TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

HAX-1 GENİ SUSTURULAN HÜCRELERDE İNFLUENZA VİRÜSÜ REPLİKASYONUNUN ARAŞTIRILMASI

HASAN UĞURLU

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

PROF. DR. KADİR TURAN

2016-İSTANBUL

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans
Anabilim Dalı	: Biyokimya (ECZ)
Tez Sahibi	: Hasan UĞURLU
Tez Başlığı	: Hax-1 Geni Susturulan Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun Araştırılması
Sınav Yeri	: Eczacılık Fakültesi – Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 28.06.2016

Tez tarafımızdan okunmuş, kapsam ve kalite yönünden Yüksek Lisans Tezi olarak kabul edilmiştir.

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Prof. Dr. Kadir TURAN	Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi	
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Prof. Dr. Azize ŞENER	Marmara Üniv., Eczacılık Fakültesi	
Doç. Dr. Ali KARAGÖZ	İstanbul Üniv., Fen Fakültesi	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 30/06/2016 tarih ve 45 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

Prof. Dr. Göksel ŞENER
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

BEYAN

Bu tez çalışmasının kendi çalışmam olduğunu, tezin planlanmasından yazımına kadar bütün safhalarda etik dışı davranışımın olmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar içinde elde ettiğimi, bu tez çalışmayla elde edilmeyen bütün bilgi ve yorumlara kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesine aldığımı, yine bu tezin çalışılması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici bir davranışımın olmadığı beyan ederim.

10.06.2016

Hasan Uğurlu

I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans eğitimim boyunca gerek bu tez çalışması, gerekse tez harici konularda bana her daim destek olan danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan'a, çalışmalarım boyunca her daim yanımda olan yardımını esirgemeyen arkadaşım Ayşegül Pirinçal'a, tez yazım sürecinde her daim yanımda yer alan annem Ayşegül Uğurlu ve babam İsmail Uğurlu'ya ve sevgili kardeşlerim Hilal Uğurlu ve Şuranur Uğurlu'ya teşekkürlerimi borç bilirim.

Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından (Konu/no: Hax-1 Geni Susturulan Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun Araştırılması/SAG-C-YLP-110915-0420) ve TÜBİTAK (Konu/no: İnfluenza Virüs Patogenezinde Viral RNA Polimeraz Enzimi ve Konak Hücre Proteinlerinin Rolünün Araştırılması/TÜBİTAK-1001 / SBAG-112S518) tarafından desteklenmiştir.

II. İÇİNDEKİLER

I. TEŞEKKÜR iii
II. İÇİNDEKİLER iv
III. KISALTMALAR ix
IV. ŞEKİL LİSTESİ x
V. TABLO LİSTESİ xii
1. ÖZET 1
2. SUMMARY 2
3. GİRİŞ VE AMAÇ 3
4. GENEL BİLGİLER 5
4.1. İnfluenza Virüsleri 5
4.2. RNA İnterferens 17
4.3. Hax-1 Proteini 21
5. GEREÇ VE YÖNTEM 22
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 22
5.2. Enzimler 24
5.3. Antikorlar 24
5.4. Ticari Kitler 25
5.5. Cihaz ve Gereçler 25
5.6. Bakteri Üretmekte Kullanılan Besiyerleri 26
5.7. Memeli Hücrelerinin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri 26
5.8. Plazmit Vektörler 26
5.9. siRNA 27
5.10. Virüsler 27
5.11. *Escherichia coli* 27
5.12. Memeli Hücre Hatları 27
5.13. Çözeltiler ve Tamponlar 28
5.13.1. Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (%30) 28
5.13.2. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10) 28
5.13.3. Bloklama çözeltisi (%5) 28
5.13.4. Etidyum bromür (10 mg/ml) 28
5.13.5. %70 Etil alkol 28
5.13.6. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0,5 M, pH:8,0) 28

5.13.7. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1) 29
5.13.8. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik su (T-FTS) 29
5.13.9. Glikoz çözeltisi (1 M) 29
5.13.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N) 29
5.13.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M) 29
5.13.12. Lamel kapatma çözeltisi 30
5.13.13. Mangan Klorür Çözeltisi (0,55 M) 30
5.13.14. Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi (%10) 30
5.13.15. Paraformaldehit çözeltisi 30
5.13.16. PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1 M) 30
5.13.17. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (%40) 30
5.13.18. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (%20 / 1,25 M) 30
5.13.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (2 mg/ml) 31
5.13.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M) 31
5.13.21. Potasyum klorür çözeltisi (2,5 M) 31
5.13.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (%7,5) 31
5.13.23. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10) 31
5.13.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (%10) 31
5.13.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N) 31
5.13.26. Sodyum klorür çözeltisi (2,5 M) 32
5.13.27. %0,25 tripsin çözeltisi 32
5.13.28. Tripsin-EDTA çözeltisi 32
5.13.29. Tween-20 çözeltisi (%10) 32
6.13.30. 4x konsantre ayırma jel tamponu (1,5 M tris, %0,4 SDS, pH: 8,8) 32
6.13.31. Bakteri transformasyon tamponu 32
6.13.32. Plazmit ekstraksiyon tamponu I 32
6.13.33. Plazmit ekstraksiyon tamponu II 33
6.13.34. Plazmit ekstraksiyon tamponu III (3 M potasyum : 5 M asetat) 33
6.13.35. 6x konsantre DNA yükleme tamponu 33
6.13.36. 10x konsantre MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonik Asit] tamponu 33
6.13.37. 4x konsantre paketleme jel tamponu 33
6.13.38. Poliakrilamid denatüre jel elektroforez tamponu 33
6.13.39. Protein transfer tamponu 33
6.13.40. 4x konsantre protein yükleme tamponu 34
6.13.41. RIPA tamponu 34
6.13.42. 2x RNA yükleme tamponu 34

6.13.43. Sodyum asetat tamponu (3M) 34
6.13.44. 50x konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu 34
6.13.45. Tris-HCl tamponu (1M, pH: 8,0) 34
6.13.46. Tris / EDTA (TE) tamponu 35
6.13.47. 5x konsantre tris-glisin tamponu 35
6.13.48. 5x konsantre TBE tamponu 35
6.13.49. 20x konsantre TBS tamponu 35
6.13.50. TBS ve TBS-T tamponu 35
5.14. Nükleik Asitler İçin Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez 35
5.14.1. DNA analizleri için agaroz jeli ve elektroforez 35
5.14.2. DNA analizleri için akrilamid jeli ve elektroforez 36
5.14.3. RNA analizleri için agaroz jeli ve elektroforez 36
5.15. Spektrofotometrik Yöntemler ile DNA ve RNA Örneklerinin Kantitatif Ve Kalitatif Analizi 37
5.16. Transformasyon İçin *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi 37
5.17. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması 38
5.18. Plazmit Vektörlerin Oluşturulması 38
5.18.1. Hax-1 genine özgü shRNA kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması 38
5.18.2. Memeli hücrelerinde ekspresyon yapan vektörlerin oluşturulması 42
5.18.3. Koloni-PZR ile transformant kolonilerin analiz edilmesi 45
5.18.4. Küçük ölçeklerde plazmit DNA izolasyonu 46
5.18.5. Plazmit DNA'ların restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi 46
5.18.6. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile saflaştırılması 46
5.19. DNA Dizi Analizleri 47
5.20. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması 47
5.21. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Aktarılması (Transfeksiyon) 47
5.22. Ekspresyon Vektörlerine Klonlanan Genler Tarafından Kodlanan Proteinlerin Western Melezleme Tekniği ile Analizi 48
5.22.1. HEK293 hücrelerinin plazmit DNA'lar ile trasnfekte edilmesi ve hücre lizatlarının hazırlanması 48
5.22.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve proteinlerin jelde yürütülmesi 49
5.22.3. Proteinlerin nitroselüloz membrana transfer edilmesi ve görüntülenmesi 49
5.23. Ekspresyon Vektörleri Üzerinden Kodlanan Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Saptanması 50
5.24. HeLa Hücrelerinin Hax-1 Genine Özgü siRNA ile Transfeksiyonu, Hücrelerde Hax-1 Transkript Düzeyinin Saptanması ve Hücrelerin Virüs İle Enfekte Edilmesi 51

5.24.1. HeLa hücrelerinin Hax-1 genine özgü siRNA ile transfeksiyonu 51

5.24.2. siRNA ile transfekte edilen hücrelerden RNA izolasyonu ve Hax-1 transkript düzeyinin saptanması 52

5.24.3. siRNA ile transfekte edilen hücrelerin influenza virüsleri ile enfekte edilmesi ve viral proteinlerin Western melezleme ile analizi 54

5.25. HEK293 Hücrelerin HA-Hax-1 Proteini ve Hax-1 shRNA Kodlayan Plazmit Vektörler ile Kalıcı (Stable) Transfeksiyonu 54

5.26. Kalıcı Transfekte Edilen Hücrelerin Kontrolü 55

5.26.1. shRNA kodlayıcı plazmitler ile kalıcı olarak transfekte hücrelerden genomik DNA izolasyonu ve PZR 55

5.26.2. pCHA-Hax1 ile kalıcı transfekte klonların kontrol edilmesi 56

5.27. Hax-1 Proteininin Hek293 Hücrelerinde İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Olan Etkisinin Mini Replikon Modeli ile İncelenmesi 56

5.28. Hax-1 Ve İnfluenza PA Proteini Arasındaki Olası Fiziksel İlişkinin GST İle Çöktürme Yöntemi İle Araştırılması.....57

6. BULGULAR 59

6.1. Hax-1 Genine Özgü shRNA'ların piGENE-PURO Plazmitine Klonlanması ile İlgili Bulgular.....59

6.2. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Bulgular 63

6.3. Geçici Olarak Plazmitler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinde Sentez Edilen GST Uzantılı PA Proteinlerinin Western Melezleme ile Analizi Sonuçları 67

6.4. GST Uzantılı PA Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonları İle İlgili Veriler 68

6.5. HA Uzantılı Hax-1 Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonları ile İlgili Veriler 70

6.6. piGENE-shRNA1, piGENE-shRNA2 ve pCHA-Hax1 Plazmitleri ile Kalıcı Olarak Transfekte Edilen Hücre Hatları ile İlgili Bulgular.....71

6.6.1. Kalıcı olarak transfekte hücrelerden genomik DNA izloasyonu ve shRNA genlerinin PZR ile kontrolü 72

6.6.2. shRNA ve Hax-1 kodlayan Plazmitler ile kalıcı olarak transfekte hücreler üzerinden Hax-1 mRNA düzeylerinin saptanması.....73

6.7. Hax-1 siRNA'sı ile Transfekte Edilen HEK293 Hücreleri ile İlgili Bulgular 75

6.7.1. siRNA ile transfekte edilmiş HeLa hücrelerden total RNA izolasyonu ile ilgili bulgular 76

6.7.2. siRNA ile transfekte hücrelerde Hax-1 geni traskrip miktarlarının saptanması ile ilgili veriler 76

6.8. Hax-1 Genine Özgü shRNA Kodlayan Plazmitler ya da siRNA'lar ile Transfekte Edilen Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun İzlenmesi ile İlgili Veriler 77

6.9. Hücrelerde Hax-1 Proteini Düzeyindeki Artışın İnfluenza Virüsü Replikasyonuna Etkileri ile İlgili Veriler.....82

6.10. Hax-1 ve PA Proteinleri Arasındaki Etkileşimin GST-Çöktürme Yöntemiyle Araştırılması ile İlgili Bulgular 84

7. TARTIŞMA VE SONUÇ 86
8. KAYNAKLAR 93
9. ÖZGEÇMİŞ 102

III. KISALTMALAR

°C	Santigrat Derece
Casp	Kaspaz
cm	Santimetre
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
EDTA	Etilendiamintetraasetik Asit
GST	Glutatyon S Transferaz
HA	Hemaglutinin
Hax-1	HCLS1 associated protein X-1
h/h	Hacim/Hacim
HRP	Yaban Turpu Peroksidazı
M	Molar
M1-2	Matriks Proteinleri
mg	Miligram
ml	Mililitre
mm	Milimetre
mM	Milimolar
MOPS	3-Morfolinpropansulfonik Asit
Mw	Molekül Ağırlığı
N	Normal
NA	Nöraminidaz
NP	Nükleoprotein
NS1-2	Yapısal olmayan protein
PA	Polimeraz Asidik Proteini
PB1-2	Polimeraz Bazik Proteini
PEG	Polietilen Glikol
PEI	Polietilenimin
PIPES	1,4-piperazindietansulfonik Asit
pM	Pikomolar
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
Ripa	Radioimmunoprecipitation Assay
RNP	Ribonükleoprotein Kompleksi
RT-PZR	Ters Transkripsiyon Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SDS	Sodyum Dedosil Sülfat
shRNA	Small Hairpin RNA
siRNA	Small Interfering RNA
T-FTS	Tamponlanmış Fizyolojik Tuzlu Su
U	Ünite
UV	Ultraviyole
w/w	Ağırlık/Ağırlık
µg	Mikrogram
µl	Mikrolitre
µM	Mikromolar

IV. ŞEKİL LİSTESİ

Şekil 1. İnfluenza A virüsü RNA melekülleri ve bu moleküller üzerinden sentez edilen viral proteinler 6

Şekil 2. A) Alfa 2,3 bağlantısı, B) Alfa 2,6 bağlantısı 8

Şekil 3. Sialic asit ve galaktoz arasında nöraminidaz bağlanma bölgesi 8

Şekil4. İnfluenza virüsünde yapı değişimleri 10

Şekil 5. Ribonükleoprotein kompleksi 11

Şekil 6. İnfluenza virüsü mRNA sentezi ve viral RNA replikasyonları 12

Şekil 7. İnfluenza virüsü yaşam döngüsü 16

Şekil 8. shRNA ve siRNA işlemesinin karşılaştırılması 19

Şekil 9. RNA aracılı gen susturulması 20

Şekil 10. Fosforillenmiş oligonükleotid primer çiftleri kullanılarak Klenow enzimi ile sentezlenen, insan Hax1 genine özgü shRNA kodlayan çift zincirli DNA molekülleri 61

Şekil 11. Hax-1-shRNA-1 ve Hax-1-shRNA 2 kodlayan plazmit vektörleri haritası 62

Şekil 12. piGENE-Puro plazmit vektörüne klonlanHax-1-shRNA kodlayıcı DNA'ların, DNA dizi analizi sonuçları 63

Şekil 13. PZR ile çoğaltılan influenza virüsü PA genleri ve pCAGGS-GST plazmit DNA'sı görüntülenmesi 64

Şekil 14. pCAGGS-GST-PA(WSN) ve pCAGGS-PA(WSN)-GST vektörlerinin haritaları 65

Şekil 15. Küçük ölçekte yapılan plazmit izolasyonu sonrası plazmitler üzerinde yapılan PstI kesim kontrolü 65

Şekil 16. GST uzantılı PA proteini kodlayan genlerin dizilenmesinde kullanılan primerler ve bu primerlerin konumları 66

Şekil 17. GST-PA ve PA-GST füzyon proteinlerini kodlayan genlerin DNA dizi analizi sonuçları 67

Şekil 18. HEK293 hücrelerinde sentezlenen GST uzantılı PA ve HA-Hax-1 proteinlerinin Western melezleme yöntemi ile analizi 67

Şekil 19. HeLa hücrelerinde sentez edilen GST-PA(W) proteinlerin immunfloresan yöntem ile görüntülenmesi 68

Şekil 20. HeLa hücrelerinde sentez edilen PA(W)-GST proteinlerin immunfloresan yöntem ile görüntülenmesi 69

Şekil 21. HeLa hücrelerinde sentez edilen GST uzantılı, influenza A/Duck/Pen-H5N2 virüsüne ait PA proteinlerinin (GST-PA ve PA-GST) immünfloresans yöntemle görüntülenmesi 70

Şekil 22. HeLa hücrelerinde, geçici olarak transfekte edilen pCHA-Hax1 plazmit vektörü üzerinden kodlan HA-Hax1 proteininin immunfloresan teknikle analiz edilmesi 71

Şekil 23. Hax-1 genine özgü shRNA kodlayıcı plazmitler ile kalıcı olarak transfekte edilen hücrelerden izole edilen genomik örnekleri 72

Şekil 24. Kalıcı olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerin shRNA kodlayan diziler için PZR ile kontrol edilmesi 73

Şekil 25. Transfekte HEK293 hücrelerden izole edilen total RNA'ların agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi 74

Şekil 26. Hax-1 genine özgü shRNA kodlayan plazmitler ve pCHA-Hax1 plamiti ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde Hax-1 ve aktin (kontrol) geni transkript düzeyleri 75

Şekil 27. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerine ait RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi 76

Şekil 28. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde Hax-1 ve aktin (kontrol) geni transkript düzeyleri 77

Şekil 29. Hax-1 genine özgü shRNA plazmitleri ile kalıcı olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi 78

Şekil 30. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi 79

Şekil 31. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde virüs replikasyonunun NS1 proteini aracılığı ile analizi 79

Şekil 32. siRNA ile transfekte olmamış kontrol HeLa hücrelerinde, influenza A/WSN/H1N1 (WSN) ve influenza A/Duck/Pen/H5N2 (DkP) tipi virüsü PA proteinlerinin immünfloresan yöntemler ile görüntülenmesi 80

Şekil 33. Negatif kontrol siRNA ile transfekte olmuş kontrol HeLa hücrelerinde, influenza A/WSN/H1N1 (WSN) ve influenza A/Duck/Pen/H5N2 (DkP) tipi virüsü PA proteinlerinin immünfloresan yöntemler ile görüntülenmesi 81

Şekil 34. Hax-1 genine özgü siRNA ile transfekte olmuş HeLa hücrelerinde, influenza A/WSN/H1N1 (WSN) ve influenza A/Duck/Pen/H5N2 (DkP) tipi virüsü PA proteinlerinin immünfloresan yöntemler ile görüntülenmesi 82

Şekil 35.pCHA-Hax1 plazmit vektörü ile transfekte edilen HEK 293 hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi 83

Şekil 36. HA-Hax-1 proteini ile influenza virüsü RNA polimerazının ilişkisinin mini replikon modeli ile gösterilmesi 84

Şekil 37. GST-PA ve HA-Hax1 ile yapılan GST çöktürme deneyi 85

V. TABLO LİSTESİ

Tablo 1. Hax-1 shRNA kodlayıcı DNA fragmentlerinin oluşturulmasında kullanılan primerler 39

Tablo 2.pCAGGS-GST plazmit vektörünü doğrusal hale getirmek için kullanılan primerler 43

Tablo 3.İnfluenza virüsü PA geninin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler 43

Tablo 4. Koloni PZR çalışmalarında kullanılan primerler 45

Tablo 5. Minireplikon çalışmalarında kullanılan plazmitlerin miktarları 57

Tablo 6. İnfluenza virüsü H1N1 (WSN) tipine ait olan PA genini PZR ile çoğaltmak için kullanılan oligonukleotid primerler..... 64

Tablo 7.GST uzantılı PA proteini kodlayan genlerin dizilenmesi amacıyla kullanılan oligonukleotid primerler..... 66

Hax-1 Geni Susturulan Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun Araştırılması

Öğrencinin Adı: Hasan UĞURLU

Danışman: Prof. Dr. Kadir TURAN

Anabilim Dalı: Biyokimya Anabilim Dalı

1. ÖZET

Amaç: Bu tez çalışmasında Hax1 proteinin insan tipi influenza A/WSN/H1N1 ve kuş tipi inluenza A/Duck/Pen/H5N2 virüslerinin replikasyonları etkilerin moleküler düzeyde belirlenmesi amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda HEK293 ve HeLa hücrelerinde Hax1 geni transkript düzeyi RNAi teknolojileri ile baskılanadı ve bu hücrelerde virüs çoğalması Western melezleme ve immunfloresan teknikler ile araştırıldı.

Yöntem: Memeli hücrelerinde Hax1 transkript düzeyinin düşürülmesinde iki farklı yol izlendi. Birincisi, bu gene özgü shRNA kodlayan plamit vektörler oluşturuldu ve bu vektörler hücreler transfekte edilerek transkript düzeyi düşürüldü. İkincisinde hücreler ticari olarak sentez ettirilen siRNA ile transfekte edildi. Hax-1 transkript düzeyi düşürülen hücreler influenza virüsüleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8-12 saat sonra hücrelerden hazırlanan lizatlarda virüs miktarları Western melezleme tekniği ile karşılaştırıldı. Hax-1 proteini kodlayan bir plazmidin transfeksiyonu ile hücrelerdeki protein düzeyi arttırıldı ve bu artışın influenza virüs replikasyonuna etkileri araştırıldı. Diğer taraftan, konak hücrelerde Hax-1 protein düzeyindeki artış ya da azalışın, infuenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri, bu virüs için geliştirilen minireplikon modelleri ile saptandı.

Bulgular ve Sonuç: Hax1 transkript düzeyi düşürülen hücrlerde influenza virüs replikasyonunun beklenmedik bir şekilde baskılandığı saptandı. Aynı şekide Hax1 protein düzeyi arttırılan hücrelerde de influenza virüsü replikasyonunda yavaşlama görüldü. İnfluenza virüsü minireplikon modelleri ile yapılan testler de benzer sonuçlar veridi. HEK293 hücrelerinde Hax-1 proteinindeki artış viral RNA polimeraz aktivitelerini inhibe edici etki gösterdi. Elde edilen veriler Hax-1 proteininin her iki tip virüs replikasyonu üzerinde de negatif yönde etki ettiği sonucunu verdi.

Anahtar Kelimeler: İnfluenza, Hax-1, PA, Viral RNA polimeraz, minireplikon

Investigation of Influenza Virus Replication in Hax-1 Gene Knock Down Cells

Student name: Hasan UĞURLU

Supervisor: Prof. Dr. Kadir TURAN

Department: Biochemistry

2. SUMMARY

Aim: In this work,it was aimed to determine the effects of Hax1 protein on human type (A/WSN/H1N1) and avian type Influenza (A/Duck/Pan/H5N2) virus replication at the molecular level.For this purpose, Hax1 gene transcript levels in HEK293 and HeLa cells was suppressed by RNAi technology and the virus multiplication in these cells was investigated with Western hybridization and immunofluorescence techniques.

Method: Two different methods were followed for reducing the Hax1 transcript levels in mammalian cells.First, the gene-specific siRNA-encoding plasmid vectors were generated and, transcript levels in the cells were reduced by transfection of these plasmids.The second, the cells were transfected with siRNA molecules synthesized commercially.Hax-1 geneknock down cells were infected with influenza viruses. 8 to 12 h post infection,the quantitiy of virus protein in lysates of infected cells was investigated with Western hybridization techniques. Hax-1 protein level in the cells was increased by transfection of plasmids encoding this proteins and the effects of this increase on influenza virus growth was also investigated. On the other hand, the effects ofchanges the amount of Hax1 protein in host cells on infuenza virus RNA polymerase enzyme were invastegatedwith minireplikon models developed for influenza viruses.

Results and Conclusion: In was found that the influenza virus replication is unexpectedly suppressedin Hax1 gene knock downcells. The influenza virus growth was also negatively affected in the cells over-expressing Hax1 protein. The assays carried out with influenza virus minireplicons also gave the similar results. The over-expression of Hax1 protein in HEK293 showed inhibititory effects on viral RNA polymerase activity. Fromdata obtained in this work, it was conclude that Hax1 proteins have negative regulatory effects on both human and avian types of influenza virus replication

Anahtar Kelimeler: İnfluenza, Hax1, PA, Viral RNA polimeraz, minireplikon

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfluenza A virüsleri sekiz adet tek iplikli RNA molekülünden oluşan bir genoma sahip zarflı virüslerdir(Palese, 1976). Bu virüslerin en önemli özelliği insanlarda değişik yaş gruplarında farklı şiddetlerde ve tekrarlayan epidemilere, zaman zaman tüm dünyayı etkisi altına alabilen pandemilere neden olabilmeleridir. İnfluenza A virüsleri geçen yüzyıl içerisinde tüm dünyayı etkileyen üç büyük salgına neden olmuştur. Bunlardan en büyüğü 1918–1919 yıllarında görülen ve çeşitli kaynaklara göre 20-50 milyon arasında değişen sayıda insanın ölümüne neden olan salgındır. İspanyol gribi olarak da adlandırılan bu salgında etkili olan influenza A virüs tipi H1N1'dir. Bu pandemi dışında influenza A virüsleri, 1957–1958 yıllarında Asya gribi (H2N2) ve 1968-1970'te Hong Kong gribi (H3N2) olarak adlandırılan önemli salgınlara neden olmuştur(Hobday ve Cason, 2009; Hsieh ve Chan, 2011; Lan ve ark., 2013). İnfluenza sadece insanlarda değil, domuzlar, atlar, deniz memelileri ve kanatlılarda da enfeksiyonlara neden olmaktadırlar(Kawaoka ve Neumann, 2012). Özellikle kuşların tüm influenza A ırkları için doğal rezervuar oldukları ve diğer konaklarda enfeksiyon yapan virüsler için kaynak oluşturdukları bilinmektedir(Palese, 1976). Bununla birlikte influenza virüslerinin bir türden diğerine, örneğin kuşlardan memeli organizmalara geçişini zorlaştıran konak organizmaya özgü hücresel faktörler ya da virüsün kendi genetik yapısı ile ilgili farklılıklar mevcuttur. Bunların bir kısmı, virüs hamaglutinin (HA) proteini ve konak hücrenin reseptör yapıları gibi tanımlanmış faktörlerdir(Gimsa ve ark., 1996; Vines ve ark., 1998; Suzuki, 2001). Bunların dışında konak hücre içerisinde virüs replikasyonunu sınırlayan ya da virüse gerekli olan birçok protein faktör bulunmaktadır. Bu proteinlerin belirlenmesi ve virüs replikasyonuna etkilerinin aydınlatılması, hem günümüzde ve hem de yakın gelecekte olası şiddetli influenza A virüsü pandemileri en az hasarla atlatmanın temel dayanağını oluşturmaktadır. Bu bağlamda influenza virüsünün konak hücre ile ilişkisinin moleküler düzeyde aydınlatılması, bu virüslerin patogenezinde kilit rol oynayan olayların belirlenmesine yönelik yoğun çalışmalar yapılmaktadır. Bu amaca yönelik olarak Won-Bo Wang ve diğerleri, kısaca Hax-1 (İng. HCLS1-associated protein X-1) olarak adlandırılan hücresel bir proteinin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi ile ilişkili olduğunu

ve insanlarda enfeksiyon yapan influenza A/WSN/33 (H1N1) virüsünün üremesini inhibe edici yönde etkilediğini rapor etmişlerdir(Hsu ve ark., 2013). Tez danışmanım Prof. Dr. Kadir TURAN'da influenza virüsü patogenezini aydınlatmaya yönelik yürüttüğü TÜBİTAK destekli bir proje kapsamında maya-ikili hibrid metodu ile tarama çalışmalarında da Hax-1 proteinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitesi olan PA proteini ile fiziksel etkileşime sahip olduğunu göstermiştir (yayınlanmamış veri). Hax-1 proteininin apoptoz mekanizmasında antiapoptotik fonksiyona sahip olduğu ve hücre göçünde de rol aldığı bilinmektedir. Buna karşın bu proteinin influenza virüsü patogenezindeki rolü hakkında çok fazla veri bulunmamaktadır. Dolayısıyla, insan hücrelerinde sentez edilen Hax-1 proteininin influenza virüs replikasyonuna etkisi bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır. Hax-1 proteininin insanlarda (A/WSN/H1N1) ve kuşlarda enfeksiyon yapan influenza A virüsü(A/WSN/H1N1) replikasyonuna etkilerinin saptanması ve buna bağlı olarak bu proteinin virüsün konak spesifikliği ve virüs patogenezindeki rolünün ortaya konması hedeflenmektedir.

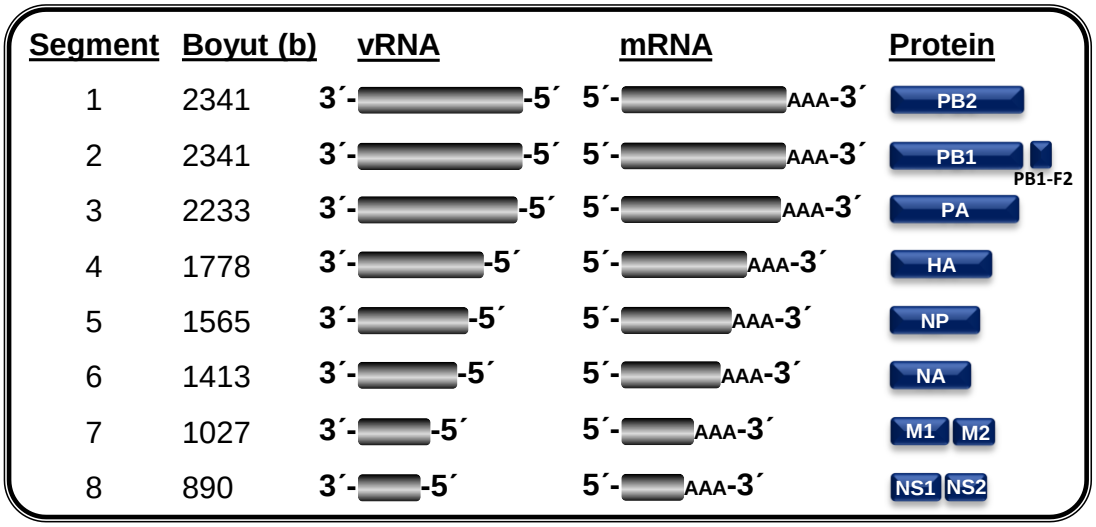
4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri, *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan zarflı virüslerdir. Çok parçalı ve negatif polarite gösteren RNA genomuna sahip olan İnfluenza virüslerinin A ve B türleri 8 segmentten, C türü ise 7 segmentten oluşan genoma sahiptir(Palese, 1976; Gultyaev ve ark., 2010). İnsanlarda yaygın enfeksiyonlara yol açan İnfluenza virüsü A tipi virüstür. İnfluenza B virüsleri ise insanlarda epidemilere neden olabilirken pandemilere neden olmamaktadırlar(Racaniello ve Palese, 1979; Couch, 1996). Parçalı genom yapısı İnfluenza virüslerinin rekombinasyon ile yeni alt tiplerin ortaya çıkarmasını kolaylaştırmaktadır.

İnsanlarda influenza virüslerinin ana hedefi üst ve alt solunum yollarındaki epitel dokulardır. Virüs partikülleri 80-120 nanometre çapında kabaca küresel bir yapıdadırlar. Virüsler konak hücre membranından kökenlenen membran yapısı taşırlar. Membrana bağlı hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) proteinleribulunur. İnfluenza A virüslerinde günümüze kadar immünolojik olarak ayırt edilebilen 18 farklı HA tipi, 9 farklı NA tipi belirlenmiştir. Bu antijenlerin değişik kombinasyonları influenza pandemilerinin temel nedenidir ve İnfluenza A virslerinin alt tiplerinin belirlenmesinde kullanılırlar (H1N1, H5N8 vb)(Pappas ve ark., 2008).

İnfluenza virüslerinin tek iplikli RNA genom segmentleri NP (nükleoprotein) proteinleriyle paketlenir ve ribonükleoprotein (RNP) yapısını oluşturur(Pons, 1971). İnfluenza virüslerinin 8 adet RNA segmentinden 11 adet protein sentezlenir(Oxford ve ark., 1978). Bunlar; PB1 (Polimeraz bazik 1), PB2 (Polimeraz bazik 2), PA (Polimeraz asidik), PB1-F2, HA, NP, NA, M1, M2, NS1 ve NS2 proteinleridir (**Şekil 1**).



Şekil 1.İnfluenza A virüsü RNA meleküleri ve bu moleküller üzerinden sentez edilen viral proteinler(Pirinçal, 2014).

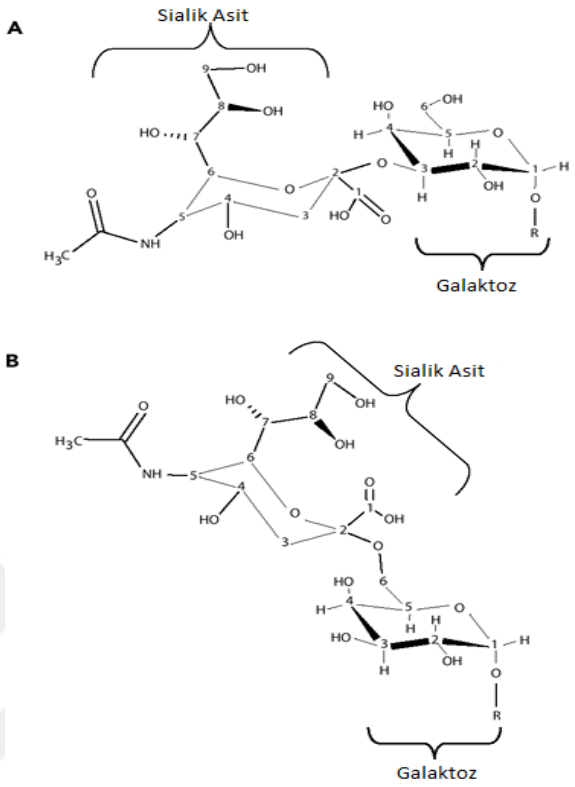
İnfluenza A virüslerinin ilk üç RNA segmenti üzerinden, viral replikasyon ve transkripsiyonu gerçekleştiren viral RNA polimeraz enzimi alt üniteleri PB2, PB1 ve PA proteinleri sentez edilir(Jones ve ark., 1986; Gonzalez ve ark., 1996). Son yıllarda yapılan çalışmalarda virüsün 2. segmenti üzerinden PB1-F2 olarak adlandırılan bir proteinin daha sentez edildiği saptanmıştır(Chen ve ark., 2001). Dördüncü RNA segmentinden İnfluenza virüsü majör yüzey antijen proteinlerinden Hemaglutinin proteini sentezlenir. Bu protein virüslerin konak hücrelere adsorbsiyonu ve endositoz ile hücreye alınan virüslerin endozomdan kurtularak sitosolde serbest kalmasında (penetrasyon) görev alır(Skehel ve Wiley, 2000; Takahashi ve ark., 2009). İnfluenza virüsü RNA molekülleri serbest halde bulunmaz, nükleer proteinleri (NP) ile ribonukleoprotein partikülleri (RNP) halindedir. NP proteinleri 5. RNA segmenti üzerinden sentezlenir(Albo ve ark., 1995). Nöraminidaz proteini virüs membranında yer alan bir diğer önemli yüzey antijen glikoproteinidir. NA hücre yüzeyinde HA proteininin bağlandığı sialik asit bakiyelerini keserek olgun virüsün hücreden ayrılmasını sağlar(Palese ve ark., 1974). Bu protein 6. segment tarafından kodlanır. İnfluenza A virüslerinin 7. ve 8. RNA segmentleri üzerinden alternatif işlenme sonucunda ikişer polipeptid sentez edilir. Bunlar matriks (M1 ve M2) ve yapısal olmayan (nonstrüktürel) (NS1 ve NS2) proteinleridir(Lamb ve Choppin, 1979; Valcarcel ve ark., 1993). M1 proteini virionda en bol bulunan proteindir. Bu proteinin viral genlerin transkripsiyonunda regülasyonla ilgili bir

işleve sahip olduğu düşünülmektedir. Yapısal olmayan proteinler (NS1 ve NS2) sadece virüs ile enfekte hücrelerde sentez edilir(Lamb ve Choppin, 1979; Basu ve ark., 2009;). Bunlardan NS1 proteini virüs partikülünde bulunamamıştır. NS1 interferon antagonisti olarak işlev görür ve konak hücre savunmasını bloke eder(Garcia-Sastre ve ark., 1998; Kochs ve ark., 2007). NS2 proteini ise RNP moleküllerinin nükleustan sitoplazmaya geçişinde rol alır.

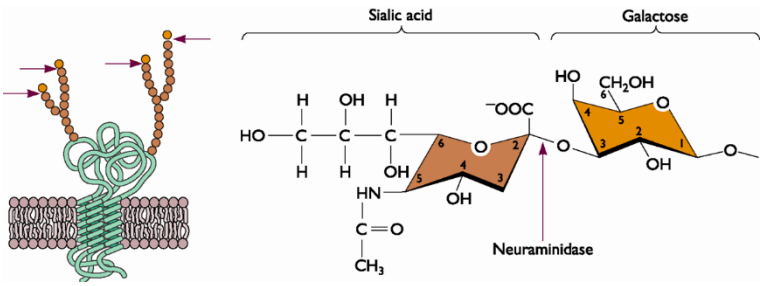
İnfluenza A virüslerinin en önemli özelliklerinden biri değişik yaş gruplarında farklı şiddetlerde tekrarlayan epidemilere ya da tüm dünyayı etkisi altına alabilen pandemilere neden olabilmeleridir. Geçen yüzyılda 1918-19 (influenza A H1N1), 1957-58 (influenza A H2N2) ve 1968-70 (influenza A H3N2) yıllarında üç büyük influenza A virüsü pandemisi görülmüştür Bilinen en büyük influenza salgını 1918–1920 yıllarında görülmüş ve tüm dünyada milyonlarca insanın ölümüne neden olmuştur. İspanyol gribi olarak adlandırılan bu salgının, kuş tipi influenza A H1N1 tipi virüsün mutasyonlarla insana adaptasyon sağlaması sonucu ortaya çıktığı ileri sürülmektedir. 1957–1958 Asya gribi ve 1968-1970 Hong Kong gribi etkeni olan virüsler insan ve kuş tipi influenza virüsü genomlarının karışması (re-assortment) sonucu ortaya çıkmıştır. 1977–1978 yıllarında ise daha önce ortaya çıkan influenza A H1N1 virüsleri, bu virüslere karşı bağışık olmayan kişilerde, Rus gribi olarak da adlandırılan yeni bir salgına yol açmıştır(Hobday ve Cason, 2009; Hsieh ve Chan, 2011; Lan ve ark., 2013). Bu virüs salgınlarının en önemli nedeni, viral replikasyon sırasında meydana gelen mutasyonların birikmesi ve daha da önemlisi farklı virüs tiplerinin enfeksiyon sırasında karışması sonucunda yeni virüs tiplerinin (re-asortment) oluşmasıdır.

İnfluenza virüsleri hücre yüzeyindeki nöraminik asit (sialik asit) moleküllerine bağlanarak enfeksiyonu başlatır. Bu bağlanma virüsün hemaglütinin proteinleri aracılığı ile gerçekleşir(Skehel ve Wiley, 2000). Farklı tip influenza virüslerine ait olan HA proteinleri farklı tip sialik asit bakiyelerini tercih edebilmektedirler. İnsan tipi influenza virüsleri altı karbonlu şekere alfa 2,6 bağı ile bağlanmış olan sialik asit bakiyelerini tercih ederken, kuş tipi influenza virüsleri ise alfa 2,3 bağı ile bağlı sialik asitleri tercih ederler (**Şekil 2 ve 3**). Bu farklılığın kuş tipi influenza virüsünün insanlarda enfeksiyon yapmasındaki zorluğun temeli olduğu düşünülmektedir ancak

insan ve kuşlar her iki konformasyonada sahiptirler(Matrosovich ve ark., 2004; Peter Palese, 2007).



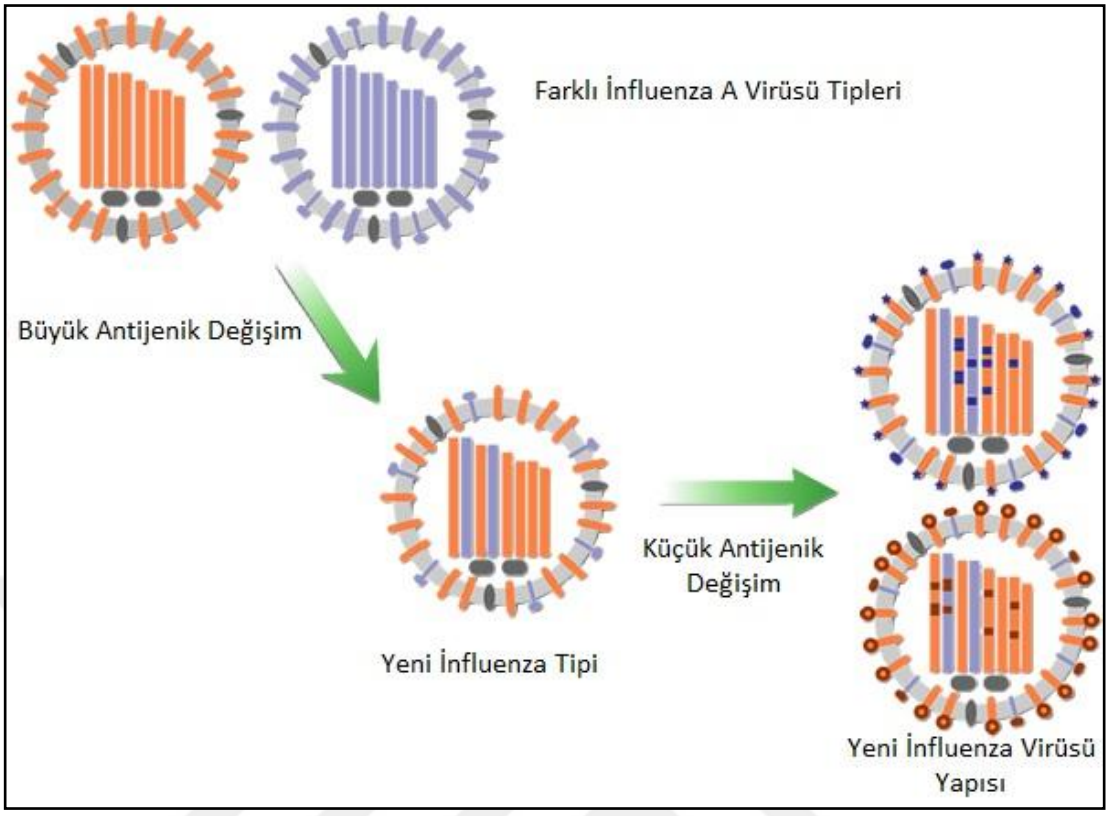
Şekil 2.A) Alfa 2,3 bağlantısı, B) Alfa 2,6 bağlantısı(Peter Palese, 2007)



Şekil 3. Sialik asit ve galaktoz arasında nöraminidaz bağlanma bölgesi (http://www.virology.ws/2009/05/04/influenza-virus-attachment-to-cells/, Erişim tarihi: 07 Haziran 2016)

İnfluenza virüsleri antijenik özelliklerini çok hızlı değiştiren virüslerdir. Bunun temel nedeninden biri viral replikasyonu gerçekleştirin RNA polimeraz enziminin hata yapma frekensının yüksek olması ve sentez sırasında oluşan hataları düzeltme yeteneklerinin olmaması; diğeri ise virüsün parçalı genom yapısıdır(Couch, 1996). Bu özelliklere bağlı olarak İnfluenza virüsü genomlarında iki türlü değişim gerçekleşir.Bunlar; büyük ve küçük antijenik değişimlerdir. Küçük değişimler özellikle viral RNA polimerazdan kaynaklanan az sayıda nükleotidin değişimi ile oluşan mutasyonlardır(Bouvier ve Palese, 2008). Bu değişimlerin birikmesi ile insan hücrelerinde çoğalamayanfarklı virüs tipleri bu hücrelerde üreme yeteneği kazanabilir veya insan immün sistemi tarafından tanınan virüsler immün sistem tarafından tanınmaz hale döneşebilirler.

Büyük değişimler ise, virüsün segmentli genom yapısına bağlı olarak, bir konağın aynı anda farklı influenza tipleri ile enfekte olması ve kurulma aşamasında farlı RNAkombinasyonlarına sahip yeni virüslerin ortaya çıkmasının bir sonucudur (**Şekil4**).Özellkle bu değişmeler büyük pandemilere neden olabilmektedir(Correspondent, 1980; Nakajima, 2003).



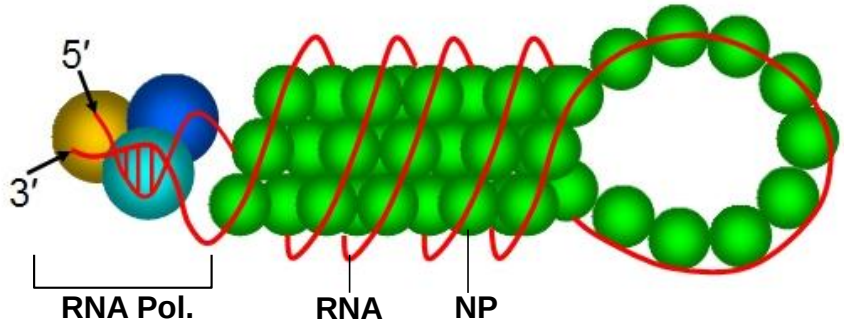
Şekil 4. İnfluenza virüsünde yapı değişimleri(Influenza, 2016).

Bazı virüslerin pH değerinden bağımsız olarakhücrelere girebilme yeteneklerine karşın influenza virüslerinin hücrelere girme süreçleri düşük pH (5-6) değerinde gerçekleşir. Bununla birlikte viral HA proteinin (HA0) konak organizmaya ait bir proteaz enzimi ile kesilerek HA1 ve HA2 alt birimlerine ayrılması viral enfeksiyonun seyri için zorunludur. İnfluenza virüsleri hemaglutinin aracılığı ile sialik asit bakiyelerine bağlanır ve fagositoz ile hücre içerisine alınır. Hücre içerisinde virüsün bulunduğu endozom membranındaki proton pompaları aracılığı ile pH değeri 5-6 seviyesine düşer. Bu pH değişimi HA moleküllerinin füzyon aktivitelerinin ortaya çıkmasına ve viral memebran ile endozomal memranın kaynaşmasına olanak sağlar. Bu da viral RNP'lerin sitoplazmada serbes kalmasına yol açar(Skehel ve Wiley, 2000;Stegmann ve ark., 1987; Stegmann, 2000; Conner ve Schmid, 2003; Huang ve ark., 2003; Lakadamyali ve ark., 2004; Sieczkarski ve Whittaker, 2005).

Virionun serbest kalması endozom içi pH değerinin zayıf bazlar (amonyum klorür) ya da iyonoforlar (monensin) ile yükseltilmesi ile inhibe edilebilir(Marsh ve Helenius, 1989; Peter Palese, 2007). Efektif bir serbestleşme virüs membranında yer

alan ve iyon kanalı aktivitesine sahip olan M2 proteinlerinin varlığına bağlıdır(Pinto ve ark., 1992; Peter Palese, 2007).

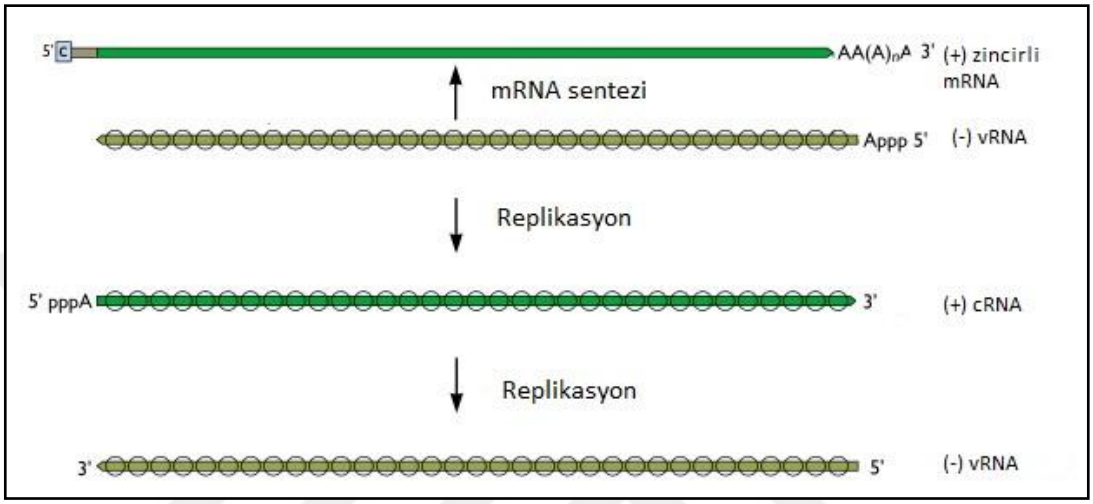
İnfluenza virüslerinin RNA sentezi diğer RNA virüslerinden farklı olarak nukleus içerisinde gerçekleşmektedir. Viral genomun nükleusa girişi ve çıkışı sıkıca kontrol edilen mekanizmalarla gerçekleşmektedir. İnfluenza virüsünün sekiz adet segmenti viral ribonukleoprotein (vRNP)kompleksleri halindedir. vRNP partiküllerindeen fazla bulunan protein NP proteinleridir. vRNA partiküllerinin yapısına katılan diğer proteinler viral RNA polimeraz alt birimleri olan PA, PB1 ve PB2 proteinleridir. Viral RNA polimeraz kompleksi, RNA moleküllerinin kodlamaya katılmayan (*İng. non-translated region: NTR*) kısmen komplementer olmaları nedeniyle bir arada bulunan 3′- ve 5′-uçlarına bağlı olarak bulunur (**Şekil 5**). RNP kompleksleri nükleusa pasif difüzyon ile girmek için çok büyüktürler dolayısı ile nükleer taşıma mekanizmasına ihtiyaç duyarlar. RNP kompleksindeki proteinler nükleer lokalizasyon sinyali taşırlar ve bu sinyal aracılığı ile viral RNP'ler nükleer taşınma mekanizmaları ile hücre nukleusuna taşınırlar(Boulo ve ark., 2007).



Şekil5. Ribonükleoprotein kompleksi.
(http://cronodon.com/BioTech/Virus_Tech_3.html, Erişim tarihi: 7 Haziran 2016)

Nükleusa taşındıktan sonra ilk olarak negatif polarite gösterenviral RNA'dan primer bağımlı bir mekanizma ile mRNA'lar sentez edilir. Bu yeni sentezlenen mRNA'lar negatif viral RNA'nın tam bir kopyası değildir, hem 5'- hem de 3'-uçlarda eksik bölgeler bulunur. Bu mRNA üzerinden viral proteinlerin sentezi gerçekleştirilir. Viral RNA'nın replikasyonu iki aşamada gerçekleştirilir.İlk

aşamadanegatif polarite gösteren vRNA'ların tam komplementeri olan pozitif anlamlı cRNA'ların sentezi gerçekleştirilir. Bu cRNA'lar üzerinden virüs partiküllerinin kurulması için gerekli olan vRNA'lar sentezlenir. Tüm bu reaksiyonlar viral RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilirler (**Şekil 6**)(Kawakami ve ark., 1981; Braam ve ark., 1983; Honda ve ark., 1986).



Şekil 6.İnfluenza virüsü mRNA sentezi ve viral RNA replikasyonları. (http://www.virology.ws/2009/05/08/influenza-viral-rna-synthesis/, Erişim tarihi: 1 Haziran 2016)

Viral RNA üzerinden sentezlenen mRNA'ların sahip olduğu 5' ucundaki şapka yapısı ve 13-14 nükleotitlik kısım konak hücre mRNA'larından viral RNA polimeraz enzimi tarafından kesilerek primer olarak kullanılır(Dhar ve ark., 1980). Bu sebeple influenza virüsü replikasyonu konak hücredeki RNA polimeraz II enziminin aktivitesine bağımlıdır ve bu olay hücre nukleusunda gerçekleşir. Ayrıca viral mRNA poli A kuyruğu taşır. cRNA ise vRNA'nın bire bir koplementeridir ve bu molekül kalıp alınarak virionlar için gerekli olan vRNA sentezlenir(Kawakami ve ark., 1981; Braam ve ark., 1983; Honda ve ark., 1986).

İnfluenza A virüsünün 2341 nükleotitlik birinci segmentinden kodlanan 87 kDa ağırlığındaki PB2 proteini viral RNA sentezinde hayati öneme sahiptir. Konak hücre RNA polimeraz II enzimi tarafından sentezlenen konak hücre mRNA'larına bağlanarak 5' uçtaki 7-metil guanozin şapkasını keserek bu yapının viral mRNA sentezinde primer olarak kullanılmasını sağlar(Blaas ve ark., 1982; Braam ve ark., 1983; Plotch ve ark., 1979; Plotch ve ark., 1981; Valcarcel ve ark., 1993). PB2

proteini amino terminal bölgesinden PB1 proteini ile bağlantılıdır(Poole ve ark., 2004). PB1 proteini viral genomun ikinci segmentinden sentezlenen ve 96 kDa ağırlığında olan bir proteindir ve replikasyondan sorumlu alt ünitedir(Braam ve ark., 1983). İnfluenza virüsünün ikinci segmentinden PB1 proteinine ek olarak 87 amino asitlik 11 kDa ağırlığındaki F2 proteini sentezlenir ve bu protein mitokondriyal lokalizasyon gösterip apoptoz ile ilişkilidir(Chen ve ark., 2001). Bu proteine sadece İnfluenza A virüsü ile enfekte hücrelerde rastlanmıştır(Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza virüsünün üçüncü RNA segmentinden PA proteini sentezlenir ve PB1 proteiniamino terminal bölgesine karboksil bölgesi ile bağlanır(Sanz-Ezquerro ve ark., 1998). Yaklaşık 85 kDa ağırlığındadır. PA proteininin işlevi tam olarak bilinmemek ile beraber bu protein üzerindeki mutasyonların hem replikasyonu hem de transkripsiyonu olumsuz yönde etkilediği tespit edilmiştir(Fodor ve ark., 2002; Fodor ve ark., 2003; Huarte ve ark., 2003). PA proteininin proteolitik aktiviteye sahip olduğu rapor edilmektedir (Sanz-Ezquerro ve ark., 1995).

İnfluenza virüsü genomunun altıncı segmentinden nöraminidaz (NA) proteini sentezlenir. Enzim aktivitesine sahip olan NA proteini viral membranda identik peptitlerin oluşturduğu tetramerik yapıda bulunur. NA, sialik asit içeren glikoproteinlerden terminal sialik asit ve sialik asite komşu olan bir şeker (D-galaktoz veya D-galaktozamin) arasındaki α-glikozid bağının kesilmesini katalize eder(Gottschalk, 1957; Palese ve ark., 1974). Sialik asit bakiyelerinin kesilmesi HA'nın sialik asite bağlanmasını engelleyerek olgunlaşmış virüsün hücreden ayrılmasını kolaylaştırır. NA enfeksiyon öncesinde solunum sistemindeki müsin tabakasını nöraminik asidi uzaklaştırarak ayrıştırır ve enfeksiyonu kolaylaştırır(Matrosovich ve ark., 2004b). Yine bu özelliğiyle; serbestleşen virüslerin epiteli kaplayan mukopolisakkaritlerin içinden geçişini sağlayarak virionların hücre yüzeyinde kümeleşmesinin önüne geçmektedir.

Viral genomun beşinci segmenti vRNA'lar ile kompleks oluşturan nükleoproteini (NP) kodlar. NP proteinleri viral RNA'ların replikasyonu ve transkripsiyonu içinde hayati proteinlerdir. NP proteinleri vRNA'lara RNA bağlanma bölgesi ile bağlanır(Albo ve ark., 1995). NP, anti-terminasyon kontrol faktörü olarak rol oynayabileceğinden bu bağlanmanın transkripsiyondan replikasyona geçişi

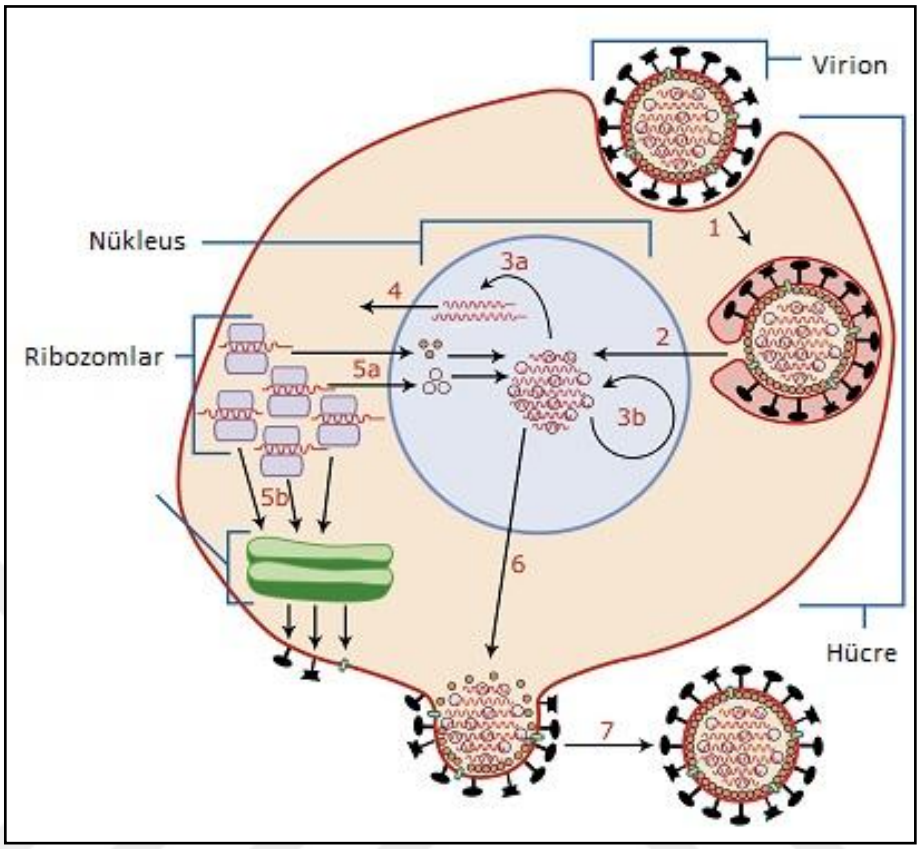
düzenlediği düşünülmektedir(Shapiro ve Krug, 1988). NP nükleer lokalizasyon sinyalleri, bu proteinin viral RNP'lerin nükleusa transportunu ve yeni viral RNA'larında nükleustan çıkışını M1 ve NS2 proteinleriyle birlikte gerçekleştirdiğini göstermektedir(Neumann ve ark., 1997).

Matriks proteinleri (M1 ve M2) influenza virüsü genomunun yedinci segmentinden alternatif kırpılma ile sentezlenen proteinlerdir(Valcarcel ve ark., 1993). M1 proteini virion içerisinde %40 oranıyla en fazla bulunan proteindir ve viral zarfın altında yer alır. Viral transkripsiyonun regülasyonunda, NS2 proteini ile birlikte RNP'lerin taşınmasında ve viral kurulumda görev almaktadır(Elleman ve Barclay, 2004). M2 proteini ise bir iyon kanalı proteinidir ve viral membranda yer alır. Bu protein kanal proteini olması sebebiyle enfeksiyon başlarında endozom içi pH değerinin düşmesini sağlayarak RNP'lerin serbest kalması için viral membran ile konak membranının birleşmesi sürecinde görev alır(Pinto ve ark., 1992).

Virüsün sekizinci RNA segmentinden ise M1 ve M2 proteinlerinde olduğu gibi alternatif kırpılma ile NS1 ve NS2 proteinleri sentezlenir(Lamb ve Choppin, 1979). Bu proteinler yapısal olmayan (İng. nonstructural) proteinler olarak adlandırılırlar. Bunun nedeni NS1 virionda bulunmaması ve NS2'nin ise virion içerisinde eser miktarda bulunmasıdır. 26 kDa ağırlığındaki NS1 proteini, hücre içerisinde savunma amacıyla oluşturulan interferon yanıtını etkisiz hale getirmek, viral RNA sentezini düzenlemek, viral mRNA translasyonunu artırmak gibi işlevlerlere sahiptir. NS2 proteinleri ise RNP'lerin nükleustan taşınmasında görev alır ve bu sebeple NEP (İng.nuclear export protein) olarak da bilinmektedir(Basu ve ark., 2009; O'Neill ve ark., 1998).

İnfluenza virüslerinin yaşam döngüsü, virüsün yüzey antijen proteinlerinden HA proteini ile konak hücrenin sialik asit reseptörlerine bağlanması ile başlar (**Şekil 7**)(Skehel ve Wiley, 2000). Daha sonra virüs, endositoz yolu ile hücre içerisine alınır (adsorpsiyon ve penetrasyon). HA proteini sadece virüsün hücrelere tutunmasında değil, aynı zamanda endozom içerisindeki virüsün sitoplazma içerisinde serbest kalmasında da rol oynar(Huang ve ark., 2003). Endozom içerisindeki düşük pH değerlerlerinde HA proteini konformasyonel değişime uğrar ve viral memran ve endozom membranlarının füzyonuna yol açar(Stegmann, 2000). Bunun

sonucundaviral RNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasını sağlanır (kot atma). Viral RNP'ler ATP ye bağımlı bir mekanizmayla nuklear porlardan nükleusa taşınır(Cros ve Palese, 2003). Nukleus içerisinde, RNP'ler üzerinde taşınan viral RNA polimeraz enzimi katalizörlüğünde negatif polarite gösteren viral RNA'lar üzerinden iki farklı tipte RNA molekülü sentez edilir. Bunlardan biri, 5'-ucunda 7-metil guanozin şapka yapısı (CAP) ve 3'-ucuna ise poli A dizisi taşıyan viral mRNA'lardır (transkripsiyon). Diğeri ise vRNA'ların tam komplementeri olan kopya RNA (cRNA)'lardır. Daha sonra cRNA'lar üzerinden, yine viral RNA polimeraz enzimi katalizörlüğünde vRNA'lar sentez edilir (replikasyon). Bu olaylar sonucunda hücre içerisinde virüse özgü yapısal proteinler (HA, NA, M1, M2, NP, NS1 ve NS2),viral RNA polimeraz enzimi (PB2, PB1 ve PA) ve viral RNA molekülleri sentez edilir. Sitoplazmada sentez edilen viral proteinlerden HA, NA ve M2 yüzey antijen proteinleri endoplazmik retikulum ve golgi aracılığı ile hücre membranına kanalize olur. NP proteinleri vRNA'lar ile kompleks oluşturarak RNP'leri meydana getirirler. Ayrıca RNA polimeraz enzimini oluşturan PB2, PB1 ve PA proteinleri de RNP'lere bağlı olarak taşınır. Henüz tam olarak anlaşılamayan bir mekanizma ile viral RNP'ler ve matriks (M1) proteinleri; viral antijenlerin girişiyle modifiye edilmiş olan hücre membranına taşınır ve burada kurulma işlemi gerçeklesir. Oluşan virüsler hücreden tomurcuklanma yoluyla ayrılır (serbestleşme). Diğer bir hücre yüzey glikoproteini olan NA, hücre yüzeyinde HA moleküllerinin bağlandığı sialik asit bakiyelerini keserek enfekte hücrelerden virüs serbestleşmesine olanak sağlar(Peter Palese, 2007).



Şekil 7.İnfluenza virüsü yaşam döngüsü. 1. Adsorpsiyon, 2. Penetrasyon ve kot atma, 3a. Tanskripsiyon, 3b. Replikasyon 4. Translasyon, 5a. RNPlerin nükleusa taşınması, 5b, Membran proteinlerinin taşınması, 6.Kurulum, 7. Hücreden ayrılma. (https://www.boundless.com/microbiology/textbooks/boundless-microbiology-textbook/viruses-9/negative-strand-rna-viruses-in-animals-125/replicative-cycle-of-influenza-a-645-4302/, Erişim tarihi: 1 Haziran 2016)

4.2. RNA İnterferens

RNA interferens gen anlatımının RNA molekülleri tarafından inhibe edilmesi durumları için kullanılan bir terimdir. Bu süreçte hücredeki mRNA'lar RNAi (RNA interferens) sistemi aracılığı ile yıkılır ve bu şekilde hücrenin söz konusu genin anlatımını daha az yapması sağlanmış olur.

RNAi ile ilgili ilk bulgular Napoli ve Jorgensen tarafından 1990 yılında rapor edilmiştir. Yapılan çalışmanın amacı petunyalarda koyu renge sebep olan kalkon sentaz genine aşırı expresyon yaptırarak daha koyu renkli petunya elde etmekti. Buna karşın çalışmanın sonunda beklenmedik şekilde beyaz renkli petunyalar elde edildi(Napoli ve ark., 1990).

Viktor Ambros ve diğerleri tarafından 1993 yılında *Caenorhabditis elegans*'ta küçük RNA'ların daha büyük genlerin anlatımını inhibe ettiğini bildirdi(Lee ve ark., 1993).

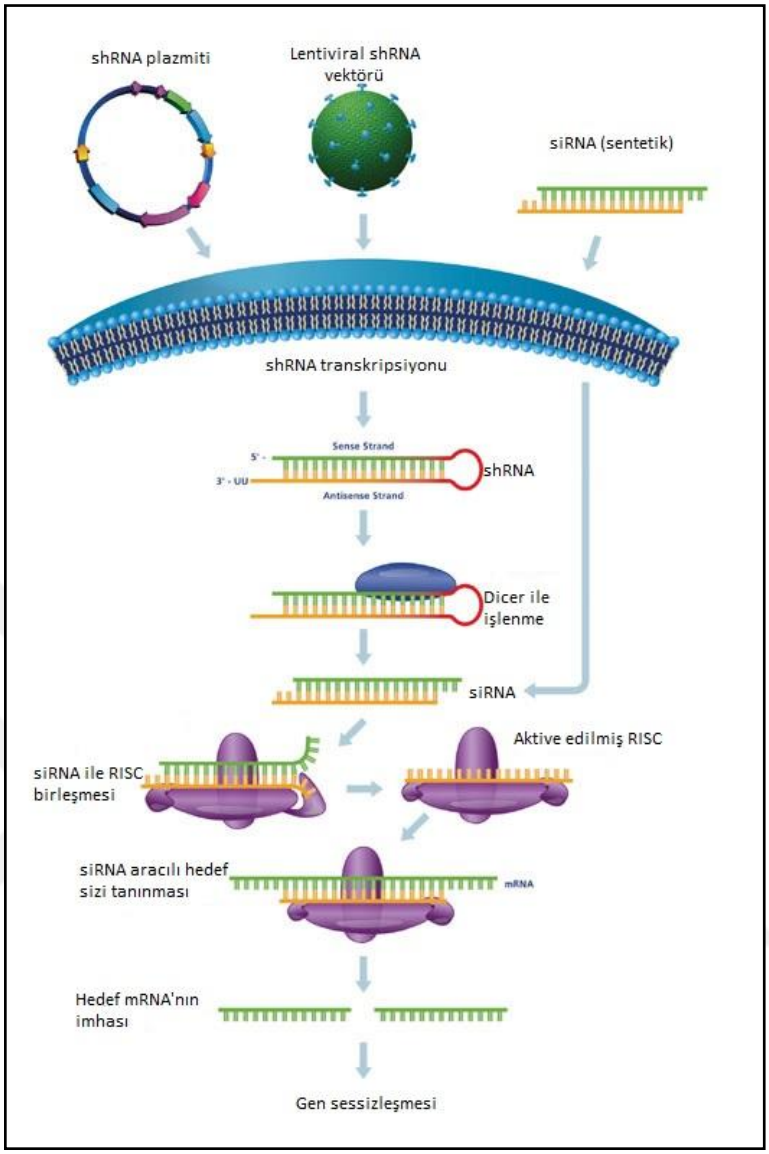
RNAi ilk olarak bir nematot olan *Caenorhabditis elegans*'ta eksojen çift zincirli RNA moleküllerine dizi spesifik bir biyolojik cevap olarak tanımlanmıştır. Geniş bir çapta ökaryotik canlı grubunda RNAi sistemi bulunmaktadır.

RNAi terimi PTGS (post transkripsiyonel gen susturması) eğer çift zincirli RNA molekülü ile gerçekleştiriliyorsa RNAi terimi kullanılır ancak bazı durumlarda susturma işleminin tek zincirli RNA'lar tarafından da gerçekleştirildiği bilinmektedir(Meister ve Tuschl, 2004).

Susturma süreci ilk olarak çift zincirli RNA'nın 21-25 nükleotitlik küçük RNA (miRNA ve siRNA) parçalarına kesilmesiyle başlar. Kesim işlemi DICER1 geni tarafından kodlanan Dicer enzimi tarafından gerçekleştirilir. Dicer enzimi RNAz III sınıfında yer alan bir enzimdir. Dicer enziminde iki adet katalitik bölge ve bu bölgelere ek olarak helikaz ve PAZ motifi bulunur(Bernstein ve ark., 2001; Filippov ve ark., 2000; Ketting ve ark., 2001). Dicer enzimi RNA interferensi için gerekli olan RISC (*İng. RNA-induced silencing complex*) aktivasyonunu sağlar. RISC basitçe dizi homolojisi ile mRNA'ları tanıyan ve ortadan kaldıran bir ribonükleoprotein

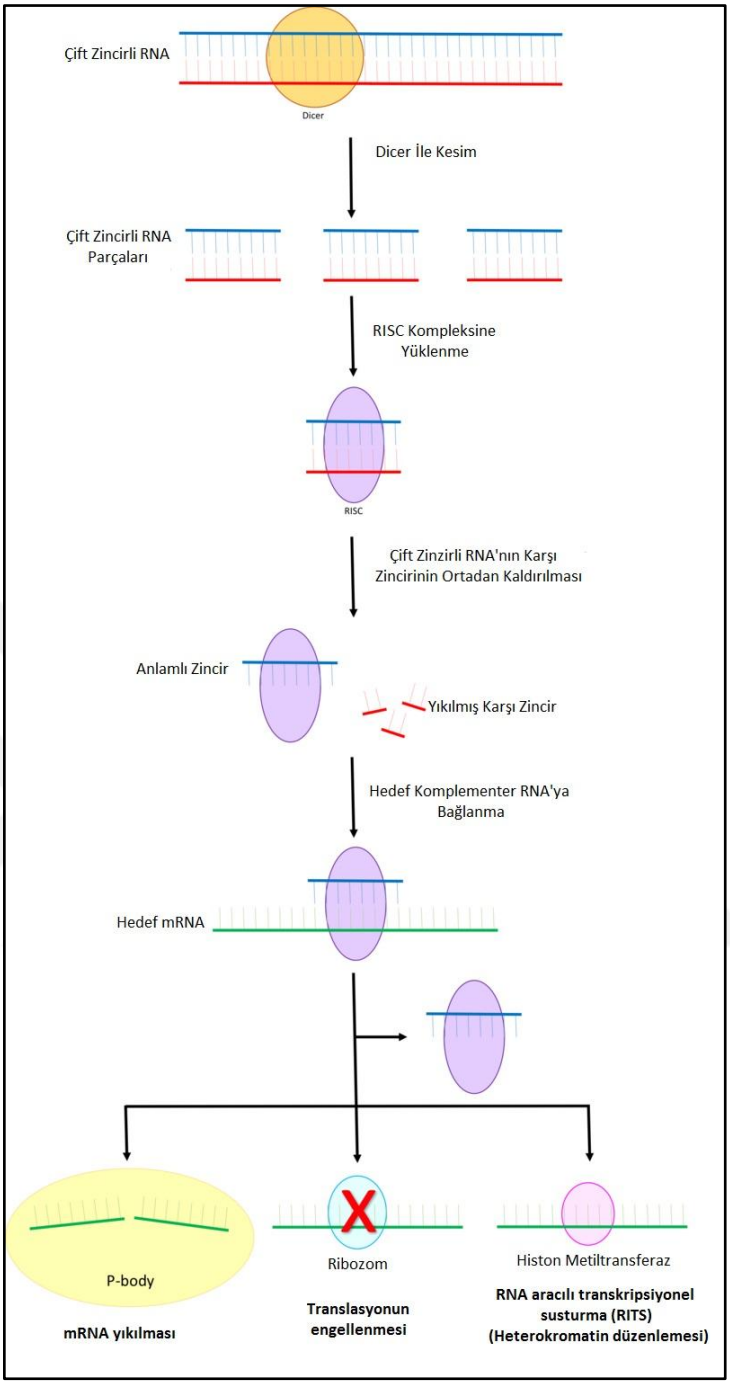
kompleksidir. RISC içerisinde mRNA'yı yıkan alt birim Argonat (*İng. Argonaute*) isimli enzimdir(Kupferschmidt, 2013).

Çalışmamızda insan Hax-1 geninin susturulması için siRNA (*İng. small interefering RNA*) ve shRNA (*İng. small hairpin RNA*) kullanılmıştır. siRNA'lar genellikle sentetik olarak oluşturulur ve hedef hücrelere dışarıdan hazır olarak verilir. shRNA'lar ise birer ekspresyon vektörü üzerinden kodlanabilir. Susturulmak istenilen gene özgü tasarlanan shRNA kodlayan plazmit vektörler hedef hücrelere transfekte edilerek gen anlatımı baskılanabilir. Vektör üzerinden shRNA aracılı RNA interferensi için hücrede RNA polimeraz III enzimi için gerekli olan U6 ve H1 gibi promotör bölgelerin vektör üzerinde bulunması gerekmektedir. shRNA'lar RNA polimeraz III tarafından sentezlenir ve Drosha enzimi tarafından işlenir, oluşan pre-shRNA'lar ise Dicer enzimi tarafından kesilerek siRNA'ya dönüştürülürler (**Şekil 8**ve **9**).



Şekil 8.shRNA ve siRNA işlemesinin karşılaştırılması. (http://www.sigmaaldrich.com/technical-documents/articles/life-science-innovations/mission-shrna-library0.html, Erişim tarihi: 1 Haziran 2016)

RISC kompleksi ayrıca mRNA'yı yıkmadan mRNA'nın ribozomlara bağlanmasını engelleyerek de gen sessizleşmesini gerçekleştirebilmektedir. Bu duruma ek olarak bazı maya türlerinde gen susturmasının transkripsiyon düzeyinde gerçekleştiği bilinmektedir, bu durumu ifade etmek için RITS (*İng. RNA induced transcriptional silencing*) terimi kullanılmaktadır(Verdel ve ark., 2004).



Şekil 9.RNA aracılı gen susturulması (https://en.wikipedia.org/wiki/RNA-induced_silencing_complex#/media/File:Part_of_the_RNA_interference_pathway_focusing_on_RISC.png, Erişim tarihi: 1 Haziran 2016)

4.3. Hax-1 Proteini

Hax-1 (*İng: HCLS1 associated protein X-1*) proteini ilk kez 1997 yılında Suzuki ve diğerleri tarafından maya ikili-hibrit metodu kullanılarak HCLS1(*İng. hematopoietic cell-specific Lyn substrate 1*) proteini ile ilişkili bir protein olarak tanımlanmıştır(Suzuki ve ark., 1997). Hax-1 proteini anti apoptotik bir proteindir ve hücrenin hayatta kalmasında rol alır, GNA13 aracılı hücre göçünün etkinliğini artırır, klatrin aracılı endositoz yolağında görev aldığı bilinmekte ve ABC transporterlerin internalizasyonunda, Casp9 ve Casp3'ün inhibisyonunda, hücre içi kalsiyum havuzunun regülasyonunda görev aldığı tahmin edilmektedir(Suzuki ve ark., 1997; Radhika ve ark., 2004; Han ve ark., 2006; Ramsay ve ark., 2007; Lee ve ark., 2008; Vafiadaki ve ark., 2009).

Dokularda yaygın olarak ekspresse olan Hax-1 proteini ağırlıklı olarak mitokondrial lokalizasyon gösterir. Son zamanlarda yapılan çalışmalarda Hax-1 genindeki homozigot mutasyonların ağır konjenital nötropeni (Kostmann hastalığı olarak da bilinir) ile ilişkilendirilmektedir. Ayrıca Hax-1 proteinin birçok hücresel ve viral proteinler ile ilişkisi saptanmış bu bakımdan çok fonksiyonlu bir protein olarak ele alınmaktadır(Fadeel ve Grzybowska, 2009).

Birlikte immün-çöktürme, immün lokalizasyon, maya ikili-hibrit metodu gibi farklı protein etkileşimi analizleri sonucunda Hax-1 proteininin Epstein-Barr virüsü antijen 5 proteini(Dufva ve ark., 2001), HIV tip 1 virüsü R proteini(Yedavalli ve ark., 2005) ve HCV kor proteini ile fiziksel etkileşim gösterdiği saptanmıştır (Banerjee ve ark., 2009).Yakın bir tarihte Won-Bo Wang ve diğerleri Hax-1 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimi ile ilişkili olduğu ve viral replikasyon üzererinde baskılayıcı etkiye sahip olduğunu rapor etmişlerdir(Hsu ve ark., 2013). Bu tez çalışmasında da Hax-1 proteininin influenza virüsü patogenezinde olası rolünü belirlemek amacıyla, HeLa ve HEK293 hücrelerinde Hax-1 protein düzeyi gen aktarımı ya da RNA interferens teknikleri ile değiştirildi ve bu değişikliklerin insan (A/WSN/H1N1) ve kuş tipi influenza virüsü(A/Duck/Pen-H5N2) replikasyonuna etkileri araştırıldı.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Santa Cruz, ABD
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
Bis-akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Borik asit	Merck, Almanya
Dimetil sülfoksit	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit: EDTA	Sigma Aldrich, ABD
Fenilindiamin	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Formamid	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Glikoz	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Hidroklorik asit	Merck, Almanya
Higromisin	Multicell, ABD
İzoamil alkol	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	Sigma Aldrich, ABD
Kalsiyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Kloroform	Merck, Almanya
L-Glutamin	Sigma Aldrich, ABD
Mangan klorür	Merck, Almanya
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD

(N-morpholino)propanesülfonik asit: MOPS	Sigma Aldrich, ABD
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, ABD
Paraformaldehit	Santa cruz, ABD
Polietilenglikol-6000	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin/Streptomisin	Sigma Aldrich, ABD
Piperazin-N,N′-bis (2-etanesulfonik asit): PIPES	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenimin	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	Merck, Almanya
Potasyum fosfat	Merck, Almanya
Potasyum klorür	Sigma Aldrich, ABD
Proteinaz-K	Roche, Almanya
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	Carlo Erba, İtalya
Sodyum deoksikolat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dodesil sülfat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum fosfat	Merck, Almanya
Sodyum hidroksit	Merck, Almanya
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Tetrametiletilendiamin: TEMED	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin	Sigma Aldrich, ABD
Tris	Sigma Aldrich, ABD
Tween 20	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD
293fectin	Invitrogen, ABD
2-β -Merkaptoetanol	Sigma Aldrich, ABD
8-hidroksikinolin	Sigma Aldrich, ABD

5.2. Enzimler

Restriksiyon Endonukleaz Enzimleri:

Plazmit vektörlerinin oluşturulması ve kontrol edilmesinde değişik aşamalarda DraI, PstI, EcoRI, BamHI, Hind III, XhoI (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleaz enzimlerinden yararlanıldı.

DNA ve RNA Modifikasyon Enzimleri:

DNA molekülleri ile yapılan çalışmaların değişik aşamalarında, amaca uygun olarak Klenow Enzimi, Alkalen Fosfataz, T4 DNA Ligaz, Polinükleotit Kinaz, RNaz ve DNaz (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs) enzimlerinden yararlanıldı

Termostabil DNA polimerazlar:

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) çalışmalarında standart Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas, New England Biolabs, Biotechrabbit) enzimi ve *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 arkea suşundan elde edilen, yüksek doğrulukta sentez özelliğine sahip KOD-plus (ToYoBo) enzimi kullanıldı

5.3. Antikorlar

Western melezleme ve immünfloresan deneylerinde birincil antikor olarak, fare anti-HA (Millipore: 05-904; Santa Cruz: sc-7392), tavşan anti-NP ve anti-PA [Dr. Atsushi Kawaguchi (Tsukuba Üniversitesi, İnfeksyon Biyolojisi Laboratuvarı) tarafından verilmiştir], fare anti-NS1 (Santa Cruz: sc-130568), fare anti-Aktin (Millipore: MAB-1501) antikorları; ikincil antikor olarak, anti-fare IgG-HRP (INVITROGEN/Thermo 31420), anti-tavşan IgG-HRP (INVITROGEN/Thermo 31423), anti-fare IgG-FITC (Chemican: AB308F), anti-fare IgG-Rhodamin (Millipore: AP124R) antikorları kullanıldı.

5.4. Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, RNA izolasyon kiti (Roche Cat. No. 11 828 665 001), reverz (ters) transkripsiyon kiti (Roche Cat. No. 04 379 012 001), orta-ölçekte plazmit izolasyon kiti (Qiagen) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı.

5.5. Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
Çalkalayıcı Su Banyosu	GFL, Almanya
Bakteriyolojik Etüv	Memmert, Almanya
Kemilüminesans tarayıcı	LI-COR, ABD
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya
Yatay Jel Elektroforez Cihazı	Labnet, ABD
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Otoklav	Kermanlar, Türkiye
Soğutmalı Santrifüjler	Backman ve Sigma, ABD
Mikro santrifüjler	Eppendorf, ABD ve Hettich, Almanya
Ters/Inverted Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Dikey Jel Elektroforez Cihazıları	Omnipage, İngiltere; Bio-Rad, ABD
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
Steril Çalışma Kabini	Holten, Danimarka
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Floresan Mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Hassas Terazi	Shimadzu, Japonya
Su Banyoları	GFL-Thermolab ve Isolab, Almanya
PZR Cihazı	ABI : ABD / Techne : ABD
Derin dondurucu (-80°C)	Panasonic, Japonya
Mikroplaka Okuyucu / Spektrofo-tometre	BioTek, ABD
Tüp karıştıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
CO_2 etüv	Sanyo, Japonya

5.6. Bakteri Üretmekte Kullanılan Besiyerleri

Bakteriler LB (Luria Bertani) ya da LBA (LB agar) besiyerlerinde üretildi. LB besiyeri 10 gram tripton, 5 gram maya özütü ve 10 gram sodyum klörür distile su içerisinde çözülüp hacmi 1 litreye tamamlanacak şekilde hazırlandı. LBA besiyeri için ise LB besiyerine %1,5 oranında agar eklenerek hazırlandı. Besiyeri 1 atm basınç altında 121 °C sıcaklıkta 20-25 dakika tutularak steril hale getirildi.

Gerekli durumlarda besiyerlerine 100 µg/ml final konsantrasyonda ampisilin eklendi.

5.7. Memeli Hücrelerinin Üretilmesinde Kullanılan Besiyerleri

Memeli hücrelerinin üretilmesi için *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) kullanıldı. HeLa hücreleri için 1 gram/litre glikoz içeren DMEM(DMEM-LG), HEK-293 hücreleri için 4,5 gram/litre glikoz içeren DMEM (DMEM-HG) besiyerleri kullanıldı.

Besiyerlerinin hazırlanması sürecinde ilk olarak 4x konsantrasyonda stok besiyerleri hazırlandı. Bunun için 20 gram D'MEM-LG ya da 26,96 gram D'MEM-HG steril deiyonize distile su içerisinde çözülerek toplam hacim 500 ml'ye tamamlandı ve 0,2 µm filtre ile steril hale getirildi. Hücre üretme besiyerlerini hazırlamak için 125 ml 4x konsantre besiyerine 50 ml fetal calf serum, 5 ml 100x konsantre penisilin/streptomisin ve 5 ml %7,5 sodyum bikarbonat eklendi ve toplam hacim steril deiyonize distile su ile 500ml'ye tamamlandı.

5.8. Plazmit Vektörler

Çalışmalarda pCAGGS, pCHA, pCAGGS-GST, piGENEhU6-Puro, pEGFP-N1 (Clontech, ABD) ve pCAGGS-Puro plazmitleri kullanılmıştır. pCAGGS ve bu vektörden türetilen pCHA plazmit vektörleri Prof. Dr. Kyosuke Nagata (Tsukuba/Japonya) tarafından verildi. Parazitik bir helmit olan *Schistosoma japonicum*'a ait glutatyon S transferaz (GST) cDNA'sının pCAGGS plazmitine klonlanması ile oluşturulmuş pCAGGS-GST plazmiti Dr. Nagata'nın laboratuvarında çalışan Dr. Sugiyama Kenji'nin hediyesidir. pCAGGS-Puro plazmiti tez danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan tarafından farklı bir çalışma kapsamında

puromisin direnç geni cDNA'sının pCAGGS plazmit vektörüne klonlanması ile elde edilmiştir.

5.9. siRNA

Çalışmada kullanılan Hax-1 genine özgü siRNA'lar (Life Technologies-Invitrogen) ticari yoldan temin edilmiştir.

5.10. Virüsler

Çalışmanın belirli aşamalarında insan tipi influenza A/WSN/33-H1N1 (WSN) ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen-H5N2 (DkP) virüsleri kullanıldı

5.11. *Escherichia coli*

Plazmit DNA'ların çoğaltılmasında,*E. coli* Mach1 (Invitrogen) bakteri ırkından yararlanıldı.

5.12. Memeli Hücre Hatları

Çalışmanın farklı aşamalarında HeLa (insan servikal kanser hücreleri) ve HEK-293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) hücre hatları kullanıldı. HeLa hücreleri ilk kez 1951 yılında Henrietta Lacks isimli serviks kanseri hastasının kanserli dokusundan George Gey (Jones ve ark., 1971) tarafından izole edilmiş ve üretilmiştir. Hastanın ad ve soyadının ilk harfleri hücre hattının ismi olmuştur. Diğer hücre hatlarına göre daha dayanıklı olmaları nedeniyle birçok araştırmada tercih nedeni olmuş ve günümüze kadar devamlılığı sağlanmıştır. HEK-293 hücreleri ise 1970'li yıllarda Alex Van der Eb (Graham ve van der Eb, 1973) tarafından kültürlenmiştirler. HEK293 hücreleri hızlı çoğalmaları ve DNA transfeksiyon etkinliğinin yüksek olması nedeniyle tercih edilen hücrelerdir.

5.13. Çözeltiler ve Tamponlar

5.13.1. Akrilamid/bis-akrilamid çözeltisi (%30)

58,0 gr akrilamid ve 2 gr bis-akrilamid deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, hacmi 200 ml'ye tamamlandı ve 0,2 µl filtreden geçirildi. Çözelti karanlık ortamda 4 °C'da saklandı.

5.13.2. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10)

1 gr amonyum persülfat, 10 ml deiyonize distile suda çözündürülerek hazırlandı. Çözelti 1 ml'lık hacimler halinde -20 °C'da saklandı.

5.13.3. Bloklama çözeltisi (%5)

25 gr yağsız süt tozu önce 400 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü. Daha sonra çözeltiye 25 ml 20x konsantre TBS, 5 ml %10 Tween-20 ve 1 ml %10 Sodyum Azid (NaN_3) eklenerek toplam hacmi deiyonize distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4 °C'da saklandı.

5.13.4. Etidyum bromür (10mg/ml)

0,1 g etidyum bromür, 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözülerek hazırlandı. Çözelti 4 °C'da saklandı.

5.13.5. %70 Etil alkol

70 ml saf etil alkol deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.13.6. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0,5 M, pH:8,0)

186,1 gr EDTA, 800 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü. Çözeltiye pellet haldeki NaOH eklenerek pH'si 8'e ayarlandı ve hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti son olarak 121 °C sıcaklıkta 20 dakika süreyle 1 atm. basınç altında steril edildi. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. (EDTA, Mw=292,24)

5.13.7. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1)

Katı haldeki fenol, 65 °C sıcaklıkta eritildi ve oksidasyonu engellemek için ortama %0,1 konsatrasyonda olacak şekilde 8-hidroksikinolin eklendi. Fenol üzerine eşit hacimde 0,5 M Tris-Cl tamponu (pH:8) eklendi ve 60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için emülsiyon 4 °C sıcaklıkta bekletildi ve üst faz bir su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0,1 M Tris-Cl tamponu (pH:8) ile fenolün pH değeri >7,8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık %90'ı uzaklaştırıldı ve 4 °C'da karanlık ortamda saklandı. Tris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol 24:24:1 (fenol:kloroform:izoamil alkol) oranında olacak şekilde kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanılmak üzere + 4 °C sıcaklıkta saklandı.

5.13.8. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik su (T-FTS)

40 gr NaCl, 1 gr KCl, 1 gr KH_2PO_4 ve 21,6 gr $Na_2HPO_4.7H_2O$, 800 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü, pH'si 7,4'e ayarlandıktan sonra hacim 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan çözelti 1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta 20 dakika tutularak steril edildi. Kullanılacağı zaman steril deiyonize distile su ile 1:5 oranında seyreltildi.

5.13.9. Glikoz çözeltisi (1 M)

90 gr glikoz deiyonize distile su içinde çözündürülüp hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C sıcaklıkta 1 atm. basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. (Glikoz, Mw=180,16)

5.13.10. Hidroklorik asit çözeltisi (3N)

75 ml deiyonize distile suya 29,56 gr (25 ml) %37'lik (w/w) HCl çözeltisi eklenerek hazırlandı. (HCl, Mw=36,46; 1,186 gr/ml)

5.13.11. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M)

100 gr kalsiyum klorür ($CaCl_2$) deiyonize distile su içinde çözündürülerek hacmi 300 ml'ye tamamlandı ve 1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta 20 dakika tutularak steril edildi. ($CaCl_2$, Mw=110,98)

5.13.12. Lamel kapatma çözeltisi

10 mg parafenilindiamin 1 ml 20 mM tris tamponunda (pH: 8,8) çözündürüldü ve gliserin ile 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti karanlıkta -20°C sıcaklıkta saklandı.

5.13.13. Mangan Klorür Çözeltisi (0,55 M)

54,4 gr $MnCl_2.4H_2O$ deiyonize distile su içinde çözülüp hacmi 500 ml'ye tamamlandı. ($MnCl_2.4H_2O$, Mw= 197,9)

5.13.14. Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi (%10)

5 gr NP-40 50 ml falkon tüp içerisinde tartıldı ve deiyonize distile su eklenerek toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

5.13.15. Paraformaldehit çözeltisi

3 gr paraformaldehit 10 ml 0,1 N NaOH içinde 65 °C'da tutularak çözündürüldü. Çözeltinin pH'sı 1M HCl ile yaklaşık 7-7.5 olarak ayarlandı (pH indikatör kağıdı ile kontrol edildi) ve hacim deiyonize distile su ile 80 ml'ye tamamlandı. Üzerine 20 ml 5x konsantre T-FTS eklendi. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5.13.16. PIPES (1,4-piperazinediethanesulfonic acid) çözeltisi (1 M)

30,2 gr PIPES 80 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü, pH'si 7,5'e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta 20 dakika tutularak steril edildi. (PIPES, Mw=302,37)

5.13.17. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (%40)

40 gr PEG-4000 deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,45 µm filtreden geçirildi ve oda sıcaklığında saklandı.

5.13.18. Polietilen glikol (PEG) / NaCl çözeltisi (%20 / 1,25 M)

%40 PEG-4000 çözeltisi ve 2,5 M NaCl eşit hacimde karıştırılarak hazırlandı.

5.13.19. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (2 mg/ml)

50 mg polietilenimin deiyonize distile su içinde çözülerek hacmi 25 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve 1 ml'lık porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı.

5.13.20. Potasyum asetat çözeltisi (3 M)

29,44 gr potasyum asetat (KCH_3COO) deiyonize distile su içinde çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. (KCH_3COO, Mw= 98,14)

5.13.21. Potasyum klorür çözeltisi (2,5 M)

93,2 gr potasyum klorür (KCl) deiyonize distile su içinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. (KCl, Mw= 74,55)

5.13.22. Sodyum bikarbonat çözeltisi (%7,5)

7.5 gr $NaHCO_3$ deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçirilerek steril hale getirildi. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5.13.23. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10)

5 gr sodyum deoksikolat (3α,12α-Dihidroksi-5β-kolanik asit sodyum tuzu) deiyonize distile su içinde çözündürülüp hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5.13.24. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (%10)

10 gr SDS deiyonize distile su içinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5.13.25. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

8 gr sodyum hidroksit deiyonize distile su içinde çözülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. (NaOH, Mw= 39,99)

5.13.26. Sodyum klorür çözeltisi (2,5 M)

36,6 gr sodyum klorür deiyonize distile su içinde çözündürülerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. (NaCl, Mw= 58,5)

5.13.27. %0,25 tripsin çözeltisi

0.25 gr tripsin 100 ml T-FTS içinde çözülüp 0,2 µm filtreden geçirilerek 10 ml'lik hacimler halinde -20 °C derece sıcaklıkta saklandı.

5.13.28. Tripsin-EDTA çözeltisi

10 ml %0,25 tripsin 1 ml %5 EDTA ile karıştırılarak toplam hacmi steril T-FTS ile 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4 °C'da saklandı.

5.13.29. Tween-20 çözeltisi (%10)

5 gr tween-20 50 ml falkon tüp içerisinde tartıldı ve deiyonize distile su eklenerek toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.30. 4x konsantre ayırma jel tamponu (1,5 M tris, %0,4 SDS, pH: 8,8)

91 gr tris ve 2 gr SDS, 400 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 1N HCl ile 8,8'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.31. Bakteri transformasyon tamponu

150 ml deiyonize distile suya 2 ml 1M PIPES, 2 ml 2,5M $CaCl_2$, 20 ml 2,5M KCl, eklendi ve pH'si6,7'ye ayarlandı. Çözeltiye 20 ml 0,55M $MnCl_2$ eklendi ve hacmi deiyonize distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. Deneylerde kullanılmadan önce buz üzerinde soğutuldu.

6.13.32. Plazmit ekstraksiyon tamponu I

5 ml 1M Tris-Cl, 10 ml 1M glikoz ve 4 ml 0,5M EDTA çözeltisi karıştırılıp deiyonize distile su ile hacmi 200 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.33. Plazmit ekstraksiyon tamponu II

Bir hacim 2N NaOH, bir hacim %10 SDS ve 8 hacim deiyonize distile su ile karıştırılarak hazırlandı. Çözelti her deney için taze hazırlanarak kullanıldı. (NaOH, Mw=39,997)

6.13.34. Plazmit ekstraksiyon tamponu III (3M potasyum : 5M asetat)

60 ml 5M potasyum asetat (CH_3COOK) ve 11,5 ml glasiyal asetik deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti 4 °C'da saklandı. (CH_3COOK, Mw= 98,14)

6.13.35. 6x konsantre DNA yükleme tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6.55 ml deiyonize distile su içinde çözdürülüp %87 gliserin ile hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4 °C'da saklandı.

6.13.36. 10x konsantre MOPS [3-(N-morpholino)propanesulfonik Asit] tamponu

41,8 gr MOPS, 700 ml deiyonize distile su içinde çözdürüldü ve pH'sı NaOH ile 7,0'a ayarlandı. Üzerine 20 ml 1M sodyum asetat, 20 ml 0,5M EDTA (pH: 8) eklendi ve hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Tampon 0.45 µm filtreden geçirildi. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.37. 4x konsantre paketleme jel tamponu

6,05 gr tris ve 0,4 gr SDS 80 ml deiyonize distile su içinde çözülüp 1 N HCl ile pH'sı 6,8'e ayarlandı. Son olarak çözelti deiyonize distile su ile 100 ml toplam hacme tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.38. Poliakrilamid denatüre jel elektroforez tamponu

200 ml 5x tris/glisin tamponuna 10 ml %10 SDS çözeltisi eklenip çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı.

6.13.39. Protein transfer tamponu

200 ml 5x tris/glisin tamponuna 100 ml metanol eklenip toplam çözelti hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

6.13.40. 4x konsantre protein yükleme tamponu

1,22 gr tris, 4 g SDS ve 0,1 gr bromofenol mavisi, 20 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve üzerine 2 ml 2-merkaptoetanol ile 23 ml %87'lik gliserin eklendi. Çözeltinin pH'sı 1 N HCI ile 6,8'e ayarlandıktan sonra deiyonize distile su ile hacim 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 ml'lik hacimler halinde -20 °C'da saklandı.

6.13.41. RIPA tamponu

5 ml 1M Tris-Cl (pH:8), 1 ml 0.5M EDTA (pH:8), 6 ml 2,5M NaCl, 10 ml %10 NP-40, 5 ml %10 Sodyum deoksikolat ve 1 ml %10 SDS deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.42. 2x RNA yükleme tamponu

1.2 ml 10x MOPS, 2 ml formaldehit, 6 ml formamid ve 2,8 ml 6x DNA yükleme tamponu karıştırılarak hazırlandı. Çözelti 1 ml'lik hacimler halinde -20 °C'da saklandı.

6.13.43. Sodyum asetat tamponu (3M)

12.3 gr sodyum asetat ($CH_3COONa.3H_2O$) 40 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve pH'sı 5,2'ye ayarlandı. pH ayarlamasından sonra çözelti hacmi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. ($CH_3COONa.3H_2O$, Mw= 82,03)

6.13.44. 50x konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu

242 gr tris 500 ml deiyonize distile su içinde çözündürülüp üzerine 57 ml saf asetik asit ve 100 ml 0.5M EDTA çözeltisi (pH: 8,0) eklendi. Daha sonra çözelti 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.45. Tris-HCl tamponu (1M, pH: 8,0)

121.1 tris 800 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü, pH'sı 3N HCl ile 8'e ayarlandıktan sonra toplam hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Tampon 1 atm. basınç altında 121 °C sıcaklıkta 20 dakika tutularak steril hale getirildi. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. (Tris, Mw= 121,1)

6.13.46. Tris / EDTA (TE) tamponu

10 ml 1M tris-Cl tamponu (pH: 8,0) ve 2 ml 0.5M EDTA çözeltisi (pH: 8,0) deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.47. 5x konsantre tris-glisin tamponu

15.15 gr tris ve 93,84 gr glisin deiyonize distile su içinde çözülüp pH'sı 8,3'e ayarlandıktan sonra hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti 4 °C'da saklandı. (Glisin, Mw= 75,07)

6.13.48. 5x konsantre TBE tamponu

54 gr tris ve 27,5 gr borik asit (H_3BO_3) deiyonize distile su içinde çözülerek üzerine 20 ml 0,5M EDTA (pH: 8,0) eklendi ve hacmi deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı. (Borik Asit, Mw= 61,83)

6.13.49. 20x konsantre TBS tamponu

160 gr NaCl, 4 gr KCl ve 60 gr tris 800 ml deiyonize distile su içinde çözülüp pH'sı HCl ile 7,4'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti oda sıcaklığında saklandı.

6.13.50. TBS ve TBS-T tamponu

50 ml 20x TBS tamponu su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. TBS-T tamponu için ek olarak 10 ml %10 tween-20 ya da 10 ml %10 triton X-100 eklendi. Çözeltiler oda sıcaklığında saklandı.

5.14. Nükleik Asitler İçin Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

5.14.1. DNA analizleri için agaroz jeli ve elektroforez

DNA analizlerinde amaca göre %1, %1,5 ya da %2'lik agaroz jeller kullanıldı. Bunun için 1, 1,5 ya da 2 gr agaroz 98 ml distile su içerisinde, mikro dalga fırınında 3 dakika süre ile kaynatıldı ve sonrasında 2 ml 50x konsantre TAE tamponu eklendi. Çözelti 60-70 C'a kadar soğutulduktan sonra 0,1-0,2µg/ml final

konsantrasyondaolacak şekilde 10 mg/ml etidyum bromür çözeltisi eklendi ve karıştırıldı. Çözelti yatay agaroz jel kasetlerine döküldü ve katılaşması sağlandı. Elektroforez işlemleri 1xkonsantre TAE tamponu içerisinde gerçekleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında 6x DNA yükleme tamponuyla karıştırılıp jele uygulandı. Elektroforez 100, volt sabit direnç altında 25-30 dakikada tamamlandı. Agaroz jelde ayrıştırılan DNA molekülleri UV transillüminatörde görüntülendi ve bir dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

5.14.2. DNA analizleri için akrilamid jeli ve elektroforez

Çalışmalarda küçük boyutlarda olan DNA'lar için %6'lık doğal poliakrilamid jelleri kullanıldı. Bunun için 2 ml %30'luk akrilamid-bis akrilamid çözeltisi ve 2 ml 5X TBA tamponuz karıştırılarak hacmi deiyonize distile su ile 10 ml'ye tamamlandı. Karışıma 50 µl APS ve 20 µl TEMED eklenerek 10 cm x 10 cm boyutundaki kasetlere dökülerek polimerizasyona bırakıldılar. Polimerizasyon sonrası DNA'lar 5:1 oranında 6x DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele yüklendi ve 90 volt sabit akım altında yürütüldüler. Elektroforez sonrası jel 0,1-0,2µg/ml konsantrasyondaki etidyum bromür çözeltisinde 1 saat boyunca 30-40 rpm çalkalama hızı ile bekletildi. Daha sonra aynı işlem distile su ile tekrar edildi. Daha sonra DNA molekülleri UV transillüminatörde görüntülendi ve bir dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

5.14.3. RNA analizleri için agaroz jeli ve elektroforez

Hücrelerden izole edilen total RNA molekülleri sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren %1'lik agaroz jeller ile analiz edildi(Aranda ve ark., 2012). 1 gr agaroz 94 ml distile su içerisinde, mikrodalga fırınında 3 dakika süre ile kaynatıldı ve sonrasında 2 ml TAE tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 60-70 ºC'a kadar soğutulduktan sonra çözeltiye 4 ml ticari sodyum hipoklorit eklendi ve jel kasetlerine döküldü. Katılaşan agaroz jel 1x TAE tamponuna alındı. RNA örnekleri 2x RNA yükleme tamponuyla 1:1 oranında karıştırıldı, 65 ºC'da 5 dakika bekletildikten sonra jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit direnç altında 45-50 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrasında jeller 0,2µg/ml konsantrasyonunda edityum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 40 devir/dakika hızında bir çalkalayıcı

üzerinde 1 saat süre ile çalkalandı. RNA moleküllerine bağlanmayan etidyum bromür kalıntılarını uzaklaştırmak için jeller deiyonize distile su ile 30 dakika 40 devir/dakika hızında yıkandı.RNA molekülleri UV transillüminatörde görüntülendi ve bir dijital kamera ile fotoğrafları çekildi.

5.15. Spektrofotometrik Yöntemler ile DNA ve RNA Örneklerinin Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA örneklerinin kalite ve miktar tayinlerinde spektrofotometrik yöntemlerden faydalanıldı. DNA örneklerinin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri bir spektrofotometre (Shimatzu BioSpec- 1601) ile ölçüldüve aşağıdaki formül ile miktarı saptandı.

$$\text{DNA konsantrasyonu } (\mu g/ml) = OD_{260} \times D \times K_d$$

[OD_{260}, 1 cm çapında quartz küvetlerde ölçülen örneklere ait absorbans değeri; D, sulandırım kat sayısı; K_d, (50 µg/ml)]

RNA örneklerinin miktar ve kalite tayini Epoch Mikroplate Spektrofotometre (Biotek) cihazında ölçülerek saptandı.

DNA ve RNA örneklerinin 260 nm dalga boyundaki absorbans değerinin 280 nm dalga boyundaki absorbans değerine oranına bakılarak örneklerin saflıkları hakkında fikir edinildi (Bu oran kaliteli DNA için yaklaşık 1,8; kaliteli RNA için ise yaklaşık 2,0'dır).

5.16. Transformasyon İçin *Escherichiacoli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi

Transformasyonda kullanılmak üzere -80 °C saklanan *Escherichia coli* Mach1 bakteri stoğundan LBA katı besiyerine öze ile ekim yapıldı ve 37 °C sıcaklıkta bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan kültürden tek bir koloni alındı ve 5 ml LB sıvı besi yerine ekildi. Bu kültür 150 devir/dakika çalkalama hızında 37 °C sıcaklıkta bir gece inkübe edildi. Hazırlanan kültür 150 ml taze LB sıvı besi yerine eklendi ve OD_{600} değeri 0,25-0,3 olana kadar 23 °C sıcaklıkta 150 rpm çalkalama hızında inkübe

edildi. Kültür 4 °C sıcaklıkta 4000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Çökelti 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içinde süspanse edildi ve 20 dakika buz içinde bekletildi. Çözelti tekrar 4 °C sıcaklıkta 4000 devir/dakika hızda 10 dakika santrifüj edildi. Hücreler 10 ml soğuk bakteri transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonunun üzerine 10 dakika ara ile iki defa 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan kompeten hücre süspansıyonu daha sonra kullanılmak üzere 0,5 ml'lik porsiyonlar halinde -80 °C sıcaklıkta saklandı.

5.17. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması

HeLa hücreleri DMEM-LG (+) besiyeri, HEK-293 hücreleri için ise DMEM-HG (+) besiyerinde standart kültür koşullarında (37 °C, %5 CO_2, %95 nispi nem) üretildi. 10 cm çapındaki petri kaplarında yaklaşık %80-90 doygunluğa erişen hücreler taze besi yerlerine aktarıldı. Bunun için besi yerleri uzaklaştırıldı, ve hücreler 2-3 ml tripsin:EDTA çözeltisi ile yıkandı. Daha sonra hücrelere 1 ml tripsin:EDTA çözeltisi eklendi ve 37 ºC'da 5-10 dakika bekletildi. Petri yüzeyinden kalkan hücreler 5 ml DMEM (+) besiyerinde pipetaj ile süspansiyon haline getirildi. Hücreler 1/10 -1/20 sulandırdım oranında taze besiyerlerine aktarıldı. Bu işlem 3-4 günde bir tekrar edildi.

5.18. Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

Bu tez çalışması kapsamında, hücrelerde Hax-1 transkript düzeyini düşürmek (knock down) amacıyla, bu transkripte özgü shRNA kodlayan vektörler oluşturuldu. Konak hücrelerde sentez edilen Hax-1 proteinin influenza virüsü PA proteini ile olası fiziksel etkileşimini saptamak için GST (glutatyon-S-transferaz) ile çöktürme testlerinde kullanmak için viral PA proteini GST ile birleşik halde (PA-GST ya da GST-PA füzyonu) kodlayan vektörler oluşturuldu.

5.18.1. Hax-1genine özgü shRNA kodlayan plazmit vektörlerin oluşturulması

Hax-1 genini susturmak için bu gen tarafından kodlanan transkript üzerinde olası hedef bölgeler, internet üzerinden shRNA tarama programı (http://www.genelink.com/→http://www.genelink.com/sirna/shRNAi.asp :

erişimtarihi 15.01.2015) yardımıyla saptandı. Bu hedef dizilerden bir 5′-uca (77-99. nukleotidler / shRNA-1) diğeri ise 3′-uca (752-774. nukleotidler/ shRNA-2) yakın olan iki bölge seçildi ve bu bölgeler için shRNA dizileri tasarlandı. Tasarlan bu DNA dizileri aşağıda belirtildiği şekilde sentetik primerler ile Klenow enzimi kullanılarak sentez edildi ve piGENE-Puro plazmit vektörüne klonlandı.

Hax-1 shRNA kodlayıcı DNA fragmentlerinin oluşturulması:

Hax-1 geni için tasarlanan shRNA kodlayıcı çift zincirli DNA fragmentleri (shRNA-1 ve shRNA-2) Tablo 1'de verilen, 3′-uçlarında 11 nükleotidlik komplementer diziler taşıyan primer çiftleri üzerinden oluşturuldu.

Tablo 1. Hax-1 shRNA kodlayıcı DNA fragmentlerinin oluşturulmasında kullanılan primerler.

Primer adı	Nukleotid dizisi
Hax-1shRNA1-For	GGATGACTCGAGATGAAGATGATgtgtgctgtcc
Hax-1shRNA1-Rev	AAAAAGGATGACTCGAGATGAAGATGATggacagcacac
Hax-1shRNA2-For	GTGATCCAGAATCACCAAGACCTgtgtgctgtcc
Hax-1shRNA2-Rev	AAAAAGTGATCCAGAATCACCAAGACCTggacagcacac

Öncelikle primerler fosforillendi. Bunun için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı ve 37 °C sıcaklıkta 1 saat süre bekletildi. Daha sonrası reaksiyon karışımı 90 °C sıcaklıkta 5 dakika tutularak T4 polinükleotid kinaz inhibe edildi.

Primer fosforilleme reaksiyon karışım:

Primer (100 pM/µl)	*: 2 µl*
ATP (10 mM)	*: 8 µl*
T4 polinükleotit kinaz tamponu (x10 konsantre)	*: 2 µl*
Deiyonize distile su	*:11 µl*
T4 polinükleotit kinaz (10U/µl)	*: 1 µl*
Toplam hacim	*: 20 µl*

Forforillenmiş primer çiftleri (Hax-1shRNA1-F / Hax-1shRNA1-R ya da Hax-1shRNA2-F / Hax-1shRNA2-R) eşit miktarlarda karıştırılarak, Klenow enzimi ile çift zincirli hale dönüştürüldü. Bunun için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon karışımı 37 °C'da 30 dakika inkübe edildi. Beklenen boyutta çif zincirli

DNA fragmentlerinin oluşup oluşmadığı, 2 µl hacimde örneklerlerin akrilamid jelinde elektroforez ile kontrol edildi.

Çizft zincirli DNA sentezi için reaksiyon karışımı:

10 pM/µl ileri Primer (Hax-1shRNA1-F ya da Hax-1shRNA2-F)	*: 10 µl*
10 pM/µl geri Primer (Hax-1shRNA1-R ya da Hax-1shRNA2-R)	*: 10 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM)	*: 2 µl*
NEB2 tamponu (x10 konsantre)	*: 3 µl*
Deiyonize distile su	*: 4 µl*
Klenow enzimi (5U/µl)	*: 1 µl*
Toplam hacim	*: 30 µl*

Poliakrilamid gel elektroforezi ile kontrol edilen örnekler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi ve etanol ile çöktürüldü. Bu amaç ile örneklerin hacmi 100 µl'ye tamamlandı ve eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol ile karıştırıldı. Emülsiyon 14000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edilip üst faz yeni tüpe aktarıldı. Örneklerin üzerine 10 µl 3M sodyum asetat ve 280 µl saf etil alkol eklendi örnekler -80 °C sıcaklıkta 5 dakika bekletildi. Örnekler4 °C'de 15 dakika 15000 devir/dakika hızda santrifüj edilerek DNA molekülleri çöktürüldü. DNA çözeltisi %70 etanol ile yıkanıp kurutuldu ve 20 µl TE tamponunda çözündürüldü. Elde edilen DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Bunun için örnekler, 4µl 6x DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak %2'lik agaroz jelde yüklendi. Elektroforez işlemi 100 volt sabit direnç altında 25 dakikada tamamlandı. Jel üzerinde ayrıştırılan DNA molekülleri ticari DNA jel ekstraksiyon kit'i (Qiagen:Cat No./ID: 28704) ile saflaştırıldı. Ekstraksiyon işleminde üretici firmanın önerdiği metot izlendi. DNA örnekleri 30 µl TE tamponu ile geri kazanıldı ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

piGENE U6 plazmit vektörünün ligasyon için hazırlanması:

piGENE U6 plazmit vektörünün doğrusal hale getirilmesinde PZR tekniğinden yararlanıldı(İbişoğlu, 2015). piGENE U6 plazmit için tasarlanan 5′-TACCTGCAGGCATGCAAGCTT-3′ (hU6-For) ve 5′-GGTGTTTCGTCCTTTCCAC-3′ (hU6-Rev) primerleri kullanılarak tüm plazmit DNA'sı PZR ile çoğaltıldı. PZR 30 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Bunun için 2 µl hU6 For (20 pM), 2 µl hU6 Rev (20 pM), 3 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 25 ng (1 µl) piGENE U6 plazmit DNA'sı, 1,5 µl $MgSO_4$, 3 µl dNTP karışımı (2

mM), 1 µl DMSO ve 1U (1 µl) KOD plus enzimi karıştırılıp deiyonize diztile su ile 30 µl'ye tamamlandı. PZR reaksiyonu 95 °C'de 3 dakika ön denatürasyondan sonra, 30 döngü; 95 °C, 15 saniye- 53 °C, 30 saniye, 68 °C 4 dakika ve bir döngü 68 °C, 10 dakika şeklinde gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Sonrasında örnekler yukarıda belirtildiği şekilde fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi ve ve doğrusal halde plazmit DNA'sı %1'lik agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. DNA örnekleri 30 µl TE tamponu içerisinde geri kazanıldı ve -20 °C'da saklandı.

Ligasyon ve transformasyon:

Yukarıda ayrıntılı olarak verildiği şekilde hazırlanan Hax-1 genine özgü shRNA1 ve shRNA2 DNA fragmentleri ve doğrusal piGENE U6 plazmit DNA'sından 3 µl % 1,5'lik agaroz jelde yürütülerek yaklaşık konsantrasyonları saptandı. Yaklaşık 50 ng (20 nmol / 4 µl) piGENE U6 5 ng (120 mmol / 1 µl))shRNA1 ya da shRNA2 DNA fragmenti ile karıştırıldı. Karışım üzerine eşit hacimde (5 µl) TaKaRa ligasyon kit'i (solüsyon I) eklendi ve 16 °C'a ayarlı PZR cihazında gece boyu reaksiyona bırakıldı. Daha sonra ligasyon ürünleri kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi.

Daha önce kimyasal maddeler ile kompetent hale getirilen ve -80 ºC'da saklanan *E. coli* hücre süspansiyonu çözündürüldü ve buz üzerinde tutulan ligasyon örneğine hücre süspansiyonundan 100 µl eklendi. Örnekler buz üzerinde 15 dakika bekletildi ve sonrasında 90 saniye süre ile 42 C'da su banyosunda tutularak sıcaklık şokuna maruz bırakıldı. Sıcaklık şokundan hemen sonra örnekler buz üzerine alında, 3 dakika buz üzerinde, 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücrelerin üzerine 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 ^{o}C'da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 150 µl hücre süspansiyonu, 100 µg/ml ampisilin içeren LBA besiyerine cam bagetle yayılarak ekildi. Petriler 37 ^{o}C'da 1 gece bekletilerek plazmit alan transformant bakterilerin çoğalması sağlandı. Transformant koloniler, koloni-PZR yöntemi rekombinant plazmit bakımından analiz edildi. shRNA1 ya da shRNA2 DNA fragmenti taşıdıkları saptanan kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA'sı izole edildi. Plazmit DNA örnekleri PEG:NaCl ile çöktürme yöntemi ile kısmı olarak saflaştırıldı ve DNA dizi analizlerinde kullanıldı.

5.18.2. Memeli hücrelerinde ekspresyon yapan vektörlerin oluşturulması

Bu çalışma kapsamında insan Hax-1 proteini ve influenza virüsü PA proteinlerini kodlayan plazmit vektörler kullanıldı. Hücrelerde Hax protein düzeyini arttırmak için pCHA-Hax1 plazmit vektöründen yararlanıldı. Bu vektör 112S518nolu TÜBİTAK projesi kapsamında tez danışmanım tarafından, HEK293 hücrelerinden elde edilen cDNA'dan PZR ile çoğaltılan Hax-1 geni okuma çerçevesinin pCHA plazmit vektöründe EcoRV kesim noktasında klonlanması ile oluşturulmuştur. Hax-1 ve PA proteinleri arasında olası fiziksel etkileşimi araştırmak amacıyla, viral PA genini GST geni ile kaynaşmış (PA-GST ya da GST-PA) halde taşıyan pCAGGS-GST-PA(D), pCAGGS-PA(D)-GST, pCAGGS-GST-PA(W), pCAGGS-PA(W)-GST, plazmit vektörlerinden yararlanılmıştır. Bu vektörlerden kuş tipi influenza virüsü PA proteini taşıyan plazmit vektörler [pCAGGS-GST-PA(D) ve pCAGGS-PA(D)-GST], tez danışmanım tarafından oluşturulmuş, insan tipi influenza PA proteinin taşıyan diğer plazmit vektörler [pCAGGS-GST-PA(W) ve pCAGGS-PA(W)-GST] ise aşağıda açıklandığı şekilde oluşturulmuştur.

pCAGGS-GST-PA(W) ve pCAGGS-PA(W)-GST plazmit vektörlerin oluşturulması

İnsan tipi influenza A/WSN/H1N1 virüsüne ait PA geni, GST geni ile iki farklı oriantasyonda klonlanarak GST-PA ve PA-GST proteinleri kodlayan vektörler oluşturuldu.

pCAGGS-GST plazmit vektörünün ligasyon için hazırlanması:

Viral PA proteinin klonlanacağı noktaya göre farklı primer çiftleri kullanılarak pCAGGS-*GST* plazmit vektörü PZR ile doğrusal hale getirildi (bkz. **5.18.2**). GST-PA kodlayan vektör için pCAGGS-GST plazmiti GST kodlayıcı dizinin bitim kodonundan hemen önce, Tablo 2'de dizileri verilen pCA-Vec-For / GST(Gly)-Rev primerleri kullanılarak; PA-GST kodlayan vektör için ise GST kodlayıcı dizinin başlangıç kodonundan hemen önce GST-For / GST-Vec-Rev primerleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı.

Tablo 2. pCAGGS-GST plazmit vektörünü doğrusal hale getirmek için kullanılan primerler.

Primer adı	Nukleotid dizisi
pCA-Vec-For	AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATGtccagatcctccCAGATCC
GST(Gly)-Rev	GATTTTGGAGGATGGTC
GST-For	ATGGGCTCCCCTATACTAGG
GST-Vec-Rev	GGCGGCGCGAGCTCGAGG

Bunun için 25 ng (1 µl) pCAGGS-GST plazmit DNA'sı, 2 µl (20 pM) pCA-Vec-For e(ya da GST-For), 2 µl (20 pM) GST(Gly)-Rev (ya da GST-Vec.Rev), 4 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 2 µl $MgSO_4$, 4 µl dNTP karışımı (2 mM), 1 µl DMSO ve 1U (1 µl) KOD plus enzimi karıştırılıp deiyonize diztile su ile 30 µl'ye tamamlandı. PZR reaksiyonu 95 °C'de 3 dakika ön denatürasyondan sonra, 30 döngü; 95 °C, 15 saniye- 58 °C, 30 saniye, 68 °C 5 dakika ve bir döngü 68 °C, 10 dakika şeklinde gerçekleştirildi. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

İnfluenza A/WSN/H1N1 virüsüne ait PA geninin PZR ile çoğaltılması

İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinden bir olan PA proteini kodlayan genin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak pCAGGS-PA/WSN (Turan K, 2011) plazmit vektörü, primer olarak ise Tablo 3'de nükleotid dizileri verilen primerler kullanıldı. Primerler PZR öncesi T4 polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendi (bak. **5.19.1**). pCAGGS-GST-PA vektörünün oluşturulmasında kullanılan PA DNA fragmentini "PA-WSN-For / PA-WSN-Rev" primer çifti ile pCAGGS-PA-GST vektörünün oluşturulmasında kullanılan PA DNA fragmeti ise "PA-WSN-For / PA-WSN(Gly)-Rev" primer çiftleri ile çoğaltıldı.

Tablo 3. İnfluenza virüsü PA geninin PZR ile çoğaltılmasında kullanılan primerler.

Primer adı	Nukleotid dizisi

PA-WSN-Rev	CTATCTCAATGCATGTGTGAGGAAG
PA-WSN-For	ATGGAAGACTTTGTGCGACAATGC
PA-WSN(Gly)-Rev	tccagatcctccTCTCAATGCATGTGTGAGGAAG

PZR reaksiyonu 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Bunu için 1 µl (25 ng) kalıp DNA (pCAGGS-PA/WSN), 2 µl (20 pM) ileri primer (PA-WSN(Gly)-For ya da PA-WSN-For), 2 µl (20 pM) geri primer (PA-WSN-Rev ya da PA-WSN(Gly)-Rev), 2 µl $MgSO_4$ (25 mM) 4 µl dNTPs (2 mM), 4 µl KOD plus tamponu deiyonize distile su ile 40 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon karışımına 1 µl (1U) KOD plus DNA polimeraz enzimi eklenerek reaksiyon başlatıldı. PZR reaksiyonu 95 °C sıcaklıkta 3 dakika başlangıç denatürasyonu; 30 tekrardan oluşan 95 °C sıcaklıkta 15 saniye, 56 °C sıcaklıkta 15 saniye, 68 °C sıcaklıkta 2 dakika süreçlerinden oluşan çoğalma döngüsü ve son olarak 10 dakikalık 68 °C sıcaklıktaki final uzamasıyla gerçekleştirildi. Reaksyon sonrası PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. PZR ürünleri fenol:kloroform:izoamialkol ile ektre edildi ve etil alkol ile çöktürüldü (bak**5.19.1**). DNA çökeltisi 15 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA'lar **5.19.1**'de belirtildiği şekilde agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı ve ligasyon deneyinde kullanıldı.

Ligasyon ve transformasyon:

Doğrusal hale getirilen ve saflaştırılan pCAGGS-GST plazmit vektörü ve PA geni DNA fragmentlerinin yaklaşık miktarları her bir örnekten 3 µl agaroz jelde yürütülerek saptandı. "pCA-Vec/For GST(Gly)-Rev" primer çiftleri ile doğrusal hale getirilen pCAGGS-GST plazmiti PA-WSN-Rev/PA-WSN-For primerleri ile çoğaltılan PA geni DNA fragmenti ile; "GST-For/GST-Vec-Rev" primer çiftleri ile doğrusal hale getirilen pCAGGS-GST plazmiti ise "PA-WSN-For/PA-WSN(Gly)-Rev"primerleri ile çoğaltılan PA geni DNA fragmenti ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon için yaklaşık 30 ng (1 µl) pCAGGS-GST plazmiti ve yaklaşık 60 ng (4-6 µl) PA geni DNA fragmenti karıştırıldı ve bunun üzerine eşit hacimde TaKaRa ligasyon kit'i (solüsyon I) eklendi ve 16 °C'a ayarlı PZR cihazında gece boyu reaksiyona bırakıldı. Ligasyon ürünleri **5.19.**1'de belirtildiği şekilde kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Ampisilin içeren LBA katı besiyerinde oluşan

koloniler koloni-PZR ile kontrol edildi ve pozitif sonuç veren kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu yapıldı. DNA örnekleri restriksiyon endonükleazları ile kesilerek ikinci kez kontrol edildikten sonra PEG:NaCl ile kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizlerinde kullanıldı.

5.18.3. Koloni-PZR ile transformant kolonilerin analiz edilmesi

Rekombinat plazmit taşıyan bakteri kolonilerinin ön seleksiyonunda koloni-PZR yönteminden yararlanıldı. Bakteri kolonileri steri kürdan ile 5 µl distile su içerisinde süspanse edildi ve 95 °C sıcaklıkta 5 dakika bekletilerek bakterilerin parçalanması ve plazmitlerin serbest kalması sağlandı. Elde edilen hücre lizatları üzerinden PZR gerçekleştirildi. Koloni-PZR deneylerinde kullanılan primerlerin nükleotid dizileri Tablo 4'de verildi. PZR için, birinin hedef dizisi plazmit vektörü içerisinde diğerinin hedef dizisi klonlanan DNA fragmenti (insert) içerisinde olan primer çiftleri tercih edildi.

Tablo 4. Koloni PZR çalışmalarında kullanılan primerler

Primer adı	Nukleotid dizisi
pCA-1850-Rev	GGGGCTTCATGATGTCCCCATAAT
PA/WSN-664-For	ATCACAGGAACAATGCGCAAGC
pCA-seq-For	GTTCGGCTTCTGGCGTGTGA
PA-WSN-717-Rev	CGGTTCGAATCCATCCACATAG
pU6-seq-For	GATACAAGGCTGTTAGAGAG
Hax-1shRNA1-Rev	AAAAAGGATGACTCGAGATGAAGATGATggacagcacac
Hax-1shRNA2-Rev	AAAAAGTGATCCAGAATCACCAAGACCTggacagcacac

pCAGGS-GST-PA plazmitleri için, PA-WSN-664-For / pCA-1850- Rev primer çifti; pCAGGS-PA-GST plazmitleri için pCA-seq-For / PA-WSN-717-Rev primer çifti; piGENE-U6-Hax-1shRNA1 için pU6-seq For / Hax-1shRNA1-Rev primer çifti; piGENE-U6-Hax-1shRNA2 için ise pU6-seq For / Hax-1shRNA2-Rev primer çifti kullanıldı. Reaksiyon için 5 µl'lik bakteri lizatına, 1 µl (10 pM) ileri primer, 1 µl (10 pM) geri primer, 1 µl dNTP (2mM), 2 µl reaksiyon tamponu (x10), 0,2 µl (1U) standart Taq DNA polimeraz enzimi ve 10 µl deiyonize distile su eklendi. Çok sayıda örnek ile yapılan deneylerde bu bileşenlerin ön-karışımı hazırlandı ve bu karışımdan 5 µl'lik hücre lizatlarına 15 µl eklendi. PZR reaksiyonu 95 °C sıcaklıkta

2 dakika ön denatürasyon, sonra 95 °C sıcaklıkta 15 saniye denatürasyon, 50-55 °C sıcaklıkta 15 saniye bağlanma, 72 °C sıcaklıkta 20-90saniye uzama aşamalarından oluşan 33 döngülük PZR gerçekleştirildi PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Pozitif sonuç veren kolonilerden ileriki aşamalarda kullanılmak üzere küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu yapıldı.

5.18.4. Küçük ölçeklerde plazmit DNA izolasyonu

Koloni-PZR deneylerinde pozitif sonuç veren bakteri kolonilerden küçük ölçekte kültürler hazırlandı. Hücreler 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve bir gece boyunca 37 C'da 150 devir/dakika çalkalama hızında üremeye bırakıldı. Kültürlerden 1-2 ml 7500 devir/dakika hızda, 2 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi Hücre çökeltisi 100 µl plazmit ekstraksiyon tamponu I içinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 200 µl plazmit ekstraksiyon tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Örnekler 5 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra üzerine 200 µl plazmit ekstraksiyon tamponu III eklendi ve karıştırtıldıktan sonra 15 dakika buz üzerinde bekletildi. Örnekler 15000 devir/dakika hızda, 4 °C'da, 15 dakika santrifüj edilerek genomik DNA ve hücresel artıklar çöktürüldü. Üst sıvı, 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı ve eşit hacimde fenol:kloform:izoamil alkol ile ekstre edildi. Yeni bir tüpe aktarılan üst faz 2,5 hacim saf etil alkol ile karıştırıldı ve 5-10 dakika -80 C'da bekletildi. Daha sonra örnekler 15000 devir/dakika hızda, 4 °C'da, 15 dakika santrifüj edilerek plazmit DNA'ları çökeltildi. DNA çökeltileri 1 ml %70 (h/h) etil alkol ile yıkandıktan ve kurutulduktan sonra 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü.

5.18.5. Plazmit DNA'ların restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi

Küçük ölçeklerde hazırlanan plazmit DNA'ları, restriksyon haritaları göz önünde bulundurularak uygun enzimler ile kesildi. Reaksiyonlar 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. 1.5 ml'lik tüp içerisinde 2-3 µl plazmit DNA'sı, 2 µl reaksiyon tamponu (x10), 15-16 µl deiyonize distile su ve 2-3 U (0,2-0,3 µl) restriksiyon enzim(ler)i karıştırıldı ve ortam 37 C'da 1-2 saat süre bekletildi.

Reaksiyon sonrası örnekler 1/5 oranında x6 konsantre jel yükleme tamponu ile karıştırıldı ve agaroz jel elektroforezi ile değerlendirildi.

5.18.6. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile saflaştırılması

TE tamponunda çözülmüş olan DNA örnekleri 5 hacim PEG/NaCl (%20 / 1,25 M) çözeltisi ile karıştırıldı ve buz üzerinde 1 saat bekletildi. Daha sonra örnekler 15000 devir/dakika hızda, 4 °C'da, 20 dakika santrifüj edilerek DNA molekülleri çöktürüldü. DNA çökeltisi 1 ml %70'lik (h/h) etil allkol ile yıkandı ve oda sıcaklığında kurutuldu. Kurutulan DNA örmekleri 50-100 µl TE içerisinde çözündürüldü ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.19. DNA Dizi Analizleri

PEG/NaCl ile kısmi olarak saflaştırılan plazmit vektörlerde klonlanan DNA fragmentlerinin kesin dizileri DNA dizi analizleri ile saptandı. Dizi analizleri için ticari bir şirketten hizmet alımı yapıldı.

5.20. Orta ölçekte plazmit DNA'ların hazırlanması

DNA dizi analizleri sonucu doğrulukları kesinleşen plazmit vektörleri memeli hücre kültüründe kullanılabilecek kalitede orta ölçekte çoğaltıldı. Bunun için plazmit taşıyan bakteriler, ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekildi, 37 °C'da 150 devir/dakika çalkalama hızında 15-16 üretildi.. Hazırlanan ön kültürler 150 ml ampisilinli LB besiyerine aktarıldı ve 16-20 saat süreyle aynı şartlarda inkübe edildi. Plazmit DNA'larının elde edilmesinde ticari kit (Qiagen, Cat No./ID: 12145) kullanıldı. Ekstraksiyon ve saflaştırma işlemlerinde üretici şirketin önerdiği yöntem izlendi. Elde edilen plazmit DNA örnekleri 750 µl TE tamponunda çözdürüldü. DNA örneklerinin konsantrasyonları ve kaliteleri 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrik ölçümler alınarak saptandı. Plazmit DNA örnekleri -20 °C sıcaklıkta derin dondurucuda saklandı.

5.21. Plazmit DNA'ların memeli hücrelerine aktarılması (transfeksiyon)

Plazmit DNA'larının HeLa hücrelerine transfeksiyonunda polietilenimin (PEI) (Reed ve ark., 2006), HEK293 hücrelerinin transfeksiyonunda ise HEK293fectin

(Invitrogen) kullanıldı. Hücreler deneyin amacına göre 6-kuyulu ($2\text{-}5\times10^5$ hücre/kuyu) ya da 12-kuyulu ($1\text{-}2.5\times10^5$ hücre/kuyu) kültür plaklarına ekildi ve 20-24 saat boyunca standart kültür koşullarına üremeye bırakıldı. Altı kuyulu plaklarda üretilen hücreler her bir kuyu için 2-3 µg DNA, 12-kuyulu plaklarda üretilen hücreler için ise 1-2 µg DNA kullanıldı. Plazmit DNA'sı Opti-MEM (Gibco) 20 ng/µl konsantrasyona seyreltildi. 20 µg/µl konsantrasyonda deiyonize distile su içerinde hazırlanan polietilenimin çözeltisi Opti-MEM içerisinde 40-50 ng/µl konsantrasyonda seyreltilerek DNA çözeltisi ile eşit hacimlerde karıştırıldı. DNA/PEI komplekslerinin oluşması için örnekler oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletildi. Kültürlerin besiyerleri taze besiyerleri ile değiştirildi ve DNA/PEI kompleksleri besiyerlerine eklendi. HEK293 fectin ile gerçekleştirilen transfeksyon deneylerinde, her bir µg DNA için 3 µl HEK293 fectin kullanıldı. HEK293 fectin Opti-MEM içerisinde 1/20 oranında seyreltildi ve seyreltilmiş DNA çözeltisi ile uygun oranlarda karıştırıldı. Oda sıcaklığında 15-20 dakika bekletilen örnekler kültür ortamlarına eklendi. Transfeksiyondan sonra kültürler 45-48 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi ve sonrasında Western melezleme ya da immünfloresan deneylerinde kullanıldı.

5.22. Ekspresyon Vektörlerine Klonlanan Genler Tarafından Kodlanan Proteinlerin Western Melezleme Tekniği ile Analizi

Yukarıda ayrıntılı olarak anlatıldığı gibi pCHA ve pCAGGS-GST vektörlerine klonlanan insan Hax-1 geni ve influenza virüsü PA geninin memeli hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadığı ve bu genlerin ekpresyon düzeyleri Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Bu deneylerde trasnfeksiyon etkinliği yüksek olan HEK293 hücreleri kullanıldı.

5.22.1. HEK293 hücrelerinin plazmit DNA'lar ile trasnfekte edilmesi ve hücre lizatlarının hazırlanması

HEK293 hücreleri DMEM-HG(+) içeren 6-kuyulu plaklara ekildi (5×10^5 hücre/kuyu) ve 20 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi. Daha sonra hücreler yukarıda (**5.22**) anlatıldığı gibi HEK293 fektin kullanılarak Hax-1 ya da GST ile füzyon halinde PA proteinin kodlayan plazmit DNA'lar ile transfekte edildi.

Kırksekiz saatlik inkübasyon sonrası hücreler T-FTS ile yıkandı ve hücreler amaca göre 500 µl RIPA tamponu ya da 500 µl x1 konsantre SDS örnek yükleme tamponu içerisinde bir silikon sıyırıcı yardımıyla toplandı. Hücre lizatları 10-15 defa insülin iğnesinden (*4mm x 32G*) geçirildi ve sonrasında 15000 devir/dakika hızda 4 C'da 5 dakika süreyle santrifüj edilerek istenmeyen artıklar çöktürüldü. SDS örnek tamponunda hazırlanan lizatlar direkt olarak jele uygulandı. RIPA tamponunda hazırlanan lizatlar ise 3:1 oranında SDS örnek tamponu ile karıştırılarak poliakrilamid jel yüklendi.

5.22.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve proteinlerin jelde yürütülmesi

Protein elektroforez işleminde 10x10 cm ya da 10x20 cm boyutlarında ve 1 mm kalınlığında poliakrilamid jeller kullanıldı. Jeller %10'luk ayırma ve %6'lık paketleme jeli halinde iki kısım olarak hazırlandı. Jel kasetlerine ilk olarak %10'luk ayırma jeli döküldü. Bunun için 50 ml'lik falkon tüpü içerisinde 4 (8) ml %30'luk akrilamid çözeltisi, 3 (6) ml 4x konsantre ayırma jel tamponu, 5 (10) ml deiyonize distile su, 50 (100) µl %10'luk APS çözeltisi ve 20 (40) µl TEMED karıştırıldı. Çözelti hazırlanan kasetlere döküldü ve üzerlerine 0,5 (1) ml deiyonize distile su eklendi. Polimerizasyon tamamlanana kadar beklendi ve üzerine eklenmiş olan deiyonize distile su enjektörle çekilerek uzaklaştırıldı. Bu aşamadan sonra %6'lık paketleme jeli hazırlandı. ,Bunun için 15 ml'lik falkon tüpünde 1 (2) ml %30'luk akrilamid çözeltisi, 1.25 (2,5) ml 4x paketleme jel tamponu, 2.75 (5,5) ml deiyonize distile su, 20 (40) µl %10'luk APS çözeltisi ve 7,5 (15) µl TEMED karıştırılarak ayırma jeli üzerine döküldü. Daha sonra taraklar yerleştirilerek jel polimerizasyona bırakıldı. Kasetler tris-glisin elektroforez tamponu içeren tanka yerleştirildi. Yukarıda belirtildiği şekilde (**5.24.1**) hazırlanan lizatlar 5 dakika 95 C'da suda bekletildikten sonra 5-20 µl/cep olacak şekilde jele yüklendi. Elektroforez işlemi 80 (100) volt gerilim altında 30 dakika, sonrasında 120 (180) volt sabit gerilim altında 1 saat 30 dakikada tamamlandı.

5.22.3. Proteinlerin nitroselüloz membrana transfer edilmesi ve görüntülenmesi

Proteinlerin nitroselüloz membrana transferi için transfer sandviçi hazırlandı bunun için transfer kasetleri arasında; sünger – filtre kâğıdı – membran – jel – filtre

kâğıdı – sünger sırası ile tranfer sandviçi hazırlandı. Kasetler, membranın olduğu taraf pozitif elektrod yönünde olacakşekilde transfer tamponu içeren tanka yerleştirildi. Transfer işlemi 30 dakika 45 volt ve bunu takip eden 1 saat 30 dakika boyunca 90 volt sabit gerilim altında gerçekleştirildi. Transfer işlemi sonrası membranlar en az 1 saat süre ile bloklama çözeltisinde bekletildi. Bloklama işlemi sonrası membranlar bloklama çözeltisi içerisinde 1:500 - 1:1000 oranlarında seyreltilen proteinlere özgü birincil antikorlar ile 15-16 saat süre ile muamele edildi. Sonrasında membranlar en az üç kez 20 dakika süre ile TBS-T tamponu ile 100 devir/dakika hızda bir karıştırıcıda karıştırılarak yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranlar TBS tamponunda 1/3500 oranında seyreltilen HRP bağlı ikincil antikorlar ile 30 dakika muamele edildi TBS-T ile en az üç kez yıkandı. Membranlar son bir kez TBS tamponunda ile yıkandıktan sonra ilgili proteinler kemilüminesens substrat (Invitrogen, WP20005 ya da H&C,RPN2232) ile görüntülendi. Görüntülemede kemilüminesens tarayıcı cihaz (C-DiGit Blot Scanner, LI-COR) kullanıldı.

5.23. Ekspresyon Vektörleri Üzerinden Kodlanan Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Saptanması

Plazmit vektörler üzerinden kodlanan insan Hax-1 proteininin ve GST ile füzyon halinde PA proteinlerinin ya da influenza virüsü ile enfekte hücrelerde viral PA proteinin lokalizasyonlarının saptanmasında immünfluoresan tekniklerden yararlanıldı. Bu deneylerde HeLa kullanıldı. HeLa hücreleri steril 9 mm çapında lameller yerleştirilmiş olan 12 kuyulu plaklara ekildi ($2{,}5 \times 10^5$ /kuyu) ve 20-24 saat boyunca standart kültür koşullarında inkübe edildi. Hücreler, **5.22**'de belirtildiği şekilde PEI aracılığı ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 45-48 saat sonra hücreler immünfluoresan testlerinde kullanıldı. Virüs ile enfekte hücrelerde PA proteini analizi için, lameller üzerinde üretilen HeLa hücrleri influenza A/WSN/H1N1 ya da A/Duck/Pen/H5N2 ile enfekte edildi ve enfeksiyondan 10 saat sonra hücreler immünfluoresan testinde kullanıldı.

Plazmit ile transfeksiyon ya da virüs ile infeksiyon sonrasında lameller üzerinde üretilen hücreler 5 dakika süre ile 2 defa 1 ml T-FTS içerisinde bekletilerek yıkandı. Yıkama sonrasında hücreler 0,5 ml %3 paraformaldehit çözöeltisinde 15 dakika

bekletilerek fikse edildi. Paraformaldehit çözeltisi uzaklaştırıldı ve hücreler tekrar 1 ml T-FTS ile yıkandı. Daha sonra hücreler 750 µl %0,1 NP-40 içerisinde 15 dakika bekletilerek antikorlar için geçirgenlikleri arttırıldı. Ardından 1 ml T-FTS ile 5 dakika yıkandı ve T-FTS içerisinde hazırlanmış 0,5 ml %1'lik yağsız süt tozu çözeltisi içinde 30 dakika bekletildi. Sonrasında hücreler %1'lik yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde 1/250-1/500 oranlarında seyreltilen birincil antikorlar ile 1 saat süre ile muamele edildi ve 3 kez 1 ml T-FTS ile 5 dakika yıkandı. -Hücreler %1'lik yağsız süt tozu çözeltisi içersinde 20 dakika bekletildi ve arkasından 1 saat süre ile, 1:250 oranında seyreltilen FITC ya da Rhodamin konjuge ikincil antikorlar ile muamele edildi. Son olarak hücreler tekrardan 3 defa 5 dakika süre 1 ml T-FTS ile yıkandılar. Yıkma sonrasında üzerinde hücre bulunan lameller 2-3 µl kapatma çözeltisi eklenmiş olan lam üzerine kapatıldı. Lamellerin etrafına şeffaf oje sürüldü ve proteinler DP72 soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olympus: BH40) altında görüntülendi.

5.24. HeLa Hücrelerinin Hax-1 Genine Özgü siRNA ile Trasnfeksiyonu, Hücrelerde Hax-1 Transkript Düzeyinin Saptanması ve Hücrelerin Virüs ile İnfekte edilmesi

Hax-1 geni tarnskript düzeyi düşürülen hücrelerde influenza virüsü replikasyonunun nasıl etkilendiğini saptamak amacıyla bu deneyler gerçekleştirildi.

5.24.1.HeLa hücrelerinin Hax-1 genine özgü siRNA ile transfeksiyonu

Hücrelerdeki Hax-1 geni transkript düzeyini düşürmek için (knock down)HeLa hücreleri Hax-1 genine özgü siRNA ile transfekte edildi. Bunun için 20 pMol (1 µl) Hax-1 siRNA'sı (10620318,Life Technology) 125 µl Opti-MEM içerisinde seyreltildi ve aynı hacimde seyreltilen 3 µl RNAi-max (13778075-Invitrogen) ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 15 dakika bekletildi. Kontrol için aynı şekilde hazırlanan negatif kontrol siRNA (sc-37007, Santa Cruz) kullanıldı. DMEM-LG (+) besiyerinde üretilen hücreler tripsin-EDTA çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi ve 1000 devir/dakika hızda, 5 dakika santrifüj edilerek çökeltilidir. Hücreler Opti-MEM içerisinde süspanse edildi ve Thoma lamı ile mililitredeki hücre sayısı belirlendi. Hücreler 5×10^5 hücre/ml olacak şekilde Opti-MEM içerisinde seyreltildi.

Bu hücre süspansiyonunda 0,5 ml (5×10^5) 2 ml'lik plastik tüplere aktarıldı ve üzerine siRNA/ RNAi-max karışımı eklendi. Tüplerdeki hücre süspansiyonları 37 ºC'da düşük hızda 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra hücreler her bir kuyusunda 3 ml DMEM-LG(+) içeren 6-kuyulu plaklara aktarıldı ve standart kültür koşullarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyonun 24. saatinde besiyerleri taze besiyerleri ile değiştirildi ve 48 saat süre daha inkübasyona devam edildi. Daha sonra hücreler tripsin-EDTA ile süspansyon haline getirildi ve Thoma lamı ile hücre sayıları belirlendi. Her bir hücre örneğinden $5x10^5$ sayıda hücre RNA ekstraksiyonu için ayrıldı, kalan hücreler influenza virüsü infeksiyonunda kullanıldı.

5.24.2.siRNA ile transfekte edilen hücrelerden RNA izolasyonu ve Hax-1 transkript düzeyinin saptanması

Yukarıda belirtildiği şekilde siRNA ile transfekte edilen hücrelerden $5x10^5$ hücre 1000 devir/dakika hızda 5 dakika süre ile santrifüj edilerek çöktürüldü ve 200 µl T-FTS içerisinde süspanse edildi. Aynı sayıda transfekte olmamış HeLa hücresi kontrol amaçlı hazırlandı. Hücrelerden total RNA izolasyonunda ticari RNA ekstraksiyon kiti (Roche Cat. No. 11 828 665 001) kullanıldı. RNA izolasyonunda üretici şirketin önerdiği yöntem izlendi. Bunu göre 200 µl hücre süspansiyonuna 400 µl Liziz-bağlanma çözeltisi eklendi ve vorteks cihazı ile iyice karışmaları sağlandı. Karışım kitin kolonuna alındı ve 5k rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra kolona DNAz çözeltisi eklendi ve 15 dakika bekletilip 5k rpm hızda 1 dakika santrifüj edildi. Daha sonra kolon yıkama çözeltileri ile yıkandı ve son aşamada RNA'lar elüsyon tamponu ile geri kazanıldı.

Son aşamada RNA molekülleri 30 µl TE ile geri kazanıldı. RNA örneklerinin konsantrasyonları ve kalitesi spektrofotometre ile ölçülerek saptandı ve reverz (ters) transkripsiyonda kullanılmak üzere -80C'da saklandı.

Hücrelerden izole edilen total RNA içerisinde Hax-1 transkript düzeyini saptamak için reverz transkripsiyon-polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) tekniğinden yararlanıldı. Bunu için, 500 ng total RNA üzerinden oligo dT primerler kullanılarak cDNA'lar elde edildi. Reaksiyon karışımları 0,2 ml PZR tüplerinde aşağıda şekilde hazırlandı:

Total RNA *: 2-5 µl (500 ng)*
Olgo dT primer (50 pM/µl) *: 0,4µl*
Nükleaz içermeyen distile su *: 5-8 µl*
Total hacim *: 10 µl*

Örnekler 95 C'da 10 dakika denatürasyon için bekletidikten sonra buz üzerine alındı ve üzerine aşağıdaki karışım eklendi.

dNTP karışımı (10 mM) *: 4 µl (500 ng)*
Reaksiyon tamponu (x5) : 4 µl
RNanz inhibitörü (40U/µl) *: 1 µl*
Reverz Transkriptaz (20 U/µl) *: 1 µl*

Örnekler reverz transkripsyon reaksiyonuiçin 45 dakika 45 ºC'da tutuldu. Sonrasında enzimler 5 dakika 70°C'da inaktive edildi ve elde edilen cDNA'lar PZR'unda kalıp olarak kullanıldı.

Hazırlanan cDNA'larda Hax-1 transkript düzeyi semi-kantitatif PZR ile belirlendi. 5'-GGTCTTGGAGAGTGATGCAA-3'(Hax-1-428-For) ve 5'-CGGGTTACTGTAGTCTCTGT-3'(Hax-1-725-Rev) primerleri ve cDNA'lar kullanılarak aşağıdaki karışım hazırlandı.

PZR karışımı:
cDNA *: 2 µl*
*10 pM/µl ileri Primer (*Hax-1-428-For) *: 2 µl*
*10 pM/µl geri Primer (*Hax-1-725-Rev)*: 2 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM) *: 2 µl*
MgCl (25 mM) *: 4 µl*
Reaksiyontamponu (x10 konsantre) *: 4 µl*
Deiyonize distile su *: 24 µl*
Standart Taq polimeraz (5U/µl) *: 0,2 µl*
Toplam hacim *: 40 µl*

PZR, 95 °C sıcaklıkta 2 dakikalık ön denatürason sonrasında, 95 °C'da 15 saniye, 53 °C'da 15 saniye ve 72 °C 20 saniye şeklinde 30 döngü halinde gerçekleştirildi. PZR cihazı 20., 22., 24., 26. ve 28. döngülerde bağlanma aşamalarında durdurularak 3'er *µl* örnek alındı ve bu örnekler doğal poliakrilamid jeller üzerinde yürütülerek miktar olarak karşılaştırıldı ve Hax-1-725-Rev primerleri

ile PZR yapıldı. Bu PZR esnasında 95 °C sıcaklıkta 2 dakikalık başlangıcı takiben 30 döngüden oluşan 95 °C 15 saniye, 53 °C 15 saniye ve 72 °C 20 saniyeden oluşan çoğaltma fazlı ve son olarak 72 °C 2 dakikalık son uzama ile PZR tamamlandı. Bu reaksiyonlar esnasında 20, 22, 24, 26, 28 ve 30'uncu döngülerde sistem durdurularak birer örnek alınarak çoğalma miktarları karşılaştırıldı.

5.24.3. siRNA ile trasnfekte edilen hücrelerin influenza virüsleri ile enfekte edilmesi ve viral proteinlerin Western melezleme ile analizi

Hax-1 geni siRNAlar ile susturulan (bak. **5.25.1**) HeLa hücreleri 12 kuyulu plaklara $1x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 20 saat standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen 1 ml DMEM-LG(-) besiyeri ile üç kez yıkandı. Hücrelere %1 BSA içeresinde 1-2 moi (*İng.multiplicity of infection*) titresinde olacak şekilde seyreltilen virüs örneklerinden 250 *µl* eklendi. Plaklar 5 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C'da virüslerin tutunması için bekletildi. Virüs süspansiyonu uzaklaştırıldı ve hücreler bir kez 1 ml DMEM-LG(-) besiyeri ile yıkandı. Sonrasında hücrelere 2 ml DMEM-LG(+) besiyeri eklendi ve infeksiyondan 6 saat sonra hücreler, Western melezleme ile viral proteinlerin analizi için hazırlandı.

5.25. HEK293 Hücrelerin HA-Hax-1 Proteini ve Hax-1 shRNA Kodlayan Plazmit Vektörler ile Kalıcı (Stable) Transfeksiyonu

Hax-1 geni anlatımını kalıcı olarak arttırmak ya da Hax-1 genine özgü shRNA kodlayan, dolayısıyla Hax-1 transkript düzeyini kalıcı olarak baskılamak ve bu hücrelerde influenza virüsü replikasyonunun seyrini araştırmak amacıyla plazmitler kalıcı olarak HEK293 hücrelerine aktarıldı. Bunun için daha önce anlatıldığı gibi (bak. **5.19.1**)oluşturulan shRNA ve HA-Hax-1 kodlayan plazmit vektörler kullanıldı. Plazmit DNA'larını kalıcı olarak genomuna katan hücreler puromisin antibiyotiği ile seçildi. HEK-293 hücreleri 3 ml D'MEM HG (+) besiyeri içeren 6 kuyulu plaklara (5×10^5 hücre/kuyu) ekildi ve standart kültür koşullarında 24 saat üremeye bırakıldı. Hücreler **5.22**'de verildiği gibi HEK293 fectin kullanılarak 2,5 µg plazmit DNA'sı ile transfekte edildi. HA-Hax-1 kodlayan stabil hücreler için yapılan transfeksiyon deneyinde, 2,25 µg pCHA-Hax1 ve seleksiyon için 1/10 oranında (0.25 µg) pCAGS-

Puro plazmit karışımı kullanıldı. piGENE-U6-Puro plazmiti yapısında puromisin direnç geni taşıdığı için ikinci bir plazmite gereksinim duyulmadı. Transfeksiyondan 24 saat sonra seleksiyonu sağlaması için besiyeri 0,5 - 2 µg/ml puromisin içeren 3 ml taze D'MEM HG (+) ile değiştirildi. Kültürün besiyerleri ortalama 3-4 gün ara ile antibiyotik içeren taze besiyerleri ile değiştirildi. Bu işlem puromisine dirençli koloniler belirgin olarak oluşana kadar devam ettirildi (yaklaşık 2 hafta). Dirençli hücreler Tripsin:EDTA etkisiyle süspansyon hale getirildi ve puromisn içeren besiyerleri içere 6 cm'lik petrilerde 2-3 gün inkübe edildi. Sonrasında hücreler tekrar tripsin:EDTA ile süspansyon haline getirildi, az miktarda hücre 2-3 hücre/100 µl besiyeri olacak sekilde seyreltilerek 96-kuyulu plaklara aktarıldı (100 µl/kuyu). Kalan hücreler %10 DMSO içeren fetal calf serum içinde -80 °C sıcaklıkta saklandı. 96-kuyulu plaklara ekilen hücreler standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Plaklar mikroskop ile kontrol edilerek tek hücreden gelişen kolonilerin olduğu kuyular işaretlendi ve tripsin:EDTA ile süspanse edilip 24 kuyulu plaklara aktarıldılar. Buradan çoğaltılan hücreler, deneylerin sonraki kontrol aşamalarında kullanılmak üzere %10 DMSO içeren fetal calf serum içerisinde -80 °C sıcaklıkta saklandı.

5.26. Kalıcı Transfekte Edilen Hücrelerin Kontrolü

piGENE-Hax-1shRNA1 ve piGENE-Hax-1shRNA2 plazmitleri ile kalıcı olarak transfekte edilen hücreler, her hangi bir protein kodlamadıkları için genomik DNA ile gerçekleştirilen PZR ile kontrol edildi. pCHA-Hax1 ile transfekte edilen hücreler ise, bu hücrelerden hazırlanan lizatların Western melezleme ile analiz edilmesi ile kontrol edildi.

5.26.1. shRNA kodlayıcı plazmitler ile kalıcı olarak transfekte hücrelerden genomik DNA izolasyonu ve PZR

shRNA'lar için kalıcı olarak transfekte edilen hücreklonlarından genomik DNA izolasyonu yapıldı. Genomik DNA izolasyonu için ticari kit kullanıldı (Roche, 1814770). Yöntem olarak üretici şirketin önerdiği yol izlendi. İzole edilen genomik DNA üzerinden PZR reaksiyonu gerçekleştirildi.5'-GATACAAGGCTGTTAGAGAG-3'dizisine sahip ileri primer (HU6-seq-For) ve 5'-

TGTGGATAACCGTATTACCG-3' dizisine sahip geri primer (HU6-rev-cont) çifti kullanılarak aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı. . PZR reaksiyonu 95 °C'de 3 dakika ön denatürasyondan sonra, 30 döngü; 95 °C, 15 saniye - 55 °C, 30 saniye - 72 °C, 30 saniye ve bir döngü 72 °C, 2 dakika şeklinde gerçekleştirildi. PZR ürünleri, agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi

5.26.2. pCHA-Hax1 ile kalıcı transfekte klonların kontrol edilmesi

Kalıcı olarak H-Hax-1 kodlayan hücre klonlarının kontrolü Western melezle tekniği ile yapıldı. 12-kuyulu plaklarda %80-90 doygunlukta üretilen hücreler SDS-örnek tamponunda parçalandı ve **5.23** belirtildiği şekilde SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Plazmit üzerinden kodlanan H-Hax-1 proteini hemaglutinin uzantısı taşıdığı için, görüntülemede birincil antikor olarak anti-HA antikorları kullanıldı.

5.27. Hax-1 Proteininin HEK293 Hücrelerinde İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Olan Etkisinin Mini Replikon Modeli ile İncelenmesi

HEK293 hücreleri 24 kuyulu plaklara kuyu başına 10^5 hücre olacak şekilde ekildi. Ekim sonrası hücreler 20-24 saat süre ile standart kültür koşullarında inkübe edildiler. İnkübasyon sonrasında kültürler **5.21**'de gösterildiği şekilde transforme edildiler. Transformasyonda ekspresyon vektörleri olarak *pCAGGS*-PB2/WSN, *pCAGGS*-PB1WSN, *pCAGGS*-PA/WSN, *pCAGGS*-NP/WSN, *pCAGGS*-PB2/DkP, *pCAGGS*-PB1/DkP, *pCAGGS*-PA/DkP, *pCAGGS*-NP/DkP, pHMP1-vNS-luc, pCHA-Hax1 ve pCHA plazmitleri kullanılmıştır. Transformasyonda kullanılan plazmitler daha önceden başka bir proje kapsamında danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan tarafından oluşturulmuştur. Plazmitlerin kullanım oranları **Tablo 5**'te verilmiştir.

Tablo 5. Minireplikon çalışmalarında kullanılan plazmitlerin miktarları (ng/kuyu)

Plazmit	Miktar (ng/kuyu)
pHMP1-vNS-luc	50
pRL	2
pCAGGS-PB2/WSN	1
pCAGGS-PB2/WSN	1
pCAGGS-PA/WSN	1
pCAGGS-NP/WSN	50
pCHA-Hax1	0-200
pCHA	0-200
Toplam	**305**
pHMP1-vNS-luc	50
pRL	2
pCAGGS-PB2/DkP	10
pCAGGS-PB2/DkP	10
pCAGGS-PA/DkP	10
pCAGGS-NP/DkP	50
pCHA-Hax1	0-200
pCHA	0-200
Toplam	3**32**

Transfeksiyon sonrası hücreler 48 saat süre ile standart kültür koşullarında inkübe edildiler, inkübasyon sonrası hücrelerde lusiferaz aktivitesi kontrolü yapıldı. Bu amaç ile ticari kit (Roche) kullanıldı. Hücreler T-FTS ile yıkandı ve 100 µl liziztamponunda parçalandı. Hazırlanan hücre lizatından 5 µl alınarak 25 µl lusiferaz substratıüzerine eklendi ve bir lüminometre ile 5 saniye süre ile ölçümler alındı. Alınan sonuçlar karşılaştırıldılar.

5.28. Hax-1 ve İnfluenza PA Proteini Arasındaki Olası Fiziksel İlişkinin GST ile Çöktürme Yöntemi ile Araştırılması

GST ile çöktürme testleri hem geçici olarak plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücreleri hem de Hax-1 geni ile kalıcı olarak transfekte edilen HEK293 hücreleri (HEK293/H-Hax-1) ile gerçekleştirildi. Geçici olarak transfeksiyon için HEK293 hücreleri 6-kuyulu plaklara eklidi ($5x10^5$ hücre/kuyu) ve 24 saat inkübasyondan sonra transfekte edildi. Plazmitlerin transfeksiyonu **5.22** de belirtildiği gibi PEI ile gerçekleştirildi. Hücreler 2 µg H-Hax-1 kodlayan plazmit ve 1 µg GST ile füzyon halinde PA kodlayan plazmit (ile pGST-PA/WSN, pPA-GST/WSN, pGST-PA/DkP ya da pPA-GST/DkP) ile birlikte transfekte edildi. HEK293/H-Hax-1 hücreleri de aynı şekilde 6-kuyulu plaklarda üretildi ve H-Hax-1 kodlayan plazmit kullanılmadan sadece 2 µg GST ile füzyon halinde PA kodlayan plazmitlerden biri transfekte edildi. Transfeksiyondan sonra hücreler 48 saat süre üremeye bırakıldı ve sonrasında hücreler RIPA tamponu içerisinde toplandı. Örnekler 10-15 defa insülin iğnesinden (*4mm x 32G*) geçirildi. Hazırlanan hücre lizatları 15000 rpm hızda 4 °C sıcaklıkta 15 dakika santrifüj edildi. Santrifüj sonrası üst sıvı glutatyon-sefaroz boncuklar ile çöktürme amacıyla kullanıldı(İbişoğlu, 2015). Bunun için 0,5 ml'lik plastik tüplere 150 µl hücre lizatı ve 30 µl liziz tamponu içerisinde 1:1 oranında karıştırılan glutatyon-sefaroz boncukları eklendi. Örnekler 4 °C sıcaklıkta 2 saat boyunca dikey tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Daha sonra örnekler 4 °C sıcaklıkta 15000 rpm hızda 3 dakika santrifüj edildi ve boncuklar liziz tamponu içinde süspanse edilip 4 °C sıcaklıkta 5 dakika boyunca dikey tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Son işlem 3 defa tekrar edildi. Son yıkama işleminden sonra çökeltiye 50 µl 2x SDS-Örnek tamponu eklendi ve süspanse edildi. Örnekler 5 dakika kaynar suda bekletilip 15000 rmp hızda 15 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı Western melezleme yöntemi ile incelendi.

6. BULGULAR

Bu çalışmada influenza A virüs RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinden PA proteini ile ilişkilendirilen insan hücrelerine özgü Hax-1 proteinin, influenza virüsü patogenezine etkileri moleküler düzeyde değerlendirildi. Bu kapsamda, hücresel Hax-1 proteini ekspresyon düzeyi RNA interferens tekniklerinden yararlanılarak düşürüldü ve bunun farklı influenza virüs replikasyonlarına etkileri araştırıldı. Diğer taraftan, insan Hax 1 geni bir memeli ekspresyon vektörüne klonlandı ve oluşturulan vektör hücrelere transfekte edilerek, hücrelerde Hax-1 protein düzeyi yapay olarak arttırıldı. Hax-1 protein düzeyi arttırılan hücrelerde viral replikasyonun seyri analiz edildi. İnsan ve kuş tipi influenza virüslerinin kullanıldığı bu çalışmada, Hax-1 proteinin farklı virüslerin replikasyonları üzerinde benzer etkileye sahip olup olmadığı sorusuna yanıt arandı.

Hücre içerisinde sentez edilen endojen Hax-1 protein ekspresyon düzeyini RNA interferens teknolojilerinde yararlanarak düşürmek (*İng. knock down*) için iki farklı stateji izlendi. Birincisi, bu gene özgü dizayn edilen shRNA dizileri piGENE-puro plazmit vektörüne klonlandı ve bu vektörler hem geçici (İng. traciently transfection) hem de kalıcı olarak transfekte (İng. satably transfection) edilerek hücelerde Hax-1 transkript düzeyi azaltıldı. İkilncisi, memeli hücreleri ticari olarak satın alınan Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edildi ve Hax-1 transkripsiyonu inhibe edildi. Bu hücrelerde influenza viral replikasyonunun seyri izlendi. Bu çalışmalar ek olarak, insan Hax-1 proteinin influenza virüsü PA proteini ile fiziksel bir etkileşim gösterip göstermediği glutatyon S-transferaz ile çöktürme ve birlikte immün çöktürme teknikleri ile de test edildi.

6.1. Hax-1Genine Özgü shRNA'ların piGENE-PURO Plazmitine Klonlanması ile İlgili Bulgular

Hax-1 geni transkripsiyonunun susturulmasında yararlanılacak shRNA dizileri bu gene özgü aşağıda verilen referans cDNA dizisinden yararlanılarak belirlendi. Bu genin susturulmasında etkili olabilecek dizilerin saptanmasında **5.19.1**'da belirtildiği gibi internet üzerinden çevrimiçi bir shRNA tarama programı kullanıldı.

İnsan Hax-1 (HCLS1 associated protein X-1) geni, varyant 1 cDNA'sı (NCBI – NM_006118.3):

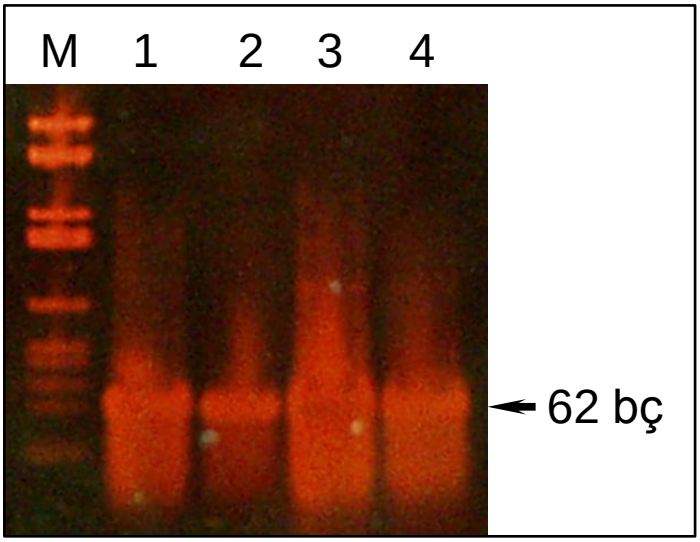
ACGTCCGGCTTACCGTCGTTTACGACAGTGTCAGGATCGCGGGCTTGCTTTCCGGTA
GCGTGGGCTGACGCCTCGCTCAATTTCTCACAGGGCTGCGCAGGTTTCCCCCGTCTG
CGAATGGACCACTGGAGGGGTTCAAAGGTTCGCGTCCCAGTACGGGAATGAGCCTCT
TTGATCTCTTCCGGGGCTTTTTCGGCTTTCCTGGACCTCGGAGCCACAGAGATCCCT
TTTTTGGAGGGATGACTCGAGATGAAGATGATGATGAGGAAGAAGAAGAAGAAGGGG
GCTCATGGGGCCGTGGGAACCCAAGGTTCCATAGTCCTCAGCACCCCCCTGAGGAAT
TTGGCTTCGGCTTCAGCTTCAGCCCAGGAGGAGGGATACGTTTCCACGATAACTTCG
GCTTTGATGACCTAGTACGAGATTTCAATAGCATCTTCAGCGATATGGGGGCCTGGA
CCTTGCCTTCCCATCCTCCTGAACTTCCAGGTCCTGAGTCAGAGACACCTGGTGAGA
GACTACGGGAGGGACAGACACTTCGGGACTCAATGCTTAAGTATCCAGATAGTCACC
AGCCCAGGATCTTTGGGGGGGTCTTGGAGAGTGATGCAAGAAGTGAATCCCCCCAAC
CAGCACCAGACTGGGGCTCCCAGAGGCCATTTCATAGGTTTGATGATGTATGGCCTA
TGGACCCCCATCCTAGAACCAGAGAGGACAATGATCTTGATTCCCAGGTTTCCCAGG
AGGGTCTTGGCCCGGTTCTACAGCCCCAGCCCAAATCCTATTTCAAGAGCATCTCTG
TGACCAAGATCACTAAACCAGATGGGATAGTGGAGGAGCGCCGGACTGTGGTGGACA
GTGAGGGCCGGACAGAGACTACAGTAACCCGACACGAAGCAGATAGCAGTCCTAGGG
GTGATCCAGAATCACCAAGACCTCCAGCCCTGGATGATGCCTTTTCCATCCTGGACT
TATTCCTGGGACGTTGGTTCCGGTCCCGGTAGCCTTGTTAACCCTCAGAGGCCTTCA
AGTCCTTTCCACCTCTCACCCATTGCCCACCATTAATAAGCTTAGCTTCTCTTGCCA
CCTCAGGGGCTTGGATATGTGGAATAGTGAACTGGGGCCATGTCAGTTTGTCACTCA
CCCAAACTGACCAATAAAACCTTTATTTATGCTAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA

Belirlenen bu dizilerden, biri mavi ile işaretlenen, genin başlangıç kodonuna yakın olan (shRNA-1) ve diğeri genin bitiş kodonuna yakın olan (shRNA-2) bölgeleri seçildi. Bu dizilerin piGENE-puro plazmiti üzerinden, U6 promotoru kontrolünde, saç tokası şeklini alacak çift zincirli RNA şeklinde kodlanabilmesi için aşağıdaki diziler tasarlandı.

İnsan Hax-1 genine özgü shRNA molekülleri kodlayacak DNA dizileri:

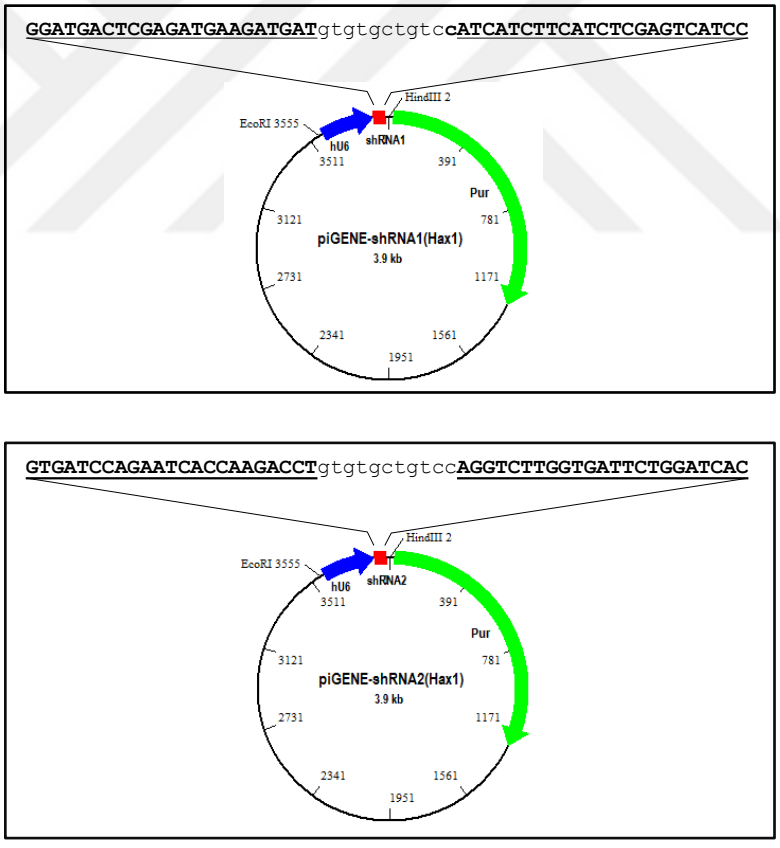
Hax-1 shRNA-1 için: **GGATGACTCGAGATGAAGATGATgtgtgctgtccATCATCTTCATCTCGAGTCATCCttttt**
Hax-1 shRNA-2 için: **GTGATCCAGAATCACCAAGACCTgtgtgctgtccAGGTCTTGGTGATTCTGGATCACttttt**

Bu diziler Metod kısmında (**5.19.1**) belirtildiği şekilde sentetik oligonüleotid primer çiftleri üzerinden Klenow enzimi kullanılarak sentez edildi.Elde edilen çift zincirli DNA dizileri %2'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi. Elde edilen veriler sonucundaDNA fragmentlerinin boyutlarının istenilen büyüklükte olduğu tespit edildi (**Şekil 10**).



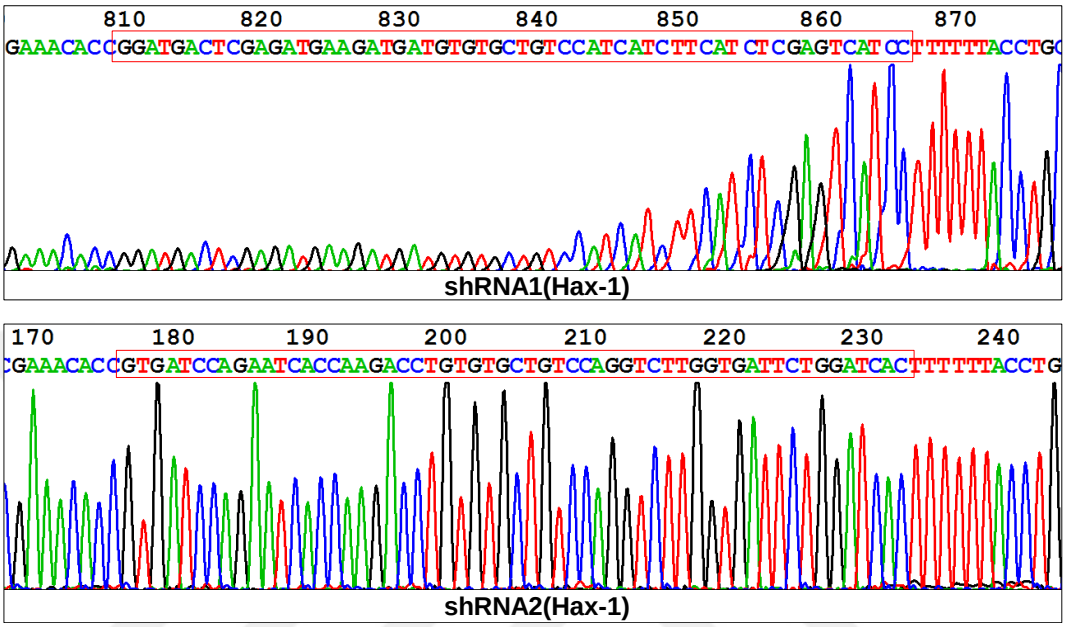
Şekil 10. Fosforillenmiş oligonükleotid primer çiftleri kullanılarak Klenow enzimi ile sentez edilen, insan Hax-1 genine özgü shRNA kodlayan çift zincirli DNA molekülleri. DNA molekülleri %2'lik agaroz jel ile analiz edildi.**1** ve **2**, Hax-1 geni shRNA-1 kodlayıcı DNA molekülü; **3** ve **4**, Hax-1 geni shRNA-2 kodlayıcı DNA molekülü. M. AluI restriksyon enzimi ile kesilen pVP16 plazmit DNA'sı. (Not: AluI ile kesilen pVP16 plazmit DNA'sı analiz edilen DNA molekülüne yakın büyüklüklerde DNA fragmentleri taşıdığı için, laboratuvarımızda pVP16 plazmiti kesilerek DNA standardı olarak kullanılmıştır).

Sentez edilen bu DNA molekülleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldıktan sonra, PZR ile doğrusal hale getirilen piGENE-puro plazmit DNA'sı ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon sonucunda **Şekil 11**'de haritaları verilen piGENE-Hax-1shRNA1 ve piGENE-Hax-1shRNA2 plazmit vektörleri elde edildi.



Şekil11. Hax-1-shRNA-1 veHax-1-shRNA 2 kodlayan plazmit vektörleri haritası. Vektörlerin haritalarının oluşturulmasında BioEdit programından yararlanıldı.

piGENE-Puro vektörüne klonlananHax-1 genine özgü shRNA kodlayıcı DNA bölgeler DNA dizi analizleri ile kontrol edildi. DNA dizi analizi sonuçları, vektörlere klonlanan DNA fragmentlerinin, tasarlanan diziler ile bire bir aynı olduğunu ortaya koydu (**Şekil 12**).



Şekil 12. piGENE-Puro plazmit vektörüne klonlanHax-1-shRNA kodlayıcı DNA'ların, DNA dizi analizi sonuçları.

6.2. Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Bulgular

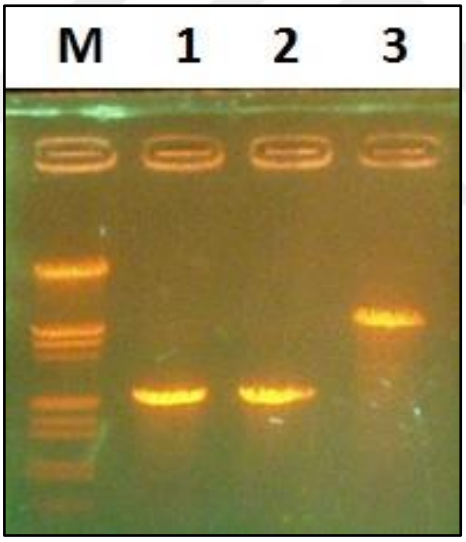
Çalışmalardainsana ait Hax-1 proteinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitesi PA ile fiziksel etkileşimini araştırmak amacıyla GST ile birlikte çöktürme tekniğinden yararlanıldı. Bunun için PA proteini kodlayan viral genler pCAGGS-GST plazmit vektörlerine klonlanarak; pCAGGS-GST-PA(WSN), pCAGGS-PA-GST(WSN)vektörleri elde edildi.

İnfluenza virüsü H1N1 (WSN) tipine ait olan PA geni daha önceden tez Danışmanım tarafından oluşturulan pCAGGS-PA(WSN) vektörü üzerinden PA cDNA'sına özgü"PA/WSN(Gly)-For ve PA/WSN-Rev" veya "PA/WSN-For ve PA/WSN(Gly)-Rev"primer çiftlerikullanılarak PZR ile çoğaltıldı. pCAGGS-GST plazmit vektörü de metot kısmında (**5.19.2**) belirtildiği şekilde PZR ile çoğaltılarak doğrusal hale getirildi.

Tablo 6. İnfluenza virüsü H1N1 (WSN) tipine ait olan PA genini PZR ile çoğaltmak için kullanılan oligonukleotid primerler.

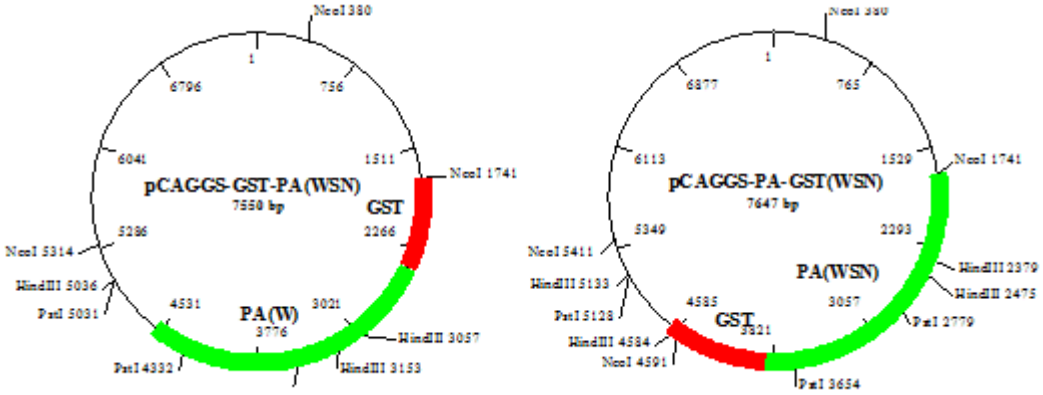
Primerlerin adı	Primerlerin nükleotid dizisi
PA/WSN(Gly)-For	cggaggatctggaATGGAAGACTTTGTGCGACAATG
PA/WSN-Rev	CTATCTCAATGCATGTGTGAGGAAG
PA/WSN-For	ATGGAAGACTTTGTGCGACAATGC
PA/WSN(Gly)-Rev	tccagatcctccTTTCAGTGCATGTGCGAGGAAG

PZR ürünleri %1 agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi ve beklenen boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 13**)



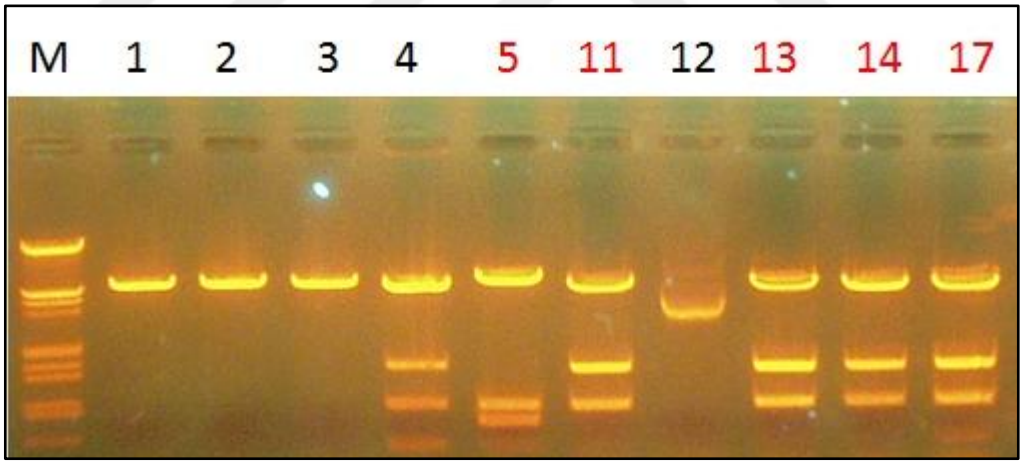
Şekil 13PZR ile çoğaltılan influenza virüsü PA genleri ve pCAGGS-GST plazmit DNA'sı görüntülenmesi.Elektroforezişlemi 100 volt sabit gerilim altında 25 dakikada yapıldı. İşlemde 0,2 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür içeren %1'lik agaroz jel kullanıldı.**1**: PA/WSN (pCAGGS-GST-PA için), **2**: PA/WSN (pCAGGS-PA-GST için), **3**: PZR ile çoğaltılan pCAGGS-GST plazmit DNA'sı

PZR ile çoğaltılan influenza virüsü PA geni cDNA'ları ve pCAGGS-GST plazmit vektörü ile ligasyona uğratılarak **Şekil 14**'de haritaları verilen plazmit vektörleri elde edildi.



Şekil 14.pCAGGS-GST-PA(WSN) ve pCAGGS-PA(WSN)-GST vektörlerinin haritaları

pGAGGS-GST ve PA cDNA'ların ligayonu ve transformasyonu sonrasında LBA(+Amp) besiyerlerinde oluşan kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA'arı hazırlandı ve bu DNA'larplazmit vektörlerinin restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak PstI restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesildi. Kesilen DNA örnekleri % 1'lik agaroz jelde yürütülerek kontrol edildi (**Şekil 15**).



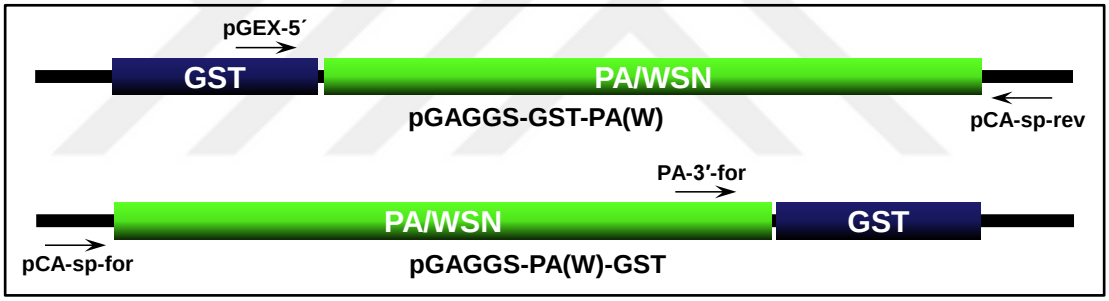
Şekil 15 Küçük ölçekte yapılan plazmit izolasyonu sonrası plazmitler üzerinde yapılan PstI kesim kontrolü. 1-5 arası olan örnekler pCAGGS-GST-PA(WSN) vektörleri, 11-17 arası örnekler ise pCAGGS-PA(WSN)-GST vektörleri. Kırmızı renkli olanlar kesim sonrası istenilen büyüklükte olan bantlardır.

PstI restrikyon enzimi sonucunda beklenen boyutlarda (GST-PA için; 857, 699, 5994 bç; PA-GST için; 875, 1474 5298 bç) DNA flagmentleri oluşan örnekler seçildi ve DNA dizi analizleri sonrasında deneylerde kullanıldı.

GST uzantılı PA proteinleri kodlayan füzyon (kaynaşmış) genlerinin özellikle birleşme noktalarında DNA dizi analizleri ile kontrol edildi. DNA dizi analizlerinde **Tablo 7**'de verilen ve Şekil üzerinde gösterilen primerler kullanıldı.

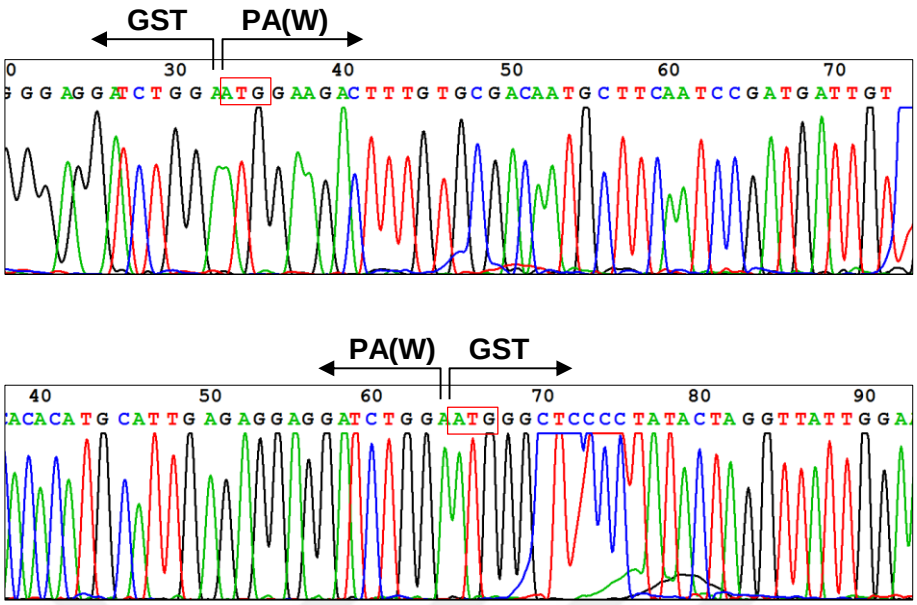
Tablo 7. GST uzantılı PA proteini kodlayan genlerin dizilenmesi amacıyla kullanılan oligonukleotid primerler.

Primerlerin adı	Primerlerin nükleotid dizisi
pGEX-5′	5′-GGGCTGGCAAGCCACGTTTGGTG-3′
pCA-sq-rev	5′-CACACCAGCCACCACCTTCT-3′
pCA-sq-for	5′-GTGCTGGTTGTTGTGCTGTC-3′
PA-3′-for	5′-GAAGCAATTGAGGAGTGCCTGA-3′



Şekil 16 GST uzantılı PA proteini kodlayan genlerin dizilenmesinde kullanılan primerler ve bu primerlerin konumları.

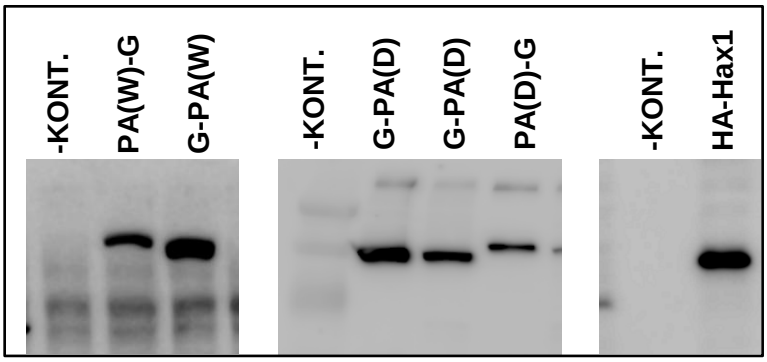
Dizileme sonucunda, oluşturulan kaynaşmış genlerin kodon çerçevesinde bir bozulma olmadığı ve tasarlanan dizi ile birebir aynı olduğu görüldü (**Şekil 17**)



Şekil 17.GST-PA ve PA-GST füzyon proteinlerini kodlayan genlerin DNA dizi analizi sonuçları.

6.3. Geçici Olarak Plazmitler ile Transfekte Edilen HEK293 Hücrelerinde Sentez Edilen GST Uzantılı PA Proteinlerinin Western Melezleme ile Analizi Sonuçları

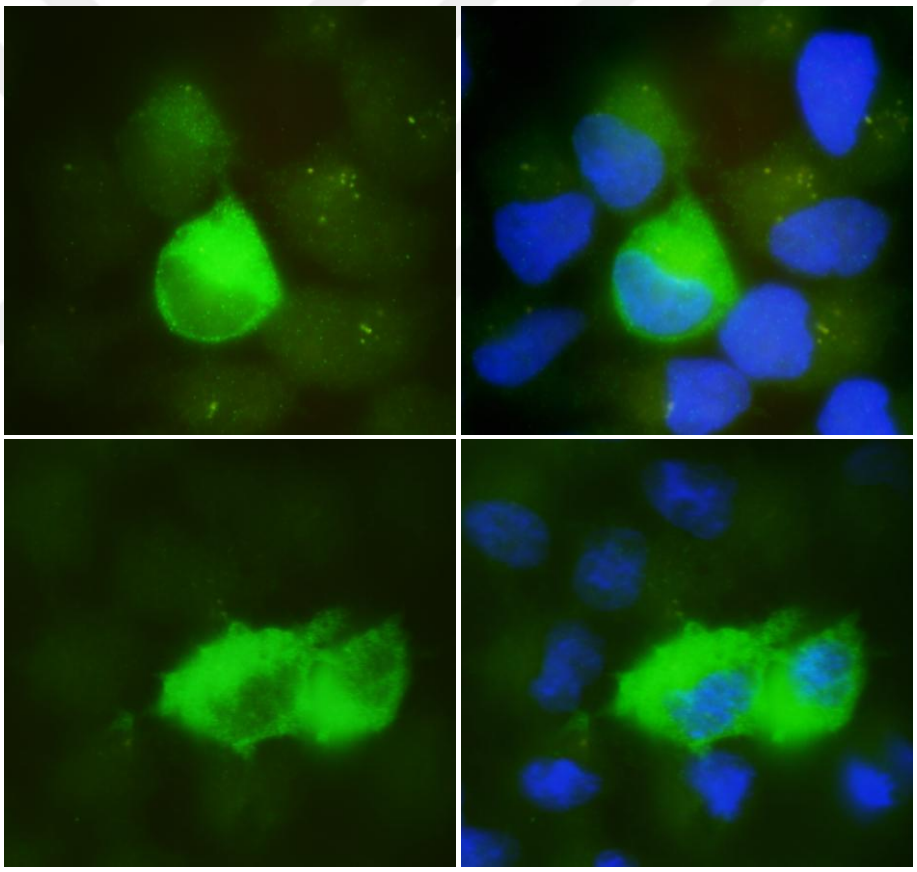
GST uzantılı PA (GST-PA ya da PA-GST) ve HA uzantılı Hax-1 (HA-Hax-1) kodlayan plazmit vektörlerinin HEK293 hücrelerinde anlatım yapıp yapmadıkları Western melezleme ile kontrol edildi. Bu plazmit vektörleri ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerde GST uzantılı PA proteinlerinin ve HA-Hax-1 proteinin etkin bir şekilde sentez edildiği saptandı (**Şekil 18**)



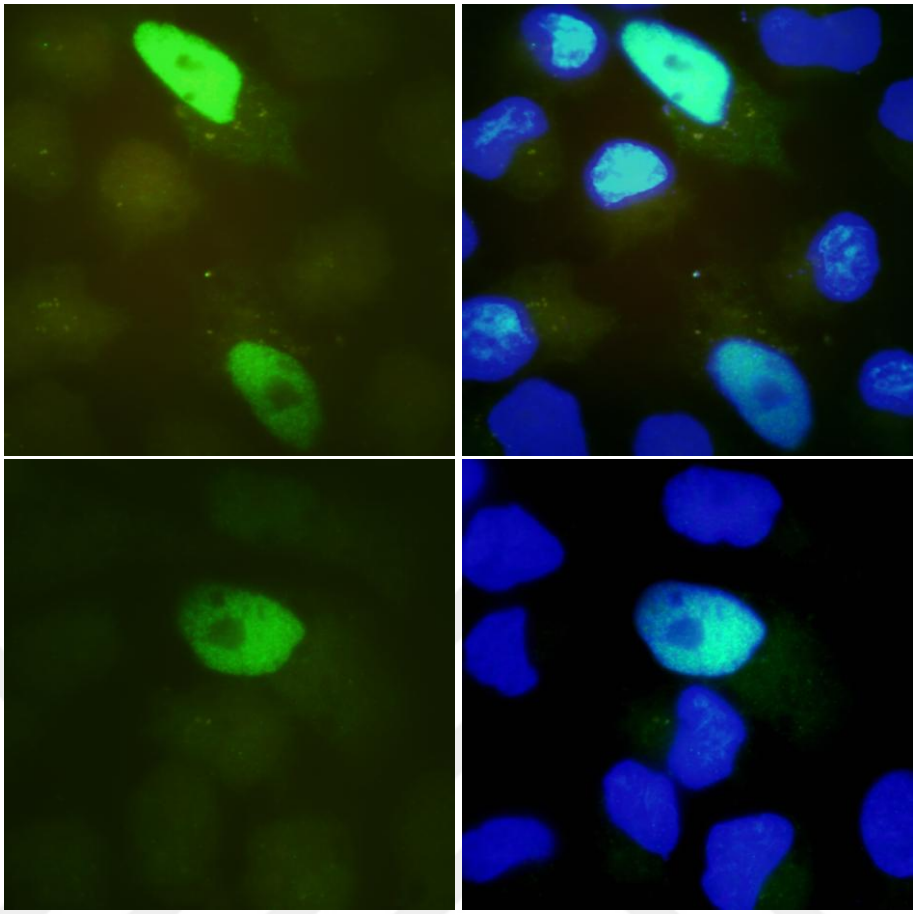
Şekil18. HEK293 hücrelerinde sentezlenen GST uzantılı PA ve HA-Hax-1 proteinlerinin Western melezleme yöntemi ile analizi.

6.4. GST Uzantılı PA Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonları İle İlgili Veriler

Plazmit vektörleri ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentez edildikleri saptanan GST uzantılı PA proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları araştırıldı. Bu amaçla plazmitler, yuvarlak lameller üzerinde üretilen HeLa hücrelerine tranfekte edildi. Hücrelerde sentez edilen proteinler, immünfloresans yöntem ile görüntülendi. İnfluenza A/WSN/H1N1 virüsüne ait PA proteini GST-PA sıralamasında GST ile birleşik olarak sentezlendiğinde hücrelerin sitoplazmasında (**Şekil 19**); buna karşın PA-GST şeklinde sentez edildiğinde hücre nukleusunda lokalize olduğu (**Şekil 20**) görüldü.

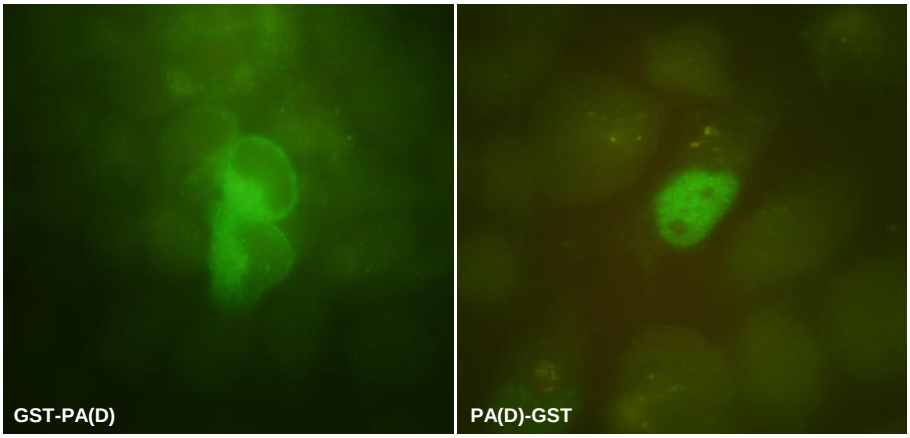


Şekil 19. HeLa hücrelerinde sentez edilen GST-PA(W) proteinlerin immunfloresan yöntem ile görüntülenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-GST antikorları, sekonder antikor olarak ise Alexa-Fluor-488 konjuge anti-fare IgG antikorları kullanıldı. Hücre nukleusları nükleik asit boyası DAPI ile görünür hale getirildi.



Şekil 20. HeLa hücrelerinde sentez edilen PA(W)-GST proteinlerin immunfloresan yöntem ile görüntülenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-GST antikorları, sekonder antikor olarak ise Alexa-Fluor-488 konjuge anti-fare IgG antikorları kullanıldı. Hücre nukleusları nükleik asit boyası DAPI ile görünür hale getirildi.

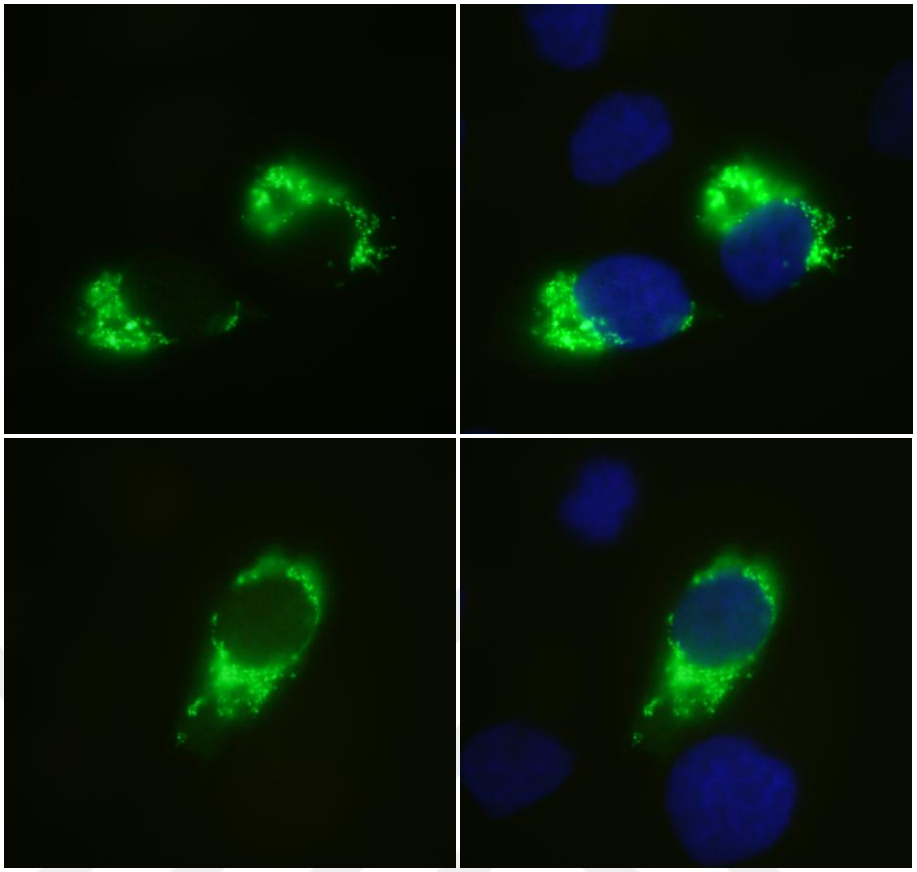
Kuş tipi influenza A/Duck/Pen/H5N2 virüsüne ait PA proteinin de WSN tipi virüsü PA protein ile benzer lokalizasyon şekli gösterdi. GST-PA(D) proteinleri hücre sitoplazmasında lokalize olurken, PA(D)-GST proteinleri hücre nukleusunda lokalize oldu (**Şekil 21**)



Şekil 21. HeLa hücrelerinde sentez edilen GST uzantılı, influenza A/Duck/Pen-H5N2 virüsüne ait PA proteinlerinin (GST-PA ve PA-GST) immünfloresan yöntemle görüntülenmesi.

6.5. HA Uzantılı Hax-1Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonları ile İlgili Veriler

İnsan Hax-1 geni Danışmanım tarafından HEK293 cDNA'sı üzerinden PZR ile çoğaltılarak pCHA plazmit vektörüne klonlanmıştır. Bu vektör üzerinden kodlananHax-1 proteini amino terminal uçta 9 amino asitten oluşan HA uzantısı taşımaktadır. HA uzantılı Hax-1 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarını saptamak için HeLa hücrelerinden yararlanıldı. Hücreler pCHA-Hax1 plazmit vektörü ile **5.22**'de belirtildiği şekilde transfekte edildi ve immunfloresan yöntemle görüntüleme deneylerinde kullanıldı. Görüntülemede monoklonal fare anti-HA antikorlarından yararlanıldı. Elde edilen sonuçlar, HA uzantılı Hax-1 proteinin hücre sitoplazmasında kümeler halinde lokalize olduğunu gösterdi (**Şekil 22**)



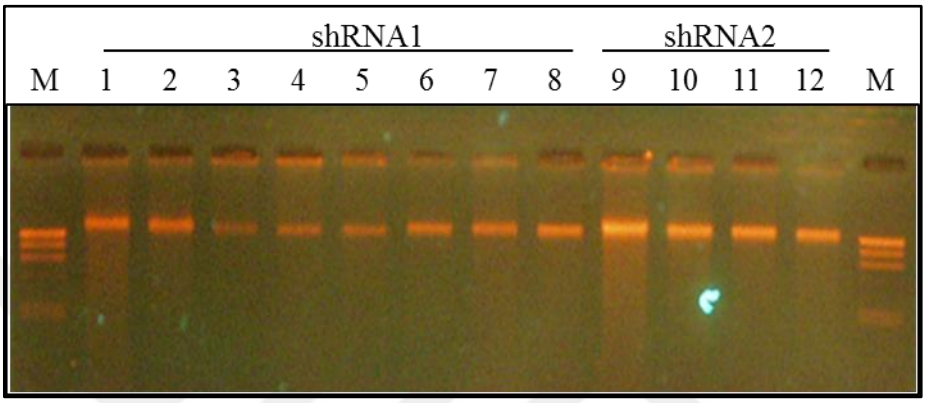
Şekil 22. HeLa hücrelerinde, geçici olarak transfekte edilen pCHA-Hax1 plazmit vektörü üzerinden kodlan HA-Hax-1 proteininin immunfloresan teknikle analiz edilmesi. Deneylerde primer antikor olrak fare monoklonal anti-HAantikorları, sekonder antikor olarak ise Alexa-Fluor-488 konjuge anti-fare IgG antikorları kullanıldı. Hücre nukleusları nükleik asit boyası DAPI ile görünür hale getirildi.

6.6. piGENE-shRNA1, piGENE-shRNA2 ve pCHA-Hax1 Plazmitleri ile Kalıcı Olarak Transfekte Edilen Hücre Hatları ile İlgili Bulgular

İnsan Hax-1 genine özgü shRNA kodlayan plazmitleri ve pCHA-Hax1 plazmiti ile HEK293 hücrelerine transfekteedildi (**bkz 5.22**)ve bu plazmitleri kalıcı olarak genomunda taşıyan hücreler seçildi. Elde edilen bu hücre klonlarından genomik DNA izole edildi ve bu DNA'lar üzerinde PZR ile kontroller yapıldı. Hücre klonlarında Hax-1 mRNA transkript düzeyleri RT-PZR ile yarı-kantitatif olarak belirlendi. Hücre klonlarının bir kısmı influenza virüsleri ile enfekte edildi ve bu hücrelerde viral replikasyonun seyri Western melezleme ile analiz edildi.

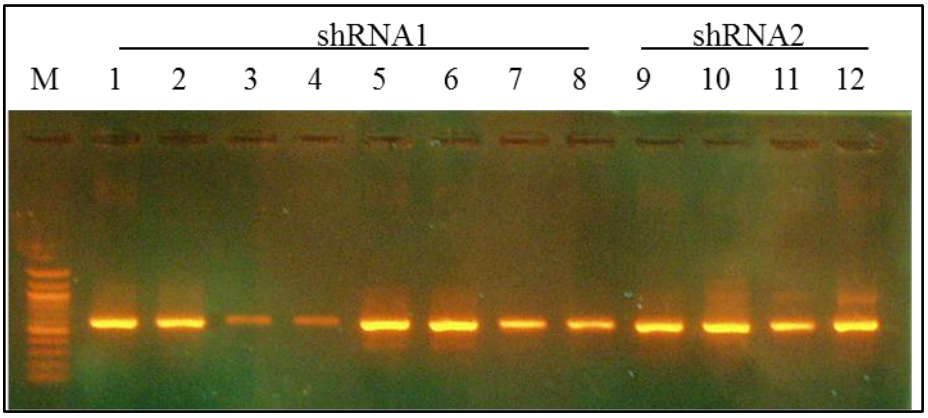
6.6.1. Kalıcı olarak transfekte hücrelerden genomik DNA izloasyonu ve shRNA genlerinin PZR ile kontrolü

Hax-1 genine gözgü shRNA taşıdığı düşünülen HEK293 hücre klonları 12-kuyulu plaklarda D'MEM HG (+) besiyerlerinde üretildi ve **5.27**'de belirtildiği şekilde bu hücrelerden genomik DNA izole edildi. DNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (**Şekil 23**).



Şekil 23. Hax-1 genine özgü shRNA kodlayıcı plazmitler ile kalıcı olarak transfekte edilen hücrelerden izole edilen genomik DNAörnekleri.**1-12**. Tek hücreden çoğaltılan kolon numaralarını göstermektedir. DNA'lar %1'lik agaroz jelde 100 volt sabit akım altında 25 dakika yürütülerek kontrol edildi.

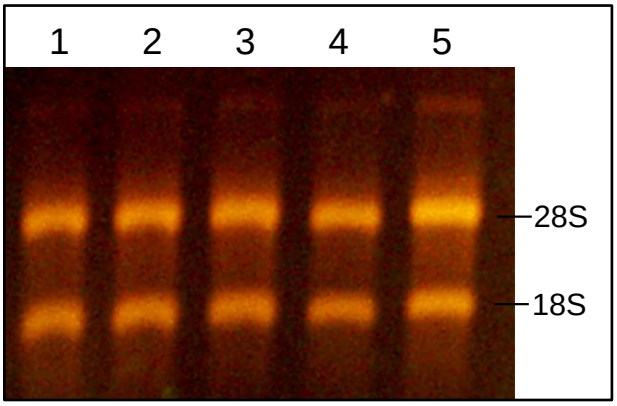
İzole edilen genomik DNA'lar üzerinden, shRNA dizilerinin yukarı ve aşağı bölgelerine bağlanan "hU6-sq-For" ve "hU6-Rev-cont" primer çifti kullanılarak PZR gerçekleştirildi. Reaksiyon ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve 620 bç boyutlarında beklenen DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 24**).



Şekil 24. Kalıcıolarak transfekte edilen HEK293 hücrelerin shRNA kodlayan diziler için PZR ile kontrol edilmesi. **1-12**. Tek hücreden çoğaltılan kolon numaralarını göstermektedir. 3 ve 4 nolu örnekler negatif olarak değerlendirildi. DNA'lar %1 agaroz jelde 100 volt sabit akım altında 25 dakika yürütüldü.

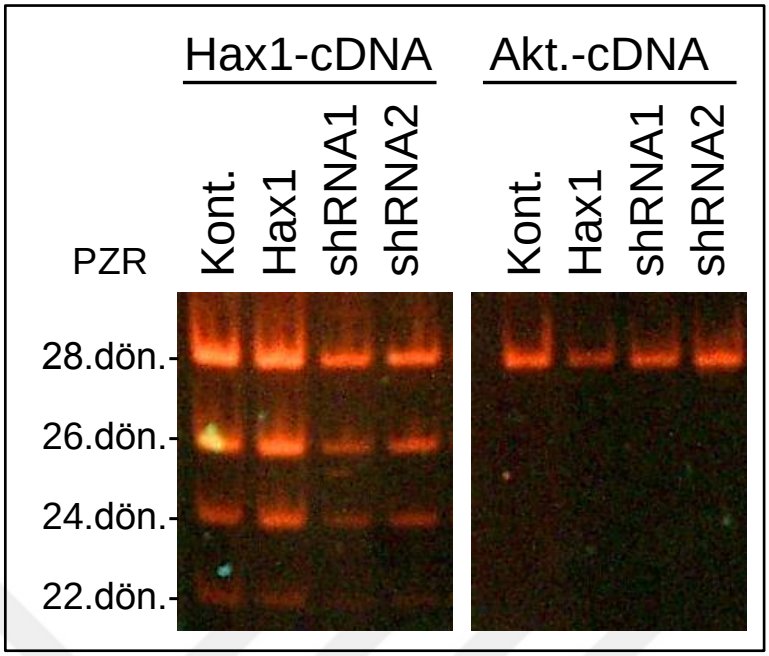
6.6.2. shRNA ve Hax-1 kodlayan Plazmitler ile kalıcı olarak transfekte hücreler üzerinden Hax-1 mRNA düzeylerinin saptanması

Hax-1 genine özgü shRNA (shRNA1 ve shRNA2) ve Hax-1 proteini kodlayan (pCHA-Hax1) plazmitler ile transfekte edilen ve puromisin antibiyotiği varlığında seçilen hücre klonları 12-kuyulu plaklarda çoğaltıldı ve bu hücrelerden total RNA izolasyonu yapıldı. Total RNA miktarları spektrofotometrik olarak belirlendi. RNA örneklerinin kalitesi agaroz jel elektroforez ile kontrol edildi. Örneklerin reverz transkripsiyon için kullanılabilecek kalitede olduğu saptandı (**Şekil 25**)



Şekil 25. Transfekte HEK293 hücrelerden izole edilen total RNA'ların agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. Her bir kuyuya yaklaşık 0,5µg totalRNA yüklendi ve 100 volt sabit akım altında 45 dakika yürütüldü. Jeller 10 µg/ml konsantrasyona EtBr çözeltisinde 1 saat boyandı ve distile su ile yıkandıktan sonra görüntülendi.**1-5**. gelişigüzel seçilen RNA örneklerini göstermektedir.

Kalite ve miktarı saptananRNA örneklerinden oligo dT primerler kullanılarak cDNA'lar sentez edildi. Elde edilen cDNA örneklerinde Hax-1 genine özgü cDNA miktarı "Hax-1-428-For"/"Hax-1-725-Rev" primer çifti kullanılarak yarı-kantikatif PZR ile belirlendi. 22., 24., 26. Ve 28. döngülerde alınan PZR ürünleri %6'lık doğal poliakrilamid jel elektroforezi ile kontrol edildi. Kontrol olarak transfekte olmamış HEK293 cDNA'sı kullanıldı. Elde edilen sonuçlar **Şekil 26**'da verildi.



Şekil 26. Hax-1 genine özgü shRNA kodlayan plazmitler ve pCHA-Hax1 plazmiti ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde Hax-1 ve aktin (kontrol) geni transkript düzeyleri. PZR ürünleri %6'lık doğal poliakrilamid jelde yürütüldü.

Elde edilen sonuçlar shRNA kodlayan Plazmitler ile transfekte hücrelerde Hax-1 transkript düzeyinin kontrol'e göre önemli ölçüde azaldığını gösterdi. Buna karşın Hax-1 ile transfekte hücrelerde ise artış saptandı.

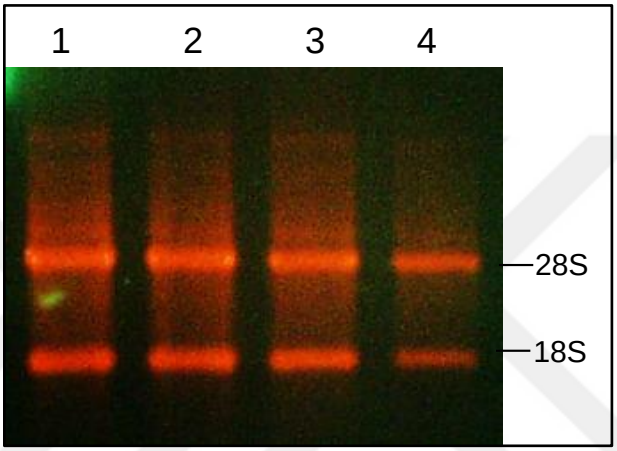
HA-Hax-1 füzyon proteini ile kalıcı olarak transfekte edilen hücreler western melezleme yöntemi ile kontrol edildiler. Pozitif çıkan hücre hattı üzerinde influenza virüsü üremesinin takibi yapıldı.

6.7. Hax-1 siRNA'sı ile Transfekte Edilen HEK293 Hücreleri ile İlgili Bulgular

Çalışmada plazmit vektörler üzerinden kodlanan shRNA'lar dışında, ticari olarak temin edilen Hax-1 siRNA'ları kullanılarak hücrelerde Hax-1 transkript düzeyi düşürüldü. Bu deneylere HeLa hücreleri kullanıldı. siRNA ile transfeksiyonu takip eden 48. saatte hücrelerin bir kısmındanHax-1 mRNA miktarını saptamak amacıyla total RNA izolasyonu yapıldı. Kalan hücreler ise influenza virüsleri ile enfekte edildi ve hücrelerde viral replikasyon western melezleme yöntemi ile analiz edildi.

6.7.1. siRNA ile transfekte edilmiş HeLa hücrelerden total RNA izolasyonu ile ilgili bulgular

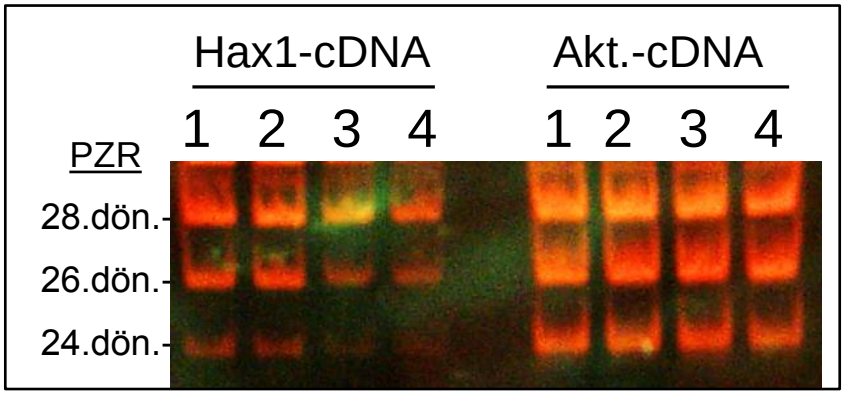
Hax-1 mRNA'sına karşı oluşturulmuş siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde transfeksiyondan 48 saat sonra total RNA izolasyonu yapıldı. İzole edilen RNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (**Şekil 27**). Kontrolleri yapılan RNA'lar oligo dT primerler kullanılarak revez transkripsiyon için kullanıldı.



Şekil 27. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerine ait RNA örneklerinin agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. Her bir kuyuya yaklaşık 0,5µg totalRNA yüklendi ve 100 volt sabit akım altında 45 dakika yürütüldü. Jeller 0,1 µg/ml konsantrasyona EtBr çözeltisinde 1 saat boyandı ve distile su ile yıkandıktan sonra görüntülendi. **1**. İşlem görmemiş HeLa hücreleri, **2**. 20 pM negatif kontrol siRNA ile transfekte edilen hücreler, **3**. 20 pM Hax-1 siRNA ile transfekte edilen hücreler, **4**. 30 pM Hax-1 siRNA ile transfekte edilen hücreler.

6.7.2. siRNA ile transfekte hücrelerdeHax-1geni traskrip miktarlarının saptanması ile ilgili veriler

Hax-1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerden hazırlanan cDNA'lar kalıp olarak kullanılarak, bu örneklerdeki Hax-1 geni transkript düzeyi yarı kantitatif PZR ile saptandı. PZR'unda, **5.24.1**'de dizileri verilen "Hax-1-428-For"/"Hax-1-725-Rev". primer çifti kullanılarak Hax-1 geni cDNA'sı üzerinden 297 bç boyutunda bölge çoğaltıldı. 24., 26., 28. ve 30. döngülerde alınan PZR ürünleri doğal poliakrilamid gel elektroforezi ile analiz edildi (**Şekil 28**).



Şekil 28. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde Hax-1 ve aktin (kontrol) geni transkript düzeyleri. PZR ürünleri % 6'lık doğal poliakrilamid jelde yürütüldü. **1**. İşlem görmemiş HeLa hücreleri, **2**. 20 pMol kontrol siRNA ile transfekte edilmiş hücreler, **3**. 20 pMol siRNA ile transfekte edilmiş hücreler, **3**. 30 pMol siRNA ile transfekte edilmiş hücreler.

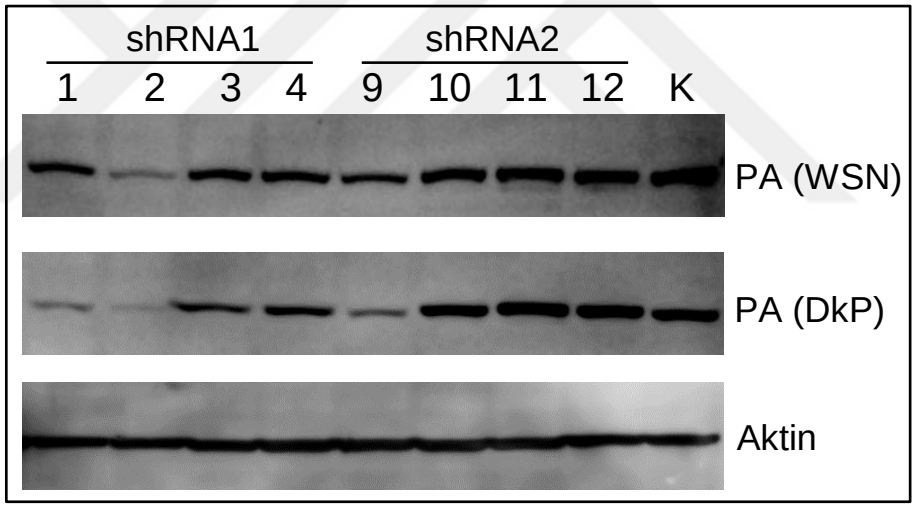
Şekil 28'de verilen sonuçlar Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerindeki Hax-1 transkript düzeyinin, negatif kontrol siRNA'lara göre önemli ölçüde azaldığı saptandı.

6.8. Hax-1Genine Özgü shRNAKodlayan Plazmitler ya da siRNA'lar ile Transfekte Edilen Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun İzlenmesi ile İlgili Veriler

İnfluenza virüsleri, diğer tüm virüslerde olduğu gibi çoğalabilmek için konak hücrenin, biyosentez mekanizmalarını kullanır. Dolayısıyla hücresel proteinler ile virüs replikasyonu arasında sıkı bir etkileşim vardır. Bazı konak proteinleri virüs replikasyonu için hayati önem taşır. Bu proteinler viral replikasyonu pozitif yönde etkilerler. Bazı proteinler ise değişik mekanizmalarla virüs replikasyonunu inhibe eder ya da yavaşlatır. Bu çalışmada da konak hücre proteinlerinden Hax-1 proteininin farklı tipte influenza virüslerin replikasyonuna etkileri araştırıldı. Bunun için konak hücrede sentez edilen endojen Hax-1 transkript düzeyi shRNA ya da siRNA'lar ile azaltıldı ve bu hücrelerde viral replikasyon hem Western melezleme hem de immunfloresan teknikler ile bazı virüs protein miktarları karşılaştırılarak sonuca gidildi.

Plazmit vektörler üzerinden kodlanan Hax-1 genine özgü shRNA'lar ile endojenHax-1transkript düzeyi düşürülen hücreler insan tipi (WSN/H1N1) ve kuş

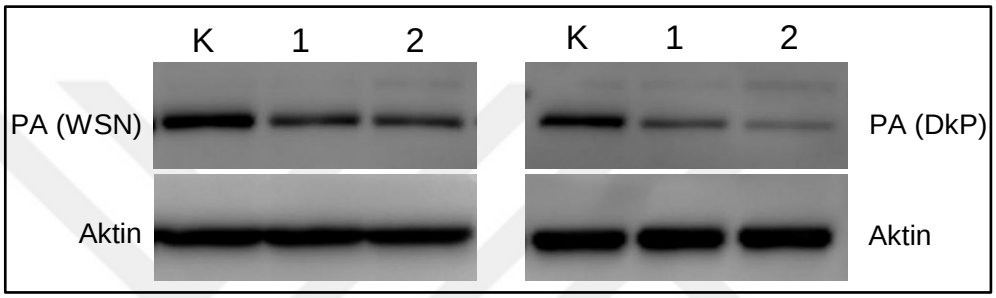
tipi(Duck/Pen/H5N2) virüsleri ile enfekte edildikten sonra 8.saate SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı ve hücresel proteinler poliakrilamid jel elektroforezi ile ayrıştırıldı. Sonrasında konak hücre aktin proteinleri ve influenza virüsü PA proteinleri Western melezleme ile görüntülendi. **Şekil 29**'daHax-1 shRNA'larını kodlayan plazmitler ile kalıcı olarak transfekte edilen farklı hücre klonlarında influenza virüsü PA protein düzeyleri verilmektedir. Elde edilen sonuçlar genel olarak Hax-1 geni transkript düzeyi düşürülen hücrelerde viral replikasyonun transfekte olmamış kontrol hücrelere göre yavaşladığınıgösterdi. Bununla birlikte özelikle shRNA1'in shRNA2'ye göre daha etkili olduğu sonucuna varıldı. Diğer taraftan virüs ile enfekte edilen farklı hücre klonlarında da PA düzeylerinde farklılıklar gözlendi. 2 ve 9 olarak numaralandırılan klonlarda en düşük düzeylerde viral PA proteini saptanırken 11-12.kolonlarda PA miktarının kontrol hücrelere yakın olduğu görüldü.



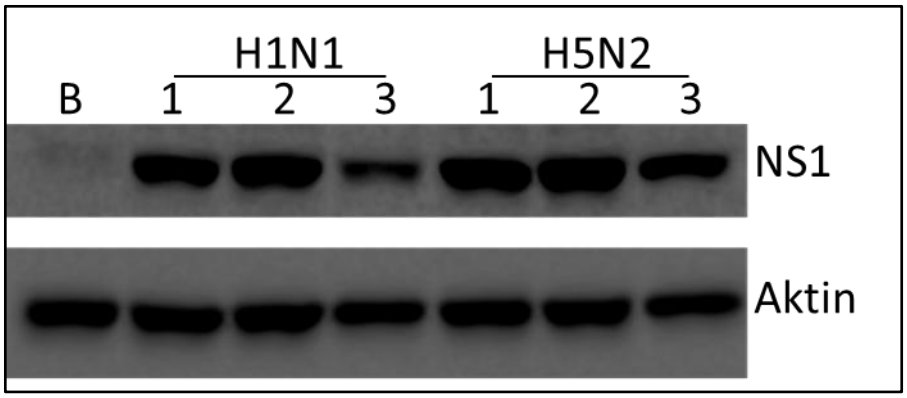
Şekil29. Hax-1 genine özgü shRNA plazmitleri ile kalıcı olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi. **1-4**. örnekler shRNA1 için, **9-12**. örnekler shRNA2 için seçilen hücre klonlarını göstermektedir. **K**. Transfekte olmamış HEK293 hücreleri.

Hücrelerde Hax-1 geninin susturulmasında shRNA'lar ile birlikte, ticari olarak sentez ettirilen siRNA'lar da kullanıldı. **5.25.1**'de belirtildiği şekilde siRNA'lar ile transfekte edilen ve Hax-1 transkript düzeyi düşürülen (**Şekil 28**) hücreler influenza virüsleri ile enfekte edildi ve enfekesiyondan 8 saat sonra hücrele lizatlarında viral

PA protein miktarları Western melezleme ile belirlendi (**Şekil 30**). **Şekil 31**'den da görüldüğü gibi siRNA'lar ile tranfekte hücrelerde viral PA protein düzeyi kontrol hücrelere göre önemli ölçüde azaldı. Bununla birlikte negatif kontro için kullanılan siRNA'ların da viral replikasyonu büyük ölçüde yavaşlattığı saptandı. İnsan tipi influenza A/WSN virüsü ile enfekte hücrelerde, kontrol siRNA ve Hax-1 siRNA'ların birbirine çok yakın düzeyde inhibisyon yaptığı görüldü. Kuş tipi virüs ile enfekte hücrelerde ise Hax-1 siRNA'nın daha fazla inhibisyon yaptığı saptandı.

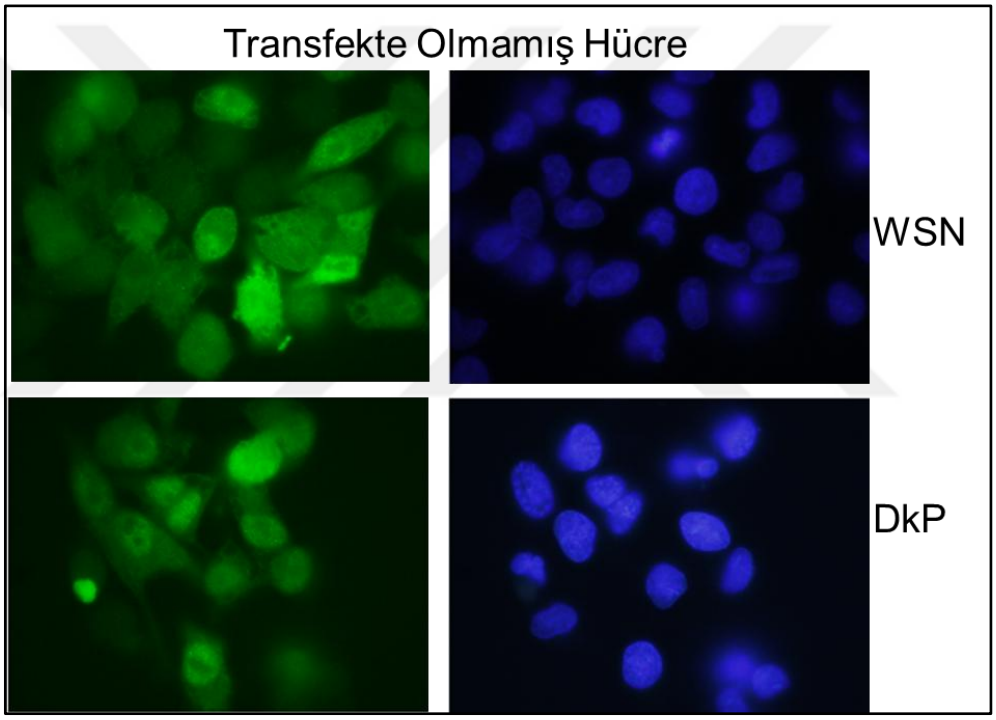


Şekil30. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi. **1.** Negatif kontrol siRNA; 2. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile trasfekte edilen hücreler**.K**. Transfekte olmamış HEK293 hücreleri.

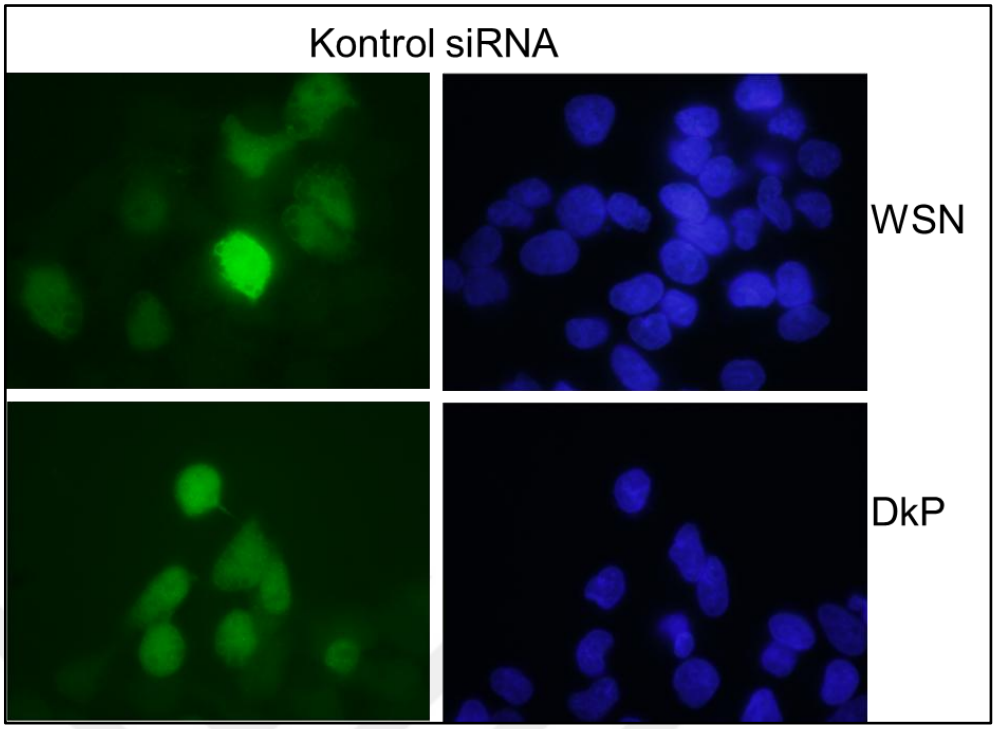


Şekil 31 Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde virüs replikasyonunun NS1 proteini aracılığı ile analizi. **B:** Hiçbir işlem görmemiş hücre, **1:** Transfekte olmamış ancak enfekte edilmiş hücre, **2:** Kontrol siRNA ile transfekte hücre, **3:** Hax-1 genine özgü siRNA ile transfekte olan hücreler.

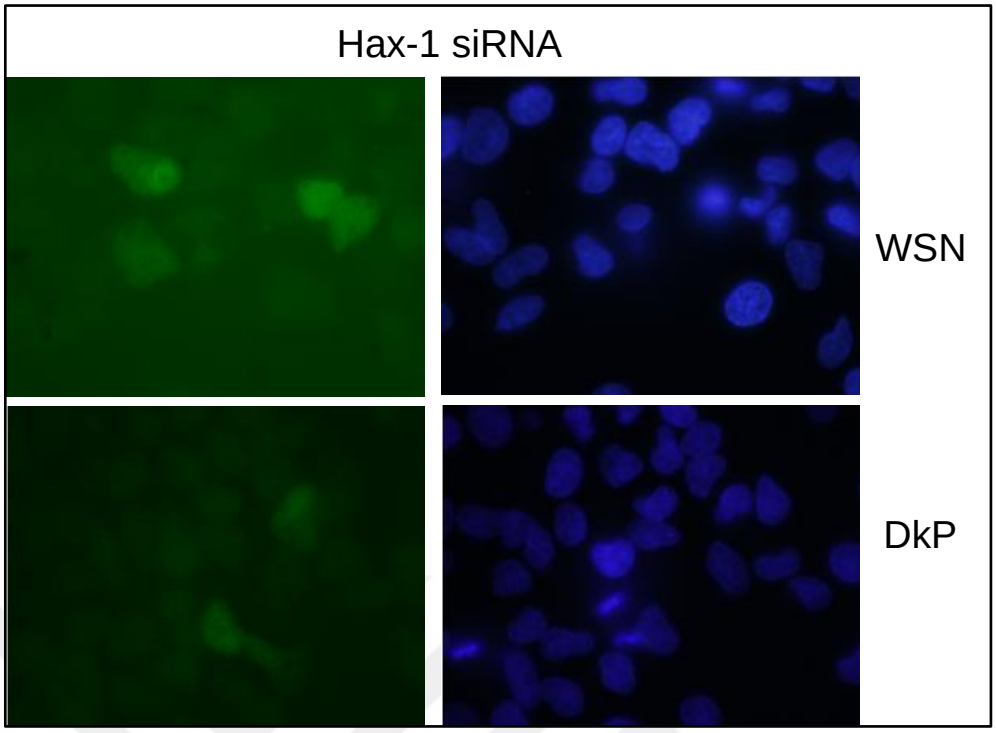
Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun seyri immunfloresan boyama tekniği ile de değerlendirildi. Bu deneylerde endojen Hax-1 transkript düzeyi düşürülen HeLa hücreleri yuvarlak lameller üzerinde çoğaltıldı ve influenza virüsleri ile enfekte edildi. İnfeksiyondan 8 saat sonra hücreler %3'lük paraformaldehit ile fikse edildi ve hücreler viral PA proteinleri için analiz edildi. Bu deneylerde siRNA'lar ile transfekte olmamış, negatif kontrol siRNA'lar ile ve Hax-1 siRNA'lar ile transfekte edilen hücreler kullanıldı. Elde edilen sonuçlar **Şekil 32-34**'de verildi.



Şekil 32.siRNA ile transfekte olmamış kontrol HeLa hücrelerinde, influenza A/WSN/H1N1 (WSN) ve influenza A/Duck/Pen/H5N2 (DkP) tipi virüsü PA proteinlerinin immünfloresan yöntemler ile görüntülenmesi. Deneylerde primerantikor olrak tavşan poliklonal anti-PA antikorları, sekonder antikor olarak ise FITC konjuge anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Hücre nukleusları nükleik asit boyası DAPI ilegörünür hale getirildi.



Şekil 33. Negatif kontrolsiRNA ile transfekte olmuş kontrol HeLa hücrelerinde, influenza A/WSN/H1N1 (WSN) ve influenza A/Duck/Pen/H5N2 (DkP) tipi virüsü PA proteinlerinin immünfloresan yöntemler ile görüntülenmesi. Deneylerde primerantikor olarak tavşan poliklonal anti-PA antikorları, sekonder antikor olarak ise FITC konjuge anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Hücre nukleusları nükleik asit boyası DAPI ilegörünür hale getirildi.



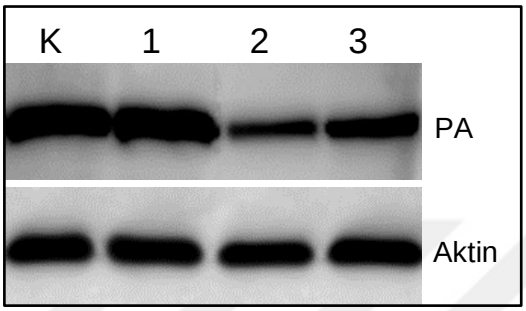
Şekil 34. Hax-1 genine özgü siRNA ile transfekte olmuş HeLa hücrelerinde, influenza A/WSN/H1N1 (WSN) ve influenza A/Duck/Pen/H5N2 (DkP) tipi virüsü PA proteinlerinin immünfloresan yöntemler ile görüntülenmesi. Deneylerde primer antikor olrak tavşan poliklonal anti-PA antikorları, sekonder antikor olarak ise FITC konjuge anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Hücre nukleusları nükleik asit boyası DAPI ile görünür hale getirildi.

Aynı koşullarda hazıranan ve fotoğrafları çekilen preparatlar incelendiğinde influenza virüsü PA düzeyinin transfekte olmamış hücrelerde en yüksek düzeyde olduğu (**Şekil 32**), Hax-1 siRNA'lar ile transfekte hücrelerde ise en düşük düzeyde olduğu saptandı. Negatif kontrol siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde ise PA protein düzeyinin Hax-1 siRNA ile transfekte hücrelere göre belirgin olarak yüksek olduğu görüldü. Bu sonuçlara **Şekil 30**'da verilen Western melezleme sonuçları ile bire bir paralellik göstermektedir.

6.9. Hücrelerde Hax-1Proteini Düzeyindeki Artışın İnfluenza Virüsü Replikasyonuna Etkileri ile İlgili Veriler

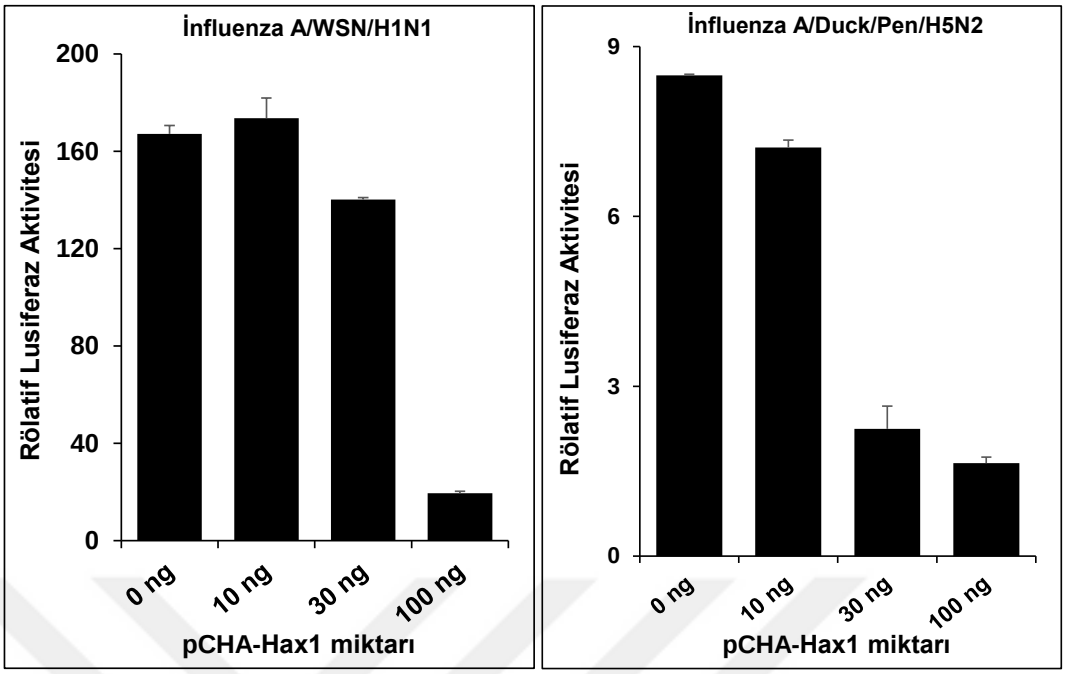
Hücrelerde Hax-1 protein miktarı, gen transferi ile yapay olarak arttırıldığında, influenza virüs replikasyonunun nasıl etkilendiğini saptamak amacıyla, HEK293 hücreleri pCHA-Hax1 plazmiti ile transfekte edildi ve 36 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi. Daha sonra hücreler influenza virüsleri ile enfekte edildi.

İnfeksiyondan 8 saat sonra hücreler SDS örnek tamponunda parçalandı ve hazırlanan lizatlarda influenza virüsü PA proteinleri ve konak hücre aktin proteinleri Western melezleme ile görüntülendi (**Şekil 35**). Elde edilen sonuçlar pCHA-Hax1 plazmiti ile transfekte edilen hücrelerde viral PA protein miktarının daha düşük düzeylerde olduğunu, dolayısıyla hem WSN hem de DkP tipi virüs replikasyonunun Hax-1 proteini artışından negatif yönde etkilendiğini ortaya koydu.



Şekil 35.pCHA-Hax1 plazmit vektörü ile transfekte edilen HEK 293 hücrelerinde influenza virüsü replikasyonunun Western melezleme ile analizi. **K.** Virüs ile enfekte HEK293 hücreleri, **1**. pCHA plazmiti ile transfekte hücreler. **2** ve **3**. pCHA-Hax1 plazmit vektörü ile transfekte edilen hücreler.

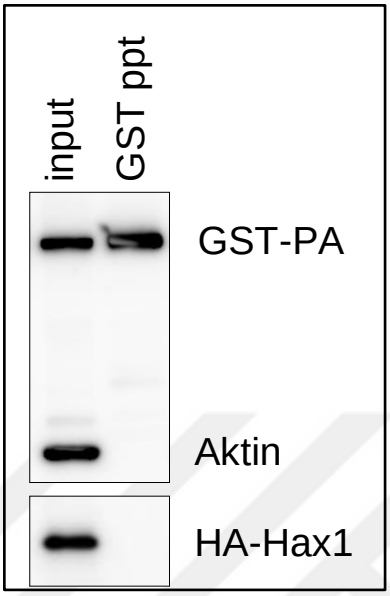
HEK293 hücrelerinde, Hax-1 proteinindeki artışın influenza virüsü RNA polimeraz enzimlerine etkileri, bu virüsler için geliştirilen minireplikon modelleri (Turan ve ark., 2004)ile araştırıldı. Bunun için HEK293 hücreleri **5.27** kısmında belirtildiği gibi belirli miktarlarda influenza virüsü minireplikon plazmitleri ve artan miktarlarda pCHA-Hax1 plazmit vektörü ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra hücreler Renilla lusiferaz liziz tamponunda parçalandı ve elde edilen lizatlarda hem kontrol Renilla lusiferaz hem de ateş böceği lusiferaz aktiviteleri ölçüldü. RNA polimeraz enzim aktivitesi için belirteç işlevi gören ateş böceği lusiferaz aktiviteleri Renilla lusiferaz aktiviteleri ile oranlanarak "*rölatif lusiferaz aktivitesi*" olarak Şekil 36'da verildi. Elde edilen sonuçlar, HEK293 hücrelerinde Hax-1 proteinindeki artışa paralel olarak rölatif lusiferaz aktivitesinin azaldığını ortaya koydu. Dolayısıyla Hax-1 proteininin hem WSN hem de DkP tipi influenza virüsü RNA polimeraz enzimini inhibe ettiği belirlendi.



Şekil 36.HA-Hax-1 proteini ile influenza virüsü RNA polimerazının ilişkisinin mini replikon modeli ile gösterilmesi. Çalışmada 0 ng/µl ile 100 ng/µl arası konsantrasyondapCHA-Hax1 plazmiti kullanıldı.

6.10. Hax-1 ve PA Proteinleri Arasındaki Etkileşimin GST-Çöktürme Yöntemiyle Araştırılması ile İlgili Bulgular

İnfluenza virüsü PA proteini ile insan Hax-1 proteini arasındaki olası fiziksel etkileşimin araştırılması için birlikte GST-çöktürme deneyleri yapıldı. Bu çalışma için GST-PA füzyon proteinleri ile HA-Hax-1 proteinlerini kodlayan plazmitler Hek-293 hücrelerine birlikte transfekte (**bkz 5.22**) edildiler. Transfeksiyon sonrası hücreler D'MEM HG (+) besiyerinde standart kültür koşullarında 48 saat inkübe edildiler. İnkübasyon sonrası hücreler RIPA tamponu ile parçalanarak hücre lizatları elde edildi. Hücre lizatlarında GST-PA glutatyon Sepharoseboncuklar ile çöktürüldü. Glutatyon Sepharose boncuklar ile çökelen proteinler SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, GST uzantılı PA proteinlerinin glutatyon Sepharose boncuklar ile çökeldiğini, fakat HA-Hax-1 proteinin çökelmediğini gösterdi. Dolayısıyla bu çalışmada uygulanan koşullarda GST uzantılı viral PA proteini ile HA-Hax-1 proteininin fiziksel bir etkileşim göstermediği sonucuna varıldı.



Şekil 37. GST-PA ve HA-Hax-1 ile yapılan GST çöktürme deneyi. Birlikte transfeksiyonun 48. saatinde HEK293 hücreleri liziz tamponu ile toplanarak GST birlikte çöktürme deneyinde kullanıldılar. Lizatlarda HA-Hax-1 ve GST-PA proteinlerinin varlığı görünürken glutatyon sepharose boncuklara ise sadece GST-PA'ların bağlandığı tesbit edildi.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnfluenza A virüsleri yapısal özelliklerinden dolayı antijenik özelliklerini çok hızlı değiştirmeleri ve solunum yoluyla çok kolay bulaşabilmeleri nedeniyle, geçmişte olduğu gibi günümüzde de insan sağlığı için büyük bir tehdit oluşturmaktadır. Bununla beraber vücudumuz bu virüslere karşı doğal ve kazanılmış bağışıklık oluşturarak kendini bir ölçüde koruyabilmektedir. Geçmişte yaşanmış olan antijenik değişimlerin sebep olduğu büyük epidemiler göz önüne alındığında gelecekte başka büyük pandemilere sebep olabileceği riski azımsanamayacak ölçüdedir. Bu sebepten ötürü İnfluenza virüsünün moleküler mekanizmalarının ve hücre ile etkileşimlerinin anlaşılması büyük önem arz etmektedir.

İnfluenza A virüsleri kuşlar başta olmak üzere insanları da kapsayacak şekilde birçok memeli türünde enfeksiyon yapabilmektedir. Buna karşın farklı türler arası geçişlerde, virüs ve konak hücre kaynaklı bazı faktörler virüslerin yayılmasını zorlaştırmaktadır(Turan ve ark., 2004; Burgui ve ark., 2007; Wang ve ark., 2009; Konig ve ark., 2010;). Örneğin interferonlar ile indüklenen çeşitli mekanizmalar viral replikasyonu inhibe etmektedir (Isaacs ve Lindenmann, 1987). İnfluenza virüslerinin konak hücrelere tutunmasında ve hücreye girişinde önemli olan hücre reseptörleri ve hemaglutinin proteini arasındaki ilişki, virüs replikasyonunda belirleyici olan en önemli bariyerlerden biridir (Steinhauer, 1999; Skehel ve Wiley, 2000; Tamm ve ark., 2003; Earp ve ark., 2005; Sieczkarski ve Whittaker, 2005;). Konak hücrelerde viral replikasyonun devamı bakımından, interferonlar tarafından uyarılan antiviral özellikte proteinler dışında, viral RNA polimeraz ile ilişkili konak proteinleri ve bu proteinler ile viral proteinlerin uyumluluğu da önem taşımaktadır(Gabriel ve ark., 2005). İnfluenza virüsü RNA polimeraz enzimi, konak hücre RNA polimeraz II enzim kompleksi ile sıkı bir ilişki halindedir (Dhar ve ark., 1980). Viral RNA polimeraz enzimi viral mRNA'ların sentezinde, RNA polimeraz II tarafından sentez edilmekte olan konak mRNA'larının 7-metil guanozin şapka yapısına gereksinim duyar. Bu olayda viral RNA polimeraz enzimi PB2 proteininin işlev gördüğü bilinmektedir (Blaas ve ark., 1982; Plotch ve ark., 1981). Bu nedenle PB2 proteini yapısında birkaç amino asidin değişmesi bile viral patogenezin seyrini değiştirmektedir. Örneğin fareler için letal olmayan bir H5N2 influenza virüs tipinde

PB2 proteininde 627. pozisyondaki glutamik asidin lizin amino asidine dönüşmesi, virüsü fareler için letal hale dönüştürmektedir(Shinya ve ark., 2004). Son yıllarda yapılan çalışmalar viral RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinden PA proteininin de viral patogenez açısından önemli olduğunu göstermiştir (Fan ve ark., 2014). İnfluenza virüsü ve konak proteinleri arasındaki ilişki ile ilgili elde edilen bu veriler, influenza virüs replikasyonunun moleküler düzeyde daha iyi anlaşılmasına olanak sağlamaktadır. Antibiyotikler ile karşılaştırıldığında, antiviral ajanların geliştirilmesindeki en önemli zorluk, viral replikasyonun inhibisyonu için hedef alınabilecek spesifik olayların sınırlı sayıda olmasıdır. Moleküler düzeyde artan veriler, influenza virüsü replikasyonunu spesifik olarak bloke edecek ajanların geliştirilmesinde hedef alınabilecek daha fazla sayıda molekül ya da virüse özgü olay sunmaktadır. Bu tez çalışmasında influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitelerinden PA proteininin konak hücre proteinlerinden Hax-1 (İng. HCLS1-associated protein X-1) proteini ile ilişkisi ve bu ilişkinin viral replikasyona etkileri araştırıldı. Bu proteinin seçilmesinin temel nedeni, tez danışmanım Prof. Dr. Kadir Turan tarafından TÜBİTAK destekli bir proje (proje no:112S518) kapsamında, maya ikili hibrit metodu ile viral PA proteini ile Hax-1 proteinin fiziksel bir etkileşime sahip olduğunun gösterilmesidir. Ayrıca bu amaca yönelik olarak Won-Bo Wang ve diğerleri, Hax-1 proteinin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi ile ilişkili olduğunu ve insanlarda infeksiyon yapan influenza A/WSN/33 (H1N1) virüsünün üremesini inhibe edici yönde etkilediğini rapor etmişlerdir. Dolayısıyla, yaptığımız bu çalışmada Hax-1 proteinin influenza virüsü replikasyonuna etkisinin virüs tipine özgü olup olmadığı sorusuna da yanıt aradı. Bunun için insanlarda enfeksiyon yapan influenza A/WSN/H1N1 ve kuşlarda enfeksiyon yapan influenza A/Duck/Pen/H5N2 virüs tiplerinden yararlanıldı.

Moleküler biyoloji ve moleküler genetik alanındaki gelişmeler, proteinler arasındaki ilişkilerin ve protein işlevlerinin saptanmasında birçok yeni olanaklar sunmaktadır. Bunlardan birisi RNA interferens teknolojisidir. Son 10-15 yılda bu alanda önemli ilerlemeler kaydedilmiş, tıpta kanser tedavisinden viral enfeksiyonların kontrolüne kadar birçok alanda araştırmalara konu olmuştur (Agrawal ve ark., 2003). RNA interferens teknikleri, memeli hücrelerinde oldukça zor olan belirli bir genin inaktive edilmesi (knock out) sorununa geçici bir çözüm

sunmaktadır. siRNA ya da mikroRNA'lar kullanılarak hücrelerde istenilen genin ekspresyonu mRNA düzeyinde geçici olarak baskılanmaktadır. Bu tez çalışmasında da hücrelerde endojen olarak sentez edilen Hax-1 mRNA düzeyini düşürmek ve bu koşullarda viral replikasyonun seyrini izlemek için RNA interferens tekniklerinden yararlanıldı. Bunun için iki farklı yöntem izlendi. Birincisi; Hax-1 genine özgü siRNA'lar ticari olarak sentez ettirildi ve bunların hücrelere transfeksiyonu ile endojen Hax-1 transkript düzeyi düşürüldü. İkincisi; Hax-1 genine özgü mikroRNA (shRNA) kodlayacak DNA dizleri tasarlandı, bu diziler oligonükleotid primerler üzerinden Klenow enzimi ile sentez edildi (**Şekil 10**) ve bu diziler piGENE-Puro plazmit vektörüne klonlandı. Oluşturulan plazmit vektörler piGENE-Hax-1shRNA1 ve piGENE-Hax-1shRNA2 olarak adlandırıldı. piGENE-Puro plazmit vektörüne klonlananHax-1 genine özgü shRNA kodlayan DNA dizileri, DNA dizi analizleri ile kontrol edildi (**Şekil 12**)

Hücrelerde sentez edilen herhangi bir proteinin işlevini saptamakta izlenen yöntemlerden biri, bu proteinin sentez edilmediği ya da düşük miktarlarda sentez edildiğinde ortaya çıkan izlenebilir fenotipik özelliklerin belirlenmesidir. Yukarıda da değinildiği gibi RNA interferens teknolojisi, hücrelerde ele alınan bir proteinin sentezinin baskılanması için kullanışlı bir araçtır. Çalışmamızda da ilk olarak piGENE-Puro plazmitine klonlanarak oluşturulan shRNA vektörleri, transfeksiyon frekansı yüksek olan HEK293 hücrelerine transfekte edilerek, endojen Hax-1 mRNA düzeyi düşürüldü. Transfekte edilen hücrelerden Hax-1 mRNA düzeyleri, reverz transkripsiyon sonrasında yarı-kantitatif PZR ile saptandı. Hücrelerden izole edilen total RNA'lar (**Şekil 25**) üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon reaksiyonu gerçekleştirildi. Elde edilen cDNA'lar kalıp olarak kullanıldı ve Hax-1 genine özgü "Hax-1-428-For"/"Hax-1-725-Rev" primer çifti ile PZR gerçekleştirildi. PZR ürünleri % 6'lık doğal poliakrilamid gel elektroforezi ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, shRNA kodlayan vektörler ile transfekte edilen hücrelerde, kontrol plazmit ile (piGENE-Puro) transfekte hücrelere göre Hax-1 transkript düzeyinin önemli ölçüde azaldığını ortaya koydu (**Şekil 26**). Hax-1 mRNA düzeyi azaltılmış olan HEK293 hücrelerinde insan (A/WSN/H1N1) ve kuş tipi influenza (A/Duck/Pen/H5N2) virüslerinin replikasyonu, virüs ile enfektehücrelerde viral proteinlerden NS1 ve PA proteininin Western melezleme ile karşılaştırılması ile

izlendi. Hax-1 transkript düzeyi azaltılan ve influenza virüsleri ile enfekte edilen hücreler SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı. Elde edilen hücre lizatları SDS-PAGE / Western melezleme ile değerlendirildi. Elde edilen veriler shRNA vektörleri kalıcı olarak transfekte edilen veHax-1 anlatımı azaltılan hücrelerde İnfluenza virüsü replikasyonunun negatif yönde etkilendiği, viral protein miktarlarının azaldığını gösterdi(**Şekil 29**). Daha önce Won-Bo Wang ve diğerleri(Hsu ve ark., 2013) tarafından yapılan çalışmada, Hax-1 proteininin influenza virüsü replikasyonunu inhibe ettiği rapor edilmiştir. Dolayısıyla hücrelerde Hax-1 mRNA miktarında ve buna bağlı olarak Hax-1 proteinindeki azalmanın viral replikasyonu pozitif yönde etkilemesi beklenir. Elde edilen bu sonucun güvenilirliğini arttırmak amacıyla deneyler ticari olarak sentez ettirilen sentetik siRNA'lar ile tekrar edildi. Bu deneylerde HeLa hücreleri kullanıldı. HeLa hücreleri metot kısmında (**5.24.1**) belirtildiği şekilde Hax-1 genine karşı oluşturulmuş sentetik siRNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra, hücrelerden elde edilen total RNA'larda Hax-1 transkript düzeyi RT-PZR ile belirlendi. Elde edilen veriler Hax-1 genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, negatif kontrol siRNA ile karşılaştırıldığında önemli ölçüde azaldığı görüldü (**Şekil 28**). Bu hücreler İnfluenza A virüsü H1N1 ve H5N2 tipleri ile enfekte edildiler. Enfeksiyon sonra yapılan Western melezleme çalışmaları sonuçlarına göre viral protein miktarları Hax-1 miktarı azaltılan hücrelerde kontrol gruplarına nazaran daha az miktarda viral protein tespit edildi (**Şekil 30** ve **31**). Dolayısıyla hem plazmit vektörler üzerinden kodlanan Hax-1 genine özgü shRNA'lar hem de ticari yolla temin edilen siRNA'lar ile *knock down* edilen hücrelerde, daha önce yayınlanmış verilerin aksine influenza virüs replikasyonu negatif yönde etkilendi. Hax-1 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde, influenza virüslerinin replikasyonları immünfloresan teknikleri ile de incelendi. siRNA uygulaması sonrası hücreler H1N1 ve H5N2 tipi virüsler ile enfekte edildi ve infeksiyondan 6 saat sonra, virüse ait PA protein düzeyi kontrol hücreler ile karşılaştırıdı. Bu çalışmalar neticesinde de, Western melezleme deneyleri ile elde edilen sonuçlarla paralellik gösterecek şekilde, siRNA'lar ile transfekte hücrelerde İnfluenza A virüslerinin daha yavaş ürediği tespit edildi (**Şekil 32**-**34**).Hücrelerde sentez edilen belirli bir proteinin işlevinin saptanmasında izlenen yöntemlerden biri de, hücrelerde ele alınan proteinin miktarını

yapay olarak arttırmaktır (*İng. over-expression*)(Turan ve ark., 2004). Memeli hücrelerde protein düzeyini arttırmanın en etkili yollarından biri, konstitütif bir promotör kontrolünde klonlanan genin bir vektör ile hücrelere aktarılması, bir anlamda genin kopya sayısının arttırılmasıdır. Bu çalışmada da memeli hücrelerinde etkin bir şekilde ekspresyon yapan pCHA-Hax1 plazmit vektöründen yararlanıldı. pCHA-Hax1 plazmit vektörü HEK293 hücrelerine aktarıldı ve hücre içi Hax-1 miktarı artırıldı. Bu hücreler İnfluenza A virüsleri ile enfekte edildi ve hücre içi viral protein miktarı Western melezleme yöntemi ile incelendi. Elde edilen veriler Hax-1 miktarı artırılan hücrelerde viral protein miktarının kontrol grubuna nazaran düştüğü tespit edildi (**Şekil 35**).

Hücrelerde Hax-1 proteini miktarındaki artışın viral RNA polimeraz enzimine etkileri, influenza virüsü minireplikon modelleri(Turan ve ark., 2004) ile araştırıldı. Hücre içi Hax-1 protein düzeyi pCHA-Hax1 plazmit vektörünün geçici transfeksiyonu ile arttırıldı. HEK293 hücrelerinde Hax-1 protein miktarındaki artışın, miktardaki artışa bağlı olarak viral RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği saptandı (**Şekil 36**). Bu sonuçlar, Şekil 35'de verilen Western melezleme sonuçları ile paralellik göstermektedir.

Çalışmada RNA interferens teknikleri ile Hax-1 transkript düzeyi baskılanan hücrelerde, influenza virüs replikasyonunun baskılandığı, yukarıda ayrıntıları anlatan farklı yöntemler ile ortaya kondu. Bu sonuçlar, Hax-1 proteininin influenza virüsü replikasyonunu desteklediği anlamına gelmektedir. Buna karşın hücrelerde Hax-1 protein düzeyindeki artışında hem viral replikasyonu yavaşlatması hem de viral RNA polimeraz enzimini inhibe etmesi bu sonuçlar ile tezat oluşturmaktadır. RNA interferens sonuçlarına göre Hax-1 proteinindeki artışın viral replikasyonu pozitif yönde etkilemesi beklenir. RNA- interferens sonuçları daha önce Won-Bo Wang ve diğerleri(Hsu ve ark., 2013) tarafından rapor edilen sonuçlar ile de paralellik göstermemektedir. Bu beklenmedik sonucun memeli hücrelerinde, özellikle çift zincirli RNA molekülleri ile uyarılan interferon mekanizmaları (Karpala ve ark., 2005; Gantier ve Williams, 2007; DeWitte-Orr ve ark., 2009; Chiappinelli ve ark., 2016) ile ilişkili olabileceği düşünülmektedir. İnterferonlar omurgalı organizmalarda, özellikle viral patojenlere karşı hücre içi savunma sisteminin ana aktörlerinden

biridir (Nagano ve Kojima, 1958;Isaacs ve Lindenmann, 1987; Chelbi-Alix ve Wietzerbin, 2007). Protein yapıda sitokinler içerisinde değerlendirilen interferonlar influenza virüsleri ile birlikte birçok RNA genomu taşıyan virüslerin, hücre içerisinde replikasyonunu engelleyici etki gösterirler. Ayrıca hücre içerisindeki çift zincirli RNA moleküllerininde interferon sistemini uyarıcı etkilerinin olabileceği bilinmektedir. Bu durumu göz önünde bulundurursak RNAi teknolojisi ile İnfluenza virüsünü kısmen inhibe edici etkisi bulunan Hax-1 proteini miktarını azaltırken, İnfluenza virüsünü güçlü bir şekilde inhibe eden interferon mekanizmasını aktive etmiş olabiliriz. Minireplikon ve Hax-1 aşırı expresyon deneylerinin sonuçlarınıda göz önünde bulundurursak shRNA ve siRNA deneylerinin diğer deneylere ve daha önce yapılan çalışmalara zıt sonuç vermesinin sebebi uyarılan interferon sistemi olabilir. Diğer taraftan bu yaklaşımın doğruluğunun, Hax-1 genine özgü shRNA molekületi sentez edilen ya da sentetik siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde, interferon mekanizması ile ilişkili protein miktarlarının saptanması gerekmektedir. Buna karşın, gerek zamanın sınırlı olması gerekse laboratuvar olanaklarının sınırlı olması nedeniyle bu yönde bir çalışma yapılmamıştır.

Bu çalışma kapsamında, maya hücrelerinde influenza virüsü PA proteini ile fiziksel etkileşimi saptanan Hax-1 proteinin, memeli hücrelerindeki etkileşimi *Glutation Sepharose* ile çöktürme yöntemi ile araştırıdı.Bunun için GST uzantılı PA proteinleri kodlayan plazmit vektörleri oluşturuldu (**Şekil 16** ve **17**). Bu vektörler HA uzantılı Hax-1 proteini kodlayan pCHA-Hax1 plazmiti ile birlikte HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Hücrelerden hazırlanan lizatlarda HA-Hax-1 ve GST-PA proteinleri arasındaki ilişki Western melezleme ile analiz edildi (**Şekil 37**). Elde edilen sonuçlar, uygulanan deney koşullarında GST-PA ile HA-Hax-1 arasında fiziksel etkileşim olmadığı sonucunu verdi. Bununla birlikte elde edilen bu veriler viral PA proteini ile Hax-1 proteini arasında kesin olarak fiziksel bir etkileşim olmadığı sonucunu vermez. Bu proteinlerin hücre içiresinde farklı zaman ve faklı koşullarda farklı lokalizasyon göstermeleri, GST ve/veya HA uzantılarının olası etkileşimi engellemesi olasılıklarının göz önünde bulundurulması gerekir. Hax-1 proteininin sitoplazmada, daha çok mitokondiyal lokalizasyon gösterdiği,buna karşılık PA proteininin nükleusta lokalize olduğu bilinmektedir. Bu lokalizasyon farkı enfeksiyonun büyük çoğunluğunda iki proteinin etkileşimini engelleyebilir ve

sadece sınırlı bir zaman aralığında iki proteine etkileşim şansı verebilir. Bu sebeplerden dolayı elde ettiğimiz GST-birlikte çökelme deneylerinin sonuçları iki protein arasında etkileşim olmadığını göstermek için yeterli olmamaktadır. Memeli hücrelerinde Hax-1 proteini ile PA arasındaki olası fiziksel etkileşimin farklı deney koşullarında, birlikte immun-çökelme gibi farklı yöntemler ile tekrar edilmesi test edilmesi daha sağlıklı sonuçlar verecektir.

Yaptığımız çalışmanın birçok aşmasında hem insan tipi (A/WSN/H1N1) hem de kuş tipi (A/Duck/Pen/H1N1) virüs kullanıldı ve Hax-1 konak proteininin farklı virüs tiplerine etkileri karşılaştırıldı. Elde edilen sonuçlar Hax-1 proteininin etkilerinin virüs tipine özgü olmadığı, her iki virüs tipi üzerinde de benzer etkilere sahip olduğunu gösterdi.

Sonuç olarak, bu tez çalışmasında, influenza virüsü RNA polimeraz enzimi ile ilişkilendirilen ve maya ikili-hibrit metodu ile viral PA proteini ile ilişkisi belirlenen Hax-1 proteinin, farklı influenza virüs replikasyonuna etkileri, farklı yöntemler izlenerek araştırıldı. RNA interferens teknikleri ile elde edilen sonuçlar ile paralellik göstermemekle birlikte, Hax-1 proteininin influenza virüsü replikasyonunu negatif yönde etkilediği ve bu etkinin virüs tipine bağlı olmadığı saptandı. shRNA ve siRNA'lar ile elde edilen sonuçların, hücrelerde sentez edilen ya da dışarıdan hücrelere aktarılan çift zincirli RNA moleküllerinin interferon mekanizmasını harekete geçirerek influenza virüsü replikasyonunu yavaşlatmasından kaynaklandığı düşünülmektedir. Memeli hücrelerinde Hax-1 proteini ile viral PA proteini arasındaki olası fiziksel etkileşimin saptanmasında *Glutation Sepharese* ile çöktürme metodunun yeterli olmadığı sonucuna varıldı.

8. KAYNAKLAR

Agrawal N, Dasaradhi, PV, Mohmmed, A, Malhotra, P, Bhatnagar, RK, Mukherjee, SK. RNA interference: biology, mechanism, and applications. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2003;*67:*657-685

Albo C, Valencia, A, Portela, A. Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. *J Virol.* 1995;*69:*3799-3806

Aranda PS, LaJoie, DM, Jorcyk, CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis.* 2012;*33:*366-369

Banerjee A, Saito, K, Meyer, K, Banerjee, S, Ait-Goughoulte, M, Ray, RB, Ray, R. Hepatitis C virus core protein and cellular protein HAX-1 promote 5-fluorouracil-mediated hepatocyte growth inhibition. *J Virol.* 2009;*83:*9663-9671

Basu D, Walkiewicz, MP, Frieman, M, Baric, RS, Auble, DT, Engel, DA. Novel influenza virus NS1 antagonists block replication and restore innate immune function. *J Virol.* 2009;*83:*1881-1891

Bernstein E, Caudy, AA, Hammond, SM, Hannon, GJ. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* 2001;*409:*363-366

Blaas D, Patzelt, E, Kuechler, E. Identification of the cap binding protein of influenza virus. *Nucleic Acids Res.* 1982;*10:*4803-4812

Boulo S, Akarsu, H, Ruigrok, RW, Baudin, F. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res.* 2007;*124:*12-21

Bouvier NM, Palese, P. The biology of influenza viruses. *Vaccine.* 2008;*26 Suppl 4:*D49-53

Braam J, Ulmanen, I, Krug, RM. Molecular model of a eucaryotic transcription complex: functions and movements of influenza P proteins during capped RNA-primed transcription. *Cell.* 1983;*34:*609-618

Burgui I, Yanguez, E, Sonenberg, N, Nieto, A. Influenza virus mRNA translation revisited: is the eIF4E cap-binding factor required for viral mRNA translation? *J Virol.* 2007;*81:*12427-12438

Chelbi-Alix MK, Wietzerbin, J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. *Biochimie.* 2007;*89:*713-718

Chen W, Calvo, PA, Malide, D, Gibbs, J, Schubert, U, Bacik, I, Basta, S, O'Neill, R, Schickli, J, Palese, P, Henklein, P, Bennink, JR, Yewdell, JW. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. *Nat Med.* 2001;*7:*1306-1312

Chiappinelli KB, Strissel, PL, Desrichard, A, Li, H, Henke, C, Akman, B, Hein, A, Rote, NS, Cope, LM, Snyder, A, Makarov, V, Budhu, S, Slamon, DJ, Wolchok, JD, Pardoll, DM, Beckmann, MW, Zahnow, CA, Merghoub, T, Chan, TA, Baylin, SB, Strick, R. Inhibiting DNA Methylation Causes an Interferon Response in Cancer via dsRNA Including Endogenous Retroviruses. *Cell.* 2016;*164:*1073

Conner SD, Schmid, SL. Regulated portals of entry into the cell. *Nature.* 2003;*422:*37-44

Correspondent, Antigenic shift and drift. *Nature.* 1980;*283:*524-525

Couch RB. (1996). Orthomyxoviruses. In S. Baron (Ed.), *Medical Microbiology* (4th ed.). Galveston (TX).

Cros JF, Palese, P. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res.* 2003;*95:*3-12

DeWitte-Orr SJ, Mehta, DR, Collins, SE, Suthar, MS, Gale, M, Jr., Mossman, KL. Long double-stranded RNA induces an antiviral response independent of IFN regulatory factor 3, IFN-beta promoter stimulator 1, and IFN. *J Immunol.* 2009;*183:*6545-6553

Dhar R, Chanock, RM, Lai, CJ. Nonviral oligonucleotides at the 5' terminus of cytoplasmic influenza viral mRNA deduced from cloned complete genomic sequences. *Cell.* 1980;*21:*495-500

Dufva M, Olsson, M, Rymo, L. Epstein-Barr virus nuclear antigen 5 interacts with HAX-1, a possible component of the B-cell receptor signalling pathway. *J Gen Virol.* 2001;*82:*1581-1587

Earp LJ, Delos, SE, Park, HE, White, JM. The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;*285:*25-66

Elleman CJ, Barclay, WS. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. *Virology.* 2004;*321:*144-153

Fadeel B, Grzybowska, E. HAX-1: a multifunctional protein with emerging roles in human disease. *Biochim Biophys Acta.* 2009;*1790:*1139-1148

Fan S, Hatta, M, Kim, JH, Le, MQ, Neumann, G, Kawaoka, Y. Amino acid changes in the influenza A virus PA protein that attenuate avian H5N1 viruses in mammals. *J Virol.* 2014;*88:*13737-13746

Filippov V, Solovyev, V, Filippova, M, Gill, SS. A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene.* 2000;*245:*213-221

Fodor E, Crow, M, Mingay, LJ, Deng, T, Sharps, J, Fechter, P, Brownlee, GG. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase inhibits endonucleolytic cleavage of capped RNAs. *J Virol.* 2002;*76:*8989-9001

Fodor E, Mingay, LJ, Crow, M, Deng, T, Brownlee, GG. A single amino acid mutation in the PA subunit of the influenza virus RNA polymerase promotes the generation of defective interfering RNAs. *J Virol.* 2003;*77:*5017-5020

Gabriel G, Dauber, B, Wolff, T, Planz, O, Klenk, HD, Stech, J. The viral polymerase mediates adaptation of an avian influenza virus to a mammalian host. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2005;*102:*18590-18595

Gantier MP, Williams, BR. The response of mammalian cells to double-stranded RNA. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2007;*18:*363-371

Garcia-Sastre A, Egorov, A, Matassov, D, Brandt, S, Levy, DE, Durbin, JE, Palese, P, Muster, T. Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. *Virology.* 1998;*252:*324-330

Gimsa U, Grotzinger, I, Gimsa, J. Two evolutionary strategies of influenza viruses to escape host non-specific inhibitors: alteration of hemagglutinin or neuraminidase specificity. *Virus Res.* 1996;*42:*127-135

Gonzalez S, Zurcher, T, Ortin, J. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. *Nucleic Acids Res.* 1996;*24:*4456-4463

Gottschalk A. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. *Biochim Biophys Acta.* 1957;*23:*645-646

Graham FL, van der Eb, AJ. A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology.* 1973;*52:*456-467

Gultyaev AP, Fouchier, RA, Olsthoorn, RC. Influenza virus RNA structure: unique and common features. *Int Rev Immunol.* 2010;*29:*533-556

Han Y, Chen, YS, Liu, Z, Bodyak, N, Rigor, D, Bisping, E, Pu, WT, Kang, PM. Overexpression of HAX-1 protects cardiac myocytes from apoptosis through caspase-9 inhibition. *Circ Res.* 2006;*99:*415-423

Hobday RA, Cason, JW. The open-air treatment of pandemic influenza. *Am J Public Health.* 2009;*99 Suppl 2:*S236-242

Honda A, Mizumoto, K, Ishihama, A. RNA polymerase of influenza virus. Dinucleotide-primed initiation of transcription at specific positions on viral RNA. *J Biol Chem.* 1986;*261:*5987-5991

Hsieh YH, Chan, CH. Excess healthcare burden during 1918-1920 influenza pandemic in Taiwan: implications for post-pandemic preparedness. *BMC Public Health.* 2011;*11:*41

Hsu WB, Shih, JL, Shih, JR, Du, JL, Teng, SC, Huang, LM, Wang, WB. Cellular protein HAX-1 interacts with the influenza A virus PA polymerase subunit and impedes its nuclear translocation. *J Virol.* 2013;*87:*110-123

Huang Q, Sivaramakrishna, RP, Ludwig, K, Korte, T, Bottcher, C, Herrmann, A. Early steps of the conformational change of influenza virus hemagglutinin to a fusion active state: stability and energetics of the hemagglutinin. *Biochim Biophys Acta.* 2003;*1614:*3-13

Huarte M, Falcon, A, Nakaya, Y, Ortin, J, Garcia-Sastre, A, Nieto, A. Threonine 157 of influenza virus PA polymerase subunit modulates RNA replication in infectious viruses. *J Virol.* 2003;*77:*6007-6013

İbişoğlu Ş. *Rekombinant Olarak Üretilecek Çözünür Halde Glukagon Reseptör Proteininin Glukagona Olan İlgisinin Araştırılması.*M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2015, (Danışman: Prof. Dr. K Turan).

Influenza WCCfRaRo (Producer). (2016, 31.01.2016). About Influenza. Retrieved from http://www.influenzacentre.org/aboutinfluenza.htm

Isaacs A, Lindenmann, J. Virus interference. I. The interferon. By A. Isaacs and J. Lindenmann, 1957. *J Interferon Res.* 1987;*7:*429-438

Jones HW, Jr., McKusick, VA, Harper, PS, Wuu, KD. George Otto Gey. (1899-1970). The HeLa cell and a reappraisal of its origin. *Obstet Gynecol.* 1971;*38:*945-949

Jones IM, Reay, PA, Philpott, KL. Nuclear location of all three influenza polymerase proteins and a nuclear signal in polymerase PB2. *EMBO J.* 1986;*5:*2371-2376

Karpala AJ, Doran, TJ, Bean, AG. Immune responses to dsRNA: implications for gene silencing technologies. *Immunol Cell Biol.* 2005;*83:*211-216

Kawakami K, Ishihama, A, Ohtsuka, E, Tanaka, T, Takashima, H, Ikehara, M. RNA polymerase of influenza virus. II. Influence of oligonucleotide chain length on the priming activity of RNA synthesis by virion-associated RNA polymerase. *J Biochem.* 1981;*89:*1759-1768

Kawaoka Y, Neumann, G. Influenza viruses: an introduction. *Methods Mol Biol.* 2012;*865:*1-9

Ketting RF, Fischer, SE, Bernstein, E, Sijen, T, Hannon, GJ, Plasterk, RH. Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in C. elegans. *Genes Dev.* 2001;*15:*2654-2659

Kochs G, Garcia-Sastre, A, Martinez-Sobrido, L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. *J Virol.* 2007;*81:*7011-7021

Konig R, Stertz, S, Zhou, Y, Inoue, A, Hoffmann, HH, Bhattacharyya, S, Alamares, JG, Tscherne, DM, Ortigoza, MB, Liang, Y, Gao, Q, Andrews, SE, Bandyopadhyay, S, De Jesus, P, Tu, BP, Pache, L, Shih, C, Orth, A, Bonamy, G, Miraglia, L, Ideker, T, Garcia-Sastre, A, Young, JA, Palese, P, Shaw, ML, Chanda, SK. Human host factors required for influenza virus replication. *Nature.* 2010;*463:*813-817

Kupferschmidt K. A lethal dose of RNA. *Science.* 2013;*341:*732-733

Lakadamyali M, Rust, MJ, Zhuang, X. Endocytosis of influenza viruses. *Microbes Infect.* 2004;*6:*929-936

Lamb RA, Choppin, PW. Segment 8 of the influenza virus genome is unique in coding for two polypeptides. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;*76:*4908-4912

Lan YC, Su, MC, Chen, CH, Huang, SH, Chen, WL, Tien, N, Lin, CW. Epidemiology of pandemic influenza A/H1N1 virus during 2009-2010 in Taiwan. *Virus Res.* 2013;*177:*46-54

Lee AY, Lee, Y, Park, YK, Bae, KH, Cho, S, Lee, DH, Park, BC, Kang, S, Park, SG. HS 1-associated protein X-1 is cleaved by caspase-3 during apoptosis. *Mol Cells.* 2008;*25:*86-90

Lee RC, Feinbaum, RL, Ambros, V. The C. elegans heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell.* 1993;*75:*843-854

Marsh M, Helenius, A. Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res.* 1989;*36:*107-151

Matrosovich MN, Matrosovich, TY, Gray, T, Roberts, NA, Klenk, HD. Human and avian influenza viruses target different cell types in cultures of human airway epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004a;*101:*4620-4624

Matrosovich MN, Matrosovich, TY, Gray, T, Roberts, NA, Klenk, HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. *J Virol.* 2004b;*78:*12665-12667

Meister G, Tuschl, T. Mechanisms of gene silencing by double-stranded RNA. *Nature.* 2004;*431:*343-349

Nagano Y, Kojima, Y. [Inhibition of vaccinia infection by a liquid factor in tissues infected by homologous virus]. *C R Seances Soc Biol Fil.* 1958;*152:*1627-1629

Nakajima K. [The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]. *Nihon Rinsho.* 2003;*61:*1897-1903

Napoli C, Lemieux, C, Jorgensen, R. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell.* 1990;*2:*279-289

Neumann G, Castrucci, MR, Kawaoka, Y. Nuclear import and export of influenza virus nucleoprotein. *J Virol.* 1997;*71:*9690-9700

O'Neill RE, Talon, J, Palese, P. The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. *EMBO J.* 1998;*17:*288-296

Oxford JS, McGeoch, DJ, Schild, GC, Beare, AS. Analysis of virion RNA segments and polypeptides of influenza A virus recombinants of defined virulence. *Nature.* 1978;*273:*778-779

Palese P, and Schulman, J. L. Differences in RNA patterns of influenza A viruses. *Journal of Virology.* 1976;*17:*876-884

Palese P, Tobita, K, Ueda, M, Compans, RW. Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. *Virology.* 1974;*61:*397-410

Pappas C, Aguilar, PV, Basler, CF, Solorzano, A, Zeng, H, Perrone, LA, Palese, P, Garcia-Sastre, A, Katz, JM, Tumpey, TM. Single gene reassortants identify a critical role for PB1, HA, and NA in the high virulence of the 1918 pandemic influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;*105:*3064-3069

Peter Palese MLS. (2007). Orthomyxoviridae: The Viruses and Their Replication. In P. M. H. David M. Knipe (Ed.), *Fields Virology* (5 ed., Vol. 1, pp. 1648-1689): Lippincott Williams & Wilkins.

Pinto LH, Holsinger, LJ, Lamb, RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. *Cell.* 1992;*69:*517-528

Pirinçal A. *İnfluenza Virüsü NS1 Proteini İle İlişkili Hücresel Faktörlerin Maya İkili Hibrid Metodu İle Saptanması.*M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2014, (Danışman: Prof. Dr. K Turan).

Plotch SJ, Bouloy, M, Krug, RM. Transfer of 5'-terminal cap of globin mRNA to influenza viral complementary RNA during transcription in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1979;*76:*1618-1622

Plotch SJ, Bouloy, M, Ulmanen, I, Krug, RM. A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. *Cell.* 1981;*23:*847-858

Pons MW. Isolation of influenza virus ribonucleoprotein from infected cells. Demonstration of the presence of negative-stranded RNA in viral RNP. *Virology.* 1971;*46:*149-160

Poole E, Elton, D, Medcalf, L, Digard, P. Functional domains of the influenza A virus PB2 protein: identification of NP- and PB1-binding sites. *Virology.* 2004;*321:*120-133

Racaniello VR, Palese, P. Influenza B virus genome: assignment of viral polypeptides to RNA segments. *J Virol.* 1979;*29:*361-373

Radhika V, Onesime, D, Ha, JH, Dhanasekaran, N. Galpha13 stimulates cell migration through cortactin-interacting protein Hax-1. *J Biol Chem.* 2004;*279:*49406-49413

Ramsay AG, Keppler, MD, Jazayeri, M, Thomas, GJ, Parsons, M, Violette, S, Weinreb, P, Hart, IR, Marshall, JF. HS1-associated protein X-1 regulates carcinoma cell migration and invasion via clathrin-mediated endocytosis of integrin alphavbeta6. *Cancer Res.* 2007;*67:*5275-5284

Reed SE, Staley, EM, Mayginnes, JP, Pintel, DJ, Tullis, GE. Transfection of mammalian cells using linear polyethylenimine is a simple and effective means of producing recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol Methods.* 2006;*138:*85-98

Sanz-Ezquerro JJ, de la Luna, S, Ortin, J, Nieto, A. Individual expression of influenza virus PA protein induces degradation of coexpressed proteins. *J Virol.* 1995;*69:*2420-2426

Sanz-Ezquerro JJ, Fernandez Santaren, J, Sierra, T, Aragon, T, Ortega, J, Ortin, J, Smith, GL, Nieto, A. The PA influenza virus polymerase subunit is a phosphorylated protein. *J Gen Virol.* 1998;*79 (Pt 3):*471-478

Shapiro GI, Krug, RM. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. *J Virol.* 1988;*62:*2285-2290

Shinya K, Hamm, S, Hatta, M, Ito, H, Ito, T, Kawaoka, Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. *Virology.* 2004;*320:*258-266

Sieczkarski SB, Whittaker, GR. Viral entry. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2005;*285:*1-23

Skehel JJ, Wiley, DC. Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem.* 2000;*69:*531-569

Stegmann T. Membrane fusion mechanisms: the influenza hemagglutinin paradigm and its implications for intracellular fusion. *Traffic.* 2000;*1:*598-604

Stegmann T, Morselt, HW, Scholma, J, Wilschut, J. Fusion of influenza virus in an intracellular acidic compartment measured by fluorescence dequenching. *Biochim Biophys Acta.* 1987;*904:*165-170

Steinhauer DA. Role of hemagglutinin cleavage for the pathogenicity of influenza virus. *Virology.* 1999;*258:*1-20

Suzuki Y. Host mediated variation and receptor binding specificity of influenza viruses. *Adv Exp Med Biol.* 2001;*491:*445-451

Suzuki Y, Demoliere, C, Kitamura, D, Takeshita, H, Deuschle, U, Watanabe, T. HAX-1, a novel intracellular protein, localized on mitochondria, directly associates with HS1, a substrate of Src family tyrosine kinases. *J Immunol.* 1997;*158:*2736-2744

Takahashi T, Hashimoto, A, Maruyama, M, Ishida, H, Kiso, M, Kawaoka, Y, Suzuki, Y, Suzuki, T. Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. *FEBS Lett.* 2009;*583:*3171-3174

Tamm LK, Abildgaard, F, Arora, A, Blad, H, Bushweller, JH. Structure, dynamics and function of the outer membrane protein A (OmpA) and influenza hemagglutinin fusion domain in detergent micelles by solution NMR. *FEBS Lett.* 2003;*555:*139-143

Turan K KA, Harada Y, Nagata K,. (2011). *Comparison of Avian and Human Influenza Virus RNA Polymerases in Mammalian Cells*. Paper presented at the XVth International Congress of Virology, Japan.

Turan K, Mibayashi, M, Sugiyama, K, Saito, S, Numajiri, A, Nagata, K. Nuclear MxA proteins form a complex with influenza virus NP and inhibit the transcription of the engineered influenza virus genome. *Nucleic Acids Res.* 2004;*32:*643-652

Vafiadaki E, Arvanitis, DA, Pagakis, SN, Papalouka, V, Sanoudou, D, Kontrogianni-Konstantopoulos, A, Kranias, EG. The anti-apoptotic protein HAX-1 interacts with SERCA2 and regulates its protein levels to promote cell survival. *Mol Biol Cell.* 2009;*20:*306-318

Valcarcel J, Fortes, P, Ortin, J. Splicing of influenza virus matrix protein mRNA expressed from a simian virus 40 recombinant. *J Gen Virol.* 1993;*74 (Pt 7):*1317-1326

Verdel A, Jia, S, Gerber, S, Sugiyama, T, Gygi, S, Grewal, SI, Moazed, D. RNAi-mediated targeting of heterochromatin by the RITS complex. *Science.* 2004;*303:*672-676

Vines A, Wells, K, Matrosovich, M, Castrucci, MR, Ito, T, Kawaoka, Y. The role of influenza A virus hemagglutinin residues 226 and 228 in receptor specificity and host range restriction. *J Virol.* 1998;*72:*7626-7631

Wang P, Song, W, Mok, BW, Zhao, P, Qin, K, Lai, A, Smith, GJ, Zhang, J, Lin, T, Guan, Y, Chen, H. Nuclear factor 90 negatively regulates influenza virus replication by interacting with viral nucleoprotein. *J Virol.* 2009;*83:*7850-7861

Yedavalli VS, Shih, HM, Chiang, YP, Lu, CY, Chang, LY, Chen, MY, Chuang, CY, Dayton, AI, Jeang, KT, Huang, LM. Human immunodeficiency virus type 1 Vpr interacts with antiapoptotic mitochondrial protein HAX-1. *J Virol.* 2005;*79:*13735-13746

9. ÖZGEÇMİŞ

Adı	Hasan	**Soyadı**	Uğurlu
Doğum Yeri	Çayeli-Rize	**Doğum Tarihi**	22.07.1992
Uyruğu	TC	**Telefon**	+905057925880
E-mail	hasanrize@hotmail.com		

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurum	**Mezun Olduğu Yıl**
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Biyokimya	2016
Lisans	İstanbul Üniversitesi/Fen Fakültesi/Moleküler Biyoloji ve Genetik	2014
Lise	Rize Fen Lisesi/Sayısal	2010

İş deneyimi

Pozisyon	**Kurum**	**Süre**
Stajyer	Winogradsky Mikrobiyoloji Enstitüsü Bakterofaj Laboratuvarı/Moskova	20.01.2014-20.02.2014
Stajyer	Zeynep Kamil Kadın ve Çocuk Hastalıkları Eğitim ve Araştırma Hastahanesi Sitogenetik Laboratuvarı/İstanbul	25.06.2012-25.08.2012

Yabancı Dil	**Okuma**	**Dinleme**	**Yazma**	**Konuşma**
İngilizce	İyi	İyi	İyi	İyi

Yabancı Dil Sınavı Notu								
YDS	ÜDS	IELTS	TOEFL IBT	TOEFL CBT	FCE	CAE	CPE	PTE
63,75		6,5						

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	89,96457	87,82602	71,73173

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanım Becerisi**
Microsoft Office Word	İyi
Microsoft Office Power Point	İyi
Microsoft Office Excel	İyi

EK: Diğer Bilimsel Faaliyetler (yayın, kongre bildirisi vs.)

Uğurlu H, Turan K, “Avian and Human Type Influenza Virus Replication in Hax-1 Gene Knock Down Cells”, IVEK 2nd International Convention of Pharmaceutical and Pharmacies, November 27-29, P-141, Istanbul, Turkey, 2015.