu durum, 2016 yılından bu yana en az yıllık düşüştür. Birçok bölge, ülke ve topluluk, COVID-19 salgını gibi devam eden diğer krizlerin yanı sıra, artan HIV enfeksiyonlarını ele almak zorunda kalmıştır (UNAIDS Küresel AIDS Gelişmeler Raporu, 2021).

2021 Hastalık Kontrol ve Korunma Merkezleri (Centers for Disease Control and Prevention-ABD, CDC) Ulusal HIV Müfredatı raporuna göre; 2020 yılında, 35,9 milyon yetişkin ve 15 yaşından küçük 1,7 milyon çocuk dahil olmak üzere, dünya genelinde HIV ile yaşayan tahmini 37,6 milyon insanın bulunduğu, 25 milyondan fazlasının (toplamın yaklaşık %67'si) Sahra Altı Afrika bölgesinde, 4,7 milyonu Batı ve Orta Afrika'da olduğu raporlanmıştır. Doğu Avrupa ve Orta Asya'da, HIV pozitif bireylerin sayısı 2010'dan 2019'a (970.000 – 1,7 milyon aralığında) keskin bir şekilde artmıştır. Bu durumun, damar içi uyuşturucu kullanımı ile ilişkili olduğu düşünülmektedir. 2020'de ise bunun 960.000'de sabitlendiği bildirilmiştir. COVID-

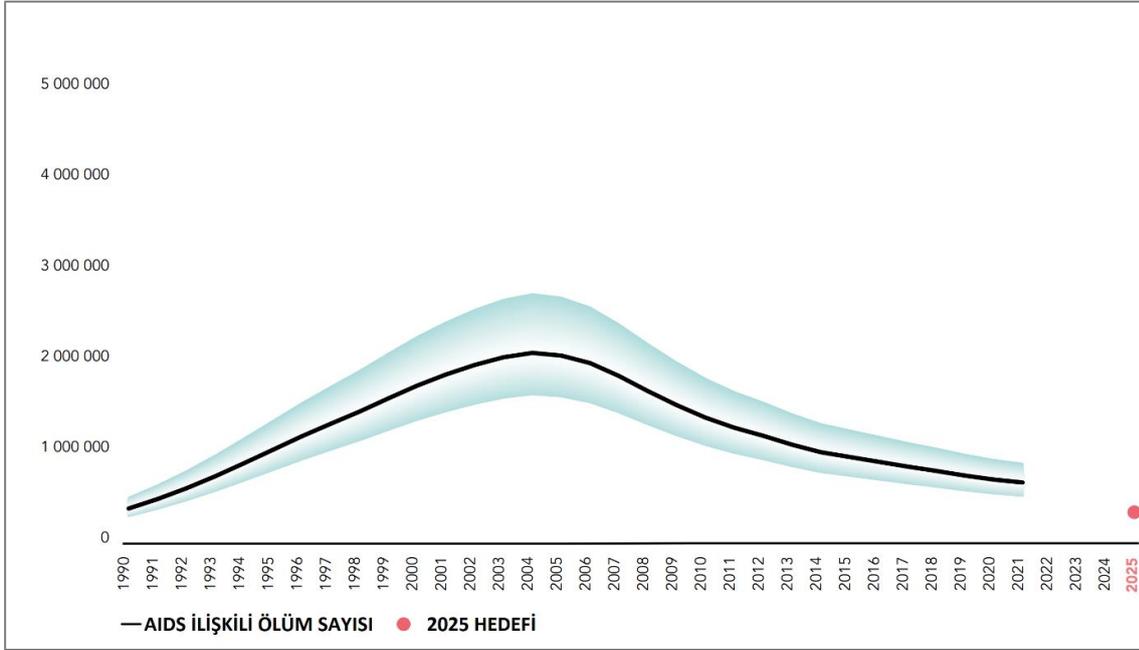
19 pandemisi sebebiyle HIV taramalarının azalması bu istatistiğin güvenilirliğini zedelediği düşünülmektedir.

Yeni vaka sayısı, COVID-19 salgını sırasında küresel olarak azalmaya devam etse de, 2021'deki yeni pozitifliklerdeki azalma, 2017'den bu yana en küçük yıllık düşüş olmuştur. Mevcut yeni pozitif HIV vaka grafiğine göre, 2025 yılında yıllık 1.2 milyon yeni vakanın olacağı düşünülmektedir (**Şekil. 2.1.**)



Şekil 2.1. 1990 yılından itibaren küresel ölçekli yeni pozitif vaka sayısı (UNAIDS, 2021)

2021'de 650.000 (tahmini vaka 510.000–860.000) insanın AIDS ile ilgili nedenlerden öldüğü kaydedilmiştir. Çocuklarda (0 ila 14 yaş arası) AIDS'e bağlı ölümler orantısız bir şekilde devam etmektedir: 2021'de çocuklar, HIV pozitif bireylerin %4'ünü oluştursa da AIDS'e bağlı ölümlerin %15'ini oluşturmaktadır. Mevcut eğilimler devam ederse, 2025'te 460.000 kişinin AIDS'e bağlı nedenlerden öleceği tahmin edilmektedir. Uluslararası toplum 2025 hedefine erişebilmesi için HIV testi ve tedavisinin hızı artırılmalı ve bireylerin bu testlere kolay bir şekilde ulaşımı sağlanmalıdır. 1990–2021 yılları arasındaki küresel ölçekte AIDS'e bağlı ölümlerin sayısı **Şekil. 2.2.**'de verilmiştir.



Şekil 2.2. Küresel ölçekte 1990-2021 yılları arası AIDS ilişkili ölüm grafiği (UNAIDS, 2021)

UNAIDS'in 2022 raporuna göre; her gün 4.000 yeni vaka kaydedilmektedir. Her hafta 15 ila 24 yaş arası 7800 genç enfekte olmaktadır. Küresel olarak yıllık yeni vaka sayısı 2010'dan bu yana %32 oranında düşmüştür. Bu, 370.000 yeni enfeksiyon olan 2025 hedefine ulaşmak için gereken düşüşün çok altındadır. 2025 yılı hedefinde %83 düşüş beklenmektedir.

Ülkemizde ilk vaka bildirimini 1985 yılında yapılmıştır. Bu bildirimden itibaren sürveyans çalışması sürdürülmektedir. T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar ve Erken Uyarı Dairesi Başkanlığı tarafından 15 Kasım 2022 tarihinde yayınlanan rapora göre, ülkemizde 2.177 AIDS ve 34.453 HIV pozitif vaka sayısı olduğu, 2022 yılında yeni vaka sayısının 2.901 olduğu bildirilmiştir. **Çizelge 2.1.**'de ülkemizdeki son 5 yılın güncel HIV/AIDS istatistikleri verilmiştir (T.C. Sağlık Bakanlığı, Halk Sağlığı Genel Müdürlüğü Bulaşıcı Hastalıklar ve Erken Uyarı Dairesi Başkanlığı, HIV-AIDS İstatistik Raporu, 2022).

Çizelge 2.1. 5 yıllık HIV pozitif /AIDS vaka ve ölüm sayısı

Yıllar	HIV Pozitif	AIDS	ÖLÜM
2018	3848	131	31
2019	4063	134	40
2020	3025	97	47
2021	3974	100	49
2022	2901	70	30

2.2. HIV-1 Virolojisi ve Temel Hümmoral Bağışıklık

HIV-1 ile enfekte hastaların AIDS klinik durumuna ilerlemesinin ana nedeni, HIV için birincil hedef olan CD4+ T lenfositlerinin azalmasıdır. Bu hücreler spesifik hümmoral ve hücre aracılı bağışıklık tepkisinin indüklenmesi için önemli görev yapmaktadır. Enfeksiyon sırasında CD4+ T lenfositlerinin yavaş ama sürekli tükenmesinin bir sonucu olarak, bağışık yanıt zarar görmektedir ve enfekte olmuş birey, sonuçta ölüme yol açan fırsatçı enfeksiyonlara ve malignitelere duyarlı hale gelmektedir (Sierra ve diğerleri, 2005).

Vakaların yaklaşık %50'sinde primer HIV-1 enfeksiyonu asemptomatik seyrederken, hastaların %50'sinde enfeksiyondan sonraki ilk dört hafta içinde grip benzeri semptomlar gelişmektedir. Primer enfeksiyon sırasında, periferik kanda virüs yoğunluğu son derece yüksektir (10^8 HIV-1 RNA kopyası/ml plazmaya kadar) ve CD4+ T lenfositlerin sayısı önemli ölçüde azalmaktadır (Piatak ve diğerleri, 1993). HIV-1'e özgü hümmoral bağışıklık tepkisinin başlangıcı ve ardından HIV-1'e özgü antikorların sentezi, plazma viral yükünün, hastaya özgü bir düzeye düşmesine yol açmaktadır. Bununla birlikte, enfeksiyonun asemptomatik aşamasında, lenf düğümlerinde kalıcı viral replikasyon ve "klinik gecikme" olarak adlandırılan hızlı bir plazma viryonları ve CD4+ T lenfosit döngüsü eşlik etmektedir (Embretson ve diğerleri, 1993; Sierra ve diğerleri, 2005). Klinik gecikme süresi boyunca, CD4+ T lenfositlerin sayısı sürekli olarak azalmaktadır. Sonuç olarak, hastanın bağışıklık sistemi artık fırsatçı patojenleri kontrol etme yeteneğine sahip değildir ve yaşamı tehdit eden AIDS tanımına uyan klinik durum ortaya çıkmaktadır. HIV-1 enfeksiyonunun farklı aşamaları yaygın

olarak CDC sistemi kullanılarak sınıflandırılmaktadır. Bu sistem, HIV-1 enfeksiyon sınıflandırması için klinik verileri ve CD4+ T lenfosit sayısını birleştirir.

Primer enfeksiyon sırasında HIV-1'e özgü sitotoksik CD8+ T lenfositlerinin (CTL) aktivasyonu meydana gelmektedir. CTL yanıtı, HIV-1'e özgü antikorlardan ziyade, viral replikasyonun kontrolünde daha etkilidir. Kantitatif teknikler kullanılarak HIV-1'e özgü CTL sayısının viral yük ile ters orantılı olduğu ortaya koyulmuştur (Ogg ve diğerleri, 1998). CTL aracılı virüs inhibisyonu için çeşitli mekanizmalar vardır. HIV-1 ile enfekte olmuş antijen sunan hücrelerin CTL'leri tanıması, T hücre reseptörü (TCR) aracılığıyla gerçekleşmektedir. CTL'ler, TCR'leri ile, enfekte hücrelerin yüzeylerinde MHC sınıf I molekülleri ile sunulan viral peptitlere bağlanırlar. Böylece, enfekte olmuş hücrelerin eliminasyonuna yol açan proteazların ve perforinlerin salınması sağlanır (McMichael ve Rowland-Jones, 2001). İkinci bir mekanizma, CTL yüzeyindeki Fas ligandının (FasL) hedef hücreler üzerindeki Fas molekülleri ile etkileşimi sonrası, enfekte olmuş hücrelerin apoptotik lizisi ile sonuçlanmasıdır (Hadida ve diğerleri, 1999). Hücre lizisinin yanı sıra, CD8+ T lenfositlerinin HIV-1 ile enfekte olmuş hücrelere bağlanması, interferon-alfa ve CC kemokinleri, MIP-1alfa, MIP-1beta gibi sitotoksik olmayan antiviral etkili bileşiklerin salınımını indüklemektedir. Bu kemokinler, HIV-1 koreseptörü CCR5'in doğal ligandlarıdır; R5 HIV-1 suşları tarafından CD4+ T lenfositlerinin enfeksiyonunu önleyebildikleri gösterilmiştir. Viral replikasyonun kontrolü için spesifik CD8+ T lenfositleri önemlidir. Çünkü uzun süreli progresyon göstermeyen bireylerin sıklıkla kantitatif ve kantitatif HIV-1'e özgü CTL yanıtı gösterdiği bilinmektedir (Migueles ve diğerleri, 2002). Son olarak, yüksek oranda HIV'e maruz kalan, ancak seronegatif bireylerin saptanabilir miktarlarda HIV-1'e özgü CTL'ye sahip olduğu bildirilmiştir (Bernard ve diğerleri, 1999, Sierra ve diğerleri, 2005).

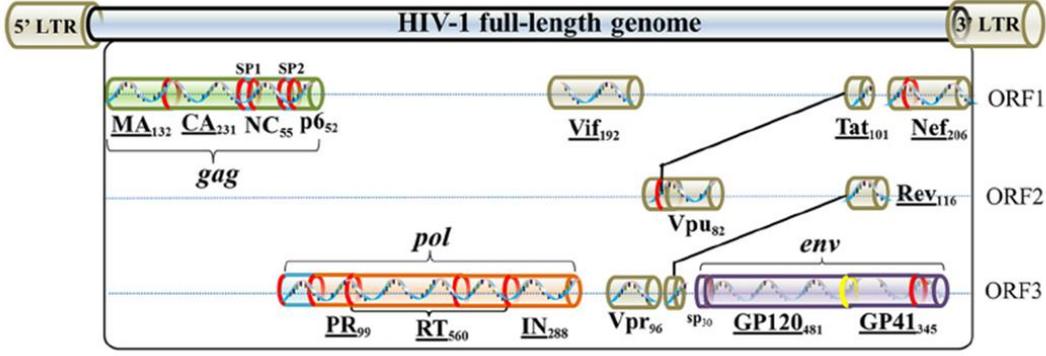
Spesifik hümmoral immün yanıt mekanizmasının HIV-1 enfeksiyonunun kontrolünde rol oynadığı görülmektedir. HIV-1 viral partiküllerinin antikor aracılı azaltılması için önemli olan; toplam spesifik antikorların miktarından ziyade nötralize edici antikorların miktarıdır. Nötralize edici antikorların viral partiküllere bağlanması, viryonların yok edilmesine aracılık etmektedir (Kostrikis ve diğerleri, 1996). Ayrıca, HIV-1 glikoprotein gp120'ye karşı mevcut nötralize edici

antikorların antiviral aktivitesi, nötralizasyona duyarlı virüsün, mutasyona bağlı konformasyonel gp120 değişiklikleriyle, bağışıklıktan kaçan HIV-1 varyantları ile tamamen değiştirilmesiyle (Wrin ve diğerleri, 1994) ve/veya gp120'nin modifiye edilmiş glikozilasyon modelleri ile (Wei ve diğerleri, 2003) virüse karşı hücrel savunmayı sürdürmektedir. Çok sayıda antiretroviral ajana rağmen bireylerin bağışıklık sistemi, HIV-1 enfeksiyonunun kronikleşmesini önleyemez; HIV-1 ile enfekte olmuş hücrelerin HIV enfeksiyonundan tümüyle temizlenmesini sağlayamaz. HIV-1'in olağanüstü yüksek mutasyon oranı (Domingo ve diğerleri, 2001), viral epitoplarda içindeki amino asit değişimleri nedeniyle immüniteden kaçınan suşların oluşmasına yol açmaktadır (Phillips ve diğerleri, 1991). Sonuç olarak, CD4+ T hücrelerinde viral replikasyon ve de novo enfeksiyon sürmekte, bu da bağışıklık sisteminin bozulmasına ve ölüme yol açmaktadır.

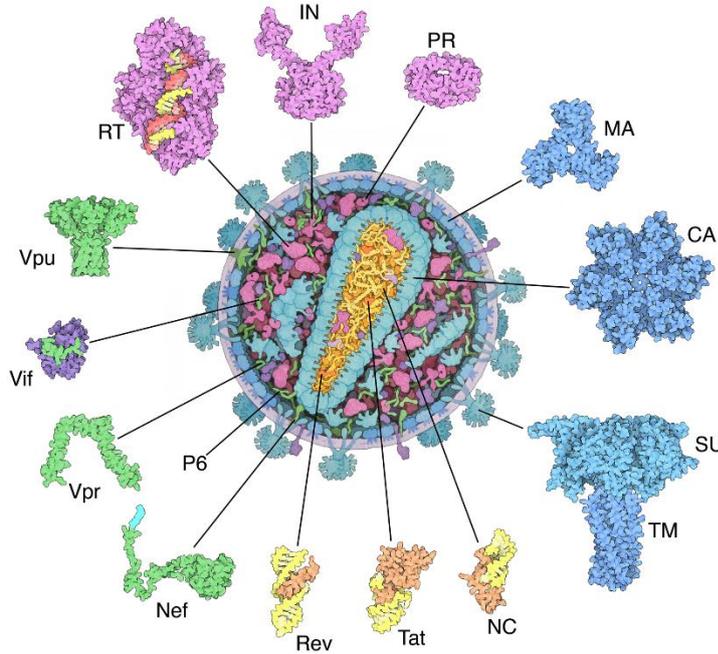
2.3. HIV-1 Proteinleri

HIV genomu, HIV yaşam döngüsü için önemli rolü olan 16 viral proteini kodlayan genlerden oluşmaktadır. Bunlar temelde; viral enzimleri (proteaz, RT ve integras), zarf proteinlerini (gp120 ve gp41), düzenleyici proteinleri (Tat ve Rev) ve yardımcı proteinleri (Vif, Vpu/Vpx, Vpr ve Nef) kodlamaktadır (**Şekil 2.3.**). Vpu, yalnızca HIV-1'de bulunurken, Vpx, HIV-2 tarafından taşınmaktadır (Malim ve Emerman, 2008).

Şekil 2.3.'te HIV protein adları ve amino asit uzunlukları, üç açık okuma çerçevesinde (ORF'ler) renkli protein bölgelerinin altında gösterilmiş ve 11 multimerik proteinin altı çizilmiştir. Gen haritasında, kırmızı halkalar, viral olgunlaşma sırasında viral proteazın bölündüğü yerleri göstermektedir. env geninde, sarı bir halka, insan proteazlarının bölünme konumunu göstermektedir. 5' ve 3' uzun terminal bölgeleri (LTR'ler) de tam uzunluktaki genomda belirtilmiştir.



Şekil 2.3. HIV-1'in tam uzunluktaki genomunun şematik modeli (Li ve Clercq, 2016 kaynağından alınmıştır)



Şekil 2.4. HIV-1 protein yapılarının yüzey alanı görselleştirmesi ve HIV-1 yapısının şematik görünümü

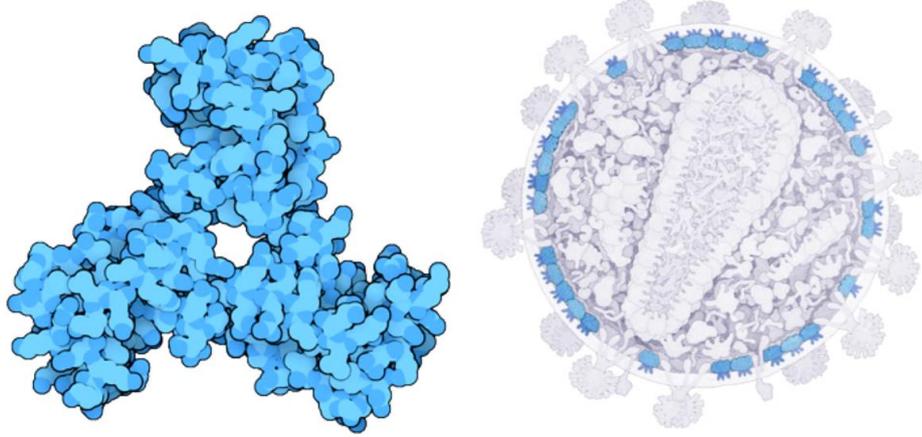
16 HIV proteininin, teoride virüs yaşam döngüsü için 120 farklı ikili protein-protein ilişkisi (iki farklı proteinin birbiriyle ilişkisi) kurduğu düşünülmektedir (Li ve Clercq, 2016). HIV-1 proteinlerinin üç boyutlu yapılarının yüzeysel gösterimle görselleştirildiği ve viral yapıda bölgesel yerleşimi **Şekil 2.4.**'te verilmiştir. **Şekil 2.4.**'te 15 HIV-1 protein yapısının yüzey temsilleri, işlevsel rollerine göre kümelenmiştir. HIV-1 monomerik proteinleri pembe renkte ve multimerik proteinlerin farklı alt birimleri farklı renklerle (yeşil, sarı ve kırmızı) gösterilmiştir.

HIV-1 protein yapıları, doğrudan ve hipotetik bir karşılaştırma için tam olarak ölçeklenmiştir. Protein şekilleri ve yerleşim görselleri PDDBE veri tabanından alınmıştır.

2.3.1. Yapısal Proteinler

Matriks

gag geninin bir bölümü tarafından kodlanan matriks proteini, viral zarın iç yüzeyinde bir kaplama oluşturmaktadır (**Şekil 2.5.**). Matrix proteini konak hücre yüzeyinden, konak hücrede üretilen HIV-1 viryonunun, tomurcuklanmasında merkezi bir rol oynamaktadır. Bu protein, zar üzerinde yan yana birleşen trimerler halinde toplanarak, plazma membranında P1-P2 alanlarına bağlanır ve viryon birleşmesini sağlamaktadır. Katlanmış matriks protein yapısı beş alfa heliks, 10 amino asitlik kısa üç alfa heliks ve üç β -tabaka motifinden oluşmaktadır (Malim ve Emerman, 2008).

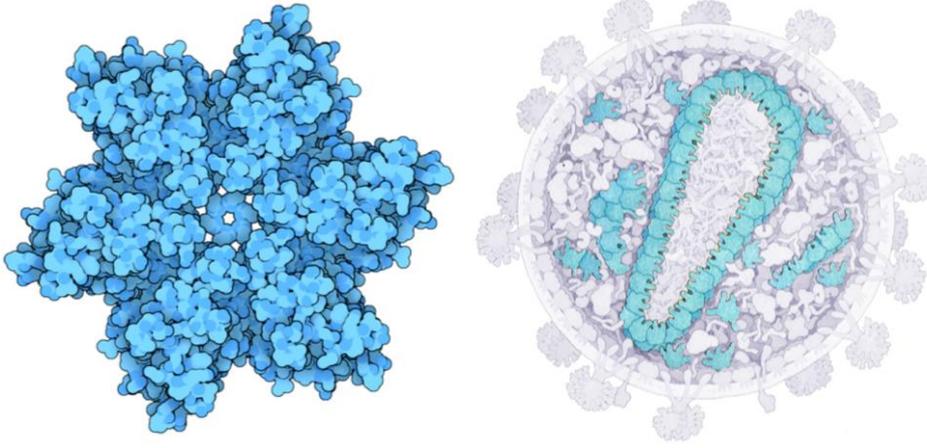


Şekil 2.5. Matriks proteininin trimerik yapısı ve matriks proteininin HIV-1'deki yerleşim yeri

Kapsid

gag geninin bir bölümü tarafından kodlanan kapsid proteini, viral RNA'nın etrafında koni şeklinde bir kılıf oluşturarak enfeksiyon sırasında onu hücreye iletirken korumakla görevlidir. Kararlı heksamerler oluşturmaktadır (**Şekil 2.6.**). Protein yapısı incelendiğinde 30 amino asitlik alfa heliks motif kompleksleri

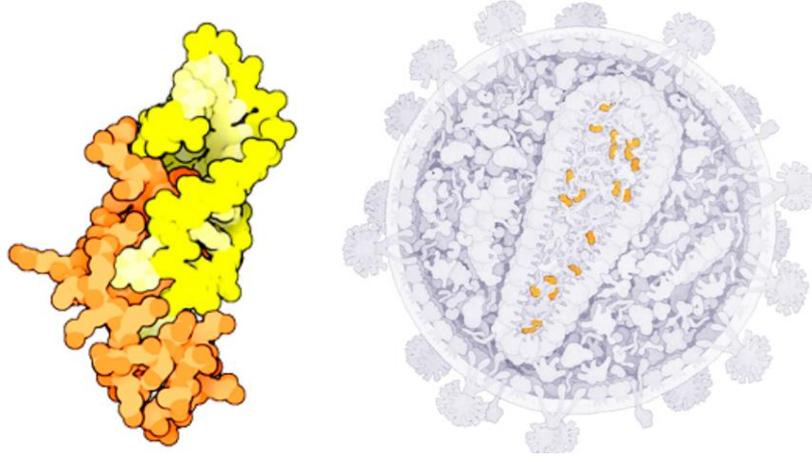
olduğu görülmüştür. Kapsid proteinleri merkezi kapsid kılıfını oluşturmak üzere birleşmektedir (Li ve Clercq, 2016).



şekil 2.6. Kapsid proteinin heksametik yapısı ve kapsid proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri

Nükleokapsid Proteini

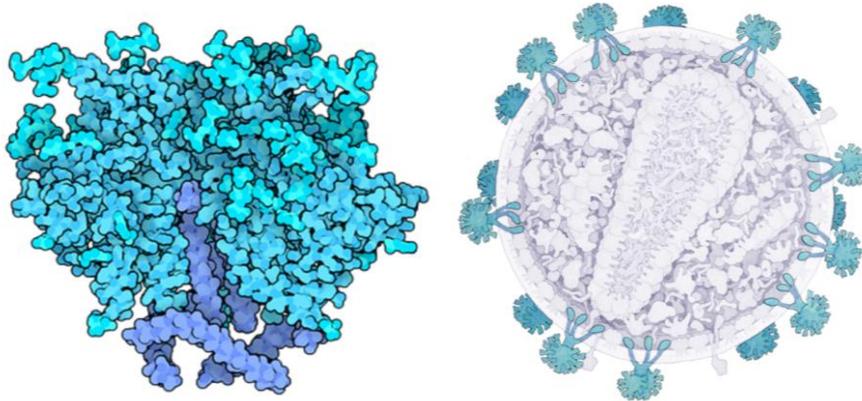
gag geninin bir bölümü tarafından kodlanan nükleokapsid proteini (**şekil 2.7**), viral RNA ile onu koruyan stabil bir kompleks oluşturmaktadır. Bu proteinin amino asit yapısı yüksek düzeyde korunmuş diziden oluşmaktadır. Nükleik asite bağlanma fonksiyonu olduğu düşünülmektedir. Ayrıca yapılan çalışmalarda nükleokapsid proteinin, RT, tat proteini ve integras proteini ile etkileşim halinde olduğu görülmüştür. RT ve tat proteinlerinin taşınmasında, integras proteinin ise DNA'ya bağlanmasına aracılık etmekle görevlidir (Li ve Clercq, 2016).



Şekil 2.7. Nükleokapsid proteini (turuncu) RNA (sarı) kompleksi ve nükleokapsid proteininin HIV-1'deki yerleşim yeri

Yüzeysel (SU) ve Transmembran Zarf (TM) Proteinleri

SU (gp120) ve TM (gp41) proteinleri (Şekil 2.8.), env geni tarafından kodlanmaktadır. SU proteini hedef hücredeki CD4 reseptörüne ve kemokin reseptörlerine bağlanmaktadır. TM proteinleri ise füzyon peptiti aracılığıyla füzyona dahil olmaktadır. gp120 ve gp41 proteinleri kompleks oluşturarak virüs yüzeyinde yer almaktadır. Protein kompleksinin, hücre yüzey proteinlerinin lokalizasyonunda önemli rol oynadığı düşünülmektedir. Bu kompleks konak hücrenin yüzey proteinleriyle etkileşime girerek virüsün konak hücreye girmesine yardımcı olmaktadır (Li ve Clercq, 2016).

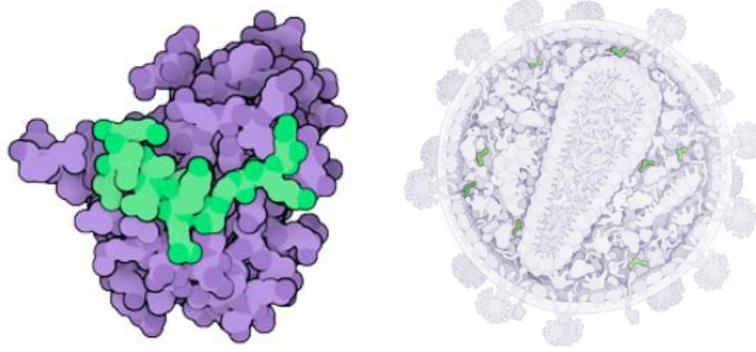


Şekil 2.8. SU proteini (mavi) TM proteini (mor) kompleksi ve zarf proteinlerinin HIV-1'deki yerleşim yeri

2.3.2. Yardımcı ve Düzenleyici Proteinler

Virion Enfektivite Faktörü (Vif)

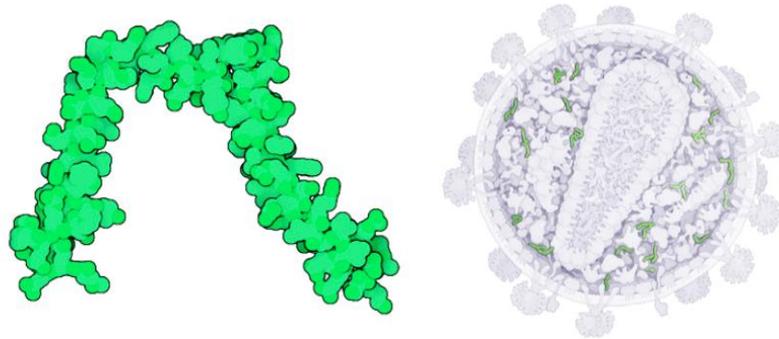
vif geni tarafından kodlanan Vif proteini (**Şekil 2.9.**), insan antiviral aktivite APOBEC3 protein grubunun etkinliğine karşı koymaktadır. HIV genomunu ile doğrudan etkileşim halinde olduğu bilinmektedir. Ayrıca Vif proteinin HIV genomunu hipermutasyona uğratabileceği düşünülmektedir (Sheehy ve diğerleri, 2002).



Şekil 2.9. Vif proteini (yeşil) insan antiviral aktivite proteini (mor) kompleksi ve vif proteinlerinin HIV-1'deki yerleşim yeri

Viral Protein R (Vpr)

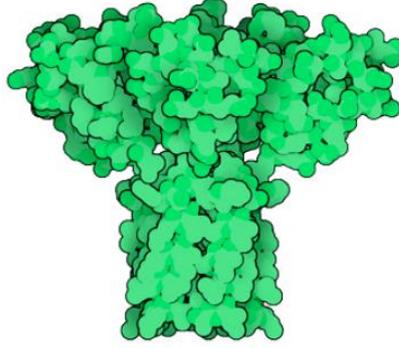
vpr geni tarafından kodlanan Vpr proteini (**Şekil 2.10.**), HIV'in hücre içerisine girdikten sonra, genomun konak hücre nükleusuna taşınmasına yardımcı olmaktadır. HIV ile enfekte hücrelerde G2 hücre döngüsünün durmasını indüklediği bilinmektedir (Heinzinger ve diğerleri, 1994).



Şekil 2.10. Vpr proteini ve Vpr proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri

Viral Protein U (Vpu)

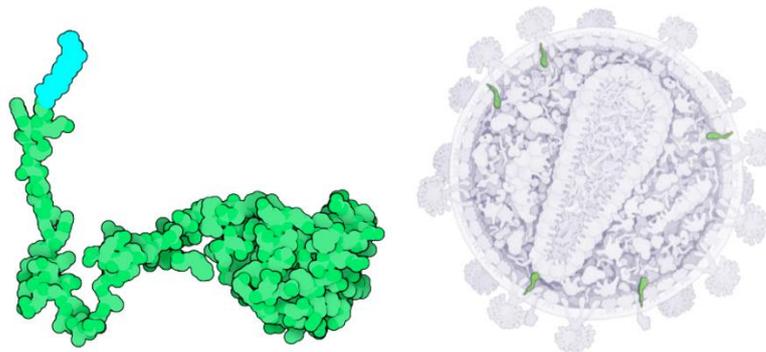
vpu geni tarafından kodlanan Vpu proteini (**Şekil 2.11.**), interferon kaynaklı kısıtlama faktörü olan Tetherin'e karşı etki ederek virüs partiküllerinin salınımını arttırdığı ve CD4 bozulmasını tetiklediği düşünülmektedir. Yapılan çalışmalarda vpu proteinin tetherin ile kompleks oluşturarak etki gösterdiği öne sürülmüştür (Van Damme ve diğerleri, 2008).



Şekil 2.11. Vpu proteinin yapısı

Negatif Regülasyon Faktör (Nef)

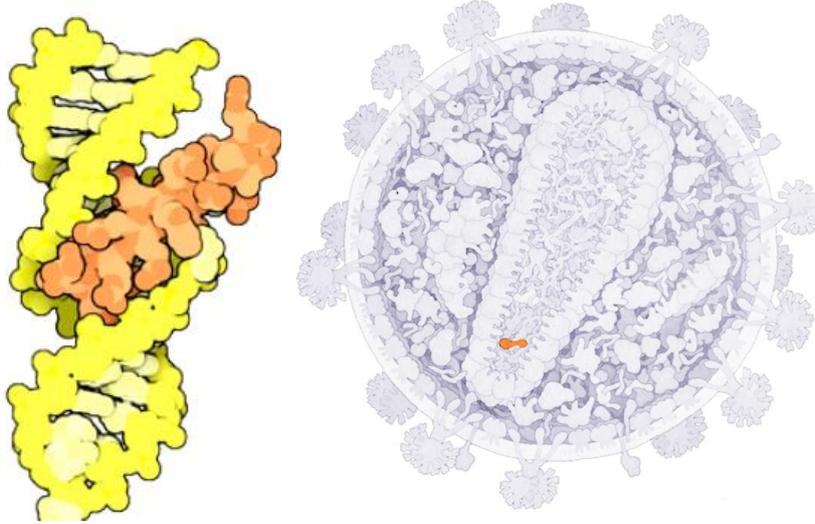
nef geni tarafından kodlanan Nef proteini (**Şekil 2.12.**), enfekte olmuş hücrenin, hücre savunmasında önemli olan proteinlerini üretmesini zorlaştırmaktadır. Nef proteini CD4+ T lenfositlerini ve MHC yapısını etkileyerek bunların aktivasyon ve sinyal yolunu baskılamaktadır. Nef proteini sayesinde immün sistemin baskılanması devam ederek, HIV pozitif bireyin AIDS tablosuna ilerlemesini sağlamaktadır (Li ve Clercq, 2016, Saksela ve diğerleri,1995). Nef proteinin RT, integraz ve proteaz enzimleriyle kompleks oluşturabildiği görülmüştür (Li ve Clercq, 2016).



Şekil 2.12. Nef proteinin yapısı ve NEF proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri

Viron Düzenleyici Protein (Rev)

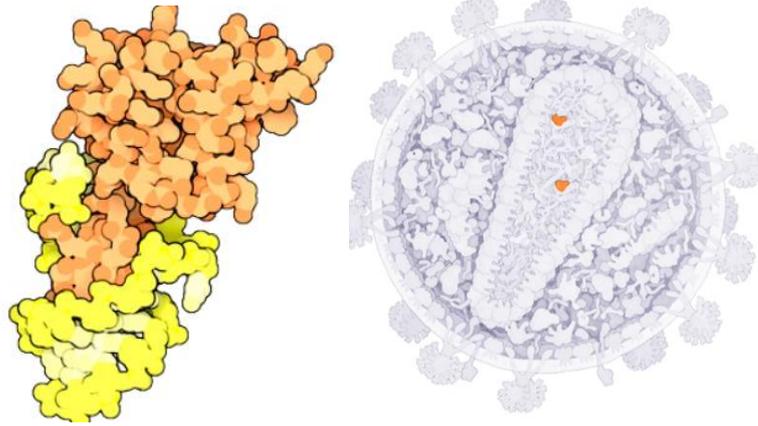
rev geni tarafından kodlanan Rev proteini (**Şekil 2.13.**), viral RNA'daki bir saç tokası motifine bağlanmaktadır. Viral RNA'nın çekirdekten dıŐa aktarılmasını ve viral genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesi sağlamaktadır (Hadzopoulou-Cladaras ve diğerleri, 1989). Ayrıca Rev proteini, Tat degradasyon kompleksini inhibe ederek Tat proteinlerinin ortamda bulunmasını sağladığı düşünülmektedir (Li ve Clercq, 2016).



Şekil 2.13. Viral RNA (sarı) ile Rev proteini (turuncu) kompleksi ve Rev proteinin HIV-1'deki yerleşim yeri

Trans-Aktivatör Transkripsiyon Proteini (Tat)

tat geni tarafından kodlanan Tat proteini (**Şekil 2.14.**), viral RNA'da sa tokası yapısına dahil olan bir diğer düzenleyici proteindir. Viral RNA'nın çekirdekten dıŐa aktarılması ve viral genlerin transkripsiyon sonrası düzenlenmesini sağlamakla görevlidir. Tat ve Rev proteinlerinin hem ayrı ayrı hem de birlikte viral RNA'yla etkileşimde olduğu analiz edilmiştir (Li ve Clercq, 2016).

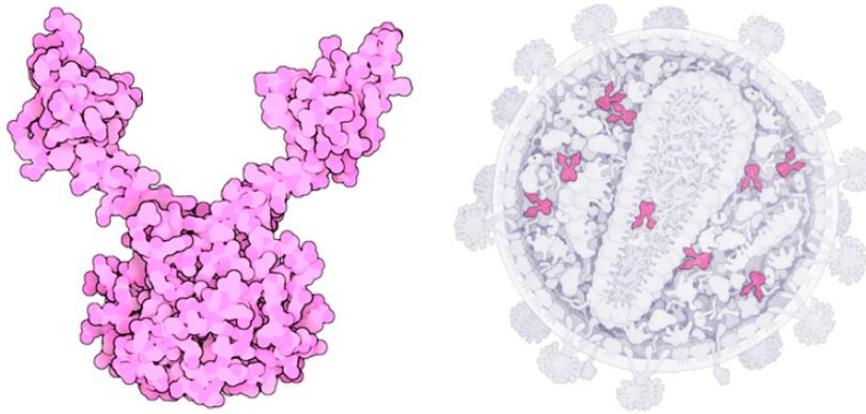


Şekil 2.14. Viral RNA (sarı) ile TAT proteini (turuncu) kompleksi ve TAT proteininin HIV-1'deki yerleşim yeri

2.3.3. Viral Enzimler

2.3.3.1. İntegraz

pol geninin bir bölümü tarafından kodlanan integraz (**Şekil 2.15.**), ters transkripsiyon sonucunda sentezlenmiş olan HIV genomunun, konak genomuna entegrasyonunu sağlamaktadır.



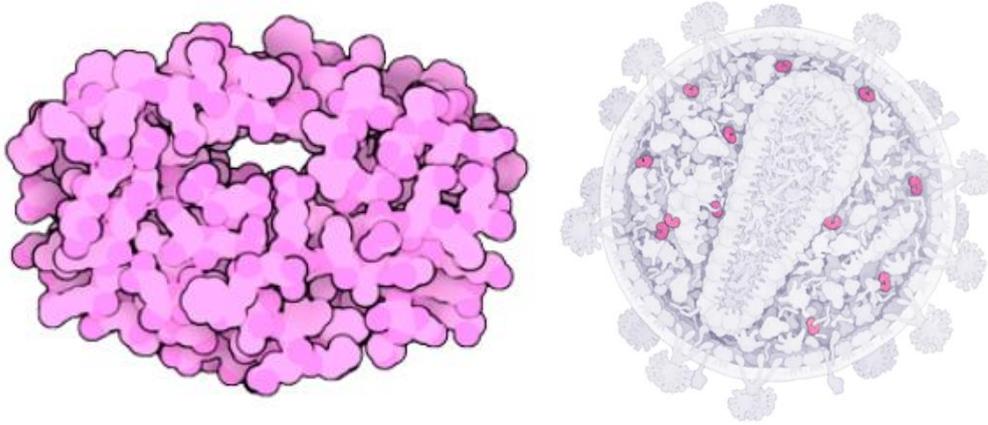
Şekil 2.15. Viral integraz ve integrazın HIV-1'deki yerleşim yeri

Dynein aracılı ters transkriptaz enziminin taşınmasında anahtar rol oynadığı bilinmektedir. İntegraz enzimi HIV'in genetik materyalini konak genomuna dahil etmektedir. Yalnızca genom entegrasyonunda değil aynı zamanda viral DNA sentezinin başlatılmasını ve uzamasını uyararak ters transkripsiyon enziminin polimerizasyona başlamasını sağlamaktadır. HIV enfeksiyonunun tedavisi için

integrazı bloke eden önemli antiretroviral ilaçlar geliştirilmiştir (Li ve Clercq, 2016, Bowerman ve diğerleri, 1989).

2.3.3.2. Proteaz

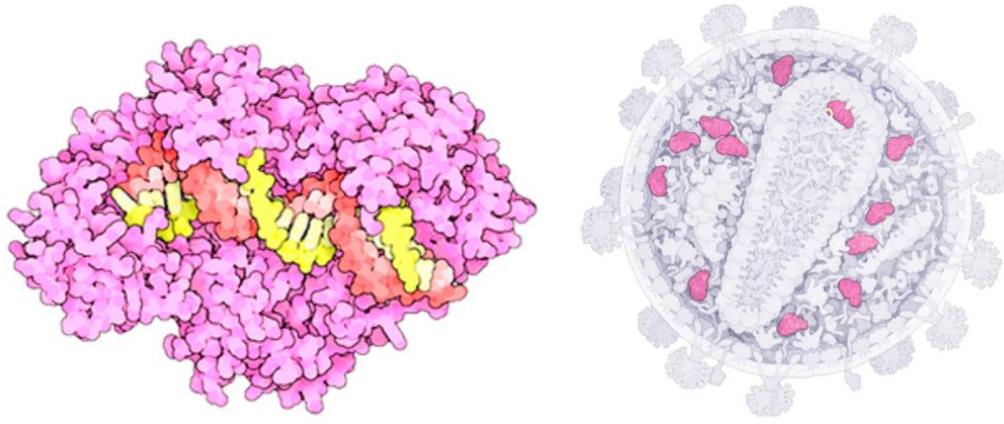
HIV proteaz (**Şekil 2.16.**), HIV partiküllerinin olgunlaşması için gereklidir. HIV poliproteinlerinin uygun uzunlukta fonksiyonel parçalara bölünmesini sağlamaktadır. Yapılan analizler proteaz enziminin her bir HIV proteini ile etkileşime girebildiği görülmüştür. Proteaz aktivitesinin viryon yapılarının oluşmasında en yüksek seviyede olduğu analiz edilmiştir (Li ve Clercq, 2016). Proteaz inhibisyonu sağlandığında viryon oluşumunun engellendiği görülmüştür. Proteaz inhibitörleri, genellikle ters transkriptaz ve integrazı bloke eden ilaçlarla kombinasyon halinde kullanılmaktadır (Briggs ve diğerleri, 2003).



Şekil 2.16. Viral proteaz ve proteazın HIV-1'deki yerleşim yeri

2.3.3.3. Ters Transkriptaz

Ters transkriptaz (Reverse Transcriptase, RT), p66 ve p51 alt birimlerinden oluşan, ortak bir amino ucunu paylaşan ve stabil bir asimetrik heterodimer yapıda bir enzimdir (Divita ve diğerleri, 1995) (**Şekil 2.17.**). p66 alt birimi iki fonksiyonel aktif bölgeyi barındırmaktadır. Bunlardan biri N-terminal RNA bağımlı DNA polimerazdiğeri ise RNA'yı parçalayan C-terminal RNaz H (RNase H) bölgesidir. RT enziminin yapısı; bağlantı bölgesi (connection reigon), parmaklar (finger), başparmak (thumb) ve avuç içi (palm) isimli 4 yapısal bölgeye ayrılarak incelenmektedir.



Şekil 2.17. Ters transkriptaz ve ters transkriptazın HIV-1'deki yerleşim yeri

p66, 560 amino asit, p51 ise 440 amino asitlik bir uzunluğa sahiptir. RT'nin kristal yapısının analizi, p66'nın farklı iki farklı fonksiyonel alan içerdiğini göstermiştir. Bunlar, polimeraz ve RNaz H alanlarıdır. Polimeraz alanı; parmaklar (1-85 ve 118-155 amino asitleri), avuç içi (86-117 ve 156-237 amino asitleri) ve başparmak (238-318 amino asitleri) alt alanlarından oluşan, sağ eli andıran karakteristik yüksek oranda korunmuş bir yapı olarak bilinmektedir. p66 alt birimi ayrıca bağlantı alt alanı (319-426 amino asitleri) ve RNase H (427-560 amino asitleri) alanını içermektedir (Kohlstaedt ve diğerleri, 1992, Jacobo-Molina ve diğerleri, 1993).

Nükleik asitin bağlanma bölgesi p66 alt biriminin avuç içi, başparmak, bağlantı ve p66'nın RNase H alt alanları tarafından oluşmaktadır. p51 alt birimi bağlantı ve başparmak alt alanları ile doğrudan etkileşim halindedir (London, 2019).

Ters çevirme işlemi, polimeraz aktivitesinin devamlılığını sağlayan nükleotidler veya tersine, onu destabilize eden inhibitörler olarak küçük moleküllerin varlığından etkilenebilmektedir (Rausch ve Grice, 2004).

DNA polimerizasyonu sırasında, p66 alt biriminin katalitik amino asitleri (Asp110, Asp185 ve Asp186) tarafından koordine edilen Mg^{2+} katyonları, DNA primer 3'-hidroksil grubunu aktive etmektedir. Substrat, 2'-deoksiribonükleozit 5'-trifosfat (dNTP) içindeki pentavalent alfa-fosfor ara durumunu stabilize etmektedir.

Polimerizasyon sırasında yeni bir baz takılmaktadır ve pirofosfat bölgeden ayrılmaktadır (Engelman ve diğeri, 2012).

Antiretroviral tedavi için ana hedeflerden biri olan RT; kristal yapı belirlemeleri, biyokimyasal tahliller ve in-silico çalışmalar sayesinde kapsamlı araştırmaların konusu olmuştur.

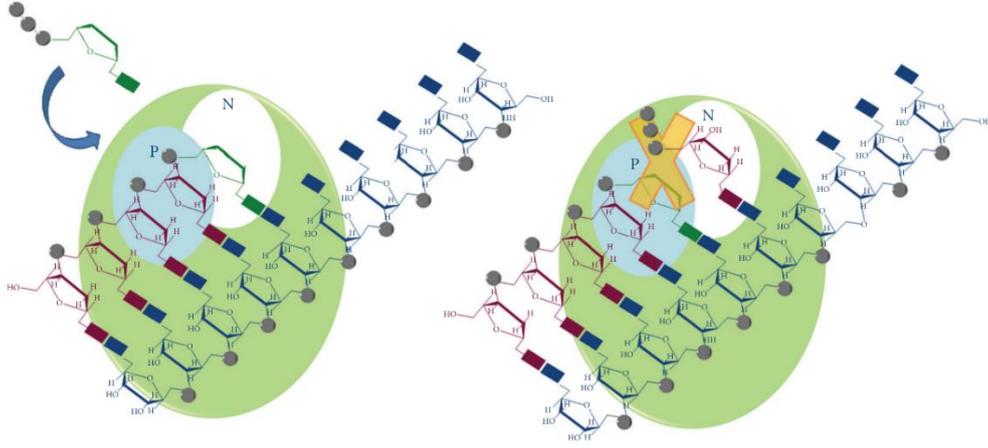
2.3.3.4. Ters Transkriptaz İnhibitörleri (RTI)

HIV-1 enfeksiyonu için kullanılan onaylanmış kombinasyon tedavilerde, iki farklı etki mekanizmasına sahipvardır inhibitörleri kombine bir şekilde kullanılmaktadır. Bu RT inhibitörlerinden birinci sınıf, nükleozid/nükleotid RT inhibitörleri (NRTI) olarak bilinen bileşikleri içermektedir. İkinci sınıf ise nükleozid olmayan RT inhibitörleri (NNRTI'ler) olarak bilinen bileşikleri içermektedir.

2.3.3.4.1. Nükleozit Ters Transkriptaz İnhibitörleri

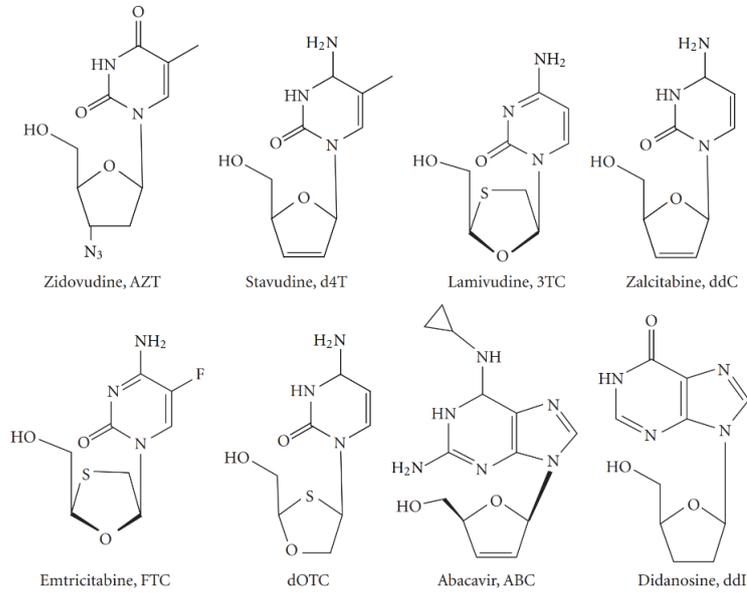
Tüm NRTI'ler aynı RT inhibisyon mekanizmasını takip etmektedir. Bu mekanizma, ilaç organizmada trifosfat formlarına getirildikten sonra, RT ile uzayan primere dahil edilmektedir. Doğal dNTP'lerle rekabet eder ve 3-hidroksil grubu eksikliğinden dolayı DNA sentezini sonlandırmaktadır. Bu nedenle, bir kez dsDNA'ya dahil edildiklerinde, sonraki nükleotidin dahil edilmesini önlemektedir (**Şekil 2.18.**).

Ayrıca, HIV-1 RT bu NRTI'leri substrat olarak kullanırken, hücrel DNA polimerazlar bu inhibitörleri aynı afiniteyle tanımamaktadır (Esposito ve diğeri, 2012). Klinik olarak mevcut ve onay almış, yapısal olarak hem pirimidin hem de pürin analoglarına benzeyen sekiz NRTI vardır. Pirimidin nükleozid analogları arasında timidin analogları olarak; zidovudin (AZT), stavudin (d4T) ve sitozin analogları olarak ise lamivudin (3TC) ve zalcitabin (ddC) vardır. Periferik nöropatiye yol açmaları nedeniyle emtrisitabin (FTC) ve tiasitidin (dOTC), önerilmeyen pirimidin nükleozid analogları arasındadır (**Şekil 2.19.**).



Şekil 2.18. Zincir sonlandırıcı olarak görev yapan RT inhibitörlerinin etki mekanizması (Esposito ve diğerleri, 2012 kaynağından alınmıştır).

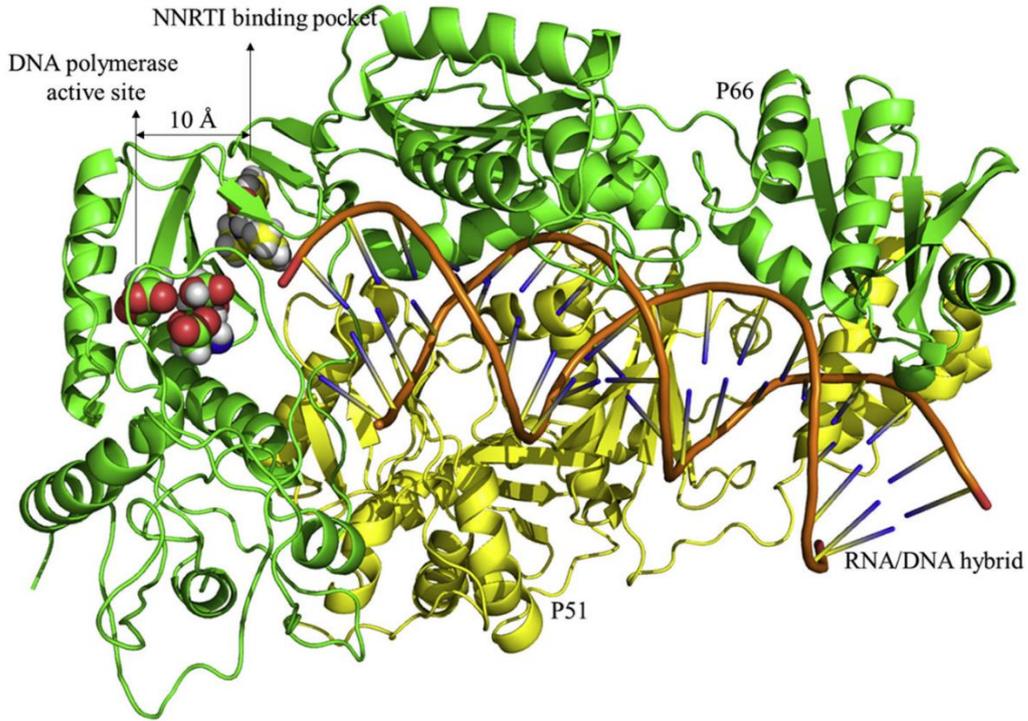
Purin nükleosid analogları arasında guanozin analogu olarak; abacavir (ABC) ve adenin analogu olarak ise didanosin (ddI) mevcuttur. Bu ajanlar, RT inhibe etmek için hücresel kinazlar tarafından trifosfat türevlerine fosforile edilmektedir (Esposito F. ve ark, 2012).



Şekil 2.19. Onaylanmış NRT inhibitörlerinin kimyasal yapıları (Esposito F. ve ark, 2012).

2.3.3.4.2. Non-nükleosit Ters Transkriptaz İnhibitörleri

Non-nükleosit (nükleosit olmayan) transkriptaz inhibitörleri, enzime geri dönüşümlü ve rekabetçi olmayan bir şekilde bağlanarak HIV-1 ters transkriptazı (RT) doğrudan inhibe etmektedir (**Şekil 2.20.**). NNRTI'ler, düşük genetik bariyere sahip ilaçlardır, yani RT genomundaki tek bir mutasyon, NNRTI'lerin monoterapi olarak kullanılmasını önleyerek yüksek düzeyde fenotipik direnç oluşturabilmektedir.



Şekil 2.20. RNA/DNA hibrit kompleksi ile HIV RT enzimi. DNA polimeraz aktif bölgesi ve NNRTI bağlanma bölgesi ok işaretiyle gösterilmiştir (Zhuang ve diğerleri, 2020).

Henüz tedavi almamış hastalarda, NNRTI'lerin nükleozidler ve/veya proteaz inhibitörleri ile kombine edildiğinde etkin olduğu gösterilmiştir. Yapılan pilot çalışmalar, NNRTI'lerin ikinci basamak tedavi olarak yararlı olabileceğini göstermiştir. Bununla birlikte, eğer yetersiz viral baskılama durumu görüldüyse bu bileşiklere dirençli virüsün hızla ortaya çıkması klinisyen tarafından

değerlendirilerek, ilaç rejimine farklı ajanlar eklenmesi önerilmektedir (Joly ve Yeni, 2000).

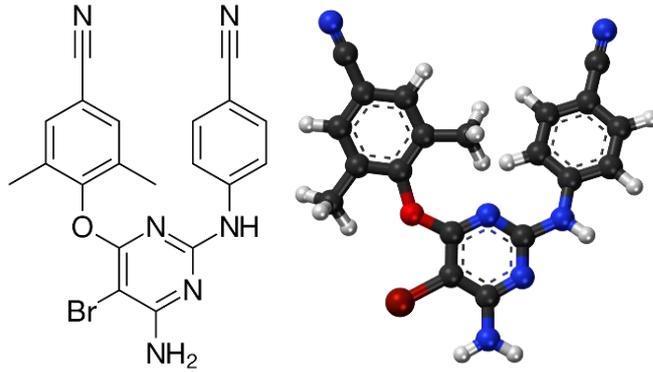
NNRTI'ler, DNA polimerizasyonunun allosterik inhibitörleridir. Bu bileşikler, polimeraz aktif bölgesinden yaklaşık 10 Å uzaklıkta bulunan hidrofobik bir cebe rekabetçi olmayan bir şekilde bağlanırlar, DNA sentezini bozan konformasyon değişikliklerine yol açarlar. DNA sentezi sırasında NNRTI'nin hidrofobik cepte olması, başparmağı (thumb) bölgesinin hareketliliğini sınırlayan ve polimerizasyonu önleyen açık bir konformasyona yol açarak replikasyonu inhibe etmektedir. Ayrıca NNRTI'ler, bazı amino asitlerle (Y181 ve Y188) rotamer konformasyonel değişiklikleri indükleyerek başparmak bölgesinin konformasyonu değiştirmektedir. Bu değişim sonucunda DNA sentezi engellenmektedir (Squires, 2001, Mehellou ve De Clercq, 2010).

NNRTI direnç mutasyonları, genellikle NNRTI bağlayıcı cep bölgesini çevreleyen amino asitlerden oluşmaktadır. Yüksek seviyeli direnç genellikle bu bölge içinde gelişen tek nokta mutasyonları ile ilişkilidir (özellikle kodon grupları 100 - 108 ve 181 - 190). Bir NNRTI kullanımının direnç sebepli başarısız olduğu durumlarda, direncin diğer NNRTI'lara da direnç olasılığı çok yüksektir. NNRTI'lar, viral replikasyonun baskılanmasını sağlamak için her zaman güçlü bir antiretroviral tedavinin parçası olarak kullanılmalıdır, böylece diğer enzimlere karşı dirençli varyantların replikasyonunu engellenmektedir (Joly ve Yeni, 2000).

Delavirdin (DLV), doravirin (DOR), efavirenz (EFV), etravirin (ETR), nevirapin (NVP) ve rilpivirin (RPV) şu anda HIV enfeksiyonu tedavisi için Gıda ve İlaç İdaresi (FDA) tarafından onaylanan NNRTI'dır. Hem tekli hem de diğer antiretroviral ilaçlarla kombinasyon halinde bulunan kapsül ilaçlar da bulunmaktadır.

Halihazırda mevcut olan NNRTI'ların (özellikle EFV ve RPV) başlıca dezavantajları, daha önce ART kullanmamış hastalarda NNRTI'ya dirençli viral suşların sık olmasıdır (Günthard ve diğerleri, 2018). Daha önce ART almamış hastalarda NNRTI bazlı bir rejime başlanmadan önce direnç testi yapılmalıdır. Tek bir mutasyonla tüm NNRTI'lere (ETR veya DOR hariç) yüksek düzeyde

direnç oluşabilir. RPV ile tedavi edilen hastalarda, virolojik başarısızlıkta RPV direnç mutasyonlarının varlığı, ETR-, DOR-, EFV- ve RPV-bazlı rejimler dahil olmak üzere diğer NNRTI'lere çapraz direnç kazandırabilir. Bu durum; “Belirli Durumlarda Önerilen Başlangıç Rejimleri” olarak kategorize edilmektedir (Cohen ve diğerleri, 2012).



Şekil 2.21. Etravirinin molekül yapısı.

Etravirin, NNRTI ailesinin bir parçası olan bir antiretroviral ilaçtır (**Şekil 2.21**). Daha önce tedavi görmüş, tedavisi başarısız olmuş veya diğer NNRTI dirençli HIV-1 suşlarına sahip yetişkin hastalarda kombine tedaviye dahil edilerek kullanılmaktadır. Etravirin, AIDS'i iyileştirmez veya HIV virüsünü tamamen ortadan kaldıramaz, ancak yeni virüslerin üretimini yavaşlatarak daha fazla hasarın oluşmasını engeller. Karaciğerde CYP450, CYP3A4, CYP2C9, CYP2C19 enzimleri tarafından metabolize edilir (Etravirine, Monograph Intelence™, 2009).

Etravirin, HIV-1 ters transkriptaz enziminin doğrudan inhibisyonu yoluyla etkilerini göstermektedir ve sonuç olarak polimeraz aktivitesini bloke eder. Etravirin, insan DNA polimeraz alfa, beta veya gammayı inhibe etmez. Bu sayede konak hücrenin sağlıklı döngüsünü değiştirmemektedir. Kullanımın yaygın yan etkileri arasında tedavinin ilk 6 haftasında hafif veya orta şiddette kızarıklık, mide bulantısı, ishal ve periferik nöropati yer almaktadır (Drug Bank: DB06414).

2.4. Düşük Düzey Viremi

Yapılan çalışmalarda, ART yaklaşımının HIV pozitif insanlarda, HIV bulaşmasını azaltmada oldukça etkili olduğu gösterilmiştir. ART kullanılan HIV enfeksiyonlu hastalar ve kanlarında saptanamayacak (HIV-undetectable) düzeyde HIV bulunan kişilerin cinsel yolla HIV bulaştırma riski yoktur (UNAIDS, 2018).

2007 ve 2016 yılları arasında, HIV pozitif bireyler ve tek eşli binlerce çift arasında cinsel yolla HIV bulaşmasına ilişkin üç büyük çalışma yapılmıştır. Çalışma sonuçlarına göre artık HIV-undetectable olan bireylerin korunma metotlarını uygulamadan cinsel ilişkiye girmelerinin, bulaş riski oluşturmadığı bildirilmiştir (Cohen ve diğerleri, 2011, Rodger ve diğerleri, 2016, Bavinton ve diğerleri, 2018). Küresel olarak, HIV pozitif bireylerin %47'si (%35-58) viral olarak baskılanmıştır (UNAIDS, 2018).

Tanıma bağlı olarak hastaların yaklaşık %10-30'unda standart ART ile, viral replikasyon tam olarak kontrol edilememektedir (Hermans ve diğerleri, 2018, Bernal ve diğerleri, 2018). Bu duruma düşük düzey viremi (LLV) adı verilmiştir. LLV'li bireylerin plazmasında düşük seviyede viral replikasyon görülmektedir. Bu vakalar arasında, ara sıra tespit edilen viremi, viral sıçrama (blip) olarak tanımlanırken, sürekli olarak tespit edilen viremi, kalıcı düşük seviyeli viremi (persisten LLV, pLLV) olarak bilinmektedir (Pereira ve diğerleri, 2019). LLV standartları, farklı yönergelerle göre büyük ölçüde değişiklik gösterebilmektedir. LLV durumu; DSÖ'ye göre 50-1000 kopya/mL, Avrupa AIDS Klinik Topluluğu'na (EACS) göre 20-50 kopya/mL, ülkemiz halk sağlığı rehberine göre ise 50-1000 kopya/ml olarak değerlendirilmektedir.

LLV'nin klinik önemi belirsizliğini korumaktadır ve özel bir klinik ilgi alanıdır. LLV'nin öneminin yorumlanmasındaki zorlukların çoğu, LLV tanımlarının tek tip olmaması ve virolojik başarısızlık dahil olmak üzere çeşitli çalışmalar arasındaki farklılıklardan kaynaklanmaktadır (Vardhanabhuti ve diğerleri, 2015, Li ve diğerleri, 2012). ART-Cohort Collaboration grubu tarafından 2015'te yapılan bir çalışmada, LLV 50–199 kopya/mL'nin virolojik başarısızlıkla ilişkili olmadığı belirlenmiştir (Vandenhende ve diğerleri, 2015). Nispeten geniş bir tanım

kullanarak, 200 - 1000 kopya/mlarasındaki LLV, tutarlı bir şekilde virolojik başarısızlık, viral evrim ve ilaç direncinin ortaya çıkması ile ilişkilendirilmiştir (Fleming ve diğerleri, 2019).

2.5. Antiretroviral Direnç

Gelişmekte olan tüm mikroorganizmalar, duyarlı suşlardan ziyade dirençli suşların seçici replikasyonu ile çevresel baskılardan kaçma eğilimindedir. Bu doğal seçim süreci, antimikrobiyal maddelere karşı bakteri direncinin iyi bilinen bir nedenidir. Doğal seçim, antiretroviral ajanlara maruz kalan HIV türleri arasında, diğer lentivirüslerde olduğu gibi, yüksek derecede genetik çeşitlilik ile ilişkilidir ve genetik çeşitlilik hızı yüksektir. Bu genetik çeşitliliğin altında yatan mutasyon eğilimi, ters transkriptaz hatalarının yüksek oranı, bu hataları düzeltecek mekanizmaların olmaması ve HIV'in hızlı replikasyon oranları ile ilgilidir. Bu durum, son derece heterojen bir "kopya" karışımının oluşumuna yol açmaktadır. Bu kopyalardan birinin bir veya daha fazla ajana dirençli olma olasılığı yüksektir.

Birincil mutasyonlar olarak adlandırılan mutasyonlar, genellikle etkilenen suşun viral replikasyon hızını yavaşlatır (düşük uygunluk). Sonuç olarak, belirli bir hastada tedaviden önce birincil dirençli virüslerin prevalansı genellikle düşüktür. Direnç mutasyonlarına sahip varyantlar, yarı tür karışımı içinde küçük azınlıklar oluşturmaktadır. Bununla birlikte, tedavi başlatıldığında, direncin ortaya çıkma hızı hem mutasyonun tedavi öncesi prevalansına hem de mutasyonun ART varlığında virüse sağladığı göreceli replikatif avantaja bağlıdır ve mutasyon biriktiren suşlar artmaya başlamaktadır. Replikasyonun yeniden başlaması, virüsün sadece diğer birincil mutasyonları değil, aynı zamanda replikasyon potansiyelini geri kazandıran ikincil mutasyonları da edinmesine izin vererek viral yükü arttırmaktadır. Birincil ve ikincil mutasyonlar, mevcut ajanın hedefi olan ters transkriptazı ve proteazı kodlayan genlerde meydana gelmektedir. Mutasyonun ortaya çıkma riski, tedavi altındayken gelişen viral yükün düzeyi ile ilişkilidir. Virüs, düşük konsantrasyonda viral RNA üreterek, daha yavaş çoğaldığında, direnç ortaya çıkma riski daha azdır. Aksine, yüksek bir viral yük, artan bir replikasyon oranı, daha yüksek bir dirençli suşun ortaya çıkma riski ile ilişkilendirilmektedir.

Bununla birlikte, optimal tedavi ve saptanabilir seviyelerin altındaki viral yük varlığında bile viral replikasyon asla tamamen durmamaktadır. Dirençli varyantların ortaya çıkması ne yazık ki kaçınılmazdır (Blaise ve diğerleri, 2002).

Stanford HIVDB, bir HTML veya otomatik web hizmeti aracılığıyla erişilebilen, halka açık, ücretsiz bir genotipik direnç yorumlama sistemini bulundurmaktadır. Yorumlama sistemi, sekans tabanlı çalışmaktadır. Kullanıcı sisteme sekansı yükledikten sonra sistem, her bir antiviral için dirençlilik raporu sunmaktadır. Bu sistem, HIV ilaç direnci konusunda ulusal ve uluslararası çalışmalar yürüten Dünya Sağlık Örgütü'nün HIV İlaç Direnci Ağı ve NIH-AIDS Klinik Araştırmalar Grubu ile veri alışverişinde bulunmaktadır. Ayrıca, en az 10.000 klinisyen, hastalara en uygun tedaviyi seçmek için her ay sistemin HTML arayüzünü kullanmaktadır (HIVDR Standford).

2.5.1. Etravirin Direnci

Dar spektrumlu NNRTI, tam çapraz direnç sağlayan tekli mutasyonların varlığı ve tekli mutasyonun dirençlilik etkisini arttıracak ikincil mutasyonlar sebebiyle, sınırlı etki göstermektedir. Bu yüzden, direnç sıklıkla görülmektedir. ETR, diğer NNRTI'lara direnç kazandıran çoğu mutasyonun varlığında bile HIV RT enzimine bağlanmaya izin veren konformasyonel esnekliğe sahip genişletilmiş spektrumlu bir NNRTI'dır. *In vitro* çalışmalar, ilaca yüksek düzeyde direnç sağlamak için çoklu mutasyonların gerekli olduğunu göstermiştir. ETR, hem daha önce tedavi almamış hastalarda hem de NNRTI'ya dirençli suşu olan bireylerin plazma viral yüklerinde, hızlı ve önemli bir azalma sağlamıştır. **Çizelge 2.2.**'de Stanford İlaç Direnci Veri Tabanı'nda ETR direnciyle ilişkili 7 amino asit tanımlanmıştır. Bunlar; L100, K101, E138, Y181, Y188, G190, M230 lokasyonlarıdır. Bu mutasyonların üç veya daha fazlasının varlığı, ETR'ye azalmış virolojik yanıt ile ilişkilendirilmiştir (Diphoko ve diğerleri, 2018).

Diphoko T ve arkadaşlarının 2018 yılında yapmış olduğu meta analiz çalışmasına göre Stanford veri tabanında yer almayan; V90I, A98G, L100V, K101H, V106A/I/M, V179D/E/F/I/L/M/T, Y181S, Y188C/H, G190C/Q/T/V, P225H, F227C

ve K238 N/T mutasyonlarının ETR direnci ile doğrudan ilişkili olabileceği düşünülmüştür (Diphoko ve diğerleri, 2018).

Çizelge 2.2. Klinik olarak anlamlı en yaygın NNRTI direncine yol açan mutasyonlar tablosu

	100 L	101 K	103 K	106 V	138 E	181 Y	188 Y	190 G	230 M
DOR	I	EP		AM		IV	L	SE	L
EFV	I	EP	NS	AM		CIV	L	ASE	L
ETR	I	EP			AGKQ	CIV	L	ASE	L
RPV	I	EP			AGKQ	CIV	L	ASE	L
NVP	I	EP	NS	AM		CIV	L	ASE	L

Çizelge 2.2.'de kalın kırmızı renkteki mutasyonlar, ilgili NNRTI'ya karşı en yüksek düzeyde azalmış duyarlılığı ifade etmektedir. Kalın yazılmış mutasyonlar: NNRTI duyarlılığını veya virolojik yanıtın azalmasıyla ilgilidir. Düz metindeki mutasyonlar: diğer NNRTI-direnç mutasyonları ile kombinasyon halinde, duyarlılığın azalmasına katkıda bulunan mutasyonlardır.

3. HOMOLOJİ MODELLEME VE MOLEKÜLER YERLEŞTİRME

3.1. Protein Modelleme Yöntemleri ve Programları

Global Protein Veri Bankası (Worldwide Protein Data Bank, wwPDB) (<https://www.wwpdb.org/>) deneysel olarak belirlenmiŐ 150.000 üzerinde proteinin üç boyutlu yapı verilerini içermektedir. Bu durum wwPDB'de depolanan protein üç boyutlu yapısından 736 katı kadar büyük bir protein sekans verisinin varlığını temsil etmektedir. Bilimsel gelişimlerle beraber protein dizilerinin sayısının, deneysel olarak belirlenmiŐ protein üç boyutlu yapılarının sayısından altı kat daha hızlı arttığı anlamına gelmektedir. Mevcut diziler ve belirlenen protein üç boyutlu yapıları arasındaki bu büyüyen fark gün geçtikçe daha da artmaktadır. Bu nedenle, mevcut dizilerin sayısı ile deneysel olarak çözümlenen protein üç boyutlu yapıları arasındaki bu genişleyen boşluğu doldurmak için hesaplamalı ve yapısal belirleme yöntemlerine ihtiyaç olduğu bilim insanları tarafından kabul edilmiştir (Berman ve diğeri, 2003, Agarwala ve diğeri, 2016).

1960 yılında miyoglobinin kristal yapısı çözümlenmesinden itibaren belirlenen üç boyutlu yapıların kalitesinde önemli ölçüde bir gelişme olmuştur. X-ışını kristalografisi ve NMR spektroskopisi gibi deneysel yöntemlerin kullanılmasıyla bu gelişmeler hız kazanmıştır. Ancak bu deneysel yöntemler her protein için kullanılamamaktadır. X-ışını kristalografisi için moleküllerin kristalize olması NMR analizi içinse protein moleküllerinin fazla kompleks olmaması gerekmektedir. Ayrıca bu yöntemler aylarca sürebilecek deneysel süreçleri barındırmaktadır. Bu nedenle, suda çözünür diğeri küçük proteinlere göre daha büyük proteinlerin saflaştırılması ve kristalizasyonundaki zorluklar nedeniyle büyük proteinlerin, özellikle de zar proteinlerinin yüksek çözünürlüklü üç boyutlu yapısında önemli ölçüde eksiklik vardır. Terapötik etken madde hedeflerinin önemli bir kısmını membran proteinleri oluşturduğu için, membran proteinlerinin belirlenmesindeki ilerlemeler ilaç keşif süreçlerine hız kazandırmaktadır. Burada, hesaplamalı protein üç boyutlu yapı tahmini çok önemli bir rol oynayacağı bilim insanları tarafından bildirilmiştir (Muhammed ve Akı-Yalçın, 2019).

Homoloji modelleme (karşılaştırmalı modelleme), çözümlenmiş bir proteinin şablonuna (template) dayalı olarak amino asit dizisinden üç boyutlu yapısını belirlemek için kullanılan hesaplamalı yapı tahmin yöntemlerinden sadece birisidir. Fonksiyonel proteinin üç boyutlu yapısı özellikle amino asit dizisi tarafından belirlenmektedir. Proteinlerin yapısındaki değişim, evrimsel süreçler sırasında sekans değişimine göre çok daha yavaştır. Sonuç olarak, benzer diziler benzer katlanmalar gösterir ve hatta düşük ilişkiye sahip diziler bile benzer katlanmaları gösterdiği bilinmektedir. Homoloji modelleme çalışmaları, hesaplamalı yapı tahmin yöntemlerinin en doğrusu olarak kabul edilmektedir (Cavasotto, 2009, Werner ve ark, 2012). De novo tahmin ve iç parçacığı oluşturma gibi hesaplama yöntemleriyle yapılan üç boyutlu yapı tahminleri, önemli bir kriter olarak kök-ortalama-kare sapması (RMSD) kullanılarak homoloji modellemesi ile karşılaştırılmaktadır. Homoloji modellemenin diğer yöntemlere oranla en yüksek doğrulukla üç boyutlu yapıları sunduğu bulunmuştur (Werner ve ark, 2012). Ayrıca net ve standart adımlarla daha az zaman ve daha düşük maliyet gerektiren bir protein üç boyutlu yapı tahmin yöntemidir. Bu nedenle, homoloji modelleme, proteinlerin yüksek kalitede üç boyutlu yapılarının üretilmesi için en yaygın kullanılan yöntemdir. Bu durum ilaç etken maddelerinin keşif sürecinde yapıya dayalı moleküler yerleştirme (docking) ve sanal tarama yöntemlerini geliştirmiştir.

Homoloji modelleme tekniği ile oluşturulan modellerin süreci temelde beş adımdır (Vyas ve diğerleri, 2012). Bunlar;

1. Hedef diziyile ilgili en uygun şablonun elde edilmesi (bu şablonlar global veri tabanı olan wwPDB yer almaktadır.),
2. Hedef dizi ile şablon olarak kullanılan dizinin hizalanması,
3. Üç boyutlu model koordinatlarının seçilen şablondaki koordinatların temel alınarak hizalanması (bu adımda şablon koordinatları üzerine hedef koordinatlar çakıştırılmaktadır ve değişken bölgeler farklı modeller gözetilerek tasarlanmaktadır.),
4. Mutasyona uğramış yan zincirler ve stereokimyasal özellikler göz önüne alınarak rotamerlerle değiştirilmesi,

5. Validasyon işlemi ile homoloji modelinin son hali tasarlanmaktadır. Bu düzen yazılımların sunduğu ileri düzey algoritmalarla sağlanmaktadır. Biyoinformatik programlardan biri olan SWISS-MODEL bu sıralamayı takip eden yazılımsal algoritma ile hedef proteinin modellenmesini sağlamaktadır (Berman ve diğerleri, 2000, Arnold ve diğerleri, 2006, Fiser ve diğerleri, 2000).

Elektron yoğunluğu açısından çözünürlük terimi, bir molekülün yoğunluk haritasındaki çözünürlüğünün ölçüsüdür. **Çizelge 3.1.**'de moleküller için kullanılan çözünürlük tanımları yer almaktadır (Huang, 2007).

İsviçre Biyoinformatik Enstitüsü (SIB), biyolojik ve biyomedikal veri saklama ve işleme alanlarında uluslararası alanda tanınan ve kâr amacı gütmeyen bir kuruluştur. Biyoçeşitlilik, evrimsel gelişim ve tıp gibi birçok farklı alanda bilgi yaratma ve karmaşık soruları çözümlere dönüştürme konusunda adımlar atmaktadır. Ayrıca bu oluşum temel verileri sunan banka ve yazılım platformları, veri yönetimi, yazılım mühendisliği ve biyo-kürasyon hizmetlerinin yanı sıra hesaplamalı biyoloji bilgisi ve eğitimi sağlamaktadır.

Çizelge 3.1. Çözünürlük değerleri ve açıklamaları (Huang, 2007).

Çözünürlük (Å)	
>4.0	Üç boyutlu koordinat noktaları yanlış olabilir. İkincil yapı elementleri belirlenebilir.
3.0 – 4.0	Katlanmalar doğru olabilir fakat hata oranı yüksektir. Birçok yan zincirler yanlış yerleşmiş ve * rotameri yanlış olabilir.
2.5 – 3.0	Katlanmalar beklendiği gibi doğrudur bazı yapısal zincirlerde hata olabilir. Birkaç zayıf yan zincirler (lys, glu, gln, vb.) ve küçük zincirler hatalı rotamer gösterebilir.
2.0 – 2.5	Aynı 2.5 – 3.0 gibidir fakat yan zincirlerin rotamer hataları oldukça düşüktür. Katlanmalar ve yapısal zincirler genellikle doğrudur ve hata var ise çok düşüktür. Su molekülleri ve ligandlar görülebilir.
1.5 – 2.0	Çok az hatalı rotamer vardır. Oldukça az hata belirlenir. Katlanmalarda çok nadir hata görülür.
< 1.5	Genellikle yapıların neredeyse hiç hatası yoktur. Yapının atomları çözülebilir.

- Rotamer: büyük moleküllerin sahip olduğu yan zincirlerin en kararlı, düşük enerjili konformasyonlarına verilen isimdir.

3.2. Moleküler Yerleştirme (Docking), Protein Ligand Etkileşim Analizi ve Kullanılan Programlar

Bilgisayar teknolojisindeki son gelişmeler ve giderek artan sayıda terapötik hedef üzerinde mevcut olan yapısal, kimyasal ve biyolojik verilerin hızlı artışı göz önüne alındığında, kemo-informatik moleküler yerleştirme ve yapay zeka ile *in silico* kullanımının önemli ölçüde arttığı ve geliştiği yapılan çalışmalarla gösterilmektedir. *In silico* yaklaşımlar artık uygun bir sürede milyonlarca bileşiğin sanal olarak taranmasını mümkün kılmaktadır, böylece ilaç geliştirme çalışmalarının maliyetlerini azaltmakta ve istenen ilaç adaylarını bulma şansını arttırmaktadır (Pinzi ve Rastelli, 2019).

Çoğu yapı tabanlı ve ligand tabanlı yaklaşımlar olarak sınıflandırılan, ilaç keşif çalışmalarını kolaylaştırmak için çeşitli moleküler modelleme teknikleri mevcuttur. Yapı tabanlı yöntemler, ilgilenilen bir hedefin üç boyutlu yapı bilgisinden elde edilen verilere dayanır ve belirli bir hedef için ligandların yapısal ve elektronik tamamlayıcılığına göre molekül veri tabanlarının sıralanmasına izin vermektedir. Bu bağlamda, moleküler yerleştirme, moleküller ve biyolojik hedefler arasında meydana gelen etkileşimleri tahmin etmeye yardımcı olan en popüler ve başarılı yapıya dayalı *in silico* yöntemlerden biridir. Bu işlem genellikle, önce bir reseptör içindeki bir ligandın moleküler oryantasyonunu tahmin ederek ve ardından bir puanlama fonksiyonu kullanılarak tamamlayıcılıklarını tahmin etmesiyle gerçekleştirilmektedir (Pinzi ve Rastelli, 2019, Kitchen ve diğerleri, 2004).

1970'lerin ortalarında ilk ortaya çıkışından bu yana, moleküler yerleştirme, kimyasal bileşiklerin moleküler hedefleriyle nasıl etkileşime girdiğini anlamaya ve ilaç keşfi ve geliştirmeye yardımcı olmak için önemli bir araç olduğunu kanıtlamıştır. Ligand-reseptör bağlanması için gerekli yapısal belirleyicileri tanımlamak ve daha doğru kenetleme yöntemlerinin geliştirilmesini bildiren çalışmaların sayısı, ilk ortaya çıkışından bu yana büyük ölçüde artmıştır (Kitchen ve diğerleri, 2004). Aslında, ilk olarak büyük ve küçük moleküller arasındaki moleküler tanımayı araştırmak için geliştirilmiş olmasına rağmen, şimdi tam bölge belirleme ve optimizasyon, ilacı yeniden konumlandırma, sonradan hedef belirleme (ters tarama) çok hedefli ligand tasarımı ve yeniden konumlandırma gibi

ilaç keşif programlarının farklı görevlerine yardımcı olmak için yaygın olarak kullanılmaktadır (Shoichet ve diğerleri, 2002, Ferreira ve diğerleri, 2015, Kinnings ve diğerleri, 2009).

Özellikle, bu tekniğin kullanımı, yerleştirme algoritmalarının iyileştirilmesi, ligandlar ve hedefler hakkında kamuya açık bilgilerin artmasıyla tetiklenen yeni ilaç keşif çalışmalarını hızlandırmıştır. Geliştirilmiş hız ve tahmin gücü sayesinde, moleküler yerleştirme ile ilişkili büyük ölçüde tarama algoritmalarının gelişmesini, örneğin: (i) ligandların bağlanabileceği protein bağlama bölgelerinin spesifitesini (Hazarika ve diğerleri, 2018); (ii) bilinen ligandların yeni moleküler hedeflerinin bulunmasını (Lí ve diğerleri, 2006); (iii) potansiyel advers ilaç reaksiyonları (LaBute ve diğerleri, 2014) ve; (iv) belirli bir hedefe veya bir dizi istenen hedefe karşı aktif olan yeni ligandların tasarlanmasını sağlamıştır (Lyu ve diğerleri, 2019).

Son yirmi yıl içinde hem akademik hem de ticari amaçlar için 60'tan fazla farklı moleküler yerleştirme aracı ve programı geliştirilmiştir. Bunlar; DOCK (2003) AutoDock (2002), FlexX (1996), Surflex (2003), GOLD (1997), ICM (2003), Glide (2004), Cdocker, LigandFit (2003), MCDock, FRED (2003), MOE-Dock (2012), LeDock (2013), AutoDock Vina (2010), rDock (2014), UCSF Dock (2015) ve diğerleridir. 2016 yılında Wang ve arkadaşlarının yapmış olduğu bir çalışmada hem ticari hem de akademik amaçla kullanılan bu programlarda doğruluğu en yüksek olan ilk üç programın AutoDock Vina, GOLD, ve MOE-Dock programları olduğu tespit edilmiştir. Genel olarak, son zamanlarda bu yerleştirme programlarının, ortalama 1,5 ila 2 Å arasında kök-ortalama-kare sapmaları (RMSD'ler) ile deneysel pozları tahmin edebildiği bildirilmiştir. Bununla birlikte, esnek alıcı yerleştirme, özellikle alıcılardaki omurga esnekliği, mevcut yerleştirme yöntemleri için hala büyük bir zorluk teşkil etmektedir (Pagandala ve diğerleri, 2017).

AutoDock Vina

AutoDock programının AutoDock Vina adlı yeni tasarlanmış ve uygulanmış bir sürümü piyasaya sürülmüştür. Bu sürüm, önceki ampirik puanlama işlevini ve

GA-tabanlı optimize algoritmayı kaldırıp onun yerine yerel optimizasyon için Monte Carlo örnekleme tekniği ve Broyden-Fletcher-Goldfarb-Shanno (BFGS) yöntemiyle yeni bir bilgiye dayalı puanlama işlevini benimsemiştir. Simülasyon sonuçları, hem tahmin doğruluğunda hem de yerleştirme süresinde önemli bir gelişme göstermiştir. PSOVina, AutoDock Vina çerçevesindeki ilk PSO (parçacık sürüsü optimizasyonu) protein-ligand yerleştirme algoritmasıdır. Vina'nın verimli yerel iyileştiricisinin standart PSO prosedürüne dikkatli bir şekilde entegre edilmesi ve parametrelerin uygun şekilde ayarlanması sayesinde PSOVina, yerleştirme doğruluklarından ödün vermeden %51-60 oranında dikkate değer bir yürütme süresinde azalma elde etmiştir (Pagandala ve diğerleri, 2017).

AutoDock Vina, moleküler yerleştirme yapmak için açık kaynaklı bir programdır. Başlangıçta Dr. Oleg Trott tarafından Scripps Araştırma Enstitüsü'ndeki Molecular Graphics Lab'de (şimdi CCSB) tasarlanmış ve uygulanmıştır.

AutoDock Vina'nın farklı bir sürümü olan CB-Dock, bağlanma bölgelerini otomatik olarak tanımlayan, merkezi ve boyutu hesaplayan, yerleştirme kutusu boyutunu sorgu ligandlarına göre özelleştiren ve ardından AutoDock Vina ile moleküler yerleştirmeyi gerçekleştiren bir protein-ligand yerleştirme yöntemidir. Büyük ölçekli kıyaslamalar, boşluk odaklı yanaşmanın kör yanaşmanın isabet oranını ve doğruluğunu artırabileceğini göstermektedir. Buna göre CB-Dock, eğrilik tabanlı boşluk algılama yaklaşımını (CurPocket) kullanarak hedef proteinlerin bağlanma bölgelerini ve AutoDock Vina'yı kullanarak sorgu ligandlarının bağlanma pozlarını tahmin ederek yerleştirme prosedürünü kolaylaştırmakta ve doğruluğu arttırmaktadır.

CB-Dock, bir proteinin tüm yüzeyi yerine tahmin edilen bölgelerde kör yerleştirme gerçekleştirmek üzere tasarlanmıştır. Bu nedenle, ilk adım varsayılan bağlanma yerlerini tespit etmektir (boşluk tespiti). Ligand bağlama bölgeleri genellikle daha büyük boşluklar olduğundan, analiz için birçok farklı bölgede boşluk seçilmektedir ve seçilen boşluklar sıralanmaktadır (boşluk sıralama). Ardından yerleştirme merkezini hesaplanmaktadır ve yerleştirme kutusu boyutu ayarlanmaktadır. Bu parametreler, AutoDock Vina (Merkez ve Boyut) ile moleküler yerleştirme için gereklidir. Yerleştirme işlemi bittikten sonra, bağlı pozlar yerleştirme puanına

(Dock ve Rerank) göre yeniden sıralanmaktadır. İlk konformasyon, en iyi bağlanma pozu olarak kabul edilip, karşılık gelen bölge, sorgu ligandı için en uygun bağlanma bölgesidir (CB Dock, 2022).

Protein ligand etkileşim analizi etken madde ile proteinin amino asitlerinin etkileşimlerini incelemektedir. Liganda yer alan bağlanma bölgesi atomları, hidrofobik atomlar, aromatik halkalar, hidrojen alıcı (acceptors) ve donör (donor) bağ, yüklü gruplar, halojen alıcı ve donör bağ bölgelerinin analizinden sonra amino asitlerle hidrofobik etkileşimleri, hidrojen bağları, π etkisi/etkileşimleri (π -Stacking), π -katyon (π -Cation) etkileşimleri, tuz köprüleri, su köprüleri, halojen bağları, metal kompleks etkileşimleri analiz edilmektedir.

Çizelge 3.2. Etkileşimler ile ilişkili limit bilgileri

Etkileşimler	Limit Bilgileri
Bağlanma uzaklığı	Bağlanma bölgesi atomlarının en fazla uzaklığı 7.5 Å olmalıdır.
Hidrofobik etkileşim	Karbon atomları arasındaki en fazla uzaklık 4.0 Å olmalıdır.
Hidrojen bağı uzaklığı	Alıcı ve verici atomlar arasındaki hidrojen bağı uzaklığı en fazla 4.1 Å olmalıdır.
π etkileşimi uzaklığı	Halka ile atom arasındaki uzaklık en fazla 5.5 Å olmalıdır.
π katyon etkileşimi uzaklığı	Aromatik halka ile yüklü atom arasındaki uzaklık en fazla 6.0 Å olmalıdır.
Tuz köprüleri uzaklığı	İki merkez arasındaki tuz köprüleri uzaklığı en fazla 5.5 Å olmalıdır.
Halojen bağı uzaklığı	Oksijen ve halojen arasındaki uzaklık en fazla 5.5 Å olmalıdır.
Su köprüsü uzaklığı	Polar atom ve sudaki oksijen arasındaki uzaklık en az 2.5 Å en fazla 4.1 Å olmalıdır.
Metal iyon uzaklığı	Metal iyon ve etkileşimde olduğu atom arasındaki uzaklık en fazla 3.0 Å olmalıdır.

Hidrofobik etkileşimler atomlar arasındaki çekici kuvvetlerden ziyade entropik değişimlerden kaynaklandığı için hidrofobik birlikteliklerin net geometrileri belirli değildir. Hidrofobik atomlar arasındaki gözlemlenen çekim, aralarındaki mesafeye üssel olarak bağımlıdır.

Hidrojen bağları, hidrojen bağ donörü ve alıcısı arasında geometrik yakınlık sağlandığında kabul edilebilir. Genel olarak, bir hidrojen bağ donörü yalnızca bir

hidrojen bağına katılabilirken, alıcı atomları birden fazla hidrojen bağı partneri olabilir (Adasme ve diğerleri, 2021).

İki aromatik halka arasındaki **π -etkileşimi**, merkezler arasındaki uzaklık en fazla 5.5 Å olmalıdır ve aralarındaki açı 90° veya 180°'lik optimal açıdan daha fazla sapma gösteremez.

π -Kasyon etkileşimleri, pozitif yük ve aromatik bir halkanın her bir etkileşimi için, yük merkezi ve aromatik halka merkezi arasındaki mesafe 5.5 Å azsa kabul edilmektedir. Ligandın üçüncül amininden oluşan bir muhtemel π -kasyon etkileşimi durumunda, ek bir açı kriteri uygulanır ve hesaba dahil edilmektedir.

Zıt yüklerin iki merkezi arasında **tuz köprüleri** oluşmaktadır. Bu zıt yükler arasındaki mesafe en fazla mesafe 5.5 Å olmalıdır (Dill ve diğerleri, 2003, Adasme ve diğerleri, 2021).

Amino asit reziduları birden fazla su molekülü ile birleştirilebilirken, bu alandaki hesaplama için yalnızca bir su molekülü aracılığıyla ligand ve protein atomlarının hidrojen bağı ile birleştirilmesi durumu düşünülmektedir. **Su köprüleri**, hidrojen bağı vericisi/alıcısı çiftlerinin su oksijenine olan mesafeleri 2.5 Å ve 4.1 Å arasındaki ligand ve protein atomları arasında konumlandırılmalıdır. Standart hidrojen bağlarıyla benzer şekilde, bir su molekülü sadece iki hidrojen bağı vericisi olarak katılabilir. Bir su molekülü için birden fazla mümkün hidrojen bağı varsa, su açısına en yakın iki kontak tutulur ve diğerleri hesaplanmamaktadır.

Halojen bağları, oksijen ve halojen atom arasında kurulmaktadır. Halojen bağı alıcısı ve donör grubunun birbirine olan mesafesinin 5.5 Å az olması ve donör ve alıcı grubundaki açıların 120° ve 165° olması durumunda kabul edilmektedir. Açısal sapma fazla 165° olmamalıdır.

Metal iyonları etkileşimi, metal iyonları ve proteinlerdeki olası etkileşen gruplar sistin (S), histidin (N), asparajin, glutamik asit, serin, treonin ve tirozin yan zincirleri ile tüm ana zincir oksijenleri olarak hesaplanmaktadır. Ligandlardaki alkol, fenolat, karboksilat, fosforil, tiyolat, imidazol, pirol ve özel bir

konumlandırma olarak demir-sülfür kümesi grupları metal iyon etkileşimine dahil edilmektedir. Bir metal iyonuna 3.0 Å mesafesine kadar olan tüm gruplar dikkate alınmaktadır (Adasme ve diğerleri, 2021).

Kovalent olmayan etkileşimlerin gücünü sıralamak, basit bir iş değildir, çünkü bu etkileşimlerin gücü, belirli bağlam ve meydana geldikleri ortam da dahil olmak üzere çeşitli faktörlere bağlı olacaktır düşünülmektedir. Bununla birlikte, bazı genel eğilimler gözlemlenebileceği literatüre geçmiştir. Genel olarak, hidrojen bağlarının elektrostatik yapıları ve yön özgüllükleri nedeniyle van der Waals etkileşimlerinden daha güçlü olduğu kabul edilmektedir. Hidrofobik etkileşimler ayrıca, özellikle sulu ortamlardaki hidrofobik etki bağlamında nispeten güçlü olacaktır düşünülmektedir. Polar olmayan moleküllerin stabilitesine ve hidrofobik etkiye katkıda bulunabilmelerine rağmen, karbon-hidrojen bağlarının tipik olarak nispeten zayıf olduğu kabul edilmektedir. Olumsuz donör-donör ve pi-sigma etkileşimlerinin gücü, belirli bağlama bağlı olarak büyük ölçüde değişebilmektedir.

Bu nedenle, bu etkileşimlerin güçlüden zayıfa olası bir sıralaması şöyle olabileceği düşünülmektedir:

1. Hidrojen bağları
2. Hidrofobik etkileşimler
3. Van der Waals etkileşimleri
4. Karbon-hidrojen bağları
5. Donör-donör etkileşimleri
6. Pi-sigma etkileşimleri

Bu sıralamanın kesin olmadığı ve kovalent olmayan etkileşimlerin gücünün çeşitli faktörlere bağlı olabileceği literatürde belirtilmektedir (Dill ve diğerleri, 2003, Gromski ve diğerleri 2005, Zhang ve diğerleri, 2006, Okazaki ve diğerleri, 2008).

4. MATERYAL VE YÖNTEM

Tez çalışmasının amacı; bazı düşük düzey viremi suşlarında tespit edilen, HIV-1 RT enziminde etravirine karşı dirençlilik durumu belli olmayan mutasyonların dirençlilik durumunun araştırılmasıdır.

1. Sekans analizi yöntemi kullanılarak HIV-1 RT enziminin sekans verilerinin elde edilmesi ve mutant tip sekans verilerinin düzenlenmesi
2. İnternet tabanlı biyoinformatik aracı olan Swiss Model Programı ile HIV-1 RT enzimlerinin (yabanıl ve mutant tipler) homoloji modellerinin oluşturulması
3. Elde edilen üç boyutlu modellerin görselleştirici araçlar olan UCSF Chimera (1.9) programı ile incelenmesi.
4. Homoloji Modellerinin CB Dock Programı ile Moleküler Yerleştirmelerinin yapılması ve *in-silico* dirençlilik durumlarının tespiti
5. Protein Ligand Etkileşim Analizinin yapılması
6. Hücre Kültürü Çalışması

4.1. Sekansların Düzenlenmesi

T.C. Halk Sağlığı Ulusal HIV/AIDS ve Viral Hepatitler Referans Laboratuvarı arşivlerinden; düşük düzey viremi durumu kanıtlanmış ve Stanford HIV İlaç Direnci veri tabanından etravirine dirençli olmadığı bilinen HIV RT enzim sekans verileri aminoasit FASTA formatı şeklinde alınmıştır. Alınan sekanslardan 9 tanesi potansiyel dirençli suş olarak seçilmiştir. Aşağıdaki tabloda (**Çizelge 4.1.**); sekans analizi sonucu Etravirin-RT etkileşim bölgesine yakın olan (1-15.0 Å uzaklığındaki) mutant suş sekansları yer almaktadır. Biyoinformatik çalışmalarımızın hepsinde yabanıl tip için NCBI- 1BQM erişim numaralı sekans dizisi temel alınarak kullanılmıştır.

Çizelge 4.1. Yabanıl ve Mutant Tip suşların sekans verileri. Suşlarda görülen mutasyonlar sarı ile boyanmış, dirençli olduğu düşünülen mutasyonlar kalınlaştırılmıştır.

Yabanıl Tip

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPL
DEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNPDI
YQYMDDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWT
VQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIVRQLSKLLRGTKALTEVIPLTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNT
PLVKLWYQLEKE

K104Q

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPL
DEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNPDI
YQYMDDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWT
VQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIVRQLSKLLRGTKALTEVIPLTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNT
PLVKLWYQLEKE

V179I

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPL
DEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNPDI
YQYMDDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWT
VQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIVRQLSKLLRGTKALTEVIPLTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNT
PLVKLWYQLEKE

K101R- K104R

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPL
DEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNPDI
YQYMDDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWT
VQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIVRQLSKLLRGTKALTEVIPLTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNT
PLVKLWYQLEKE

K102Q

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPL
DEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNPDI
YQYMDDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWT
VQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYPGIVRQLSKLLRGTKALTEVIPLTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNT
PLVKLWYQLEKE

I94L-K102R

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKKSVTVLDVGDAYFSVPL
DEDFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNPDI
YQYMDDLIVGSDLEIGQHRTKIEELRQHLLRWGLTTPDKKHQKEPPFLWMGYELHPDKWT
VQPIVLPKEDSWTVNDIQKLVGKLNWASQIYSGIKIRQLSKLLRGTKALTEVIPLTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYYDPSKDLIAEIQKQGQGWYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNT
PLVKLWYQLEKE

PLVKLWYQLEKE

K104E – H235L

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKALVEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKKESVTVLDVGDAYFSVPL
DEEFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGQWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNP^EIVI
YQYMDDL^YVGSDLEIGQHR^TKIE^KLR^HHLL^KWGLTTP^NKKHQKEPPFLW^RGYELL^LPKDWT
VQPI^RLP^KQDSW^PVNDIQ^NL^VGKLNWASQIYPGKIVRQLSKLLRGTKALTEVIPLTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTP
PLVKLWYQLEKE

A98S

PISPIE^PVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKAL^TA^IC^DEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHS^SGLKKKSVTVLDVGDAYFSVPL
DEN^FFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGQWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNP^EIVI
YQYMDDL^YVGSDLEIGQHR^AK^VEEL^RE^HLL^KWGLTTPDKKHQKEPPFLW^MGYELHPDKWT
VQPI^QLPEK^ESWTVNDIQ^LVGKLNWASQIYPGKIVRQLSKLLRGA^AKAL^TD^IV^LTEEAE
LELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTP
PLVKLWYQLEKE

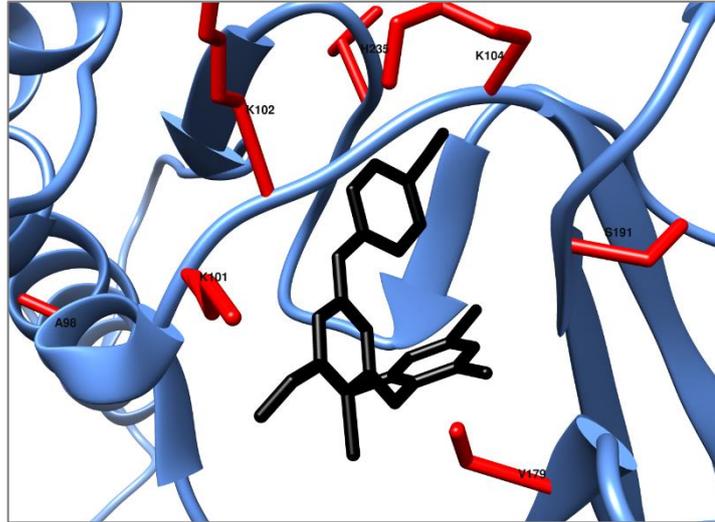
S191F

PISPIETVPV^TLKPGMDG^PR^VKQWPLTEEKIKAL^TA^IC^DEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKK^SSVTVLDVGDAYFSVPL
DEN^FFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGQWKGSPAIFQSSMTKILEPFKKQNP^EIVI
YQYMDDL^YVG^FDLEIGQHR^TKIEELRQHLL^KWGLTTPDKKHQKEPPFLW^MGYELHPDKWT
VQPI^MLPE^QDSWTVNDIQ^LVGKLNWASQIYPGKIVRQLSKLLRGTK^SLTEVI^TLT^KEAE
LELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAEIQKQGQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTP
PLVKLWYQLEKE

L228R

PISPIETVPVKLPGMDGPKVKQWPLTEEKIKAL^LEICTEMEKEGKISKIGPENPYNTPV
FAIKKKDSTKWRKLVDFRELNKRTQDFWEVQLGIPHPAGLKKK^SSVTVLDVGDAYFSVPL
DK^DFRKYTAFTIPSINNETPGIRYQYNVLPQGQWKGSPAIFQSSMTKIL^DPFKKQNP^DIVI
YQYMDDL^YVGSDLEIGQHR^AKIEELRQHLL^KWGF^TTPD^DKHQKEPP^FR^WMGYELHPDKWT
VQPI^MLPEK^DSWTVNDIQ^LVGKLNWASQIYPGKIV^KQLSKLLRGTKALTEVIPLT^SE^AE
LELAENREILKEPVHGVYDPSKDLIAE^LQKQGQGWTYQIYQEPFKNLKTGKYARMRGA
HTNDVKQLTEAVQKITTESIVIWGKTPKFKLPIQKETWETWWTEYWQATWIPEWEFVNTP
PLVKLWYQLEKE

Çalışmamızda ETR cebini oluşturan ve proteinlerin üç boyutlu yapıları (**Şekil 4.1.**) göz önüne alındığında alfa heliks ve beta pilli katlanmalarının değişerek ETR ile ilişkili olan amino asitlerin lokasyonunu değiştirebilecek amino asitler seçilmiştir. Bu amino asitler; 107-109, 177-191, 225- 240 ve 316-321 aralığındaki amino asitlerdir. Sekanslar incelendiğinde bu aralıktaki mutasyonlar seçilmiştir.



Şekil 4.1. Yabanıl tip modelin üzerinde direnç geliştireceği düşünülen mutasyonların atomik (kırmızı) gösterimi ve ETR (siyah)

4.2. Homoloji Modelleme

Homoloji modelleme çalışmaları Swiss-Model (www.swissmodel.expasy.org) isimli biyoinformatik aracı kullanılarak yapılmıştır. Dizi setleri ayrı ayrı sisteme yüklenerek homoloji modelleri elde edilmiştir. Bütün modeller Das K. ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı etravirin-HIV-RT etkileşimli üç boyutlu model olan 1SUQA teması temel alınarak oluşturulmuştur. Homoloji modellerinin A alt domaini modellenmiş ve analiz edilmiştir. 1SUQA modelinin çözünürlüğü 3.00 Å, sekans eşliği 96.06, sekans benzerliği ise 0.62'dir.

Oluşturulan homoloji modelleri UCSF Chimera (1.15rc) programı kullanılarak analiz edilmiştir. Bütün modeller, ribbon gösterimi, atomik gösterim ve hidropati yüzey analizi özelliği kullanılarak görselleştirilmiştir. Yabanıl tip ve mutant modeller ayrı ayrı karşılaştırılmış ve konformasyonel farklılıklar ile mutasyon bölgesi değişimleri atomik olarak görselleştirilmiştir. Bütün modellerde mutant amino asit C- α atomları ve ETR arasındaki uzaklıkları ölçülmüştür. ETR'nin mutant amino asite en yakın atomu temel alınmıştır.

4.3. Moleküler Yerleştirme ve Etkileşim Analizi

Moleküler yerleştirme çalışmaları AutoDock Vina'nın geliştirdiği CB-Dock biyoinformatik aracıyla yapılmıştır. Ligand ve homoloji modelleri pdb formatıyla

hazırlanmıştır. Moleküler yerleştirme sonucunda veriler BIOVIA Discovery Studio Visualizer (DS) programı kullanılarak analiz edilmiştir. DS programı aracılığıyla 2 boyutlu ligand-amino asit bölgeleri görselleştirilmiştir.

4.4. Protein Ligand Etkileşim Analizi

CB-Dock aracılığıyla oluşturulan ETR-HIV RT Homoloji modellerinde (Moleküler yerleştirme ile oluşturulan modeller) ETR ve etkileşimde olduğu amino asitlerin hidrofobik etkileşim, hidrojen bağ etkileşimi, π -Stacking, π -Cation halojen bağ, tuz köprüsü ve metal etkileşimleri Protein-Ligand Interaction Profiler programı kullanılarak analiz edilmiştir. Analizler tablolar halinde sunulmuştur.

4.5. Hücre Kültürü Çalışması

Hücre kültürü çalışmalarında, tedavi almakta olan HIV pozitif bireylerden alınmış T.C. Halk Sağlığı Ulusal HIV/AIDS ve Viral Hepatitler Referans Laboratuvarı arşiv örnekleriyle çalışılmıştır. Virüsün çoğaltılması ve devamlılığının doku kültürü ile sağlanması için seronegatif insan donör periferik kan mononükleer hücreleri (PBMC) kullanılmıştır. Test edilecek suş örnekleri ile donörlerden alınan kan örneklerinden PBMC izole edilmiştir. Hücre kültüründe kullanılan çözeltiler ayrıntılarıyla verilmiştir.

Phosphate-buffered saline (PBS):

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Tüm kimyasallar 800 mldistile H₂O ile çözülmüş, pH HCl ile 7.4'e ayarlanarak su ile 1 litreye tamamlanmıştır. 18-22°C'de saklamaya alınmıştır. Kontaminasyonu en aza indirmek amacıyla farklı tüplere bölünmüştür.

Phytohaemagglutinin (PHA):

50 mg PHA içeren şişeye 5 mldistile su eklenmiştir. 15 mlRPMI %10 BSA eklendi ve 2.5 mg/mlkonsantrasyonunda PHA elde edildi. 100 μ l tüplere bölünmüş ve tüpler -70°C'de saklanmıştır.

Growth medium:**RPMI %10:**

RPMI 1640 (1X)	900 ml
Fetal calf serum (FCS)	100 ml
Antibiyotik (Son kons. penicillin 50 U/ml ve streptomycin 50 µg/mL)	5 ml

PBS içerisinde 10 000 U/ml penisilin ve 10 000 µg/ml streptomisin solüsyonu kullanılmıştır.

IL-2 medium:

RPMI %10	500 ml
Interleukin-2 (IL-2, recombinant) (son kons. 5 U/mL)	2500 U
Antibiyotik (Son kons. penicillin 50 U/ml ve streptomycin 50 µg/mL)	5 ml

D-MEM Growth Medium (D-MEM, with L-glutamine, sodium pyruvate, glucose, and pyroxidine) (Gibco BRL Life Technologies):

İçeriğinde; %10 ısı ile inaktif FBS, 50 µg/ml gentamisin, 25 mM HEPES bulunmaktadır. Kullanım öncesinde 20- 37°C'de bekletilmelidir. 500 ml için

D-MEM	435 ml
FBS	50 ml
Gentamisin	2.5 ml
HEPES	12.5 ml

BSA (Bovine serum albumin):

50 mg BSA 10 ml H₂O ile çözülmüş ve 0.3 ml alikotlanarak -20°C'de saklanmıştır.

Kandan PBMC izolasyonu:

Örneklerden PBMC elde edebilmek için dansite gradient santrifüjasyon metodu kullanılmıştır (LeucoSep-Tube 12 ml, Greiner, Germany).

1. Örnekler işlenene kadar 18-22°C'de bekletilmiştir. Lenfosit seperation medium içeren tüpe 5 ml EDTA'lı tüpe alınmış tam kan eklenmiştir. 10 dakika 1000 x g'de veya santrifüj edilmiştir.
2. Üstte kalan kısım (plazma) ayrı tüpe boşaltılmıştır.
3. Arada kalan lenfosit ve PBMC içeren kısım pastör pipeti ile tüpe alınıp ve 10 ml PBS eklenerek yıkanmıştır. 10 dk 250 x g'de santrifüj edilmiştir.
4. Yıkama aşaması ikinci kez tekrarlandı. Süpernatant atılıp ve kalan pellet 5 ml PBS ile suspanse edilmiştir. Elde edilen PBMC -80°C'de saklamaya alınmıştır.

PBMC stimülasyonu:

1. PBS ile ikinci yıkamadan sonra hücreler 10 ml %10 RPMI ile (%10 FCS) ile suspanse edilmiştir.
2. 75'lik kültür flaskına 20 ml RPMI 1640 besiyeri (%10 FBS, %1 penisilin/streptomisin) ve 100 µl PHA (2.5-5 µg/ml) ile 3×10^6 hücre/ml konsantrasyonunda PBMC eklenmiştir.
3. Kültürler 37°C %5 CO₂'de 24 saat kapak hafif açık olarak inkübe edilmiştir. İnkübasyon 3 güne kadar uzatılmıştır. Bu basamakla flask yüzeyindeki monositler süspansiyon içindeki lenfositlerden ayrılmasını sağlar.
4. Flask içeriği 50 ml'lik konik tüpe alınıp ve 500 x g de 5 dk santrifüj edilmiştir.
5. Hücre pelleti süspanse edilip ve 25 ml RPMI 1640 besiyeri (10% FBS, 1% penisilin/streptomisin ve 1 µg/ml PHA) içeren 75'lik flaska aktarılmıştır.
6. 37°C 3 gün inkübe edilmiş, 24 saatten sonra 15-20 ml taze besiyeri eklenmiştir.
7. 3 günden sonra pipetle besiyeri alınmış ve flaska asılı lenfositler yeni bir 50 ml'lik tüpe alınmıştır. 500 x g 5 dk santrifüj edilmiştir.
8. Hücre pelleti resuspanse edilmiş ve 25 ml RPMI 1640 with 10% FBS, 1% penisilin/streptomisin ve 20 U/ml veya ng/ml insan IL-2 içeren yeni bir 75'lik flaska alınmıştır.

Test örnekleri ile Donör hücrelerinin enfeksiyonu:

1. Üç ayrı 25'lik flask kullanılmaktadır. Tümüne 25 cm²'lik flaska 10 ml IL-2 eklenmiş büyüme mediumu (10% FBS, 1% penisilin/streptomisin ve 20

U/ml veya ng/ml insan IL-2 eklenmiş) ve 3×10^6 PHA-stimüle edilmiş donör PBMC hücreleri eklenmiştir.

2. İlk flask kontrol olarak kullanılmıştır.
3. İkinci flaska HIV pozitif hastadan elde edilen PBMC hücreleri eklenmiştir.
4. Kùltürler 37°C %5 CO_2 'de 24 saat kapak hafif açık olarak inkübe edilmiştir.
5. Kùltür vasatının yarısı (5 ml) üçüncü gün değiştirilmiştir. İkinci flaska asılı lenfositler yeni bir 50 ml'lik tüpe alındı ve $500 \times \text{g}$ 5 dk santrifüj edilmiştir. Hücre pelleti 10 ml RPMI 1640 (10% FBS, 1% penicillin/streptomycin ve 20 U/ml human IL-2) ile resuspanse edilmiştir. İçine 2×10^6 konsantrasyonunda taze donör PBMC eklenmiştir. 5% CO_2 li ortamda 37°C de inkübe edilmiştir.
6. Yedinci gün ikinci flasktan 3.5 ml ayrılarak -70°C 'de saklanmıştır. Viral yük tespiti için 1.2 ml, p24 ag testi için 0.9 ml için ayrılmıştır.
7. P24 antijen testi için tüpe 0.9 ml medium alınır ve 0.1 ml %5 Triton-X 100 eklenmiştir. Örnekler test öncesinde -20°C de bekletilmiştir. P24 antijen ELISA testi VIDAS p24 ag test (Bioemerieux, France) ile yapılmıştır. Viral yük Cepheid HIV RNA testi (Genexpert, USA) ile yapılmıştır.
8. ELISA pozitifliği ve/veya HIV viral yük saptanması durumunda 10. Gün ikinci flasktan alınan süspansiyon doku kùltür plaklarına 1 ml olacak şekilde dağıtılmıştır. Bir plak kontrol plağı olarak boş bırakılmıştır. İkinci plağı Etravirin 10 mM stok solüsyonundan 10 μl , üçüncü plağı Etravirin 1 mM stok solüsyonundan 10 μl eklenmiştir. 1 saat inkübe edilir. Inkübasyon geceye uzatılırsa 0.2 ml daha IL-2 eklenir. Kùltür 35 güne kadar uzatılabilmektedir. Haftada iki kez sitopatik etki açısından incelenmiştir.
9. Real Time PCR testleri tam otomatik Cepheid HIV-VL kiti ile yapılmıştır.

5. SONUÇLAR VE TARTIŞMA

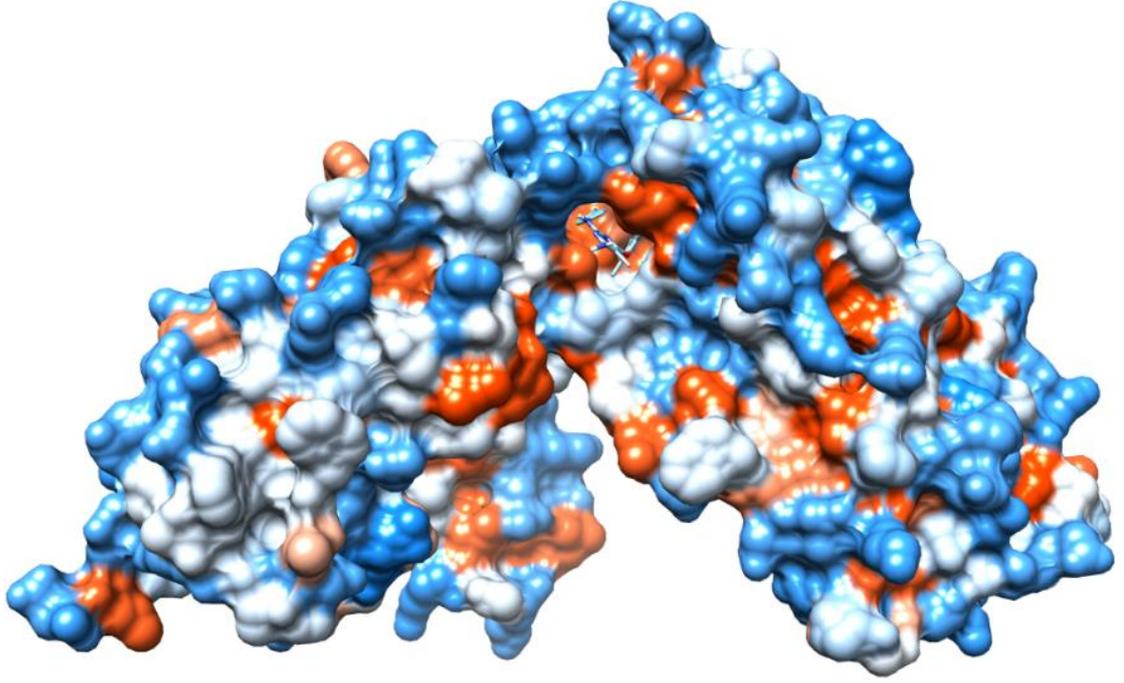
5.1. Homoloji Modelleme ve Görselleştirme Sonuçları

Das K. ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı etravirin-HIV-RT ilişkili üç boyutlu model olan **1SUQA** teması temel alınarak homoloji modelleri oluşturulmuştur. 1SUQA teması etravirin ve HIV-RT enziminin birlikte çözümlenmiş bir temasıdır (Das ve diğerleri, 2004). Yabanıl tip ve mutant suşların homoloji modelleri karşılaştırılmıştır ve konformasyonel değişiklikler analiz edilmiştir. Yabanıl tipin homoloji modeli göz önüne alındığında mutant suşların mutasyon bölgelerinde atomik ölçekte ve amino asit değişimi sebepli fiziko kimyasal özelliklerde (hidropati, elektriksel yük, polarite gibi) değişikliklerin olduğu, alfa heliks ve/veya beta pilli katlanmalarının değişmediği ya da konformasyonel olarak minör değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür.

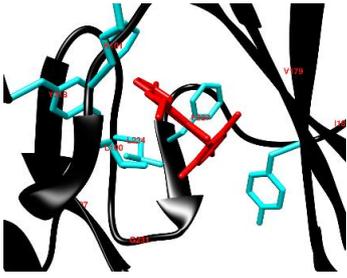
Yabanıl Tip

Yabanıl Tip homoloji modelinin hidropati yüzey analizine göre (**Şekil 5.1. A.**) yoğunlukla hidrofilik olduğu ancak aktif bölge cebinde hidrofobik ve nötr amino asitlerin bulunduğu, etravirin giriş bölgesinde hidrofobik amino asitlerin yoğunlukta olduğu görülmüştür (**Şekil 5.1. C.**). ExPASy'nin oluşturduğu ProtParam programı kullanılarak modellerin hidropati endeksi ile hidropatik yüzey analiz sonuçları teyit edilmiştir. Etravirin ve ilişkili olduğu düşünülen amino asitlerinin (L100, K101, E138, Y181, Y188, G190, M230) (Stanford Drug Database) etravirin ile uzaklığı 3.4 Å – 5.8 Å arasında değişmektedir (**Şekil 5.1.B.**)

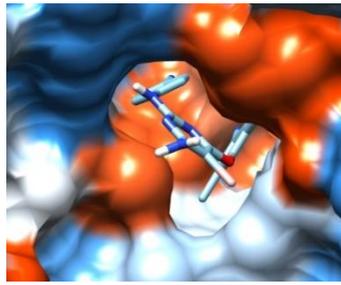
A



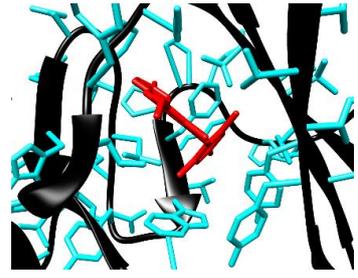
B



C



D



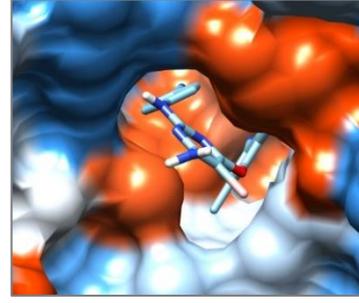
Şekil 5.1. **A.** Yabani Tip homoloji modelin hidropati yüzey görseli (beyaz: nötr, kırmızı: hidrofobik, mavi: hidrofilik) **B.** Yabani Tip homoloji modelinin ribbon gösterimi (siyah), etravirin (kırmızı) ve ilişkili amino asitler (mavi) **C.** Yabani Tip homoloji modelinde aktif bölgenin hidropati yüzey görseli ve etravirin **D.** Yabani Tip homoloji modelinin ribbon gösterimi (siyah), etravirin (kırmızı) ve çevresindeki amino asitler (mavi)

Etravirinin girdiği cepte bulunan amino asitler; 94-105, 178-190, 227-239 ve 317-319 aralığındaki amino asitlerdir (**Şekil 5.2. A.**).

```

1 P I S P I E T V P V K L K P G M D G P K V K Q W P L T E E K I K A L V E I C T E M E K E G K I S K I
51 G P E N P Y N T P V F A I K K K D S T K W R K L V D F R E L N K R T Q D F W E V Q L G I P H P A G I
101 K K K K S V T V L D V G D A Y F S V P L D E D F R K Y T A F T I P S I N N E T P G I R Y Q Y N V L P
151 Q G W K G S P A I F Q S S M T K I L E P F K K Q N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G S D L E I G Q H R T
201 K I E E L R Q H L L R W G L T T P D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H P D K W T V Q P I V L P E K D
251 S W T V N D I Q K L V G K L N W A S Q I Y P G I K V R Q L S K L L R G T K A L T E V I P L T E E A E
301 L E L A E N R E I L K E P V H G V Y Y D P S K D L I A E I Q K Q G G Q W T Y Q I Y Q E P F K N L K
351 T G K Y A R M R G A H T N D V K Q L T E A V Q K I T T E S I V I W G K T P K F K L P I Q K E T W E T
401 W W T E Y W Q A T W I P E W E F V N T P P L V K L W Y Q L E K E P I V G A E T F Y V D G A A N R E T
451 K L G K A G Y V T N K G R Q K V V P L T N T T N Q K T E L Q A I Y L A L Q D S G L E V N I V T D S Q
501 Y A L G I I Q A Q P D K S E S E L V N Q I I E Q L I K K E K V Y L A W V P A H K G I G G N E Q V D K
551 L V S A G I R K I L

```



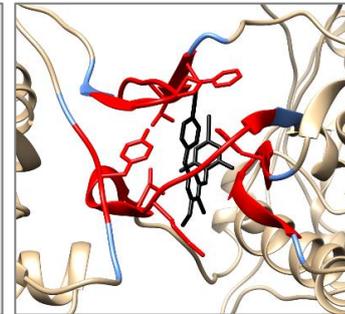
Şekil 5.2. **A.** Etravirin cebini oluşturan amino asitler **B.** Etravirin cebinin hidropati yüzey analiz görseli

Proteinlerin üç boyutlu yapıları göz önüne alındığında alfa heliks ve beta pilli katlanmalarının değişerek etravirinle ilişkili olan amino asitlerin lokasyonunu değiştirebilecek diğer amino asitler **Şekil 5.3.**'te verilmiştir. Bu amino asitler; 107-109, 177-191, 225-240 ve 316-321 aralığındaki amino asitlerdir. Bu amino asitler çalışma süresince mutasyona uğradığında ETR-HIV RT etkileşimini etkileyeceğini düşündüğümüz amino asitlerdir. Etravirin ile doğrudan ilişkili amino asitler kırmızı, ilişkili amino asitlerin çevresindeki amino asitler mavi, etravirin siyah renk ile boyanmıştır.

```

1 P I S P I E T V P V K L K P G M D G P K V K Q W P L T E E K I K A L V E I C T E M E K E G K I S K I
51 G P E N P Y N T P V F A I K K K D S T K W R K L V D F R E L N K R T Q D F W E V Q L G I P H P A G I
101 K K K K S V T V L D V G D A Y F S V P L D E D F R K Y T A F T I P S I N N E T P G I R Y Q Y N V L P
151 Q G W K G S P A I F Q S S M T K I L E P F K K Q N P D I V I Y Q Y M D D L Y V G S D L E I G Q H R T
201 K I E E L R Q H L L R W G L T T P D K K H Q K E P P F L W M G Y E L H P D K W T V Q P I V L P E K D
251 S W T V N D I Q K L V G K L N W A S Q I Y P G I K V R Q L S K L L R G T K A L T E V I P L T E E A E
301 L E L A E N R E I L K E P V H G V Y Y D P S K D L I A E I Q K Q G G Q W T Y Q I Y Q E P F K N L K
351 T G K Y A R M R G A H T N D V K Q L T E A V Q K I T T E S I V I W G K T P K F K L P I Q K E T W E T
401 W W T E Y W Q A T W I P E W E F V N T P P L V K L W Y Q L E K E P I V G A E T F Y V D G A A N R E T
451 K L G K A G Y V T N K G R Q K V V P L T N T T N Q K T E L Q A I Y L A L Q D S G L E V N I V T D S Q
501 Y A L G I I Q A Q P D K S E S E L V N Q I I E Q L I K K E K V Y L A W V P A H K G I G G N E Q V D K
551 L V S A G I R K I L

```

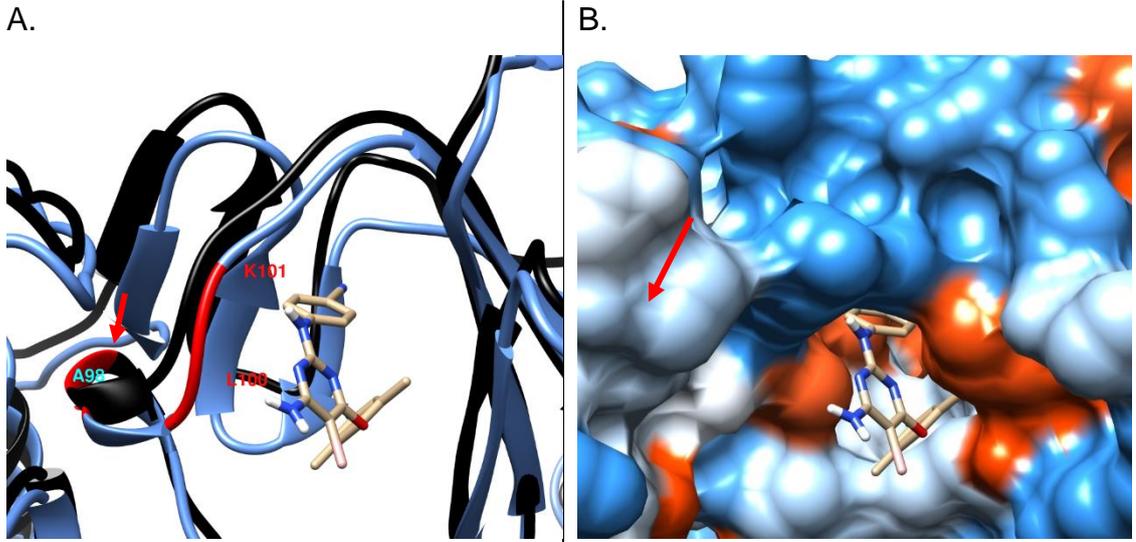


Şekil 5.3. **A.** Etravirin cebini oluşturan amino asitlerin yakınlarında bulunan amino asitler **B.** Etravirin cebinin yapısını oluşturan amino asitler

Yabanıl Tip – A98S

Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgesinde atomik ölçekli değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür. Mutasyon bölgesi proteinin yüzeyinde değil, iç bölgededir (**Şekil 5.4.** A-B.). Bu sebeple mutasyonun yüzeysel etkisinin kuvvetli olmadığı ancak hidrofobik nanopolar bir amino asit olan alaninden, nötral ve polar bir amino asit

olan serine dönüşmesi çevresinde yer alan ETR cebi ile ilişkili amino asitlerin lokasyonunu değiştirmesi hususunda etkili olacağı düşünülmektedir. Yabancıl tipteki 98. amino asidin ETR'ye ve ETR ile doğrudan ilişkili olan amino asitlere uzaklıklarının mutasyon sonucu değiştiği görülmüştür. Mutasyon sonucunda özellikle 101. (lizin) ve 318. (tirozin) aminoasitlerin 98. aminoasit bölgesine yaklaştığı bu sebeple ETR cebinin değiştiği düşünülmektedir. ETR'nin tam olarak cebe girmediği, cebin giriş bölümüne yakın olduğu görülmektedir (**Şekil 5.4.B.**).



Şekil 5.4. **A.** Mutasyon amino asiti olan 98. amino asitin ETR ile doğrudan ilişkili L100 ve K101 amino asitlerinin lokasyonu ribbon gösterim ile görselleştirilmesi **B.** A98S mutasyonunun hidropati yüzey gösterimi ile gösterimi, kırmızı ok mutasyonun gerçekleştiği yüzeyde yer almayan amino asiti işaret etmektedir

Çizelge 5.1 'de mutasyon sonucu uzaklık değişimleri verilmiştir. Bu değişimlere göre 101. ve 318. amino asitlere uzaklıkta 0.3-0.4 Å değişiklik analiz edilmiştir.

Çizelge 5.1. Yabancıl ve Mutant Tip modellerde 98. amino asitler ile ETR, L100, K101 ve Y318 amino asitlerine olan uzaklıkları

Uzaklık (Å)	ETR (ort.)	L 100	K101	Y 318
A 98	9.8	5.8	8.7	5.7
S 98	9.5	5.7	8.4	5.4

Yabanıl Tip – I94L-K102R

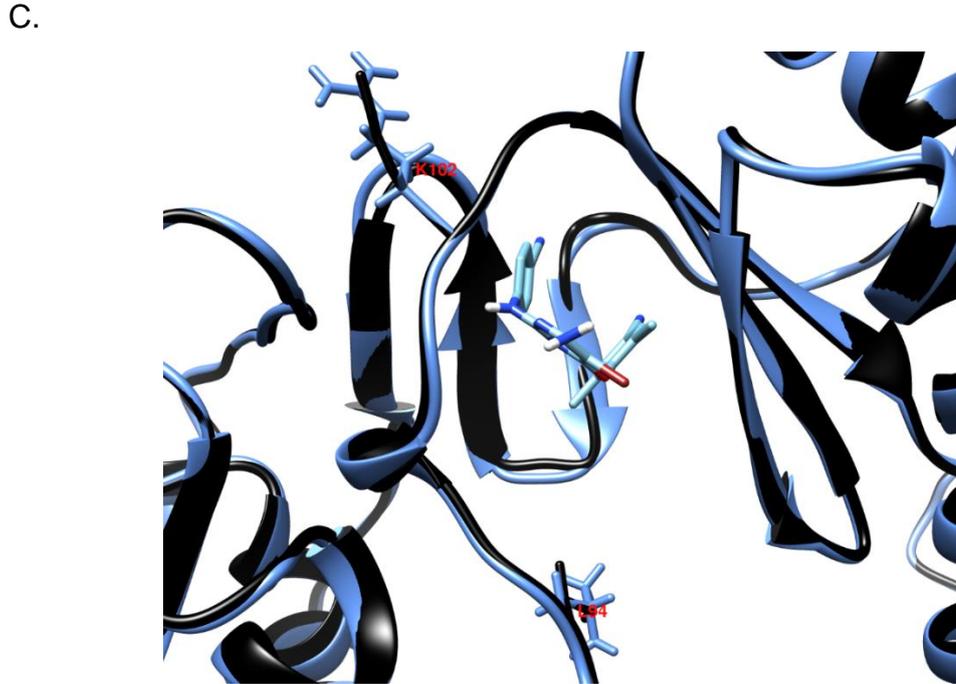
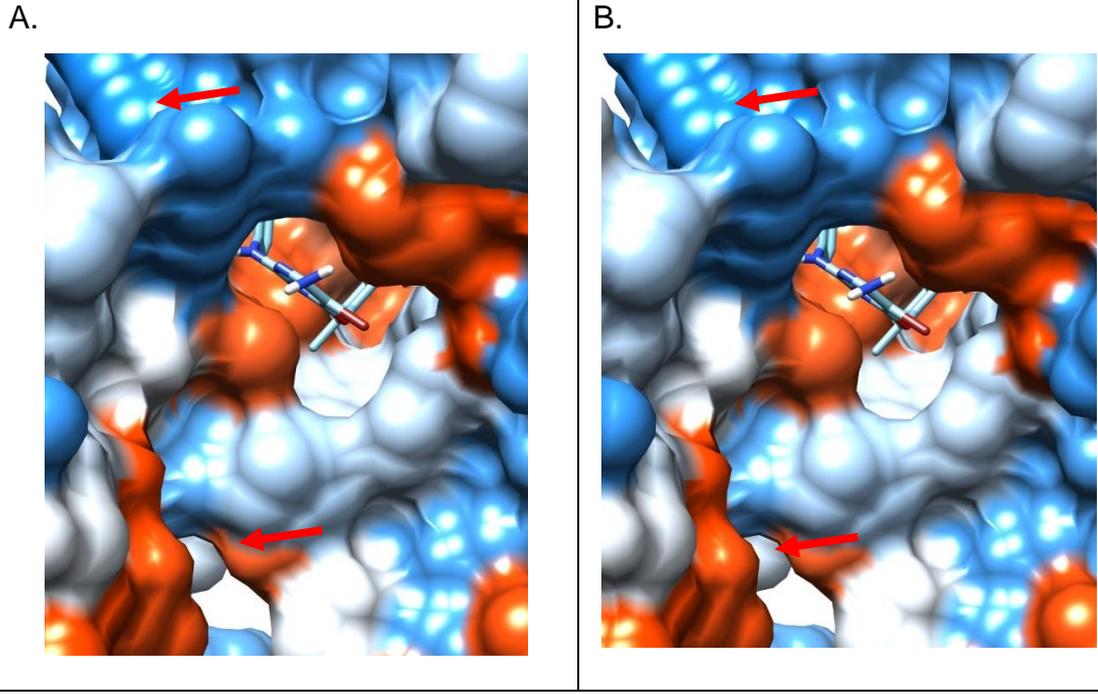
Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgelerinde atomik ölçekli değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür. I94L mutasyon bölgesi ETR cebine ortalama 11.4 Å uzaklıktadır.

94. amino asit bölgesinin cebe uzaklığı ve değişen amino asitlerin fiziko-kimyasal özelliklerin birbirine yakın olması sebebiyle ETR'nin cebe girmesine ve ETR ile etkileşimde olan diğer amino asitlere etki etmeyeceği düşünülmektedir (**Çizelge 5.2**).

Çizelge 5.2. Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 98. amino asitler ile ETR, L100, K101 ve K103 amino asitlerine olan uzaklıkları

Uzaklık (Å)	ETR (ort.)	L 100	K101	K103
K 102	4.9	6.6	4.3	4.7
R 102	4.9	6.6	4.3	4.6

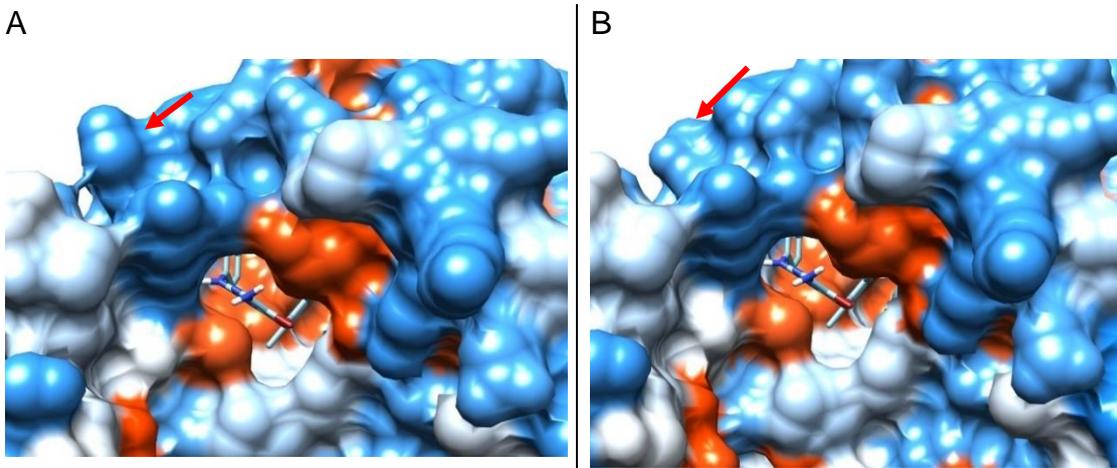
102. amino asitin olduğu bölgenin ise atomik ölçekte farklılık oluşturacağını ancak yalnızca bu bölgede mutasyon olmasının, ETR cebinde ETR'nin bağlanmasını etkileyecek bir değişikliğin oluşmayacağı düşünülmektedir (**Şekil 5.5**).



Şekil 5.5. Yabanıl (A.) ve mutant modelin (B.) hidropati yüzey analizi gösterimi ile görselleştirilmesi kırmızı ok mutasyon bölgeleri olan 94. ve 102. amino asitleri göstermektedir C. 94. ve 102. amino asitin atomik gösterimi. Yabanıl tip siyah, mutant tip mavi renk ile boyanmıştır.

Yabanıl Tip – K102Q

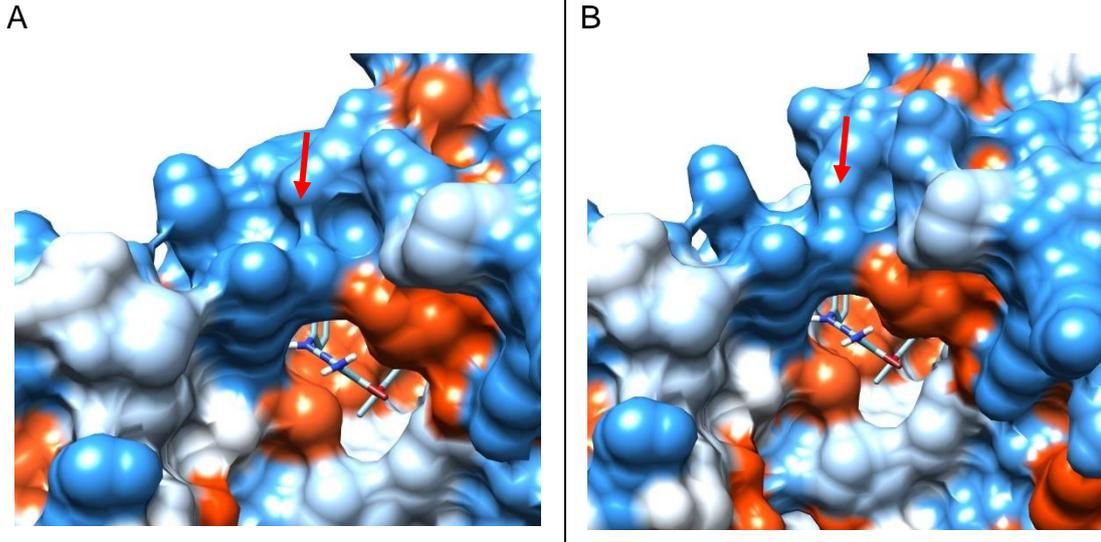
Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgesinde atomik ölçekte değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür. Homoloji modelleri incelendiğinde ETR cebine girişte yer alan 102. amino asit bölgesi hidropati değişiminin (K -1.5, Q 0.85) az olduğu ve hidrofilik amino asitten hidrofilik diğer bir amino asite değişim olduğu için ETR'nin cebe girmesinin engellenmediği (**Şekil 5.6.**) ve ETR cebinde ETR'nin bağlanmasını etkileyecek bir değişikliğin oluşmayacağı düşünülmektedir.



Şekil 5.6. Yabanıl tip (A) ve K102Q mutant tip (B) homoloji modellerinin hidropati yüzey analizi ile görselleştirilmesi kırmızı ok mutasyon bölgesi olan 102. amino asitleri göstermektedir.

Yabanıl Tip – K104Q

Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgesinde atomik ölçekte değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür. Mutasyon bölgesinde hidropati değişimi görülmemiştir (**Şekil 5.7.**). Yabanıl tipteki 104. amino asidin ETR'ye ve ETR ile doğrudan ilişkili olan amino asitlere uzaklıklarının mutasyon sonucu, mikro düzeyde değişmesinin ilaç direncine etki etmeyeceği düşünülmektedir.



Şekil 5.7. Yabanıl tip (A) ve K104Q mutant tip (B) homoloji modellerinin hidropati yüzey analizi ile görselleştirilmesi. Mavi bölgeler hidrofilik, kırmızı bölgeler hidrofobik beyaz bölgeler ise nötr amino asitleri, kırmızı ok mutasyon bölgesi olan 104. amino asitleri göstermektedir.

Çizelge 5.3.'te mutasyon sonucu uzaklık değişimleri verilmiştir. Mutant tip modelinde ETR cebinde yer alan 227. amino asite uzaklık yabanıl tipe göre 0.6 Å artmıştır. ETR cebinde ETR'nin bağlanmasını etkileyecek bir değişikliğin oluşmayacağı düşünülmektedir.

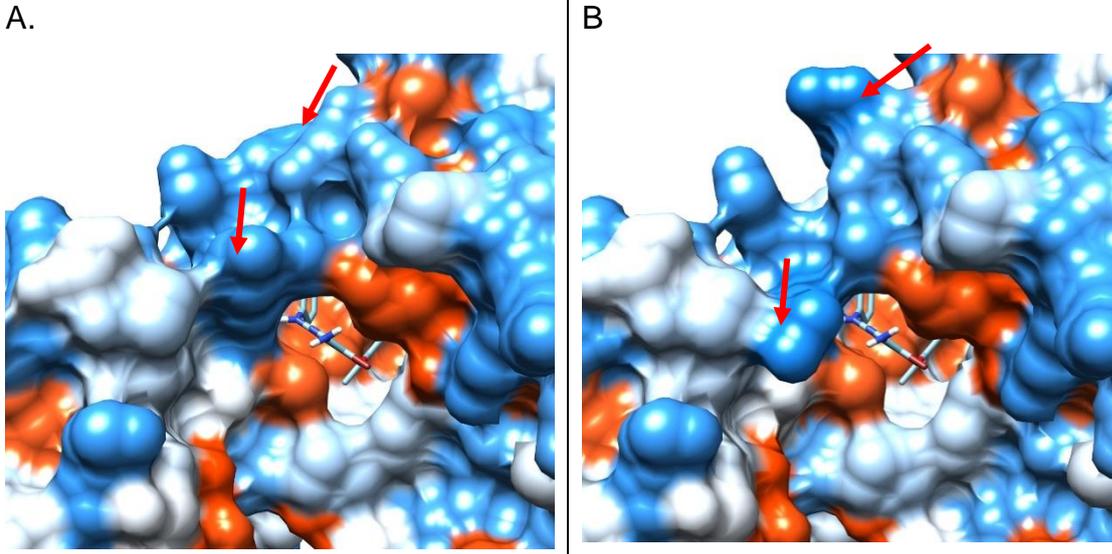
Çizelge 5.3. Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 104. amino asitler ile ETR, K101 ve F227 amino asitlerine olan uzaklıkları

Uzaklık (Å)	ETR (ort.)	K 101	F 227
K 104	8.6	9.9	9.0
Q 104	8.2	9.9	9.6

Yabanıl Tip – K101R-K104R

Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgelerinde atomik ölçekli değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür. Mutasyon bölgelerinde hidropati değişimi görülmemiştir (**Şekil 5.8.**). Lizin ve arjinin amino asitleri aynı fiziko-kimyasal özelliğe sahiptir sadece hacimsel bir fark söz konusudur. Mutasyonlar her iki nokta da ETR cebini değiştirmemektedir. Homoloji modelleri incelendiğinde ETR cebine girişte yer

alan 101. amino asit bölgesi hidropati deęiřimi (K -1.5, R -2.5) az olduęu ve hidrofilik amino asitten hidrofilik dięer bir amino asite deęiřim olduęu için ETR'nin cebe girmesini engellemeyeceęini ve ETR cebinde ETR'nin baęlanmasını etkileyecek bir deęiřiklięin oluřmayacaęı dūřunūlmektedir.



şekil 5.8. Yabanıl tip (A.) ve K101R-K104R mutant tip (B.) homoloji modellerinin hidropati yūzey analizi ile gōrselleřtirilmesi. Mavi bōlgeler hidrofilik, kırmızı bōlgeler hidrofobik beyaz bōlgeler ise nōtr amino asitleri, kırmızı ok mutasyon bōlgeleri olan 101. ve 104. amino asitleri gōstermektedir.

Yabanıl tipteki 101. ve 104. amino asitlerinin ETR'ye ve ETR ile doęrudan iliřkili olan amino asitlere uzaklıkları analiz edilmiřtir. Bu uzaklık sebebiyle mutasyonun mikro dūzeyde bōlgeyi deęiřtirerek ilaç direncine yol açamayacaęı dūřunūlmektedir. Çizelge 5.4. ve izelge 5.5.'te mutasyon sonucu uzaklık deęiřimleri verilmiřtir. Yabanıl ve mutant tip modellerin analiz sonuçlarında bir fark gōrūlmemiřtir.

Çizelge 5.4. Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 101. amino asitler ile ETR ve L100 amino asitine olan uzaklıkları

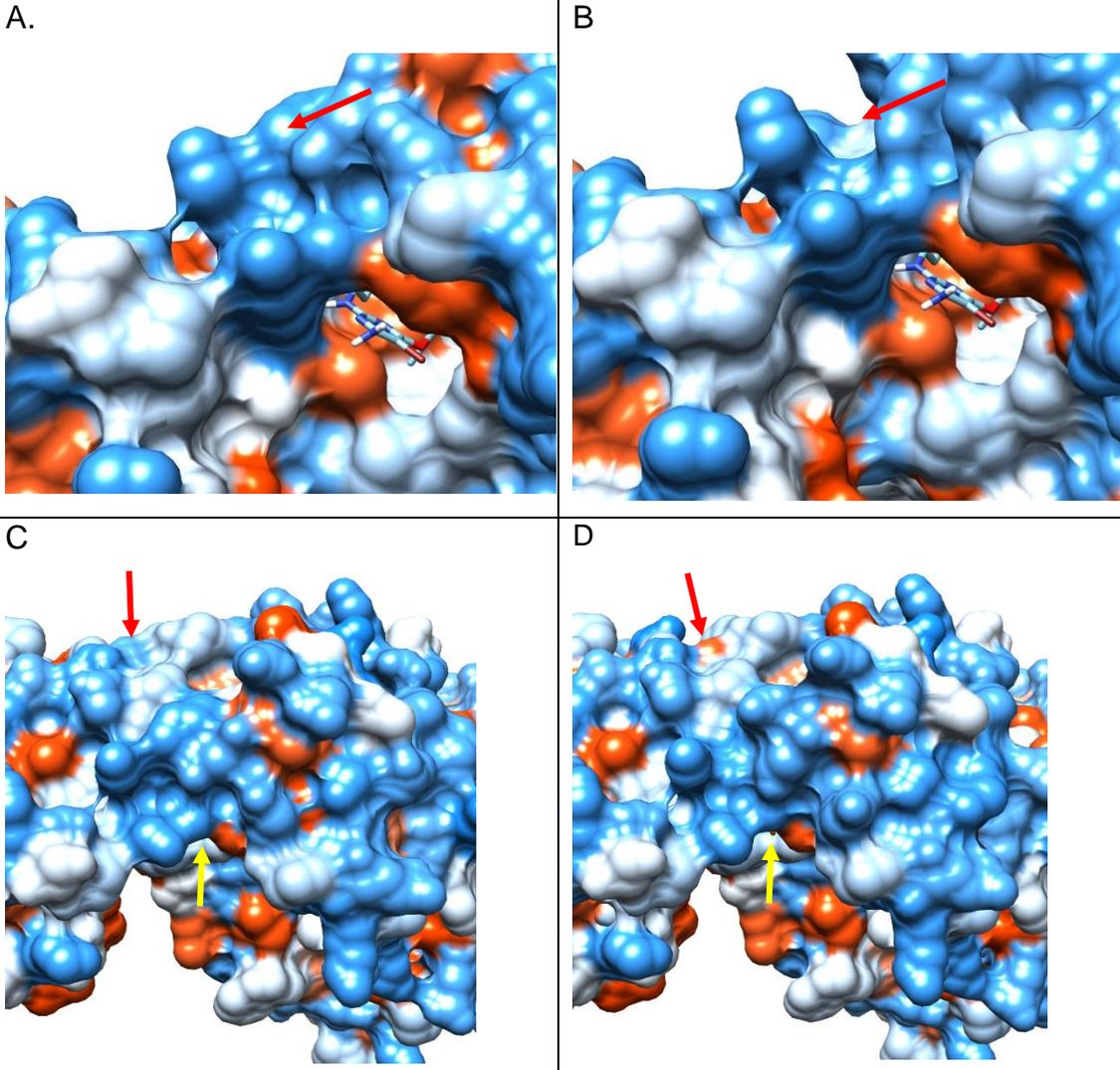
Uzaklık (Å)	ETR (ort.)	L 100
K 101	4.2	5.8
R 101	4.2	5.8

Çizelge 5.5. Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 104. amino asitler ile ETR, F227 ve P236 amino asitlerine olan uzaklıkları

Uzaklık (Å)	ETR (ort.)	F 227	P 236
K 104	7.4	9.0	5.8
R 104	7.4	9.0	5.8

Yabanıl Tip – K104E-H235L

Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgelerinde atomik ölçekli değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür. Mutasyon bölgelerinde hidropati değişimi görülmemiştir (**Şekil 5.9.**). Lizin ve arjinin amino asitleri aynı fiziko-kimyasal özelliğe sahiptir sadece hacimsel bir fark söz konusudur. Her iki nokta da ETR cebini değiştirmemektedir. Homoloji modelleri incelendiğinde ETR cebine girişte yer alan 104. amino asit bölgesi hidropati değişimi (K -1.5, E -0.74) az olduğu ve hidrofilik amino asitten hidrofilik diğer bir amino asite değişim olduğu için ETR'nin cebe girmesinin engellenmediği düşünülmektedir. 235. amino asit olan histidin ve mutasyon sonucu yer alan lösin amino asitinin fiziko-kimyasal özellikleri benzerdir. Hidropati değişimi (H 0.40, L 1.1) az olduğu ve nötr bir amino asitten hidrofobik bir amino asite değiştiği görülmektedir. Doğrudan ETR cebine etki etmeyen 235. amino asit ETR ile ilişkili olan 236. amino asitin lokasyonunu 0.2 Å değiştirmiştir. Bu değişikliğin ETR ile 236. prolin amino asiti etkileşimini etkilemediği düşünülmektedir.

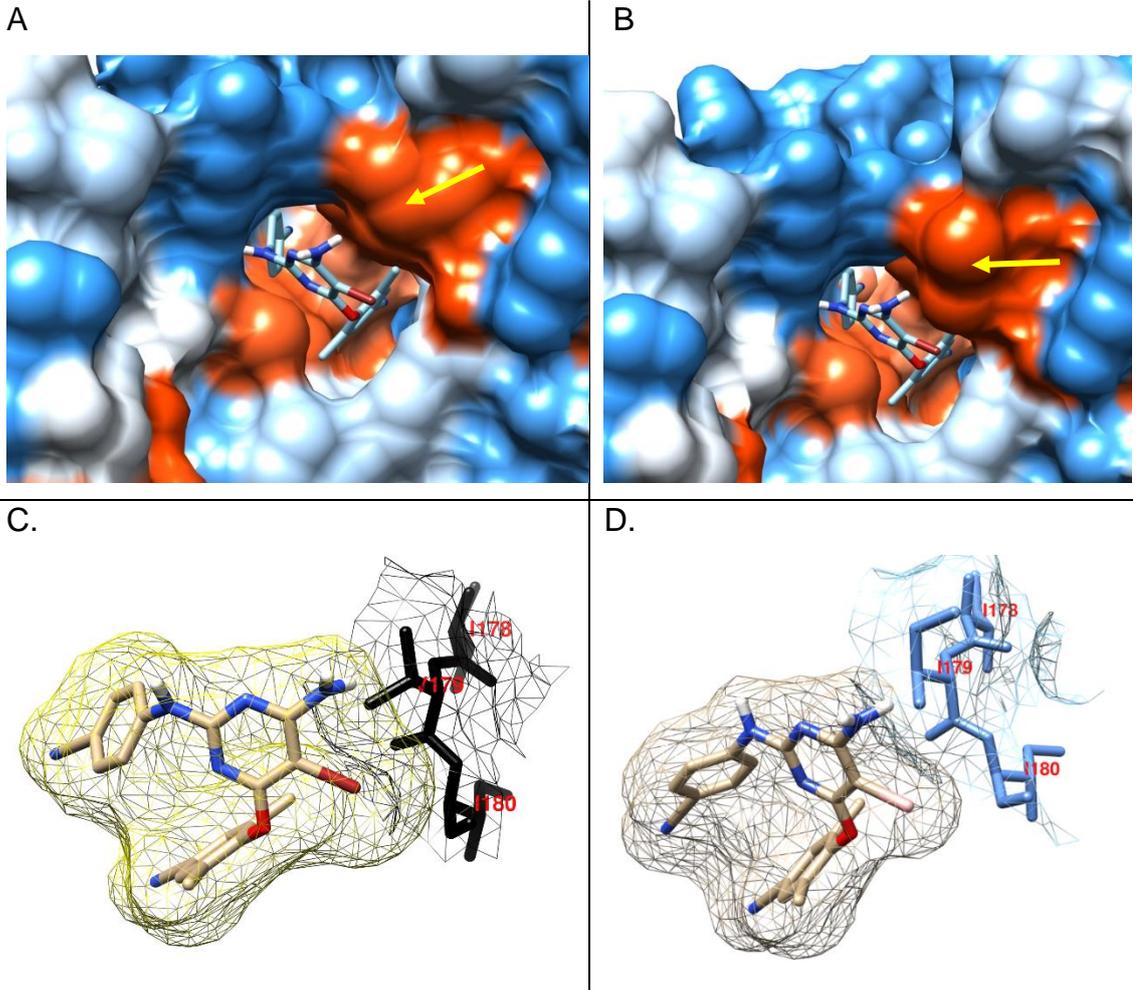


Şekil 5.9. Yabanıl tip (A-C) ve K104E-H235L (B-D) mutant tip homoloji modellerinin hidropati yüzey analizi ile görselleştirilmesi. A-B. Kırmızı ok mutasyon bölgesi olan 104. amino asitini göstermektedir. C.D. Kırmızı ok 235. amino asiti, sarı ok ise ETR cebini göstermektedir.

Yabanıl Tip – V179I

Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgesinde atomik ölçekli değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür. Mutasyon bölgesinde hidropati değişimi görülmemiştir (Şekil 5.10.). Mutasyonun gerçekleştiği lokasyon ETR cebinin ağzı olduğu için önemlidir. Homoloji modelleme sonucu göz önüne alındığında, buradaki atomik değişimin ETR cep ağzında bir daralmaya yol açmış olabileceği bu sebeple ETR'nin cebe girmesi engelleyebileceği düşünülmektedir. Valin-izolösin değişimi hem hidropati

(valin 1.1, izolösin 1.4) hem de elektriksel yük anlamında bir değişiklik oluşturmamaktadır ancak hacim değişikliğinin (yaklaşık: valin 154 Å³, izolösin 174 Å³) bu mutasyonun geręekleřtięi lokasyonun önemi açısından anahtar rol oynayacağı düşünülmektedir. Homoloji modelleme analizlerinde bu hacimler atomik yüzey analizi görüntüsü ile görselleştirilmiştir. ETR ve valin 179 yüzey alanı çakışmaktadır ancak ETR ve izolösin 179 yüzey alanları etkileşirken ETR'nin yüzey alanı izolösin 179'un yüzey alanı açmaktadır (**şekil 5.10. C.-D.**).

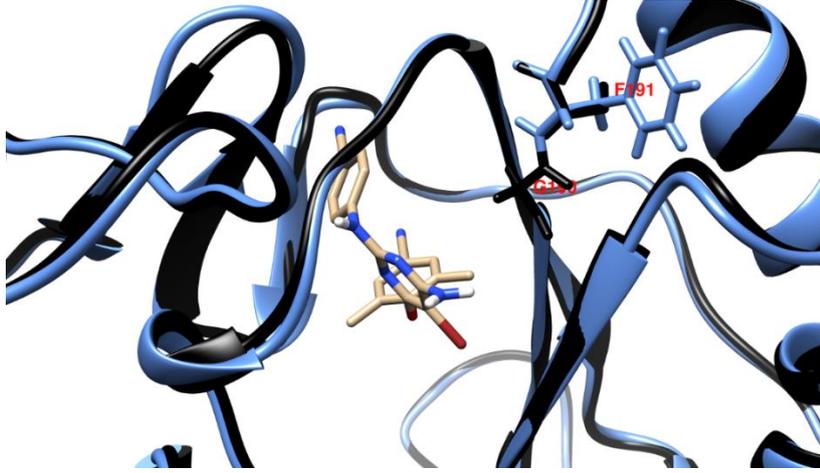


şekil 5.10. Homoloji modellerinin hidropati yüzey analizi ile görselleştirilmesi (**A.** yabani tip, **B.** mutant tip) ETR ve mutasyon bölgesinin yüzey alanının atomik görselleştirilmesi (**C.** yabani tip, **D.** mutant tip).

Yabani Tip – S191F

Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgesinde atomik ölçekli değişikliklerin geręekleřtięi

görülmüştür (**Şekil 5.11.**). Mutasyon bölgesinde hidropati değişimi düşüktür (Serin -0.18, Fenilalanin 1.2). Bu düşük değişim mutasyon lokasyonu ve çevresinde herhangi konformasyonel değişikliğe yol açmamıştır ve ETR cebini değiştirmemektedir. Homoloji modelleri incelendiğinde ETR cebine girişe yakın yerde yer alan ve yüzeyde yer almayan serin 191 fenilalanin değişiminin ETR'nin cebe girmesinin engellenmeyeceği ve ETR cebinde ETR'nin bağlanmasını etkileyecek bir değişikliğin oluşmayacağı düşünülmektedir.



Şekil 5.11. Mutasyon amino asiti olan 191. amino asit ve ETR cebinde yer alan 190. amino asitin atomik gösterimi

191. amino asit bölgesinin cebe uzaklığı ve ETR ile doğrudan ilişkili 190. amino asit olan glisin ile uzaklığı değişmemiştir (**Çizelge 5.6.**)

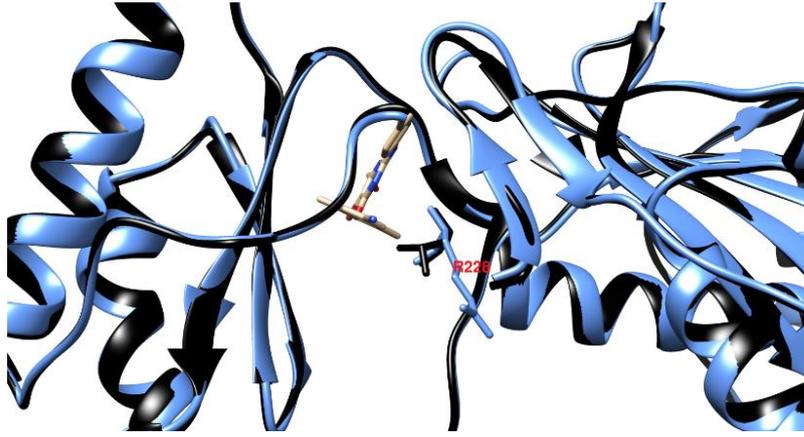
Çizelge 5.6. Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 191. amino asitler ile ETR ve G190 amino asitine olan uzaklıkları.

Uzaklık (Å)	ETR (ort.)	G 190
S 191	10.2	2.6
F 191	10.3	2.6

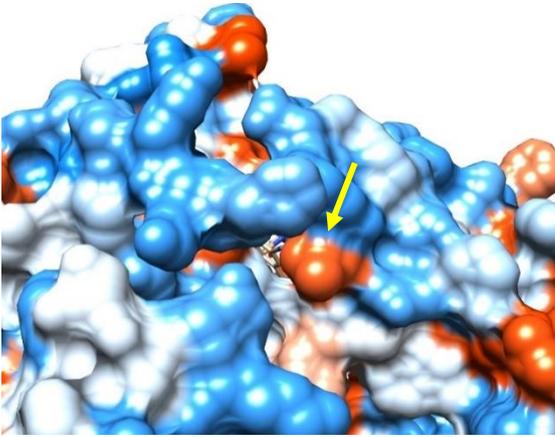
Yabanıl Tip – L228R

Homoloji modelleme sonucuna göre global ölçekte büyük bir değişikliğin olmadığı ancak mutasyon bölgesinde atomik ölçekli değişikliklerin gerçekleştiği görülmüştür (**Şekil 5.12.**).

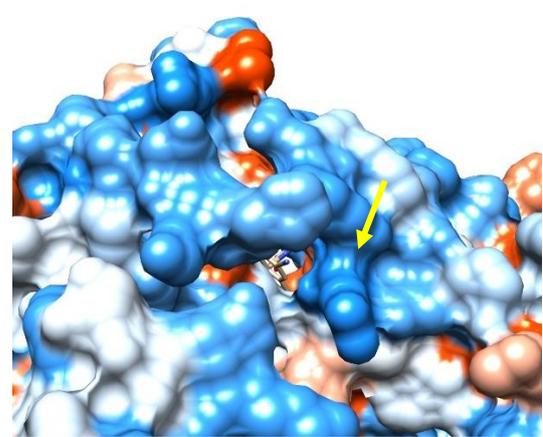
A



B



C



Şekil 5.12. **A.** Mutasyon amino asiti olan 228. amino asitin atomik gösterimi Yabanıl tip (**B**) ve L228R mutant tip (**C**)

228. amino asit konumundaki hidrofobik lösin (1.1) hidrofilik arjinin (-2.5) amino asitine dönüşmüştür. 228.amino asitin konumu ETR cebinin arkasında ve yüzeyde yer almaktadır bu yüzden doğrudan ETR ile bir ilişkisi yoktur. ETR cebinde yer alan fenilalanin 227 ile arasındaki uzaklığı değişmemiştir (**Çizelge 5.7.**). Bu sebeple ETR'nin cebe girişini etkilemeyeceğini ve ETR cebinde ETR'nin bağlanmasını etkileyecek bir değişikliğin oluşmayacağı düşünülmektedir.

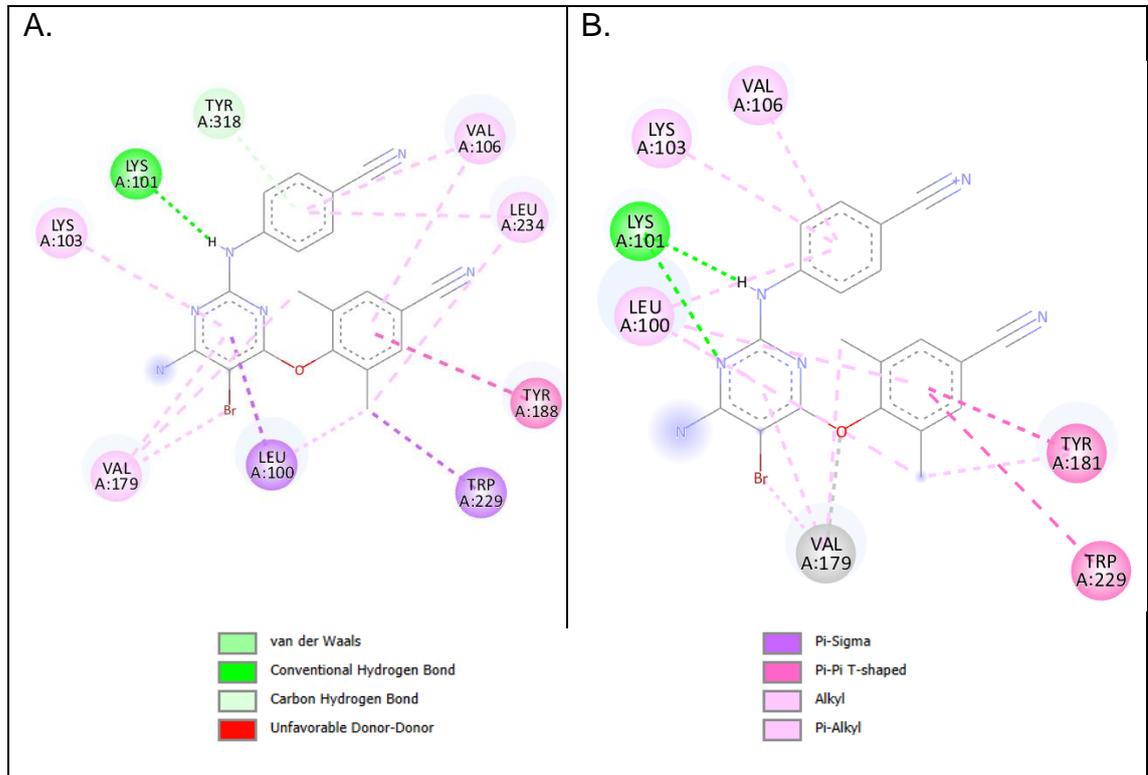
Çizelge 5.7. Yabanıl ve Mutant Tip modellerde 228. amino asitler ile ETR ve F227 amino asitine olan uzaklıkları.

Uzaklık (Å)	ETR (ort.)	F227
L 228	7.9	7.3
R 228	7.9	7.3

Yabanıl Tip – A98S

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.14.) yabanıl tip ile A98S modeli karşılaştırıldığında;

- Lys101 ile ETR arasında olan hidrojen bağ etkileşiminin arttığı,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve arttığı,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve arttığı,
- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği ve azaldığı,
- Trp229 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği,
- Lys103 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği,
- Tyr188 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Tyr181 ile ETR arasında ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı analiz edilmiştir.

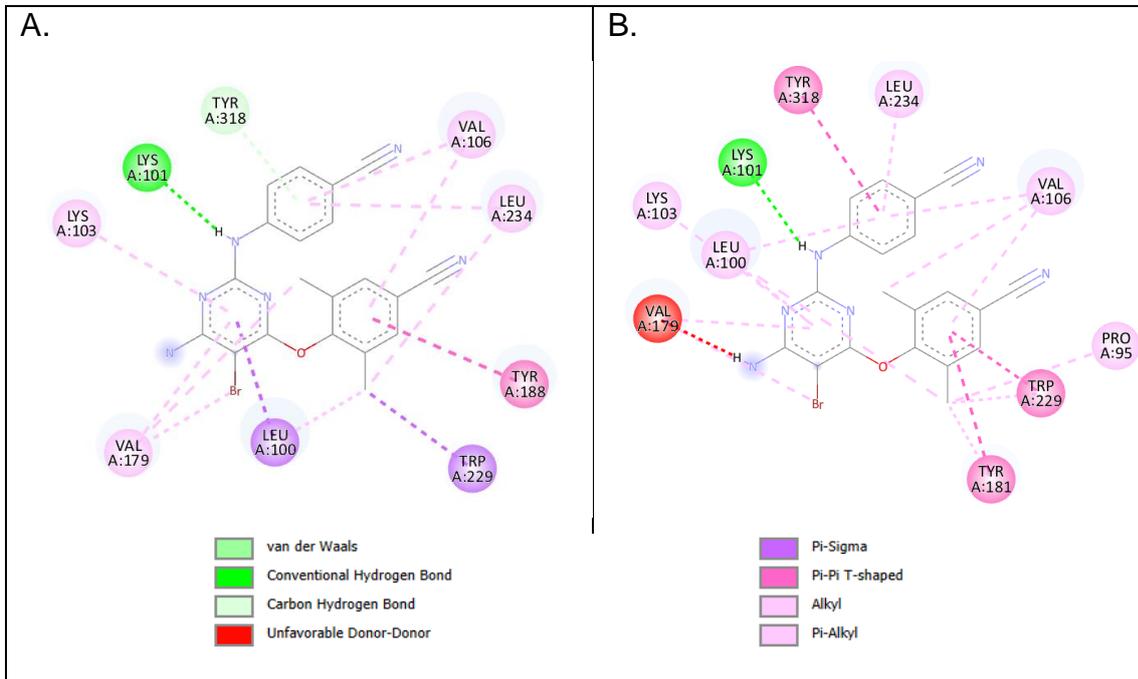


Şekil 5.14. Yabanıl (A.) ve A98S mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabanıl Tip – I94L-K102R

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.15.) yabanıl tip ile I94L-K102R modeli karşılaştırıldığında;

- Pro95 amino asitinin ETR ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Tyr181 amino asitinin ETR ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve Donör-Donör etkileşiminin oluştuğu,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği,
- Trp229 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği,
- Tyr188 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin azaldığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşim tipinin değiştiği edilmiştir.

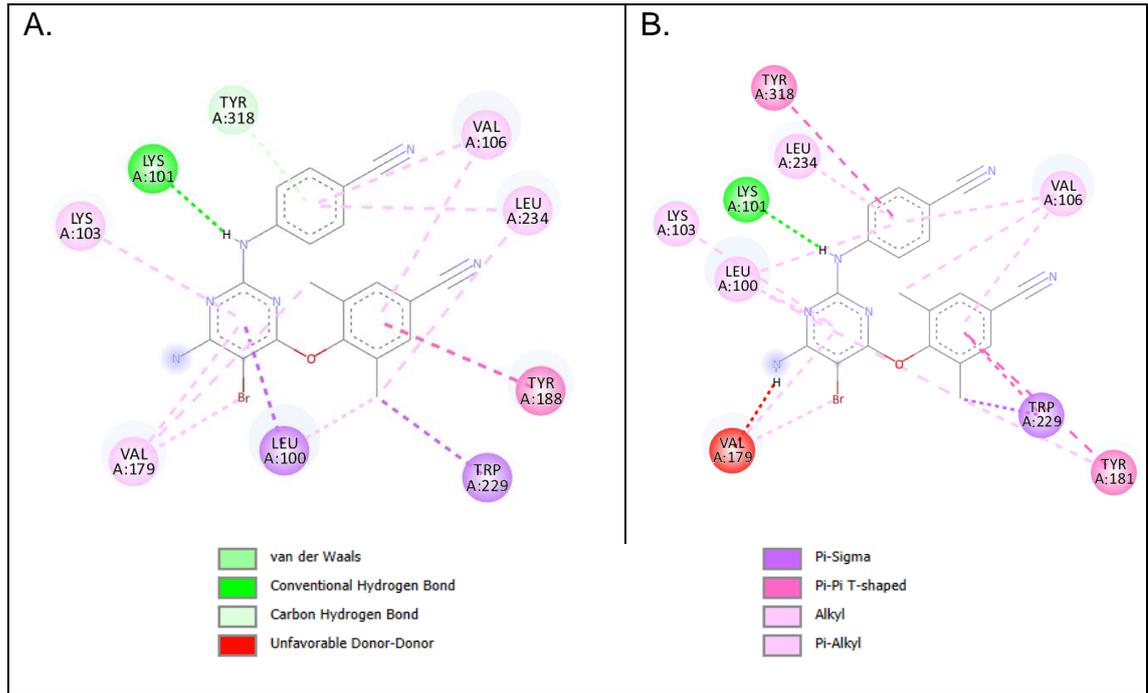


Şekil 5.15. Yabanıl (A.) ve I94L-K102R mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabanıl Tip – K102Q

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.16.) yabanıl tip ile K102Q modeli karşılaştırıldığında;

- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve Donör-Donör etkileşiminin oluştuğu,
- Tyr181 ile ETR arasında ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği,
- Tyr188 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin azaldığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşim tipinin değiştiği edilmiştir.

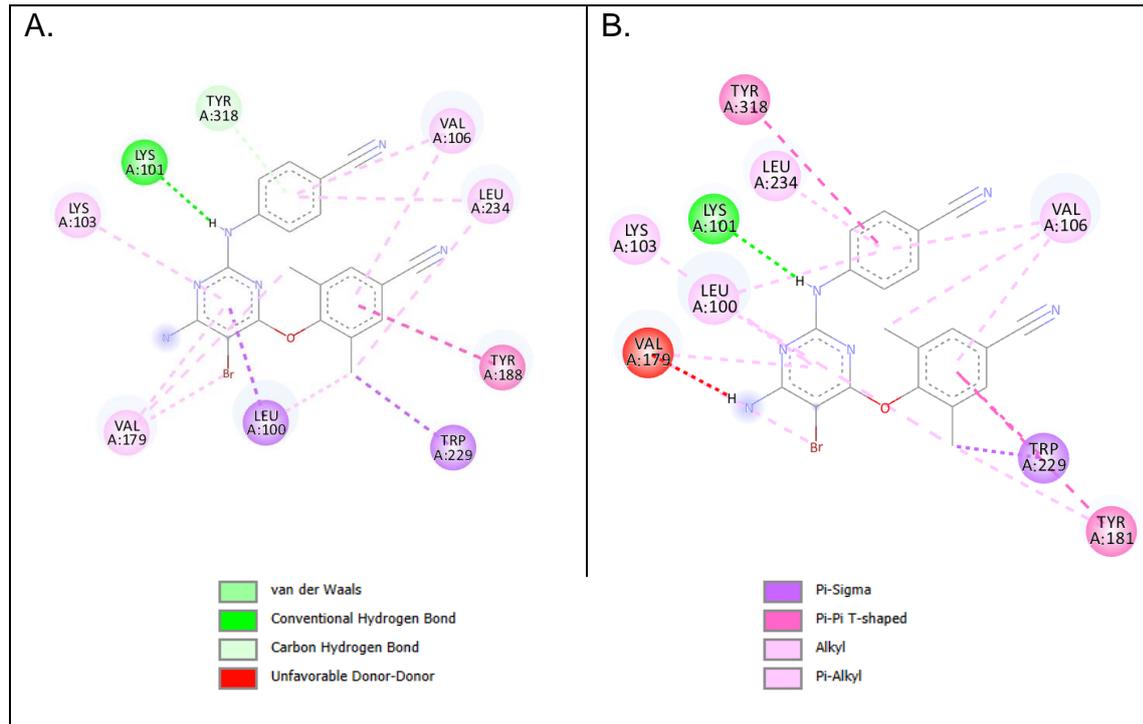


Şekil 5.16. Yabanıl (A.) ve K102Q mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabanıl Tip – K104Q

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.17.) yabanıl tip ile K104Q modeli karşılaştırıldığında;

- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve Donör-Donör etkileşiminin oluştuğu,
- Tyr181 ile ETR arasında ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği,
- Tyr188 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin azaldığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşim tipinin değiştiği edilmiştir.

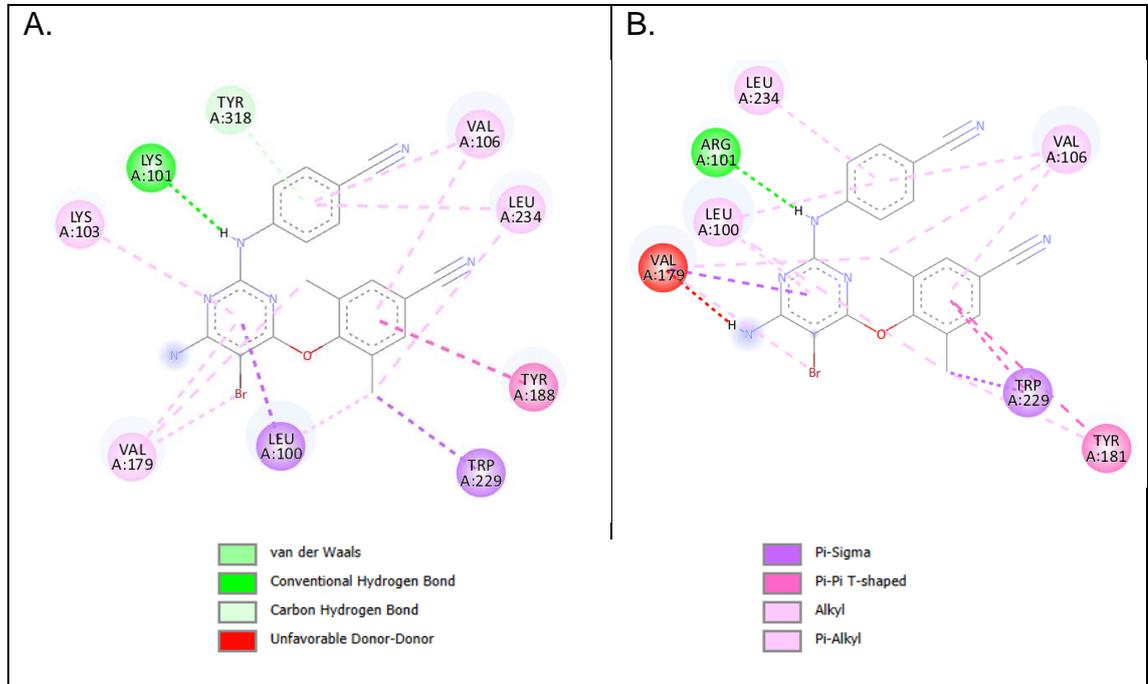


Şekil 5.17. Yabanıl (A.) ve K104Q mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabanıl Tip – K101R-K104R

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.18.) yabanıl tip ile K101R-K104R modeli karşılaştırıldığında;

- Lys101 amino asiti yerine Arg101 amino asiti geçmiştir hidrojen bağı bozulmamıştır,
- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Trp229 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve Donör-Donör etkileşiminin oluştuğu,
- Tyr181 ile ETR arasında ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği,
- Tyr188 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin azaldığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı edilmiştir.

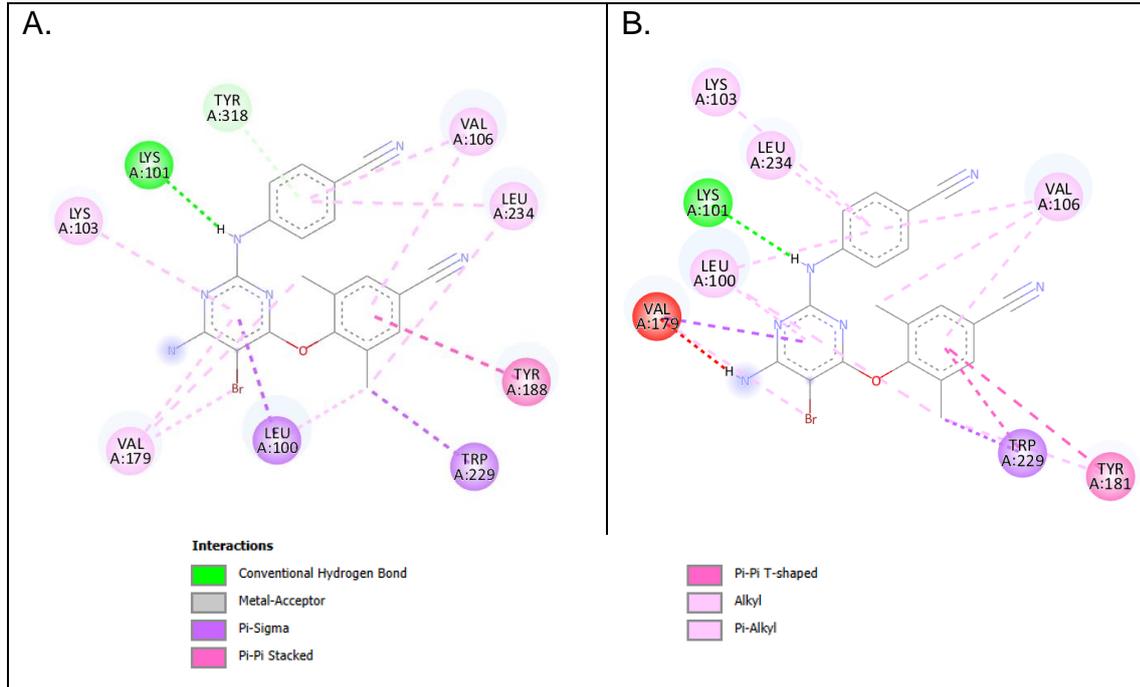


Şekil 5.18. Yabanıl (A.) ve K101R-K104R mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabanıl Tip – K104E-H235L

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.19.) yabanıl tip ile K104E-H235L modeli karşılaştırıldığında;

- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Trp229 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Lys103 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve Donör-Donör etkileşiminin oluştuğu,
- Tyr181 ile ETR arasında π -etkileşiminin kurulduğu,
- Tyr188 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin azaldığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı edilmiştir.

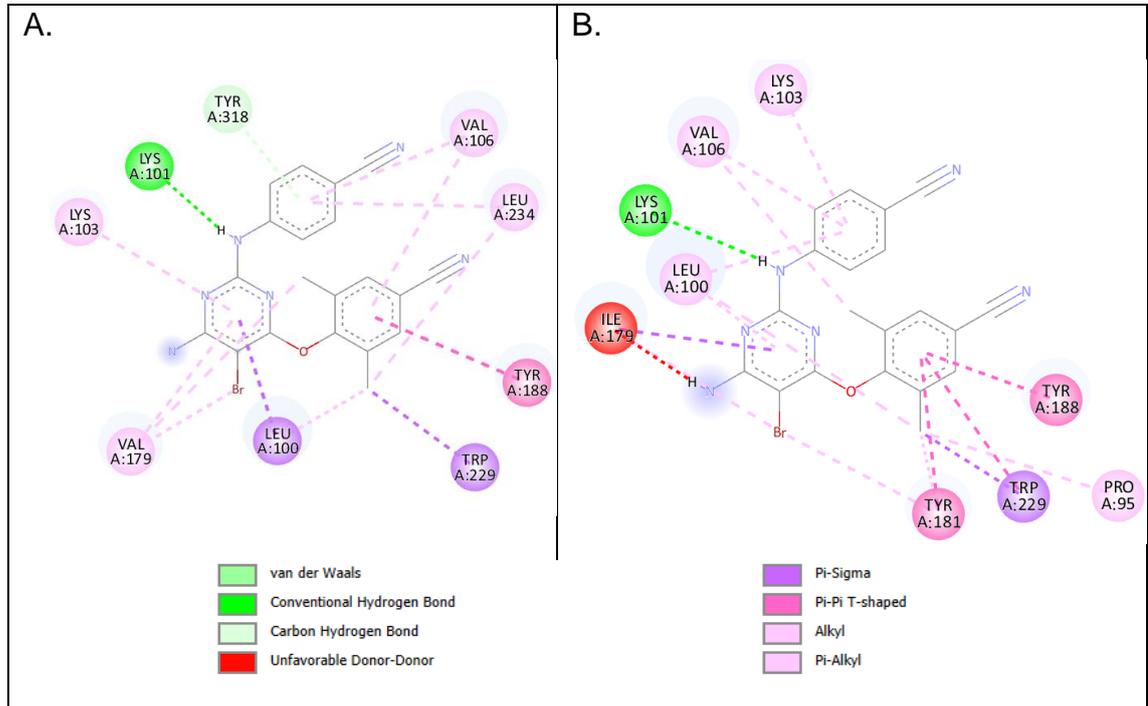


Şekil 5.19. Yabanıl (A.) ve K104E-H235L mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabanıl Tip – V179I

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.20.) yabanıl tip ile V179I modeli karşılaştırıldığında;

- Val179 amino asitinin değiştiği Ile179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği, azaldığı ve yeni Donör-Donör etkileşiminin oluştuğu,
- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği,
- Trp229 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Lys103 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin değiştiği,
- Val179 amino asiti yerine Ile101 amino asiti geçmiştir hidrojen bağı bozulmamıştır,
- Tyr181 ile ETR arasında ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Pro95 ile ETR arasında ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı edilmiştir.

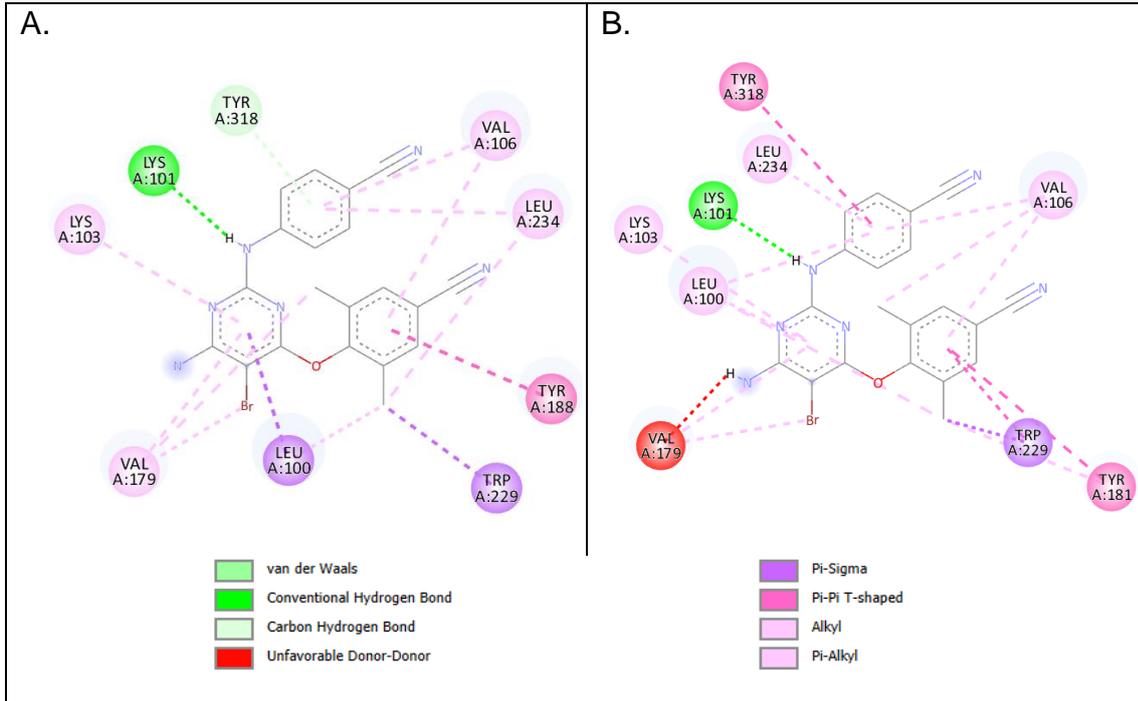


Şekil 5.20. Yabanıl (A.) ve V179I mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabanıl Tip – S191F

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.21.) yabanıl tip ile S191F modeli karşılaştırıldığında;

- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Trp229 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve Donör-Donör etkileşiminin oluştuğu,
- Tyr181 ile ETR arasında π -etkileşiminin kurulduğu,
- Tyr188 ile ETR arasındaki etkileşimin kalktığı,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin azaldığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşim tipinin değiştiği analiz edilmiştir.

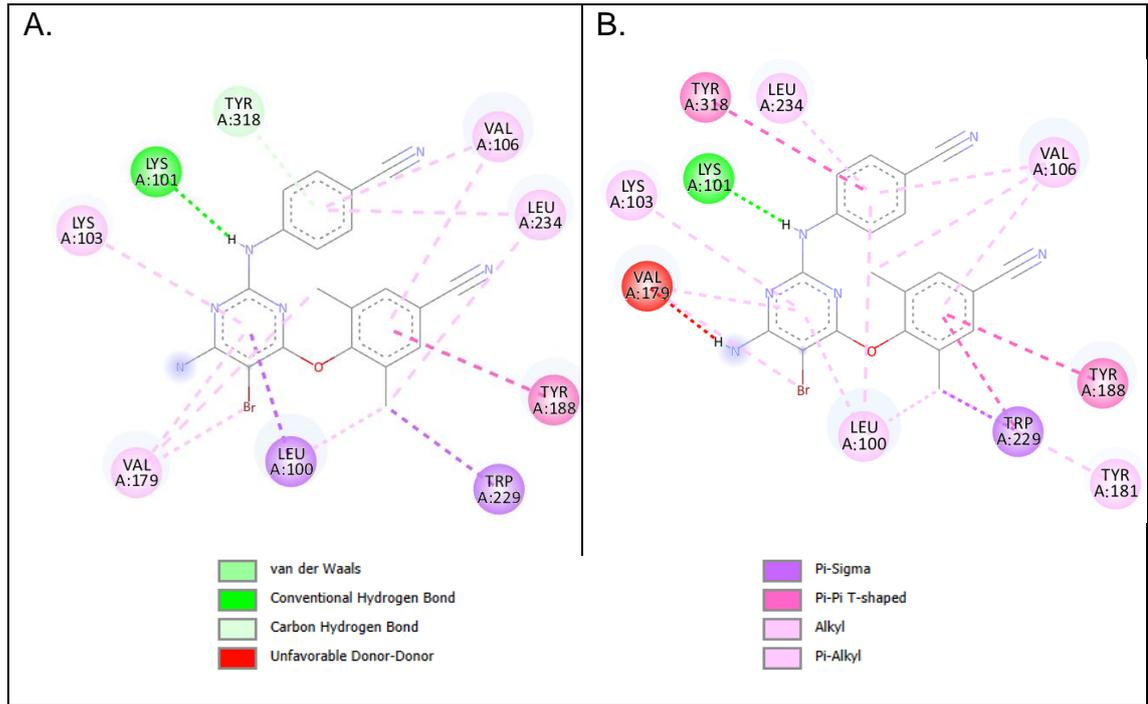


Şekil 5.21. Yabanıl (A.) ve S191F mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

Yabani Tip – L228R

Moleküler yerleştirme sonuç analizleri ve protein ligand etkileşimi analizi ayrı ayrı değerlendirilmiştir. Moleküler yerleştirme sonuç analizine göre (Şekil 5.22.) yabancı tip ile L228R modeli karşılaştırıldığında;

- Val106 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Trp229 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Leu100 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgesinin arttığı,
- Val179 amino asitinin ETR ile π -etkileşim bölgelerinin değiştiği ve Donör-Donör etkileşiminin olduğu,
- Tyr181 ile ETR arasında ile π -etkileşiminin kurulduğu,
- Leu234 ile ETR arasındaki etkileşimin azaldığı,
- Tyr318 ile ETR arasındaki etkileşim tipinin değiştiği analiz edilmiştir.



Şekil 5.22. Yabani (A.) ve K104E-H235L mutant (B.) tiplerin moleküler yerleştirme 2D diyagram gösterimi

5.3. Protein-Ligand Etkileşim Analizi Sonuçları

Yabanıl Tip – A98S

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile A98S mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni 2 farklı hidrofobik etkileşimin olduğu, Tyr188 amino amino asidiyle olan 2 hidrofobik etkileşimden birinin ortadan kalktığı, Trp229, Leu234 amino asitlerinin ETR ile hidrofobik etkileşimlerinin ortadan kalktığı, Val179 amino asidiyle yeni bir hidrofobik etkileşimin olduğu, Tyr181 amino asidiyle π -istif etkileşiminin olduğu, diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (**Çizelge 5.9**).

Çizelge 5.9. Yabanıl Tip ve A98S mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			A98S		
Hidrofobik Etkileşim			Hidrofobik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.44
106	Val	3.82	100	Leu	3.16
106	Val	3.40	103	Lys	3.68
188	Tyr	3.56	106	Val	3.75
188	Tyr	3.36	179	Val	3.95
229	Trp	3.91	181	Tyr	3.59
234	Leu	3.73	188	Tyr	3.55
318	Tyr	3.87	318	Tyr	3.71
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	2.57
101	Lys	3.76	101	Lys	1.86
π-İstifleri			π-İstifleri		
			181	Tyr	4.24

Bu değişen etkileşimler sonucunda yabancı tipe (-10.6) oranla A98S mutant tipinin daha az bir bağlanma skoruna (-9.6) sahip olduğu düşünölmektedir.

Yabancı Tip – I94L-K102R

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabancı tip ile I94L-K102R mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni bir hidrofobik etkileşimin olduğu, Trp229 amino asidinin ETR ile hidrofobik etkileşiminin π -istif etkileşimine dönüştüğü, diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (**Çizelge 5.10**).

Çizelge 5.10. Yabancı Tip ve I94L-K102R mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabancı Tip			I94L-K102R		
Hidrofobik Etkileşim			Hidrofobik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.51
106	Val	3.82	103	Lys	3.74
106	Val	3.40	106	Val	3.89
188	Tyr	3.56	106	Val	3.58
188	Tyr	3.36	188	Tyr	3.66
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.67
234	Leu	3.73	234	Leu	3.47
318	Tyr	3.87	318	Tyr	3.94
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	2.24
101	Lys	3.76	101	Lys	3.14
			π -İstifleri		
			229	Trp	5.50

Yabanıl Tip – K102Q

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile K102Q mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni 2 farklı hidrofobik etkileşimin olduğu, Trp229 amino asidiyle yeni bir π -istif etkileşiminin olduğu, diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (Çizelge 5.11).

Çizelge 5.11. Yabanıl Tip ve K102Q mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			K102Q		
Hidrofofik Etkileşim			Hidrofofik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.49
106	Val	3.82	100	Leu	3.86
106	Val	3.40	103	Lys	3.75
188	Tyr	3.56	106	Val	3.90
188	Tyr	3.36	106	Val	3.64
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.67
234	Leu	3.73	188	Tyr	3.62
318	Tyr	3.87	229	Trp	3.69
			234	Leu	3.49
			318	Tyr	3.92
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	2.19
101	Lys	3.76	101	Lys	3.07
			π -İstifleri		
			229	Trp	5.45

Bu etkileşimler sonucunda yabanıl tip (-10.6) ve K102Q mutant tipinin aynı bağlanma skoruna (-10.6) sahip olduğu düşünülmektedir.

Yabanıl Tip – K104Q

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile K104Q mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni bir hidrofobik etkileşimin olduğu, Trp229 amino asidiyle olan hidrofobik etkileşimin π -istif etkileşimine dönüştüğü, diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (Çizelge 5.12.).

Çizelge 5.12. Yabanıl Tip ve K104Q mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			K104Q		
Hidrofofik Etkileşim			Hidrofofik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.49
106	Val	3.82	103	Lys	3.74
106	Val	3.40	106	Val	3.82
188	Tyr	3.56	106	Val	3.55
188	Tyr	3.36	188	Tyr	3.64
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.68
234	Leu	3.73	229	Trp	3.65
318	Tyr	3.87	234	Leu	3.51
			318	Tyr	3.98
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	2.29
101	Lys	3.76	101	Lys	3.15
			π -İstifleri		
			229	Trp	5.43

Bu değişen etkileşimler sonucunda yabanıl tipe (-10.6) oranla K104Q mutant tipinin daha az bir bağlanma skoruna (-10.5) sahip olduğu düşünülmektedir.

Yabanıl Tip – K101R-K104R

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile K101R-K104R mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni 2 farklı hidrofobik etkileşimin olduğu, Tyr318 amino asitinin ETR ile hidrofobik etkileşimlerinin ortadan kalktığı, Lys101 amino yerine Arg101 amino asidinin iki hidrojen bağı kurduğu, diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (Çizelge 5.13.).

Çizelge 5.13. Yabanıl Tip ve K101R-K104R mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			K101R-K104R		
Hidrofobik Etkileşim			Hidrofobik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.40
106	Val	3.82	100	Leu	3.88
106	Val	3.40	103	Lys	3.60
188	Tyr	3.56	106	Val	3.91
188	Tyr	3.36	106	Val	3.66
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.73
234	Leu	3.73	188	Tyr	3.57
318	Tyr	3.87	229	Trp	3.72
			234	Leu	3.63
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Arg	1.99
101	Lys	3.76	101	Arg	3.17

Bu etkileşimler sonucunda yabanıl tip (-10.6) ve K101R-K104R mutant tipinin aynı bağlanma skoruna (-10.6) sahip olduğu düşünülmektedir.

Yabanıl Tip – K104E-H235L

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile K104E-H235L mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni 2 farklı hidrofobik etkileşimin olduğu, Tyr318 amino asitinin ETR ile hidrofobik etkileşimlerinin ortadan kalktığı, diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (**Çizelge 5.14**).

Çizelge 5.14. Yabanıl Tip ve K104E-H235L mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			K104E-H235L		
Hidrofobik Etkileşim			Hidrofobik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.43
106	Val	3.82	100	Leu	3.87
106	Val	3.40	103	Lys	3.53
188	Tyr	3.56	106	Val	3.89
188	Tyr	3.36	106	Val	3.59
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.73
234	Leu	3.73	188	Tyr	3.54
318	Tyr	3.87	229	Trp	3.72
			234	Leu	3.51
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	3.67
101	Lys	3.76	101	Lys	2.03

Bu etkileşimler sonucunda yabanıl tip (-10.6) ve K104E-H235L mutant tipinin aynı bağlanma skoruna (-10.6) sahip olduğu düşünülmektedir.

Yabanıl Tip – V179I

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile V179I mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni iki hidrofobik etkileşimin olduğu ve Lys101 amino asidiyle bir hidrojen bağının ortadan kalktığı, diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (**Çizelge 5.15**).

Çizelge 5.15. Yabanıl Tip ve V179I mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			V179I		
Hidrofobik Etkileşim			Hidrofobik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.70
106	Val	3.82	100	Leu	3.80
106	Val	3.40	103	Lys	3.73
188	Tyr	3.56	106	Val	3.63
188	Tyr	3.36	106	Val	3.98
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.81
234	Leu	3.73	188	Tyr	3.37
318	Tyr	3.87	229	Trp	3.66
			234	Leu	3.84
			318	Tyr	3.78
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	2.21
101	Lys	3.76			

Bu değişen etkileşimler sonucunda yabanıl tipe (-10.6) oranla V179I mutant tipinin daha az bir bağlanma skoruna (-9.6) sahip olduğu düşünülmektedir.

Yabanıl Tip – S191F

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile S191F mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 amino asidiyle yeni bir hidrofobik etkileşimin oluştuğu, Trp229 amino asidiyle yeni iki π -istif etkileşiminin oluştuğu, Val106 amino asiti ve ETR'nin hidrofobik etkileşimlerinden birinin ortadan kalktığı diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (**Çizelge 5.16**).

Çizelge 5.16. Yabanıl Tip ve S191F mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			S191F		
Hidrofobik Etkileşim			Hidrofobik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.91
106	Val	3.82	103	Lys	3.65
106	Val	3.40	106	Val	3.55
188	Tyr	3.56	181	Tyr	3.97
188	Tyr	3.36	188	Tyr	3.43
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.54
234	Leu	3.73	229	Trp	3.63
318	Tyr	3.87	234	Leu	3.67
			318	Tyr	3.68
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	2.43
101	Lys	3.76	101	Lys	5.36
			π-İstifleri		
			229	Trp	5.11
			229	Trp	5.36

Bu etkileşimler sonucunda yabanıl tip (-10.6) ile S191F mutant tip karşılaştırıldığında birbirine yakın bir bağlanma skoruna (-10.5) sahip olduğu düşünülmektedir.

Yabanıl Tip – L228R

Protein ligand etkileşimi analizi sonuçlarında yabanıl tip ile L228R mutasyonu karşılaştırıldığında mutant model etkileşiminde; Leu100 ve Tyr181 amino asidiyle yeni bir hidrofobik etkileşimlerin olduğu, Trp229 amino asidiyle yeni iki π -istif etkileşiminin olduğu, Val106 amino asiti ve ETR'nin hidrofobik etkileşimlerinden birinin ortadan kalktığı diğer etkileşimde olan amino asitlerle uzaklıklarının 0.5 Å uzaklığından düşük değerde değişime uğradığı analiz edilmiştir (**Çizelge 5.17**).

Çizelge 5.17. Yabanıl Tip ve S191F mutant tip protein ligand etkileşim analizi

Yabanıl Tip			L228R		
Hidrofobik Etkileşim			Hidrofobik Etkileşim		
Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)	Konum	Amino Asit	Uzaklık (Å)
103	Lys	3.67	100	Leu	3.87
106	Val	3.82	103	Lys	3.61
106	Val	3.40	106	Val	3.57
188	Tyr	3.56	106	Val	3.99
188	Tyr	3.36	181	Tyr	3.96
229	Trp	3.91	188	Tyr	3.46
234	Leu	3.73	188	Tyr	3.50
318	Tyr	3.87	229	Trp	3.62
			234	Leu	3.71
			318	Tyr	3.70
Hidrojen Bağları			Hidrojen Bağları		
101	Lys	2.22	101	Lys	2.07
101	Lys	3.76	101	Lys	3.11
π-İstifleri			π-İstifleri		
			229	Trp	5.21
			229	Trp	5.33

Bu etkileşimler sonucunda yabancı tip, (-10.6) ve L228R mutant tipinin aynı bağlanma skoruna (-10.6) sahip olduğu düşünülmektedir.

5.4. Hücre Kültürü Sonuçları

Hücre kültürü çalışmalarından numune yetersizliği sebebiyle istatistiksel olarak anlamlı sonuçlar elde edilememiştir.

5.5. Sonuçların Tartışılması

Homoloji modelleme, moleküler yerleştirme ve protein ligand etkileşim analizi çalışmalarının sonuçları birlikte değerlendirildiğinde; düşük düzey viremili hastalardan elde edilen suşların HIV-RT proteininde saptanan **S191F, K104E – H235L, K102Q, K104Q** mutasyonlarının ETR'ye karşı direnç göstermediği, düşük düzey viremi durumunun bu mutasyonlar sebebiyle olmadığı (Vardhanabhuti ve diğerleri, 2015, Li ve diğerleri, 2012, Fleming ve diğerleri, 2019), virolojik başarısızlık sebebiyle düşük düzey viremiye sebep olabileceği düşünülmektedir (Laprise ve diğerleri, 2013).

2010 yılında Lai M.T. ve arkadaşlarının yaptığı hücre kültürü çalışmalarında **S191F** (Lai ve diğerleri, 2010) tek başına direnç göstermediği, Telwatte S. ve arkadaşlarının 2016 yılında yapmış olduğu bir çalışmada **K104** polimorfizmlerinin dirence sebep olabileceğinin düşünüldüğü, **K102Q** mutasyonunun direnç ile ilişkili olmadığı ancak Hachiya A. ve arkadaşlarının 2004 yılında yaptığı bir çalışmada **K102R** mutasyonunun diğer mutasyonlarla beraber direnç gösterdiği literatürde yer almaktadır. H235L mutasyonunun direnç ile ilişkili olduğu bir çalışma bulunmamaktadır. Literatür çalışmaları ve yaptığımız analiz sonuçları göz önüne alındığında HIV-RT proteininde saptanan S191F, K104E – H235L, K102Q, K104Q mutasyonlarının ETR'ye karşı direnç geliştiremeyeceği bu sebeple düşük düzey viremi durumuna yol açamayacağı düşünülmektedir.

Vingerhoets J. ve arkadaşlarının 2010 yılında yapmış olduğu bir çalışmada **A98S** mutasyonun aynı suşta başka bir NNRTI mutasyonu ile beraber dirence yol açabileceği, **A98G** mutasyonunun (Stanford Veri Bankası, Rhee ve diğerleri,

2023, Vingerhoets ve diğeri, 2010) diğeri mutasyonlarla beraber dirence yol açtığı bildirilmiştir. V179 yüksek mutasyona sahip bir bölgedir, V179D/E/F/L/T mutasyonlarının dirence sebep olabileceği bildirilmiştir (Dwivedi ve diğeri, 2022, Stanford Veri Tabanı,). Dwivedi R. ve arkadaşlarının 2022 yılında yapmış oldukları bir hücre kültürü çalışmasında V179I mutasyonun tek başına yabanıl tipte yakın bir ilaç duyarlılığına sahip olduğu ancak Y181 mutasyonlarıyla beraber NNRT inhibitörlerinden biri olan rilpivirine karşı direnç gösterdiği, Marcelin ve arkadaşlarının 2012 yılında yaptıkları bir biyoinformatik analiz çalışmasında; özellikle, V179 konumundaki değişiklikler ETR direnci için önemli görüldüğünü, **V179I/L** mutasyonlarının diğeri mutasyonlarla direnç ile ilişkilendirilebileceğini, bu mutasyonların fenotipik duyarlılığı azalttığı bildirmiştir. Literatür çalışmaları ve yaptığımız analiz sonuçları göz önüne alındığında HIV-RT proteininde saptanan A98S ve V179I mutasyonlarının ETR'ye karşı direnç tek başına düşük düzeyde direnç gösterebileceği, kombine bir durumda ise yüksek dirence yol açabileceği düşünülmektedir.

KAYNAKLAR

- Adasme, M. F., Linnemann, K. L., Bolz, S. N., Kaiser, F., Salentin, S., Haupt, V. J., and Schroeder, M., PLIP 2021: Expanding the scope of the protein–ligand interaction profiler to DNA and RNA. *Nucleic Acids Research*, 49 (2021) 530-534.
- Agarwala, R., Barrett, T., Beck, J., Benson, D. A., Bollin, C., Bolton, E., and Zbicz, K., Database resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research*, 44 (2016) D7–D19.
- Arnold, K., Bordoli, L., Kopp, J., and Schwede, T., The SWISS-MODEL workspace: a web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics*, 22 (2006) 195-201.
- Bavinton, B. R., Pinto, A. N., Phanuphak, N., Grinsztejn, B., Prestage, G. P., Zablotska-Manos, I. B., and Orth, D., Viral suppression and HIV transmission in serodiscordant male couples: an international, prospective, observational, cohort study. *The Lancet HIV*, 5 (2018) e438-e447.
- Berman, H. M., Westbrook, J., Feng, Z., Gilliland, G., Bhat, T. N., Weissig, H., and Bourne, P. E., The protein data bank. *Nucleic Acids Research*, 28 (2000) 235-242.
- Berman, H., Henrick, K., and Nakamura, H., Announcing the worldwide Protein Data Bank. *Nature Structural Biology*, 10 (2003) 980.
- Bernal, E., Gómez, J. M., Jarrín, I., Cano, A., Muñoz, A., Alcaraz, A., and CoRIS Study Group., Low-level viremia is associated with clinical progression in HIV-infected patients receiving antiretroviral treatment. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 78 (2018) 329-337.
- Bernard, N. F., Yannakis, C. M., Lee, J. S., and Tsoukas, C. M., Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific Cytotoxic T Lymphocyte Activity in HIV-Exposed Seronegative Persons. *The Journal of Infectious Diseases*, 179 (1999) 538-547.
- Blaise, P., Clevenbergh, P., Vaira, D., Moutschen, M., and Dellamonica, P., HIV resistance to antiretroviral drugs: mechanisms, genotypic and phenotypic resistance testing in clinical practice. *Acta Clinica Belgica*, 57 (2002) 191-201.
- Bowerman, B., Brown, P. O., Bishop, J. M., and Varmus, H. E., A nucleoprotein complex mediates the integration of retroviral DNA. *Genes & Development*, 3 (1989) 469-478.

- Briggs, J.A., Wilk, T., Welker, R., Kräusslich, H.G., Fuller, S.D. Structural organization of authentic, mature HIV-1 virions and cores. *EMBO* 22 (2003) 1707-1715.
- Cavasotto, C. N., and Phatak, S. S., Homology modeling in drug discovery: current trends and applications. *Drug Discovery Today*, 14 (2009) 676-683.
- CB-Dock, <http://clab.labshare.cn/cb-dock/php/index.php> (Erişim tarihi: **29 Kasım 2022**).
- Cohen, C. J., Molina, J. M., Cahn, P., Clotet, B., Fourie, J., Grinsztejn, B., and Boven, K., Efficacy and safety of rilpivirine (TMC278) versus efavirenz at 48 weeks in treatment-naïve HIV-1-infected patients: pooled results from the phase 3 double-blind randomized ECHO and THRIVE trials. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 60 (2012), 33-42.
- Cohen, M. S., Chen, Y. Q., McCauley, M., Gamble, T., Hosseinipour, M. C., Kumarasamy, N., and Fleming, T. R., Prevention of HIV-1 infection with early antiretroviral therapy. *New England Journal of Medicine*, 365 (2011), 493-505.
- Das, K., Clark, A. D., Lewi, P. J., Heeres, J., De Jonge, M. R., Koymans, L. M., and Arnold, E., Roles of conformational and positional adaptability in structure-based design of TMC125-R165335 (etravirine) and related non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors that are highly potent and effective against wild-type and drug-resistant HIV-1 variants. *Journal of Medicinal Chemistry*, 47 (2004) 2550-2560.
- Dill, K., and Bromberg, S., *Molecular driving forces: statistical thermodynamics in biology, chemistry, physics, and nanoscience*. Garland Science, New York, **2003**.
- Diphoko, T., Gaseitsiwe, S., Kasvosve, I., Moyo, S., Okatch, H., Musonda, R., and Essex, M., Prevalence of rilpivirine and etravirine resistance mutations in HIV-1 subtype C-infected patients failing nevirapine or efavirenz-based combination antiretroviral therapy in Botswana. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 34 (2018) 667-671.
- Divita, G., Rittinger, K., Geourjon, C., Deleage, G., and Goody, R. S., Dimerization kinetics of HIV-1 and HIV-2 reverse transcriptase: a two step process. *Journal of Molecular Biology*, 245 (1995) 508-521.
- Domingo, E., Sheldon, J., and Perales, C., Viral quasispecies evolution. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 76 (2012) 159-216.

- Dwivedi, R., Wang, Y., Kline, C., Fischer, D. K., and Ambrose, Z., APOBEC3 selects V179I in HIV-1 reverse transcriptase to provide selective advantage for non-nucleoside reverse transcriptase inhibitor-resistant mutants. *Frontiers in Virology*, 2 (2022) 919825.
- Embretson, J., Zupancic, M., Ribas, J. L., Burke, A., Racz, P., Tenner-Racz, K., and Haase, A. T., Massive covert infection of helper T lymphocytes and macrophages by HIV during the incubation period of AIDS. *Nature*, 362 (1993) 359-362.
- Engelman, A., and Cherepanov, P., The structural biology of HIV-1: mechanistic and therapeutic insights. *Nature Reviews Microbiology*, 10 (2012) 279-290.
- Esposito, F., Corona, A., and Tramontano, E., HIV-1 reverse transcriptase still remains a new drug target: structure, function, classical inhibitors, and new inhibitors with innovative mechanisms of actions. *Molecular Biology International*, (2012) 586401.
- Ferreira, L. G., Dos Santos, R. N., Oliva, G., and Andricopulo, A. D., Molecular docking and structure-based drug design strategies. *Molecules*, 20 (2015) 13384-13421.
- Fiser, A., Do, R. K. G., and Šali, A., Modeling of loops in protein structures. *Protein Science*, 9 (2000) 1753-1773.
- Fleming, J., Mathews, W. C., Rutstein, R. M., Aberg, J., Somboonwit, C., Cheever, L. W., and HIV Research Network., Low level viremia and virologic failure in persons with HIV infection treated with antiretroviral therapy. *Aids*, 33 (2019) 2005-2012.
- Gromski, P. S., and Kierzek, A. M., The importance of hydrogen bonds in stabilizing biological molecules. *Acta Biochimica Polonica*, 52 (2005) 663-671.
- Günthard, H. F., Calvez, V., Paredes, R., Pillay, D., Shafer, R. W., Wensing, A. M., and Richman, D. D., Human immunodeficiency virus drug resistance: 2018 recommendations of the International Antiviral Society–USA Panel. *Clinical Infectious Diseases*, 68 (2019) 177-187.
- Hachiya, A., Gatanaga, H., Kodama, E., Ikeuchi, M., Matsuoka, M., Harada, S., and Oka, S. (2004). Novel patterns of nevirapine resistance-associated mutations of human immunodeficiency virus type 1 in treatment-naive patients. *Virology*, 327 (2004) 215-224.

- Hadida, F., Vieillard, V., Mollet, L., Clark-Lewis, I., Baggiolini, M., and Debré, P., Cutting edge: RANTES regulates Fas ligand expression and killing by HIV-specific CD8 cytotoxic T cells. *The Journal of Immunology*, 163 (1999) 1105-1109.
- Hadzopoulou-Cladaras, M., Felber, B. K., Cladaras, C., Athanassopoulos, A., Tse, A., and Pavlakis, G. N., The rev (trs/art) protein of human immunodeficiency virus type 1 affects viral mRNA and protein expression via a cis-acting sequence in the env region. *Journal of Virology*, 63 (1989) 1265-1274.
- Hazarika, R. R., Sostaric, N., Sun, Y., and van Noort, V., Large-scale docking predicts that sORF-encoded peptides may function through protein-peptide interactions in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS One*, 13 (2018) e0205179.
- Heinzinger, N. K., Bukinsky, M. I., Haggerty, S. A., Ragland, A. M., Kewalramani, V., Lee, M. A., and Emerman, M., The Vpr protein of human immunodeficiency virus type 1 influences nuclear localization of viral nucleic acids in nondividing host cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 91 (1994) 7311-7315.
- Hengel, R. L., Kennedy, M. S., Steketee, R. W., Thea, D. M., Abrams, E. J., Lambert, G., and McDougal, J. S., Neutralizing antibody and perinatal transmission of human immunodeficiency virus type 1. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 14 (1998) 475-481.
- Hermans, L. E., Moorhouse, M., Carmona, S., Grobbee, D. E., Hofstra, L. M., Richman, D. D., and Wensing, A. M., Effect of HIV-1 low-level viraemia during antiretroviral therapy on treatment outcomes in WHO-guided South African treatment programmes: a multicentre cohort study. *The Lancet Infectious Diseases*, 18 (2018) 188-197.
- Huang, Y., Study of Mining Protein Structural Properties and its Application, Doktora Tezi, Department of Computer Science and Information Engineering College of Electrical Engineering and Computer Science, National Taiwan University, 2007.
- Jacobo-Molina, A., Ding, J., Nanni, R. G., Clark Jr, A. D., Lu, X., Tantillo, C., and Clark, P., Crystal structure of human immunodeficiency virus type 1 reverse transcriptase complexed with double-stranded DNA at 3.0 Å resolution shows bent DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90 (1993) 6320-6324.
- Joly, V., and Yeni, P., Inhibiteurs non nucléosidiques de la transcriptase inverse. In *Annales de Médecine Interne (Paris)*, 151 (2000) 260-267.

- Kinnings, S. L., Liu, N., Buchmeier, N., Tonge, P. J., Xie, L., and Bourne, P. E., Drug discovery using chemical systems biology: repositioning the safe medicine Comtan to treat multi-drug and extensively drug resistant tuberculosis. *PLoS Computational Biology*, 5 (2009) e1000423.
- Kitchen, D. B., Decornez, H., Furr, J. R., and Bajorath, J., Docking and scoring in virtual screening for drug discovery: methods and applications. *Nature reviews Drug Discovery*, 3 (2004) 935-949.
- Kohlstaedt, L. A., Wang, J., Friedman, J. M., Rice, P. A., and Steitz, T. A., Crystal structure at 3.5 Å resolution of HIV-1 reverse transcriptase complexed with an inhibitor. *Science*, 256 (1992) 1783-1790.
- Kostrikis, L. G., Cao, Y., Ngai, H., Moore, J. P., and Ho, D. D., Quantitative analysis of serum neutralization of human immunodeficiency virus type 1 from subtypes A, B, C, D, E, F, and I: lack of direct correlation between neutralization serotypes and genetic subtypes and evidence for prevalent serum-dependent infectivity enhancement. *Journal of Virology*, 70 (1996) 445-458.
- LaBute, M. X., Zhang, X., Lenderman, J., Bennion, B. J., Wong, S. E., and Lightstone, F. C., Adverse drug reaction prediction using scores produced by large-scale drug-protein target docking on high-performance computing machines. *PloS One*, 9 (2014) e106298.
- Lai, M. T., Lu, M., Felock, P. J., Hrin, R. C., Wang, Y. J., Yan, Y., and Miller, M. D., Distinct mutation pathways of non-subtype B HIV-1 during in vitro resistance selection with nonnucleoside reverse transcriptase inhibitors. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 54 (2010) 4812-4824.
- Laprise, C., de Pokomandy, A., Baril, J. G., Dufresne, S., and Trottier, H., Virologic failure following persistent low-level viremia in a cohort of HIV-positive patients: results from 12 years of observation. *Clinical Infectious Diseases*, 57 (2013) 1489-1496.
- London, R.E., HIV-1 Reverse Transcriptase: A Metamorphic Protein with Three Stable States. *Structure*. 27 (2019) (3):420-426.
- Li, G., and De Clercq, E., HIV genome-wide protein associations: a review of 30 years of research. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80 (2016) 679-731.
- Li, H., Gao, Z., Kang, L., Zhang, H., Yang, K., Yu, K., and Jiang, H., TarFisDock: a web server for identifying drug targets with docking approach. *Nucleic Acids Research*, 34 (2006) 219-224.

- Li, J. Z., Gallien, S., Do, T. D., Martin, J. N., Deeks, S., Kuritzkes, D. R., and Hatano, H., Prevalence and significance of HIV-1 drug resistance mutations among patients on antiretroviral therapy with detectable low-level viremia. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 56 (2012) 5998-6000.
- Lyu, J., Wang, S., Balius, T. E., Singh, I., Levit, A., Moroz, Y. S., and Irwin, J. J., Ultra-large library docking for discovering new chemotypes. *Nature*, 566 (2019) 224-229.
- Malim, M. H., and Emerman, M., HIV-1 accessory proteins—ensuring viral survival in a hostile environment. *Cell Host & Microbe*, 3 (2008) 388-398.
- McMichael, A. J., and Rowland-Jones, S. L., Cellular immune responses to HIV. *Nature*, 410 (2001) 980-987.
- Mehellou, Y., and De Clercq, E., Twenty-six years of anti-HIV drug discovery: where do we stand and where do we go?. *Journal of Medicinal Chemistry*, 53 (2010) 521-538.
- Migueles, S. A., Laborico, A. C., Shupert, W. L., Sabbaghian, M. S., Rabin, R., Hallahan, C. W., and Connors, M., HIV-specific CD8+ T cell proliferation is coupled to perforin expression and is maintained in nonprogressors. *Nature Immunology*, 3 (2002) 1061-1068.
- Muhammed, M. T., and Aki-Yalcin, E., Homology modeling in drug discovery: Overview, current applications, and future perspectives. *Chemical Biology & Drug Design*, 93 (2019) 12-20.
- Ng, M. C., Fong, S., and Siu, S. W., PSOVina: The hybrid particle swarm optimization algorithm for protein–ligand docking. *Journal of Bioinformatics and Computational Biology*, 13 (2015) 1541007.
- Ogg, G. S., Jin, X., Bonhoeffer, S., Dunbar, P. R., Nowak, M. A., Monard, S., and McMichael, A. J., Quantitation of HIV-1-specific cytotoxic T lymphocytes and plasma load of viral RNA. *Science*, 279 (1998) 2103-2106.
- Okazaki, K., Takada, S., and Onuchic, J. N. Protein topology determines binding mechanism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 105 (2008). 9604-9609.
- Pagadala, N. S., Syed, K., and Tuszynski, J., Software for molecular docking: a review. *Biophysical Reviews*, 9 (2017) 91-102.
- Pereira, R., Ludwig, D. A., Mathew, S., Flores, C., Dominguez, S., Gonzalez, I., and Mitchell, C. D., Predicting viral failure in human immunodeficiency virus perinatally infected youth with persistent low-level viremia on highly active

- antiretroviral therapy. *Journal of the Pediatric Infectious Diseases Society*, 8 (2019), 303-309.
- Phillips, R. E., Rowland-Jones, S., Nixon, D. F., Gotch, F. M., Edwards, J. P., Ogunlesi, A. O., and McMichael, A. J. Human immunodeficiency virus genetic variation that can escape cytotoxic T cell recognition. *Nature*, 354 (1991) 453-459.
- Piatak Jr, M., Saag, M. S., Yang, L. C., Clark, S. J., Kappes, J. C., Luk, K. C., and Lifson, J. D. High levels of HIV-1 in plasma during all stages of infection determined by competitive PCR. *Science*, 259 (1993) 1749-1754.
- Pinzi, L., and Rastelli, G., Molecular docking: shifting paradigms in drug discovery. *International Journal of Molecular Sciences*, 20 (2019), 4331.
- Product Monograph Intelence™ (etravirine). Janssen-Ortho Inc., Toronto, ON, Canada: 2009. Prepared by the Ontario HIV Pharmacy Professional Specialty Group, 2009.
- Rausch, J. W., and Le Grice, S. F., 'Binding, bending and bonding': polypurine tract-primed initiation of plus-strand DNA synthesis in human immunodeficiency virus. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 36 (2004) 1752-1766.
- Rhee, S. Y., Schapiro, J. M., Saladini, F., Zazzi, M., Khoo, S., and Shafer, R. W., Potential role of doravirine for the treatment of HIV-1-infected persons with transmitted drug resistance. *AIDS Research and Therapy*, 20 (2023) 8.
- Rodger, A. J., Cambiano, V., Bruun, T., Vernazza, P., Collins, S., Van Lunzen, J., and Partner Study Group., Sexual activity without condoms and risk of HIV transmission in serodifferent couples when the HIV-positive partner is using suppressive antiretroviral therapy. *Jama*, 316 (2016) 171-181.
- Saksela, K., Genhong, C., and Baltimore, D., Proline-rich (PxxP) motifs in HIV-1 Nef bind to SH3 domains of a subset of Src kinases and are required for the enhanced growth of Nef+ viruses but not for down-regulation of CD4. *The EMBO Journal*, 14 (1995) 484-491.
- Sheehy, A. M., Gaddis, N. C., Choi, J. D., and Malim, M. H., Isolation of a human gene that inhibits HIV-1 infection and is suppressed by the viral Vif protein. *Nature*, 418 (2002) 646-650.
- Shoichet, B. K., McGovern, S. L., Wei, B., and Irwin, J. J., Lead discovery using molecular docking. *Current Opinion in Chemical Biology*, 6 (2002) 439-446.

- Sierra, S., Kupfer, B., and Kaiser, R., Basics of the virology of HIV-1 and its replication. *Journal of Clinical Virology*, 34 (2005) 233-244.
- Telwatte, S., Brumme, C. J., Hearps, A. C., Latham, C. F., Hayward, J. A., Sonza, S., and Tachedjian, G., Increasing prevalence of K65K and K66K in HIV-1 subtype B reverse transcriptase. *Aids*, 30 (2016) 2787-2793.
- UNAIDS, Undetectable= Untransmittable Public Health and HIV Viral Load Suppression, 2018.
- Van Damme, L., Govinden, R., Mirembe, F. M., Guédou, F., Solomon, S., Becker, M. L., and Taylor, D., Lack of effectiveness of cellulose sulfate gel for the prevention of vaginal HIV transmission. *New England Journal of Medicine*, 359 (2008) 463-472.
- Vandenhende, M. A., Ingle, S., May, M., Chene, G., Zangerle, R., Van Sighem, A., Antiretroviral therapy cohort collaboration (ART-CC). Impact of low-level viremia on clinical and virological outcomes in treated HIV-1-infected patients. *Aids*, 29 (2015) 373-383.
- Vardhanabhuti, S., Taiwo, B., Kuritzkes, D. R., Eron Jr, J. J., and Bosch, R. J. (2015). Phylogenetic evidence of HIV-1 sequence evolution in subjects with persistent low-level viraemia. *Antiviral Therapy*, 20 (2015) 73–76.
- Vingerhoets, J., Tambuyzer, L., Azijn, H., Hoogstoel, A., Nijs, S., Peeters, M., and Picchio, G., Resistance profile of etravirine: combined analysis of baseline genotypic and phenotypic data from the randomized, controlled Phase III clinical studies. *Aids*, 24 (2010) 503-514.
- Vyas, V. K., Ukawala, R. D., Ghate, M., and Chintha, C., Homology modeling a fast tool for drug discovery: current perspectives. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 74 (2012) 1-17.
- Wang, Z., Sun, H., Yao, X., Li, D., Xu, L., Li, Y., and Hou, T., Comprehensive evaluation of ten docking programs on a diverse set of protein–ligand complexes: the prediction accuracy of sampling power and scoring power. *Physical Chemistry Chemical Physics*, 18 (2016) 12964-12975.
- Wei, X., Decker, J. M., Wang, S., Hui, H., Kappes, J. C., Wu, X., and Shaw, G. M., Antibody neutralization and escape by HIV-1. *Nature*, 422 (2003) 307-312.
- Werner, T., Morris, M. B., Dastmalchi, S., and Church, W. B., Structural modelling and dynamics of proteins for insights into drug interactions. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 64 (2012) 323-343.

Wrin, T., Crawford, L., Sawyer, L., Weber, P., Sheppard, H. W., and Hanson, C. V., Neutralizing antibody responses to autologous and heterologous isolates of human immunodeficiency virus. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes*, 7 (1994) 211-219.

Zhuang, C., Pannecouque, C., De Clercq, E., and Chen, F., Development of non-nucleoside reverse transcriptase inhibitors (NNRTIs): our past twenty years. *Acta Pharmaceutica Sinica B*, 10 (2020) 961-978.