

Türkiye’de HIV-1 ile Enfekte Olgularda APOBEC3 Hipermutasyonları

APOBEC3 Hypermutations in HIV-1 Infected Cases in Turkey

Murat SAYAN¹, Funda ŞİMŞEK², Nurgül CERAN³, Başak DOKUZOĞUZ⁴, Haluk ERAKSOY⁵

¹ Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Kocaeli.

¹ Kocaeli University Medical Faculty Hospital, Central Laboratory, PCR Unit, Kocaeli, Turkey.

² İstanbul Okmeydanı Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

² Istanbul Okmeydanı Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinic, Istanbul, Turkey.

³ Haydarpaşa Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, İstanbul.

³ Haydarpaşa Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinic, Istanbul, Turkey.

⁴ Ankara Numune Eğitim ve Araştırma Hastanesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Kliniği, Ankara.

⁴ Ankara Numune Training and Research Hospital, Infectious Diseases and Clinical Microbiology Clinic, Ankara, Turkey.

⁵ İstanbul Üniversitesi İstanbul Tıp Fakültesi, Enfeksiyon Hastalıkları ve Klinik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı, İstanbul.

⁵ Istanbul University Istanbul Faculty of Medicine, Department of Infectious Diseases and Clinical Microbiology, Istanbul, Turkey.

Geliş Tarihi (Received): 15.12.2012 • Kabul Ediliş Tarihi (Accepted): 20.03.2013

ÖZET

Konak genetik faktörleri insan immün yetmezlik virusu (HIV)’nun patogenezi üzerinde etkili olabilmektedir. Bunlardan biri olan APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3) proteinleri, HIV vif (virion infektivite faktörü) aksesuar proteini ile sürekli bir etkileşim içinde olup, HIV ters transkripsiyonunda oluşturduğu hasar ile antiretroviral aktivite göstermektedir. Bu çalışmada, ülkemizde elde edilen HIV-1 izolatlarında APOBEC 3G/F hipermutasyonlarının tanımlanması amaçlanmıştır. Çalışma grubu, Haziran 2009-Şubat 2012 tarihleri arasında, yeni tanı almış 394 hasta [349 erkek, 45 kadın; ortalama yaş (aralık): 37.1 (2-69) yıl; ortalama CD4⁺ T-hücre sayısı (aralık): 340 (1-1660) mm³; ortalama HIV-RNA yükü (aralık): 5.76 + E5 (8.7 + E2-9.4 + E6) IU/ml] ile HAART tedavisi altında 121 hasta [99 erkek, 22 kadın; ortalama yaş (aralık): 40.7 (20-70) yıl; ortalama CD4⁺ T-hücre sayısı (aralık): 195 (6-720) mm³; ortalama HIV-RNA yükü (aralık): 5.4 + E5 (1.37 + E3-1.07 + E7) IU/ml] olmak üzere toplam 515 HIV-1 pozitif hastadan oluşturulmuştur. HIV-1 *pol* geninin ters transkriptaz (kodon 41-238) ve proteaz kangalları (kodon 1-99) *nested* RT-PCR ile çoğaltılmış ve dizilenmiştir. APOBEC 3G/F hipermutasyonları HIVdb-Stanford algoritması kullanılarak tanımlanmıştır. Çalışma grubunda yer alan hastaların %2.5 (13/515)’inde HIV-1 *pol* geni dizilerinde APOBEC 3G/F hipermutasyonları saptanmıştır. Hastalarımızda

İletişim (Correspondence): Doç. Dr. Murat Sayan, Kocaeli Üniversitesi Tıp Fakültesi Hastanesi, Merkez Laboratuvarı, PCR Ünitesi, Eski İstanbul Yolu, 41380, Kocaeli, Türkiye. **Tel (Phone):** +90 262 303 8571, **E-posta (E-mail):** sayanmurat@hotmail.com

sıklıkla HIV-1 *pol* geninin RT kangalında ve 3G motifi olarak belirlenen hipermutasyonlar, tedavi-naif hastalarda %2 (8/394), HAART tedavisi altındaki hastalarda ise %4.1 (5/121) oranında tespit edilmiştir. HIV-1 enfeksiyonlarında APOBEC 3G/F hipermutasyonlarının ortaya çıkarılması, HIV-1 enfeksiyonlarının doğasını ve sonuçlarını kavramamıza yardımcı olabilir. Öte yandan APOBEC 3G/F hipermutasyon motif ve sıklığının CD4⁺ T lenfositlerden elde edilecek HIV-1 proviral DNA örneklerinde araştırılması ve ülkemizde dolayısıyla bulunan HIV-1 alttıpleri ile ilgisinin ortaya çıkarılması yararlı olabilir.

Anahtar sözcükler: HIV; insan immün yetmezlik virusu; APOBEC3; hipermutasyon; vif; Türkiye.

ABSTRACT

Host genetic factors may play an effective role on the human immunodeficiency virus (HIV) pathogenesis. APOBEC3 (apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide like-3) proteins are cellular antiviral proteins which inhibits HIV replication in the absence of vif (virion infectivity factor). In this study, we aimed to determine the APOBEC 3G/F hypermutations in HIV-1 strains isolated in Turkey. A total of 515 HIV-1 infected patients between June 2009 - February 2012 were included in the study. Three hundred ninety four cases were newly diagnosed antiretroviral-naive patients [349 male, 45 female; median age (range): 37.1 (2-69) years; median CD4⁺ T-cell count (range): 340 (1-1660) mm³; median HIV-RNA load (range): 5.76 + E5 (8.7 + E2-9.4 + E6) IU/ml] and 121 were under HAART therapy [99 male, 22 female; median age (range): 40.7 (20-70) years; median CD4⁺ T-cell count (range): 195 (6-720) mm³; median HIV-RNA load (range): 5.4 + E5 (1.37 + E3-1.07 + E7) IU/ml]. APOBEC 3G/F hypermutations in HIV-1 *pol* sequences (reverse transcriptase; codons 41-238 and protease; codons 1-99) analysed by nested RT-PCR and direct sequencing techniques. APOBEC 3G/F hypermutations have been determined by using of HIVdb-Stanford algorithm. The prevalence of overall APOBEC 3G/F hypermutations was 2.5% (13/515) in HIV-1 *pol* gene sequences in study group, and the rates were 2% (8/394) and 4.1% (5/121) in antiretroviral naive and treatment groups, respectively. However, the location and marker hypermutations of determined APOBEC in the HIV-1 *pol* gene sequences were RT and 3G in the Turkish patients. The hypermutated HIV-1 strains identified in HIV-1 infected patients may facilitate our understanding the nature and the consequences of HIV-1 infections. Moreover, investigations of the motif and frequency of APOBEC 3G/F hypermutations in HIV-1 proviral DNA samples and understanding their relationships with HIV-1 subtypes in Turkish patients would be beneficial.

Key words: HIV; human immunodeficiency virus; APOBEC3; hypermutation; vif; Turkey.

GİRİŞ

Bağışıklık sisteminin CD4⁺ T lenfosit, makrofaj ve dendritik hücreleri gibi temel hücrelerini enfekte eden insan immün yetmezlik virusu (HIV), immün sistemin çökmesiyle sonuçlanan edinilmiş immün yetmezlik sendromuna (AIDS) neden olmaktadır. Zarflı, ikozahedral simetrik, pozitif tek iplikli diploid RNA içeren bir retrovirus olan HIV'in iki genotipi (HIV-1 ve HIV-2) mevcuttur. Ters transkriptaz (RT) ve integras enzimleriyle replike olan HIV, enzim ve viral partikülleri sentezleyen *gag*, *pol* ve *env* yapısal genleri, transkripsiyon ve sonrası basamakları düzenleyen ve yayılmayı sağlayan *tat* ve *rev* regülatör proteinleri ve *vif*, *vpu*, *vpr* ve *nef* düzenleyici/aksesuar proteinleri ile viral patogeneze etkili genetik faktörlere sahiptir¹.

Bazı konak genetik faktörleri HIV enfeksiyonu patogenezi üzerinde etkili olmakta ve HIV kliniğinde iyi gidişi olumlu etkileyebilmektedir. Bunlara; APOBEC (apolipoprotein B

mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3), langerin, tetherin, kemokin reseptör 5 (CCR5) ve HLA B27 gibi doğal bağışıklık sistemi üyeleri örnek olarak verilebilir. Son 10 yılda, HIV-1 enfeksiyonlarında, viral ve konak genetik faktörlerinin karşılıklı etkileşimlerinin yoğun araştırma konusu olduğu gözlenmektedir². İlk kez 2002 yılında tanımlanan APOBEC3 gen ailesi yedi proteinden (A, B, C, DE, F, G, H) oluşmakta ve virusun replikasyon aşamasında yeni oluşan viral cDNA'yı etkileyerek HIV-1'in enfektivitesini sınırlamaktadır^{2,3}. Buna karşın virus kodladığı vif proteini (virion infectivity factor) ile APOBEC3'ü interfere ederek hücrenin antiviral savunmasından kaçmaktadır. Vif proteini ile etkileşim içinde bulunan APOBEC3 proteinleri vif'in fonksiyonel olmadığı ya da defektif olduğu durumlarda etkin olabilmektedir^{2,3}. HIV'in genom organizasyonunda vif geni, merkezde ve pol geninin 3' ucuyla üst üste çakışır pozisyonundadır.

HIV'in ters transkripsiyonu sırasında, negatif DNA ipliğindeki CC dinükleotidlerinde, sitozin deaminasyonu sonucunda, pozitif RNA; 5'-GG-3' → pozitif DNA; 5'-AG-3' değişimi gerçekleşir. Hipermutasyon olarak tanımlanan bu değişim karakteristik bir APOBEC3 motifidir. Ayrıca G → A motifi dışında G → non A hipermutasyon motifleri de söz konusudur⁴. Vif - APOBEC3 etkileşimi açısından bakıldığında APOBEC3G ve APOBEC3F (APOBEC 3G/F) en potent ve antiviral aktiviteleri en iyi bilinen HIV-1 inhibitörleridir³. Bu hücrel defansı HIV, vif aksesuar proteini sayesinde APOBEC3 protein degradasyonu yoluyla dengelemeye ve nötralize etmeye çalışır. Ancak HIV-1 ile enfekte bireylerde nötralizasyonun etkinliği ve hipermutasyon oluşma sıklığı oldukça değişkendir. APOBEC3 proteinleri ve vif arasındaki denge HIV-1 enfeksiyonunun sonuçları konusunda kritik önemde olabilir⁵.

G → A hipermutasyon motifi ilk kez 1991 yılında, HIV-1'in in vitro çoğaltılması sırasında, env geni dizilerinde tanımlanmıştır⁶. Hipermutasyonla sonuçlanan nükleotid yer değiştirmelerinin lokal dinükleotid içeriğine bağlı olduğu ve bunun azalan sırayla, G→A > G→G > G→T ~ G→C olarak gerçekleştiği gösterilmiştir⁶. HIV-1 pol geni dizilerinde yapılan çalışmalara göre yüksek aktif antiretroviral tedavi (HAART) altındaki bireylerin > %9'unda hipermutant proviral DNA'lar saptanmaktadır^{3,7}. Günümüzde HIV-1 dizilerinde APOBEC 3G/F hipermutasyonları biyoinformatik araçlarla rutin olarak taranabilmektedir. HIV-1 dizileri dışında, ters transkriptaz (RT) enzimi ile retrovirus replikasyon özellikleri taşıyan hepatit B virusu (HBV) da hipermutasyonlar yönünden analiz edilebilmektedir⁸. Kronik HBV taşıyıcısı sekiz hastanın serum örneklerinden elde edilen 92 parsiyel ve tüm HBV genomu dizilerinde iki hastada G→A hipermutasyon motifi bildirilmiştir⁹.

Bu çalışmada ülkemizde ilk kez, izole edilen HIV-1 pol geni dizilerinde APOBEC 3G/F hipermutasyonlarının sunulması amaçlanmıştır.

GEREÇ ve YÖNTEM

Çalışma Grubu

Bu araştırma, Kocaeli Üniversitesi Klinik Araştırma Etik Kurulu'nun onayı ile gerçekleştirildi (Protokol: KOU KA EK 2013/45; karar no: 6/6). Çalışmaya, Haziran 2009-Şubat

2012 tarihleri arasında, yeni tanı almış ve primer antiretroviral (ART) ilaç direnci analizi için başvuran 394 hasta [349 erkek, 45 kadın; ortalanca yaş (aralık): 37.1 (2-69) yıl; ortalanca CD4⁺ T-hücre sayısı (aralık): 340 (1-1660) mm³; ortalanca HIV-RNA yükü (aralık): 5.76 + E5 (8.7 + E2-9.4 + E6) IU/ml] ile HAART tedavisi altında ve HIV-1 RNA yüklerindeki artış sonrasında sekonder ilaç direnci analizi için başvuran 121 hasta [99 erkek, 22 kadın; ortalanca yaş (aralık): 40.7 (20-70) yıl; ortalanca CD4⁺ T-hücre sayısı (aralık): 195 (6-720) mm³; ortalanca HIV-RNA yükü (aralık): 5.4 + E5 (1.37 + E3-1.07 + E7) IU/ml] olmak üzere toplam 515 HIV-1 pozitif hasta dahil edildi.

Hastaların tanı ve takipleri, HIV-1 ART ilaç direnci analizi talebinde bulunan hastanelerde yapıldı. Hastalarda HIV-1 enfeksiyon tanısı ve HAART tedavisi EACS (European AIDS Clinical Society) ve DHHS (U.S. Department of Health and Human Services; <http://aidsinfo.nih.gov/Guidelines>) kılavuzlarına göre yapıldı¹⁰. HIV-1 enfeksiyonunun klinik evrelemesi, CDC (Center for Diseases Control and Prevention) önerilerine göre CD4⁺ T lenfosit sayısı esas alınarak yapıldı¹¹. Tedavi öncesi alınan EDTA'lı kan örneklerinin plazmaları ayrıldı ve çalışılncaya kadar -80°C'de saklandı. Hastalarda tekrarlı olarak pozitif saptanan anti-HIV-1/2 antikor sonuçları Western blot (WB) yöntemi ile (DIA PRO, HIV-1 LIA, Diagnostic Bioprobes Srl, İtalya) doğrulandı. Anti-HIV-1/2 antikor ve doğrulama testleri sırasında hastaların kimliği gizlendi ve örnekler yeniden verilen kodlarla çalışıldı.

HIV-1 RT-PCR ve *pol* Geni Dizilemesi

HIV-1 *pol* geninin RT (kodon 41-238) ve proteaz (kodon 1-99) kangalları *nested* ters transkriptaz polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PCR) ile çoğaltıldı ve dizilendi. Bu amaçla The French ANRS (National Agency for AIDS Research) AC11 Direnç Grubu'nun PCR ve dizileme algoritmasından yararlanıldı (www.hivfrenchresistance.org). Kullanılan primerler Tablo 1'de gösterildi. RT-PCR koşulları 95°C - 10 dakika, ardından 45 döngü 95°C - 45 saniye, 55°C - 45 saniye ve 72°C - 45 saniye olarak uygulandı. HIV-1 cDNA sentezi M-MuLV ters transkriptaz enziminin kullanıldığı First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific Inc, Fermentas, Litvanya) ile gerçekleştirildi. PCR ürünleri, DNA Engine peltier termal döngü platformunda (BioRad Laboratories, ABD), 95°C - 10 dakika ön denatürasyon, 45 döngü 95°C - 45 saniye 55°C - 45 saniye ve 72°C - 45 saniye koşullarında elde edildi. Primerler, PCR için 0.2 uM, dizileme için 0.3 uM final konsantrasyonunda kullanıldı. Tüm PCR ürünleri High Pure PCR Product Purification Kit (Roche Diagnostics GmbH, Almanya) ile saflaştırıldı ve ürünler ABI PRISM 310 platformunda DYEnamic ET Terminator Cycle Sequencing Kit (Amersham Pharmacia Biotech Inc., ABD) kullanılarak dizilendi. Direkt dizileme için kullanılan PCR protokolü; 35 döngü 95°C -20 saniye, 50°C - 25 saniye ve finalde 60°C - 2 dakika olarak gerçekleşti. Elektroferogramlar Vector NTI v5.1 (InforMax, Invitrogen, Life Science Software, ABD) programı aracılığıyla elde edildi.

HIV-1 Altıtip, Antiretroviral İlaç Direnci ve APOBEC 3G/F Hipermutasyon Analizi

HIV-1 *pol* geni dizilerinin alttıplendirmesinde ve ART ilaç direnci mutasyonlarının belirlenmesinde HIVdb - Stanford databazı (www.hivdb.stanford.edu, v6.2.0, Mayıs 2012)

Tablo 1. HIV-1 pol Geni RT ve Proteaz Kangallarının Nested RT-PCR Amplifikasyon ve Dizileme Primerleri

Hedef bölge	Dış primer (5'→3')	İç primer (5'→3')	Dizi primeri (5'→3')	Ürün büyüklüğü
RT (kodon 41-238)	MJ3: agtaggaccctacacgtgtca MJ4: ctgttagtgctttgggtcctct	A(35): ttgggtgcactttaaatcttccattagtcctatt NE1(35): cctactaacttctgtatgcatatgacagtcagct	A(20): attttccattagtcctatt 5'prot2: tcagagcagaccagagccaacagcccca	798 bp 507 bp
Proteaz (kodon 1-99)	5'prot1: taatttttttaggga- agatcggccttc 3'prot1: gcaaatactggagtattgta tggattttcagg	5'prot2: tcagagcagaccagagccaacagcccca 3'prot2: aatgctttttattttttctctgtcaatggc		
RV: Revers transkriptaz.				

kullanıldı. Ancak klinik önemi bulunan ART ilaç direnci mutasyonlarının tanımlanmasında Dünya Sağlık Örgütü'nün 2009 "ilaç direnci mutasyon surveyansı" (SDRM) kriteri esas alındı¹². HIVdb - Stanford algoritması aynı zamanda bilinmeyen (fasta formatında) HIV-1 DNA dizilerindeki APOBEC 3G/F hipermutasyonlarını gen bölgesine ve aminoasit pozisyonlarına göre tanımlayabilmektedir. APOBEC 3G/F hipermutasyonları, rutin HIV-1 ilaç direnci analizi için merkezimize başvuran HIV-1 ile enfekte hastalarda, HIVdb - Stanford algoritması ile saptandı.

APOBEC 3G/F hipermutasyon analizi, HIVdb - Stanford veritabanının kullandığı dizi kalite kontrol mekanizmalarından biridir ve sürekli güncellenmektedir (son güncelleme; Ocak 2011, <http://hivdb.stanford.edu/pages/news/index.html>). HIVdb - Stanford algoritması, bilinmeyen HIV-1 *pol* geni dizilerindeki hipermutasyonları, kullandığı referans konsensus HIV-1 alttip B dizileri ile karşılaştırarak tanımlamaktadır. Karşılaştırmada hipermutasyonlar, referans APOBEC belirteçleri esas alınarak (proteaz bölgesinde 11 adet 3G, 4 adet 3F belirteci; RT bölgesinde 19 adet 3G ve 20 adet 3F belirteci bulunur; ayrıca 3G/F bölgelerinde belirteç olan ART direnci mutasyonları da mevcuttur. Bunlar; proteaz bölgesi için; D30N, G48R, G73S ve RT bölgesi için; M41I, D67N, M184I ve G190R mutasyonları olarak tanımlanmıştır) ROC (receiver-operator curve) eğrilerinin kullanılması ile oluşturulmuş bir kontrol dataseti ile değerlendirilmektedir. Bu dataseti, HIV-1 pozitif ve ART naif 6000'den fazla bireyden elde edilmiş proteaz ve RT dizilerinden oluşmaktadır. HIV-1 *pol* geninde ilaç direnci analizinin hedef bölgeleri olan proteaz (kodon 1-99) ve RT (kodon 1-240) kangalları triptofan (Trp; TGG) kodlayan 9 adet yüksek korunmuş kodon içermektedir. Trp kodonu en azından bir, potansiyel olarak iki G → A substitusyon hedef bölgesi içermekte ve proteinin inaktivasyonuna yol açan stop kodon (TAG, TGA ya da TAA) oluşumuna neden olmaktadır. Bu nedenle HIVdb - Stanford veritabanında HIV-1 proteaz ve RT ilaç direnci hedef bölgesindeki korunmuş Trp bölgeleri, APOBEC 3G/F hipermutasyonları için indikatör bölgeler olarak kullanılmaktadır¹³.

BULGULAR

Çalışma grubunda yer alan hastaların %2.5 (13/515)'inde, HIV-1 *pol* geni dizilerinde APOBEC 3G/F hipermutasyonları saptanmıştır. Klinik ve laboratuvar bulguları Tablo II'de verilen bu hastaların hepsi erkek olup ortalama yaş 41.1 yıl; ortalama CD4⁺ T-hücre sayısı 209.9 mm³ ve ortalama HIV-RNA yükü 1.08 + E5 IU/ml'dir.

Hipermutasyonlar, ART naif hastalarda %2 (8/394) ve HAART tedavisi altındaki hastalarda %4.1 (5/121) oranında belirlenmiştir. HIV-1 *pol* geni proteaz kangalında sırasıyla 17., 29., 40., 78. ve 86.; RT kangalında sırasıyla 16., 40., 53., 86., 99., 141., 152., 155. ve 239. nükleotid pozisyonlarında APOBEC 3G/F hipermutasyonları saptanmıştır. HIVdb-Stanford veritabanının kullandığı APOBEC belirteçlerine göre hipermutasyonların 10'u 3G ve 4'ü 3F motifi olarak tanımlanmıştır. APOBEC 3G/F hipermutasyonları, HIV-1'in *pol* genindeki lokasyonuna göre 9'u RT; 3'ü ise proteaz kangalında tespit edilmiştir. Ayrıca saptanan hipermutasyonlara 2 adet belirteç ART direnci mutasyonunun; M184I (RT) ve G73S (proteaz) eşlik ettiği belirlenmiştir.

Tablo II. Hipermutasyon Saptanan HIV-1 ile Enfekte Olguların Laboratuvar ve Klinik Özellikleri

Hasta no.	Cinsiyet	Yaş	HIV bulaş yolu	CD4 ⁺ T- hücre sayısı (mm ³)	HIV-RNA yükü (IU/ml)	CDC ^a sınıflaması	Antiretroviral tedavi ve süresi ^b
1	Erkek	49	Htsx ^a ilişkisi	60	6750	A3	- Lamivudin + indinavir; 8 yıl - Lamivudin/zidovudin + indinavir; 1 yıl - Tenofovir/emtrisitabin + efavirenz; 1 yıl - Tenofovir/emtrisitabin + lopinavir/norvir; 1 yıl - Tenofovir/emtrisitabin + darunavir/norvir; 3 ay
2	Erkek	34	Htsx ^a ilişkisi	15	65000	A3	- Lamivudin/zidovudin + indinavir; 3 ay - Tenofovir/emtrisitabin + efavirenz; 4 yıl
3	Erkek	40	Tıbbi girişim	347	250	C2	Tenofovir/emtrisitabin + efavirenz; 7 yıl
4	Erkek	43	Htsx ^a ilişkisi	300	29800	B2	- Lamivudin/zidovudin + indinavir; 5 yıl - Lamivudin/zidovudin + nevirapin; 1 yıl - Efavirenz + lopinavir/norvir; 4 yıl - Tenofovir/emtrisitabin + lopinavir/norvir; 1 yıl^c
5	Erkek	53	Htsx ^a ilişkisi	120	273000	A3	Lamivudin/zidovudin + indinavir; 11 yıl
6	Erkek	29	Htsx ^a ilişkisi	455	14000	A2	Tedavi naif
7 ^d	Erkek	40	Htsx ilişkisi	325	65750	A2	Tedavi naif
8	Erkek	38	Eşcinsel ilişkisi	174	1800	A3	Tedavi naif
9	Erkek	34	Eşcinsel ilişkisi	245	375100	B2	Tedavi naif
10	Erkek	48	Htsx ^a ilişkisi	336	190250	A2	Tedavi naif
11	Erkek	40	Htsx ^a ilişkisi	300	95000	B2	Tedavi naif
12	Erkek	47	Htsx ^a ilişkisi	11	17235	C3	Tedavi naif
13	Erkek	40	Htsx ^a ilişkisi + DIU ^a kullanımı	3	120000	C3	Tedavi naif

^a CDC: Centers for Disease Control and Prevention; Htsx: Heteroseksüel ilişkisi; DIU: Damar içi uyuşturucu madde.

^b Antiretroviral tedavi, yıllar içinde ve sırasıyla kullanılan kombinasyonlardan oluşmaktadır.

^c Hastada tenofovir/emtrisitabin + lopinavir/norvir kombinasyon tedavisi devam etmektedir.

^d Hastanın eşi HIV-1 ile enfekte ve 7 aylık gebelik öyküsü bulunmaktadır. Lopinavir/norvir + lamivudin/zidovudin kombinasyon tedavisi altındaki eş, HIV RNA negatifliği ile izlenmektedir.

APOBEC 3G/F hipermutasyonları saptanan hastalarda HIV-1 alttip B, CRF01_AE, CRF02_AG, CRF03_AE ve CRF12_BF enfeksiyon etkeni olarak tanımlanmıştır. ART naif iki hastada ve HAART tedavisi altındaki dört hastada çeşitli nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri (NRTI), nonnükleozid revers transkriptaz inhibitörleri (NNRTI) ve proteaz inhibitörlerine (PI) sırasıyla primer ve sekonder dirençten sorumlu mutasyonlar belirlenmiştir. Hastalarda saptanan HIV-1 alttip, antiretroviral direnç mutasyonları ve APOBEC 3G/F hipermutasyonları Tablo III'te görülmektedir.

TARTIŞMA

Bu çalışmada sunduğumuz APOBEC 3G/F hipermutasyonları, plazmadan izole edilen HIV-1 dizilerinde tespit edilmiştir. Bu durum, hipermutant HIV-1 kökenlerinin hastalarda bloklanmadan dolaşıma geçmiş olabileceğini gösterebilir. Kieffer ve arkadaşlarının⁷ HAART tedavisi altındaki dokuz hastada (üç ay boyunca tekrarlanan örneklerinde viral yükün < 50 kopya/ml saptandığı hastalar) hem hücrel (proviral) hem de plazma HIV-1 izolatlarının *pol* geni dizilerinde APOBEC3 hipermutasyonlarını araştırdığı çalışmasında, RT kangalında %11, proteaz kangalında %13.5 oranında hipermutasyon saptanmış; hastaların proviral HIV-1 DNA'larında hipermutasyonların bulunduğu ancak plazmada, dolaşımda bulunan HIV-1 izolatlarında bulunmadığı bildirilmiştir. Bu sonuçlar, APOBEC 3G/F hipermutasyonlarının etkili HAART tedavilerinde HIV-1 proviral DNA'da arşivlendiğini ve dolaşıma geçmeyebileceklerini gösterebilir⁷.

Çalışmamıza göre hastalarımızda APOBEC hipermutasyonları, HIVdb-Stanford databazının kullandığı belirteçlere göre HIV-1 *pol* geninin sıklıkla RT kangalında ve 3G motifi olarak karşımıza çıkmaktadır. APOBEC hipermutasyonlarının lokasyon ve motif dağılımı, HIV-1 sürveyansında önemli olabilir. Ayrıca Tablo III'te görüldüğü gibi mutasyonel belirteçlerden ART direnci ile ilişkili olanların (RT: M184I; proteaz: G73S) yanında başka direnç mutasyonları da bulunmaktadır (RT: M41L, K65R, K70E, L100I, K103N, Y181C, M184V, G190A, T215Y ve K219E; proteaz: M46I, I47V, F53L, I54V, V82A ve L90M). HIV ilaç direncinin bulaştırılabilir olduğu dikkate alındığında bu bulguların HIV-1 sürveyansında ve ayrıca databaz güncellemelerinde yeri olabilir.

APOBEC 3G/F hipermutasyonları saptanan hastaların demografik, klinik ve laboratuvar bulguları ülkemizde daha önce yapılmış çalışmalarda bulgularla paralellik göstermektedir (Tablo II, III). Ülkemizde HIV-1 pozitif bireylerin belirgin bir oranda (%81) erkek cinsiyetinde olduğu ve heteroseksüel ilişkinin en yaygın bulaş yolu (%64) olduğu anlaşılmaktadır. Filogenetik analizler, alttip B'nin en büyük HIV-1 grubunu oluşturduğunu, ancak belirgin bir şekilde rekombinant suşların da (CRF02_AG, CRF12_BF, CRF03_AB ve CRF01_AE) dolaşımda bulunduğunu göstermektedir. Öte yandan ülkemizde HIV-1 ile ilgili yapılmış az sayıdaki moleküler çalışmada ART direnci mutasyonları sıklıkla ART naif bireylerde analiz edilmiştir¹⁴⁻¹⁸. Bu çalışmada HAART tedavisi altındaki HIV-1 ile enfekte hastalarda ART direnci mutasyonlarının saptandığı ve bu mutasyonların ART naif bireylerde saptanmayan paternler içerdiği (sırasıyla NRTI: 65., 70. ve 184. aminoasit pozisyonu; NNRTI: 100., 181. ve 190. aminoasit pozisyonu; PI: 46., 53. ve 90. aminoasit pozisyonu) görülmektedir (Tablo III).

Tablo III. HIV-1 ile Enfekte Olgularda Saptanan HIV-1 Altıpti, Antiretroviral Direnç Mutasyonları ve APOBEC 3G/F Hipermutasyonları

Hasta no.	HIV-1 altıpti	Antiretroviral direnç mutasyonu				APOBEC 3G/F hipermutasyonu	APOBEC motifi	HIV-1 hipermutasyon bölgesi
		RT kengali	Proteaz kengali	PI				
		NRTI	NNRTI					
1	B	M184V, T215Y	K103N	M46I, I47V, F53L, I54V, V82A		G17A	3F	RT
2	B	K70E, M184I	K103N, Y181C, G190A	-		G53G/T	3F	RT
3	B	K65R, M184V, K219E	L100I, K103N	M46I		G40G	3G	Proteaz
4	B	-	-	G73S		G29A/C/T, G78A	3F, 3G	Proteaz
5	B	-	-	-		G40A	3G	Proteaz
6	B	-	-	-		G86T	3F	RT
7	CRF03_AE	-	-	-		G99C	3G	RT
8	CRF12_BF	-	-	-		G141A	3G	RT
9	CRF02_AG	-	-	-		G239A/T	3G	RT
10	CRF12_BF	-	-	L90M		G86A	3G	Proteaz
11	B	-	-	-		G152G	3G	RT
12	B	M41L	-	-		G155A	3G	RT
13	CRF01_AE	-	-	-		G16A	3G	RT

RT: Revers transkriptaz; NRTI: Nükleozid revers transkriptaz inhibitörleri; NNRTI: Nonnükleozid revers transkriptaz inhibitörleri; PI: Proteaz inhibitörleri; APOBEC: Apolipoprotein B mRNA editing enzyme catalytic polypeptide-like 3.

Vif - APOBEC3 etkileşiminin farmakolojik hedef olabileceğine yönelik çalışmalar mevcuttur³. Bu anlamda vif antagonisti yeni sınıf antiviral ilaçlarla HIV-1'in enfektivitesinin azaltılabileceği düşünülmektedir¹⁹. Ancak Gandhi ve arkadaşları²⁰, HAART tedavisindeki bireylerden elde edilen 978 bağımsız HIV-1 proviral DNA örneğinde, *env* geni direkt dizileme analizlerine göre APOBEC3G/F hipermutasyon sıklığını yaklaşık %20 oranında bildirmektedir. Janini ve arkadaşları²¹, periferik mononükleer kan hücrelerinde *pol* geni proteaz kangalı dizi analizinde %43 oranında hipermutant HIV-1 kökeni tanımlamışlardır. Bildirilen bu yüksek oranlar, APOBEC3G/F aktivitesinin tek başına viremiyi kontrol edebilecek bir mekanizma olmadığını, muhtemelen sitotoksik T lenfosit yanıtının da içinde bulunduğu diğer viral ve konak faktörlerinin bir kombinasyonu ile HIV-1 baskılanmasının düzenlendiğini gösterebilir⁷. Öte yandan APOBEC 3G/F hipermutasyonları, HIV-1 ters transkripsiyonunda oluşturduğu defekt ile antiretroviral aktivite göstermektedir. Ancak HIV-1 ile ilgili son zamanlarda ortaya çıkan kanıtlar, hipermutasyonların, ilaç direncine ve immün sistemden kaçışa yol açan genetik değişimlere yol açabileceğini göstermektedir⁴.

Hepatit B virusunun genom organizasyonunda, *pol* geni HBsAg'yi kodlayan S geni ile üst üste çakışmaktadır. Bu nedenle HBV oral antiviral ilaç direnci analizlerinde HBsAg "escape" mutasyonların da analiz edilmesi mümkün olabilmektedir²²⁻²⁴. HIV'in genom organizasyonunda da benzer bir özellik bulunmakta ve *vif* gen bölgesi, *pol* geninin 3' ucuyla üst üste çakışmaktadır². Bu genomik özellik *vif* dizilerinin analizini kolaylaştırabilir. HIV-1 alttiplendirmesi ya da antiretroviral ilaç direncinin rutin olarak analiz edildiği durumlarda elde edilecek olan HIV-1 *pol* geni dizilerinde, APOBEC 3G/F hipermutasyonları da analiz edilebilir.

HIV-1 dizilerinin moleküler analizleri virusun tanısında, patogenezinde, bulaşında, klinik yönetiminde ve aşı geliştirme çabalarında önem taşımaktadır²⁵. Ülkemizde HIV/AIDS olgusunun bildirimi ilk kez 1985 yılında yapılmasına rağmen²⁶, HIV-1 ile ilgili moleküler temelli çalışmalar az sayıdadır ve bu nedenle HIV-1 alttiplerinin moleküler karakterleri hakkında bilgilerimiz kısıtlıdır. HIV-1 enfeksiyonlarında APOBEC 3G/F hipermutasyonlarının ortaya çıkarılması, HIV-1 enfeksiyonlarının doğasını ve sonuçlarını kavrayışımıza katkı yapabilir. Öte yandan APOBEC 3G/F hipermutasyon motif ve sıklığının CD4⁺ T lenfositlerden elde edilecek HIV-1 proviral DNA örneklerinde araştırılması ve ülkemizde dolaşımda bulunan HIV-1 alttipleri ile ilgisinin ortaya çıkarılması yararlı olabilir.

KAYNAKLAR

1. Turner BG, Summers MF. Structural biology of HIV. J Mol Biol 1999; 285(1): 1-32.
2. Albin JS, Harris RS. Interactions of host APOBEC3 restriction factors with HIV-1 in vivo: implications for therapeutics. Expert Rev Mol Med 2010; 12: e4.
3. Wissing S, Galloway NL, Greene WC. HIV-1 vif versus the APOBEC3 cytidine deaminases: an intracellular duel between pathogen and host restriction factors. Mol Aspects Med 2010; 31(5): 383-97.
4. Wood N, Bhattacharya T, Keele BF, et al. HIV evolution in early infection: selection pressures, patterns of insertion and deletion, and the impact of APOBEC. PLoS Pathog 2009; 5(5): e1000414.
5. Armitage AE, DeForche K, Chang C, et al. APOBEC3G - induced hypermutation of human immunodeficiency virus type - 1 is typically a discrete "all or nothing" phenomenon. PLoS Genet 2012; 8(3): e1002550.

6. Vartanian JP, Meyerhans A, Asjo B, Wain-Hobson S. Selection, recombination, and G→A hypermutation of human immunodeficiency virus type 1 genomes. *J Virol* 1991; 65(4): 1779-88.
7. Kieffer TL, Kwon P, Nettles RE, et al. G3A hypermutation in protease and reverse transcriptase regions of human immunodeficiency virus type 1 residing in resting CD4⁺T cells in vivo. *J Virol* 2005; 79(3): 1975-80.
8. Rose PP, Korber BT. Detecting hypermutations in viral sequences with an emphasis on G→A hypermutation. *Bioinformatics* 2000; 16(4): 400-1.
9. Günther S, Sommer G, Plikat U, et al. Naturally occurring hepatitis B virus genomes bearing the hallmarks of retroviral G→A hypermutation. *Virology* 1997; 235(1): 104-8.
10. European AIDS Clinical Society (EACS) Guidelines. Version 6, October 2011. www.europeanaidsclinicalsociety.org.
11. Centers for Disease Control and Prevention. Guidelines for national human immunodeficiency virus case surveillance, including monitoring for human immunodeficiency virus infection and acquired immunodeficiency syndrome. *MMWR Recomm Rep* 1999; 48(RR-13): 1-27, 29-31.
12. Bennett DE, Camacho RJ, Otelea D, et al. Drug resistance mutations for surveillance of transmitted HIV-1 drug-resistance: 2009 update. *PLoS One* 2009; 4(3): e4724.
13. Gifford RJ, Rhee SY, Eriksson N, et al. Sequence editing by apolipoprotein B RNA-editing catalytic component-B and epidemiological surveillance of transmitted HIV-1 drug resistance. *AIDS* 2008; 22(6): 717-25.
14. Sayan M, Kumbasar Karaosmanoğlu H, Mete B, et al. Molecular epidemiological analysis of HIV-1 *pol* gene sequences isolated in Istanbul, Turkey. *Mikrobiyol Bul* 2013; 47(1): 87-97.
15. Akhan S, Sayan M, Sargın F. HIV-1 subtypes and antiretroviral resistance mutations in HBV/HCV coinfecting HIV-1 positive patients from two center of Marmara region of Turkey. *EASL Monothematic Conference: HIV & The Liver*. December 7-8, 2012. London, UK.
16. Üser ÜY, Sayan M, Inan D. Antalya bölgesinde HIV-1 subtip dağılımı ve antiretroviral ilaç direnci mutasyonları. *Klinik HIV/AIDS Sempozyumu 2012*, 23-25 Kasım 2012, Kapadokya.
17. Sayan M, Willke A, Özgüneş N, Sargın S. Türkiye'de HIV-1 ile enfekte antiretroviral naif hastalarda HIV-1 subtip dağılımı ve primer ilaç direnci mutasyonları. *Klinik HIV/AIDS Sempozyumu 2012*, 23-25 Kasım 2012, Kapadokya.
18. Sayan M, Aydın OA, Mete B, Uzun N, Karaosmanoğlu HK, Gündüz A, Tabak F. HIV-1 primary drug resistance mutations in antiretroviral therapy naive patients in Istanbul, Turkey. *J Int AIDS Soc* 2012; 15(Suppl 4): 18181.
19. Xiao Z, Ehrlich E, Luo K, Xiong Y, Yu XF. Zinc chelation inhibits HIV Vif activity and liberates antiviral function of the cytidine deaminase APOBEC3G. *FASEB J* 2007; 21(1): 217-22.
20. Gandhi SK, Siliciano JD, Bailey JR, et al. Role of APOBEC3G/F-mediated hypermutation in the control of human immunodeficiency virus type 1 in elite suppressors. *J Virol* 2008; 82(2): 3125-30.
21. Janini M, Rogers M, Birx DR, McCutchan FE. Human immunodeficiency virus type 1 DNA sequences genetically damaged by hypermutation are often abundant in patient peripheral blood mononuclear cells and may be generated during near-simultaneous infection and activation of CD4(+) T cells. *Virology* 2001; 75(17): 7973-86.
22. Sayan M, Sentürk O, Akhan SC, Hulagu S, Cekmen MB. Monitoring of hepatitis B virus surface antigen escape mutations and concomitantly nucleos(t)ide analog resistance mutations in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2010; 14(Suppl 3): e136-41.
23. Sayan M, Akhan SC. Antiviral drug-associated potential vaccine-escape hepatitis B virus mutants in Turkish patients with chronic hepatitis B. *Int J Infect Dis* 2011; 15(10): 722-6.
24. Sayan M, Cavdar C, Dogan C. Naturally occurring polymerase and surface genes variants of hepatitis B virus in Turkish hemodialysis patients with chronic hepatitis B. *Jpn J Infect Dis* 2012; 65(6): 495-501.
25. Hemelaar J. The origin and diversity of the HIV-1 pandemic. *Trends Mol Med* 2011; 25(5): 679-89.
26. Alp E, Bozkurt I, Doğanay M. Epidemiological and clinical characteristics of HIV/AIDS patients followed-up in Cappadocia region: 18 years experience. *Mikrobiyol Bul* 2011; 45(1): 125-36.