TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

FARE Mx2 PROTEİNİNİN İNFLUENZA VİRÜSÜ RNA POLİMERAZ ENZİMİNE ETKİLERİNİN ARAŞTIRILMASI

İlkyaz ERKAN

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Doç. Dr. Kadir TURAN

İSTANBUL - 2013

TEZ ONAYI

Kurum	: Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü
Programın seviyesi	: Yüksek Lisans
Anabilim Dalı	: Eczacılık Fakültesi / Biyokimya Anabilim Dalı
Tez Sahibi	: İlkyaz ERKAN
Tez Başlığı	: Fare Mx2 Proteininin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması
Sınav Yeri	: M.Ü., Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı
Sınav Tarihi	: 20.09.2013

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

Danışman (Unvan, Adı, Soyadı)	**Kurumu**	**İmza**
Sınav Jüri Üyeleri (Unvan, Adı, Soyadı)		
Doç. Dr. Kadir TURAN (Danışman)	Eczacılık Fak., Eczacılık Temel Bil. Anabilim Dalı	
Prof.Dr.Azize ŞENER	Eczacılık Fak., Biyokimya Anabilim Dalı	
Yrd.Doç.Dr. Erkan RAYAMAN	Eczacılık Fak., Farmasötik Mikrobiyoloji Anabilim Dalı	

Yukarıdaki jüri kararı Enstitü Yönetim Kurulu'nun 07./10./2013 tarih ve 45 sayılı kararı ile onaylanmıştır.

F. Arıcıoğlu

Prof. Dr. Feyza ARICIOĞLU
Sağlık Bilimleri Enstitüsü Müdürü

I.TEŞEKKÜR

Tez çalışmamda, tüm bilgisini benimle paylaşan ve bana yol gösteren değerli hocam Doç. Dr. Kadir Turan'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatımın her döneminde bana destek olan ve hiçbir fedakarlıktan kaçınmayıp her zaman yanımda olan annem ve babama sonsuz teşekkür edip minnettarlığımı sunarım.

İlkyaz ERKAN

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından "Mx Proteinlerinin Farklı İnfluenza Virüs Tiplerine Özgü RNA Polimeraz Enzimlerine Etkilerinin Araştırılması" konulu ve "SAG-A-040712-0260" numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

I.Teşekkür..... i
II.İçindekiler……..... ii
III.Kısaltmalar……..... iii
IV.Şekil ve Tablo Listesi..... iv
*i.*Şekil Listesi…….....…….. vi
*ii.*Tablo Listesi……..... vii

II. İÇİNDEKİLER

1. ÖZET ……..…..... 1
2. SUMMARY…..……..... 2
3. GİRİŞ VE AMAÇ……..……..... 3
4. GENEL BİLGİLER……..... 5
4.1. İnfluenza Virüsleri……..... 5
4.2. İnfluenza Virüslerine Karşı Hücresel Savunma Mekanizmaları…..... 13
4.3. Mx Proteinleri……..... 18
5. GEREÇ VE YÖNTEM……..... 24
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler……..……..... 24
5.2. Enzimler……..... 25
5.3. Ticari Kitler……..... 25
5.4. Cihaz ve Gereçler……..... 25
5.5. Besiyerleri……..... 26
5.5.1.Luria Bertani (LB) Besiyeri..... 26
5.5.2.Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri..... 26
5.5.3.Memeli Hücre Kültürleri İçin Besiyerleri..... 26
5.6. Çözeltiler……..... 27
5.6.1. Sodyum Hidroksit Çözeltisi (2 N) 27
5.6.2. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi (% 10 –a/h)..... 27
5.6.3. Hidroklorik Asit Çözeltisi (3 N) 27
5.6.4. Potasyum Asetat Çözeltisi (3 M)..... 27
5.6.5. Sodyum Klorür Çözeltisi (2.5 M) 27
5.6.6. Pipes Çözeltisi (1 M) 27
5.6.7. Kalsiyum Klorür Çözeltisi (2.5 M) 27

5.6.8. Potasyum Klorür Çözeltisi (2.5 M) 28
5.6.9. $MnCl_2$ Çözeltisi (0.55M) 28
5.6.10. Lamel Kapatma Çözeltisi..... 28
5.6.11. Polietilen Glikol Çözeltisi (% 40 –a/h) 28
5.6.12. Glikoz Çözeltisi (1 M) 28
5.6.13. %70 Etil Alkol..... 28
5.6.14. Fenol : Kloroform : İzoamil Alkol (25:24:1) 28
5.6.15. Etidyum Bromür (10 mg/ml) 29
5.6.16. Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)..... 29
5.6.17. Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (50x) 29
5.6.18. 3-(N-morpholino)propanesulfonik Asit (MOPS) Tamponu (10x)..... 29
5.6.19. Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10 – a/h)..... 29
5.6.20. Tris-Cl Tamponu (1 M, pH: 8.0) 29
5.6.21. Tris/ EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0)..... 29
5.6.22. Polietilenglikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M)..... 30
5.6.23. 6x DNA Yükleme Tamponu..... 30
5.6.24. 2x RNA Yükleme Tamponu..... 30
5.6.25. DNA Ekstraksyon Tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0) 30
5.6.26. DNA Ekstraksyon Tamponu II (0,2 N NaOH, % 1 SDS)..... 30
5.6.27. DNA Ekstraksyon Tamponu (3 M Potasyum : 5 M Asetat)..... 30
5.6.28. Sodyum Asetat Tamponu (3 M) 30
5.6.29. Akrialmid/bis-Akrilamid Çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-Akrilamid –a/h) 30
5.6.30. 4x Konsantre Jel Çözeltisi-B (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8).... 31
5.6.31. 4x Konsantre Jel Çözeltisi-C (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8)... 31
5.6.32. 5x Tris Glisin Tamponu (0.125 M Tris, 0.25 M Glisin, pH:8.3)..... 31
5.6.33. Akrilamid Jel Elektroforez Tamponu: (0.025 M Tris, 0.05 M Glisin, %0.1 – a/h SDS, pH 8.3) 31
5.6.34. 4x Protein Yükleme Tamponu (0.25 M Tris; % 4 SDS – a/h; % 0.002 Bromophenol blue – a/h ; % 4 2-beta-Merkaptoetanol - h/h; % 40 Gliserin– h/h, pH:6.8) 31
5.6.35. Bakteri Transformasyon Tamponu..... 31
5.6.36. 5x Tamponlanmış Fizyolojik Tuzlu Su (T-FTS)..... 31
5.6.37. 20x TBS Tamponu..... 32
5.6.38. TBS-T Tamponu..... 32

5.6.39. Bloklama Çözeltisi (% 5 lik Yağsız Süt Tozu) 32
5.6.40. Protein Transfer Tamponu..... 32
5.7. Plazmit Vektörler……..... 32
5.8. Escherichia coli……..... 32
5.9. Memeli Hücre Hatları……..... 33
5.10. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Elektroforez……..... 33
5.11. Spektrofotometrik yöntemle DNA' nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi..... 33
5.12. Transformasyon için Escherichia coli Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi 33
5.13. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması……..... 34
5.14. Fare Mx2 cDNA' sının Hazırlanması……..... 34
5.14.1. Swiss 3T3 Hücrelerinden Total RNA' nın İzole Edilmesi…..... 34
5.14.2. Formaldehit İçeren Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez……. 35
5.14.3. cDNA'ların Hazırlanması ve Fare Mx2 Geninin PCR ile Çoğaltılması..... 35
5.15. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi ve Saflaştırılması 36
5.16. pCHA-Mx2 Plazmid Vektörünün Oluşturulması……..... 36
5.16.1. pCHA Plazmit DNA'nın EcoRV ile Kesilmesi..... 36
5.16.2.pCHA ve Mx2 DNA'nın Ligasyonu ve Transformasyon……..... 37
5.16.3.pCHA-Mx2 Vektörü Taşıyan Bakteri Kolonilerini Saptanması…..... 37
5.16.4. Küçük Ölçekte Plazmit DNA'ları Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Kontrol edilmesi..... 38
5.16.5. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizler 38
5.17. SV40 T Antijeni Nüklear Lokalizasyon Sinyali Taşıyan Fare Mx2 Geninin Elde Edilmesi..... 38
5.18. pCHA-nMx2 Vektörünün Oluşturulması..... 39
5.19.Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması……..... 39
5.20. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Aktarılması (Transfeksiyon)..... 40
5.21. Mx2 Gen Ekspresyonunun Western Melezleme Yöntemi ile Kontrolü…..... 40
5.21.1. HEK293 Hücrelerinin pCHA-Mx2 Plazmiti ile Transfeksiyonu..... 40
5.21.2. Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması……..... 40
5.21.3. Proteinlerin Jelde Yürütülmesi ve Nitrosellüloz Membrana Transfer Edilmesi 41

5.21.4. Mx2 Proteinlerinin Görüntülenmesi……..... 41
5.22. Fare Mx2 Proteininin Hücre İçerisindeki Lokalizasyonunun İmmünfluoresans Yöntemiyle Saptanması……..... 42
5.22.1. Swiss3T3 Hücrelerinin Plazmit DNA ile Transfeksiyonu…..... 42
5.22.2. Mx2 Proteinlerinin Swiss3T3 Hücrelerinde İmmünfluoresans Yöntemle Görüntülenmesi……..... 42
5.23. Mx2 proteininin influenza RNA polimeraz enzimine etkilerinin araştırılması. 43
5.23.1. Mx2 proteinlerinin Swiss3T3 Hücrelerinde Viral Polimeraz Enzimine Etkisinin İncelenmesi..... 43
5.23.2. Mx2 proteinlerinin HEK293 Hücrelerinde Viral Polimeraz Enzimine Etkisinin İncelenmesi……..... 44
5.23.3. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Lüsiferaz Aktivitesinin Ölçülmesi 44
5.23.4. Kültürlerde SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi……..... 45
6. BULGULAR……..... 46
6.1. Fare Mx2 Geni Taşıyan Memeli Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması…... 46
6.1.1. Fare Mx2 Geni cDNA'sının Elde Edilmesi……..... 46
6.1.2. pCHA-Mx2 Vektörünün Oluşturulması……..... 49
6.1.3. pCHA-Mx2 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi……..... 50
6.1.4. pCHA-Mx2 Vektöründe Mx2 Geninin DNA Dizi Analizi ile Kontrol Edilmesi..... 50
6.1.5. pCHA-nMx2 Vektörünün Oluşturulması……..... 51
6.1.6. pCHA-nMx2 VektörününRestriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi..... 52
6.1.7.pCHA-nMx2 Vektöründe Mx2 Geninin DNA Dizi Analizi ile Kontrol Edilmesi..... 53
6.2. pCHA-Mx2 Vektörünün Mx2 Proteini Kodladığının Western Melezleme ile Kontrol Edilmesi..... 53
6.3. Mx2 ve nMx2 Proteininin Swiss3T3 Hücrelerinde Lokalizasyonlarının İmmünflüoresan Yöntem ile Saptanması……..... 54
6.4. Mx2 Proteinlerinin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkisinin İncelenmesi……..... 55
6.4.1. İnfluenza Virüsü Minireplikonu İşleyişinin HEK293 Hücrelerinde Test

Edilmesi……..... 56
6.4.2. Swiss3T3 Hücrelerinde Fare Mx2 Proteinin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkileri……..... 57
6.4.3. HEK293 Hücrelerinde Fare Mx2 Proteinin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkileri……..... 58
6.4.4. Swiss3T3 Hücrelerinde NLS Taşıyan Mx2 Proteinin İnfluenza Virüsü RNA Enzimine Etkileri……..... 59
7. TARTIŞMA VE SONUÇ 61
8. KAYNAKLAR..... 67
9. ÖZGEÇMİŞ..... 75

III. KISALTMALAR

a/h: Ağırlık:hacim

DNA: Deoksiribonükleik asit

EDTA: Etilendiamintetraasetik asit

HA: Hemaglutinin

h/h: Hacim:hacim

NA: Nöraminidaz

NP: Nükleoprotein

OD: Optik densite

PAGE: Poliakrilamid jel (gel) elektroforezi

PEG: Polietilen glikol

RNA: Ribonükleik asit

SDS: Sodyum dodesil sülfat

TEMED: N,N,N',N'-tetrametilenetilendiamin

UV: Ultra violet

NA: Nöraminidaz

RNP: Ribonükleoprotein partikülleri

INF: İnterferon

NES: Nuklear export signal (Nükleus çıkış sinyali)

kD: Kilo dalton

MHC: Major histocompatibility complex (Büyük doku uygunluk kompleksi*)*

STAT: Signal transducer and transcription activator (sinyal ileten ve transkripsiyonu aktive eden proteinler)

JAK: Janus aktivated kinaze (Janus tarafından aktive edilen kinaz)

ISG: Interferon stimulated genes (İnterferon tarafından uyarılan genler)

D'MEM: Dulbecco's modified Eagle medium

FCS: Fetal calf serum *(*fötal buzağı serumu)

BSA: Bovin serum albümin

LBA: Luria Bertani Agar

IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 4.1. Yirminci yüz yılda önemli pandemilere neden olan influenza virüs tipleri ve ortaya çıkış yolları 6
Şekil 4.2. İnfluenza A virüslerinde major antijenik değişmeler (genetik şift)..... 7
Şekil 4.3. İnfluenza A virüsünün şematik görünümü..... 8
Şekil 4.4. İnfluenza virüslerinin yaşam döngüsü..... 12
Şekil 4.5. Hücre savunmasında görev alan özelleşmiş hücreler..... 14
Şekil 4.6. İnterferonlarla hücre içi sinyal iletisi ve hedef genlerin aktive olması..... 17
Şekil 4.7. Mx proteinlerinin filogenetik dağılımı..... 19
Şekil 4.8. MxGTPazların yapı ve domain kompozisyonları..... 20
Şekil 6.1. Swiss3T3 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın formaldehit jel elektroforezi ile analizi..... 47
Şekil 6.2. Fare Swiss3T3 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılan Mx2 geni DNA'ları..... 49
Şekil 6.3. Fare Mx2 geni taşıyan pCHA-Mx2 plazmit vektörü..... 49
Şekil 6.4. pCHA-Mx2 plazmit vektörünün BstXI restriksiyon enzimi ile kesilerek kontrol edilmesi..... 50
Şekil 6.5. pCHA plazmit vektörüne klonlanan fare Mx2 geninin nükleotid dizi kromatogramı..... 50
Şekil 6.6. PZR ile pCHA-Mx2 plazmit vektörü üzerinden çoğaltılan nMx2 DNA fragmenti jel görüntüsü..... 51
Şekil 6.7. SV40 NLS taşıyan Mx2 kodlayan pCHA-nMx2 plazmit vektörü..... 52
Şekil 6.8. BstXI Restriksiyon enzimi ile kesilmiş plazmitlerin elektroforez profilleri.... 52
Şekil 6.9. pCHA plazmit vektörüne klonlanan fare nMx2 geninin nükleotid dizi kromatogramı..... 53
Şekil 6.10. pCHA-Mx2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentezlenen fare Mx2 proteinlerinin Westen melezleme yöntemi ile görüntülenmesi..... 54
Şekil 6.11. pCHA-Mx2 (A) ve pCHA-nMx2 (B) plazmit vektörleri ile transfekte hücrelerde Mx2 proteinlerinin lokalizasyonu..... 55

Şekil 6.12. İnfluenza virüsü minireplikon sisteminin işleyişi……..…..... 56
Şekil 6.13. HEK293 hücrelerinde influenza virüsü minireplikonun işleyişinin kontrolü…..... 57
Şekil 6.14. Swiss 3T3 hücrelerinde fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkisi……..... 58
Şekil 6.15. HEK 293 hücrelerinde fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkisi…….....……..... 59
Şekil 6.16. Swiss 3T3 hücrelerinde NLS taşıyan fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkisi…….....…..... 60

ii. Tablo Listesi

Tablo 5.1. Swiss3T3 hücreleri için 24 kuyulu plaklarda her bir kuyu için kullanılan plazmit miktarları……..…. 43

Tablo 5.2. HEK293 hücreleri için 24 kuyulu plaklarda her bir kuyu için kullanılan plazmit miktarları…….… 44

1.ÖZET

Fare Mx2 Proteininin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması

İnfluenza virüsleri, *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan, negatif iplikli genoma sahip zarflı virüsleridir. Bu virüs ailesi içerisinde yer alan influenza A virüsleri insan sağlığı açısından önemli ve yaygın infeksiyonlara yol açan virüs tipidir. İnfluenza virüs infeksiyonlarına karşı en etkili savunma sistemi, doğal ya da edinsel bağışıklık sistemidir. Doğal savunma sistemi içerisinde değerlendirilebilecek hücre içi savunma sistemi virüslerin replikasyonunu zorlaştıran önemli bir bariyerdir. Bu mekanizmanın aktörlerinden biri, interferonların uyarısı sonucu sentez edilen Mx proteinleridir. Mx proteinleri *Orthomyxovirus, Rhabdovirus, Paramyxovirus, Bunyavirus* ve *Alfavirus* familyalarında yer alan birçok RNA virüsün replikasyonunu inhibe etmektedir. Bununla birlikte Mx proteinlerin moleküler düzeyde etki mekanizmaları hakkında bilgiler yetersizdir. Bu konuda elde edilen bulgular, influenza virüs infeksiyonları ile mücadelede büyük önem taşımaktadır.

Bu tez çalışması kapsamında, farelere ait Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri araştırıldı. Bu amaçla, standart DNA klonlama teknikleri ile fare Mx2 geni pCHA memeli ekspresyon vektörüne klonlandı ve pCHA-Mx2 vektörü oluşturuldu. Sitoplazmik lokalizasyon gösteren Mx2 proteinin lokalizasyon profilini değiştirmek amacıyla, SV40-T antijeni NLS dizisi taşıyan nMx2 proteini kodlayan bir diğer vektör, pCHA-nMx2 oluşturuldu. Bu vektörlerin Mx2 proteini kodladıkları hem Western melezleme hem de immünfloresans tekniklerle saptandı. NLS dizisi taşıyan nMx2 proteinin beklenenin aksine baskın olarak hücre sitoplazmasında lokalize olduğu gözlendi. Bu proteinlerin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkilerini saptamak amacıyla, yapay influenza virüsü minireplikon modelinden yararlanıldı. Artan miktarlarda pCHA-Mx2 ve pCHA-nMx2 vektörleri minireplikon komponentleri ile birlikte fare orijinli Swiss3T3 ve insan orijinli HEK293 hücrelerine transfekte edildi. Transfeksiyondan 48 saat sonra, hücrelerde influenza virüsü RNA polimeraz enzimi aktivitesine bağlı olarak sentez edilen belirteç lüsiferaz aktivitesi ölçüldü. Elde edilen sonuçlar, Swiss 3T3 ve HEK293 hücrelerinde Mx2 proteininin influenza RNA polimeraz enzimi üzerine etkisinin sınırlı olduğunu gösterdi. Bu sonucun elde edilmesinde Mx2 proteininin hücre sitoplazmasında lokalize olmasının etkili olduğu düşünülmektedir.

Anahtar Kelimeler: İnfluenza, interferon, Mx proteinleri, minireplikon, reverz genetik

2. SUMMARY

Investigation of the Effects of Mouse Mx2 Protein on Influenza Virus RNA Polymerase Enzyme

Influenza viruses are enveloped viruses with a negative-stranded genome and classified in *Orthomyxoviridae* family. Influenza A virus type belong to this family are important in terms of human health and causes worldwide pandemics. The most effective defense system against influenza virus infections is natural or adaptive immunity. The intracellular defense system considered in the natural immunity is an important barrier blocking the replication of viruses into the cells. One of the important actors of this mechanism is the interferon-induced Mx proteins. Mx proteins inhibit several RNA viruses classified in *Orthomyxoviruses*, *Rhabdoviruses*, *Paramyxoviruses*, *Bunyaviruses* and *Alphaviruses* families. However, information on the mechanisms of action of Mx proteins at the molecular level is inefficient. The findings on this issue, is of great importance in the fight against influenza virus infections.

In this Master Thesis study, the effects of the mice Mx2 protein on influenza virus RNA polymerase enzyme was investigated. For this aim, mouse Mx2 gene was cloned in pCHA mammalian expression vector by using the standard DNA cloning techniques and formed pCHA-Mx2 vector. In order to change the localization profile of cytoplasmic Mx2 protein, another plasmid vector named as pCHA-nMx2 encoding nMx2 protein carrying the SV40-T antigen NLS, was constructed. It is confirmed that these plasmids encode Mx2 protein with immunofluorescence and Western hybridization techniques. Contrary to expectations, nMx2 protein having NLS was found to be localized predominantly in the cytoplasm of the cells. To determine effects of these proteins on influenza virus RNA polymerase enzyme, an artificial influenza virus minireplikon model was used. Increasing amounts of pCHA-Mx2 or pCHA-nMx2 vectors were co-transfected with minireplicon components into mouse Swiss3T3 and human HEK293 cells. Forty-eight hours after transfection, luciferase activity synthesized depend on influenza virus RNA polymerase into the cells was measured. The results showed that mouse Mx2 protein have a very limited effect on influenza RNA polymerase in Swiss 3T3 and HEK293 cells. It is considered that one of the reasons of this negative result is the cytoplasmic localization of Mx2 protein.

Keywords: Influenza, interferon, Mx proteins, minireplicon, reverse genetics

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfluenza virüsleri, *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan zarflı virüsleridir. Antijenik özelliklerine göre, influenza A, influenza B ve influenza C olmak üzere üç ana sınıfa ayrılırlar. Bu virüsler negatif polarite gösteren parçalı RNA genom yapısına sahiptirler. İnfluenza A ve B virüslerinin genomu sekiz parçalı RNA molekülünden oluşurken, influenza C virüslerinde genom yedi parçalıdır. İnfluenza A tipi virüsler insan sağlığı açısından önemli ve yaygın infeksiyonlara yol açan virüs tipidir[1, 2].

İnfluenza A virüslerini B ve C tipi virüslerden ayıran en önemli özellik, antijenik yapılarını sık sık değiştirebilmeleri ve buna bağlı olarak tüm dünyayı etkisi altına alan pandemilere neden olabilmeleridir [3]. Bu pandemilerinin en önemli nedeni, virüsün hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA; acylneuraminyl hydrolase, EC.3.2.1.18) yüzey antijenlerinde meydana gelen yapısal değişmelerdir. İnfluenza A virüslerinin yüzey antijenlerinde iki farklı tipte değişme meydana gelebilmektedir. Bunlardan biri minor antijenik değişmelerdir. Antijenik drift olarak da adlandırılan bu tip değişmeler HA ve NA antijenlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların bir sonucudur [4, 5]. İkinci tip antijenik yapı değişmeleri major antijenik yapı değişmeleridir ve genetik şift olarak da adlandırılır [6]. Genetik şift yüzey glikoproteinlerinin yapısında büyük ölçüde farklılaşmalara neden olur. Bu değişmeler aynı konak organizmayı infekte eden farklı influenza ırkları arasında meydana gelen rekombinasyonların bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır.

İnfluenza virüslerinin yapısı ve replikasyon stratejileri iyi bilinmekle birlikte, başta insanlar olmak üzere birçok yabani ve evcil memeli organizmalar ve kuşlar için önemli bir tehdit olma özelliğini sürdürmektedirler. Bunun başlıca nedeni yukarıda da belirtildiği gibi virüslerin antijenik yapısında meydana gelen hızlı değişmelerdir. Yaşam devam ettiği sürece insanlar gelecekte ortaya çıkması olası farklı birçok virüslerle enfekte olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, bilim insanlarının virüslerle baş etmede yeni yöntemler ve araçlar geliştirmesi zorunludur. Günümüzde viral infeksiyonlara karşı korunmada en önemli araç aşılardır. Bununla birlikte, bazı virüslere karşı aşı ya hiç geliştirilememekte ya da influenza virüslerinde olduğu gibi, virüsün mutasyon ve rekombinasyonlar sonucunda antijenik yapısını hızla değiştirmesi nedeniyle mevcut aşılar yetersiz kalmaktadır [7].

Çok hızlı değişim geçiren ve solunum yoluyla çok kolay bulaşabilen influenza virüslerine karşı en büyük avantajımız bağışıklık sistemimizdir. Vücut savunmasında, önceden geçirilen hastalıklarda edindiğimiz bağışıklığın yanı sıra, viral infeksiyonlar sonucu

aktive olan interferon sistemi de çok büyük önem taşımaktadır [8-10]. İnterferonlar direkt olarak antiviral özellik gösteren proteinler değildir. Birçok hücre tipi, virüs saldırılarına karşı tip I interferon (interferon α ve β) üretir ve salgılar[11]. Bu yolla hücreler arası sinyal iletisi gerçekleşir. İnterferonların hedef hücrelerde reseptörlerine bağlanması hücre içerisinde Jak/STAT sinyal sistemini harekete geçirir. Bu sistemin etkinleşmesi sonucunda hücrelerde viral replikasyonun inhibisyonunda işlev gören bir dizi protein sentez edilir. Bu proteinlerin bir grubu Mx proteinleridir. Mx proteinleri içerisinde sınıflandırılan fare Mx2 proteininin influenza virüs replikasyonuna etkileri bu tezin konusunu oluşturmaktadır.

Mx proteinlerinin influenza virüslerini da kapsayan çok geniş bir yelpazede RNA virüslerine karşı önemli bir antiviral potansiyele sahip olduğu hem in vitro deneyler hem de transgenik hayvanlar kullanılarak gerçekleştirilen in vivo çalışmalar sonucunda kanıtlanmıştır. Bununla birlikte, bu proteinlerin antiviral etki mekanizmaları tam olarak açıklık kazanmamıştır. Mx proteinlerinin etki mekanizmalarının ortaya konması, gerek insan ve gerekse hayvanların kendi doğal savunma mekanizmalarını harekete geçirerek bu proteinlere duyarlı virüslerle mücadelede yeni ve önemli bir alternatif sunacaktır. Bu proteinlerin viral replikasyonu inhibe etmelerinde diğer hücresel faktörlerin gerekli olup olmadığı, viral proteinlerle direkt bir etkileşim gösterip göstermedikleri, direkt bir etkileşim gösteriyorlarsa Mx proteinlerinin hangi domenlerinin bu işlevi gerçekleştirdiği cevap bekleyen sorulardır.

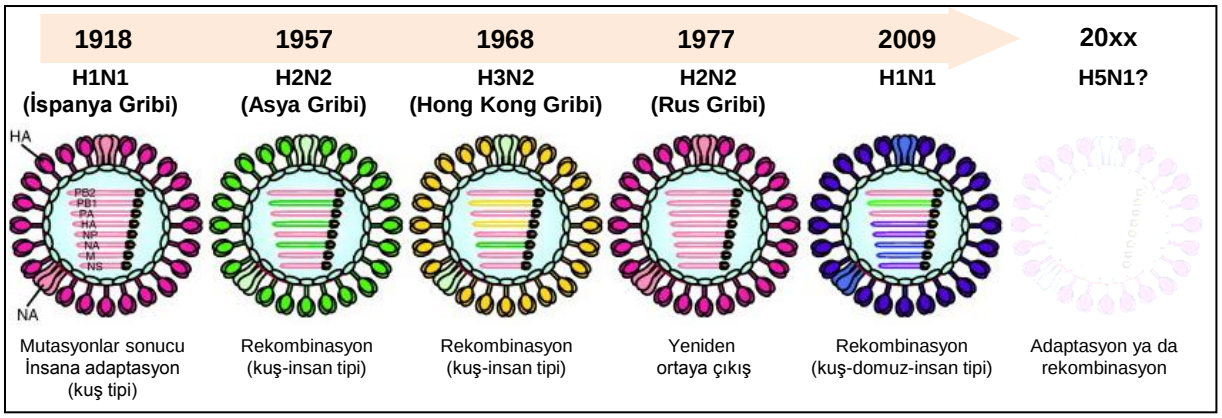
Bu tez çalışmasında da memeli hücrelerinde interferonların uyarısı sonucu sentez edilen, influenza virüslerini de kapsayan birçok virüs replikasyonunu inhibe eden Mx proteinlerinden fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine olası etkileri araştırılmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri, başta kuşlar olmak üzere birçok memeli organizmayı konak olarak kullanan ve zaman zaman bu organizmalarda ölümcül infeksiyonlara yola açan virüslerdir. Bu virüsler *Ortomyxoviridae* familyası içerisinde sınıflandırılır. İnfluenza virüsleri, NP ve M1 proteinlerinin antijenik özelliklerine göre A, B ve C olmak üzere üç farklı tipe ayrılır. Farklı virüs tipleri konak spesifikliği bakımından da farklılık gösterir. İnfluenza A tipi virüsleri insan, at, domuz, balina, fok gibi memeli organizmalar, evcil ya da yabani kuş türlerini kapsayan çok geniş bir konak yelpazesine sahiptir. Buna karşın, influenza B tipi sadece insanlardan izole edilmiştir. İnfluenza C virüsleri ise insan ve domuzları konak olarak kullanır. İnfluenza virüsleri içerisinde insan sağlığı için büyük önem taşıyan virüs tipi influenza A tipidir. İnfluenza B tipi virüsler insanda A tipi virüslerle benzer klinik tablolara yol açsalar bile, daha hafif seyreden salgınlara neden olurlar. İnfluenza C virüsleri insan sağlığı için önemli bir tehdit oluşturmaz [1, 2].

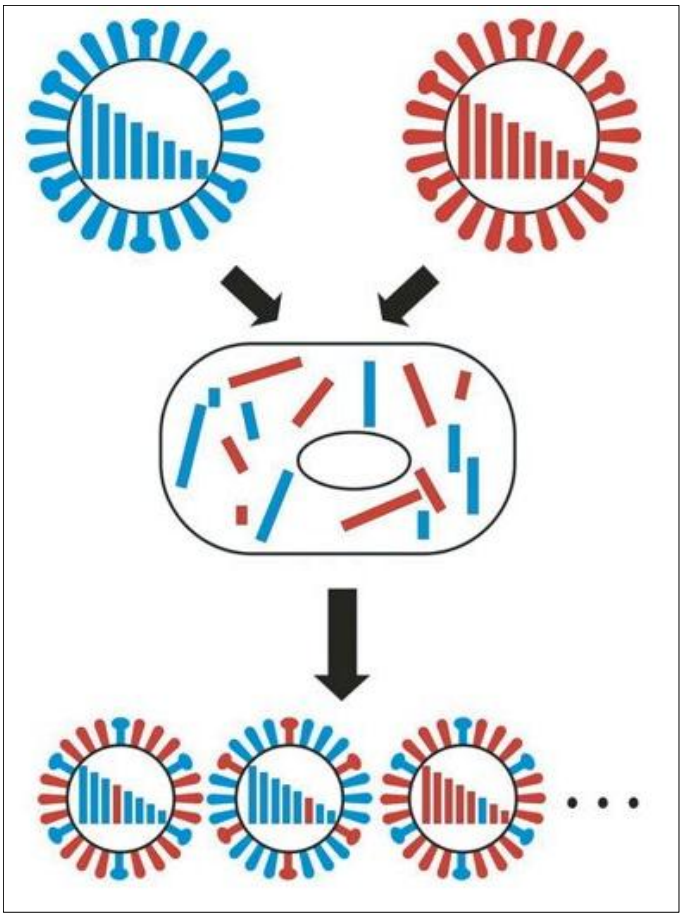
İnfluenza A virüslerinin en önemli özelliklerinden biri değişik yaş gruplarında farklı şiddetlerde tekrarlayan epidemilere ya da tüm dünyayı etkisi altına alabilen pandemilere neden olabilmeleridir. İnfluenza pandemileri ile ilgili en eski tarihi kayıtlar 1580 yılına aittir. Geçen yüzyılda 1918-19 (influenza 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 yılların 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 (reassortment) 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 (**Şekil.4.1**)[12-14].



Şekil 4.1. Yirminci yüz yılda önemli pandemilere neden olan influenza virüs tipleri ve ortaya çıkış yolları [15].

İnfluenza A virüsleri memranlı virüslerdir. Virüs membranı üzerinde taşınan HA ve NA proteinleri enfeksiyonun yayılması ve seyri açısından büyük önem taşımaktadır. HA ve NA proteinleri antijenik olarak büyük bir çeşitlilik gösterir [16, 17]. İnfluenza A virüslerinde bugüne kadar 17 farklı HA (H1-H17), 9 farklı NA (N1-N9) alt tipi belirlenmiştir[18]. İnfleunza A virüslerinin yüzey antijenlerinde çeşitliliğe yol açan iki farklı tipte değişme meydana gelebilmektedir. Bunlardan biri minor antijenik değişmelerdir. Antijenik drift olarak da adlandırılan bu değişmeler, hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA; acylneuraminyl hydrolase, EC.3.2.1.18) proteinlerini kodlayan genlerde meydana gelen mutasyonların bir sonucudur[4, 5]. Her bir replikasyon sırasında infleunza A virüslerinin HA ve NA genlerindeki bir nükleotidin mutasyona uğrama frekansı yaklaşık 10^{-5} olarak saptanmıştır. Bununla birlikte, paramyxovirus gibi diğer RNA virüslerinin de aynı oranlarda mutasyona uğrayabilmesi nedeniyle, infleunza A virüslerinin hızlı evrimsel değişimi sadece basit mutasyonlarla açıklanamaz. Buna karşın, basit mutasyonların birikimi virüsün antijenik yapısında konak immün sisteminin tanıyamayacağı düzeyde değişikliklere neden olarak, yeni salgınların ortaya çıkmasını yol açabilir. 1918-1919 yıllarında görülen influenza salgınında da, daha önce insanlarda görülmeyen fakat mutasyonlar sonucu insan hücrelerinde çoğalabilme yeteneği kazanan bir virüsün yol açtığı düşünülmektedir [14]. İkinci tip antijenik yapı değişmeleri major antijenik yapı değişmeleridir ve genetik shift olarak da adlandırılır. Genetik shift, yüzey glikoproteinlerinin yapısında yüksek düzeyde farklılaşmalara neden olur [19]. Bu değişmeler, aynı konak organizmayı infekte eden farklı influenza ırkları arasında

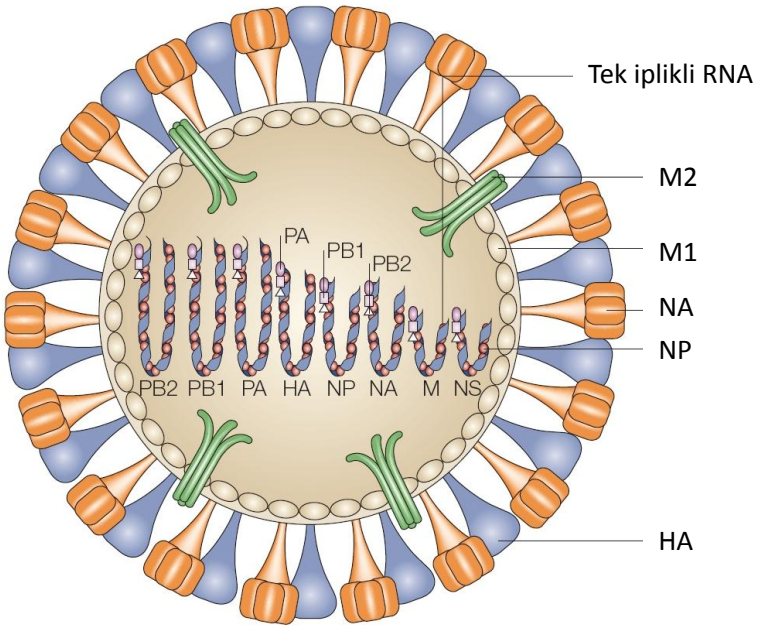
meydana gelen rekombinasyonların bir sonucudur (**Şekil 4.2**). Bu tip olaylar influenza virüsünün yapısında hızlı ve büyük değişmelere neden olurlar.



Şekil 4.2. İnfluenza A virüslerinde major antijenik değişmeler (genetik şift) [20]

İnfluenza virüsleri tek iplikli negatif polarite gösteren çok parçalı RNA genomuna sahiptirler. İnfluenza A ve B virüslerinde genom sekiz parçalı RNA'dan oluşurken, influenza C virüslerinde 7 parçalıdır. Viral genomu oluşturan her bir RNA segmenti en az bir protein kodlar. Üç tip influenza virüsünde de toplam genom uzunluğu farklılık gösterir. Tip B virüsü en uzun genoma sahiptir, bunu sırasıyla tip A ve tip C virüsü takip eder. Viral RNA segmentlerinin 3′- ve 5′- uçlarında yer alan, sırsıyla son 12 ve 13 nükleotidlik bölge yüksek derecede korunmuştur. Bu bölgeler viral genomun replikasyonu ve transkripsyonu için önem taşır [21-23]. İnfluenza virüsü RNA moleküllerinin her biri nükleoproteinler (NP) ile ribonükleoprotein (RNP) partikülleri halinde paketlenmiştir. İnfluenza virüslerinin segmentlenmiş genomu P proteinleri (PB1, PB2 ve PA), nükleoprotein (NP), hemaglutinin (HA), nöraminidaz (NA), matriks proteinleri (M1 ve M2) ve nonstrüktürel (NS1 ve NS2)

proteinleri kapsayan on bir farklı polipeptid için genetik şifre taşır [4, 5]. Yakın tarihte influenza A virüslerinde ikinci segmenti üzerinden PB1 proteinine ek olarak PB1-F2 olarak adlandırılan ikinci bir proteinin sentez edildiği gösterilmiştir [24]. Yapısal olarak ele alındığında, influenza A virüsleri, 80-120 nm çapında zarflı virüslerdir. Viral membran üzerinde HA, NA ve az miktarda M2 proteinleri yer alır. Virüslerde en fazla miktarda bulunan M1 proteini viral membranın hemen atında yer alır. NP proteinleri tek iplikli viral RNA'lar ile kompleks oluştururlar. Bu kompleksler ribonükleoprotein partikülleri (RNP) olarak adlandırılırlar. Viral RNA'nın replikasyon ve transkripsiyonunda iş gören PB2, PB1 ve PA proteinleri de RNP'lere bağlı olarak bulunurlar. Yapısal olmayan (non-structurel) NS1 proteini genellikle virüs partikülünde yer almaz. Virüs parikülünde çok az miktarda da olsa, NS1 ile aynı RNA segmenti üzerinden sentez edilen NS2 proteini bulunur [25, 26].**(Şekil 4.3)**.



Şekil 4.3. İnfluenza A virüsünün şematik görünümü [27].

PB2 proteini 87 kD ağırlığında olup hücresel mRNA' ların 5′-CAP yapısına bağlanma ve tanıma açısından çok önemlidir [28]. PB2 proteini, viral mRNA sentezi için temel olduğu bilinmektedir. Fareler üzerinde yapılan reverse genetik çalışmalar sonucunda, PB2 proteininin özellikle 627. aminoasitin replikasyonda kritik bir rol oynadığı bulunmuştur. 627. pozisyondaki glutamik asitin mutasyon sonucunda lizine dönüşmesi hücrelerde viral replikasyonu arttırmıştır, bu da virüsün fareler için daha patojen hale gelmesine yol açmıştır

[29]. PB1 proteini, 96 kD ağırlığında, viral RNA'nın sentezinin başlaması ve uzaması için gereklidir. PB1'in viral promotor yapısına bağlanması proteinin şapkalı mRNA endonükleaz aktivitesini aktive eder. PB1 iki ayrı kısım içerir, bu iki kısımda nuklear lokalizasyon için gereklidir [30]. PA proteini, 85 kD ağırlığında viral polimeraz kompleksi için temel komponentlerden biridir. PA proteininin replikasyon ve transkripsiyondaki rolü PB2 ve PB1' ye göre daha az açıklanabilmiştir. Bununla birlikte PA proteininin viral RNA replikasyonu için gerekli bir protein olduğu, zincirin uzamasında rol oynadığı veya PB1'in viral RNA' ya bağlanmasını kolaylaştırdığı düşünülmektedir[31, 32]. Aynı zamanda transkripsiyonlada ilişkilidir [33]. Diğer taraftan PA proteininin serin proteaz aktivitesine sahip olduğu ileri sürülmekte, fakat bu aktivitenin viral replikasyon için önemli olup olmadığı bilinmemektedir [34].

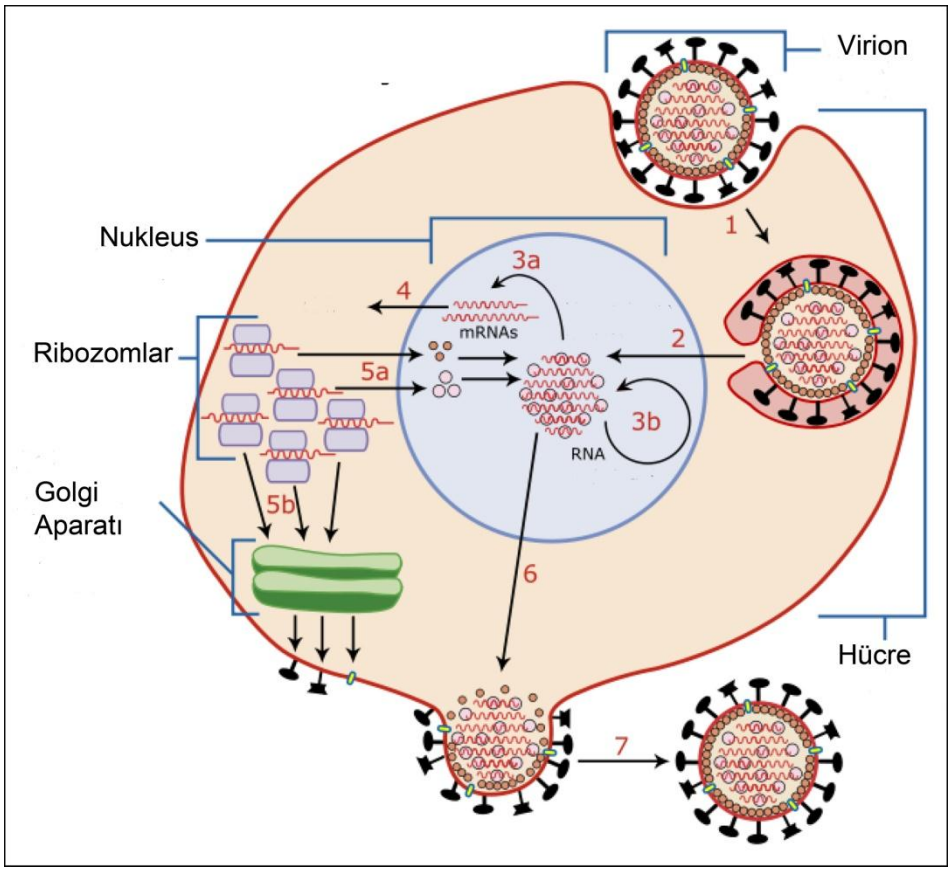
Virüsün yüzey antijenlerinden hemaglutinin (HA) proteini, virüsün dördüncü en uzun RNA segmenti tarafından kodlanır ve viral proteinlerin yaklaşık % 25'ini oluşturur. HA proteini virüsün konak hücreye tutunmasında ve hücre içerisine serbestleşmesinden sorumludur. İnfluenza virüslerinin replike olabilmeleri için HA proteinin hücresel bir proteaz ile kesilerek aktif forma dönüşmesi gerekir. Proteolitik kesim sonucunda disülfid bağları ile bağlı HA1 (36 kDa) ve HA2 (27 kDa) alt üniteleri oluşur. Bu oluşan 'iki zincirli' monomerlerden üçü virüs membranında nonkovalent olarak bir araya gelerek trimerik yapı oluşturur. İnfluenza virüsünün hücre içerisinde serbest kalabilmesi için viral membran ile endosomal membranın füzyona uğraması gerekir. Bu olay asidik pH'da d HA proteini aracılığı ile gerçekleştirilir [35]. Endozom içerisinde düşük olması (~pH:5), HA proteininin tersiyer yapısını viral ve endosomal membranı füzyona uğratacak şekilde değiştirir. Bu değişiklik virüs replikasyonu için hayati önem taşır [36]. Nüklear protein (NP), RNP kompleksinde yer alan bir proteindir. Ortalama 60 kD ağırlığındadır. NP aynı zamanda hücresel nuklear eksport faktörü olan CRM1 proteini ile de ilişkisi olduğu saptanmış ancak bunun virüs replikasyon açısından önemi bilinmemektedir [37]. Yapılan çalışmalar serbest halde NP'nin, vRNA sentezi için gerekli olduğunu göstermiştir[38]. İnfluenza virüslerinin önemli yüzey antijenlerinden olan NA proteini 60 kD ağırlığındadır. NA proteini sap ve baş kısmından oluşur. Baş kısımı hem virüsün antijenik özelliği açısından önemlidir hem de enzimatik olarak aktif bölgesidir. Sap kısmı ise, hidrofobik özellik taşır ve NA proteinin viral membranda lokalize olmasını sağlar [39]. NA proteini enzimatik aktivitesi sayesinde, terminal sialik asit ile bitişiğinde bulunan şeker bakiyesi arasındaki alfa ketosidik bağın koparılmasını katalizler. Sialik asit bakiyesinin ortadan uzaklaştırılması virüsün infekte olmuş hücreden

serbest hale geçmesi için büyük önme taşır [40, 41]. Matriks (M1) proteini, virüs partikülünde en fazla miktarda bulunan proteinidir ve influenza virüsünün spesifik antijenlerindendir. M1 proteini 27 kD ağırlığındadır. İnfekte hücrelerin nükleuslarında oluşan vRNP kompleksinin, sitoplazmaya taşınması için M1 proteini gereklidir. İnfluenza A ve B virüslerinde M1 proteinleri 'zinc finger' olarak söylenen çinko parmak motifleri taşır. Bu nedenle saflaştırılmış virüs partikülleri çinko içerirler. Ancak çinko miktarı proteinin RNA bağlanma aktivitesi ile ilişkili değildir ve korunmuş sistein ve histidin bakiyelerinin çinko parmak motifinde yer değiştirmeleri hücre kültüründe önemli derecede virüs replikasyonunu zayıflatmamıştır [42, 43]. Matriks proteini ile aynı RNA segmenti üzerinden kodlanan M2 proteini, integral tetramerik membran proteinidir. Bu protein 14 kD ağırlığındadır [44]. Virüs ile infekte olmuş hücrelerin yüzeyinde fazla miktarda eksprese olur, fakat virüs partikülünde göreceli olarak düşük miktardadır. M2 proteini kanal proteinidir ve pH ile aktive olan iyon kanalından protonların virion içerisine girmesini sağlar. Bu da influenza virüslerinin enzdozomdan sitoplazmaya geçişi yani serbestleşmesi için önemlidir [45]. NS1 proteini, influenza A virüsünün tek yapısal olmayan, 26 kD ağırlığında bir proteinidir. NS1 proteininin temel işlevi interferon (INF) cevabı oluşmuş konak hücrede, hücresel ve antiviral interferon cevabını bloke ederek viral replikasyonu sağlamaktır [46]. NS2 proteini influenza virüslerinin en küçük RNA segmenti üzerinden kodlanan 14 kD ağırlığında bir proteindir. Virüs ile infekte olmuş hücrenin hem nukleusunda hem sitoplazmasında lokalize olur. NS2 proteini, amino terminal bölgesinde klasik nuklear çıkış sinyali (nuclear export signal-NES) taşır ve hücresel nuklear çıkış faktörü olan CRM1 ile etkileşim içerisindedir. Bu tip proteinler NES dizisi taşıyan proteinlerin taşınmasında aracılık eder. Virüs benzeri partiküllerle infekte olmuş hücrelerde NS2 proteini bulunmadığı zaman, viral RNP kompleksi nukleusta alıkonulur [11, 47]. Bu da NS2 proteinin vRNA'lerin taşınmasındaki rolünü ortaya koyar.

İnfluenza virüsü RNA polimeraz komplekslerinin yapısal ve işlevsel özellikleri üzerinde halen yoğun araştırmalar yapılmaktadır. Şu ana kadar yapılan çalışmalar, PB1-PB2 dimerik kompleksinin transkripsiyon, PB1-PA kompleksinin ise replikasyonda işlev gördüğü sonucunu vermiştir [31, 32]. Viral RNA polimeraz kompleksi influenza virüsünün promotor yapısındaki özel bir diziyi tanır ve NP ile interaksiyona girer [48]. PB1, polimeraz kompleksinin yapısal temelini PB2 ve PA ile interaksiyona girerek oluşturur [49].

İnfluenza virüslerinin yaşam döngüsü, virüsün HA proteini ile hücrelerin sialik asit reseptörlerine bağlanması ile başlar (**Şekil 4.4**). Daha sonra virüs, endositoz yolu ile hücre içerisine alınır (tutunma ve penetrasyon) [50]. HA proteini sadece virüsün hücrelere

tutunmasında değil, aynı zamanda endozom içerisindeki virüsün sitoplazma içerisinde serbest kalmasında da rol alır. Endozom içerisindeki düşük pH değerlerine HA proteini konformasyonel değişime uğrar ve viral memran ve endozom membranlarının füzyonuna yol açar. Bunun sonucunda viral RNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasını sağlanır (kot atma) [51]. Viral RNP'ler ATP ye bağımlı bir mekanizmayla nuklear porlardan nükleusa taşınır. 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) [52]. 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 proteinler (HA, NA, M1, M2, NP, NS1 ve NS2), enzim proteinleri (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 [53]. 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 gerçekleşir (kurulma). Oluşan virüsler hücreden tomurcuklanma yoluyla ayrılır (serbestleşme). Diğer bir hücre yüzey glikoproteini olan NA, hücre yüzeyinde HA moleküllerinin bağlandığı sialik asit bakiyelerini keserek infekte hücrelerden virüs serbestleşmesine olanak sağlar [53].



Şekil 4.4. İnfluenza virüslerinin yaşam döngüsü. 1-virüsün hücreye tutunması ve endositoz ile hücreye girişi (adsorpsiyon/penetrasyon); 2-Viral ve endozomal membranın füzyonu sonucu vRNP'lerin sitoplazmada serbest kalması (kot atma); 3a- vRNA'lar üzerinden mRNA sentezi (transkripsiyon); 3b- vRNA üzerinden cRNA sentezi (replikasyon); 4- mRNA'lar üzerinden viral proteinlerin sentezi (translasyon); 5a- sentez edilen bazı viral proteinlerin nukleusa taşınması; 5b- yüzey antijen proteinler golgi üzerinden hücre membranına taşınması; 6- vRNP'lerin hücre membrana taşınması ve kurulma; 7- virüs partiküllerinin serbestleşmesi (https://www.boundless.com/microbiology/viruses--2/negative-strand-rna-viruses-of-animals/replicative-cycle-of-influenza-a/)

İnfluenza virüslerinin yapısı ve replikasyon stratejileri iyi bilinmekle birlikte, başta insanlar olmak üzere yabani ve evcil kuşlarda önemli bir tehdit olma özelliğini sürdürmektedirler. Bunun başlıca nedeni yukarıda da belirtildiği gibi virüslerin antijenik yapısında meydana gelen hızlı değişmelerdir. Yaşam devam ettiği sürece insanlar gelecekte ortaya çıkması olası farklı birçok virüslerle enfekte olması kaçınılmazdır. Bu nedenle, bilim insanlarının virüslerle baş etmede yeni yöntemler ve araçlar geliştirmesi zorunludur.

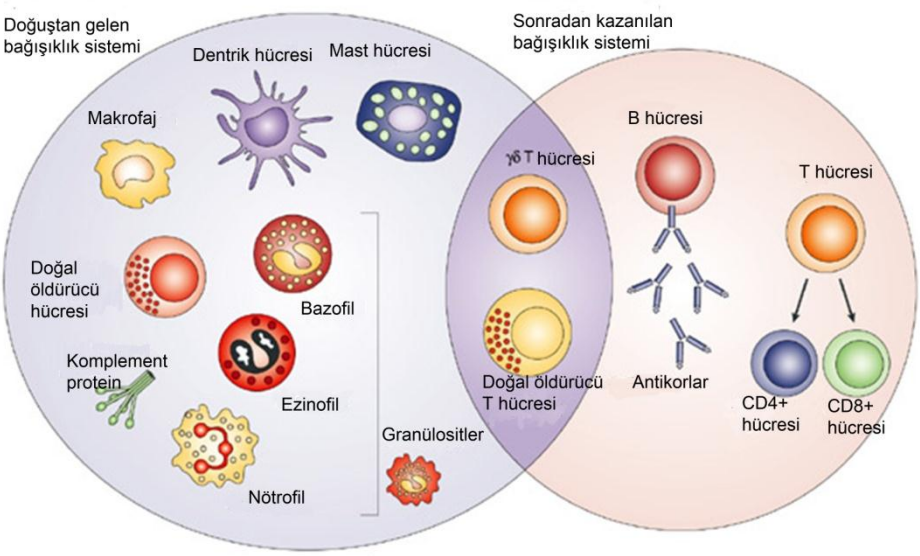
Günümüzde viral infeksiyonlara karşı korunmada en önemli araç aşılardır. Bununla birlikte, bazı virüslere karşı aşı ya hiç geliştirilememekte ya da influenza virüslerinde olduğu gibi, virüsün mutasyon ve rekombinasyonlar sonucunda antijenik yapısını hızla değiştirmesi nedeniyle mevcut aşılar yetersiz kalmaktadır.

4.2. İnfluenza Virüslerine Karşı Hücresel Savunma Mekanizmaları

Doğada en basit yapılı prokaryotik bir organizmadan, gelişmiş ökaryotik organizmalara kadar, tüm canlılar varlıklarını sürdürebilmek için değişik savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir. Örneğin bakteriler sahip oldukları restriksiyon-modifikasyon sistemleri sayesinde dışarıdan gelen bakteriyofaj saldırılarına karşı ya da plazmit gibi yabancı bir DNA molekülüne karşı bir ölçüde kendisini koruyabilmektedir [54]. Yüksek organizasyonlu canlılar ise çok daha karmaşık bir bağışıklık sistemi geliştirmişlerdir. Çok hücreli organizmalardan omurgalılarda bağışıklık sistemi, özelleşmiş işlevlere sahip farklı doku, hücre ve moleküllerden oluşan karmaşık bir yapıya sahiptir.

Evrimsel piramidin en üst halkasını oluşturan memelilerde bağışıklık sistemi, birisi doğal bağışıklık, diğeri kazanılmış (edinsel) bağışıklık olarak iki kısım halinde değerlendirilebilir. Bağışıklık sistemine dahil olmamakla birlikte gelişmiş organizmalarda, mukoza gibi vücudun normal yapısal elemanları ve çeşitli fizyolojik olaylar daha başlangıçta patojenlerin vücuda girişi ve yayılmasını önleyecek bir bariyer oluşturur. Örneğin, influenza virüslerinin üst solunum yolları mukozasını aşabilmeleri için, hücresel reseptörlerin uygun olması, virüslerin HA yüzey antijen proteinlerini aktive edecek uygun bir proteaz enziminin bulunması zorunludur. Bu bariyerler, influenza virüslerinin konak tercihinde etkili olmaktadır. Vücudun doğal bariyerlerini aşan patojenler, spesifik olmayan bir savunma mekanizması ile karşılaşırlar. Lökositler, fagositler, makrofajlar, nötrofiller, dendritik hücreler, mast hücrelerin, eozinofiller, bazofiller ve doğal öldürücü hücreleri ve çeşitli moleküllerden oluşan, patojenler arasında herhangi bir ayrım yapmaksızın koruma sağlayan bu sistem doğal bağışıklık olarak tanımlanır [55, 56]. Fagositler, sitokinler tarafından uyarılan hücre savunmasında görev alan özelleşmiş hücrelerdir. Patojen olarak bilinen yabancı organizma ve maddeleri, iki farklı yol ile öldürebilirler. Ya fagolizozom içinde sindirim enzimlerinin etkinliğiyle ya da solunumsal (oksidatif) tepkimeyi izleyen serbest radikallerin fagolizozom içine bırakılmasıyla öldürme işlemini gerçekleştirirler. Nötrofiller ve makrofajlar da yine vücutta saldırgan patojenleri takip eden fagositlerdir. Dendritik hücreler ise, antijen sunan hücrelerdir. Doğuştan bağışıklık sistemi ve adaptif immun sistem arasında haberci olarak

hareket ederler. Bazofiller ve Eozinofiller nötrofillerle bağlantılı hücrelerdir. Bir patojence etkinleştirildiklerinde, parazitlere karşı savunmada ve (astım gibi) alerjik reaksiyonlarda önemli rolü olan histamini salarlar. Bu yüzden herhangi bir doku harabiyetinin önlenmesiyle oldukça ilişkilidirler. Doğal öldürücü hücreler (NK ya da DÖH hücreler), tümör hücreleri veya virüslerce enfekte edilmiş hücrelere saldırıp onları yok eden lökositlerdir [57-60] (**Şekil 4.5**).



Şekil 4.5. Hücre savunmasında görev alan özelleşmiş hücreler [61].

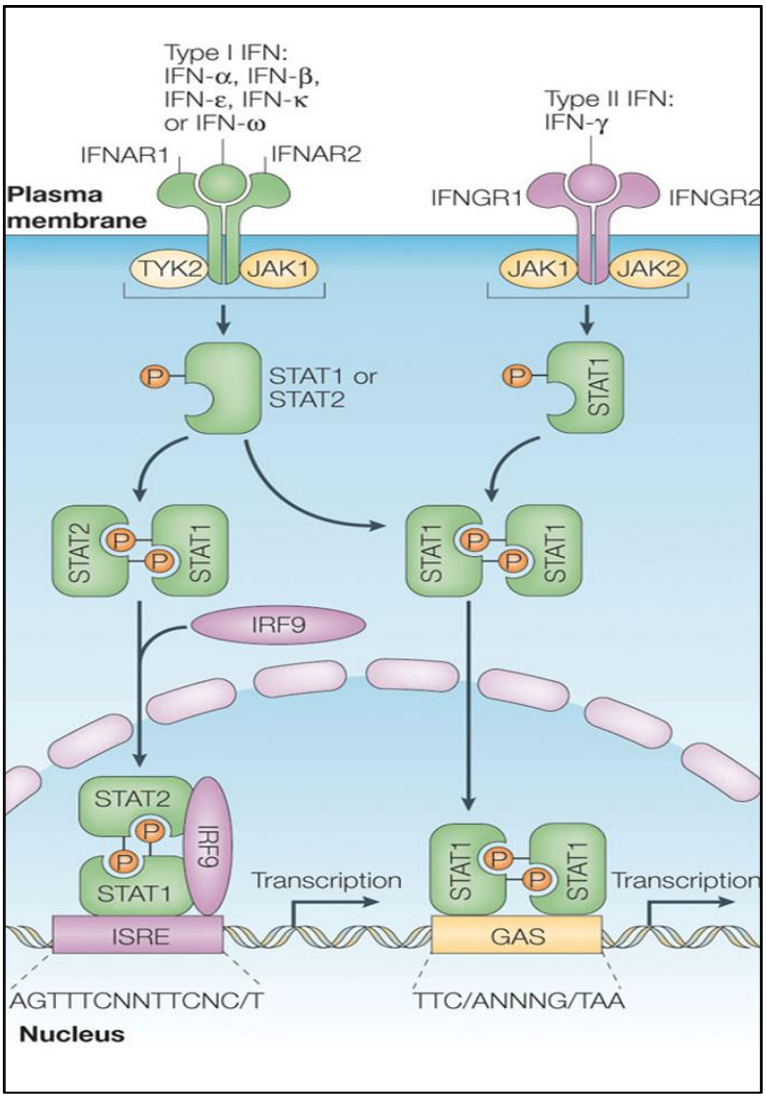
Yüksek organizasyonlu canlıların geliştirdiği ikinci savunma mekanizması olan edinsel bağışıklık sistemi, doğal bağışıklıktan farklı olarak patojen vücuda girdikten sonra uyarılır. Bu sistem yabancı maddeleri ya da organizmaları spesifik olarak tanır ve bunlarla her karşılaştığında daha da güçlenir. Edinsel bağışıklığı harekete geçiren patojen ya da yabancı moleküller antijen olarak tanımlanır [62]. Edinilmiş bağışıklık sisteminin ana aktörleri B ve T lenfosit hücreleridir (**Şekil 4.5**). B ve T hücreleri kemik iliğindeki hematopoietik kök hücrelerinden oluşur. B hücreleri humoral bağışıklık yanıtını oluştururken, T hücreleri hücresel bağışıklığı oluştururlar. B lenfositleri antijene özgü antikor üreten, edinsel bağışıklık sisteminin hayati önem taşıyan hücrelerdir. Antijen ile karşılaşan B lenfositleri bölünmeye başlayarak plazma hücrelerine dönüşür ve antijne özgü antikor salgılarlar. Bu antikorlar kan plazmasında ve lenf de dolaşır, antijen sunan patojenleri bağlar ve onları kompleman sistemi ya da fagositler tarafından etkisizleştirilmesi için işaretler [63, 64].

Omurgalı canlılarda doğal bağışıklık sisteminin en önemli bileşenlerden biri de hiç kuşkusuz interferonlardır. İnterferonlar ilk kez 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann tarafından influenza virüsleri üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir [65]. İnterferon adı hücre içerisinde viral replikasyona dışarıdan müdahile etme (interfere) kelimesinden kaynaklanmaktadır. İnterferonlar (IFN'ler) sadece virüslere karşı değil aynı zamanda, bakteriler, parazitler ya da tümör hücrelerine karşı da yanıt olarak konak hücreleri tarafından salınan moleküllerdir. Bu patojenlerin ya da tümör hücrelerinin ortadan kaldırılması için hücre içi ve hücreler arası savunma mekanizmalarını harekete geçirirler [66, 67].

İnterferonlar, glikoprotein yapıda moleküllerdir ve sitokinler içerisinde sınıflandırılırlar. İnsanlarda interferonlar hücre yüzeyinde bağlandıkları reseptör tipine göre Tip I ve Tip II interferonlar olarak iki alt sınıf içerisinde değerlendirilir. INF-α, INF-β ve INT-ω Tip I interferonlar içerisinde yer alır. Bu grup interferonlar heteromerik özellik gösteren interferon-α/β reseptörlerine (IFNAR) bağlanarak sinyal iletisini gerçekleştirirler. INF-α yaklaşık olarak 18 kD'dur ve makrofajlar tarafından üretilir. INF-β ise 20 kD'luk bir glikoproteindir ve fibroblastlar tarafından üretilir. Tip II interferonlar ise heterodimerik yapıda, INFGR1 ve INFGR2 alt ünitelerinde oluşan interferon-gama reseptörlerine (INFGR) bağlanırlar. INT-γ tip II interferonlar içerisinde değerlendirilir ve lenfositler tarafından salgılanan 21-24 kD'luk alt ünitelerden oluşan homodimerik glikoproteindir. INF-β ve INT-γ için genomda tek gen kopyası bulunur. INF-β'yı kodlayan gen 9 nolu kromozomda, INT-γ'yı kodlayan gen ise 12 no'lu kromozomda yer alır. INF-α genleri çok kopyalıdır. En az 23 farklı INF-α geni tarafından 15 farklı fonksiyonel protein kodlanmaktadır. INF-α genleri de INF-β gibi 9 nolu kromozom üzerinde yer almaktadır. Tip I ve Tip II interferonların antiviral, antiproliferatif ve immun düzenleyici etkileri vardır. Özellikle tip I INF'lar antiproliferatif ve antiviral reaksiyonlarda, tip II interferonlar ise immun düzenleyici reaksiyonlarda etkilidirler. INF'ların etkisini gösterebilmeleri için hedef hücre yüzeyinde bulunan kendilerine özgü reseptörlere bağlanması gerekmektedir. Bu bağlanma hücre içerisinde bir dizi reaksiyonun başlamasını tetikler [68-70]. Tip I interferon, influenza virüslerini de kapsayacak şekilde birçok RNA virüslerinin replikasyonun inhibe ederler. Bu işlevlerini hücre içerisinde sentezini uyardıkları 2'5'oligoadenilat sentetaz, protein kinaz R (PKR) gibi enzimler ve çeşitli protein faktörler aracılığıyla gerçekleştiriler [71]. Tip I interferonlar sinyal iletisi parakrin tarzda gerçekleşir; virüs ile infekte olan hücrelerin salgıladıkları IFN'lar komsu hücreleri etkileyerek, bu hücrelerin virüslere karşı direnç kazanmalarını sağlarlar. Tıp I interferonlar hücrelere etki ederek hücre proliferasyonunu da önlerler. Bu da virüsün yayılmasında

yavaşlatıcı bir etki yapar. Diğer taraftan doğal öldürcü hücrelerin (NK) litik fonksiyonlarını da arttırırlar[72, 73]. İnterferon gamma, Tip I INF ile birçok benzer işleve sahiptir. IFN-γ'da antiviral ve antiproliferatif etki gösterir. Sinyal iletisinde Tip I interferonlardan farklı hücre reseptörleri kullanır. Ayrıca, Tip I interferondan farklı olarak, IFN-γ mononükleer fagositlerin güçlü bir aktivatörüdür. Temel Makrofaj Aktive edici Faktör (MAF) dür ve T hücrelerinin makrofajları aktive etmesini sağlar. Nötrofilleri aktive eder ve tip I INF'lara göre daha etkin bir şekilde NK hücrelerinin litik aktivitelerini arttırır [74].

İnterferonlarla hücre içerisine sinyal taşınmasında iki temel protein ailesi işlev görür. Bunlar Janus kinazlar (JAK) ve sinyal ileten ve transkripsiyonu aktive eden (STAT: signal transducer and transcription activator) proteinleridir. Bu moleküller interferon reseptörlerinden aldıkları sinyaller nukleusa taşıyarak, belirli genlerin transkripsiyonunu başlatırlar (**Şekil 4.6**) Yapılan çalışmalar sonucunda, interferon dışında pek çok sitokin, hormon ve büyüme faktörleri ile hücre içi sinyal iletisinde de JAK-STAT yolaklarının kullandığını ortaya konmuştur [75].



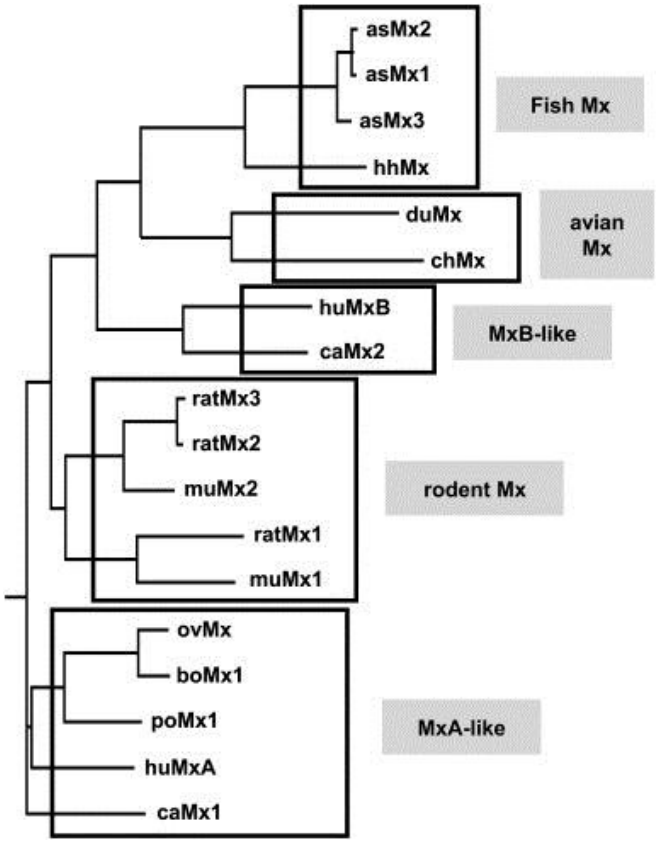
Şekil 4.6. İnterferonlarla hücre içi sinyal iletisi ve hedef genlerin aktive olması[75].

Interferonlar kendilerine özgü reseptörlere bağlandıktan sonra, reseptörlerin hücre içi bölgeleri ile etkileşim halinde olan tirozin kinazlar ve/veya Janus kinazlar (JAK) aktive olurlar. Aktif formdaki bu kinaz enzimleri STAT proteinlerini fosforile ederler. Fosfat bağlı aktif formdaki STAT proteinleri dimerik yapı oluşturarak sitoplazmadan taşınırlar ve nukleus taşınırlar. Aktif STAT proteinleri nükleus içerisinde ilgili genlerin (interferon tarafından uyarılan genlerin – interferon sitimulated genes-ISG) regülasyon bölgelerine (enhancer) bağlanır bu genlerin transkripsiyonlarını sağlar [75]. Bu genlerin transkripsiyonu sonucu 2'-5' oligoadenilat sentetaz, çift zincirli RNA tarafından aktive edilen protein kinaz (PKR) ve Mx proteinleri sentez edilir. 2'- 5' oligo adenilat sentetaz enzimi insanlarda OAS1 geni tarafından kodlanır. Bu gen, 2-5 A sentetaz ailesinin birçok üyesini sentezinden sorumludur. Bu enzimler

inaktif halde bulunan Rnaz L enzimini aktive ederler. Aktif Rnaz L enzimleri, virüse ait RNA moleküllerinin yıkılmasını kataliz eder ve viral replikasyonun inhibe olması sağlanır. RNA bağımlı protein kinazlar (PKR), insanda EIF2AK2 geni tarafından kodlanır. Virüs replikasyonu sırasında hücre içerisinde oluşan çift zincirli RNA moleküllerinin bu enzimin dimerizasyona ve buna bağlı olarak otofosforilasyon reaksiyonu ile aktivasyonuna neden olduğu düşünülmektedir. Aktive olan RNA bağımlı protein kinaz, ökaryotik translasyon başlatıcısı faktörünü (EIF2A) fosforile eder. Fosforile olan EIF2A translasyonu inhibe ederek viral protein sentezini olumsuz yönde etkiler [76].

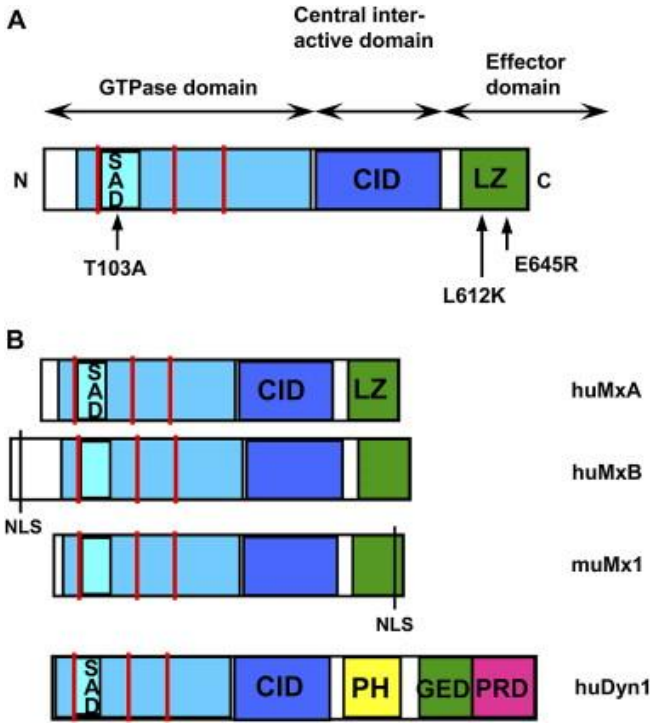
4.3. Mx Proteinleri

Mx proteinlerinin varlığı ilk kez 1962 yılında aynı ırktan fareler için ölümcül olan dozda influenza infeksiyonlarına karşı direnç gösteren A2G fare ırkı üzerinde yapılan çalışmalarla ortaya konmuştur [77]. A2G ırkı farelerin influenza virüs infeksiyonlarına karşı gösterdikleri bu direncin taşıdıkları dominant bir gene bağlı olduğu saptanmış ve bu allel gen Mx+ olarak adlandırılmıştır. Günümüze kadar maya, kuş ve memelileri kapsayan birçok ökaryotik organizma türünde fare Mx+ geni tarafından kodlanan ve Mx1 adı verilen proteine homolog proteinler belirlenmiştir. Fare Mx1 ve daha sonra saptanan Mx2 genleri 16. kromozomda birbirine yakın bölgede lokalizasyon gösterir. İnsanlarda sitoplazmik protein kodlayan MxA ve MxB genleri tanımlanmıştır. Bu iki gende 21. Kromozomun uzun kolunda birbirlerine yakın bölgelerde lokalize olmuşlardır. Araştırmalar sonucunda Mx genlerinin farklı türlerde evrim süresince korunmuş olduğu gösterilmiştir. Omurgalılarda, Mx proteinleri dizi benzerliklerine göre 5 alt grup altında sınıflandırılabilirler. Bu gruplar, MxA benzeri proteinler, MxB benzeri proteinler, balık Mx proteinleri, kuş Mx proteinler, ve kemirgen Mx proteinleri olarak isimlendirilebilir [78, 79].



Şekil 4.7. Mx proteinlerinin filogenetik dağılımı [78].

Mx proteinleri yüksek molekül ağırlıklı GTPaz'ları kapsayan dinamin (100 kD ağırlığında endositoz olayında işlev gören bir GTPaz) ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Dinamin proteinleri, hücre içi sinyal iletisi, vesikül transportu ve hücre içi protein trafiği gibi farklı işlevlerde görev almaktadırlar. Mx genlerinin, amino-terminal bölgesinde GTPase domaini, ortada orta interaktif domaini (CID), karboksi- terminal bölgesinde ise lösin fermuar mötifi (LZ) ile efektör bölge yer almaktadır. Fare Mx1 geni, karboksi- terminal bölgesinde nüklear lokalizasyon sinyali (NLS) taşır. Dinamin benzeri Mx GTPaz'lar yaklaşık olarak 80 kD molekül ağırlığına sahiptir. Dinamin benzeri olmayan Mx GTPaz' ların kendilerine has amino-terminal uzantıları vardır ve bunlar özel fonksiyonlara aracılık eder. Bunlarda klasik dinamin proteinlerinde bulunan ve membrana bağlanma özelliği sağlayan PH bölgesi bulunmaz. Aynı zamanda prolin/arjinin aminoasitleri bakımından zengin PRD bölgelerinden de yoksundurlar (**Şekil 4.8**). MxA ve fare Mx2 genlerinin LZ bölgesindeki nokta mutasyonları karboksi-terminal efektör bölgenin viral hedefi tanıma açısından çok önemli olduğunu göstermiştir. Mx GTPaz'ların üç boyutlu yapısı henüz tam olarak bilinmemektedir [78-80].



Şekil 4.8. MxGTPazların yapı ve domain kompozisyonları (A) huMxA nın fonksiyonel domainlerini gösteren sistematik diyagram (B) İnsan MxA, MxB ve fare Mx1' in insan dinamin1 proteini ile karşılaştırılması [78].

Dinamin benzeri GTPaz'ların oligomer formuna kendiliğinden kurulma ve GTP'yi hidroliz etme özellikleri vardır. Mx proteinlerindeki kendiliğinden kurulma özelliği de GTPaz aktivitesi, protein stabilitesi ve viral hedef yapılarını tanıma için kritik bir özelliktir (93). Homo-oligomerizasyon daha çok LZ bölgesindeki bir molekülün CID bölgesindeki ikinci komşu molekülüne bağlanması sonucu oluşur. MxA geninin LZ bölgesinin 612. pozisyonunda yer alan lösin aminoasitinin GTPaz aktivitesi açışından önemli olduğu saptanmıştır. Bu pozisyonda lösin amino asitinin mutasyon sonucu lizine dönüştürülmesi MxA proteinin kendiliğinden oligomerizasyonla agregat oluşturma ve GTP'yi hidroliz etme yeteneğinin kaybolmasına neden olduğu belirlenmiştir. Bunun sonucunda oligomerizasyonun GTPaz aktivitesi için çok önemli bir düzenleyici olduğu anlaşılmıştır [81, 82]. Bununla birlikte Mx proteinlerinin GTPaz aktivitesinin antiviral etki ortaya koyması bakımından önemi hakkında farklı görüşler rapor edilmektedir. Bir araştırma grubu GTPaz aktivitesinin Mx proteinlerinin antiviral aktivitesi için gerekli olan bir işlev olduğunu ileri sürerken, diğer bir grup monomerik halde bulunan ve GTPaz aktivitesi olmayan mutant MxA proteinin antiviral etkiye sahip olduğunu rapor etmektedir. Bununla birlikte, Mx proteinlerinin

orthomyxovirus, *bunyavirus*, *rhabdovirus*, *alfavirus* ve *paramyxovirus* familyalarını kapsayacak şekilde birçok RNA virusunun replikasyonunu inhibe ettiği gerek in vivo gerekse in vitro deneylerle kanıtlanmıştır [78, 83].

Mx proteinlerinin bir kısmı sitoplazmada lokalize olurken, diğer bir kısmı ise hücre nükleusunda lokalizasyon göstermektedir. Örneğin fare Mx1 proteini nukleusta lokalize olmaktadır. İnsan MxA proteini ise sitoplazmada lokalize olur. Sitoplazmik Mx proteinleri intraselüler membranlarla birleşme gösterirler. [84]. İnsan MxB proteini, amino-terminal ucunda NLS dizisi taşıdığından MxA proteinine göre farklılık göstermektedir. MxB proteinin antiviral aktivitesi çok düşüktür. MxB proteini hücrede nukleus veya nüklear porların sitoplazmik yüzeylerinde lokalize olmaktadır. Bu proteinin nukleo-sitoplazmik transportta görev aldığı düşünülmektedir. GTPaz özelliği kusurlu MxB mutantlarının etkin bir biçimde nükleustan sitoplazmaya taşınmayı bloke ettiği ve hücre döngüsünde G(1)/S fazı geçişinde gecikmeye sebep olduğu rapor edilmiştir [85].

Mx proteinlerinin antiviral özellikleri hücre içerisindeki lokalizasyonlarına göre farklılık göstermektedir. Örneğin nuklear lokalizasyon gösteren fare Mx1 proteini FLUAV ve Thogoto virüsleri (THOV) gibi *orthomyxovirus* ailesi içerisinde yer alan virüslere karşı antiviral etki gösterirler. Sitoplazmik bir protein olan Mx2 proteini ise rhabdovirüslerinin veya bunyavirüslerinin replikasyonunu sitoplazmada inhibe ederler. İnsan MxB proteini daha önce belirtildiği gibi nukleositoplazmik lokalizasyon gösterir ve antiviral aktivitesi çok düşüktür. İnsan MxA proteini ise sitoplazmada yer alır ve *bunyavirus*, *orthomyxovirus*, *paramyxovirus*, *rhabdovirus* aileleri içerisinde yer alan birçok virüse karşı antiviral etki gösterirler [78].

Mx proteinlerinin antiviral mekanizmasını aydınlatmaya yönelik birçok çalışma yapılmaktadır. Bununla birlikte etki mekanizması tam olarak aydınlatılabilmiş değildir. Mx proteinleri temel viral komponentlere bağlanmakta ve fonksiyonlarını bloke etmektedir. Viral nükleokapsidin nükleoprotein komponenti ile fiziksel etkileşimi THOV ve LACV virüsleri için ispat edilmiştir. MxA içeren hücre lizatı THOV nukleokapsidleri ile karıştırılmış, MxA proteini nukleokapsidler ile birlikte çökelti oluşturmuştur [78]. Bu interaksiyon in vivo deneylerlede kanıtlanmıştır ve bu deneyler sonucunda elde edilen veriler sitoplazmik MxA proteininin nukleokapsidlerin nukleus içerisine transportunu engellediğini göstermiştir. MxA eksprese eden hücrelere mikroenjeksiyon yöntemiyle saflaştırılmış viral nükleokapsidleri verildiğinde, MxA bunların nukleusa hareketini bloke etmiştir. Bununla birlikte tam olarak

moleküler düzeyde MxA nın nuklear transportu nasıl engellediği bilinmemektedir [78]. Thogota virüsü ile infekte olmuş hücrelerde MxA proteini viral nukleokapsidler ile etkileşime girerek viral nükleokapsidlerin nukleusa transportunu inhibe eder. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda da MxA proteininin hepatit B virüslerinde viral mRNA nın nukleustan transportunu bloke ederek virüsünün çoğalmasını inhibe ettiği bulunmuştur [86].

Fare Mx1 proteini ve insan yapay olarak hücre nükleusunda lokalize olması sağlanan MxA proteinleri influenza virüs genomunun transkripsiyonunu inhibe ettiği bilinmektedir. Nükleusta lokalize olan MxA proteininin anti-influenza virüs aktivitesini açıklamak için minireplikon sisteminden yararlanılmıştır. Bu sistem lusiferaz belirteç geni, RNA polimeraz alt üniteleri ve NP proteinini kodlayan plazmitvektörlerden oluşmaktadır. Çalışmanın sonucunda, nükleusta lokalize olan MxA proteininin, belirteç gen ekspresyonunu ileri düzeyde inhibe ettiği ve bu inhibisyonun PB2 proteininin ekpresyon düzeyinin arttırılması ile belirli düzeyde nötralize olduğu rapor edilmiştir. Bununla birlikte, yapay olarak hücre içerisinde NP proteininin ekspresyon düzeyinin arttırılmasının MxA proteininin aktivitesine önemli ölçüde baskıladığı görülmüştür. İmmün-çöktürme (co-immunprecipitation) çalışmaları sonucunda MxA proteininin direk veya indirek yollarla NP proteini ile kompleks oluşturarak viral transkripsiyonu engellediği rapor edilmiştir [87].

Tavuk hücreleri influenza virüsleri için doğal konak hücreleridir. Daha önce bahsedildiği üzere tip I interferonlar influenza virüslerine karşı savunmada temel rol oynarlar. İnterferonların antiviral aktivitesi ilk kez tavuk embriyosunda gözlenmiştir [88]. Fareler üzerinde yapılan çalışmalar sonucunda interferonlarla indüklenmiş Mx1 proteininin influenza virüsüne karşı efektör rol oynadığı belirlenmiştir. Fonksiyonel Mx1 geni taşıyan fareler influenza virüsü infeksiyonuna karşı dirençlidirler. Deneyler sonucu elde edilen defektif Mx1 geni taşıyan fareler ise yüksek dozlarda influenza virüsü infeksiyonuna karşı duyarlıdırlar. Son zamanlarda yapılan çalışmalar sonucunda tavuk Mx genlerinin yüksek derecede polimorfik olduğu görülmüştür. Tavuk Mx proteininde 631.pozisyonunda Asn/Ser polimorfizminin, antiviral aktiviteyi etkilediği bulunmuştur. Tavuk Mx protein varyantlarının fare fibroblast 3T3 hücre hatlarında eksprese edilmesi Mx-631Asn varyantının influenza virüsüne karşı direnç oluşturduğu, Mx-631Ser varyantının ise etkili olmadığı belirlenmiştir. Bunun üzerine tavuk hücreleri ve embriyosunda Mx-631 izoformlarının etkisi araştırılmış ancak Mx-631Ser veya Mx-631Asn izoformlarının in vivo ve in vitro şartlarda koruyucu bir etkisi bulunamamıştır [88].

Yukarıda ayrintılı olarak verilen bilgileden de anlaşıldığı gibi Mx proteinlerinin influenza virüslerini de kapsayan çok geniş bir yelpazede RNA virüslerine karşı önemli bir antiviral aktiviteye sahiptir. Bununla birlikte bu proteinlerin antiviral etki mekanizmaları tam olarak açıklık kazanmamıştır. Mx proteinlerinin etki mekanizmalarının ortaya konması, gerek insan ve gerekse hayvanların kendi doğal savunma mekanizmalarını harekete geçirerek bu proteinleri duyarlı virüslerle mücadelede yeni ve önemli bir alternatif sunabilir. Dolayısıyla birçok araştırmacı Mx proteinlerinin etki mekanizmalarını saptamaya yönelik yoğun çaba sarfetmektedir. Bu bağlamda gerçekleştirilen bu tez çalışmasında farelere özgü Mx2 proteinin influenza virüsü replikasyonu ve transkripyonunun baş aktörü olan viral RNA polimeraz enzimine etkileri araştırılmıştır. Çalışmada, daha önce insan MxA proteinlerinin etki mekanizmalarını saptamaya yönelik geliştirilen minireplikon sistemi [87] kullanılmıştır.

5. GEREÇ VE YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma, ABD
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	Sigma, ABD
Bovin serum albümin (BSA)	Sigma, ABD
Dulbecco's modified eagle medium (D'MEM)	Difco, ABD
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma, ABD
Etil alkol	Carlo Erba, İtalya
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Fenol	Sigma, ABD
Fetal calf serum (FCS)	Biochrom, Almanya
İzoamil alkol	Sigma, ABD
İzopropanol	Sigma, ABD
Kalsiyum klorür	Sigma, ABD
Kloroform	E.Merk, Almanya
L-Glutamin	Sigma, ABD
Penisilin/Steptomisin	Sigma, ABD
Polietilenglikol (PEG)	Sigma, ABD
Potasyum klorür	Sigma, ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	E. Merck, Almanyas
Sodyum asetat	Sigma, ABD
Sodyum klorür	Carlo Erba, İtalya
Tetramethylethylenediamine	Sigma, ABD
Tripsin	Sigma, ABD
Tween 20	Glaxowellcorn

5.2. Enzimler

Restriksiyon Endonukleazları:

DraI, XhoI, BamHI, EcoRI, PstI, Eco01091, EcoRV, NheI, Bgl II, Hind III (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) enzimleri plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde kullanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri:

Klenow Enzimi, Alkalen Fosfataz, T4 DNA Ligaz, Polinükleotid Kinaz, RNaz (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs)

Termostabil DNA polimerazlar:

Taq DNA polimeraz (MBI Fermentas ve New England Biolabs), Phusion DNA polimeraz (Finnzymes).

5.3.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), lusiferaz assay kiti (Roche Cat. No. 11 814 06 001) , SEAP assay kiti (Roche Cat. No. 11 779 842 001), orta-ölçekte plazmit izolasyon kiti (Qiagen) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) kullanıldı.

5.4. Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
Çalkalayıcı Su Banyosu	Nüve BM 102, Türkiye
Etüv	Memmert, Almanya
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Mekanik karıştırıcı	Ika- Werk, Almanya
Yatay Jel Elektroforez Cihazı	Atto, Japonya
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Otoklav	Kermanlar, Türkiye
Soğutmalı Santrifüj	Sigma, ABD
Mikrosantrifüj	Hettich, Almanya
Mikroskop	Olympus BH40, Japonya

Dikey Jel Elektroforez Cihazı	Sigma, ABD
pH metre	Sigma, ABD
Luminometre	Sigma, ABD
Steril Çalışma Kabini	Sigma, ABD
Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Flüoresan Mikroskop	Sigma, ABD
Hassas Terazi	Sigma, ABD
Su Banyosu	Sigma, ABD
PZR Cihazı	Sigma, ABD

5.5. Besiyerleri

5.5.1.Luria Bertani (LB) Besiyeri

10 gr tripton, 5 gr maya özütü ve 10 gr sodyum klorür deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 1 litreye tamamlandı [89].

5.5.2.Luria Bertani Agar (LBA) Besiyeri

LB besiyerine % 1.5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı.

LB ve LBA besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Gerektiğinde besiyerlerine 100 µg/ml final konsantrasyonda ampisilin ya da 30 µg/ml final konsantrasyonda kanamisin eklendi [89].

5.5.3.Memeli Hücre Kültürleri İçin Besiyerleri

Memeli hücrelerinin üretilmesinde besiyeri olarak glikoz konsantrasyonu 1 g/L veya 4.5 g/L olan *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM-LG ve DMEM-HG) (Gibco, USA) kullanıldı. Önce x4 konsantre stok besiyerleri hazırlandı. Bunun için 10g DMEM-LG ya da 13.4g DMEM-HG deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek 250 ml'ye tamamlandı ve 0.2 µm filtre ile steril edildi. Hücre üretme besiyerleri, 50 ml x4 konsantre DMEM üzerine 126 ml steril deiyonize distile su, 20 ml FCS (fetal calf serum), 2 ml x100 konsantre penisilin/streptomisin ve 2 ml % 7.5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.6. Çözeltiler

5.6.1. Sodyum Hidroksit Çözeltisi (2 N)

20 gr Sodyum Hidroksit 100 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülüp 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı. (Sodyum hidroksit Mw=39.99)

5.6.2. Sodyum Dodesil Sülfat (SDS) Çözeltisi (% 10 –a/h)

20 gr SDS 100 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülüp 200 ml' ye tamamlanarak hazırlandı.

5.6.3. Hidroklorik Asit Çözeltisi (3 N)

3,4 ml %37' lik (w/w) HCl çözeltisi 50 ml distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml tamamlanarak hazırlandı. (Hidroklorik Asit Mw=36.46)

5.6.4. Potasyum Asetat Çözeltisi (3 M)

29.46 gr Potasyum Asetat deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. (Potasyum asetat Mw= 98.14)

5.6.5. Sodyum Klorür Çözeltisi (2.5 M)

37 gr Sodyum Klorür 200 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacim 500 ml'ye tamamlandı. (Sodyum Klorür Mw=58.5)

5.6.6. Pipes Çözeltisi (1 M)

30.2 gr Pipes, 60 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülür ve pH'sı 7.5 olacak şekilde ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı. (Pipes Mw=302.37)

5.6.7. Kalsiyum Klorür Çözeltisi (2.5 M)

97 gr Kalsiyum klorür 200 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 300 ml'ye tamamlandı. Çözelti daha sonra otoklavda steril edildi. (Kalsiyum Klorür Mw= 110.98)

5.6.8. Potasyum Klorür Çözeltisi (2.5 M)

93 gr Potasyum Klorür çözeltisi 300 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. (Potasyum Klorür Mw= 74.55)

5.6.9. $MnCl_2$ Çözeltisi (0.55M)

55 gr $MnCl_2$.4H2O, 300 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. ($MnCl_2$ Mw=125.84)

5.6.10. Kapatma Çözeltisi

10 mg fenilindiamin 1 ml 20 mM Tris tamponunda (pH:8.8) çözündürüldü ve saf gliserol ile 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti karanlıkta -20 °C'da saklandı.

5.6.11. Polietilen Glikol Çözeltisi (% 40 –a/h)

40 gr Polietilen Glikol 60 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 100 ml tamamlandı. Çözelti 0.45 µm filtreden geçirildi.

5.6.12. Glikoz Çözeltisi (1 M)

90 gr glikoz 300 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. (Glikoz Mw=180.16)

5.6.13. %70 Etil Alkol

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

5.6.14. Fenol : Kloroform : İzoamil Alkol (25:24:1)

Kristal halde fenol, 65 °C'da çözündürüldü ve oksidasyonu önlemek için ortama % 0.1 (a/h) konsantrasyonda 8-hidroksikinolin katıldı. Fenol üzerine eşit hacimde 0.5 M Tris-Cl tamponu (pH 8) eklendi ve 30 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için, emülsiyon 4 °C'da 60 dakika bekletildi ve üst faz bir su trompu yardımıyla uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0.1 M Tris-Cl tamponu ile fenolün pH değeri >7.8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık % 90'ı uzaklaştırıldı ve 4 °C'da saklandı [89]. Yaklaşık pH değeri 8 olan doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanıldı.

5.6.15. Etidyum Bromür (10 mg/ml)

0.1g Etidyum Bromür 10 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı.

5.6.16. Etilendiamintetraasetik Asit (EDTA) Çözeltisi (0.5 M, pH: 8.0)

186.1 gr EDTA 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. Pellet halde NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildi. (EDTA Mw = 372.2)

5.6.17. Tris-Asetat-EDTA (TAE) Tamponu (50x)

242 gr Tris deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH:8.0) eklendi. Elektroforez tamponu olarak ya da agaroz jellerin hazırlanmasında 1:50 oranında sulandırıldıktan sonra kullanıldı.

5.6.18. 3-(N-morpholino)propanesulfonik Asit (MOPS) Tamponu (10x)

41.8 gr MOPS 700 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve pH'sı 7.0 ye ayarlandı. Üzerine 20 ml 1 M sodyum asetat ve 20 ml 0,5 M EDTA eklendi ve hacmi 1litreye tamamlandı. Tampon 0.45 μm fitreden geçirilerek steril edildi.

5.6.19. Amonyum Persülfat (APS) Çözeltisi (% 10 – a/h)

1 g amonyum persülfat deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 10 ml'ye tamamlandı.

5.6.20. Tris-Cl Tamponu (1 M, pH: 8.0)

121.1 gr Tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 5 N HCl çözeltisi ile pH'sı 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Tris-HCl tamponu otoklavda 121 C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. (Tris. Mw=121.1)

5.6.21. Tris/ EDTA (TE) Tamponu (10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH : 8.0)

10 ml 1 M Tris-HCl tamponu (pH: 8.0) ve 2 ml 0.5 M EDTA çözeltisi (pH: 8.0) deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.6.22. Polietilenglikol (PEG) / NaCl çözeltisi (% 20 / 1.25 M)

% 40 PEG çözeltisi ve 2.5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı.

5.6.23. DNA Yükleme Tamponu (2x)

25 mg bromofenol mavisi 6.7 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 25 mg xylene cyanol FF ve 3.3 ml gliserol eklenip karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan 6x DNA yükleme tamponu -20 °C' da saklandı [89].

5.6.24. RNA Yükleme Tamponu (2x)

120 µl 10x MOPS, 200 µl formaldehit, 600 µl formamid ve 280 µl 6x DNA yükleme tamponu karıştırılarak hazırlandı [89].

5.6.25. DNA Ekstraksyon Tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA pH: 8.0)

2,5 ml 1 M Tris-Cl, 20 ml 1 M glikoz ve 0,2 ml 5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 200 ml'ye tamamlandı [89].

5.6.26. DNA Ekstraksyon Tamponu II (0,2 N NaOH, % 1 SDS)

Bir hacim NaOH, 1 hacim % 10 SDS çözeltisi ve 8 hacim deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı [89].

5.6.27. DNA Ekstraksyon Tamponu III (3 M Potasyum : 5 M Asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11,5 ml glasiyel asetik asit deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (Potasyum Asetat Mw = 98.14) [89].

5.6.28. Sodyum Asetat Tamponu (3 M)

20.4 gr sodyum asetat ($CH_3COONa.3H_2O$), 40 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülüp pH'sı 5.2 ye ayarlandıktan sonra 50 ml'ye tamamlandı.

5.6.29. Akrialmid/bis-Akrilamid Çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-Akrilamid –a/h)

29.0 g Akrilamid ve 1 g bis-Akrilamid deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı [90]. Çözelti 0.2 µm filtreden geçirildi.

5.6.30. Konsantre Jel Çözeltisi-B (1.5 M Tris, % 0.4 SDS– a/h, pH: 8.8) (4x)

91 g Tris ve 2 g SDS 400 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 8.8' e ayarlandı. Çözeltinin hacmi deiyonize distile su ile 500 ml'ye tamamlandı [90].

5.6.31. Konsantre Jel Çözeltisi-C (0.5 M Tris, % 0.4 – a/h SDS, pH :6.8) (4x)

6.05 g Tris ve 0.4 g SDS 80 ml deiyonize distile su içinde çözündürüldü, çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6.8'e ayarlandı ve hacmi de iyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı [90].

5.6.32. Tris Glisin Tamponu (0.125 M Tris, 0.25 M Glisin, pH:8.3) (5x)

15.1 g Tris ve 95 g glisin deiyonize su içinde çözündürüldü, pH' sı 8.3' e ayarlandıktan sonra hacimi 100 ml'ye tamamlandı [90].

5.6.33. Akrilamid Jel Elektroforez Tamponu: (0.025 M Tris, 0.05 M Glisin, % 0.1 – a/h SDS, pH 8.3)

200 ml 5x Tris Glisin tamponu deiyonize distile su ile 990 ml'ye tamamlandı, üzerine 10 ml % 10 SDS eklendi [90].

5.6.34. Protein Yükleme Tamponu (0.25 M Tris; % 4 SDS – a/h; % 0.002 Bromophenol blue – a/h ; % 4 2-beta-Merkaptoetanol - h/h; % 40 Gliserin– h/h, pH:6.8) (4x)

1.52 g Tris, 2 g SDS ve 1 mg bromophenol mavisi 20 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve üzerine 2 ml 2-beta-Merkaptoetanol ile 20 ml gliserin eklendi. Çözeltinin pH' sı 1 N HCl ile 6.8' e ayarlandıktan sonra deiyonize distile su ile hacim 50 ml'ye tamamlandı [89].

5.6.35. Bakteri Transformasyon Tamponu

1 ml 1 M Pipes, 2 ml 2.5 M $CaCl_2$ ve 20 ml 2.5 M KCl 150 ml deiyonize distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6.7'ye ayarlandıktan sonra üzerine 20 ml 0.55 M $MnCl_2$ eklendi, hacmi su ile 250 ml'ye tamamlandı ve 0.2 μm fitreden geçirilerek steril edildi [91].

5.6.36. Tamponlanmış Fizyolojik Tuzlu Su (T-FTS) (5x)

40 g NaCl, 1 g KCl 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürülüp üzerine 7.2 g Na_2HPO_4 ve 1,2 g KH_2PO_4 eklendi, pH'sı 7.4'e ayarlandıktan sonra hacim 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan tamponlanmış fizyolojik tuzlu su, otoklavda 121 °C' da 1 atmosfer

basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi. Kullanılacağı zaman steril deiyonize distile su ile 1:5 oranında sulandırıldı.

5.6.37. TBS Tamponu (20x)

8 gr NaCl, 0.2 gr KCl ve 3 gr Tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH' sı 7.4 olacak şekilde ayarlanıp hacmi 1000 ml tamamlandı ve sterilizasyon için 20 dak. otoklavlandı.

5.6.38. TBS-T Tamponu

50 ml 20x TBS tamponu, 10 ml % 10 Tween20 deiyonize distile su ile 1000 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.6.39. Bloklama Çözeltisi (% 5 lik yağsız süt tozu)

25 g yağsız süt tozu, 0,5 g Tween20 deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 474 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x TBS ve 1 ml % 10 NaN_3, eklendi.

5.6.40. Protein Transfer Tamponu

200 ml 5x Tris Glisin tamponu ile 100 ml metanol deiyonize distile su ile 1litreye tamamlanarak hazırlandı.

5.7. Plazmit Vektörler

Fare Mx2 geninin klonlanmasında memeli hücrelerinde ekspresyon yapan pCAGGS plazmitinden [92] türetilen pCHA plazmit vektörü kullanıldı. pCHA vektörü Prof. Dr. Nagata tarafından verilmiştir [93]. Transfeksiyon koşullarının belirlenmesi ve normalizasyonunda pEGFP-N1 (Clontech, ABD) ve pSEAP plazmitlerinden yararlanıldı. Çalışmada kullanılan, influenza virüsü mini genomunu oluşturan pCAGGS-PB2, pCAGGS-PB1, pCAGGS-PA, pCAGGS-NP ekspresyon vektörleri ve pHH21-vNS-luc belirteç vektörü tez danışmanım Doç. Dr. Kadir Turan tarafından oluşturulmuştur. Fare hücre hatlarına özgü pMP-vNS-luc belirteç vektör Turan ve ark. [94] tarafından oluşturulmuştur.

5.8. Escherichia coli

Plazmit DNA'ların çoğaltılmasında E. coli DH5α bakteri ırkı kullanıldı.

5.9. Memeli Hücre Hatları

Çalışmada Swiss 3T3 (fare fibroblast hücreleri) ve HEK 293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) hücre hatları kullanıldı. Swiss 3T3 hücreleri, 1962 yılında Todara ve Green [95] tarafından fare embriyo dokusunda elde edilmiş ve günümüzde standart hücre hattı olarak kullanılmaktadır. İnsan embriyonik böbrek hücreleri ise, 1970'li yılların başlarında Alex Van der Eb tarafından kültüre edilmiştir. Hızlı çoğalmaları ve transfeksiyon etkinliklerinin yüksek olması nedeniyle bilimsel çalışmalarda sıklıkla tercih edilen bir hücre hattıdır.

5.10. Agaroz Jelin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde % 1-1.5' lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Analiz edilecek DNA moleküllerinin boyutuna göre 1 ya da 1.5 g agar 100 ml 1x TAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 55-60 °C' a düştüğünde 0.1-0.2 µg/ml final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel donduktan sonra 1x TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında 6x yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100V sabit elektrik akımı altında 20-25 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotografları çekildi.

5.11. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalite tayinlerinde spektrofotometreden yararlanıldı. DNA miktarlarının saptanmasında, "DNA konsantrasyonu (µg/ ml) = OD_{260} . D . K_d"; RNA miktarlarının saptanmasında "RNA konsantrasyonu (µg/ ml) = OD_{260} . D . K_r" formülünden - yararlanıldı. [OD_{260}, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda elde edilen absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; K_d, (50 µg/ml); K_r, (40 µg/ml)]. DNA ya da RNA'nın saflığı OD_{260}/OD_{280} oranından yararlanılarak saptandı. (Bu oran kaliteli DNA için ~1.8; RNA için ise ~2.0'dir).

5.12. Transformasyon için *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi

Plazmitlerin üretilmesinde konak bakteri olarak *Escherichia coli* DH5α ırkı kullanıldı. Bu amaçla, -80 °C' da saklanan bakteri stoğundan LBA besiyerine öze ile ekim yapıldı ve 37 °C' da bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan kültürden tek bir koloni alındı ve 5 ml sıvı LB besiyerine ekim yapıldı. Kültür 37 °C'da 150 dev./dk. çalkalama hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik kültür 150 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 23-25 °C' da 150

dev./dk. çalkalama hızında üremeye bırakıldı. Kültür, OD_{600} = 0.25 - 0.3 değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4 °C' da 5 dakika, 4000 dev./dk. hızda santrifüj edilerek bakteriler çökeltildi. Çökelti 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C' da 5 dakika 4000 dev./dk. hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi [91]. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı, ya da ileride kullanılmak üzere – 80 °C' da saklandı.

5.13. Memeli Hücre Hatlarının Devamlılığının Sağlanması

Hücreler 10 ml besiyeri içeren10 cm'lik petri kutularında standart kültür koşullarında (37 °C, % 5 CO_2, % 95 nem) inkübe edildi ve 3-4 gün aralıklarla pasajları yapıldı. Doygun kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve 37 °C' da 5-10 dakika Tripsin:EDTA etkisinde bırakıldı. Hücreler 5 ml besiyerinde süspanse edildi. 0.25-0.5 ml hücre süspansiyonu 10 ml besiyeri içeren petriler aktarıldı ve üremeye bırakıldı. HEK293 hücreleri için yüksek glikozlu besiyeri (D'MEM HG), Swiss3T3 hücreleri için ise düşük glikozlu besiyeri (D'MEM LG) kullanıldı.

5.14. Fare Mx2 cDNA' sının Hazırlanması

Fare Mx2 geni cDNA'sı, fare orijinli Swiss3T3 hücrelerinden izole edilen total RNA üzerinden reverz transkripsiyon ile elde edildi.

5.14.1. Swiss 3T3 Hücrelerinden Total RNA'nın İzole Edilmesi

Swiss 3T3 hücreleri D'MEM-LG besiyeri içeren 6 cm'lik petri kutusuna ortalama $2x10^5$ hücre olacak şekilde ekildi. Hücreler standart kültür koşullarında 24 saat inkübe edildi. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve Tripsin:EDTA uygulanarak hücreler toplandı. Total RNA'nın izolasyonunda ticari RNA izolasyon kiti (Roche) kullanıldı. Yöntem olarak üretici firma tarafından önerilen yöntem izlendi. 200 µl T-FTS içerisinde hazırlana hücre süspansiyonu (~$2x10^5$ hücre) üzerine 400 µl lizis çözeltisi eklendi ve tüp karıştırıcıda 5-10 s karıştırıldı. Elde edilen hücre lizatı kolonlu bir tüpe aktarıldı ve 10.000 dev/dk hızda 30 s santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. DNA kontaminasyonunu önlemek için kolon üzerine DNaz (10 µl DNaz + 90 µl reaksiyon tamponu) eklendi ve 15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. RNA bağlı kolon 500 µl yıkama çözeltisi I ve yıkama çözeltisi II ile yıkandı. Son aşamada kolona 50 µl elüsyon tamponu eklendi ve 10.000 dev/dk hızda 1 dakika santrifüj edilerek

RNA molekülleri elüe edildi. Elde edilen total RNA, formaldehit içeren agaroz jel ile kontrol edildi ve -80 °C'da saklandı.

5.14.2. Formaldehit İçeren Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Formaldehitli jel hazırlamak için 1.5 g agar 80 ml deiyonize distile su içerisinde kaynatıldı. Üzerine 10 ml 10x konsantre MOPS tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 55-60 °C' a düştüğünde 9 ml % 37 formaldehit eklendi ve yatay jel kasetlerine dökülerek donması sağlandı [89]. Elektroforez işlemi 1x konsantre MOPS içerisinde gerçekleştirildi. RNA örnekleri 2x konsantre RNA jel yükleme tamponuyla karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit elektrik akımı altında 30 dakikada tamamlandı. Jeller 200 µg/ml konsantrasyon etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 15-20 dakika bekletildi ve UV transillüminatör ile görünür hale getirilerek fotografları çekildi.

5.14.3. cDNA'ların Hazırlanması ve Fare Mx2 Geninin PCR ile Çoğaltılması

Swiss3T3 hücrelerinden elde edilen total RNA üzerinden oligo dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA hazırlandı. Reverz transkripsiyon için ticari kit (Roche) kullanıldı. Reaksiyon 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. 1.5 ml'lik plastik tüpe 500 ng total RNA, 50 pikomol oligo dT primer eklendi ve hacim 11.4 µl'ye tamamlandı. Ortam 65 °C' da 10 dakika tutularak RNA denatürasyonu sağlandı ve sonrasında buz üzerine alındı. Reaksiyon ortamına sırasıyla 4 µl 5x konsantre reaksiyon tamponu, 0.5 µl (40U/µl) RNaz inhibitörü, 2 µl (10 mM) dNTP karışımı 1 µl (5 mM) DTT ve 1.1 µl (10U) reverz transkriptaz enzimi eklendi. Ortam 50 °C' da 45 dakika cDNA sentezi için, 80 °C' da 10 dakika enzimlerin inaktivasyonu için bekletildi. Elde edilen cDNA fare Mx2 geni kodlayıcı bölgesinin PZR ile çoğaltılmasında kullanıldı.

Fare Mx2 geninin kodlayıcı bölgesini PZR ile çoğaltmak için, referans Mx2 cDNA dizisi (NCBI Ref. No NM_013606.1) göz önüne alınarak, 5′-TAT*GATATC*ATGGTTCTTAGCACAGAAGAAAAC-3′ (Mx2-for) ve 5′-CGC*GATATC*TTAACCAGGGAATTTGGCTAGC-3′ (Mx2-rev) primer çifti oluşturuldu. PZR reaksiyon 50 µl hacim içeresinde gerçekleştirildi. 0.2 µl' lik PZR tüpüne 2 µl cDNA, 2.5 µl Mx2-for (10 pM), 2.5 µl Mx2-rev (10 pM), 5 µl dNTP karışımı (2 mM), 4 µl $MgCl_2$ (25 mM), 5 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 29 µl deiyonize distile su ve 1U Pwo DNA polimeraz enzimi (5U/µl) eklendi. Reaksiyon, 95 °C da 2 dakika ön denatürasyondan sonra

30 döngü, 95°C-15 s / 54°C-15 s / 72°C-2 dk ve bir döngü 72°C-10 dk olacak şekilde gerçekleştirildi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.15. PZR Ürünlerinin Restriksiyon Enzimi ile Kesilmesi ve Saflaştırılması

PZR ile elde edilen ürünler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. Bu amaçla, PZR ürünlerinin hacmi 100 µl ye tamamlandı, üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Ortam 14.000 dev/dk hızda, 20 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0.1 hacim 3M Sodyum Asetat ve 2.5 hacim saf etil alkol eklendi. Ortam 10 dakika buz üzerinde bekletildi ve 4 °C' da 15 dakika 14.000 dev/dk hızda santrifüj edildi. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 90 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA örneği, üzerine 10 µl 10x konsantre EcoRV tamponu ve 10 U EcoRV restriksiyon endonükleazı eklendikten sonra 2-3 saat 37 °C'da su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyon sonrası DNA örnekleri yukarıda belirtildiği şekilde tekrar fenol:kloroform ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. Çökelti 20 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü, üzerine 4 µl 6x konsantre DNA yükleme tamponu eklendi ve % 1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, 1x TAE tamponu içerisinde 100 V sabit elektrik akımı altında 20-25 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası fare Mx2 DNA bandı UV ışık altında bir bisturi yardımıyla kesilip çıkartıldı ve 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. DNA moleküllerinin jelden kurtarılmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Invitrogen) kullanıldı. İşlemler kit için önerilen yönteme uygun olarak gerçekleştirildi. EcoRV enzimi ile kesilmiş halde fare Mx2 DNA fragmentleri 30 µl elüsyon tamponu ile elue edildikten sonra, ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.16. pCHA-Mx2 Plazmid Vektörünün Oluşturulması

pCHA-Mx2 vektörü, EcoRV restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA plazmit vektörü ile yine aynı enzimle kesildikten sonra agaroz gel elektroforezi ile saflaştırılan fare Mx2 DNA fragmentlerinin ligasyonu ile oluşturuldu.

5.16.1. pCHA Plazmit DNA'nın EcoRV ile Kesilmesi

5 µg pCHA plazmit DNA'sı deiyonize distile su ile 90 µl'ye tamamlandı, üzerine 10 µg 10x EcoRV tamponu ve 5U EcoRV restriksiyon endonükleazı (10U/ µl eklendi ve 37 °C'da su banyosunda 2-3 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'ların kesilip kesilmediği agaroz gel elektroforezi ile kontrol edildi. DNA örneği 5.15' de belirtildiği şekilde fenol:kloroform ile

ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. Çökelti 45 µl TE içerisinde çözündürüldü. Plazmit DNA'lar SAP ile defosforile edildi. Bunun için TE de çözündürülen DNA üzerine 5 µl SAP tamponu ve 2U SAP (1U/µl - Fermentas) eklendikten sonra 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA örneği fenol:kloroform ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltisi 25 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C' da saklandı.

5.16.2.pCHA ve Mx2 DNA'nın Ligasyonu ve Transformasyon

5.7 ve 5.14' de belirtildiği şekilde hazırlanan pCHA ve Mx2 DNA örneklerinin yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Ligasyon işlemi 10 µl hacim içerinde T4-DNA ligaz enzimi ile gerçekleştirildi. Yaklaşık 20 ng kesilmiş pCHA, 30 ng Mx2 DNA'sı, 1 µl 10x konsantre T4-ligaz tamponu ve 5 U T4 DNA ligaz karıştırılarak deiyonize distile su ile 10 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamı 8-16 saat süre ile 15 °C' da PZR cihazında inkübe edildi ve inkübasyon sonrası transformasyon da kullanıldı. Ligasyon ürünleri 1.5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. Üzerine daha önce anlatıldığı şekilde hazırlanan 100 µl kompetent hücre eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 1 dakika 42 °C'da su banyosunda, 2 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücrelerin üzerine 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 45 dakika inkübe edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 150 µl, antibiyotikli LBA besiyerine cam bagetle yayılarak ekildi ve 37 °C'da 1 gece üremeye bırakıldı. Plazmidleri alan, transformant bakterilerin oluşturduğu kolonilerden 5 ml sıvı kültürler hazırlandı ve küçük ölçekte plazmit DNA hazırlandı.

5.16.3.pCHA-Mx2 Vektörü Taşıyan Bakteri Kolonilerini Saptanması

Ligasyon ürünleri ile transformasyon sonucu oluşan bakteri kolonilerinden 5 ml doygun kültürler hazırlandı. Belirli sayıda bakteri kolonisi steril kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine aktarıldı ve 37 °C' da 120 dev./dk. çalkalama hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler 6000 dev./dk. hızda 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücre çökeltisi 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 200 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanan hücrelerin üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu III eklendi ve karıştırılıp buz içerisinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4 °C' da, 15000 dev./dk. hızda 15 dakika

santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmid DNA'sını içeren üst sıvı üzerine 2,5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 20 °C' da 15-20 dakika bekletildikten sonra 14000 dev./dk. hızda 15 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. DNA çökeltisi % 70 etanol ile yıkandı ve kurutulduktan sonra 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri restriksiyon endonüklezları ile kesilerek ön kontrolleri yapıldı. Fare Mx2 genini taşıyan DNA örnekleri PEG/NaCl çözeltisi ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

5.16.4. Küçük Ölçekte Plazmit DNA'ları Restriksiyon Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi

Küçük ölçekte elde edilen plazmit DNA'ları EcoRV ve BglII restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrol edildi.

5.16.5. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizler

TE tamponu içerisinde çözündürülen DNA örnekleri eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi. DNA içeren üst faz yeni bir tüpe transfer edildi ve 4 hacim PEG/NaCl (%20 / 1.25 M) çözeltisi ile iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat buz üzerinde tutuldu. Sürenin sonunda 4 °C' da 15000 dev./dk. hızda, 25 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. Çökelti 1 ml % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 50-100 µl TE içerisinde çözündürüldü. Uygun görülen DNA örnekleri dizi analizlerinde kullanıldı. DNA dizi analizleri için İontek (Merter/ İstanbul) hizmet alımına gidildi.

5.17. SV40 T Antijeni Nüklear Lokalizasyon Sinyali Taşıyan Fare Mx2 Geninin Elde Edilmesi

Fare Mx2 proteini, hücrelerde sitoplazma içerisinde lokalizasyon gösteren bir proteindir. Buna karşın, bu çalışmaya konu olan influenza virüsü RNA polimeraz enzimleri, hücre nükleusunda yer alırlar. Bu nedenle hücrede sentez edilecek Mx2 proteinin hücre nükleusuna kanalize olmasını sağlamak amacıyla, PZR'dan yararlanarak, amino-terminal uçlarında Simian Virüs 40 (SV40) T antijeni nüklear lokalizasyon sinyali (NLS) (PKKKRKV) taşıyan Mx2 proteinlerini kodlayacak yeni gen çerçevesi oluşturuldu. Bu şekilde, her amino-terminal ucunda da NLS taşıyan (nMx2) Mx2 gen çerçevesi elde edildi.
PZR ile nMx2 gen çerçevesinin elde edilmesinde 5'-*CCCAAAAAGAAGAGAAAGGTG***ATG**GTTCTTAGCACAGAAGA -3' (NLS-Mx2-for) ve 5'-CGC*GATATC*TTAACCAGGGAATTTGGCTAGC-3' (Mx2-rev) primer çifti kullanıldı.

Primerler PCR öncesi T4-polinükleotid kinaz enzimi ile fosforile edildi (Manyatis). NLS taşıyan Mx2 gen çerçevesinin PZR ile çoğaltılmasında pCHA-Mx2 plazmit vektöründen yararlanıldı. PZR; 25 ng pCHA-Mx2 plazmiti (1 µl), 2.5 µl NLS-Mx2-for (10 µM), 2.5 µl Mx2-rev (10 µM), 5 µl dNTP karışımı (2 mM), 4 µl $MgCl_2$ (25 mM), 5 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 30 µl deiyonize distile su ve 1U Pwo DNA polimeraz enzimi (5U/µl) karıştırılarak hazırlanan reaksiyon ortamında gerçekleştirildi. Reaksiyon koşulları; 98 °C - 2 dk ön denatürasyon; 5 döngü, 97°C-15 s / 55°C-15 s / 68°C-75 s, 25 döngü 97°C-15 s / 60°C-15 s / 68°C-75 s, final olarak 68°C-10 dk. olarak belirlendi. PCR ürünleri 5.15' de belirtildiği şekilde fenol:kloroform:izoamilalkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. NLS taşıyan PCR ürünleri (nMx2) 20 µl TE tamponunda çözündürüldü ve agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bak 5.15). Saflaştırılan ürünler direkt olarak ligasyonda kullanıldı.

5.18. pCHA-nMx2 Vektörünün Oluşturulması

pCHA-nMx2 vektörünün oluşturulmasında, 5.16.1' de verildiği şekilde hazırlanan pCHA vektörü kullanıldı. PZR ile elde edilen nMx2 fragmenti EcoRV ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA ligasyona uğratıldı. Oluşturulan vektörün kontrolünde enzim kesimi ve DNA dizi analizi kademeleri izlendi.

5.19. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri sonucu doğru olduğu saptanan Mx2 plazmit DNA'ları çoğaltıldı ve memeli hücre kültürlerinde kullanılabilecek kalitede saflaştırıldı. Bu amaçla plazmitler kompetent *E. coli* DH5α hücrelerine transforme edildi. Plazmit taşıyan bir bakteri kolonilerinden steril bir kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve 37 °C'da bir gece inkübe edilerek ön kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 150 ml ampisilin içeren taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 37 °C' da 120 dev./dk. çalkalama hızında 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırmasında kullanıldı. Plazmitlerin izolasyonu ve saflaştırmasında Qiagen orta-ölçekte plazmit izolasyon kit'i kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA 500 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA miktarı ve kalitesi, 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçümler alınarak saptandı. Plazmit DNA'nın doğruluğu 5.16.4' de belirtildiği şekilde BglII enzimi ile yeniden kesilerek kontrol edildi ve daha sonraki deneylerinde kullanılmak üzere – 20 °C' da saklandı.

5.20. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Aktarılması (Transfeksiyon)

Plazmit DNA'ların memeli hücrelerine transfeksiyonunda PEI taşıyıcı olarak kullanıldı. Plazmit DNA'lar 10 ng/µl konsantrasyonda serum içermeyen D'MEM [D'MEM (-)] içerisinde sulandırıldı. Aynı şekilde D'MEM (-) içerisinde hazırlanan 20-30 ng/µl konsantrasyonda PEI ile eşit hacimlerde karıştırıldı. Karışım, DNA/PEI kompleklerinin oluşması için 20 dk. bekletildi. Yirmi dört kuyulu plaklarda üretilen hücrelerin transfeksiyonunda her bir kuyu için 0.25-0.35 µg, 6 kuyulu plaklar için ise 1-1.5 µg plazmit DNA kullanıldı. Hazırlanan DNA/PEI kompleksleri, ortalama plak yüzeylerini % 50-60 oranında kaplayacak şekilde üretilen hücre kültürlerine eklendi. Kültürler 45-48 saat süre ile standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler lüsiferaz aktivite testleri, SEAP aktivite testleri, immünfuoresans testleri ya da Western melezleme tekniğinde kullanıldı.

5.21. Mx2 Gen Ekspresyonunun Western Melezleme Yöntemi ile Kontrolü

pCHA plazmit vektörüne klonlanan fare Mx2 geninin anlatım yapıp yapmadığı Western melezleme tekniği ile incelendi. Bu amaçla Mx2 geni taşıyan pCHA-Mx2 plazmiti HEK293 hücrelerine aktarıldı ve bu hücrelerden hazırlanan lizat içerisinde Mx2 proteini saptandı.

5.21.1.HEK293 Hücrelerinin pCHA-Mx2 Plazmiti ile Transfeksiyonu

HEK293T hücreleri ($2,5x10^5$ hücre/kuyu) D'MEM-HG içeren 6 kuyulu plakalara ekildi ve standart kültür koşullarında 24 saat üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler pCHA-Mx2 plazmiti ile transfekte edildi. Transfeksiyonda her bir kuyu için 1 µg pCHA-Mx2 kullanıldı ve yukarıda belirtilen yöntem izlendi. Transfeksiyon sonrası kültürler 48 saat 37 °C' da inkübe edildi. Daha sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler T-FTS ile iki kez yıkandı. Hücreler 200 µl RIFA tamponu içerisinde bir silikon sıyırıcı yardımıyla toplandı. Hücre lizatı 15-20 kez insülin enjektöründen geçirildi ve 15.000 dev/dk hızda 4 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı poliakrilamid jel elektroforezinde kullanıldı.

5.21.2.Poliakrilamid Jellerin Hazırlanması

Protein elektroforezi için 100x100x0.8 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller % 10'luk ayırma ve % 5'lık paketleme jeli olarak iki kısım halinde hazırlandı. Jellerin % 10' luk akrilamid içeren birinci bölümü (ayırma jeli); 2 ml solüsyon A, 1.5 ml solüsyon B, 2.5 ml deiyonize distile su, 60 µl % 10'luk APS ve 30 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı ve jel

kasetlerine döküldü. Jel yüzeyine 300-500 µl deiyonize distile su yayılarak yüzeyin düzgün polimerize olması sağlandı. Daha sonra jeller 20-30 dakika oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki su alınarak ikinci bölüm jel için hazır hale getirildi. % 5' lik akrilamid içeren jellerin ikinci bölümü (paketleme jeli); 1 ml solüsyon A, 1,25 ml solüsyon C, 2,75 ml deiyonize distile su, 60 µl APS ve 30 µl TEMED ile karıştırılarak hazırlandı. Karışım daha önce hazırlanan ayırma jeli üzerine döküldü ve oda sıcaklığında polimerizasyona bırakıldı [89].

5.21.3. Proteinlerin Jelde Yürütülmesi ve Nitrosellüloz Membrana Transfer Edilmesi

Analiz edilecek protein örnekleri 1:3 oranında 4x örnek yükleme tamponu ile karıştırıldı ve 5 dakika kaynar suda tutularak proteinlerin denatüre olması sağlandı. Örnekler, 10-15 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez işlemi, elektroforez tamponu ile dolu tank içerisinde ilk 20 dakika 30 volt, daha sonra 60 volt gerilim altında yaklaşık 3 saatte tamamlandı. Elektroforez sonrası, jel üzerinde ayrılan proteinler nitrosellüloz membranlara transfer edildi. Bunun için transfer kasetleri arasında "sünger-filtre kağıdı-nitrosellüloz membran-jel-filtre kağıdı-sünger" sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve ısınmayı önlemek için buz aküleri ile soğutulan ortamda 45 dk. 45 voltta 90 dk. 90 voltta transfer işlemi gerçekleştirildi.

5.21.4. Mx2 Proteinlerinin Görüntülenmesi

Protein transferi işleminden sonra nitroselüloz membranlar, oluşabilecek non-spesifik bağlanmaların önlenmesi için 4-16 saat bloklama solüsyonunda bekletildi. Daha sonra membranlar, iki saat süre ile bloklama solüsyonu içerisinde 1/1000 oranında sulandırılarak hazırlanan anti-HA primer antikoru etkisinde bırakıldı, sonrasında üç kez 10 dk TBS-T ile yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranlar 20 dakika 1/3000 oranında TBS içerisinde sulandırılarak hazırlanan biyotinlenmiş keçi-anti fare IgG antikorı ile işleme kondu. İşlemin sonrası membranlar üç kez 10 dk TBS-T ile tekrar yıkandı. Yıkama işleminden sonra 10 ml TBS-T içerisinde 1:3500 oranında sulandırılan streptavidinli alkalen fosfataz ile 15 dakika inkübe edildi. Ardından 3 kez minimum 10 dakika TBS-T ile yıkama yapıldı. Yıkama işleminden sonra membran üzerine 10 ml BCIP/NBT alkalin fosfataz substratı (Millipore-NMM1581860) eklendi ve bantlar görünür hale gelene kadar karanlıkta bekletildi. Son aşamada, reaksiyonu durdurmak için membran deiyonize distile su ile yıkandı [96].

5.22. Fare Mx2 Proteininin Hücre İçerisindeki Lokalizasyonunun İmmünfluoresans Yöntemiyle Saptanması

Fare Mx2 proteini ve SV40 NLS sinyali taşıyan nMx2 proteinlerinin hücre içerisinde lokalizasyonları, geçici olarak ilgili plazmitlerle transfekte edilen Swiss3T3 hücrelerinde immünfloresans yöntemi ile saptandı.

5.22.1. Swiss3T3 Hücrelerinin Plazmit DNA ile Transfeksiyonu

Swiss3T3 hücreleri içerisine etil alkol ile steril edilen 9 mm çapında lameller yerleştirilmiş 24-kuyulu plaklara ekildi ($2x10^4$ hücre/kuyu) ve 20-24 saat süre 37 °C' da inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler, her bir kuyu için 300 ng pCHA-Mx2 ya da pCHA-nMx2 plazmit DNA'ları ile transfekte edildi. Transfeksiyonda 5.21' de belirtilen yöntem izlendi. Kültürler transfeksiyondan sonra 45-48 saat süre ile 37 °C'da inkübe edildi. Daha sonra lameller üzerinde tutunmuş halde çoğalan ve plazmit ile transfekte hücreler Mx2 proteinleri için immümfluoresans yöntem ile analiz edildi

5.22.2. Mx2 Proteinlerinin Swiss3T3 Hücrelerinde İmmünfluoresans Yöntemle Görüntülenmesi

Lamel üzerinde üretilen ve Mx2 plazmitleri ile transfekte hücreler T-FTS ile 2 kez 10'ar dakika süre ile yıkandı. Daha sonra hücreler % 3 paraformaldehid çözeltisi içerisinde 10-15 dakika oda sıcaklığında fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler iki kez % 0.1 Tween-20 içeren T-FTS ve bir kez T-FTS içerisinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen bağlanmaları minimum düzeye indirmek için hücreler T-FTS içerisinde hazırlanmış % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi. Daha sonra hücreler 1 saat % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1:250 oranında sulandırılan fare anti-HA monoklonal antikorların etkisinde bırakıldı. Hücreler iki kez 10 dakika T-FTS içerisinde tutularak bağlanmamış antikorlar uzaklaştırıldı ve ikinci kez % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 30 dk bekletildi. Bunu takiben hücreler 60 dakika süreyle % 1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1:250 oranında sulandırılan FITC (Fluorescein Isothiocyanate) bağlı anti-fare IgG antikorları ile işleme kondu. Hücreler tekrar iki kez 10 dakika T-FTS ile yıkandıktan sonra, üzerine 2-3 µl kapatma çözeltisi damlatılan lam üzerine kapatıldı, lamellerin çevresi şeffaf oje ile kapatıldı ve floresan mikroskopta (Olimpus-DP72) incelendi.

5.23. Mx2 proteininin influenza RNA polimeraz enzimine etkilerinin araştırılması

Fare Mx2 proteinlerinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimi aktivitesine etkilerinin incelenmesinde influenza virüsü minireplikon modellerinden yararlanıldı. Bunun için ekspresyon vektörleri olarak *pCAGGS*-PB2, *pCAGGS*-PB1, *pCAGGS*-PA ve *pCAGGS*-NP plazmitleri; belirteç vektör olarak Swiss3T3 hücreleri ile gerçekleştirilen deneylerde pHMP1-vNS-luc; HEK293 hücreleri ile gerçekleştirilen deneylerde ise pHH21-vNS-Luc vektörü kullanıldı. Bu vektörler daha önce farklı çalışmalar için tez danışmanım Doç. Dr. Kadir Turan tarafından oluşturulmuştur [94].

5.23.1. Mx2 proteinlerinin Swiss3T3 Hücrelerinde Viral Polimeraz Enzimine Etkisinin İncelenmesi

Swiss3T3 hücreleri 24 kuyulu plaklara ekildi ($1x10^4$ hücre/kuyu) ve 20-24 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi. Daha sonra hücreler, minireplikonu oluşturan pCAGGS-PB2, pCAGGS-PB1, pCAGGS-PA ve pCAGGS-NP ekspresyon plazmitleri, pHH21-vNS-luc belirteç vektörü, değişen miktarlarda Mx2 proteini kodlayan vektör, alkalen fosfataz kodlayan pSEAP vektörü Tablo 1'de belirtilen miktarlarda karıştırılarak transfekte edildi. Her bir kuyu için kullanılan plazmitlerin toplam miktarı pCHA plazmiti ile 320 nanogram'a tamamlandı. Transfeksiyon işleminde 5.21' de belirtilen yöntem izlendi. Kültürler 48 saat süre ile inkübasyona bırakıldı, sonrasında SEAP ve lüsiferaz aktivitelerinin ölçümünde kullanıldı.

Tablo 5.1. Swiss3T3 hücreleri için 24 kuyulu plaklarda her bir kuyu için kullanılan plazmit miktarları.

	nanogram/kuyu
pHMP1-vNS-luc	30
pSEAP	10
pCAGGS-PB2	20
pCAGGS-PB1	20
pCAGGS-PA	20
pCAGGS-NP	20
Mx2 ya da nMx2 kodlayan plazmitler	10-200
pCHA	10-200
Total Plazmit DNA miktarı	320

5.23.2. Mx2 proteinlerinin HEK293 Hücrelerinde Viral Polimeraz Enzimine Etkisinin İncelenmesi

HEK293 hücrelerinin transfeksiyonunda yukarıda Swiss3T3 hücreleri için verilen yöntem izlendi. Farklı olarak 24 kuyulu plaklarda her bir kuyuya $5x10^4$ hücre ekildi. Belirteç vektör olarak insan orijinli hücreler için oluşturulan pHH21-vNS-Luc belirteç vektörü (ref-Kongre Abstrakt) kullanıldı. HEK293 hücrelerinin plazmit DNA'ları alma kapasitesinin Swiss3T3 hücrelerine göre daha yüksek olması nedeniyle Tablo 2 verildiği gibi plazmit miktarlarında değişiklik yapıldı.

Tablo 5.2. HEK293 hücreleri için 24 kuyulu plaklarda her bir kuyu için kullanılan plazmit miktarları.

	nanogram/kuyu
pHH21-vNS-luc	10
pSEAP	10
pCAGGS-PB2	3
pCAGGS-PB1	3
pCAGGS-PA	3
pCAGGS-NP	10
Mx2 ya da nMx2 kodlayan plazmitler	10-200
pCHA	10-200
Total Plazmit DNA miktarı	**300**

5.23.3. Hücre Lizatlarının Hazırlanması ve Lüsiferaz Aktivitelerinin Ölçülmesi

Yukarıda 5.23.1' de belirtildiği şekilde transfekte edilen hücrelerde lüsiferaz aktiviteleri ticari kit (Roche) kullanılarak ölçüldü. Transfekte kültürler 48 saat standart kültür koşullarda inkübe edildikten sonra, besiyerleri uzaklaştırıldı, hücreler T-FTS ile yıkandı ve 100 µl liziz tamponunda parçalandı. Hazırlanan hücre lizatından 5 µl alınarak 25 µl lusiferaz substratı üzerine eklendi ve bir lüminometre ile 5 saniye süre ile ölçümler alındı. Elde edilen değerler, aynı kültürlerin SEAP aktivite değerleri ile normalize edilerek sonuçlar değerlendirildi.

5.23.4. Kültürlerde SEAP Aktivitesinin Ölçülmesi

Transfeksiyon deneylerinde, hem transfeksiyon etkinliklerinin normalizasyonu hem de, memeli hücrelerinde dışarıdan verilen plazmitler üzerinden sentez edilen proteinlerin hücresel RNA polimeraz II enzimi üzerindeki etkilerini gözlemlemek amacıyla, RNA polimeraz II promotör kontrolünde SEAP (secreated alkalene phosphatse) geni taşıyan pSEAP plazmiti kullanılmıştır. Transfekte kültürlerde besiyerine salgılanan SEAP enzimi aktivitesi ticari kit (Roche) kullanılarak ölçüldü. Transfeksiyondan 48 saat sonra, kültürlerden 100 µl besiyeri alındı ve 14.000 dev /dk hızda 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvıdan alınan 10 µl örnek 30 µl sulandırım çözeltisi ile karıştırıldı ve 65 °C' da 30 dakika bekletildi. Bu örneklerden 10 µl alındı ve eşit hacimde inaktivasyon çözeltisi ile karıştırıldı ve 5 dakika bekletilerek endojen alkalen fosfatazlar inaktive edildi. Son aşamada 10 µl substrat eklendi ve 10 dakika oda sıcaklığında beklendikten sonra lüminometre ile enzim aktiviteleri ölçüldü.

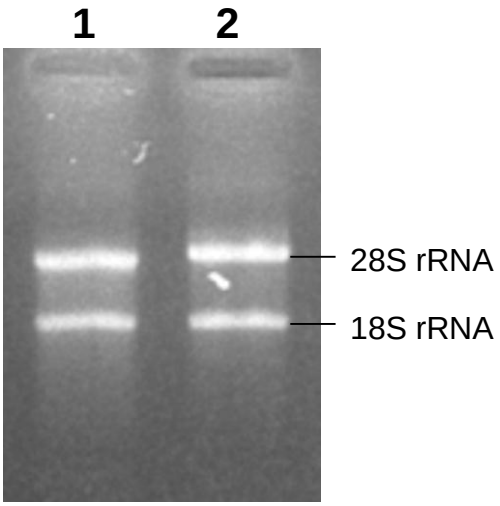
6. BULGULAR

6.1. Fare Mx2 Geni Taşıyan Memeli Ekspresyon Vektörlerinin Oluşturulması

Bu çalışmada memeli hücrelerinde interferonların uyarısı sonucu sentez edilen, influenza virüslerini de kapsayan birçok virüs replikasyonunu inhibe eden Mx proteinlerinden fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine olası etkileri araştırılmıştır. Bu bağlamda, öncelikle fare Mx2 geni, memeli hücrelerinde yaygın olarak kullanılan pCAGGS plazmit vektöründen türetilen, pCHA vektörüne klonlanmış ve pCHA-Mx2 olarak adlandırılan vektör elde edilmiştir. Bu vektörün elde edilmesinde ve memeli hücrelerinde ekspresyon yayıp yapmadığı aşağıda sıralanan işlemler sonucu ortaya konmuştur.

6.1.1. Fare Mx2 Geni cDNA'sının Elde Edilmesi

Fare Mx2 geni cDNA' sı fare orijinle Swiss3T3 hücrelerinden elde edilmiştir. Gereç ve Yöntem kısmında (5.14.1) ayrıntılı olarak verildiği şekilde Swis3T3 hücrelerinden total RNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen total RNA'nın kalitesi formaldehit agaroz jel elektroforeziyle gösterildi (**Şekil 6.1**). Formaldehit agaroz jel elektroforez sonuçları, hazırlanan total RNA'nın, çalışmanın bir sonraki kademesi olan reverz transkripyon için kullanılabilecek kalitede olduğunu göstermiştir. Elektroforez sonrası, total RNA'da baskın olarak bulunan 18S ve 28S ribozomal RNA'lar herhangi bir yıkıma uğramaksızın tek bant halinde ayrıldıkları gözlenmiştir. Hazırlanan total RNA'nın miktarı spektrofotometrik olarak belirlenmiş ve cDNA hazırlamak için kalıp olarak kullanılmıştır.



Şekil 6.1. Swiss3T3 hücrelerinden elde edilen total RNA'nın formaldehit jel elektroforezi ile analizi. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilim altında 30 dakikada tamamlandı. Elektroforez işleminin ardından jel, 200 µg/ml konsantrasyon etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 15-20 dakika bekletildi ve UV transillüminatör ile görünür hale getirilerek fotoğrafı çekildi. 1. ve 2. aynı koşullarda hazırlanan iki kültürden hazırlanan RNA örneklerini göstermektedir.

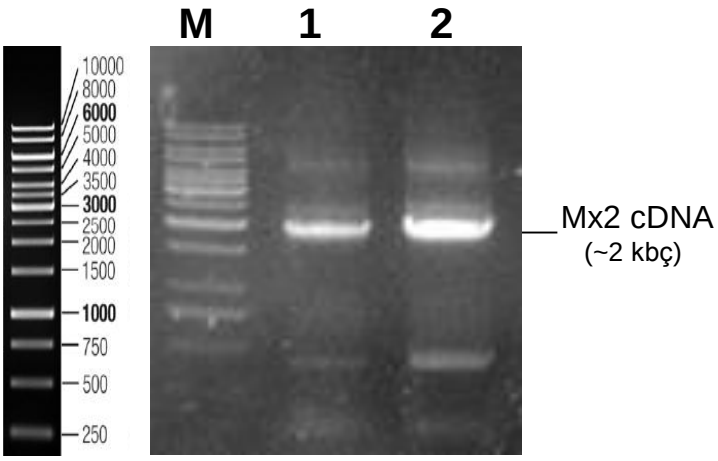
Swiss3T3 hücrelerinden elde edilen RNA üzerinden reverz transkripsiyon reaksiyonu ile cDNA' ların hazırlanmasında oligo dT primerler kullanılmıştır. Elde edilen cDNA üzerinden fare Mx2 genine özgü primerler kullanılarak PZR ile Mx2 geni okuma çerçevesi çoğaltılmıştır. PZR'unda kullanılan *Mx2-For* ve *Mx2 Rev* primerlerinin oluşturulmasında aşağıda dizisi verilen referans Mx2 cDNA dizisinden (NM_013606.1) yararlanılmıştır.

Fare Mx2 cDNA'sı (NCBI-NM_013606.1):

ACACTCCGTCTCCAAGCCGGGAGGGGTGAGTATTGCACAGGATTCTGTGGAAGGATAGAGGA
TACCTTCTAAGGCTTCTTTGTAGACACTGAGTACCCAACTGAGAGAAGAAATAAAAGATGGT
TCTTAGCACAGAAGAAAACACAGGCGTTGATTCAGTCAACTTACCCAGTGGAGAGACGGGCC
TAGGAGAGAAAGACCAGGAGTCTGTGAACAATCTCTGCAGTCAGTATGAGGAGAAGGTGCGG
CCCTGCATTGACCTCATCGACTCCCTGCGGGCTCTGGGTGTGGAGCAGGACCTGGCCCTGCC
TGCCATCGCTGTCATTGGGGACCAGAGTTCAGGGAAGAGCTCTGTGCTGGAAGCACTGTCTG
GAGTGGCCCTCCCCAGAGGCAGTGGTATTGTCACCAGATGCCCTCTGGTGCTGAAATTGAGG
AAGCTGAATGAGGGAGAGGAGTGGAGAGGCAAAGTCTCCTATGATGACATCGAAGTGGAGCT
CTCTGATCCTTCAGAGGTGGAAGAGGCCATCAACAAGGGTCAGAACTTCATTGCTGGGGTAG
GTCTGGGGATCAGTGATAAGCTCATTAGCCTGGATGTCAGCTCCCCAAATGTCCCAGACCTG

ACTCTCATTGACCTGCCTGGAATTACCAGGGTGGCTGTAGGCAACCAGCCTGCAGACATAGG
ACGCCAGATCAAGAGACTCATCAAGACATACATCCAAAAACAGGAGACCATCAACCTGGTGG
TGGTCCCCAGCAATGTGGACATTGCCACCACAGAGGCTCTGAGCATGGCTCAGGAGGTGGAC
CCTGAAGGGGATAGGACCATAGGGATCTTGACCAAGCCCGATCTGGTGGACAGAGGTACTGA
AGACAAGGTCGTGGATGTGGTGCGGAACCTGGTGTACCATCTGAAGAAGGGCTACATGATAG
TCAAGTGCAGAGGCCAGCAGGACATCCAAGAGCAGCTGAGCCTGACTGAGGCTCTTCAGAAT
GAGCAAATCTTCTTCAAGGAACACCCTCATTTCAGAGTTCTTCTGGAGGATGGGAAGGCCAC
AGTGCCCTGCCTGGCAGAGAGACTGACCGCAGAGCTCATCTTACACATCTGTAAATCTCTTC
CTCTGCTAGAAAATCAAATAAAGGAAAGTCACCAGAGTGCAAGTGAGGAGCTGCAGAAGTAC
GGTATGGACATACCAGAAGATGACAGTGAAAAAACGTTCTTCCTGATTGAAAAAATCAATGC
TTTTAACCAGGACATCACTGCCCTAGTACAAGGGGAAGAGAATGTGGCAGAGGGAGAATGTC
GCCTATTCACCAGGCTCCGAAAAGAGTTCTTGTCCTGGAGTAAGGAGATCGAAAAGAATTTC
GCAAAAGGTTATGCTGTTTTATATAATGAAGTCTGGGCATTTGAAAAGCAGTACCGTGGACG
AGAATTGCCAGGGTTTGTGAATTACAAAACATTTGAGAACATTATAAGAAGACAAATCAAAA
CCCTGGAAGAACCAGCTATAGAAATGCTGCACACGGTCACTGAAATTGTACGAGCTGCCTTT
ACAAGTGTTTCTGAGAAAAATTTTTCTGAGTTTTATAACCTCCACAGAACTACCAAGTCCAA
ACTTGAAGACATCAGATTAGAACAAGAAAAGGAAGCAGAGATGTCAATCCGACTCCACTTCA
AGATGGAACAAATTATCTACTGCCAGGACCAGATTTACAGAGGAGCCTTGCAGAAGGTCAGA
GAGGAGGAAGCTGAGGAGGAGAAGAAGACAAAGCATGGCACTTCCAGTTCCTCTCAGTCCCA
AGATTTACAGACCTCATCCATGGCTGAGATCTTCCAGCATCTGAATGCCTACCGCCAAGAGG
CTCACAACCGCATCTCCAGCCACGTTCCCTTGATCATCCAGTATTTCATCCTGAAAATGTTT
GCTGAGCGGCTGCAGAAGGGCATGCTCCAGCTCCTGCAGGACAAGGATTCCTGCAGCTGGCT
CCTGAAGGAGCAGAGTGACACAAGCGAGAAGAGGAAGTTCCTGAAGGAGAGGCTGGCAAGGC
TGGCCCAGGCTCGGCGCCGGCTAGCCAAATTCCCTGGTTAAGCTGGCTCTGTCCTTCCCTGT
GTTTCCTGGATTGTGATTCAGGGACAGAAGGGCTCCTGCCTTTCCTGGTAGCTATACCACCA
GCCTTTATGCTCTGATAAGTGCTAGCACTCAGATTTGAAGGAGCTTTCTGCTCACTCTGAGA
TAGGAAGAGAAAGAGGCTCTCAAAGCTCAGCAAGTAGATGGGTAGAGGAAGCCACTTTGCTA
ATAAGACAACGGCTTCACCTGAGTACTCTTCTTGCCCACCATTTAGCACACTGCCAGAAATA
AATATTTGATGTACAAATGGGAGCTGCCTGTTACATTCCTTAATAAACCACTTTTCTTTAAA
AAAAAA

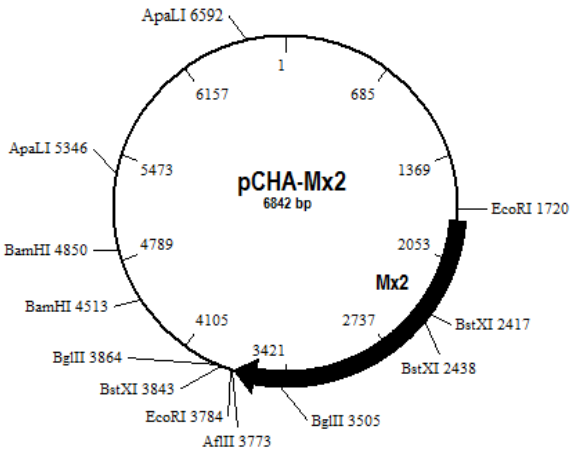
PCR ürünleri standart agaroz jel elektroforezi ile incelenmiştir. Şekil 6.2'de görüldüğü gibi Mx2 geni için beklenen yaklaşık 2 kbç'lik DNA fragmentleri elde edilmiştir.



Şekil 6.2. Fare Swiss3T3 hücrelerinden hazırlanan cDNA'lar üzerinden PZR ile çoğaltılan Mx2 geni DNA'ları. PZR'unda 1.5 mM (1) ve 2 mM (2) konsantrasyonlarda $MgCl_2$ denendi. DNA örneklerinin incelenmesinde %1' lik agaroz jeller kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilim altında 25 dakikada gerçekleştirildi.

6.1.2. pCHA-Mx2 Vektörünün Oluşturulması

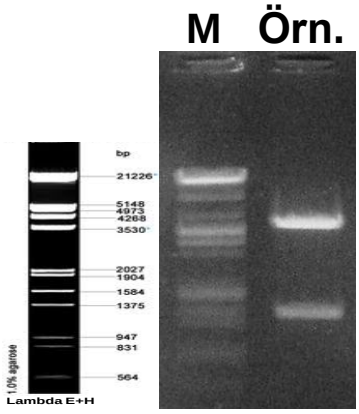
Reverz transkripsiyon polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZT) ile elde edilen fare Mx2 cDNA' ları agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra fenol:kloroform:izoamilalkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çökeltildi. Mx2 cDNA'sı EcoRV restriksiyon endonükleazi ile kesildi ve Gereç ve Yöntemlerde verildiği şekilde agaroz jel ile saflaştırıldı. Aynı şekilde EcoRV enzimi ile doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sı ile Mx2 DNA fragmentleri ligasyona uğratılarak pCHA-Mx2 vektörü elde edildi (**Şekil 6.3**).



Şekil 6.3. Fare Mx2 geni taşıyan pCHA-Mx2 plazmit vektörü.

6.1.3. pCHA-Mx2 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi

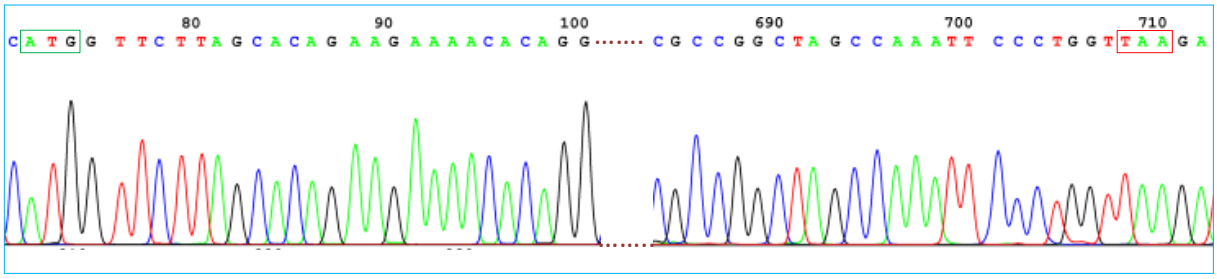
Küçük ölçekte hazırlanan pCHA-Mx2 plazmit DNA'ları, vektörün haritası göz önüne alınarak BstXI restriksiyon enzimi ile kontrol edildi. Bu şekilde plazmit vektörün Mx2 cDNA'sını doğru pozisyonda ve doğru yönde taşıdığı gösterildi. Şekil 6.3' de verilen haritaya uygun olarak, BstXI enzimi ile kesim sonucunda agaroz jel üzerinde 5416 ve 1405 bç' lik DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 6.4**). pCHA-Mx2 plazmit DNA'sı, ticari kit kullanılarak orta ölçekte çoğaltıldıktan sonra da aynı enzim ile kesilerek doğruluğu kontrol edildi.



Şekil 6.4. pCHA-Mx2 plazmit vektörünün BstXI restriksiyon enzimi ile kesilerek kontrol edilmesi

6.1.4. pCHA-Mx2 Vektöründe Mx2 Geninin DNA Dizi Analizi ile Kontrol Edilmesi.

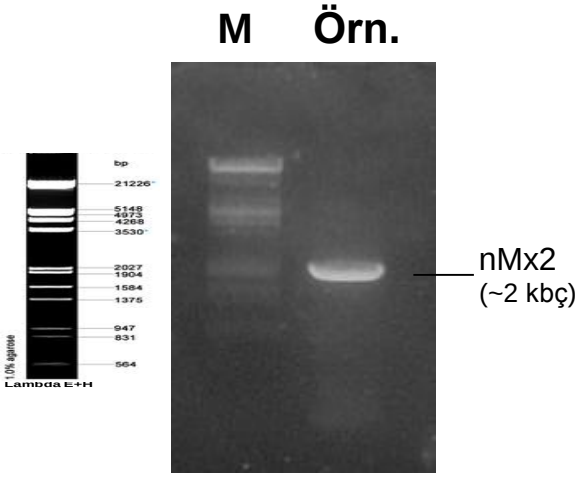
Restriksiyon endonükleazları ile gerekli ön kontrolleri yapılan pCHA-Mx2 vektöründe, Mx2 geninin kesin nükleotid dizisi, Sanger Yöntemi ile dizilenerek belirlendi. Sonuçlar, teorik olarak tasarlanan vektör yapısı ile birebir aynı olduğu gözlendi (**Şekil 6.5**).



Şekil 6.5. pCHA plazmit vektörüne klonlanan fare Mx2 geninin nükleotid dizi kromatogramı. Mx2 geni dizi analiz sonuçları, genin 5' ve 3' bölgelesini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir.

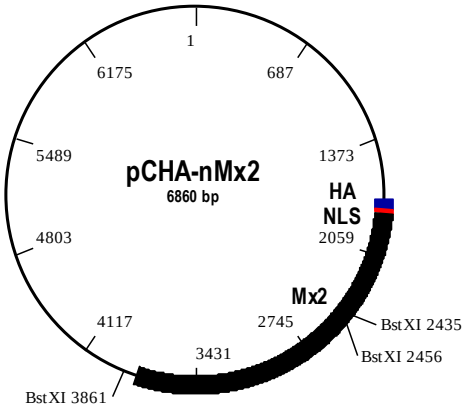
6.1.5. pCHA-nMx2 Vektörünün Oluşturulması

Fare Mx2 proteinleri, daha önce yapılan çalışmalarda ağırlıklı olarak hücre sitoplazmasında lokalize olduğu gösterilmiştir. Oysa, bu çalışmada Mx2 proteinlerinin etkisini araştırmak amacıyla kullanılan influenza virüs minireplikon modeli hücre nükleusunda iş görmektedir. Dolayısıyla Mx2 proteinlerini hücre nükleusunda lokalize olması önem taşımaktadır. Fare Mx2 proteinini nükleusa yönlendirmek amacıyla, Simian Virüs 40 (SV40) T antijeni nüklear lokalizasyon sinyali (NLS) (PKKKRKV) taşıyan Mx2 proteini kodlayacak pCHA-nMx2 vektörü oluşturuldu. PZR ile NLS kodlayacak diziler taşıyan, Mx2 genine özgü primerler kullanılarak pCHA-Mx2 plazmit vektörü üzerinden NLS-Mx2 (nMx2) DNA fragmentleri çoğaltılmıştır (**Şekil 6.6**).



Şekil 6.6. PZR ile pCHA-Mx2 plazmit vektörü üzerinden çoğaltılan nMx2 DNA fragmenti jel görüntüsü. DNA örneği %1'lik agaroz jel'e uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilimde 25 dakikada tamamlandı.

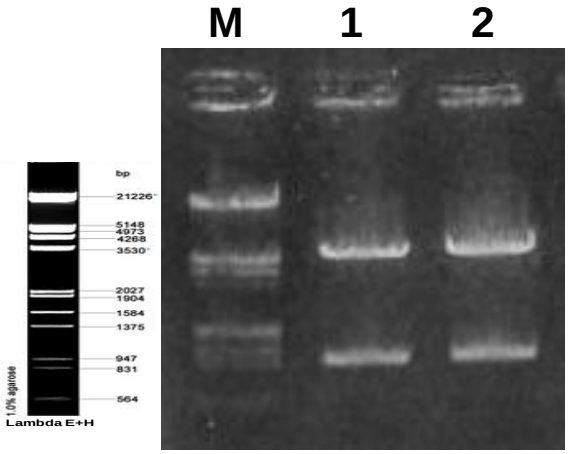
PZR ile çoğaltılan nMx2 DNA fragmentleri, EcoRV restriksiyon endonükleazı ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA vektörü ile ligasyona uğratıldı ve Şekil 6.7' de haritası verilen pCHA-nMx2 plazmit vektörü elde edildi.



Şekil 6.7. SV40 NLS taşıyan Mx2 kodlayan pCHA-nMx2 plazmit vektörü.

6.1.6. pCHA-nMx2 Vektörünün Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri ile Kesilerek Kontrol Edilmesi

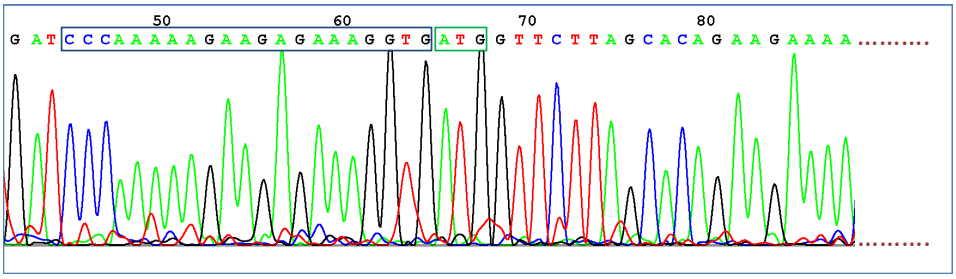
Küçük ölçekte hazırlanan pCHA-nMx2 plazmit DNA'ları, vektörün haritası göz önüne alınarak BglII restriksiyon enzimi ile kontrol edildi. Kontrol aynı enzimle kesilen pCHA-Mx2 plazmiti ile karşılaştırılarak, pCHA-nMx2 vektörün nMx2 cDNA' sını doğru pozisyonda ve doğru yönde taşıdığı gösterildi. Şekil 6.8'de verilen pCHA-nMx2 plazmit vektörünün haritasına uygun olarak, BstXI enzimi ile kesim sonucunda agaroz jel üzerinde 1405 bç. ve 5434bç' lik DNA fragmentleri elde edildi. Kontrol olarak kullanılan pCHA-Mx2 plazmiti de pCHAnMx2 ile benzer elektroforez profili verdi **(Şekil 6.8)**.



Şekil 6.8. BstXI Restriksiyon enzimi ile kesilmiş plazmitlerin elektroforez profilleri (**1.**pCHAnMx2 : **2.**pCHAMx2). DNA örnekleri %1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilimde 25 dakikada tamamlandı.

6.1.7. pCHA-nMx2 Vektöründe Mx2 Geninin DNA Dizi Analizi ile Kontrol Edilmesi.

SV40-T antijeni NLS'ini kodlayacak dizi sadece 21 nükleotidden oluştuğu için bu dizinin restriksyon enzinleri ile kesilerek kontrol edilmesi çok zordur. Bu bakımdan bu tip dizilerin mutlaka DNA dizi analizi ile doğtulanması gerkekir. Oluşturulan pCHA-nMx2 vekttöründe *MX2* geninin 5'-ucunda NLS kodlayıcı diziyi doğru çerçeve içerisinde taşıdığı gösterildi (Şekil 6.9)

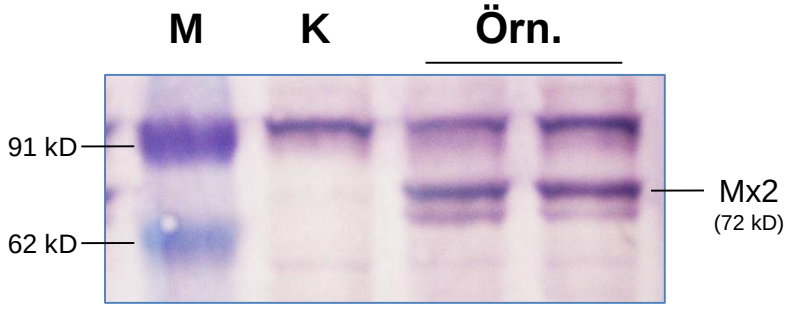


Şekil 6.9. pCHA plazmit vektörüne klonlanan fare nMx2 geninin nükleotid dizi kromatogramı. Kromatogram, nMx2 geninin sadece 5′- bölgelesini kapsayacak şekilde kısmen verilmiştir. SV40-T antijeni NLS peptidini kodlayan bölge çerçeve içerisinde gösterilmiştir.

6.2. pCHA-Mx2 Vektörünün Mx2 Proteini Kodladığının Western Melezleme ile Kontrol Edilmesi.

pCHA-Mx2 plazmiti ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde fare Mx2 proteinin sentezi Gereç ve Yöntemler kısmında (5.22) ayrıntılı olarak verildiği gibi Western melezleme tekniği ile analiz edildi. pCHA-Mx2 plazmiti üzerinden kodlanan Mx2 proteinlerini amino-terminalinde 9 amino asitten oluşan hemaglütinin (HA) epitopu (YPYDVPDYA) taşımaktadır. pCHA plazmiti, influenza HA epitopu için kodlayıcı nükleotid dizi içermektedir [97]. HA epitopunu kodlayan dizi, klonlanacak gen ile uygun bir okuma çerçevesi içerisinde olması halinde, bu gen tarafından kodlanan proteinlerin, WB ya da IF yöntemlerle anti-HA IgG antikorları kullanılarak analizinde büyük kolaylık sağlamaktadır. Bu nedenle pCHA-Mx2 plazmit vektörü tarafından kodlanan ve HA epitopu taşıyan fare Mx2 proteini anti-HA IgG

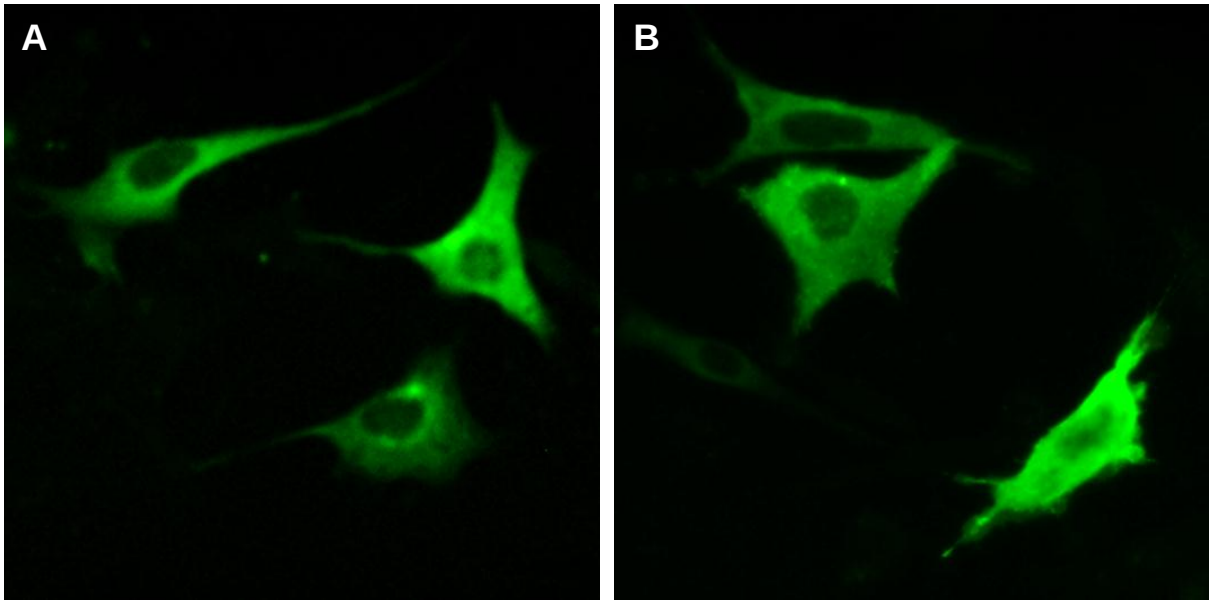
antikorları ile işaretlenmiştir. Şekil 6.10'da görüldüğü gibi pCHA-Mx2 plazmit vektörü ile transfekte edilen hücrelerde Mx2 proteinlerinin sentez edildiği saptanmıştır.



Şekil 6.10. pCHA-Mx2 plazmit vektörü ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentezlenen fare Mx2 proteinlerinin Western melezleme yöntemi ile görüntülenmesi. Elektroforez işlemi ilk 20 dakika 20 volt, 90 dakika 60 volt altında yaklaşık 3 saat içerisinde gerçekleştirildi.

6.3. Mx2 ve nMx2 Proteininin Swiss3T3 Hücrelerinde Lokalizasyonlarının İmmünflüoresan Yöntem ile Saptanması

Yukarıda da belirtildiği gibi, influenza virüsü minireplikon sistemi hücre nükleusu içerisinde işleyen bir sistemdir. Bu sistem üzerinde test edilecek proteinlerin lokalizasyonu önem taşımaktadır. Bu amaçla fare orijinli Swiss3T3 hücreleri pCHAMx2 veya pCHAnMx2 plazmitleri ile transfekte edildi ve plazmitler üzerinde kodlanan Mx2 proteinlerinin hücre içerisinde lokalizasyonları immünflüoresan yöntemle saptandı. pCHA-Mx2 vektörü üzerinden kodlanan Mx2 proteinin, beklendiği gibi ağırlıklı olarak hücrelerde sitoplazma içerisinde lokalize olduğu saptandı (**Şekil 6.11A**). Bununla birlikte SV40 NLS dizileri taşıyan Mx2 proteinlerinin de sitoplazmada yer aldığı, NLS sinyallerinin Mx2 proteinlerini hücre nükleusuna yönlendirmede yeterli olmadığı saptandı (**Şekil 6.11B**).

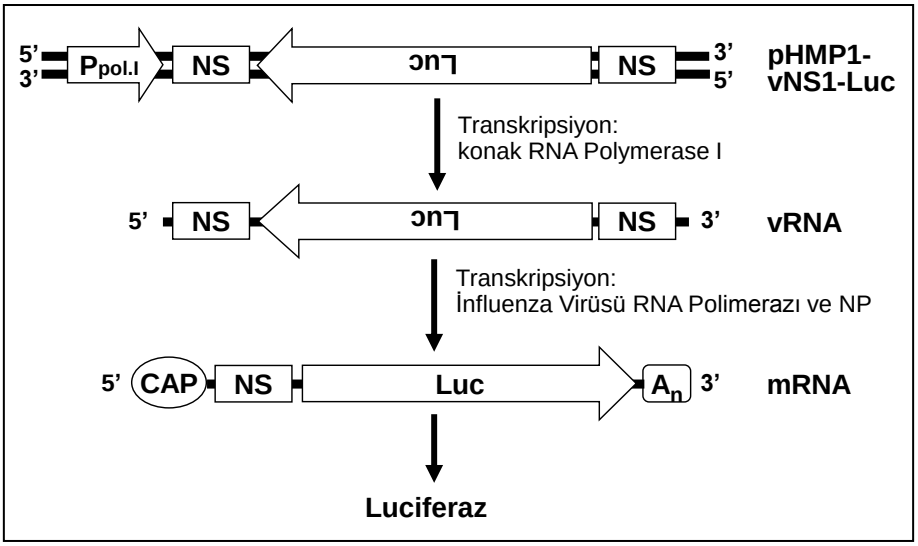


Şekil 6.11. pCHA-Mx2 (A) ve pCHA-nMx2 (B) plazmit vektörleri ile transfekte hücrelerde Mx2 proteinlerinin lokalizasyonu. Mx2 proteinlerinin işaretlenmesinde primer antikor olarak fare anti-HA IgG monoklonal antikorları ve sekonder antikor olarak ise FITC-bağlı anti-fare IgG antikorları kullanıldı.

6.4. Mx2 Proteinlerinin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkisinin İncelenmesi

Fare Mx2 proteinin Swiss3T3 ve HEK293 hücrelerinde influenza virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılmasında yapay influenza virüs genomu minireplikon modeli kullanıldı. İnfluenza virüsü minireplikon sistemi, daha önce plazmit temelli rekombinant influenza virüsü elde etmek için uygulanan reverz genetik teknikler göz önünde bulundurularak Turan ve arkadaşları tarafından geliştirilmiştir. İnfluenza virüsü minireplikon sistemi, influenza virüsü RNA polimeraz alt birimlerini (PB2, PB2 ve PA) ve nukleoproteini (NP) kodlayan plazmit vektörleri ve bir belirteç vektörden oluşmaktadır. Belirteç vektör, influenza virüs RNA'sının korunmuş dizileri arasında ters oryantasyonda klonlanmış lusiferaz geni taşır. Bu gen RNA polimeraz I enzimi kontrolündedir. Bu plazmitlerin konak olarak kullanılacak hücrelere birlikte transfekte edilmesi şekil 6.12' de görüldüğü gibi lüsiferaz enziminin sentez edilmesi ile sonuçlanır. Burada viral proteinlerin sentezi, konak RNA polimeraz II enzimine bağlı olarak gerçekleşir. Yapay vRNA sentezi konak RNA polimeraz I tarafından kontrol edilir. Yapay viral RNA üzerinde ters oryantasyonda yer alan lusiferaz geninin mRNA kopyasının sentezi, viral RNA polimeraz enzimine bağlıdır. Dolayısıyla, hücre içerisinde

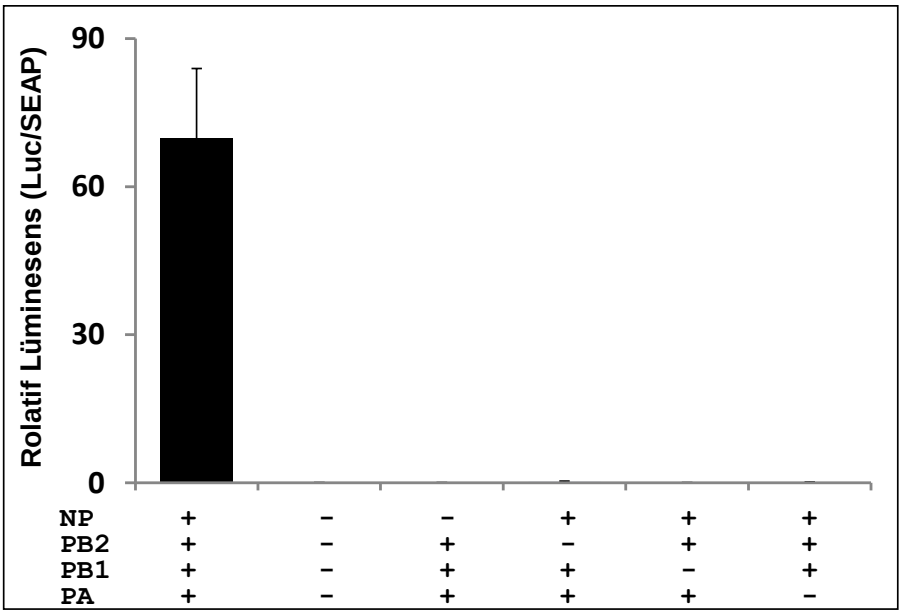
yapay olarak sentezi arttırılacak ya da azaltılacak proteinlerin etkileri lüsiferaz aktivitesi ölçülerek izlenebilmektedir.



Şekil 6.12. İnfluenza virüsü minireplikon sisteminin işleyişi Turan ve ark 'den [87] alınmıştır.

6.4.1. İnfluenza Virüsü Minireplikonu İşleyişinin HEK293 Hücrelerinde Test Edilmesi

İnfluenza virüsü minireplikon modeli dört ekspresyon vektörü ve bir belirteç vektöründen oluşmaktadır. Minireplikon modelinin çalışabilmesi için tüm bileşenlerin bulunması ve işlevsel olası gerekmektedir. Mx2 proteinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri minireplikon üzerinden araştırmadan önce, sistemin işleyişi HEK293 hücrelerinde test edildi. HEK293T hücreleri ekspresyon vektörlerinden birini içermeyecek şekilde minireplikonu oluşturan diğer vektörler ile karışım halinde transfekte edildi ve 48 saatlik inkübasyondan sonra hücrelerde lüsiferaz aktiviteleri ölçüldü. Şekil 6.13'de görüldüğü gibi minireplikon sisteminin, sadece replikonu oluşturan beş bileşenin bir arada bulunduğu kombinasyonda çalıştığı, buna karşın PB2, PB1, PA ya da NP proteinlerinden birinin eksik olması halinde lüsiferez aktivitesinin yok denecek kadar düşük olduğu gözlendi.

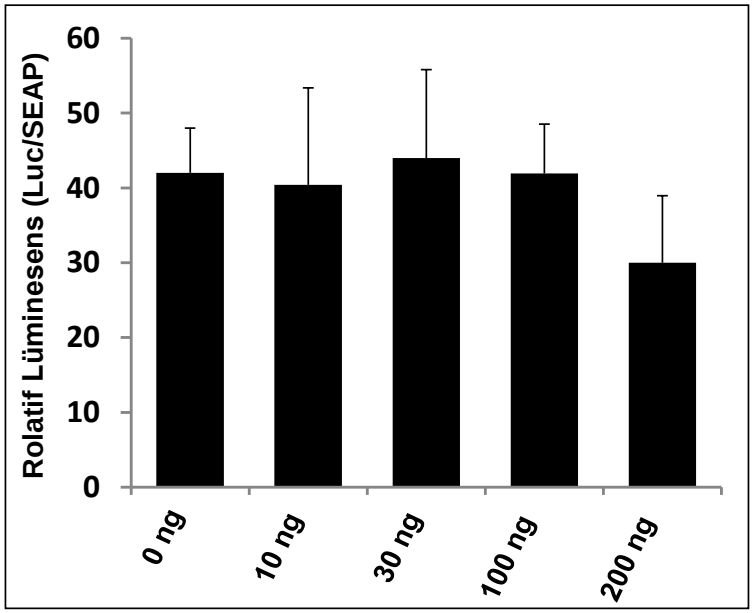


Şekil 6.13. HEK293 hücrelerinde influenza virüsü minireplikonun işleyişinin kontrolü. HEK293 hücreleri 24-kuyulu plaklarda üretildi. Her bir plak için 10 ng pHH21-vNS-luc ve pCAGGS-NP, 20 ng pSEAP, 3 ng miktarında pCAGGS-PB2, PB1, PA plazmit vektörleri kullanıldı.

6.4.2. Swiss3T3 Hücrelerinde Fare Mx2 Proteinin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkileri

Fare Mx2 proteinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri öncelikle fare orijinli Swiss3T3 hücrelerinde denendi. Bu deneylerde, belirteç vektörü olarak fare hücrelerine özgü RNA polimeraz I promotör bölgesi taşıyan pHMP1-vNS-luc plazmit vektörü kullanıldı. Transfeksiyon işleminde Gereç ve Yöntem kısmında belirtilen yol izlendi. Swiss 3T3 hücreleri artan miktarlar halinde pCHA-Mx2 vektörü, Gereç ve Yöntem kısmında (5.24.1) belirtilen miktarlarda ekspresyon ve belirteç vektörleri ile transfekte edildi. Deneysel hatalardan kaynaklanabilecek hataları normalize etmek amacıyla minireplikon vektörleri ile birlikte, influenza virüs RNA polimeraz enziminden bağımsız olarak hücresel RNA polimeraz II enzimine bağlı olarak ekspresyon yapan pSEAP plazmit vektörü de transfeksiyon deneylerinde kullanıldı. 48 saatlik inkübasyondan sonra, kültürlerde besiyerlerine salgılanan alkalen fosfataz (SEAP) aktivitesi ve liziz tamponu içerisinde parçalanan hücrelerde lüsiferaz aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen lüsiferaz aktiviteleri SEAP aktivitelerine oranlandı ve

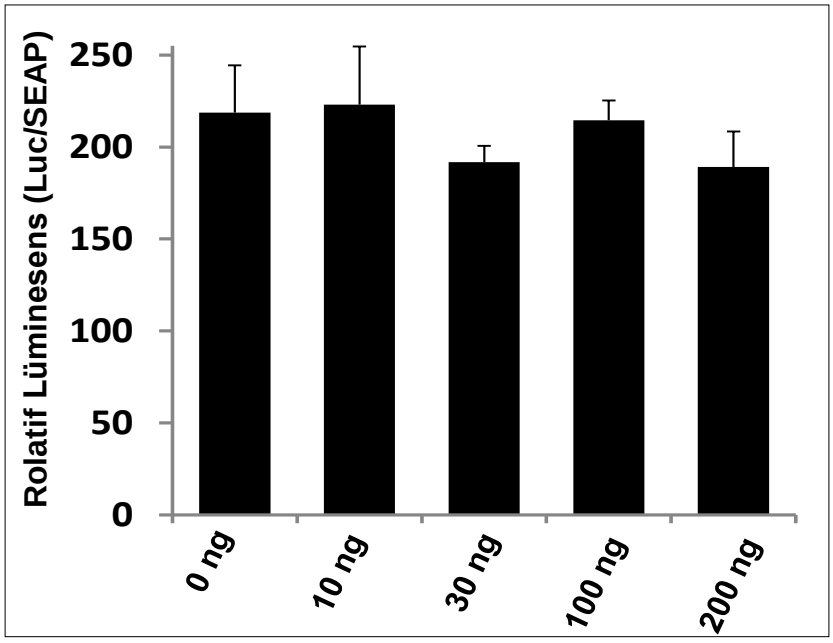
sonuçlar Şekil 6.14'de verildi. Beklenenin aksine, artan miktarlarda ki Mx2 proteininin lüsiferaz ekspresyonunda belirgin bir değişikliğe neden olmadığı, dolayısıyla influenza virüsü RNA polimeraz enzimi üzerine etkisinin çok sınırlı olduğu saptandı.



Şekil 6.14. Swiss 3T3 hücrelerinde fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkisi. Swiss3T3 hücreleri 24-kuyulu plaklarda üretildi. Her bir plak için, şekil üzerinde gösterilen miktarlarda pCHA-Mx2, 30 ng pHMP1-vNS-luc, 10 ng pSEAP ve 20 ng miktarında pCAGGS-PB2, PB1,PA ve NP plazmit vektörleri kullanıldı.

6.4.3. HEK293 Hücrelerinde Fare Mx2 Proteinin İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkileri

Olası hücresel faktörlerin etkilerini saptamak amacıyla Swis3T3 hücrelerinde gerçekleştirilen deneyler HEK293 hücrelerinde tekrarlandı. Belirteç vektör olarak, insan hücrelerine özgü RNA polimeraz I promotör bölgesi taşıyan pHH21-vNS-luc vektör kullanıldı. HEK293 hücreleri artan miktarlarda pCHA-Mx2 vektörü, Gereç ve Yöntem kısmında (5.24.2) belirtilen miktarlarda ekspresyon ve belirteç vektörleri ve pSEAP ile transfekte edildi. 48 saatlik inkübasyondan sonra kültürlerde SEAP ve lüsiferaz aktiviteleri ölçüldü ve sonuçlar şekil 6.15' de verildi. Elde edilen veriler, insan orijinli HEK293 hücrelerinde de Mx2 proteininin influenza RNA polimeraz enzimi üzerine etkisinin sınırlı olduğunu gösterdi.

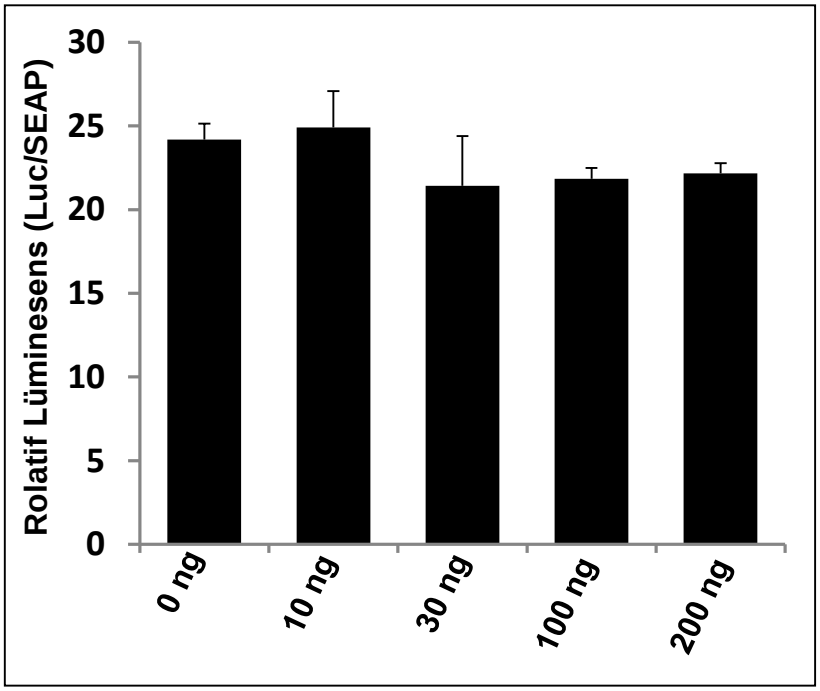


Şekil 6.15. HEK 293 hücrelerinde fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkisi. HEK293 hücreleri 24-kuyulu plaklarda üretildi. Her bir plak için, şekil üzerinde gösterilen miktarlarda pCHA-Mx2, 10 ng pHH21-vNS-luc, pCAGGS-NP ve pSEAP, 3 ng miktarında pCAGGS-PB2, PB1,PA plazmit vektörleri kullanıldı.

6.4.4. Swiss3T3 Hücrelerinde NLS Taşıyan Mx2 Proteinin İnfluenza Virüsü RNA Enzimine Etkileri

İnfluenza virüsleri, diğer birçok RNA virüsünün aksine, hücre nükleusunda replikasyon geçirirler. Dolayısıyla, virüs replikasyonu ve transkrpsiyonu üzerine etkili olacak hücresel faktörlerin nükleusta lokalize olması beklenir. Yaptığımız immünfluoresans testler pCHA-Mx2 üzerinde sentez edilen Mx2 proteinlerinin hücre sitoplazmasında lokalize olduğunu göstermiştir (**Şekil 6.11A,6.11B**). Mx2 proteinini hücre nükleusuna kanalize etmek amacıyla, SV40 T antijenin NLS dizisini taşıyan Mx2 ekspresse eden vektör oluşturulmuştur, fakat IP testler istenilen sonucu vermemiştir (**Şekil 6.11B**). Bununla birlikte NLS'i taşıyan Mx2 proteinin influenza virüs RNA polimeraz enzimine etkileri incelendi. Bu amaçla NLS'i taşıyan Mx2 proteinini ekspresse eden pCHAnMx2 plazmitleri, Gereç ve Yöntem kısmında (5.24.1) belirtilen miktarlarda ekspresyon ve belirteç vektörleri ile Swiss3T3 hücrelerine

transfekte edildi. 48 saatlik inkübasyondan sonra kültürlerde SEAP ve lüsiferaz aktiviteleri ölçüldü. Şekil 6.16' da görüldüğü gibi SV40 NLS dizileri taşıyan Mx2 proteinlerinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimi üzerine etkisi bakımında NLS dizileri taşımayan Mx2 proteini ile benzerlik gösterdiği saptandı.



Şekil 6.16. Swiss 3T3 hücrelerinde NLS taşıyan fare Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkisi. Swiss3T3 hücreleri 24-kuyulu plaklarda üretildi. Her bir plak için, şekil üzerinde gösterilen miktarlarda pCHA-nMx2, 30 ng pHMP1-vNS-luc, 10 ng pSEAP ve 20 ng miktarında pCAGGS-PB2, PB1, PA, NP plazmit vektörleri kullanıldı.

7. TARTIŞMA VE SONUÇ

İnterferonlar omurgalı organizmalarda, özellikle viral patojenlere karşı hücre içi savunma sisteminin ana aktörlerinden biridir. Protein yapıda sitokinler içersinde değerlendirilen interferonlar influenza virüsleri ile birlikte birçok RNA genomu taşıyan virüslerin, hücre içerisinde replikasyonunu engelleyici etki gösterirler. Bununla birlikte interferonlar viral replikasyon üzerinde direkt etki eden moleküller değildirler. Organizmanın bir virüs saldırına maruz kalması bir kısım hücrelerin interferon sentez etmesi ve salgılamasına neden olur. Salgılanan interferon hem otokrin hem de parakrin yolla hücrelere sinyal iletisi taşır. Uyarılan hücrelerde, viral replikasyonu engelleyici etkiye sahip bir dizi protein sentez edilir. Bu proteinler arasında, ilk kez inbred A2G fare ırkında saptanan ve myxovirus'lara karşı farelerde koruyucu etki göstermesi nedeniyle (myxovirus-resistance) Mx olarak adlandırılan proteinler [77] önemli bir yer tutmaktadır. Inbred AG2 fare ırkı letal dozlarda farklı influenza A virüsü ırkları ve Sendai parainfluenza 1 virüslerine karşı diğer fare ırklarına göre çok daha dirençli olduğu görülmüştür [77]. Daha sonra bu özelliğin A2G farelerin taşıdığı dominant bir gene bağlı olduğu ortaya konmuş ve ilgili gen klonlanarak karakterize edilmiştir [98]. *MX1* olarak adlandırılan bu gen Mx proteinlerinden Mx1 proteinini kodlamaktadır. Staeheli ve Sutcliffe [99] *MX1*geni ile homoloji gösteren ve hücrelerde interferon sinyali ile uyarılan ikinci bir gen belirlemişlerdir. Bu gen üzerinden sentez edilen protein Mx2 proteini olarak adlandırılmıştır. Bu tez çalışmada da fare *MX2* geni Swiss3T3 hücrelerinden hazırlanan cDNA üzerinden PZR ile çoğaltılıp pCHA plazmit vektöründe klonlanmış ve bu plazmit üzerinden kodlanan Mx2 proteinin influenza virüsü replikasyonuna etkileri araştırılmıştır.

Memeli organizmalarda interferon sinyali sonucu uyarılan genler tarafından kodlanan, yapısal olarak birbirleri ile ilişkili, bir kısmı sitoplazmik, bir kısmı ise nükleusta lokalize olan proteinler, Mx proteinleri olarak da adlandırılır. Farelerde *MX1* ve *MX2* genleri yüksek düzeyde baz dizisi benzerliğ gösterir ve 16. kromozom üzerinde aynı pozisyonda lokalize olurlar. Bu genler tarafından kodlanan Mx1 ve Mx2 proteinleri hücre içerisinde lokalizasyon bakımından farklılık gösterirler. Daha önce karakterize edilen fare Mx1 proteini hücre nükleusunda lokalize olur. Mx proteinlerinin karakteristik özelliklerinden biri non-kovalent olarak bir araya gelerek oligomerler oluşturmasıdır. Fare Mx1 proteini ile yapılan biyokimyasal çalışmalar proteinin amino-terminal ucunda, GTP bağlama motifleri arasında yer alan bir bölgenin oligomerizasyondan sorumlu olduğunu göstermiştir. Bununla birlikte, diğer araştırma grupları tarafından farklı sonuçlar bildirilmiştir. Bir grup Mx1 proteinin

karboksi-terminalde yer alan lösin fermuarı motifinin hem olimerizasyon hem de antiviral aktivite için gerekli olduğunu rapor etmiştir. Mx1 proteinin aksine bu çalışmanın konusunu oluşturan Mx2 proteinleri hücre sitoplazmasında lokalize olurlar. Mx proteinlerinin hücrelerde farklı lokalizasyon göstermesi, bu proteinlerin antiviral aktiviteleri ve etki mekanizmalarının da farklı olmasına neden olmaktadır.

Hücre nükleusunda lokalize olan Mx1 proteini influenza virüsü replikasyonu üzerinde güçlü bir inhibisyona neden olmaktadır. Buna karşın Mx2 proteini ilginç bir şekilde influenza virüsleri üzerinde etki etmemekte, VSV (vesicular stomatitis virus) virüslerine karşı ise zayıf inhibitör etki göstermektedir. Bu durum farklı nedenlerden kaynaklanabilir. Bunlardan biri, *MX2* genlerinin işlevsel özelliklerini kaybetmesi olabilir. Yapılan çalışmalar birçok laboratuvar faresinde *MX2* genlerinde kodlayıcı bölgenin 1366.pozisyonda bir C bakiyesi eklenmesi sonucunda, translasyonda çerçeve kaymasına neden olan mutasyon bulunduğu saptanmıştır. Yaptığımız çalışmada, Mx2 cDNA'sı fare kökenli Swiss3T3 hücrelerinden hazırlanmış ve memeli ekspresyon vektörüne klonlanmıştır. Yapılan dizi analizi sonucunda, klonladığımız Mx2 geninin belirtilen tarzda translasyonda çerçeve kaymasına yol açacak bir inserstonel mutasyon taşımadığı saptanmıştır. Aynı şekilde, Western melezleme tekniği ile pCHA-Mx2 plazmit vektörünün Mx2 proteinin kodlayıp-kodlamadığını saptamaya yönelik analizler sonucunda, yaklaşık 72 kD büyüklüğünde, beklenen boyutta protein bandı belirlenmiştir (**Şekil 6.10.**). Zurcher ve arakadaşları [100] yaptıkları çalışmada, Mx2 ekspresse eden Swiss3T3 hücrelerine ait MX2 cDNA'sini hedefe-özgü (site-specifik) mutagenez ile düzelterek virüsler üzerinde denemişlerdir. Bu haliyle Mx2 proteini yakarıda da değinildiği gibi sadece VSV virüsü replikasyonu üzerinde bir ölçüde inhibitif etki yaptığı saptanmıştır. Mx2 proteinin influenza virüsü replikasyonu üzerinde etkili olmamasının bir diğer nedeni, hücre içerisindeki lokalizasyonudur. Mx2 proteini sitoplazmik lokalizasyon göstermesi, replikasyon stratejileri farklı olan virüsler üzerinde farklı etki gösterebilmektedir.

Swiss3T3 hücrelerinden izole edilen ve pCHA plazmit vektörüne klonlanan fare Mx2 geni, DNA dizi analizi ile kontrol edildikten sonra (**Şekil 6.5.**), HEK293 hücrelerinde sentez edilip edilmediği Westen melezleme tekniği ile ortaya konmuştur. Bu kontrol deneylerinden sonra, fare Mx2 proteinin influenza virüs replikasyonuna olası etkisini saptamak amacıyla bu virüs için oluşturulan minireplikon sitemi kullanılmıştır. Daha önce farklı virüsler için geliştirilen minireplikon sistemleri Mx proteinlerinin etki mekanizmalarını saptamak amacıyla kullanılmıştır. Hücre sitoplazmasında lokalize olan insan MxA proteinlerinin Semliki Forest Virüs (SFV) replikasyonuna etkilerini saptamak amacıyla, bakteri β-galaktozidaz geni

kullanılarak minireplikon sistemi oluşturulmuş ve yapılan deneyler sonucunda MxA proteinin pozitif polarite gösteren ve hücre sitoplazmasında replike olan SFV replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir [101]. Yine vaccinia virüsler kullanılarak Thogota virüs [102] ve influenza virüslerinin [103] replikasyon ve transkripsiyon mekanizmalarını çalışmak için yapay ekspresyon sistemleri geliştirilmiştir. Bu sistemlerde, belirteç gen taşıtan yapay virüs genomları, RNA polimeraz enzimi ve NP proteinleri virüs infeksiyonu ile ya da rekombinant vaccinia virüs tarafından kodlanan T7 RNA plimeraz enzimi katalizörlüğünde hücre içerisinde sentez ettirilmiştir. Bu şekilde hazırlanan rekombinant vaccinia virüs temeline dayalı sistemlerde fare Mx1 proteinin influenza virüs replikasyonunu [104], insan MxA proteininin ise Thogoto virus replikasyonun inhibe ettiği rapor edilmiştir [105]. Benzer şekilde Turan ve arkadaşları [87] insan MxA proteinin influenza virüs replikasyonuna etki mekanizmasını aydınlatmaya yönelik olarak, influenza virüsleri için plazmit temeline dayalı bir minireplikon sistemi geliştirmişlerdir. Bu sistem üzerinde gerek doğal olarak nukleusta lokalize olan fare Mx1 proteinin, gerekse sitoplazmik ve nulear insan MxA proteinlerinin etkisini araştırmışlardır. Bu çalışma sonucunda özellikler nüklear lokalizasyon gösteren Mx proteinlerinin viral RNA polimeraz üzerinde çok daha yüksek hüzeyde inhibitör etkiye sahip olduklarını göstermişlerdir. Diğer taraftan influenza NP protein miktarının hücre içerisinde yapay olarak arttırılmasının MxA proteinin aktivitesini nötralize ettiğini saptamışlardır. Dolayısıyla yapay sistem olmakla birlikte minireplikon sistemleri, moleküler düzeyde hücresel ve viral proteinlerin etkileşimlerini saptamakta kullanılan önemli araçlardır. Bu tez çalışmasında da Turan ve arkadaşlarının [87] kullandığı minireplikon plazmitleri kullanılmıştır (**Şekil 6.12.**). Çalışmaya minireplikon sisteminin işleyişinin kontrolü ile başlanmıştır. Bu amaçla HEK293 hücreleri, farklı kombinasyonlarda minireplikon plazmitleri ile transfekte edilmiş ve belirli bir süre sonrasında lüsiferaz belirteç gen ekspresyon düzeyi ölçülmüştür (**Şekil 6.13.**). Elde edilen sonuçlara, minireplikon sisteminin hem influenza virüsü RNA polimeraz alt birimlerine, hem de NP proteinine bağımlı olduğu, bu komponentlerden birinin eksik olması halinde sistemin işlemediği gösterilmiştir.

pCHA vektörü üzerinden sentez edilen fare Mx2 proteininin Swiss3T3 hücrelerinde lokalizasyonu immünfluoresan yöntemlerle incelenmiştir. Mx2 proteininin görüntülenmesinde, proteinin amino-terminalinde taşıdığı HA epitopundan yararlanılarak monoklonal anti-HA antikorları ile saptanmıştır (**Şekil 6.11.**). Elde edilen sonuçlar, daha önceki çalışmalara paralel olarak, Mx2 proteinin hücre sitoplazmasında lokalize olduğunu göstermiştir. İnfluenza virüsleri diğer birçok RNA virüsünün aksine hücre nükleusunda

replike olmaktadır. Benzer şekilde influenza virüsü minireplikonunun transkripsiyonu da nükleus içerisinde gerçekleşmektedir. Daha önce yapılan çalışmalarda da rapor edildiği gibi fare Mx2 proteinin influenza virüs replikasyonuna etki etmemesinin bir nedeni hücre içeresindeki lokalizasyona bağlı olabilir. Bununla birlikte, plazmitlerden oluşan influenza minireplikon sistemi kullanılarak fare Mx2 proteinin etkisini araştırmaya yönelik bir çalışmaya rastlanmamıştır. Bu nedenle bu çalışmada fare Mx2 proteinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri hem Swiss3T3 hem de HEK293 hücrelerinde araştırılmıştır. Şekil **6.14** ve **6.15**'de de görüldüğü gibi Mx2 proteininin influenza virüsü RNA polimeraz enzimi üzerinde anlamlı bir inhibitör etkiye sahip olamadığı gözlenmiştir.

İnterferonlar tarafından sentezi uyarılan ve antiviral aktivite gösteren proteinler hücre nükleusunda ya da sitoplazmada lokalize olarak işlevlerini ortaya koyarlar. Doğal olarak belirli bir virüsün replikasyonunu inhibe eden nüklear ya da sitoplazmik proteinin etki mekanizması ve hedef aldığı viral fonksiyonlar bakımından farklılık göstermektedir [106]. Örneğin fare Mx1 proteinin ve insan MxA proteinleri, her ikisi de influenza virüs replikasyonunu inhibe etmektedir. Bununla birlikte etki mekanizmalari tam olarak netlik kazanmasa da, Mx1 proteini virüse ait hedef moleküllerinin başında RNA polimeraz alt birimlerinden PB2 proteini gelmektedir. Stranden ve arkadaşları, [107] fare Mx1 proteini aktivitesinin hücrede artan miktarlarda sentez edilen viral PB2 proteinin ile ileri derecede nötralize olduğunu göstermiştir. İnsan MxA proteinin hedeflerinden biri influenza PB2 olmakla birlikte, viral NP proteininin de önemli olduğu saptanmıştır [87]. Kochs ve Haller [108] insan MxA proteinin Thogoto virüs nükleokapsitlerinin hücre nükleusuna transportunu bloke ettiğini göstermişlerdir. Diğer taraftan Mx proteinlerinin lokalizasyonu, viral replikasyonu inhibisyonda virüs tipine göre de farklılık gösterebilmektedir. RNA genomu taşıyan virüslerin önemli bir kısmı, kendi replikasyonları için gereken polimeraz enzimlerini yapılarında taşıdıklarından konak hücre sitoplazmasında replike olmakta, bir kısmi ise çeşitli hücresel faktörlere gereksinim duyduğundan hücre nükleusunda replike olmaktadır. Bu nedenle örneğin Siçanlara özgü ve nüklear lokalizasyon gösteren Mx1 proteini hücreleri influenza virülerine karşı etkin bir şekilde korurken, sitoplazmada replike olan VSV replikasyonu üzerinde önemli ölçüde etkisiz kalmaktadır. Benzer durum fare MxB proteini için de geçerlidir. Sitoplazmik MxB proteini VSV replikasyonunu bir ölçüde inhibe ederken influenza virüsleri üzerinde etki göstermemektedir [109]. Bazı çalışmalarda insan MxA ve fare Mx1 proteinleri nokta mutasyonları ya da çeşitli sinyal peptidlerilerinin eklenmesi ile doğal loakalizasyon özellikleri değiştirilmiştir. Turan ve ark. [87] nüklear lokalizasyon

gösteren VP16-Mx2 proteinin, minireplikon siteminde influenza virüs replikasyonunu sitoplazmik doğal MxA proteinine göre daha etkin bir şekilde inhibe ettiğini göstermişlerdir. Fare Mx1 proteini üzerinde yapılan nokta mutasyonları çalışmaları sonucunda, lokalizasyon ve antiviral aktivite bakımından farklılık gösteren proteinler oluşturulmuştur [110]. Bu çalışmada yabani tipte Mx1 proteininden tek amino asit bakiyesi bakımından farklı ve sitoplazmik lokalizasyon gösteren mutant Mx1(E_{614}) proteininin hem influenza virüsü hem de VSV replikasyonu üzerinde inhibitör etki yapmadığı gösterilmiştir. Tüm bu veriler değerlendirildiğinde, Mx proteinleri üzerinde yapılacak değişikliklerle hücredeki konumlarının değiştirilmesinin, bu proteinlerin antiviral aktivitelerinde ve etki ettikleri virüs tiplerinde farklılaşmanın olduğu görülmektedir. Bu nedenle tez kapsamında fare Mx2 proteinin hücre nüklesuna kanalize etmek amacıyla bir çalışma yapılmıştır. Fare Mx2 geni, SV40 T antijenin nüklear lokalizasyon sinyali taşıyan Mx2 (nMx2) kodlayacak şekilde yeniden klonlanmıştır (**Şekil 6.8**). Elde edilen pCHA-nMx2 vektörünün SV40 T anitijeni NLS taşıdığı DNA dizi analizleri ile kanıtlanmıştır (**Şekil 6.10**). Fakat, immünflüoresan teknikler kullanılarak yapılan çalışmada nMx2 proteinin beklenenin aksine baskın olarak hücre sitoplazmasında lokalize olduğu gözlenmiştir (**Şekil 6.11**).

Hücre içerisinde cereyan eden önemli olaylardan biri protein trafiğidir. Sitoplazmada sentez edilen proteinler işlevlerine göre hücrenin farklı bölgelerine kanalize edilir. İlk kez Blobel ve Dobberstein [111, 112] proteinlerin hücre membranlarına taşınmasında sinyal dizilerinin rol aldığını göstermişlerdir. Benzer şekilde proteinlerin diğer hücre organellerine taşınmasında da çeşitli sinyal peptidleri rol oynamaktadır. Proteinlerin hücre nükleusuna taşınmasında rol alan değişik nüklear lokalizsayon sinyalleri tanımlanmıştır. Bunlar, klasik ve klasik olmayanlar olmak üzere iki farklı sınıfta incelenmektedir. İlk keşfedilen NLS dizisi (PKKKRKV) SV40-T antijenidir [113]. Bunun dışında birçok farklı tipte nüklear lokalizasyon dizileri bulunmaktadır. Örneğin, hnRNP A1'in asidik M9 domaini, maya transkripsiyon represörü Matα2' nin KIPIK dizisi veya U snRNPs' in kompleks dizileri. Birçok NLS dizisi, importin ß ailesinin spesifik reseptörleri tarafından tanınırlar [114]. NLS dizisini taşıyan protein impotine güçlü bir şekilde bağlanır ve bu kompleks birlikte nuklear pora hareket ederler. Bu aşamada Ran-GTP, importin-protein kompleksine bağlanır ve bu bağlanma sonucunda importinin proteine karşı afinitesi kaybolur. Protein nukleusta serbest bırakıldıktan sonra Ran-GTP/importin kompleksi nuklear por aracılığıyla nucleusun dışına taşınır. Sitoplazmada bulunan GTPaz aktive edici protein (GAP), Ran-GTP' nin Ran-GDP' ye hidrolizini gerçekleştirir. Bu konformasyonel değişikliğin sonucunda, Ran proteininin

importine karşı afinitesi düşer. Bu döngü bu şekilde devam eder [115]. Bu çalışma da SV40-T antijenine özgü NLS dizisi rakombinant DNA tekniklerinden yararlanılarak Mx2 proteinin amino-terminal ucuna eklenmiştir. Bununla birlikte, NLS dizisinin Mx2 proteininde en azından amino-terinal uçta yer aldığı zaman işlev görmediği görülüştür. Bu durum farklı şekillerde açıklanabilir. NLS dizisi Mx2 proteininde, tersiyer yapıdan kaynaklanan bir maskelenme ile işlevini kaybetmiş olabilir. Bir diğer neden oluşturduğumuz pCAH-Mx2 vektörünün amino terminalde HA epitopu uzantısı taşıması translokasyonu engellemiş olabilir. Alternatif olarak SV40 T antijen NLS Mx2 proteininin karboksi-terminal bölgesine eklenebilir. Fakat bu çalışmada karboksi-terminalde NLS taşıyan Mx2 proteini denenmemiştir. NLS taşıyan Mx2 (nMx2) proteini hücre içerisinde arzu edilen lokalizasyonu göstermemesine karşın, influenza virüsü minireplikonu üzerinde test edilmiştir. Fakat, doğal Mx2 proteininde olduğu gibi nMx2 proteini de influenza virüs RNA polimeraz enzimi üzerinde anlamlı bir etkiye sahip olmadığı görülmüştür (**Şekil 6.16.**)

Özet olarak bu tez kapsamında farelere özgü *MX2* geni pCHA memeli ekspresyon vektörüne klonlanmış, bu genin hem fare örijinli Swiss3T3, hem de insan örijinli HEK293 hücrelerinde etkin bir şekilde ekspresyon yaptığı gösterilmiştir. İmmünflüoresan çalışmalar Mx2 proteinin hücre sitoplazmasında lokalize olduğunu ortaya koymuştur. Fare Mx2 proteininin amino-terminaline SV40-T anitijeni NLS dizisinin eklenmesinin, bu proteinin hücre nükleusuna kanalize olması için yeterli olmadığı saptanmıştır. Diğer taraftan, gerek doğal Mx2 gerekse NLS taşıyan Mx2 proteinlerinin, hücre içerisnde yapay olarak oluşturulan influenza virüsü minireplikon modelinde, viral RNA polimeraz üzerinde inhibe edici etkiye sahip olmadığı görülmüştür. Bu bağlamda Mx2 proteinini hücre nükleusuna kanalize etmek önemli olabilir. Dolayısıyla bu çalışmanın devamında nüklear Mx2 proteini kodlayacak bir gen yapısının oluşturulması düşünülmektedir. Bu amaçla farklı startıjiler izlenecektir. Öncelikle karboksi-terminalinde SV40-T antijeni NLS'si taşıyan Mx2 proteinini kodlayacak gen oluşturulacaktır. Olumlu sonuç alınamaması durumunda, daha farklı nüklear lokalizasyon sinyallerinden yararlanılacaktir.

8. KAYNAKLAR

1. Palese, P. and J.L. Schulman, Differences in RNA patterns of influenza A viruses. J Virol, 1976. **17**(3): p. 876-84.
2. Gultyaev, A.P., R.A. Fouchier, and R.C. Olsthoorn, Influenza virus RNA structure: unique and common features. Int Rev Immunol. **29**(6): p. 533-56.
3. Igarashi, M., et al., Predicting the antigenic structure of the pandemic (H1N1) 2009 influenza virus hemagglutinin. PLoS One. **5**(1): p. e8553.
4. Webster, R.G. and M.T. Berton, Analysis of antigenic drift in the haemagglutinin molecule of influenza B virus with monoclonal antibodies. J Gen Virol, 1981. **54**(Pt 2): p. 243-51.
5. Schweiger, B., I. Zadow, and R. Heckler, Antigenic drift and variability of influenza viruses. Med Microbiol Immunol, 2002. **191**(3-4): p. 133-8.
6. Isaeva, E.I., Z.I. Rovnova, and T.S. Belkina, [Immunological analysis of the chronological sequence of the shift in the antigenic determinants of influenza virus A (H1N1) hemagglutinins]. Vopr Virusol, 1984. **29**(4): p. 423-7.
7. Patel, A., et al., Co-administration of certain DNA vaccine combinations expressing different H5N1 influenza virus antigens can be beneficial or detrimental to immune protection. Vaccine. **30**(3): p. 626-36.
8. Cebulla, C.M., D.M. Miller, and D.D. Sedmak, Viral inhibition of interferon signal transduction. Intervirology, 1999. **42**(5-6): p. 325-30.
9. Price, G.E., A. Gaszewska-Mastarlarz, and D. Moskophidis, The role of alpha/beta and gamma interferons in development of immunity to influenza A virus in mice. J Virol, 2000. **74**(9): p. 3996-4003.
10. Horisberger, M.A., Interferons, Mx genes, and resistance to influenza virus. Am J Respir Crit Care Med, 1995. **152**(4 Pt 2): p. S67-71.
11. Wagner, R.R., Cellular resistance to viral infection, with particular reference to endogenous interferon. Bacteriol Rev, 1963. **27**: p. 72-86.
12. Lan, Y.C., et al., Epidemiology of pandemic influenza A/H1N1 virus during 2009-2010 in Taiwan. Virus Res, 2013. **177**: p. 46-54.
13. Hobday, R.A. and J.W. Cason, The open-air treatment of pandemic influenza. Am J Public Health, 2009. **99 Suppl 2**: p. S236-42.
14. Hsieh, Y.H. and C.H. Chan, Excess healthcare burden during 1918-1920 influenza pandemic in Taiwan: implications for post-pandemic preparedness. BMC Public Health. **11**: p. 41.
15. Watanabe, Y., et al., The changing nature of avian influenza A virus (H5N1). Trends Microbiol, 2011. **20**(1): p. 11-20.

16. Leser, G.P. and R.A. Lamb, Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. Virology, 2005. **342**(2): p. 215-27.
17. Nayak, B., et al., Contributions of the avian influenza virus HA, NA, and M2 surface proteins to the induction of neutralizing antibodies and protective immunity. J Virol. **84**(5): p. 2408-20.
18. Tong, S., et al., A distinct lineage of influenza A virus from bats. Proc Natl Acad Sci U S A. **109**(11): p. 4269-74.
19. Nakajima, K., [The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]. Nihon Rinsho, 2003. **61**(11): p. 1897-903.
20. Hirsch, M.S., A new publisher for the Journal of Infectious Diseases. J Infect Dis. **203**(1): p. 1-2.
21. Fodor, E., D.C. Pritlove, and G.G. Brownlee, Characterization of the RNA-fork model of virion RNA in the initiation of transcription in influenza A virus. J Virol, 1995. **69**(7): p. 4012-9.
22. Fodor, E., D.C. Pritlove, and G.G. Brownlee, The influenza virus panhandle is involved in the initiation of transcription. J Virol, 1994. **68**(6): p. 4092-6.
23. Li, X. and P. Palese, Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4331-8.
24. Henklein, P., et al., Influenza A virus protein PB1-F2: synthesis and characterization of the biologically active full length protein and related peptides. J Pept Sci, 2005. **11**(8): p. 481-90.
25. Klumpp, K., R.W. Ruigrok, and F. Baudin, Roles of the influenza virus polymerase and nucleoprotein in forming a functional RNP structure. EMBO J, 1997. **16**(6): p. 1248-57.
26. Hoogstraten, C.G. and M. Sumita, Structure-function relationships in RNA and RNP enzymes: recent advances. Biopolymers, 2007. **87**(5-6): p. 317-28.
27. Horimoto, T. and Y. Kawaoka, Influenza: lessons from past pandemics, warnings from current incidents. Nat Rev Microbiol, 2005. **3**(8): p. 591-600.
28. Blaas, D., E. Patzelt, and E. Kuechler, Identification of the cap binding protein of influenza virus. Nucleic Acids Res, 1982. **10**(15): p. 4803-12.
29. Hatta, M., et al., Molecular basis for high virulence of Hong Kong H5N1 influenza A viruses. Science, 2001. **293**(5536): p. 1840-2.
30. Li, M.L., P. Rao, and R.M. Krug, The active sites of the influenza cap-dependent endonuclease are on different polymerase subunits. EMBO J, 2001. **20**(8): p. 2078-86.
31. Lee, M.T., et al., Definition of the minimal viral components required for the initiation of unprimed RNA synthesis by influenza virus RNA polymerase. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(2): p. 429-38.
32. Honda, A., K. Mizumoto, and A. Ishihama, Minimum molecular architectures for transcription and replication of the influenza virus. Proc Natl Acad Sci U S A, 2002. **99**(20): p. 13166-71.

33. Fodor, E., et al., 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**(18): p. 8989-9001.
34. Hara, K., et al., Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. Genes Cells, 2001. **6**(2): p. 87-97.
35. White, J.M., Membrane fusion. Science, 1992. **258**(5084): p. 917-24.
36. White, J.M. and I.A. Wilson, Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: low-pH activation of the influenza virus hemagglutinin. J Cell Biol, 1987. **105**(6 Pt 2): p. 2887-96.
37. Elton, D., et al., Interaction of the influenza virus nucleoprotein with the cellular CRM1-mediated nuclear export pathway. J Virol, 2001. **75**(1): p. 408-19.
38. Beaton, A.R. and R.M. Krug, Transcription antitermination during influenza viral template RNA synthesis requires the nucleocapsid protein and the absence of a 5' capped end. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(17): p. 6282-6.
39. Colman, P.M., J.N. Varghese, and W.G. Laver, Structure of the catalytic and antigenic sites in influenza virus neuraminidase. Nature, 1983. **303**(5912): p. 41-4.
40. Gottschalk, A., Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. Biochim Biophys Acta, 1957. **23**(3): p. 645-6.
41. Palese, P., et al., Characterization of temperature sensitive influenza virus mutants defective in neuraminidase. Virology, 1974. **61**(2): p. 397-410.
42. Wakefield, L. and G.G. Brownlee, RNA-binding properties of influenza A virus matrix protein M1. Nucleic Acids Res, 1989. **17**(21): p. 8569-80.
43. Hui, E.K., et al., Basic residues of the helix six domain of influenza virus M1 involved in nuclear translocation of M1 can be replaced by PTAP and YPDL late assembly domain motifs. J Virol, 2003. **77**(12): p. 7078-92.
44. Holsinger, L.J. and R.A. Lamb, Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. Virology, 1991. **183**(1): p. 32-43.
45. Pinto, L.H., L.J. Holsinger, and R.A. Lamb, Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell, 1992. **69**(3): p. 517-28.
46. Garcia-Sastre, A., et al., Influenza A virus lacking the NS1 gene replicates in interferon-deficient systems. Virology, 1998. **252**(2): p. 324-30.
47. O'Neill, R.E., J. Talon, and P. Palese, The influenza virus NEP (NS2 protein) mediates the nuclear export of viral ribonucleoproteins. EMBO J, 1998. **17**(1): p. 288-96.
48. Honda, A., et al., Identification of the RNA polymerase-binding site on genome RNA of influenza virus. J Biochem, 1987. **102**(5): p. 1241-9.
49. Ohtsu, Y., et al., Fine mapping of the subunit binding sites of influenza virus RNA polymerase. Microbiol Immunol, 2002. **46**(3): p. 167-75.

50. White, J., M. Kielian, and A. Helenius, Membrane fusion proteins of enveloped animal viruses. Q Rev Biophys, 1983. **16**(2): p. 151-95.
51. Skehel, J.J., et al., Changes in the conformation of influenza virus hemagglutinin at the pH optimum of virus-mediated membrane fusion. Proc Natl Acad Sci U S A, 1982. **79**(4): p. 968-72.
52. Plotch, S.J., et al., A unique cap(m7GpppXm)-dependent influenza virion endonuclease cleaves capped RNAs to generate the primers that initiate viral RNA transcription. Cell, 1981. **23**(3): p. 847-58.
53. Doms, R.W., et al., Folding and assembly of viral membrane proteins. Virology, 1993. **193**(2): p. 545-62.
54. Bikard, D. and L.A. Marraffini, Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. Curr Opin Immunol. **24**(1): p. 15-20.
55. Kaufmann, A., et al., Defense against influenza A virus infection: essential role of the chemokine system. Immunobiology, 2001. **204**(5): p. 603-13.
56. Kase, T., et al., Human mannan-binding lectin inhibits the infection of influenza A virus without complement. Immunology, 1999. **97**(3): p. 385-92.
57. Medzhitov, R., Recognition of microorganisms and activation of the immune response. Nature, 2007. **449**(7164): p. 819-26.
58. Ryter, A., Relationship between ultrastructure and specific functions of macrophages. Comp Immunol Microbiol Infect Dis, 1985. **8**(2): p. 119-33.
59. Langermans, J.A., W.L. Hazenbos, and R. van Furth, Antimicrobial functions of mononuclear phagocytes. J Immunol Methods, 1994. **174**(1-2): p. 185-94.
60. Guermonprez, P., et al., Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol, 2002. **20**: p. 621-67.
61. Dranoff, G., Cytokines in cancer pathogenesis and cancer therapy. Nat Rev Cancer, 2004. **4**(1): p. 11-22.
62. Pancer, Z. and M.D. Cooper, The evolution of adaptive immunity. Annu Rev Immunol, 2006. **24**: p. 497-518.
63. Holtmeier, W. and D. Kabelitz, gammadelta T cells link innate and adaptive immune responses. Chem Immunol Allergy, 2005. **86**: p. 151-83.
64. Kehry, M.R. and P.D. Hodgkin, B-cell activation by helper T-cell membranes. Crit Rev Immunol, 1994. **14**(3-4): p. 221-38.
65. Lindenmann, J., D.C. Burke, and A. Isaacs, Studies on the production, mode of action and properties of interferon. Br J Exp Pathol, 1957. **38**(5): p. 551-62.
66. Friedlander, E.J., H.L. Henry, and A.W. Norman, Studies on the mode of action of calciferol. Effects of dietary calcium and phosphorus on the relationship between the 25-hydroxyvitamin

D3-1alpha-hydroxylase and production of chick intestinal calcium binding protein. J Biol Chem, 1977. **252**(23): p. 8677-83.

67. Isaacs, A. and J. Lindenmann, Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci, 1957. **147**(927): p. 258-67.
68. Fensterl, V. and G.C. Sen, Interferons and viral infections. Biofactors, 2009. **35**(1): p. 14-20.
69. de Veer, M.J., et al., Functional classification of interferon-stimulated genes identified using microarrays. J Leukoc Biol, 2001. **69**(6): p. 912-20.
70. Vilcek, J., Recent progress in the elucidation of interferon alfa/beta and interferon gamma actions. Semin Hematol, 1993. **30**(3 Suppl 3): p. 9-10.
71. Chelbi-Alix, M.K. and M.N. Thang, Multiple molecular forms of interferon display different specific activities in the induction of the antiviral state and 2'5' oligoadenylate synthetase. Biochem Biophys Res Commun, 1986. **141**(3): p. 1042-50.
72. Swiecki, M. and M. Colonna, Type I interferons: diversity of sources, production pathways and effects on immune responses. Curr Opin Virol. **1**(6): p. 463-75.
73. Wright, S.C. and B. Bonavida, Studies on the mechanism of natural killer cell-mediated cytotoxicity. IV. Interferon-induced inhibition of NK target cell susceptibility to lysis is due to a defect in their ability to stimulate release of natural killer cytotoxic factors (NKCF). J Immunol, 1983. **130**(6): p. 2965-8.
74. Schroder, K., et al., Interferon-gamma: an overview of signals, mechanisms and functions. J Leukoc Biol, 2004. **75**(2): p. 163-89.
75. Platanias, L.C., Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(5): p. 375-86.
76. Minks, M.A., et al., Structural requirements of double-stranded RNA for the activation of 2',5'-oligo(A) polymerase and protein kinase of interferon-treated HeLa cells. J Biol Chem, 1979. **254**(20): p. 10180-3.
77. Lindenmann, J., Resistance of mice to mouse-adapted influenza A virus. Virology, 1962. **16**: p. 203-4.
78. Haller, O., S. Stertz, and G. Kochs, The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. Microbes Infect, 2007. **9**(14-15): p. 1636-43.
79. Haller, O. and G. Kochs, Interferon-induced mx proteins: dynamin-like GTPases with antiviral activity. Traffic, 2002. **3**(10): p. 710-7.
80. Kochs, G., et al., Assay and functional analysis of dynamin-like Mx proteins. Methods Enzymol, 2005. **404**: p. 632-43.
81. Staeheli, P., F. Pitossi, and J. Pavlovic, Mx proteins: GTPases with antiviral activity. Trends Cell Biol, 1993. **3**(8): p. 268-72.
82. Pitossi, F., et al., A functional GTP-binding motif is necessary for antiviral activity of Mx proteins. J Virol, 1993. **67**(11): p. 6726-32.

83. Stertz, S., et al., The antiviral potential of interferon-induced cotton rat Mx proteins against orthomyxovirus (influenza), rhabdovirus, and bunyavirus. J Interferon Cytokine Res, 2007. **27**(10): p. 847-55.
84. Kochs, G., et al., Self-assembly of human MxA GTPase into highly ordered dynamin-like oligomers. J Biol Chem, 2002. **277**(16): p. 14172-6.
85. King, M.C., G. Raposo, and M.A. Lemmon, Inhibition of nuclear import and cell-cycle progression by mutated forms of the dynamin-like GTPase MxB. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(24): p. 8957-62.
86. Kochs, G. and O. Haller, Interferon-induced human MxA GTPase blocks nuclear import of Thogoto virus nucleocapsids. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(5): p. 2082-6.
87. Turan, K., et al., 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**(2): p. 643-52.
88. Schusser, B., et al., Mx is dispensable for interferon-mediated resistance of chicken cells against influenza A virus. J Virol. **85**(16): p. 8307-15.
89. Sambrook, J., Fritsch, E. F., Maniatis, T.: Molecular Clonning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Newyork, 1989.
90. Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J.A., Struhl, K., Short Protocols in Molecular Biology, Capter 19, p: 1-33, John Wiley & Sons, Inc., Newyork, 1999.
91. Johnsborg O, Eldholm V, Håvarstein LS., Natural genetic transformation: prevalence, mechanisms and function. Res. Microbiol., 2007, 158 (10).
92. Kitamura, M., et al., Cloning and expression of the catalase gene from the anaerobic bacterium Desulfovibrio vulgaris (Miyazaki F). J Biochem, 2001. **129**(3): p. 357-64.
93. Nagata, K., et al., Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. Exp Cell Res, 1998. **240**(2): p. 274-81.
94. Turan K, Kawaguchi A, Harada Y, Nagata K, Comparison of Avian and Human Influenza Virus RNA Polymerases in Mammalian Cells, XVth International Congress of Virology, September 11-16, VI-PO7-5, Sapporo, Japan, 2011.
95. Todaro, G.J. and H. Green, Quantitative studies of the growth of mouse embryo cells in culture and their development into established lines. J Cell Biol, 1963. **17**: p. 299-313.
96. Fritschy, Jean-Marc; Härtig, Wolfgang., Immunofluorescence, ELS, 2001, 10.1038.
97. Skarlas, T., et al., Influenza virus H5N1 hemagglutinin (HA) T-cell epitope conjugates: design, synthesis and immunogenicity. J Pept Sci. **17**(3): p. 226-32.
98. Meier, E., et al., A family of interferon-induced Mx-related mRNAs encodes cytoplasmic and nuclear proteins in rat cells. J Virol, 1988. **62**(7): p. 2386-93.

99. Staeheli, P. and J.G. Sutcliffe, Identification of a second interferon-regulated murine Mx gene. Mol Cell Biol, 1988. **8**(10): p. 4524-8.
100. Zurcher, T., J. Pavlovic, and P. Staeheli, Mouse Mx2 protein inhibits vesicular stomatitis virus but not influenza virus. Virology, 1992. **187**(2): p. 796-800.
101. Landis, H., et al., Human MxA protein confers resistance to Semliki Forest virus and inhibits the amplification of a Semliki Forest virus-based replicon in the absence of viral structural proteins. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1516-22.
102. Weber, F., et al., In vivo reconstitution of active Thogoto virus polymerase: assays for the compatibility with other orthomyxovirus core proteins and template RNAs. Virus Res, 1998. **58**(1-2): p. 13-20.
103. Fuerst, T.R., et al., Eukaryotic transient-expression system based on recombinant vaccinia virus that synthesizes bacteriophage T7 RNA polymerase. Proc Natl Acad Sci U S A, 1986. **83**(21): p. 8122-6.
104. Huang, T., et al., Overexpression of the influenza virus polymerase can titrate out inhibition by the murine Mx1 protein. J Virol, 1992. **66**(7): p. 4154-60.
105. Weber, F., O. Haller, and G. Kochs, MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. J Virol, 2000. **74**(1): p. 560-3.
106. Pavlovic, J., O. Haller, and P. Staeheli, Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. J Virol, 1992. **66**(4): p. 2564-9.
107. Stranden, A.M., P. Staeheli, and J. Pavlovic, Function of the mouse Mx1 protein is inhibited by overexpression of the PB2 protein of influenza virus. Virology, 1993. **197**(2): p. 642-51.
108. Pichlmair, A., et al., Thogoto virus lacking interferon-antagonistic protein ML is strongly attenuated in newborn Mx1-positive but not Mx1-negative mice. J Virol, 2004. **78**(20): p. 11422-4.
109. Lee, S.H. and S.M. Vidal, Functional diversity of Mx proteins: variations on a theme of host resistance to infection. Genome Res, 2002. **12**(4): p. 527-30.
110. Zurcher, T., J. Pavlovic, and P. Staeheli, Nuclear localization of mouse Mx1 protein is necessary for inhibition of influenza virus. J Virol, 1992. **66**(8): p. 5059-66.
111. Blobel, G. and B. Dobberstein, Transfer of proteins across membranes. I. Presence of proteolytically processed and unprocessed nascent immunoglobulin light chains on membrane-bound ribosomes of murine myeloma. J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 835-51.
112. Blobel, G. and B. Dobberstein, Transfer of proteins across membranes. II. Reconstitution of functional rough microsomes from heterologous components. J Cell Biol, 1975. **67**(3): p. 852-62.
113. Kalderon, D., et al., A short amino acid sequence able to specify nuclear location. Cell, 1984. **39**(3 Pt 2): p. 499-509.

114. Mattaj, I.W. and L. Englmeier, Nucleocytoplasmic transport: the soluble phase. Annu Rev Biochem, 1998. **67**: p. 265-306.
115. Newmeyer, D.D. and D.J. Forbes, Nuclear import can be separated into distinct steps in vitro: nuclear pore binding and translocation. Cell, 1988. **52**(5): p. 641-53.

8. ÖZGEÇMİŞ

1990 yılında İstanbul'da doğdum. İlkokulu 1996-2001 yılları arasında Marmara Kolej'inde ortaokulu İstek Özel Barış İlköğretim okulunda, liseyi ise İstek Özel Semiha Şakir Lisesinde tamamladım. 2007 yılında İstanbul Üniversitesi Fen Fakültesi Moleküler Biyoloji ve Genetik Bölümünü kazandım ve 2011 yılında mezun oldum. 2011 yılında Marmara Üniversitesi Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Biyokimya Anabilim Dalı'nda yüksek lisans programına kayıt oldum.