TÜRKİYE CUMHURİYETİ

MARMARA ÜNİVERSİTESİ

SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNSAN SNX2 PROTEİNİ İLE İNFLUENZA VİRÜSÜ RNA POLİMERAZ ENZİMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN MEMELİ HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

TUĞBA KOÇMAR

YÜKSEK LİSANS TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. KADİR TURAN

İSTANBUL – 2020

BEYAN

Bu tezin kendi çalışmam olduğunu, planlanmasından yazımına kadar hiçbir aşamasında etik dışı davranışım bulunmadığını, bu tezdeki bütün bilgileri akademik ve etik kurallar çerçevesinde elde ettiğimi, bu tez çalışmasıyla elde edilmeyen her bilgi ve yorum için kaynak gösterdiğimi ve bu kaynakları da kaynaklar listesinde belirttiğimi, bu tez çalışması ve yazımı sırasında patent ve telif haklarını ihlal edici herhangi bir davranışımın olmadığını beyan ederim.

Tuğba KOÇMAR



I. TEŞEKKÜR

Yüksek lisans tezi çalışmamın her aşamasında desteğini ve ilgisini hiç esirgemeyen, çalışmanın planlanma aşamasından sonuçlanmasına kadarki süreçte bana her türlü imkanı sağlayan, bilgi birikimini ve tecrübelerini paylaşmayı kendine görev edinmiş, hayata ve bilime bakışı, akademik çalışma ve etik konularında kendime örnek aldığım, kendisiyle çalışıyor olmaktan ve öğrencisi olmaktan dolayı gurur duyduğum tez danışmanım Prof. Dr. Kadir TURAN'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Katkılarından dolayı başta Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı değerli hocam Prof. Dr. Azize ŞENER olmak üzere, Prof. Dr. Fikriye URAS ve Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Laboratuvar çalışmalarımda desteğini benden esirgemeyen, bilgi birikimini ve tecrübelerini benimle paylaşan Ayşegül PİRİNÇAL ve Elif ÇAĞLAYAN'a ve laboratuvarda birlikte çalıştığım kıymetli arkadaşlarım Nazife GELMEZ, Ayşenur GÜNEŞ'e teşekkürlerimi sunarım.

Her daim yanımda olan ve varlıkları ile bana güç veren çok sevgili dostlarım İrem Gülfem ALBAYRAK ve Buse DURSUN'a teşekkürlerimi sunarım.

Hayatım boyunca her konuda yanımda olan, benden desteklerini hiç esirgemeyen, benimle her zaman gurur duyan, eğitim hayatım boyunca bana anlayış ve fedakarlık gösteren sevgili annem Seher KOÇMAR'a ve değerli babam Abdullah KOÇMAR'a teşekkürü bir borç bilirim.

Ayrıca her zaman yanımda duran, bana her daim güvenen ve ellerinden gelen her türlü desteği benden esirgemeyen, varlıkları ile bana güç veren çok sevdiğim kardeşlerim Volkan KOÇMAR ve Nazlı AYGÜN'e çok teşekkür ederim.

Bugünlere gelmemde emeği geçen herkese en içten dileklerim ile teşekkür ederim.

Tuğba KOÇMAR

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (Konu / No: İnsan SNX-2 Proteini ile İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimi Arasındaki İlişkinin Memeli Hücrelerinde Araştırılması / SAG-C-YLP-120619-0224) ve TÜBİTAK (Konu/No: İnfluenza Virüs Patogenezinde Viral RNA Polimeraz Enzimi ve Konak Hücre Proteinlerinin Rolünün Araştırılması / 112S518) tarafından desteklenmiştir.

I. TEŞEKKÜR ..... **ii**
II. İÇİNDEKİLER ..... **iii**
III. KISALTMALAR..... **x**
IV. ŞEKİL ve TABLOLARIN LİSTESİ ..... **xiii**
i. Şekil Listesi..... **xiii**
ii. Tablo Listesi ..... **xvi**

II. İÇİNDEKİLER

1 ÖZET..... **1**
2 SUMMARY..... **2**
3 GİRİŞ VE AMAÇ..... **3**
4 GENEL BİLGİLER..... **8**
4.1. Virüslerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması..... 8
4.2. İnfluenza Virüsleri..... 12
4.3. İnfluenza Patogenezi..... 22
4.4. İnfluenza Virüsü Enfeksiyonlarında Hücre İçi Savunma Mekanizmaları..... 24
4.5. Sorting Nexinler ve SNX2..... 26
5 GEREÇ ve YÖNTEM..... **32**
5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler..... 32
5.2. Enzimler..... 34
5.3. Ticari Kitler..... 35
5.4. Antikorlar..... 35
5.5. Cihaz ve Gereçler..... 36
5.6. Besiyerleri..... 37
5.6.1. Luria Bertani (LB) besiyeri 37
5.6.2. Luria Bertani agar (LBA) besiyeri 37
5.6.3. YPAD (Yeast- Pepton-Adenin-Dekstroz) besiyeri..... 37
5.6.4. YPD (Yeast- Pepton-Dekstroz) besiyeri..... 38
5.6.5. Katı Sentetik Dekstroz (SD) besiyeri..... 38
5.6.6. Sentetik Dekstroz /+leu+his+ade (SD+LHA) besiyeri..... 38
5.6.7. Sentetik Dekstroz /+his+ade (SD+HA) besiyeri..... 39

5.6.8. Memeli hücrelerinin üretilmesinde kullanılan besiyeri…… 39
5.7. Çözeltiler……. 39
5.7.1. 10x Konsantre amino asit (+urasil) çözeltisi (Drop Out: DO).. 39
5.7.2. 100x Konsantre lösin (Leu) çözeltisi…….……. 39
5.7.3. 100x Konsantre histidin (His) çözeltisi…..…….. 40
5.7.4. 100x Konsantre triptofan (Trp) çözeltisi……..... 40
5.7.5. 50x Konsantre adenin (Ade) çözeltisi…… 40
5.7.6. 3- Amino-1,2,4-triazole (3-AT) çözeltisi (1 M)…….. 40
5.7.7. Dekstroz çözeltisi (%20 –a/h)……. 40
5.7.8. Akrialmid/bis-Akrilamid çözeltisi (%29 Akrilamid / %1 bis-Akrilamid – a/h)…….…….. 40
5.7.9. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10 – a/h)…..... 40
5.7.10. Bloklama çözeltisi (%5'lik Yağsız Süt Tozu)……. 41
5.7.11. Etidyum bromür (10 mg/ml)……..... 41
5.7.12. %70 Etil alkol……... 41
5.7.13. Etilendiamintetraasetik asit (EDTA) çözeltisi (0,5 M, pH: 8,0) ……...…….. 41
5.7.14. Fenol : kloroform : izoamil alkol (25:24:1)……..... 41
5.7.15. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)…… 41
5.7.16. Glikoz çözeltisi (1 M)…….. 42
5.7.17. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)……. 42
5.7.18. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M)……..... 42
5.7.19. Kapatma çözeltisi…… 42
5.7.20. Lityum asetat çözeltisi (1M)…… 42
5.7.21. Lityum Asetat/PEG/TE çözeltisi (1M)……. 42
5.7.22. Mangan klorür çözeltisi (0,55M)……. 42
5.7.23. %10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi……..... 43
5.7.24. Paraformaldehit çözeltisi……. 43
5.7.25. 1,4-piperazindietanesulfonik asit (PIPES) çözeltisi (1 M)…. 43
5.7.26. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (%40 – a/h)……..... 43
5.7.27. Polietilen glikol (PEG) / sodyum klorür (NaCl) çözeltisi (%20 / 1,25 M) …….…….. 43

5.7.28. Polietilenimin (PEI) çözeltisi (2 mg/ml)…….. 43
5.7.29. Potasyum asetat (KCH_3COO) çözeltisi (3 M)…….. 44
5.7.30. Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4) çözeltisi (50 mM)…. 44
5.7.31. di-Potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) çözeltisi (50 mM)…. 44
5.7.32. Potasyum klorür (KCI) çözeltisi (2,5 M)……. 44
5.7.33. Salmon sperm DNA (ssDNA) çözeltisi (5 mg/ml)……... 44
5.7.34. Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) çözeltisi (%7,5)…….. 45
5.7.35. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10)……..... 45
5.7.36. Sodyum dodesil sülfat (SDS) çözeltisi (%10)…….. 45
5.7.37. Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (2 N)……..... 45
5.7.38. Sodyum klorür (NaCI) çözeltisi (2,5 M)…….. 45
5.7.39. Sodyum di-hidrojen fosfat (Na2HPO4) çözeltisi (200 mM)... 45
5.7.40. di-Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (200 mM)…. 46
5.7.41. %0,25 Tripsin çözeltisi…… 46
5.7.42. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0,05 Tripsin, %0,05 EDTA-a/h)… 46
5.7.43. Tween-20 çözeltisi (%10)……..... 46
5.8. Tamponlar……..... 46
5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu…… 46
5.8.2. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glukoz, 10 mM EDTA, pH 8,0)…… ……... 46
5.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu II (0,2 N NaOH, %1 SDS)…….. 47
5.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum, 5 M Asetat).. 47
5.8.5. 50x Konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu…..... 47
5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu…… 47
5.8.7. 10x Konsantre 3-(N-morfolino)propansulfonik asit (MOPS) tamponu…….……..... 47
5.8.8. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, %0,4 SDS–a/h, pH 8,8)……..... 47
5.8.9. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0,5 M Tris, %0,4 – a/h SDS, pH 6,8)……..……. 47
5.8.10. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0,125 M Tris, 1,25 M Glisin, pH 8,3)……..... 48

5.8.11. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 – a/h SDS, pH 8,3)……..…… 48
5.8.12. Protein transfer tamponu…….. 48
5.8.13. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0,2 M tris; %8 SDS - a/h; %0,2 bromofenol mavisi - a/h ; %4 2-merkaptoetanol h/h; %40 gliserin - h/h, pH 6,8)…….……... 48
5.8.14. RIPA tamponu (50 mM Tris, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8; 150 mM NaCl; %1 NP- 40, %0,5 sodyum deoksikolat; %0,1SDS) 48
5.8.15. Sodyum asetat (CH3COONa.3H2O) tamponu (3 M)……... 48
5.8.16. Tris-HCl tamponu (1 M, pH 8,0)…….. 49
5.8.17. Tris-EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0)……..... 49
5.8.18. 20x Konsantre TBS tamponu……... 49
5.8.19. TBS ve TBS-T tamponu……... 49
5.8.20. Potasyum fosfat (K_2HPO_4) tamponu (50 mM, pH 7,5)…….. 49
5.8.21. Sodyum fosfat tamponu (200 mM, pH 7,0)…….. 49
5.8.22. Z tamponu (100 mM fosfat tamponu, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$)……... 49
5.8.23. Z (+) tamponu…….. 50
5.9. Plazmit Vektörler……. 50
5.10. Virüsler……..... 50
5.11. Bakteriler……. 50
5.12. Maya hücreleri……. 50
5.13. Memeli Hücre Hatları…….. 51
5.14. Transformasyon için *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi…….……. 51
5.15. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez… 52
5.16. RNA Analizleri için Formaldehitli Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez……..…..... 52
5.17. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu……..…….. 52
5.18. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi 53
5.19. Total RNA üzerinden cDNA'ları elde edilmesi……... 53

5.20. Plazmit Vektörlerin Oluşturulması…….. 54
5.20.1. Delesyonlu SNX2 kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması.……..……... 54
5.20.2. GAL4 aktivasyon domaini ile kaynaşmış halde SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteinleri kodlayan maya ekspresyon vektörlerinin oluşturulması……..…….... 57
5.21. Küçük Ölçeklerde Plazmit DNA İzolasyonu……... 59
5.22. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizleri.. 60
5.23. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması……..... 60
5.24. Plazmit DNA'lar Restriksiyon Endonukleaz Enzimi ile Kesilerek Kontrol Edilmesi…….……..... 61
5.25. Bait (Yem) Proteini (İnfuenza PA) Kodlayan Plazmitlerin Maya Hücrelerine Transformasyonu…….……..... 62
5.26. Maya Hücrelerimde PA ve SNX2 Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Araştırılması……..…….. 63
5.27. Memeli Hücrelerinin Plazmit DNA'lar ile Transfeksiyonu……. 63
5.28. Plazmit Vektörlere Klonlanan Genlerin Anlatımlarının Western Melezleme Tekniği ile Analiz Edilmesi……. 64
5.28.1. Poliakrilamid jellerin hazırlanması…….. 64
5.28.2. Proteinlerin nitrosellüloz membranlara transferi…….. 65
5.28.3. Membran üzerinde proteinlerin görüntülenmesi…….. 65
5.29. Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonlarının İmmünfloresan Teknikler ile Belirlenmesi ……... 66
5.30. Konak Proteini (SNX2) ile PA Proteini Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması…….……... 66
5.30.1. İki farklı proteinin hücre içi birlikte-lokalizasyonlarının immünfluoresan teknikler ile analizi……... 67
5.30.2. PLA (Proximity Ligation Assay) testi……. 67
5.30.3. Birlikte immünçöktürme…….. 68
5.31. İnsan SNX2 Proteininin İnfluenza Virüs Replikasyonuna Etkilerinin Araştırılması…….……..... 69
5.31.1. SNX2 proteinlerindeki artışın influenza virüs replikasyonuna

etkilerinin araştırılması……..……..... 69
5.31.2. SNX2 Genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde influenza virüsü replikasyonunu araştırılması……..…..... 70
5.31.3. SNX2 Genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde SNX2 ve viral transkript düzeylerinin saptanması……. 71
5.32. İnsan SNX2 Proteininin İnfluenza RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması……..... 72
6 BULGULAR…….. 74
6.1. İnsan SNX2 Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler……..…….... 74
6.1.1. İnsan SNX2 proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler…….……..... 74
6.1.2. İnsan SNX2 proteini kodlayan maya vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler…….…… 79
6.2. Plazmit Vektörlere Klonlanan SNX2 Genlerinin Memeli Hücrelerinde Ekspresyonu ve Hücre İçi Birlikte-Lokalizasyonları ile İlgili Veriler……...……..... 83
6.2.1. İnsan SNX2 proteinlerinin Western melezleme teknikleriyle analizi sonuçları…….. 83
6.2.2. İnsan SNX2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları ile ilgili sonuçlar……... 84
6.3. Maya İkili-Hibrit Metodu ile Elde Edilen Veriler……..... 86
6.4. Birlikte İmmünçöktürme ile İlgili Veriler……..... 88
6.5. Birlikte Lokalizasyon ile İlgili Veriler……..... 89
6.6. PL Testi ile İlgili Veriler …… 91
6.7. SNX2 Proteininin Viral Replikasyona Etkileri ile İlgili Veriler…….……..... 92
6.7.1. SNX2 ekspresyon düzeyindeki artışın influenza virüs replikasyonuna etkisi ile ilgili veriler…….. 92
6.7.2. SNX2 geninin siRNA transfeksiyonu ile traskript düzeyinin düşürülmesinin influenza virüs replikasyonuna etkisi ile ilgili veriler…….…….. 93

6.8. SNX2 Proteinlerinin İnfluenza A Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkileri ile İlgili Veriler……... 95

7 TARTIŞMA ve SONUÇ……..... 98

8 KAYNAKLAR……... 109

9 EKLER……... 124

10 ÖZGEÇMİŞ……... 126

III. KISALTMALAR

°C	:	Santigrat derece
a/h	:	Ağırlık/hacim
Ade	:	Adenin
APS	:	Amonyum persülfat
BAR	:	İng. Bin/Amphiphysin/Rvs
Bç	:	Baz çifti
BLV	:	Bovine leukaemia virus
CI-M6PR	:	Katyon bağımsız mannoz-6-fosfat reseptörü
D'MEM	:	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	:	Dimetil sülfoksit
dNTP	:	Deoksiribonükleotit trifosfat
DO	:	Drop Out
DSÖ	:	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	:	Etilendiamintetraasetik asit
EtBr	:	Etidyum bromür
FCS	:	Fetal buzağı serumu
FERM	:	İng. protein 4.1/ezrin/radixin/moesin
FITC	:	Floresan izosiyanat
FTS	:	Fizyolojik tuzlu su
GAL4-AD	:	GAL4 aktivasyon bölgesi (domain)
GLUT1	:	Glikoz transport 1
Gr	:	Gram
GST	:	Gulutatyon S Transferaz
g/L	:	Gram/Litre
h/h	:	Hacim/hacim
HA	:	Hemaglutinin
HCMV	:	Human cytomegalovirus
HEK-293	:	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
His	:	Histidin
HPV	:	İnsan papillomavirüsü

HRP	:	Yaban Turpu Peroksidazı
HTLV-1	:	Human T-cell leukemia-lymphoma virus
kDa	:	Kilo dalton
LB	:	Luria bertani
LBA	:	Luria bertani agar
Leu	:	Lösin
LiAc/PEG	:	Lityum asetat/polietilen glikol
M	:	Molar
mg	:	Miligram
ml	:	Mililitre
mM	:	Milimolar
MOPS	:	3- (N-morpholino) propanesulfonik asit
NA	:	Nöraminidaz
OD	:	Optik dansite
ONPG	:	Orto-Nitrofenil β-Galaktozid
PA	:	Polimeraz asidik protein
PAGE	:	Poliakrilamit jel elektroforezi
PEG	:	Polietilen glikol
PEI	:	Polietilenimin
PIPES	:	1,4-piperazindietansülfonik asit
PLA	:	Proximity Ligation Assay
PtdIns	:	FosfatidilİnositoI
PVDF	:	Polivinilidenflorit
PX	:	İng. Phox-homology
PZR	:	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
RIPA	:	*ing*. Radioimmunoprecipitation Assay
RNP	:	Ribonükleoprotein kompleksi
SD	:	Sentetik dekstroz besiyeri
SD+LHA	:	Lösin, histidin, adenin içeren SD besiyeri
SD+HA	:	Histidin, adenin içeren SD besiyeri
SDS	:	Sodyum dodesil sülfat
SNX2	:	*İng*. Sorting Nexin 2

ssDNA	:	Salmon sperm DNA
STLVs	:	Simian T-lymphotropic virüsleri
TAE	:	Tris-asetat-EDTA
TE	:	Tris-EDTA
TEMED	:	Tetrametiletilendiamin
Trp	:	Triptofan
U	:	Ünite
UV	:	Ultraviyole
VACV	:	Vaccinia virüsü
YNB	:	Maya azot kaynağı (yeast nitrogen base)
YPA	:	Maya özütü (yeast extract), pepton, adenin içeren besiyeri
YPAD	:	Maya özütü (yeast extract), pepton, adenin, dekstroz içeren besiyeri
YPD	:	Maya özütü (yeast extract), pepton, dekstroz içeren besiyeri
w/w	:	Ağırlık/ağırlık
3-AT	:	3-amino-1,2,4-triazol
µg	:	Mikrogram
µl	:	Mikrolitre
µM	:	Mikromolar

IV. ŞEKİL VE TABLOLARIN LİSTESİ

i. Şekil Listesi

Şekil 1. David Baltimore'un virüsleri genom yapılarına göre sınıflandırması……... 9

Şekil 2. İnfluenza virüslerinde meydana gelen genetik değişmeler……... 16

Şekil 3. A. İnfluenza A virüsü şematik görünümü, **B.** vRNP'lerin yapısı….. 18

Şekil 4. İnfluenza A virüs moleküler yapısı ve yaşam döngüsü…… 19

Şekil 5. Konak mRNA'ların Cap yapılarının viral RNA polimeraz enzimi tarafından kesilmesi……..... 21

Şekil 6. Memeli Sorting Nexin proteinlerinin domain yapıları…… 27

Şekil 7. Endositik yolak.…… 29

Şekil 8. A. İnsan SNX2 geninin kromozom 5 üzerindeki lokasyonu ve intron-ekzon yapısı. **B**. SNX2 proteinin işlevsel bölgeleri. **NTD**, N-terminal domaini; **PX**, phox homologi domaini; **BAR**, C-terminal BAR bölgesi…… 31

Şekil 9. Delesyonlu *SNX2* genleri üzerinden kodlanan proteinler…… 76

Şekil 10. pCHA-SNX2 plazmit vektörü üzerinden ters PZR ile çoğaltılan delesyonlu *SNX2* genlerinin türetilmesinde kullanılan primerlerin bağlanma noktaları ve yönleri…… 76

Şekil 11. pCHA-SNX2 plazmiti üzerinden ters PZR ile çoğaltılan, *SNX2* geninde belirli ekzon bölgeleri taşımayan DNA fragmentlerinin elektroforez profilleri……. 77

Şekil 12. Tam boyutta insan *SNX2* geni klonlanan pCHA-SNX2 plazmiti ve bu plazmitten türetilen delesyonlu *SNX2* geni taşıyan plazmitlerin restriksiyon haritaları……. 77

Şekil 13. Delesyonlu *SNX2* geni taşıyan pCHA plazmitlerinin koloni-PZR ile seçilmesi……... 78

Şekil 14. Restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi profilleri……. 79

Şekil 15. *SNX2* cDNA'sı taşıyan pCHA plazmit vektörleri üzerinden PZR ile çoğaltılan tam boyutta *SNX2* ve delesyonlu *SNX2* cDNA'ları…….. 79

Şekil 16. pACT2 plazmiti ve *SNX2* genleri klonlanan pACT2 plazmitlerinin restriksiyon haritaları……. 80
Şekil 17. pACT2 plazmitinde maya GAL4-AD geni ile kaynaşmış halde *SNX2* (1-4), *SNX2*dC (5-9), *SNX2*dN (10-14) ve *SNX2*dM (15-19) geni klonlanarak elde edilen rekombinant vektörlerin koloni PZR ile seçilmesi… 81
Şekil 18. DraI restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen plazmit vektörlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri……... 82
Şekil 19. pACT2 maya ikili hibrit plazmitinde GAL4 bağlanma domainini kodlayan dizi ile aynı çerçevede klonlanan *SNX2*, *SNX2*dN ve *SNX2*dC genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları…… 83
Şekil 20. *SNX2* geni taşıyan plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde plazmitler üzerinden kodlanan proteinlerin Western melezleme tekniği ile analizi…… 84
Şekil 21. pCHA-SNX2, pCHA-SNX2dN, pCHA-SNX2dM ve pCHA-SNX2dC plazmit vektörleri ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan HA uzantılı SNX2 proteinlerinin hücre içi loklalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi……... 85
Şekil 22. İnfluenza A virüsü PA proteini ve insan SNX2 proteini kodlayan maya ikili hibrit plazmitleri ile transforme edilen *S. cerevisiae* PJ69-4A hücrelerinin SD (-) seçici besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri……. 87
Şekil 23. Plazmitler üzerinden HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen insan SNX2 proteinleri ve influenza PA proteinleri arasındaki ilişkinin birlikte immünçöktürme testi ile araştırılması…….. 88
Şekil 24. İnfluenza A virüsü PA proteini ve insan SNX2 proteini kodlayan plamzitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA ve SNX2 proteinlerinin lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. 90
Şekil 25. Hela hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden kodlanan influenza PA ve insan SNX2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının PL testi ile incelenmesi…… 91
Şekil 26. Delesyonlu SNX2 proteini kodlayan plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilen ve sonrasında influenza A virüsleri ile enfekte 92

edilen HEK293 hücrelerinde viral NP ve NS1 protein miktarlarının Western melezleme tekniği ile incelenmesi……...
Şekil 27. *SNX2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen ve sonrasında influenza A virüsleri ile enfekte edilen HeLa hücrelerde, enfeksiyondan 6 ve 12 saat sonra PA ve beta aktin proteini miktarlarının Western melezleme tekniği ile analizi…… 93
Şekil 28. *SNX2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen ve sonrasında influenza A virüsleri ile enfekte edilen HeLa hücrelerde, enfeksiyon hücresel SNX2 trasnktipt düzeyi ve enfeksiyondan 12 saat sonra viral transkript düzeylerinin gerçek zamanlı PZR ile analizi……..... 95
Şekil 29. HEK293 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile miktarı arttırılan SNX2 proteini (**A**) ve delesyonlu SNX2 proteinlerinin (**B**) influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri…… 96

ii. Tablo Listesi

Tablo 1. Tez çalışması kapsamında yararlanılan birincil ve ikincil antikorlar…….. 36

Tablo 2. SNX2 ve delesyonlu SNX2 cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında kullanılan plazmit vektörler ve oligonukleotit primerler…. 58

Tablo 3. Tez çalışmaları kapsamındaki plazmitler için kullanılan restriksiyon endonukleaz eznzimleri ve reaksiyon tamponları…….. 61

Tablo 4. SNX2 protein düzeyindeki artışın influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkilerini saptamak için uygulanan minireplikon testinde kullanılan plazmit vektörler ve miktarları (ng/kuyu)…… 72

İnsan SNX2 Proteini ile İnfluenza Virüsü RNA Polimeraz Enzimi Arasındaki İlişkinin Memeli Hücrelerinde Araştırılması

Öğrencinin Adı : Tuğba KOÇMAR

Danışman : Prof. Dr. Kadir TURAN

Anabilim Dalı : Biyokimya (ECZ)

1. ÖZET

Amaç: İnfluenza A virüsleri sekiz adet tek iplikli negatif polarite gösteren RNA molekülünden oluşan genoma sahiptirler. Geniş bir konak yelpazesine sahip olan bu virüslerde replilasyon ve transkripsiyon işlevleri; PB2, PB1 ve PA alt birimlerinden oluşan RNA polimeraz enzimi tarafından gerçekleştirilir. Viral RNA polimeraz enzimi konak hücrede viral patogenezi etkileyen önemli bir faktördür. Bu çalışmada, maya ikili-hibrit metodu kullanılarak viral PA proteini ile ilişkisi gösterilen insan sorting nexin 2 (SNX2) proteinin influenza A virüsü replikasyonuna etkilerinin belirlenmesi amaçlanmıştır.

Gereç ve Yöntem: Çalışmada maya ikili-hibrit testlerinde *Saccharomyces cerevisiae* hücreleri kullanıldı. Memeli hücrelerinde PA ve SNX2 proteinleri arasındaki etkileşimi saptamak için yapılan çalışmalarda HEK293 ve HeLa hücrelerinden yararlanıldı. Enfeksiyon deneylerinde influenza A/WSN/33-H1N1 ve A/duck/Pennsylvania-H5N2 virüs ırkları kullanıldı. Protein etkileşimlerinin saptanmasında, birlikte immünçöktürme ve immünfloresan teknikler uygulandı. Memeli hücrelerinde SNX2 ya da PA protein düzeylerinin geçici olarak arttırılması, bu proteinleri kodlayan plazmitlerin hücrelere transfeksiyonu ile sağlandı. Hücrelerde SNX2 transkript düzeyini düşürmek (knock down) için siRNA teknolojisinden yararlanıldı. SNX2 protein düzeyi değiştirilen hücrelerde virüs replikasyonunun seyri viral proteinlerin analizi ile saptandı. SNX2 proteinin viral RNA polimeraz enzimine etkileri minireplikon modelleri ile araştırıldı.

Sonuç: İmmünçöktürme, immünfloresan boyama ve PL testleri HEK293 ve/veya HeLa hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden kodlanan SNX2 ve PA proteinlerinin etkileşim halinde olduğunu gösterdi. SNX2 proteinine bağlanmada PA proteininin özellikle amino-terminal bölgesinin (PAdC) önemli olduğu saptandı. İnsan SNX2 proteinin influenza A virüsü replikasyonuna negatif yönde etki ettiği, bu etkinin kuş tipi influenza A/duck/Pennsylvania-H5N2 virüslerinde çok daha belirgin olduğu ortaya kondu. Bu veriler PA ve SNX proteinlerinin influenza A virüsü patogenezini etkileyen faktörler arasında olduğu sonucunu verdi.

Anahtar Kelimeler:

SNX2, İnfluenza virüsleri, İnfluenza RNA polimeraz enzimi, PA proteini

Investigation of the Relationship Between Human SNX2 Protein and Influenza Virus RNA Polymerase Enzyme in Mammalian Cells

Student's name : Tuğba KOÇMAR

Supervisor : Prof. Dr. Kadir TURAN

Department : Biochemistry (Pharmacy)

2. SUMMARY

Aim: Influenza A viruses have a genome consisting of eight single-stranded negative sense RNA molecules. Replication and transcription of these viruses having a wide host range are performed by the RNA polymerase enzyme, which composed of PB2, PB1 and PA subunits. The influenza RNA polymerase is one of the important factor affecting the viral pathogenesis in host cell. In this study, it was aimed to determine the effects of human sorting nexin 2 (SNX2) protein, which is shown to be associated with viral PA protein by yeast two-hybrid assay on influenza A virus replication.
Materials ve Methods: Yeast two-hybrid assays were carried out with *Saccharomyces cerevisiae*. HEK293 and HeLa cells were used for revealing the interaction between PA and SNX2 proteins in mammalian cells. Influenza A/WSN/33-H1N1 and A/duck/Pennsylvania-H5N2 virus strains were used to infect the cells. Immunoprecipitation and immunofluorescence techniques were applied for detection of protein interactions. Transient increase of SNX2 and/or PA protein levels in the mammalian cells was achieved by transfection of the plasmid DNAs encoding the proteins. siRNA interference technology was applied for knock down of SNX2 transcript in the cells. The course of virus replication in the cells, over-expressing of SNX2 protein or down regulated with gene specific siRNA was determined by analysis of the viral proteins. Effects of SNX2 protein on viral RNA polymerase were investigated with minireplicon models.
Results: Immunoprecipitation, immunofluorescence staining and PL assay showed that the SNX2 and PA proteins encoded from plasmid DNAs have interaction in HEK293 and HeLa cells. The amino-terminal region of the viral PA protein (PAdC) was found to be particularly important for binding to human SNX2. The results showed that human SNX2 protein had a negative regulatory effect on influenza A virus replication and this effect was much more pronounced for avian influenza A/DkPen viruses. It was concluded that PA and SNX proteins are important factors that determine the pathogenesis of influenza A viruses in mammalian cells.

Keywords:

SNX2, Influenza viruses, Influenza virus RNA polymerase, PA protein

3. GİRİŞ VE AMAÇ

İnfluenza virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan ortalama 80-120 nm çapında, pleomorfik yapıya sahip, membranlı virüslerdir (Palese ve Schulman, 1976). Bu virüsler tek iplikli, negatif polarite gösteren 7 ya da 8 RNA moleküllerinden oluşan parçalı bir genom taşırlar (Bouvier ve Palese, 2008). Özellikle influenza A virüsleri, replikasyon sırasında meydana gelen mutasyonlar ve parçalı genom yapısının bir sonucu olarak farklı tipte virüs genomlarının karışması (*İng. reassortment*) nedeniyle genetik özelliklerini değiştirir ve yeni virüs tipleri ortaya çıkar. Bu da influenza A virüslerinde büyük bir varyasyona neden olur. İnfluenza A virüslerinde görülen varyasyon bu virüslerin konak yelpazesini de genişletmektedir. Dolayısıyla, influenza A virüsleri başta kuş türleri olmak üzere, insanlar ve fok, balina, domuz, at, köpek, kedi, yarasa gibi memeli hücrelerinde çoğalabilmekte ve enfeksiyon yapabilmektedir.

İnfluenza A virüslerinin genetik yapılarında meydana gelen değişiklikler, insanlarda sürekli tekrarlayan gribal enfeksiyonların temel nedenini oluşturmaktadır. İnfluenza virüsüne ait RNA bağımlı-RNA polimeraz enziminin diğer birçok viral RNA polimerazlarda olduğu gibi hata yapma frekansı oldukça yüksektir (Couch, 1996). Buna karşın bu enzimlerin replikasyon sırasında meydana gelen hatalarını düzeltme yetenekleri yoktur. Dolayısıyla virüsün her replikasyonunda virüs genomunda nokta mutasyonlar oluşur. Viral RNA segmentlerinde oluşan nokta mutasyonlarının birikmesi sonucunda, özellikle virüsün yüzey antijenleri hemaglutinin (HA) ve nöraminidaz (NA) enziminin değişikliğe uğraması antijenik sapma (antigenic drift) olarak adlandırılır (Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza A virüslerinde varyasyona neden olan ikinci olay virüslerinin parçalı genom yapılarından kaynaklanan genetik karışmalarıdır. Antijenik kayma (shift) olarak tanımlanan bu olaylar virüs genotipinde büyük değişmelere yol açar. Bir konak aynı anda iki farklı influenza A virüsü alt tipi ile enfekte olabilir. Hücrede her iki virüse ait genom segmentlerinin aynı anda çoğalması ve kurulma sırasında bu segmentlerin gelişigüzel bir araya gelerek yeni virüs partikülü halinde paketlenmesi kaçınılmazdır. Genetik karışma ile oluşan yeni virüs tiplerinin pandemilere yol açma olasılığı yüksektir. Antijenik kaymalar sadece tip A virüslerinde gözlenmiştir (Nakajima, 2003). İnflunza A virüslerinde görülen

antijenik drift ve antijenik shift sonucunda özellikle HA ve NA proteinlerinde meydana gelen değişmeler, önceden kazanılmış bağışıklığın etkisiz kalmasına neden olmakta, virüsün yeniden enfeksiyon yapabilmesine olanak tanımaktadır. Bu durum influenza A virüslerinin pandemilere neden olmasını kolaylaştırmaktadır (Lagace-Wiens ve ark., 2010).

İnfluenza A virüsleri tarihi kayıtlara geçmiş büyük salgınlara neden olmuştur. Grip salgınları ile ilgili ilk kayıtlar M.Ö. 412 yılına kadar uzanmaktadır (Kuszewski ve Brydak, 2000; Potter, 2001). Bununla birlikte, kayıtlara geçen en büyük salgın, İspanyol gribi olarak bilinen 1918-1919 yılı influenza A virüsü pandemisidir. Farklı kaynaklara göre bu salgında 20-50 milyon arasında değişen sayıda insanın öldüğü bildirilmektedir (Couch, 1996; Taubenberger, 2005). Bu pandemiye yol açan virüsün influenza A/H1N1 tipi olduğu bilinmektedir (Trilla ve ark., 2008). İnfluenza A virüsleri geçen yüzyılda İspanyol gribi dışında, 1957–1958 yıllarında Asya gribi (H2N2) ve 1968-1970'te Hong Kong gribi (H3N2) olarak adlandırılan önemli salgınlara neden olmuştur (Hsieh ve ark., 2006). Yakın tarihimizde ise influenza A virüsü H1N1 suşunun yeni bir tipi 2009 yılında domuz gribi olarak tanımlanan ve yaklaşık 20 ay süren yeni bir salgına neden olmuştur. (http://edition.cnn.com/2009/HEALTH/06/11/swine.flu.who/index.html?iref=nextin – Erişim tarihi: 20.05.2020) Bu salgında Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ)'ne bildirilen onaylanmış ölümlerin sayısı 18.449'dur (https://www.who.int/csr/don/2010_08_06/en/ - Erişim Tarihi: 8.04.2020) Buna karşın 2009 domuz gribi salgınına bağlı ölümlerin 150.000 ile 575.000 arasında olduğu tahmin edilmektedir. Bununla birlikte, yapılan değerlendirmeler, bu vaka sayılarının mevsimsel influenza A virüsü salgınlarında görülen vaka sayısından çok yüksek olmadığını göstermiştir (https://www.webmd.com/cold-ve-flu/news/20100907/h1n1-swine-flu-no-worse-than-seasonal-flu - Erişim Tarihi: 13.03.2020).

Tarihsel gelişmelere bakıldığında, influenza A virüslerinin her zaman büyük pandemilere yol açma olasılığının yüksek olduğu anlaşılmaktadır. Viral pandemiler influenza A virüsleri ile sınırlı kalmamaktadır. Yaşadığımız zaman dilimi içerisinde 2019 yılı Aralık ayında Çin'in Hubei eyaletine bağlı Wuhan şehrinde ortaya çıkan *Coronoviridae* ailesi içerinde yer alan ve RNA genomu taşıyan SARS CoV2 virüsü, insandan insana çok kolay bir şekilde bulaşabilir şekilde mutasyon geçirmiştir ve

yüksek oranlarda ölümler ile seyreden büyük bir pandemiye neden olmuştur ve 2020 yılı Haziran ayı itibiariyle etkisini halen sürdürmektedir (Porcheddu ve ark., 2020; Rubino ve ark., 2020). DSÖ'nün son verilerine göre dünyada SARS CoV2 virüsünün neden olduğu COVID-19 vaka sayısı 5 milyon 705 bin, ölen insan sayısı ise 358 bindir (https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019 - Erişim Tarihi: 29.05.2020). Dünya ekonomisinde neden olduğu trilyonlarca dolarlık maliyetin tam olarak ne kadar olduğu henüz bilinmemektedir.

İnfluenza A virüsü genetiğinde meydana gelen değişmeler sadece konak bağışıklık sisteminden kaçışı sağlamamakta, aynı zamanda kullanımda olan antiviral ilaçların da etkisini azaltmaktadır. Bu nedenle influenza A virüslerine karşı kullanılan ilk anti-influenza ilaç olma özelliği taşıyan adamantan türevleri (amantadin ve rimantadin) günümüzde neredeyse hiç kullanılmamaktadır (Deryabin ve ark., 2019). İnfluenza A virüsü membran proteinlerinden M2 kanal proteinini bloke eden ve profilaktik olarak kullanılan bu ilaçlar, bu proteinde meydana gelen mutasyonlar sonucunda dolaşımda bulunan çoğu virüslere karşı antiviral özelliklerini büyük ölçüde yitirmişlerdir (Ma ve ark., 2016; Wang ve ark., 2013). Benzer bir durum, yeni nesil NA inhibitörü anti-influenza ilaçları için de söz konusudur. NA proteinleri influenza virüslerinin önemli yüzey antijen proteinlerinden biridir. Bu protein, enfekte hücrelerden yeni oluşan virüslerin serbest kalmasında kritik öneme sahip sialisaz aktivitesine sahiptir. NA enziminin bu aktivitesi sayesinde sialik asit bakiyelerine bağlı olarak hücre yüzeyinde tutunmuş olan virüsler serbest kalmaktadır. NA proteininin sialidaz aktivitesinin inhibe edilmesi viral replikasyonun inhibisyonu ile sonuçlanır. Şu anda dünya genelinde kullanımda olan dört farklı NA inhibitörü bulunmaktadır. Bunlar zanamivir, oseltamivir, peramivir ve laninamivirdir. İnfluenza virüslerinin NA enzimini hedef alan bu ilaçlar sialik asit (N-acetylneuraminic acid, Neu5Ac) analoglarıdır. Yapılan araştırmalar, bu antiviral ilaçlara karşı dirençli yeni infuenza A virüsü tiplerinin yaygınlaştığını ortaya koymaktadır (Quosdorf ve ark., 2017; Smith ve ark., 2001; Vavricka ve ark., 2017). Bu nedenle influenza A virüslerinin yol açtığı enfeksiyonlar ile baş etmek için yeni aşıların ve antiviral ilaçların geliştirilmesi ve bunların sürekli güncellenmesi gerekmektedir. Bu bağlamda influenza A virüsü ile konak hücre arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde iyi bilinmesi, antiviral ajanlar için hedef

olabilecek konak ve/veya viral proteinlerin ya da viral replikasyon ile ilişkili metabolik olayların saptanması büyük bir önem taşımaktadır.

Son yıllarda influenza virüsü PA proteininin virüs patojenitesindeki rolünü saptamaya yönelik çalışmalarda önemli bir artış görülmektedir (Suzuki ve ark., 2011). Bu çalışmalarda PA proteinlerinin birden fazla işleve sahip olduğu anlaşılmıştır (Song ve ark., 2011; Suzuki ve ark., 2011). Bu bağlamda farklı bir proje kapsamında (TÜBİTAK / Proje no: 112S518) maya ikili-hibrid metoduyla yapılan tarama çalışması sonucunda; influenza A virüsü PA proteini yem (bait) olarak kullanarak maya *(Saccharomyces cerevisiae)* hücrelerinde, bu protein ile ilişkili olan çok sayıda insan proteini saptanmıştır. Bu proteinlerden biri olan insan sorting nexin 2 (SNX2) proteini ve bu proteinin memeli hücrelerinde influenza virüsü replikasyonundaki rolü bu tez çalışmasının konusunu oluşturmaktadır.

Sorting nexin proteinleri yapısal olarak iyi korunmuş proteinlerdir (Carlton ve ark., 2005b). Bu proteinler çeşitli sitoplazmik gruplar ve hücre membran proteinleri ile ilişkili geniş bir aile oluştururlar. SNX2 proteinleri, transmembran proteinlerinin yenilenmesinde, proteinlerin hücre içerisinde taşınmasında, endositozu da içeren çeşitli hücresel olaylarda, rol oynarlar (Kanzawa ve ark., 2014). Bu çalışmaya konu olan SNX2 proteini, trans-golgi ağında görev alan proteinlerinden biridir. Endozomal sistem, hücre içerisinde bulunan bir molekülün uygun alt hücresel hedeflere iletilmesini sağlayan bir membran ağı olarak görev alır. Hücre yüzeyinden alınan moleküller başlangıçta erken endositik yolak, sismik, tubüller ve veziküler bölge olarak sınıflandırılır ve hedef organele gönderilir. Bu endozomal sınıflandırmada SNX2 protein ailesi görev alır. SNX2 proteininin daha çok erken endositik yolakta lokalize olduğu, hücre tubül yapısı üzerinde konumlandığı ve fosfotidilinositol 3-monofosfat ve fosfotidilinositol 3,5-bifosfat molekülleri ile ilişkili olduğu ve bu iki molekülün yoğun olduğu bölgelerde bulunduğu bilinmektedir (Carlton ve ark., 2005b; Gullapalli ve ark., 2004).

İnsan SNX2 geni üzerinden kodlanan proteinin maya hücrelerine influenza A virüsü PA proteini ile ilişkisi saptanmış olmakla birlikte, influenza A virüsü replikasyonu için önemli olup olmadığı bilinmemektedir. Bu tez çalışmasında insan SNX2 proteininin

memeli hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile ilişkisi belirlenmesi ve bu proteinin viral replikasyona etkilerinin saptanması amaçlanmıştır.

4. GENEL BİLGİLER

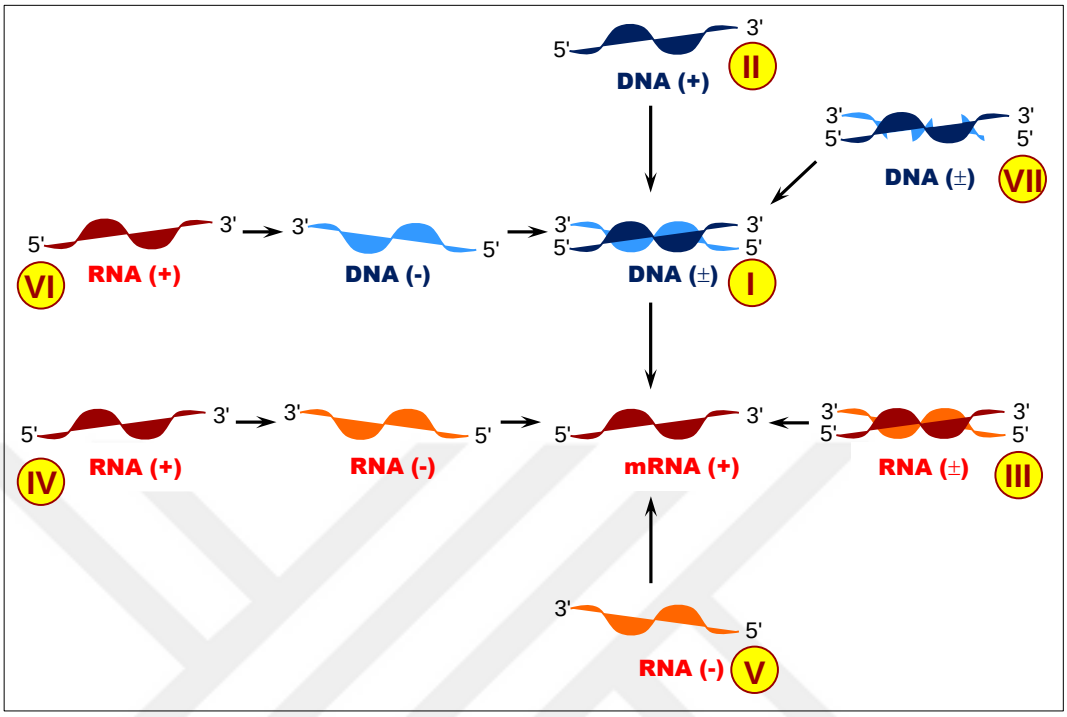
4.1. Virüslerin Genel Özellikleri ve Sınıflandırılması

Virüsler çoğalabilmek için metabolik olarak aktif ökaryotik ya da prokaryotik özellikler gösteren hücrelere gereksinim duyarlar. Yapılarındaki moleküllerin sentezi için gerekli mekanizmalara sahip olmayan virüsler, replikasyon, transkripsiyon ve translasyon gibi karmaşık metabolik reaksiyonları gerçekleştirmek için gerekli mekanizmalara sahip olmadıklarından ancak canlı konak hücrelerde çoğalabilirler. Virüsler, yaşam döngülerini tamamlamak için hayvanlar, bitkiler, bakteriler ve arkealar dahil olmak üzere tüm canlı formları enfekte edebilirler ve konak olarak kullanabilirler.

Konak hücre dışında herhangi bir canlılık belirtisi taşımayan virüsler, yapısal olarak büyük bir çeşitlilik gösterirler. Bir virüs partikülü, kapsid adı verilen koruyucu bir protein kılıf içinde bulunan DNA veya RNA moleküllerinden oluşurlar. İnfluenza virüslerinde olduğu gibi bir kısım virüslerde nükleik asit ve proteinlerin oluşturduğu partiküller, konak hücrelerden aldıkları bir membran ile çevrelenmiş haldedir. Bazı virüsler ise membran taşımaz, daha basit yapıda protein nükleik asit kompleksileri şeklindedir. Basit yapılı olmalarına karşın, prokaryotik ve ökaryotik organizmaların aksine, virüsler genom yapıları bakımından büyük bir çeşitlilik gösterirler. Viral nükleik asitleri çift/tek zincirli, halkasal/doğrusal, DNA/RNA şeklinde olabilirler. Viroloji alanında öncü isimlerden olan Nobel ödüllü David Baltimore, virüsleri genom yapılarına göre 6 ana kategoride sınıflandırmıştır, fakat daha sonra *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan virüslerde olduğu gibi kısmi çift iplikli DNA genomu taşıyan virüsler de eklenerek virüsler 7 farklı sınıf altında toplanmıştır (Cann, 2005) (Şekil.1). Bu sınıflandırma da virüslerin morfolojik özellikleri değerlendirilmemiştir.

1.Grup virüsler: Çift zincirli DNA genomu taşıyan virüsler bu grup içerisinde toplanmıştır. Bu virüslerin büyük bir çoğunluğuda, replikasyon için viral genomun konak hücre nukleusuna taşınması zorunludur ve büyük ölçüde konak hücre polimeraz enzimlerine ve diğer protein faktörlere gereksinim duyarlar. Hücre nuklesuna gereksinim duymayan ve sitoplazmasında çoğalan, omurgalılar için yüksek patojeniteye sahip olan çiçek virüsünün de yer alığı *Poxvirus* ailesidir. *Herpesviridae,*

Adenoviridae ve *Papovaviridae* aileleri içerinde yer alan virüsler bu grup içerinde yer almaktadır.



Şekil 1. David Baltimore'un virüsleri genom yapılarına göre sınıflandırması. I. Çift iplikli DNA virüsleri; II. Tek iplikli DNA virüsleri; III. Çift iplikli RNA virüsleri; IV. + iplikli RNA virüsleri; V. – iplikli RNA virüsleri; VI. DNA aracılı RNA virüsleri; VII. Kısmi çift iplikli DNA virüsleri

2.Grup virüsler:

Tek iplikli DNA virüsleri bu grup içerinde sınıflandırılmıştır. Birçok hayvansal, bitkisel ve bakteri virüsleri bu sınıf içerinde yer almaktadır. Omurgalılarda enfeksiyon yapan *Anelloviridae, Circoviridae* ve *Parvoviridae* ailelerinde yer alan virüsler; bitkilerde enfeksiyon yapan *Geminiviridae* ve *Nanoviridae* ailelerinde yer alan virüsler ve prokaryotik hücrelerde enfeksiyon yapan *Microviridae* ailesi virüsleri tek iplikli DNA genomu taşıyan virüslerdir. Bu virüslerin sahip oldukları tek iplikli DNA genomu çoğunlukla halkasal formdadır.

3.Grup virüsler:

Çift iplikli RNA genomu taşıyan virüsler bu grup içerisinde sınıflandırılmıştır. RNA genomu taşımaları nedeniyle, replikasyon için kendi RNA polimeraz enzimine sahip

olma zorunlulukları vardır. Hücre sitoplazması içerinde replike olduklarından DNA virüslerinde olduğu gibi konak replikasyon enzimlerine gereksinim duymazlar. *Reoviridae* ve *Birnaviridae* ailesinde yer alan virüsler bu grup içerisinde yer almaktadırlar.

4.Grup virüsler:

Tek iplikli pozitif polarite gösteren RNA genomu taşıyan virüsler bu grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Pozitif polarite gösteren RNA genomları konak organizma translasyon mekanizması tarafından doğrudan şablon olarak kullanılabilmekte ve replikasyon olmaksızın viral proteinler sentez edilebilmektedir. Bu grup içerinde yer alan virüsler konak hücre sitoplazmasında replike olmaktadırlar. Pozitif polarite gösteren RNA genomu taşıyan virüslerin bir kısmında, RNA genom üzerinden poliprotein sentez edilmekte bu protein daha proteolitik kesimler sonucunda fonksiyonel viral proteinler ortaya çıkmaktadır. Diğer bir kısım virüs genomları üzerinden ise poliproteinler ile birlikte genler üzerinden bağımsız proteinlerde sentez edilmektedir. Covid-19 etkeni SARS CoV2 virüsü de tek iplikli pozitif polarite gösteren RNA genomu taşımaktadır. Bu sınıfın içerisinde yer alan virüsler arasında *Astroviridae, Caliciviridae, Coronaviridae, Flaviviridae, Picornaviridae, Arteriviridae* ve *Togaviridae* aileleri sayılabilir.

5.Grup virüsler:

Tek iplikli negatif polarite gösteren RNA genomu taşıyan virüsler bu grup içerisinde sınıflandırılmıştır. Bu grup içerisinde yer alan virüslerin bir kısmı tek parçalı genom taşırken, bazıları parçalı genom yapısına sahiptirler. Bu tez çalışmasına konu olan influenza A virüsleri 8 adet tek iplikli negatif polarite gösteren genoma sahiptir ve bu grup içerisinde yer alırlar. Negatif polariteye sahip olan viral RNA genomları konak hücrelerde doğrudan translasyon için şablon olarak kullanılamazlar. Viral RNA bağımlı RNA polimeraz enzimleri ile viral RNA'lar üzerinde mRNA'lar sentez edilir. Tek iplikli negatif polarite gösteren genoma sahip virüslerin önemli bir bölümü hücre sitoplazmasında replike olur. Buna karşın parçalı genom yapısına sahip olan influenza virüsleri replikasyon ve transkripsiyon için konak RNA polimeraz II enzimine bağımlıdırlar. Bu nedenle viral genomların hücre nuklesuna taşınması zorunludur.

Arenaviridae, *Orthomyxoviridae*, *Paramyxoviridae*, *Filoviridae* ve *Rhabdoviridae* virüs aileler bu grup içerinde yer almaktadırlar.

6.Grup virüsler:

Tek iplikli pozitif polarite gösteren RNA genomu taşıyan virüslerdir. Dördüncü grupta yer alan RNA virüslerinden replikasyon stratejileri bakımından farklılık gösterirler. Bu grup içerisinde en iyi çalışılan virüs ailesi, AIDS etkeni olan HIV virüslerinin de yer aldığı retrovirüslerdir. Bu virüslerin ayırt edici en temel özellikleri pozitif polarite gösteren RNA genomlarını komplementer DNA'ya dönüştürecek ters transkriptaz enzimi taşımalarıdır. Viral RNA genomu çift zincirli DNA molekülüne dönüştürüldükten sonra konak hücre genomuna entegre olur ve replikasyon ve transkripsiyon olayları konak hücrenin RNA polimeraz enzimleri tarafından gerçekleştirilir.

7.Grup virüsler:

Bölgesel çift zincirli DNA genomuna sahip, replikasyonları ara şablon olarak işlev gören tek zincirli RNA molekülleri üzerinden gerçekleştiren virüs grubudur. Hepatit B virüsünü de kapsayan *Hepadnaviridae* ailesi bu grup içerisinde yer almaktadır. Konak hücrelerde kısmı çift zincirli DNA genomundaki boşluklar polimeraz enzimleri ile doldurularak çift zincirli kapalı halkasal forma dönüştürülür. Bu halkasal molekül üzerinden viral mRNA'lar ve viral DNA'nın sentezinde şablon görevi görecek pregenomik RNA sentezlenir. Bu RNA molekülü üzerinden de ters trankripsiyon ile viral DNA genomu sentezi gerçekleşir. *Hepadnaviridae* ailesinde yer alan virüsler replikasyon döngüleri sırasında konak genomuna entegrasyon aşamasını kaybetmiş ve virion içerisinde RNA yerine DNA'yı genomu şeklinde paketlenmiş virüsler olarak düşünülmektedir (Krupovic ve ark., 2018).

Baltimore sınıflandırmasında virüslerin genom yapıları ölçüt olarak alınmıştır, bu nedenle virüslerin morfolojileri hakkında bir fikir vermez. Virüsler morfolojik özelliklerine göre de sınıflandırılabilmektedir. Daha önce de değinildiği gibi influenza virüslerini de kapsayan bazı virüsler konak hücre membranından kaynaklanan, fakat viral replikasyon sırasında modifikasyona uğrayan bir membran yapısı taşır. Membran yapısı, virüsün konak immün sisteminden korunmasına yardımcı olmakla birlikte,

membran üzerinde bulunan proteinler aracılığıyla konak hücrelerde bulunan kendilerine özgü reseptör moleküllere bağlanarak konak hücrelere girişlerine de imkân sağlarlar.

4.2. İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri, *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde konumlandırılan, ortalama 80-120 nm çapında pleomorfik morfolojiye sahip membranlı virüslerdir. *Orthomyxoviridae* ailesi influenza A, influenza B, influenza C, influenza D, Isavirus, Thogotovirus ve Quaranjavirus olmak üzere 7 farklı virüs cinsini kapsamaktadır (Mourya ve ark., 2019). Isavirus'ler somon balıklarında enfeksiyon yaparlar (Kibenge ve ark., 2007). Thogotovirus'ler ise bazı omurgalıları, keneler ve sivrisinekler gibi omurgasızları enfekte eden virüslerdir (Jones ve Nuttall, 1989; Raynard ve ark., 2001; Zeng ve ark., 2013). *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde yer alan influenza A virüsleri başta kanatlılar olmak üzere birçok memeli türünde enfeksiyona neden olan en önemli virüs grubudur. İnfluenza B virüslerinin sadece insanlarda ve foklarda enfeksiyon yaptığı bilinmektedir (Osterhaus ve ark., 2000). İnfluenza C virüsleri insanlar ve domuzlarda enfeksiyon yaparken (Guo ve ark., 1983), influenza D virüsü insan, domuz, at, deve ve sığırlarda enfeksiyon yapabilmektedir. İnfluenza A ve B virüsleri sekiz adet RNA molekülünden oluşan parçalı bir genom yapısına sahiptirler. İnfluenza C ve D virüs genomları ise yedi parça RNA molekülünden oluşur.

İnfluenza virüsleri taşıdıkları nükleoprotein (NP) ve matriks (M1) proteininin antijenik özelliklerine göre gruplandırılmıştır (Couch, 1996). Bu proteinlerin antijenik özellikleri dikkate alınarak yapılan değerlendirmede influenza virüsleri A, B, C ve D olmak üzere dört ana grup altında sınıflandırılırlar. İnfluenza A virüsü ilk defa 1933 yılında Smith ve arkadaşları tarafından izole edilmiştir (Juozapaitis ve Antoniukas, 2007). Daha sonra 1939 yılında Francis ve arkadaşları antijenik olarak influenza A'dan farklı özellik taşıyan influenza B virüsünü tanımlamışlardır (Francis, 1940). İnfluenza C tipi virüsler ise 1956 yılında Taylor ve arkadaşları tarafından tanımlanmıştır (Lobodzinska, 1972). Antijenik özellikleri bakımından farklılık gösteren bu dört influenza virüsü grubu içerisinde insan sağlığı açısından büyük risk taşıyanları bu çalışmaya konu olan influenza A virüsleridir. İnfluenza virüslerinin konak özgüllüğü virüsün alt tipine göre değişiklik göstermektedir (Abdelwhab ve Hafez, 2011).

Doğal ortamlardan izole edilen influenza virüslere belirli kurallar çerçevesinde farklı isimler verilir. NP ve M1 proteinlerinin antijenik özellikleri virüs ana grubunu (influenza A, B, C veya D tipini) ortaya koyar. Virüs tipine sırasıyla izole edildiği konak türü, (belirtilmezse, izolat insan olarak kabul edilir), virüsün bulunduğu coğrafi konumu belirten bir isim, izolat sayısı ve izolasyon yılı eklenir. İnfluenza A virüsleri yüzey antijenleri bakımından büyük bir çeşitlilik gösterdiklerinden, isimlendirmelerde HA ve NA alt tipi genellikle viral izolat adından sonra belirtilir (Gavin ve ark., 2017). Örneğin, influenza A/Turkey/Ontario/6118/1968 (H8N4) virüsü, 1968'de Ontario'daki bir hindiden izole edilen, 6118 numaralı izolata verilen isimdir; virüs izolatı HA antijenik alt tip 8 (H8) ve NA antijenik alt tip 4 (N4)'e sahiptir.

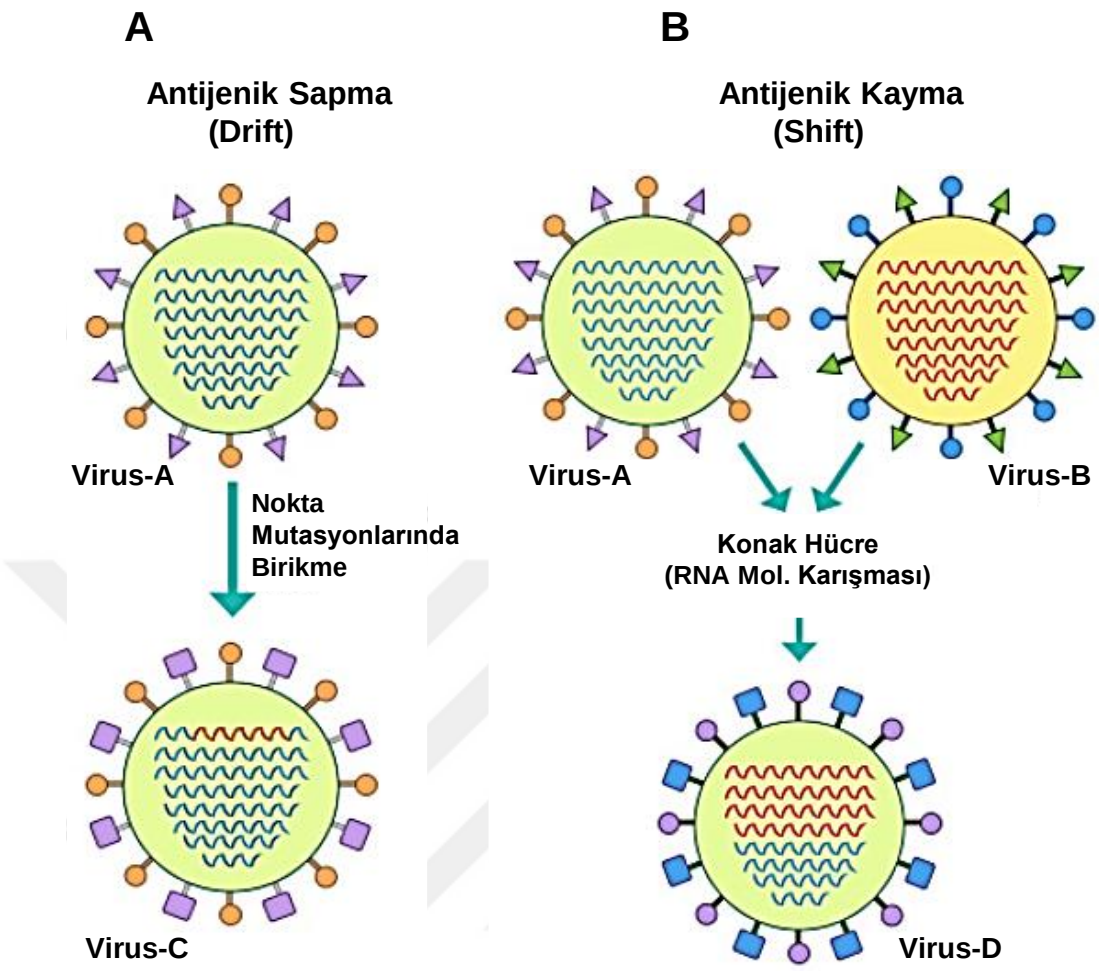
İnfluenza A virüsleri, boyutları 890-2341 nükleotit arasında değişen sekiz adet tek iplikli RNA segmentinden (viral RNA: vRNA) meydana gelen bir genoma sahiptirler. Her bir RNA segmenti üzerinde en az bir protein kodlanmaktadır. Virüs tipine bağlı olarak, influenza A virüsü genomu tarafından 10-15 farklı protein kodlanmaktadır (Shafiuddin ve Boon, 2019). İnfluenza A virüslerinin membranında viral genom üzerinde kodlanan üç farklı protein yer alır. Viral membran üzerinde miktar olarak en fazla bulunan, HA proteinidir (Leser ve Lamb, 2005). Miktar olarak ikinci sırada NA proteinleri bulunmaktadır (McAuley ve ark., 2019). Virüs membranında yer alan M2 kanal proteinleri, miktar olarak HA ve NA proteinlerine göre çok düşük düzeydedirler (de Vries ve ark., 2018; Leser ve Lamb, 2005). HA ve NA proteinleri influenza A virüslerinin antijenik özelliklerini belirleyen glikoproteinlerdir. İnfluenza A virüsleri HA ve NA proteinlerinin antijenik özelliklerine göre çok sayıda alt gruba ayrılırlar. Bugüne kadar influenza A virüslerinde immünolojik olarak farklılık gösteren 18 HA (H1-H18) ve 11 NA (N1-N11) proteini tanımlanmıştır (Kawaoka ve Neumann, 2012). Bu proteinler virüs partiküllerinde farklı kombinasyonlarda yer alabilmektedirler. Dolayısıyla farklı HA ve NA proteinlerinin bir araya gelmesi ile çok sayıda farklı influenza tipinin ortaya çıkması mümkündür. İnfluenza A virüsü alt tipleri (H1–16 ve N1–9) sucul kuş türlerinde tespit edilen virüslerdir. H17N10 ve H18N11 adı verilen alt tipler ise 2010 yılında yarasalardan izole edilmiştir (Yoon ve ark., 2014). İnsanlarda dolaşım gösteren influenza A virüsü tipleri H1N1, H2N2 ve H3N2 alt tipleridir (Hay ve ark., 2001). Bununla birlikte zaman zaman özellikle kuşlardan

geçişler ile farklı influenza A virüsü tipleri de insanlarda enfeksiyon yapabilmektedir (de Vries ve ark., 2018).

Konak hücre zarlarında bulunan glikoproteinlere bağlı sialik asit bakiyeleri influenza virüslerinin konak özgüllüğünü belirleyen etkenlerin başında gelmektedir. İnsanlarda enfeksiyon yapan influenza A virüsleri (örn. H1N1) daha çok galaktoz şekerine α-2,6 bağı ile bağlı sialik asit bakiyeleri (SAα2,6Gal) taşıyan glikoproteinleri reseptör olarak tercih eder. Virüslerin tutunmasında reseptör görevi gören bu proteinler insan solunum yolu epitel hücrelerinde yaygın olarak bulunur. Buna karşın kuş tipi influenza A virüsleri (örn. H5N1) galaktoz ile α-2,3 glikozid bağı ile bağlı sialik asit bakiyelerini (SAα2,3Gal) hücrelere tutunmak için tercih ederler. Bu tip glikoprotein reseptörler kanatlıların bağırsak hücrelerinde yaygın olarak bulunur. Dolayısıyla bağırsak epitel hücreleri bu virüsler için uygun hedeflerdir. Domuzlarda solunum yolu epitel hücrelerinde ise, hem SAα2,6Gal hem de SAα2,3Gal molekülleri bulunmaktadır (Ma ve ark., 2008). Bu nedenle domuz hücre reseptörleri, hem insan hem de kuş tipi virüslerin tutunmasına olanak tanır ve aynı hücreyi enfekte eden farklı influenza alt tiplerine ait RNA segmentlerinin karışmasına olanak sağlar (Ma ve ark., 2008; Sullivan ve ark., 2010; Tscherne ve Garcia-Sastre, 2011).

Genel olarak kanatlılarda enfeksiyon yapan influenza A virüsleri memeli hücrelerinde daha düşük hızlarda çoğalır. Bununla birlikte viral genlerde meydana gelen mutasyonlar virüsün memelilerde enfeksiyon yapacak şekilde farklılaşmasına neden olabilir. Bu şekilde kuşlardan insanlara bulaşan İnfluenza A virüsleri, insan bağışıklık sistemi için yeni olacağından çok daha büyük riskler taşımaktadır (de Vries ve ark., 2018). İnfluenza A virüsleri insanlarda sıklıkla tekrarlayan enfeksiyonlara yol açarlar. Bunun en önemli nedeni influenza A virüslerinin genetik yapılarında meydana gelen değişmelerdir. RNA genomu taşıyan influenza A virüslerinde mutasyon frekansı çok yüksektir ve çok parçalı genom yapıları nedeniyle farklı virüs tipine ait RNA segmentlerinin karışması ve farklı kombinasyonlarda yeniden bir araya gelmesi (*İng. reassortment*) sıklıkla karşılaşılan bir durumdur. Virüs genlerinde meydana gelen mutasyonlar, konak bağışıklık sisteminin en önemli hedefi olan HA ve NA yüzey antijenlerinin yapısal özelliklerini değiştirmektedir. Bu değişiklikler daha önce virüse karşı kazanılmış bağışıklığın etkisini azaltmakta ve tekrarlayan enfeksiyonlara neden olabilmektedir (Bouvier ve Palese, 2008). İnfluenza A virüslerinin genetik yapıları

temelde iki farklı şekilde değişikliğe uğramaktadır. Bunun birinci nedeni; hücrelerde viral RNA bağımlı RNA polimeraz enzimi katalizörlüğünde hızlı bir şekilde replike olan virüs genlerinde meydana gelen nokta mutasyonlarıdır. İnfluenza virüsleri tek iplikli RNA genomu taşıdıklarından, viral mRNA'ları ve yeni viral RNA'ları sentez edebilmek için kendi RNA polimeraz enzimlerini yapılarında taşırlar. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi üç farklı alt üniteden (PB2, PB1 ve PA) oluşur ve diğer birçok viral RNA polimeraz enzimleri gibi RNA sentezinde hata yapma frekansları yüksektir (Couch, 1996). Buna karşın viral RNA polimeraz enzimlerinin replikasyon sırasında ortaya çıkan hatalarını düzeltme yetenekleri yoktur. Buna bağlı olarak özellikle RNA virüslerinin replikasyonu sırasında viral genlerde çok sayıda nokta mutasyonu meydana gelir. Viral genlerde meydana gelen bu nokta mutasyonları özellikle konak immün sisteminin tanıması açısından önemli olan HA ve NA yüzey antijenik proteinlerinin amino asit kompozisyonunda değişmelere neden olurlar (Bouvier ve Palese, 2008). Virüs genlerindeki bu değişmeler antijenik sapma olarak isimlendirilir (Schild, 1979) (Şekil 2A). Viral antijenlerinde ortaya çıkan bu değişmeler, konağın bağışıklık sistemi tarafından virüslerin daha geç algılanmasına yol açar. Antijenik drift, sadece İnfluenza A virüslerinde değil B ve C tipi virüslerde de görülebilir. İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarının tekrarlamasının temel nedenlerinden biri antijenik sapmalardır. İnfluenza A virüslerinde görülen antijenik değişimin ikinci önemli nedeni, çok parçalı RNA genomu taşımaları nedeniyle, farklı virüs tiplerine ait RNA segmentlerin farklı kombinasyonlarda bir araya gelebilmesidir. Bu durum antijenik kayma olarak tanımlanmakta ve virüs genom yapısında daha büyük değişmelere neden olmaktadır (Şekil 2B). Yukarıda da belirtildiği gibi influenza A virüsleri negatif polarite gösteren sekiz parçalı RNA moleküllerinden oluşan bir genoma sahiptirler (Bouvier ve Palese, 2008). Bazen bir konak organizma aynı anda farklı İnfluenza A virüsü alt tipileri ile enfekte olabilmektedir. Bu gibi durumlarda konak hücrelerde farklı virüs tiplerine ait RNA segmentleri oluşmakta ve hücrelerde virüs kurulumu esnasında viral RNA segmentleri gelişi güzel bir araya gelerek genetik yapısı farklı yeni virüs partikülleri halinde paketlenebilmektedir. Viral RNA segmentlerinin karışması sonucunda genetik özellikleri tamamen farklı virüs tipleri oluşmaktadır (Gething ve ark., 1980; Nakajima, 2003).



Şekil 2. İnfluenza virüslerinde meydana gelen genetik değişmeler. **A.** Viral RNA segmentlerinde meydana gelen nokta mutasyonlarının birikmesi (antijenik drift). **B.** Aynı hücreyi enfekte eden iki farklı tipte İnfluenza A virüsü RNA segmentlerinin farklı kombinasyonlarda bir araya gelmesi (antijenik shift).

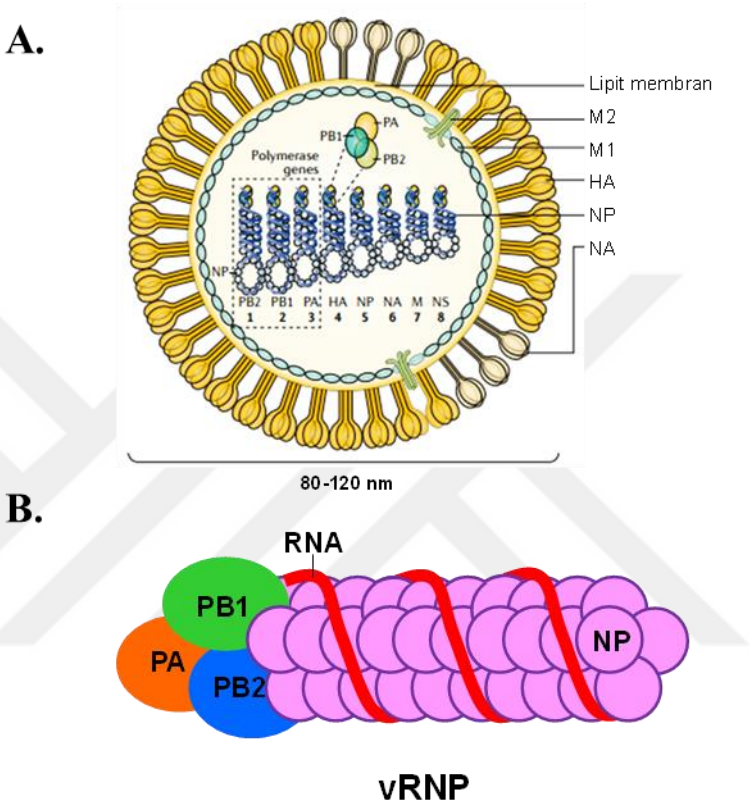
Dünya'da her yıl ortalama 3 milyondan fazla kişi solunum yolu enfeksiyonları nedeniyle hayatını kaybetmektedir. Bu sayı toplam ölüm oranlarının % 6,4'ünü oluşturmaktadır. Solunum yolu enfeksiyonlarına yol açan patojenlerin başında influenza A virüsleri gelmektedir. Bu nedenle influenza virüsleri insan sağlığı açısından büyük önem taşımaktadır. DSÖ verilerine göre influenza virüslerinin yıllık yaklaşık 1 milyar kişide enfeksiyona neden olduğu, bunlardan 3-5 milyon arasında değişen sayıda insanda hastalık ağır seyrederken, ortalama 300-500 bin insan hayatını kaybetmektedir (Jennings ve ark., 2018). İnfluenza A virüsleri, genetik özelliklerinin sıklıkla değişikliğe uğraması, geniş bir konak yelpazesine sahip olmaları, cinsiyet, yaş

ve ırk farkı gözetmeksizin tüm bireylerde enfeksiyon yapabilme, epidemiler ve kimi zaman yüksek mortalite ile seyreden pandemilere yol açmaları nedeniyle tarih boyunca güncelliklerini hep korumuşlardır (Hsieh ve ark., 2006). Gribal enfeksiyonlar ile ilgili ilk tarihsel veriler M.Ö. 5. yüzyılda Hipokrat ve Livy tarafından bildirilmiştir (Kuszewski ve Brydak, 2000). Tarihi kayıtlara geçen bilinen ilk influenza pandemisi ise 1580 yılında gerçekleşmiştir. İnfluenza A virüsleri geçen yüzyılda üç büyük pandemiye neden olmuştur (Hsieh ve ark., 2006). Bunlardan en önemlisi 1918-1919 yılları arasında gerçekleşen ve İspanyol gribi olarak da bilinen salgındır (Taubenberger, 2005). Bu salgına neden olan virüsün influenza A virüs H1N1 tipi olduğu belirlenmiştir. Bu virüs pandemisinde farklı kaynaklara göre dünya genelinde ortalama 20-50 milyon kişi yaşamını yitirmiştir. Yüksek oranlarda ölümlere neden olan bu pandemide dünya nüfusunun %20-40'ının etkilendiği düşünülmektedir (Shortridge, 1999). 1957-1958 yıllarında meydana gelen influenza A H2N2 virüsünün neden olduğu Asya gribi ve 1968-1969 yıllarında influenza A H3N2 virüsünün neden olduğu Hong Kong gribi geçen yüzyılda görülen diğer önemli influenza pandemileridir. İnfluenza A H1N1 virüsleri 1977–1978 yılları arasında Rus gribi olarak da adlandırılan yeni bir salgına neden olmuştur. Bu yüzyılın başında, 2009 yılı Şubat-Mart aylarında Meksika'da ortaya çıkan ve kısa süre sonra ABD'de görülen domuz kaynaklı influenza A (H1N1) virüsü yeni bir salgına yol açmıştır (Morens ve ark., 2010; Ortiz ve ark., 2012).

Yapısal olarak ele alındığında influenza A virüslerinin sekiz parçadan oluşan tek iplikli RNA moleküllerinin herbiri, nukleoproteinler (NP) ile kompleks oluştururlar. Bu yapılar viral ribonukleoprotein partikülleri (vRNP) olarak adlandırılırlar (Bouvier ve Palese, 2008; Ishihama ve Nagata, 1988). İnfluenza A virüslerinde RNA genomu üzerinden 11 farklı protein kodlanır. Bu proteinler; viral DNA polimeraz enzimini oluşturan PB2, PB1 ve PA proteinleri, PB1 proteini ile aynı segment üzerinden kodlanan PB1-F2 pro-apoptotik protein, HA yüzey antijen proteini, NP, NA yüzey antijen proteini, matriks proteini (M1), iyon kanal proteini (M2), NS1 (yapısal olmayan protein) ve NS2 proteinleridir (Nakajima, 1997; Zell ve ark., 2007) (Şekil 3).

İnfluenza virüslerinde vRNP'ler konak hücre kaynaklı bir membran ile çevrelenmiştir. Viral proteinlerden, HA, NA ve M2 proteinleri virüs membranında yer alırlar (Skehel

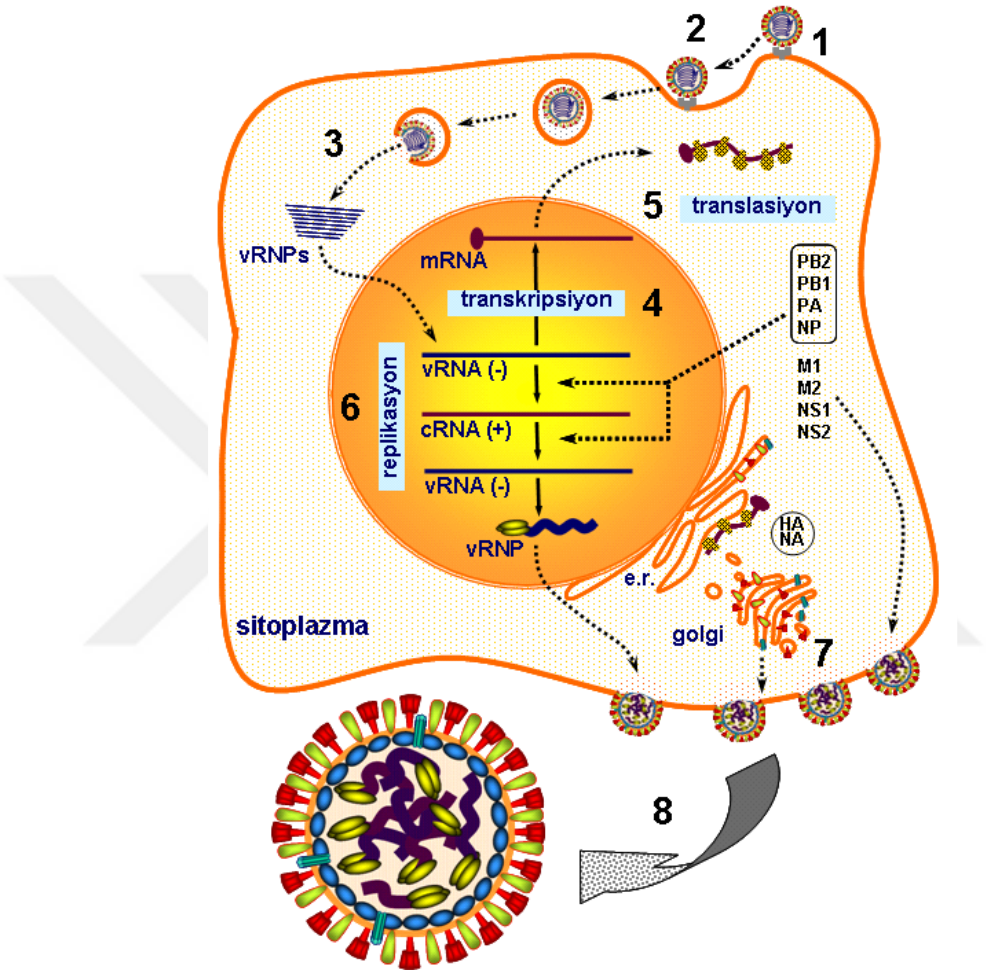
ve Wiley, 2000; Watanabe ve ark., 2010). Virüslerin konak hücrelere tutunması (adsopsiyon), konak hücre membranında yer alan ve reseptör işlevi gören glikoproteinlerin sialik asit (N-acetyl neuraminic acid) bakiyelerine, viral HA molekülünün globüler yapıda olan eksternal uzantısındaki reseptör bağlanma bölgesi ile bağlanmasıyla gerçekleşir (Bouvier ve Palese, 2008).



Şekil 3. A. İnfluenza A virüsü şematik görünümü, **B.** vRNP'lerin yapısı

Konak hücre yüzeyine HA proteinleri aracığıyla tutunan (adsorpsiyon) virüs partikülleri endositoz yoluyla hücre içerisine alınır (penetrasyon). Viral HA ve M2 proteinleri konak hücre sitoplazmasında endozom içerisinde hapsolmuş olan virüs partiküllerinin serbestleşmesinden işlev gören önemli proteinlerdir. Virüs serbestleşmesi viral membran ile enzdozomal membranın kaynaşması ile gerçekleşir. Bu olayda HA proteini işlev görür ve bu işlevin gerçekleştirebilmesi için endozom ve virionun iç pH'sının asidik olması gerekmektedir. HA2 bölgesindeki hidrofobik füzyon peptidi, HA molekülünün düşük pH değerinde konformasyonel bir değişikliğe uğraması sonucunda açığa çıkar ve viral membran ile endozomal membranın

kaynaşmasına neden olur. M2 kanal proteininin bir işlevi sonucu, pH değerindeki düşme ile viral proteinler (NP ve M1) arasındaki etkileşimi de bozar ve vRNP'lerin matriks proteininden serbest kalmasına yol açar. Bunun sonucu olarak vRNP'ler endozomdan kurtularak sitoplazmada serbest kalırlar (Bouvier ve Palese, 2008)(Şekil 4).



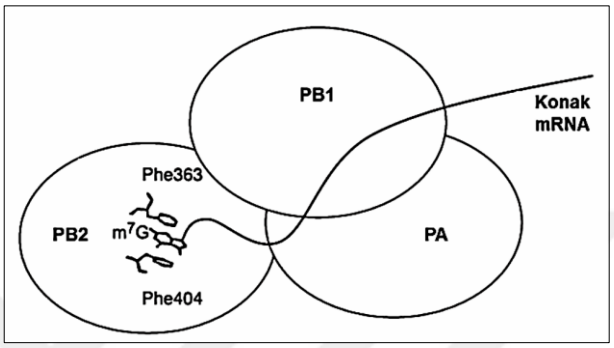
Şekil 4. İnfluenza A virüs moleküler yapısı ve yaşam döngüsü. **1.** Tutunma (adsorbsiyon), **2.** Giriş (penetrasyon), **3.** Kot atma, **4.** Transkripsiyon, **5.** Translasyon, **6.** Replikasyon, **7.** Kurulma, **8.** Serbestleşme.

NS1 ve NS2 proteinleri virüs genomunun en küçük parçası olan sekizinci segment üzerinden sentez edilir (Lamb ve Choppin, 1979). İnfluenza A virüsü NS1 proteini, virüs partikülünde varlığı saptanamamış, yapısal olmayan (ing. NS: Non-Structural) bir proteindir (Basu ve ark., 2009). Virüs partikülünde az miktarda bulunan NS2 proteini ise M1 proteini ile birlikte viral RNP'lerin transportunda rol alır (Senbas

Akyazi ve ark., 2020). Bu nedenle NEP (nuclear export protein) olarak da adlandırılır (Kawaoka ve Neumann, 2012; Neumann ve ark., 2000). İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimini oluşturan PB2, PB21 ve PA proteinleri viral genomu oluşturan en büyük ilk üç RNA segmenti tarafından kodlanır ve bu enzim genom replikasyonunu ve viral mRNA'ların sentezini kataliz eder. İnfluenza virüslerinin replikasyonu ve transkripsiyonu olayları konak hücrenin nukleusunda gerçekleşir. Replikasyon ve transkripsyon olayları sonucunda hücrelerde sentez edilen vRNP'ler, nükleer por komplekslerinden sitoplazmaya oradan da hücre membranına taşınır. Virüslerin kurulum işlemleri viral proteinler ile değişikliğe uğratılmış hücre membranında gerçekleşir. İnfluenza virüsleri negatif iplikli RNA içerdiklerinden, kendi genomlarını replike etmek ve kendi mRNA'larını sentez etmek için virion içerisinde RNA'ya bağımlı RNA polimeraz enzimi taşımaktadırlar.

İnfluenza virüsü RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi, virüs enfeksiyonu sırasında hem 5′-ucundaki 7-metil guanozin şapka (m7G) (Cap) yapısına ve 3′-ucunda poli-A kuyruğu taşıyan viral mRNA'ların, hem de negatif polarite gösteren vRNA'ların sentezinde şablon görevi gören Cap ve Poli-A taşımayan cRNA'ların sentezinden sorumludur (Braam ve ark., 1983; Plotch ve ark., 1981). Bu enzim viral replikasyon için primere gereksinim duymaz, buna karşın viral mRNA'ların sentezinde konak mRNA Cap yapılarını primer olarak kullanır (Plotch ve ark., 1979). Viral RNA polimerazın PB1 alt ünitesi virüsün ikinci segmenti üzerinden sentez edilir. Viral RNA'ların polimerizasyonundan sorumlu olan bu alt birimdir (Sanz-Ezquerro ve ark., 1998). PB1 proteininin tek başına RNA şablonunu *in vitro* olarak kopyalayabildiği ve cRNA sentezini kataliz edebildiği gösterilmiştir (Kobayashi ve ark., 1996; Nakagawa ve ark., 1996). Enzimin PB2 alt ünitesi birinci RNA segment üzerinden kodlanır. PB2 proteini konak hücrelerde RNA polimeraz II enzimi tarafından sentez edilmekte olan mRNA'ların Cap yapısına bağlanır. Konak mRNA'ların Cap yapıları viral RNA polimeraz enzimi tarafından kesilerek viral mRNA'ların sentez edilmesinde primer molekül olarak kullanılır (Poole ve ark., 2004; Sanz-Ezquerro ve ark., 1998)(Şekil 5). Bu yönüyle influenza A virüsleri transkripsiyon için konak hücre RNA polimeraz II enzimine gereksinim duyarlar. Bu nedenle diğer birçok RNA virüsünden farklı olarak influenza virüslerinin replikasyon ve transkripsiyon işlevleri hücre nukleusunda gerçekleşir. İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimini oluşturan üçüncü alt birim

PA proteinidir. PA proteini üçüncü viral RNA segmenti üzerinden sentez edilmektedir. PA proteininin viral replikasyon ve transkripsiyondaki işlevi ile ilgili bilinmeyenler olmakla birlikte proteaz aktivitesine sahip olduğu bilinmektedir (Hara ve ark., 2001). Son zamanlarda yapılan çalışmalar hücresel mRNA'lardan 5′-CAP yapısının kesimi olayında PB1 proteini ile birlikte PA proteininin de rol aldığını göstermektedir (Dias ve ark., 2009).



Şekil 5. Konak mRNA'ların Cap yapılarının viral RNA polimeraz enzimi tarafından kesilmesi (Fodor ve Smith, 2004)

İnfluenza A virüs membranında bulunan HA, NA yüzey antijen proteinleri ve M2 konak proteinleri sentezi konak hücrelerde endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlarda gerçekleştirilir. Bu proteinlerin translasyon sonrası modifikasyonları ve hücrelerin membranlarına taşınması endoplazmik retikulum ve golgi kompleksi aracılığıyla gerçekleşir. Virüse ait PA, PB1, PB2 ve NP proteinleri ise konak hücre sitoplazmasında serbest ribozomlar üzerinde sentez edilmektedir. Sitoplazmada sentez edilen bu proteinleri işlevleri gereği hücre nukleusuna taşınmakta ve hem negatif polarite gösteren genomik vRNA'ların sentezini sağlamakta hem de vRNA'lar ile vRNP'leri oluşturmaktadırlar (Ciblak ve Grip, 2013). Oluşan vRNP'lerin nukleustan sitoplazmaya taşınması nükleer eksport proteini (NEP) olarak da adlandırılan NS2 ve M1 proteinleri tarafından düzenlenir. M1 proteinleri hem viral RNA'lar hem de NP proteinleri ile etkileşim halindedirler. M1 proteini de sitoplazmada sentezlendikten sonra nukleusa taşınır ve vRNP-NEP komplekslerinin hücre membranına yönlendirilmesine katkı sağlar. Viral vRNP'ler HA, NA ve M2 proteinlerinin eklenmesi ile farklılaşan konak hücre membranında bir araya gelerek yeni virüs partiküllerini oluştururlar (Nayak ve ark., 2009). Hücre membranında virüs

partiküllerinin tomurcuk şeklini alması, M1 matriks proteinlerinin membranın sitoplazma tarafında birikmesiyle başlar. Hücre yüzeyinde tomurcuklanma şeklinde oluşan yeni virüs partikülleri, viral HA proteinlerinin membrandaki glikoproteinlerin sialik asit bakiyelerine bağlanması sebebiyle kolayca serbest hale geçemezler (Sawada ve ark., 2010). Bu aşamada viral membranda yer alan NA enzimi, konak hücre membranındaki sialik asit bakiyelerini keserek virüs partiküllerinin serbest kalmalarını sağlamaktadır (Conenello ve Palese, 2007; McAuley ve ark., 2007; Zamarin ve ark., 2006).

4.3. İnfluenza Patogenezi

İnfluenza virüsünün patojenitesini belirleyen faktörlerin bir kısmı konak hücre kaynaklı bir kısmı ise viral kaynaklı faktörlerdir (Fukuyama ve Kawaoka, 2011). Hücrelerde virüsün tutunması ve hücreye girişini sağlayacak uygun reseptörlerin bulunması, virüsün hücre içine girişi ve replikasyonu için gerekli olan enzimlerin varlığı, viral replikasyonda rolü olan hücresel protein faktörler, organizmanın bağışıklık sisteminin yetkinliği, organizmanın virüse karşı olan önceden kazanılmış spesifik bağışıklıkları, bağışıklık sisteminin enflamatuar yanıtı ile konak organizmada hasar oluşturmadan viral replikasyonunu kontrol edebilme yeteneği gibi bir çok hücresel faktör viral patogenezin seyrini belirlemektedir. Viral patogenezi belirleyen diğer önemli faktörler virüsün kendi yapısal ve işlevsel özellikleri ile ilgili faktörlerdir. Konak organizmada hedef hücrelere bağlanma yeteneği, konak organizma dokularında ya da konaklar arasında yayılma yeteneği, bağışıklık sistemin kontrol mekanizmalarından kaçış için mutasyonlar ya da rekombinasyonlar ile antijenik varyasyonlar geliştirme yeteneği ve konak savunmasını zayıflatmak için immün yanıtı kontrol altına alabilme yeteneği viral patogenezi etkileyen viral kaynaklı faktörlerdir (Chen ve ark., 2018).

İnfluenza virüsünün insanlarda enfeksiyon için ana giriş yolu, solunum sistemini mukozasını kaplayan epitel hücreleridir. Bu hücreler genellikle virüslerin tutunması için gerekli uygun reseptör taşımaları nedeniyle enfeksiyona duyarlıdırlar. Bu nedenle virüslerin tutunmasını sağlayan reseptörlerin yapısı enfeksiyon için önemli belirleyici unsurlardan biridir. Virüs ile enfekte olan epitel hücrelerinde viral bileşenlerin çoğalması ve metabolik fonksiyonların işlemez hale gelmesi hücrelerinin ölümüne

neden olmakta ve çok sayıda yeni virüs partikülleri açığa çıkmaktadır. Solunum yolu epitel hücrelerinde yüksek titrelerde çoğalan virüsler, daha sonra alveoler makrofajları enfekte ederek bu hücrelerde apoptoz mekanizmasını tetiklemektedir. Hücrelerin viral enfeksiyon sonucunda nekroz ya da apoptoz ile ölmeleri, organizmada bağışıklık sisteminin uyarılmasına ve sitokin/kemokinlerin üretimine neden olmaktadır. Bu olayların sonucunda salgılanan inflamatuvar mediyatörler, enfeksiyonun başlangıcından birkaç gün içinde önce makrofaj ve nötrofillerin daha sonra da T-lenfositlerinin periferal kandan akciğer dokularına göçüne neden olmaktadır (La Gruta ve ark., 2007).

Viral enfeksiyonun erken aşamalarında doğal bağışıklık yanıt mekanizmaları (interferon alfa/beta, doğal öldürücü hücreler, nazal salgılardaki müsinler, kompleman sistemi, pulmoner sürfaktan proteinler ve serum mannoz bağlayan proteinler) etkin hale gelir. İnfluenza virüslerine karşı kazanılmış bağışıklık yanıtı, 5-7 gün içerisinde ortaya çıkar. Viral enfeksiyon dendritik hücreler tarafından algılanır. Dendritik hücreler antijen sunan hücre olarak işlev görürler. İnfluenza virüsü için özgül olarak oluşan T lenfosit yanıtında, aktive olan CD4+ yardımcı T (Th1 ve Th2) lenfositleri salgıladıkları sitokinlerle (interlökin-2, interferon-gama) CD8+ sitotoksik T ve B lenfositerini (IL-10, IL-4) aktive ederler. Sitotoksik T lenfositleri (CTL) virüs ile enfekte hücrelerin ortadan kalkmasını sağlayarak enfeksiyonun şiddetini ve komplikasyon gelişme riskini azaltırlar. Diğer taraftan, virüsün gerek yüzey antijenlerine (HA ve NA) gerekse NP ve M1 proteinine karşı gelişen CTL yanıtı, virüsün farklı alt tiplerine karşı da çapraz koruma sağlayabilmektedir (Stambas ve ark., 2008).

Viral enfeksiyon sürecinde vücutta salgılanan sitokinler B lenfositlerini de aktive ederler. Bunun sonucu olarak virüse özgü immünglobülinlerin sentezi için hümoral immün yanıt oluşturulur. İnfluenza virüsüne karşı gelişen hümoral yanıtta, virüsün NP, M, HA ve NA proteinlerine karşı özgün antikorlar sentez edilir (Song ve ark., 2011). NP ve M antijenlerine karşı sentez edilen antikorlar kısa ömürlüdür ve önemli bir koruyucu özelliği yoktur. Viral membranda yer alan NA enzimine karşı oluşturulan antikorlar yeni oluşan virüslerin hücre membranlarından serbestleşmesini önleyerek hastalık şiddetini ve yeni hücrelere bulaşmayı sınırlandırırlar. Virüsün en önemli yüzey antijeni olan HA glikoproteini, influenza enfeksiyonlarına karşı oluşan

koruyucu hümoral yanıtın en önemli hedefidir. HA glikoproteinine özgü oluşturulan antikorlar virüslerin hücre membranlarına tutunmasını zorlaştırır ve virüsün yayılmasını önlerler (Garulli ve Castrucci, 2009; Yang ve ark., 2002). Özellikle influenza A virüslerinde gerek HA gerekse NA yüzey antijenlerinin çok sayıda alt tipinin olması kazanılmış bağışıklığın koruyucu etkisini sınırlar. Bu nedenle, farklı influenza A alt tiplerinin HA ve NA glikoproteinlerinde korunmuş bölgelere karşı oluşturulan özgün nitelikli nötralize edici antikor varlığının saptanması, olası influenza pandemilerden korunmada büyük önem taşıyacaktır (Ekiert ve ark., 2009).

4.4. İnfluenza Virüsü Enfeksiyonlarında Hücre İçi Savunma Mekanizmaları

Omurgalı hayvanlarda virüslere karşı koruma sağlayan bağışıklık sisteminin önemli bileşenlerinden biri interferonlardır. İnterferonlar ilk kez 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann tarafından, influenza virüsleri üzerinde yaptıkları çalışmalar sırasında keşfedilmiştir (Isaacs ve Lindenmann, 1987). İnterferon (IFN) ismi, hücrelerde viral işlevlere karışma ya da müdahale etme anlamına gelen "interfere" kelimesinden gelmektedir. Nagano ve Kojima tarafından yapılan çalışmalar, IFN sisteminin ayrıntılarıyla ilgili daha sonraki çalışmalara temel oluşturmuştur (Nagano ve Kojima, 1958). İnterferonlar, bazı virüs enfeksiyonlarına karşı antiviral cevap olarak konak hücreler tarafından sentez edilen ve salgılanan glikoproteinlerdir (Chelbi-Alix ve Wietzerbin, 2007; De Andrea ve ark., 2002). Bu glikoproteinler hücreler tarafından sadece virüslere karşı değil aynı zamanda diğer prokaryot ya da ökaryot yapıda patojenlere ya da tümör hücrelerine yanıt olarak da sentez edilirler. Bir enfeksiyon durumunda IFN'lar otokrin ve parakrin yollarla etki ederek enfekte hücrede veya interferon reseptörleri taşıyan komşu hücrelerde çeşitli savunma mekanizmalarını aktif hale getirerek patojenin yayılmasını engellerler (Bonjardim, 2005). IFN'lar genel olarak iki grup altında incelenirler. Bunlar Tip I ve Tip II interferonlardır. Tip I interferonlar içerisinde IFN-α, IFN-β ve IFN-ω interferonlar yer almaktadır (Liu, 2005). IFN-α lökositler, IFN- β ise fibroblast hücreleri tarafından sentez edilir ve salgılanır. Aynı grup içinde yer alan IFN-α, viral RNA veya DNA replikasyonunu durdurucu yönde etki gösterir ve edinsel bağışıklıkta epitop durumundaki antijenleri taşıyan MCH-I sınıfı genlerin anlatımını uyarırlar. IFN-β makrofaj hücreleri üzerinde etkilidir, NK hücrelerini aktive eder ve MCH-II anlatımını uyarırlar. Tip II IFN'lar

immün IFN'lar olarak bilinir. IFN2-γ bu grup içerisinde yer alır. IFN-γ lenfositler tarafından üretilir ve salgılanır. IFN-γ makrofajlar üzerinde etkilidir ve NK hücrelerini aktive eder. MCH-I ve MCH-II sınıfı genlerin anlatımını uyarır. IFN-γ CD4+Th yardımcı hücreleri ve CD8+Tc hücreleri de aktive eder (Stinebring, 1974). Her iki grupta yer alan IFN'lar antiviral, antiproliferatif ve immün düzenleyici özelliklere sahiptir. Bununla birlikte özellikle viral IFN olarak bilinen Tip I IFN'lar virüs enfeksiyonlarında, Tip II IFN'lar ise mitojenik veya antijenik uyarıcılarla immün düzenleyici reaksiyonlarda etki göstermektedirler (Williams, 2002). İlgili hücrelerde sentezlenen ve salgılanan interferonlar parakrin veya otokrin yol ile hedef hücrelere sinyal iletirler (Bunn ve ark., 2012). Hücreler bu sinyallere yanıt olarak virüslerin replikasyonunu yavaşlatıcı ya da virüslerin replikasyonunu tamamen inhibe edici tepkiler ortaya koyarlar. IFN'lar hedef hücre membranlarında yer alan reseptörlere bağlanarak etkilerini gösterirler (Mogensen ve ark., 1999). Bu sinyal moleküllerin kendilerine özgü reseptörlere bağlanması hücre içerisinde bir dizi biyokimyasal reaksiyonun başlamasını neden olur (Samuel, 2001). Tip I interferonlar, İnfluenza virüslerinin ve diğer birçok RNA virüslerinin replikasyonunu inhibe ederler. Bu işlevlerini hücrelerde 2'-5'oligoadenilat sentetaz, protein kinaz R (PKR) gibi enzimler ve çeşitli protein faktörlerin sentezini uyararak gerçekleştirirler (Chelbi-Alix ve Thang, 1986). RNA genomu taşıyan virüsler ile enfekte olan hücrelerde fazla miktarda çift zincirli RNA moleküllerinin oluşması IFN'ların sentezi için en önemli uyarıcı faktördür (Gowen ve ark., 2007). Buna yanıt olarak Tip I interferonların (IFN-α/β) sentezi gerçekleşir. İnterferonların uyarısı ile hedef hücrelerde RNA bağımlı Protein Kinaz (PKR) enzimi üretilmektedir (Thomis ve Samuel, 1993). İnsanda PKR enzimin karboksi-terminal bölgesi protein kinaza proapoptik bir özellik verirken, N-terminal bölgesi viral replikasyon ve gen ekspresyonları sonucu oluşan çift zincirli RNA'ya bağlanma işlevi görür. Viral enfeksiyonlarda PKR, çift zincirli RNA'ya bağlanarak dimerleşir ve buna bağlı olarak otofosforilasyon reaksiyonu sonucunda aktive olur. Aktive olan PKR, ökaryotik translasyon başlatıcı faktörünü (EIF2α) fosforile eder. Fosforillenmiş EIF2α, hücresel mRNA sentezini inhibe eder ve bu da viral protein sentezini negatif yönde etkiler (Galabru ve Hovanessian, 1987). PKR'nin antiviral etkisinin yanı sıra hücre proliferasyonunun kontrolünde de rolü olduğu saptanmıştır.

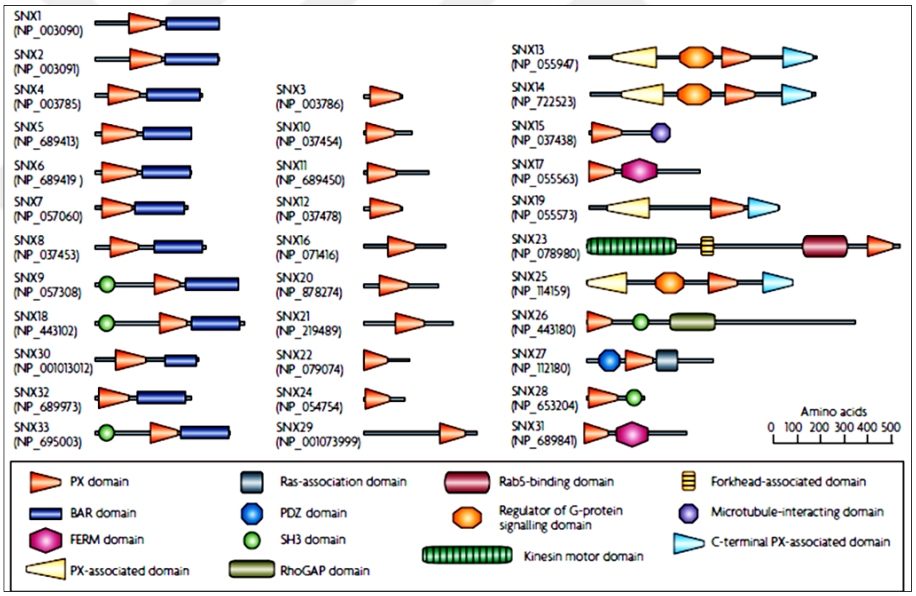
Virüs enfeksiyonlarında IFN'ların etkisi ile hücrelerde sentez edilen diğer bir enzim, 2′-5′ oligo adenilat sentetaz (OAS) enzimleridir (Ball, 1979). OAS enzimleri viral RNA'ların yıkımına yol açarak antiviral etkisini gösterir. Viral RNA'ların yıkımı için aktive olmuş OAS ve RNaz L olmak üzere iki enzime gereksinim vardır. OAS enzimi çift zincirli RNA moleküllerine bağlanarak aktifleşir. Aktif OAS enzimi, 2′-5′ oligoadenilatların sentezini katalizler. Sentezlenen oligoadenilatlar inaktif haldeki RNaz L enzimini aktive ederler. Aktif RNaz L enzimleri, virüse ait RNA moleküllerinin yıkılmasını kataliz eder ve viral replikasyonun inhibe olmasına neden olur (Baglioni ve ark., 1979).

Konak hücrelerin viral enfeksiyonlara karşı kendilerini savunmada sentez ettikleri bir diğer önemli protein grubu Mx proteinleridir (Weber ve ark., 2000). Mx proteinleri özellikle RNA virüsü ile enfekte hücrelerde IFN'ların uyarısı sonucunda üretilirler. İnsan hücrelerinde IFN'ların uyarısı ile sentez edilen iki farklı Mx proteini tanımlanmıştır. Bunlar MxA ve MxB proteinleridir. İnsan MxA ve MxB genlerinin her ikisi de 21. kromozomda lokalize olmuşlardır. Mx proteinlerinin sahip olduğu GTPase aktivitesi, antiviral aktiviteleri açısından gereklidir. Yapılan çalışmalarda MxA proteinlerinin İnfluenza virüsleri başta olmak üzere birçok RNA virüsü replikasyonunu inhibe ettiği gösterilmiştir (Turan ve ark., 2004). Virüs enfeksiyonlara karşı immün yanıt oluşturmada görev yapan MHC-I ve MCH-II kompleks proteinleri de IFN'lar tarafından sentezi uyarılan antiviral proteinler arasındadır. Bu kompleks proteinler kazanılmış bağışıklıkta antijenlerin T lenfositlerce tanınmalarından sorumludurlar. Ekzojen antijenlerin tanınmasında MCH-II ve CD4 etkileşimi gerçekleşirken; endojen antijenlerin tanınmasında MCH-I ve CD8 etkileşimi gerçekleşmektedir (Waldburger ve ark., 2000; Yewdell ve Bennink, 1999).

4.5. Sorting Nexinler ve SNX2

Bu tez çalışmasında influenza A virüsü PA proteini ile ilişkilendirilen SNX2 proteinini de kapsayan Sorting nexin (SNX) proteinleri hücre sitoplazmasında yer alan, taşıdıkları PX (phox-homology) motifleri ile ya da protein-protein etkileşimleri ile membrandaki protein kompleksleri aracılığıyla membranlar ile etkileşime girebilme potansiyeline sahip büyük bir protein ailesidir (Worby ve Dixon, 2002). Bu ailede yer alan proteinlerin bir kısmının protein trafiğine katkı sağladığı gösterilmiştir. Bu grup

içerisinde yer alan proteinler yapısal olarak iyi korunmuş proteinlerdir (Carlton ve ark., 2005b). SNX proteinleri hidrofilik özellik gösterir ve yapılarında bulunan PX motifi varlığına göre sınıflandırılırlar. Bu proteinleri taşıdıkları PX motifi aracılığıyla membranlarda bulunan fosfotidilinositol-3-fosfata bağlanır. SNX proteinleri çeşitli sitoplazmik gruplar ve membran proteinleri ile etkileşim içinde olup, hücre içi protein trafiği, transmembran proteinlerinin yenilenmesi, endozomların taşınması ve endositoz gibi birçok önemli hücre yolağında işlev görürler (Cullen, 2008; Johannes ve Popoff, 2008; Kanzawa ve ark., 2014). SNX proteinleri PX motifi, BAR (İng. Bin/Amphiphysin/Rvs), FERM (İng. protein 4.1/ezrin/radixin/moesin) ve SH3 motifi gibi farklı bölgeler de içerirler (Şekil 6). SNX proteinleri içerdikleri motifler dikkate alınarak 5 alt grup altında incelenebilir. Bunlar; SNX-PX, SNX-BAR, SNX-FERM, SNX-PXA-RGS-PXC ve SNX-MIT alt gruplarıdır (Bonifacino ve Hurley, 2008; Yong ve ark., 2020).

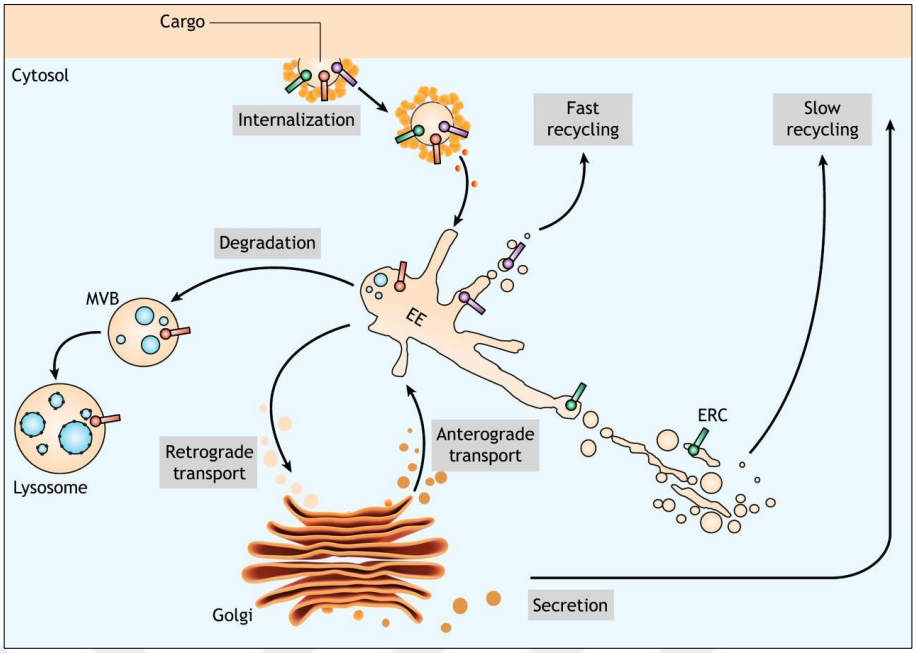


Şekil 6. Memeli Sorting Nexin proteinlerinin domain yapıları. (Cullen, 2008)

Hücrelerde endozomal sistemi, sitoplazmada bir molekülün hedeflere iletilmesini sağlayan bir sistem olarak işlev görür. Hücreye dış ortamdan alınan maddeler erken endozoma alınır ve hedef organele ulaştırılır. Bu olaylarda SNX proteinleri görev alır. Bu çalışmaya konu olan SNX2 proteini de trans-golgi ağında görev alan SNX proteinlerinden biridir.

Ökaryotik hücrelerde çok sayıda SNX proteini bulunmaktadır. Mayalarda 10 memelilerde ise 33 SNX proteini tanımlanmıştır (Carlton ve ark., 2005a; Seet ve Hong, 2006). Memelilerde saptanan SNX proteinlerinden 12'si C-terminal BAR motifi bulundurmaktadır ve bu proteinler SNX-BAR alt grubunda sınıflandırılmıştır (Carlton ve ark., 2004). SNX proteinlerindeki BAR motifi, içbükey yüzü küçük veziküller veya dar çaplı membran tübüllerde olduğu gibi tercihen pozitif eğrilikli zarlarla etkileşime giren bir membran bağlayıcı kavisli yapı oluşturan bir dimerizasyon motifidir (McMahon ve Gallop, 2005).

Ökaryotik hücrelerde endozomlar, membran bileşenlerinin yeniden bir araya gelmesi veya bozulmasını kontrol etmede merkezi bir rol oynar, böylece besin alımı, bağışıklık, sinyal verme, yapışma, membran döngüsü ve geliştirme dahil olmak üzere birçok temel süreçleri düzenler (Conner ve Schmid, 2003; Kirkham ve Parton, 2005; Mayor ve Pagano, 2007). Farklı yollarla endositoz haline getirilen bileşenler, ilk aşamada ortak bir erken endozoma yönlendirilir. Membranlardaki temel reseptörler ve diğer proteinler, geri dönüşüm endozomu yoluyla doğrudan ya da dolaylı olarak tekrar plazma membranına katılırken, diğer bazı moleküller yıkıma uğratılmak üzere lizozomlara veya trans-Golgi ağına gönderilir (Şekil 7). Vesikül trafiğinde yer alan erken endozomlar, tekrar kullanılmak için geri dönüştürülecek membran bileşenlerinin lizozomlara değil geri dönüşüm yolağına girmesinde anahtar sıralama istasyonu olarak işlev görür. Erken-geç endozomlardan taşınmaya, majör protein ve lipitlerin yeniden modellenmesi ve endozomal lümende değişiklikler eşlik eder (Scott ve Gruenberg, 2011). En önemlisi, çok alt birimli bir proton pompası olan V-ATPase, erken endozomların ve geç endozomların/lizozomların sırasıyla ≈6,2 ve ≈5,5 / 5,0 pH değerlerine asitleştirilmesinden sorumludur bu da birçok endo-reseptör-ligand ayrılması, lizozom enzim aktivitesi ve taşınmasının da dahil olduğu lizozom fonksiyonlarıdır.



Şekil 7. Endositik yolak. (Naslavsky ve Caplan, 2018)

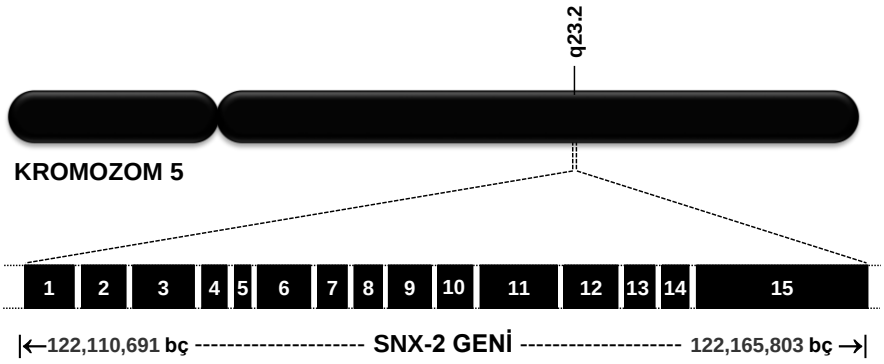
Karmaşık ve farklı endositoz yollarına karşın, hücreye alınan tüm maddeler tek bir organelde - erken endozomda birleşir. Bu pleomorfik ve kalıcı yapı, en azından memelilerde, membrana bağlı moleküllerin sınıflandırılması ve çözünenlerin aktarılması veya hedeflenmesi için ilk ve birincil lokasyon olarak işlev görür. Erken endozomlar ve geri dönüşüm endozomları farklı asitleştirme özellikleri gösterir ve muhtemelen kısıtlayıcı bir etki alanı benzeri organizasyon gösteren Rab GTPazlar dahil olmak üzere seçici lipit ve protein alt gruplarını içerirler (Hsu ve Prekeris, 2010; Scott ve Gruenberg, 2011). Bu farklılıklara rağmen, erken ve geri dönüşüm endozomları arasındaki ayrım moleküler düzeyde belirgin değildir ve her iki endozom, birlikte bazı hücre tiplerinde retiküler bir organizasyon gösterebilen, birbirine bağlı tubulo-cisternal elemanlarının geniş ağlarını oluştururlar (Stoorvogel ve ark., 1996; Tooze ve Hollinshead, 1991). Memeli hücrelerinde, çeşitli proteinler ve lipitler, genel olarak endozomların ve hücre içi zarların mozaik organizasyonu ile spesifik erken endozom alt bölgelerine tutulur (Gruenberg, 2001).

Endozomal kompartımanlardan çıkış retrograd sıralama olarak adlandırılır ve endositik yolun farklı kısımlarında görülür. Retrograd sıralama, Golgi cisimciğinden veya plazma zarından endozomlara hedeflenen kargo molekülleri üzerinde etkilidir. Bu kargo proteinleri veya lipitleri daha sonra retrograd yoldan trans-Golgi ağına, Golgi

membranlarına veya bazı durumlarda endoplazmik retikuluma taşınır (Falguieres ve ark., 2006; Pfeffer, 2011; Sandvig ve van Deurs, 2005). Bu taşınma yolu, patojenler tarafından hücrelere giriş sırasında da tercih edilir. Örneğin, konak hücre içinde *Shigella dysenteriae* bakterisi tarafından üretilen Shiga toksin molekülünün uygun şekilde hedeflenmesi retrograd nakil gerektirir. Shiga toksininin toksik olmayan β-alt birimi (STxβ), konak hücre toksin reseptörünü, glikosfingolipid Gb3'ü bağlar (Bosse ve ark., 2019). Reseptör bağlanmasını takiben, Shiga toksini erken/geri dönüşüm endozomları ile TGN / Golgi membranları yoluyla ER'ye taşınır (Johannes ve Popoff, 2008; Sandvig ve van Deurs, 2005). Bu nedenle, patojenler ve hücresel faktörler üzerine yapısal ve mekanik çalışmalar, endozomlar ve trans-Golgi ağı arasında ilk moleküler modellerin oluşturulmasını sağlamıştır. Retrograd yolla taşınmanın belirgin özellikleri, immünoterapi ve ilaç dağıtımında yeni terapötik stratejiler geliştirmek için yeni hedefler sunmaktadır. Tomurcuklanarak çoğalan maya türü Saccharomyces cerevisae'e ait Vps10 gibi asit hidrolaz ayrıştırma reseptörleri ve memelilerde (katyona bağımlı ve katyondan bağımsız) mannoz 6-fosfat reseptörleri retrograd kargo proteinleri arasında en iyi çalışılan örneklerdir (Munier-Lehmann ve ark., 1996).

Bu çalışmaya konu olan SNX2 proteininin daha çok erken endositik yolakta işlev gördüğü, hücre tubül yapısı üzerinde konumlandığı ve fosfotidilinositol 3-monofosfat ve fosfotidilinositol 3,5-bifosfat molekülleri ile ilişkili olduğu ve bu iki molekülün yoğun olduğu bölgelerde bulunduğu bilinmektedir (Carlton ve ark., 2005b; Gullapalli ve ark., 2004). İnsan hücrelerinde SNX2 proteinin kodlayan gen, 5. kromozomun uzun kolunda q23.2 bölgesinde yer almakta ve yaklaşık 55 kbç'lik bir bölgeyi kaplamaktadır (Duclos ve ark., 2017)(Şekil 8).

A.



B.



Şekil 8. A. İnsan SNX2 geninin 5.kromozom üzerindeki lokasyonu ve intron-ekzon yapısı. **B**. SNX2 proteinin işlevsel bölgeleri. **NTD**, N-terminal domaini; **PX**, phox homoloji domaini; **BAR**, C-terminal BAR bölgesi (Duclos ve ark., 2017).

On beş ekzon bölgesinden oluşan SNX2 geni üzerinden ortalama 1.5 kb boyutunda bir transkript sentez edilmektedir. İnsan SNX2 proteini yaklaşık 55.5 kDa ağırlığında 519 amino asitten oluşan bir polipeptittir. SNX2 proteininde amino-terminal bölge (NTD), PX motifi ve BAR motifi olmak üzere üç fonksiyonel bölge tanımlanmıştır. İnfluenza A virüsü PA proteininin yem olarak kullanıldığı maya ikili-hibrit testlerinde, pACT2 plazmitine klonlanmış halde insan cDNA kitaplığı ile yapılan tarama çalışmalarında insan SNX2 proteinin viral PA proteini ile etkileşim halinde olduğu saptanmıştır. Bu tez çalışmasında da insan orijinli HEK293 ve HeLa hücrelerinde SNX2 proteini ile influenza A virüsü PA proteini arasındaki ilişki biyokimyasal ve immün boyama yöntemleri ile araştırılmış, bu proteinin viral replikasyon için önemli olup olmadığı sorusuna yanıt aranmıştır. İnsan orijinli hücrelerde yapılan çalışmalar SNX2 proteininin memeli hücrelerinde de viral PA proteini ile etkileşim içinde olduğunu ve moleküler mekanizması tam olarak aydınlatılamamış olmakla birlikte influenza A virüsü replikasyonunu negatif yönde etkilediğini göstermiştir.

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Adenin	:	Sigma Aldrich, ABD
Agar	:	Difco, ABD
Agaroz	:	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	:	Sigma Aldrich, ABD
Amonyum persülfat	:	Merck, Almanya
Ampisilin	:	Carlo Erba, İtalya
Bromofenol mavisi	:	Sigma Aldrich, ABD
bis-Akrilamid	:	Sigma Aldrich, ABD
Dekstroz	:	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	:	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	:	Fluka, Almanya
Etil alkol	:	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	:	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	:	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	:	Merck, Almanya
Formamid	:	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	:	Sigma Aldrich, ABD
Glikoz	:	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	:	Sigma Aldrich, ABD
Hidrojen klorür	:	Merck, Almanya
Histidin	:	Sigma Aldrich, ABD
İzoamil alkol	:	Sigma Aldrich, ABD
İzopropanol	:	Sigma Aldrich, ABD
Kalsiyum klorür	:	Sigma Aldrich, ABD
Kanamisin	:	Roche, Almanya
Kloroform	:	Merck, Almanya
L- Arginin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Aspartik asit	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Fenil alanin	:	Sigma Aldrich, ABD

L-Glutamin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- İzolösin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Lizin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Metiyonin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Serin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Sistein	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Prolin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Tirozin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Treonin	:	Sigma Aldrich, ABD
L- Valin	:	Sigma Aldrich, ABD
Lityum asetat	:	Merck, Almanya
Lösin	:	Sigma Aldrich, ABD
Magnezyum sülfat	:	Merck, Almanya
Mangan klorür	:	Merck, Almanya
Orto-nitrofenil galaktozid (ONPG)	:	Sigma Aldrich, ABD
Metil alkol	:	Sigma Aldrich, ABD
(N-morpholino)propanesülfonik asit (MOPS)	:	Sigma Aldrich, ABD
Nonidet P-40	:	Sigma Aldrich, ABD
Paraformaldehit	:	Santa Cruz, ABD
Polietilenglikol-6000	:	Sigma Aldrich, ABD
Penisilin/Streptomisin	:	Sigma Aldrich, ABD
1,4-piperazindietanesulfonik asit (PIPES)	:	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenimin (PEI)	:	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	:	Merck, Almanya
Potasyum fosfat	:	Merck, Almanya
Potasyum klorür	:	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum asetat	:	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid	:	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum bikarbonat	:	Carlo Erba, İtalya
Sodyum deoksikolat	:	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dodesil sülfat	:	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dihidrojen fosfat	:	Merck, Almanya

Disodyum hidrojen fosfat	:	Merck, Almanya
Salmon sperm DNA	:	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum hidroksit	:	Merck, Almanya
Sodyum klorür	:	Carlo Erba, İtalya
Tetrametiletilendiamin (TEMED)	:	Sigma Aldrich, ABD
Tripsin	:	Sigma Aldrich, ABD
Triptofan	:	Sigma Aldrich, ABD
Tris	:	Sigma Aldrich, ABD
Tween 20	:	Sigma Aldrich, ABD
Urasil	:	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	:	Sigma Aldrich, ABD
2- β –Merkaptoetanol	:	Sigma Aldrich, ABD
8-hidroksikinolin	:	Sigma Aldrich, ABD
3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)	:	Sigma Aldrich, ABD

5.2. Enzimler

Tez çalışması kapsamında yararlanılan ekspresyon vektörlerinin oluşturulmasında, plazmitlerin kontrol edilmesinde ve genlerin PZR ile çoğaltılmasında DNA üzerinde etkili olan çeşitli enzimlerden yararlanıldı.

Restriksiyon Endonükleazları:

Plazmit vektörlerin doğrusal hale getirilmesi ya da elde edilen rekombinant plazmitlerin kontrol edilmesinde *Bam*HI, *Eco*RI, *Pst*I, *Dra*I, *Hind*III ve *Mlu*I (MBI Fermentas, Roche ya da New England Biolabs) restriksiyon endonükleazları kullanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri

Gen klonlama çalışmalarının farklı aşamalarında, alkalen fosfataz (MBI Fermentas), Klenow enzimi, T4 polinukleotid kinaz (New England Biolabs) ve T4 DNA Ligaz (TaKaRa) kullanıldı.

Termostabil DNA polimerazlar

PZR ile DNA moleküllerinin çoğaltılması ve elde edilen rekombinant plazmitlerin kontrol edilmesinde Taq DNA polimeraz enzimleri (New England Biolabs veya Biotechrabbit), Phusion high-fidelity DNA polimeraz (Thermo Scientific) ve *Thermococcus kodakaraensis* KOD1 arkea suşundan elde edilen, yüksek doğrulukta sentez özelliğine sahip KOD-plus (Toyobo) enzimleri kullanıldı.

Diğer enzimler

Komplementer DNA (cDNA) sentezinde reverz transriptaz (Toyobo ya da New England Biolabs) enziminden yararlanıldı. DNA ve RNA kontaminsayonlarının giderilmesinde DNaz ve RNaz enzimleri kullanıldı.

5.3. Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, RNA izolasyon kitleri (Roche#11828665001 ve Qiagen#74104), orta-ölçekte plazmit DNA izolasyon kiti (Qiagen#12145) ve DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen#20051) kullanıldı.

5.4. Antikorlar

Western melezleme ile protein analizleri, proteinlerin antikorlarla çöktürülmesi (immünçöktürme), immünfloresan testler ve ligasyonla yakınlık testi (*Proximity Ligation* Assay: PLA) deneylerinde aşağıdaki tabloda (Tablo 1) verilen birincil ve ikincil antikorlardan yararlanıldı.

Tablo 1. Tez çalışması kapsamında yararlanılan birincil ve ikincil antikorlar. Poliklonal antiserumlar, Tsukuba Üniversitesi (Japonya), Enfeksiyon Biyolojisi Laboratuvarından temin edildi.

Birincil Antikorlar:

Antikor adı	Antikor çeşidi	Antikor kaynağı	Üretici/Kodu
Anti-HA	Monoklonal	Fare	Santa Cruz#sc-7392
Anti-M1	Poliklonal-antiserum	Tavşan	-
Anti-NP	Poliklonal-antiserum	Tavşan	-
Anti-PA	Poliklonal-antiserum	Tavşan	-
Anti-aktin	Monoklonal	Fare	Abcam#ab11003

İkincil Antikorlar:

Antikor adı	Antikor çeşidi	Antikor kaynağı	Üretici/Kodu
anti-fare IgG-HRP	Poliklonal-konjuge	Keçi	Invitrogen/Thermo#31420
anti-tavşan IgG-HRP	Poliklonal-konjuge	Keçi	Invitrogen/Thermo#31423
anti-fare IgG-alexa 488	Poliklonal-konjuge	Keçi	Abcam#ab150117
anti-tavşan IgG-alexa 488	Poliklonal-konjuge	Keçi	Abcam# ab175471

5.5. Cihaz ve Gereçler

Spektrofotometre	:	Shimadzu BioSpec- 1601, Japonya
Çalkalayıcı etüv	:	N-Biotek, Güney Kore
Çalkalayıcı su banyosu	:	GFL, Almanya
Etüv (bakteri ve maya için)	:	Memmert, Almanya
Sterilizatör	:	Heraeus, Almanya
Manyetik karıştırıcı	:	Heidolph, Almanya
Yatay jel elektroforez cihazı	:	Labnet, ABD
U.V. Transillüminatör	:	Vilber Lourmat, Fransa
Otoklav	:	Kermanlar, Türkiye
Soğutmalı santrifüjler	:	Backman ve Sigma, ABD
Mikrosantrifüj	:	Hettich, Almanya
Ters/Inverted mikroskop	:	Olympus BH40, Japonya
Dikey jel elektroforez cihazları	:	Omnipage, İngiltere; Bio-Rad, ABD

pH metre	:	Hanna instruments, Portekiz
Steril çalışma kabini	:	Holten, Danimarka
Mikropipetler	:	Gillson-Thermo-Eppendorf
Floresan mikroskop	:	Olympus BH40, Japonya
Hassas terazi	:	Shimadzu, Japonya
Su banyoları	:	GFL-Thermolab ve Isolab, Almanya
PZR cihazları	:	ABI : ABD / Techne : ABD
Derin dondurucu (-80°C)	:	Panasonic, Japonya
Tüp karıştıcı (vorteks)	:	Heidolph, Almanya
CO2 etüv	:	Sanyo, Japonya
Gerçek Zamanlı PZR Cihazı	:	Bio-Rad, ABD

5.6. Besiyerleri

5.6.1. Luria Bertani (LB) besiyeri

10 gr tripton, 5 gr maya özütü ve 10 gr sodyum klorür ile distile su içerisinde çözdürüldü ve total hacmi 1 litre olacak şekilde hazırlandı. Hazırlanan LB besiyeri, 1 atmosfer basınç altında, 121 °C'da, 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi.

5.6.2. Luria Bertani agar (LBA) besiyeri

LB besiyerine %1,5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı. Hazırlanan LBA besiyerleri,1 atmosfer basınçta, 121 °C'da 20-25 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi. Gerekli durumlarda besiyerlerine 100 μg/ml final konsantrasyonda ampisilin eklendi.

5.6.3. YPAD (Yeast- Pepton-Adenin-Dekstroz) besiyeri

10 gr maya özütü, 20 gr pepton ve 0,1 gr adenin distile su içerisinde çözündürüldü ve 900 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için ortama 100-200 μl 2 N NaOH eklendi. Katı YPAD besiyerlerinin hazırlanmasında, otoklavlama işleminden önce besi ortamına %2 oranında agar katıldı. Besiyeri 1 atmosfer basınçta, 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi. Otoklav sonrası besiyerlerine 100 ml %20 (a/h) konsantrasyonda steril dekstroz çözeltisi eklendi. Agar eklenen besiyerleri 10 cm'lik

plastik petrilere döküldü ve oda sıcaklığında bekletilerek katılaşması sağlandı. Besiyerleri 4 °C'da saklandı.

5.6.4. YPD (Yeast- Pepton-Dekstroz) besiyeri

10 gr maya özütü ve 20 gr pepton distile su içerisinde çözündürüldü ve son hacmi 900 ml olacak şekilde hazırlandı. pH ayarı için besi ortamına 100-200 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi. Otoklav sonrasında besiyerine 100 ml %20 (a/h) konsantrasyonda steril dekstroz çözeltisi eklendi. Besiyerleri 4 °C'da saklandı.

5.6.5. Katı Sentetik Dekstroz (SD) besiyeri

6,7 gr amino asit içermeyen maya azot kaynağı (yeast nitrogen base: YNB) yaklaşık 500 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Üzerine 20 gr agar eklendi ve çözelti hacmi 800 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için besi ortamına 100-200 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyeri 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra çözeltiye 100 ml steril edilmiş %20 (a/h) dekstroz ve 100 ml x10 konsantre amino asit karışımı çözeltisi (drop out: DO) eklendi. Transformasyon deneylerinde seçici besiyeri olarak kullanılan katı SD besiyerlerine, otoklav sonrası 2 mM final konsantrasyonda 3-amino-1,2,4-triazol (3-AT) eklendi. Besiyeri 10 cm' lik petrilere döküldü ve oda sıcaklığında bekletilerek katılaşmaları sağlandı. Besiyerleri 4 °C'da saklandı.

5.6.6. Sentetik Dekstroz /+leu+his+ade (SD+LHA) besiyeri

1,34 gr amino asit içermeyen YNB distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 152 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için besi ortamına 20-30 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyeri 121 C'daºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra çözeltiye steril 20 ml %20 (a/h) konsantrasyonda dekstroz, 20 ml 10x konsantre DO çözeltisi, 2 ml 100x konsantre lösin, 2 ml 100x konsantre histidin ve 4 ml 50x konsantre adenin eklendi. Katı SD+LHA besiyeri hazırlamak için, otoklav öncesi ortama 2 gr agar eklendi. Otoklav sonrası gerekli maddeler eklendikten sonra 10 cm'lik petrilere döküldü ve oda sıcaklığında bekletilerek katılaşması sağlandı.

5.6.7. Sentetik Dekstroz /+his+ade (SD+HA) besiyeri

1,34 gr amino asit içermeyen YNB distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 154 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için besi ortamına 20-30 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyeri 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra çözeltiye steril 20 ml % 20 (a/h) konsantrasyonda dekstroz, 20 ml 10x konsantre DO çözeltisi, 2 ml 100x konsantre histidin ve 4 ml 50x konsantre adenin eklendi. Katı SD+THA besiyeri, otoklav öncesi ortama 2 gr agar eklenerek hazırlandı. Sterilizasyon sonrasında gerekli maddeler eklendi ve 10 cm'lik petrilere döküldü.

5.6.8. Memeli hücrelerinin üretilmesinde kullanılan besiyeri

Memeli hücrelerinin üretilmesinde glikoz konsantrasyonu 1 gr/L olan DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium) besiyeri (Gibco, ABD) kullanıldı. Öncelikle 4x konsantre stok besiyeri hazırlandı. Bunun için 20 gr toz haldeki DMEM, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 500 ml'ye tamamlandı ve 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Hücreleri üretme besiyeri, 125 ml 4x konsantre DMEM, 325 ml steril distile su, 50 ml FCS (fetal calf serum) ve 5 ml 100x konsantre penisilin/streptomisin (Gibco) karıştırılarak hazırlandı. Besiyerine 4-5 ml %7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek pH 7,3-7,4'e ayarlandı.

5.7. Çözeltiler

5.7.1. 10x Konsantre amino asit (+urasil) çözeltisi (Drop Out: DO)

Konsantre (x10) amino asitler çözeltisi; ade, his, leu ve trp içermeyen hazır amino asit karışımından (Clontech # DO Supplement/630428) hazırlandı. Bunu için 3 gr amino asit karışımı 500 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve otoklavda 121 ºC'da 20 dakika tutularak steril edildi.

5.7.2. 100x Konsantre lösin (Leu) çözeltisi

1 gr lösin distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi.

5.7.3. 100x Konsantre histidin (His) çözeltisi

0,5 gr histidin distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi.

5.7.4. 100x Konsantre triptofan (Trp) çözeltisi

1 gr triptofan distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi.

5.7.5. 50x Konsantre adenin (Ade) çözeltisi

0,5 gr adenin distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml olacak şekilde hazırlandı. Çözelti 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi.

5.7.6. 3- Amino-1,2,4-triazole (3-AT) çözeltisi (1 M)

0,84 gr 3-AT distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi ve 1 ml'lik porsiyonlar halinde -20 ºC'da saklandı. (3-AT Mw: 84)

5.7.7. Dekstroz çözeltisi (%20 –a/h)

100 gr dekstroz distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti 121 ºC'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi.

5.7.8. Akrialmid/bis-Akrilamid çözeltisi (%29 Akrilamid / %1 bis-Akrilamid – a/h)

29,0 gr akrilamid ve 1 gr bis-akrilamid distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçirildi ve 4-8 °C'da saklandı.

5.7.9. Amonyum persülfat (APS) çözeltisi (%10 – a/h)

1 gr amonyum persülfat, distile su içinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı.

5.7.10. Bloklama çözeltisi (%5'lik yağsız süt tozu)

25 gr yağı alınmış süt tozu, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 474 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x konsantre TBS ve 1 ml %10 sodyum azid (NaN_3) eklendi. Çözelti 4 °C'da saklandı.

5.7.11. Etidyum bromür (10 mg/ml)

0,1 g etidyum bromür, 10 ml distile su içerisinde çözündürülerek hazırlandı. Çözelti 4-8 °C'da saklandı.

5.7.12. %70 Etil alkol

70 ml saf etil alkol, distile su ile toplam hacmi 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

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

186,1 gr EDTA, 800 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Çözeltiye granül halinde NaOH eklenerek pH 8'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda 121 °C sıcaklıkta 20 dakika bekletilerek steril edildi. (EDTA, Mw:292,24)

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

Kristal haldeki fenol, 65°C'da çözündürüldü ve oksidasyonu önlemek için ortama %0,1 (a/h) final konsantrasyonda 8-hidroksikinolin eklendi. Üzerine eşit hacimde 0,5 M Tris-Cl tamponu (pH:8) eklenerek 30-60 dakika manyetik karıştırıcıda karıştırıldı. Fenol ve tamponun iki faz halinde ayrılması için, emülsiyon 4-8 °C'da, 60 dakika bekletildi ve üst faz uzaklaştırıldı. Aynı işlem 0,1 M Tris-Cl tamponu ile fenolün pH değeri >7,8 olana kadar tekrarlandı. Üst fazın yaklaşık %90'ı uzaklaştırıldı C'daTris-Cl tamponu ile doyurulmuş fenol, 25:24:1 (F:K:İ) oranlarında kloroform ve izoamil alkol ile karıştırıldı ve DNA çalışmalarında kullanılmak üzere 4-8 °C'da saklandı.

5.7.15. 5x Konsantre tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS)

40 gr NaCl, 1 gr KCl, 1 gr KH_2PO_4 ve 21,6 gr $Na_2HPO_4.7H_2O$, 800 ml distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7,4'e ayarlandıktan sonra toplam hacmi 1 litreye

tamamlandı. Hazırlanan T-FTS otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi. Çalışmalarda konsantre T-FTS steril deiyonize distile su ile 1:5 oranında seyreltilerek kullanıldı.

5.7.16. Glikoz çözeltisi (1 M)

90 g glikoz, distile su içerisinde çözündürüldü ve toplam hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi. (Glikoz, Mw:180,16)

5.7.17. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)

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

5.7.18. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M)

69,36 gr kalsiyum klorür, 100 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi. (Kalsiyum klorür, Mw:110,98)

5.7.19. Kapatma çözeltisi

10 mg parafenilindiamin 1 ml 20 mM Tris tamponunda (pH:8,8) çözündürüldü ve saf gliserin ile hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti -18-20°C'da saklandı.

5.7.20. Lityum asetat çözeltisi (1M)

10,2 gr lityum asetat distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçildi. (CH_3CO_2Li Mw: 102)

5.7.21. Lityum Asetat/PEG/TE çözeltisi (1M)

6,7 ml % 50 PEG, 1 ml 1 M LiAc, 0,2 ml 0,5M Tris-Cl (pH: 7,5), 0,02 ml 0,5M EDTA (pH: 7,5) distile su ile hacmi 9,6 ml'ye tamamlandı.

5.7.22. Mangan klorür çözeltisi (0,55M)

54,4 g $MnCl_2.4H_2O$, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. ($MnCl_2.4H_2O$, Mw:197,9)

5.7.23. %10 Nonidet P-40 (NP-40) çözeltisi

5 gr (4,72 ml) NP-40, distile su ile karıştırılarak hacmi 50 ml olacak şekilde hazırlandı. (NP-40, d: 1,06 gr/ml)

5.7.24. Paraformaldehit çözeltisi

3 gr paraformaldehit, 65 °C sıcaklıkta 70 ml distile su içinde çözündürüldü. Çözeltinin pH'sı 1N HCl ile yaklaşık 7-7,5 olacak şekilde ayarlandı (pH indikatör kağıdı ile kontrol edildi) ve hacimi distile suyla 80 ml'ye tamamlandı. Üzerine 20 ml 5x konsantre T-FTS eklendi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5.7.25. 1,4-piperazindietanesulfonik asit (PIPES) çözeltisi (1 M)

30,2 gr 1,4-piperazindietanesulfonik asit 80 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'si NaOH ile 7,5'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi distile su ile100 ml'ye tamamlandı ve otoklavda 121 °C'e 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi. (1,4-piperazindietanesulfonik asit, Mw:302,37)

5.7.26. Polietilen glikol (PEG) çözeltisi (%40 – a/h)

40 gr PEG-4 000, distile su içinde çözündürüldü ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

5.7.27. Polietilen glikol (PEG) / sodyum klorür (NaCl) çözeltisi (%20 / 1,25 M)

%40 PEG-4 000 çözeltisi ve 2,5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı (Sodyum klorür, Mw:58,44).

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

50 mg polietilenimin distile su içinde çözündürüldü ve hacmi 25 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildikten sonra 1 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C sıcaklıkta saklandı.

5.7.29. Potasyum asetat (KCH_3COO) çözeltisi (3 M)

29,44 gr potasyum asetat distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı. (Potasyum asetat, Mw:98,14)

5.7.30. Potasyum di-hidrojen fosfat (KH_2PO_4) çözeltisi (50 mM)

6,8 gr potasyum di-hidrojen fosfat distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı.(KH_2PO_4 Mw: 136,09)

5.7.31. di-Potasyum hidrojen fosfat (K_2HPO_4) çözeltisi (50 mM)

17,4 gr di-potasyum hidrojen fosfat distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı. (K_2HPO_4 Mw: 174,18)

5.7.32. Potasyum klorür (KCI) çözeltisi (2,5 M)

93,2 gr potasyum klorür distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı. (Potasyum klorür, Mw:74,55)

5.7.33. Salmon sperm DNA (ssDNA) çözeltisi (5 mg/ml)

50 mg salmon sperm DNA 10 ml TE tamponunda (pH: 8) çözündürüldü. Hazırlanan çözelti otoklavda 121°C'de 1 atmosfer basınç altında 1 dakika bekletildi. Otoklav sonrası ssDNA çözeltisine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Çözelti 4500 dev/dak hızda, 15 dakika oda sıcaklığında santrifüj edildi. DNA içeren üst faz ayrıldı ve üzerine 0,1 hacim 3M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etil alkol eklendi. Çözelti tüp karıştırıcıda 4-5 saniye karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10-15 dakika bekletildi ve 4500 dev/dak hızda 4°C' de 25 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi üzerine 5 ml %70 etil alkol eklendi ve tekrar 4500 dev/dak hızda 4 °C' de 5 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi oda sıcaklığında kurutuldu ve 8 ml TE tamponu içerisinde çözündürüldü. DNA konsantrasyonu 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçüm alınarak belirlendi ve final konsantrasyon TE çözeltisi eklenerek 5 mg/ml'ye ayarlandı. Denatüre edilmiş ve kırılmış salmon sperm

DNA örneği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra 0,5 ml'lik porsiyonlar halinde -20°C'da saklandı.

5.7.34. Sodyum bikarbonat ($NaHCO_3$) çözeltisi (%7,5)

7,5 gr sodyum bikarbonat, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 μm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5.7.35. Sodyum deoksikolat çözeltisi (%10)

5 gr sodyum deoksikolat (3α,12α-Dihidroksi-5β-kolanik asit sodyum tuzu) distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

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

10 gr sodyum dodesil sülfat, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı.

5.7.37. Sodyum hidroksit (NaOH) çözeltisi (2 N)

8 gr sodyum hidroksit, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı. (Sodyum hidroksit, Mw:39,99)

5.7.38. Sodyum klorür (NaCI) çözeltisi (2,5 M)

36,6 gr sodyum klorür, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 250 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı. (Sodyum klorür, Mw:58,5)

5.7.39. Sodyum di-hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (200 mM)

3,12 gr sodyum di-hidrojen fosfat deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı. ($NaH_2PO_4.2H_2O$ Mw: 156,02)

5.7.40. di-Sodyum hidrojen fosfat (Na_2HPO_4) çözeltisi (200 mM)

5,67 gr di-sodyum hidrojen fosfat distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı. (Na_2HPO_4 Mw: 141,96)

5.7.41. %0,25 Tripsin çözeltisi

0,25 gr tripsin, 100 ml T-FTS içerisinde çözündürüldü ve 0,2 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi. Hazırlanan çözelti 10 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı.

5.7.42. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0,05 Tripsin, %0,05 EDTA-a/h)

10 ml %0,25 tripsin, 39,5 ml steril T-FTS ve 0,5 ml %5 EDTA (pH. 7,4) karıştırılarak hazırlandı. Hazırlanan çözelti 4 °C'da saklandı.

5.7.43. Tween-20 çözeltisi (%10)

5 gr (4,5 ml) Tween-20, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin toplam hacmi 50 ml'ye tamamlandı. Hazırlanan çözelti oda sıcaklığında saklandı. (Tween-20 d=1,11g/ml)

5.8. Tamponlar

5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu

2 ml 1 M PIPES, 2 ml 2,5 M $CaCl_2$, 20 ml 2,5 M KCl ve 150 ml distile su karıştırıldı. Çözeltinin pH'sı 6,7'ye ayarlandı. Daha sonra çözeltiye 20 ml 0,55 M $MnCl_2$ eklendi, hacmi distile su ile 200 ml'ye tamamlandı. Tampon 0,2 µm fitreden geçirilerek steril edildi.

5.8.2. DNA ekstraksiyon tamponu I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glikoz, 10 mM EDTA, pH 8,0)

5 ml 1 M Tris-Cl, 10 ml 1 M glikoz ve 4 ml 0,5 M EDTA çözeltisi karıştırıldı, distile su ile çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı.

5.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu II (0,2 N NaOH, %1 SDS)

Bir hacim 2 N NaOH, 1 hacim %10 SDS çözeltisi ve 8 hacim distile su karıştırılarak hazırlandı.

5.8.4. DNA ekstraksiyon tamponu III (3 M Potasyum, 5 M Asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11,5 ml glasiyal asetik asit, distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (Potasyum asetat, Mw: 98,14).

5.8.5. 50x Konsantre tris-asetat-EDTA (TAE) tamponu

242 gr Tris, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözelti hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyal asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA çözeltisi (pH 8,0) eklendi. Konsantre tampon elektroforez deneylerinde 1:50 oranında seyreltildikten sonra kullanıldı.

5.8.6. 6x Konsantre DNA yükleme tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6,55 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra 3,45 ml %87'lik gliserin eklenerek çözelti hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

5.8.7. 10x Konsantre 3-(N-morfolino)propansulfonik asit (MOPS) tamponu

41,8 gr 3-(N-morfolino)propansulfonik asit, 700 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve pH'sı NaOH ile 7,0'ye ayarlandı. Çözeltiye 20 ml 1 M sodyum asetat, 20 ml 0,5 M EDTA (pH: 8) eklendi ve hacmi distile su ile 1 litreye tamamlandı. Tampon 0,45 µm fitreden geçirilerek steril edildi.

5.8.8. 4x Konsantre ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, %0,4 SDS– a/h, pH 8,8)

45,4 gr Tris ve 1 gr SDS, 200 ml distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 8,8'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi distile su ile 250 ml'ye tamamlandı (Tris, Mw: 121,1).

5.8.9. 4x Konsantre paketleme jeli tamponu (0,5 M Tris, %0,4 – a/h SDS, pH 6,8)

6,05 gr Tris ve 0,4 gr SDS, 80 ml distile su içinde çözündürüldü ve çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6,8'e ayarlandı. Çözeltinin hacmi distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

5.8.10. 5x Konsantre tris-glisin tamponu (0,125 M Tris, 1,25 M Glisin, pH 8,3)

37,88 gr Tris ve 234,6 gr glisin, distile su içinde çözündürüldü, pH'sı 8,3'e ayarlandıktan sonra çözeltinin hacmi 2,5 litreye tamamlandı (Glisin, Mw: 75,07).

5.8.11. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris, 250 mM Glisin, %0,1 – a/h SDS, pH 8,3)

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

5.8.12. Protein transfer tamponu

200 ml 5x tris-glisin tamponu, 100 ml metanol ve 700 ml distile su karıştırılarak hazırlandı.

5.8.13. 4x Konsantre protein yükleme tamponu (0,2 M tris; %8 SDS - a/h; %0,2 bromofenol mavisi - a/h ; %4 2-merkaptoetanol - h/h; %40 gliserin - h/h, pH 6,8)

1,21 gr Tris, 4 gr SDS ve 0,1 gr bromofenol mavisi, 20 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve üzerine 2 ml 2-merkaptoetanol ile 23 ml %87'lik gliserin eklendi ve 1 N HCl ile çözeltinin pH'sı 6,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

5.8.14. RIPA tamponu (50 mM Tris, pH 8; 5 mM EDTA, pH 8; 150 mM NaCl; %1 NP- 40, %0,5 sodyum deoksikolat; %0,1 SDS)

5 ml 1 M Tris-Cl (pH 8), 1 ml 0,5 M EDTA (pH 8), 6 ml 2,5 M NaCl, 10 ml %10 NP-40, 5 ml %10 sodyum deoksikolat ve 1 ml %10 sodyum dodesil sülfat distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.15. Sodyum asetat ($CH_3COONa.3H_2O$) tamponu (3 M)

12,3 gr sodyum asetat, 40 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve pH'sı 5,2'ye ayarlandıktan sonra hacmi 50 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (Soydum asetat, Mw: 82,03).

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

121,1 gr Tris, 800 ml distile su içerisinde çözündürüldü ve pH'sı 3 N HCl çözeltisi ile 8'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Tris-Cl tamponu otoklavda 121°C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi (Tris, Mw: 121,1).

5.8.17. Tris-EDTA (TE) tamponu (10 mM Tris; 1 mM EDTA, pH 8,0)

5 ml 1 M Tris-Cl tamponu (pH 8,0), 1 ml 0,5 M EDTA çözeltisi (pH 8,0) 494 ml distile su ile karıştırılarak hazırlandı.

5.8.18. 20x Konsantre TBS tamponu

160 gr NaCl, 4 gr KCl ve 60 gr Tris, 800 ml distile su içerisinde çözündürüldükten sonra pH'sı 7,4'e ayarlandı ve çözeltinin hacmi 1 litreye tamamlandı. Tampon otoklavda 121°C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika bekletilerek steril edildi.

5.8.19. TBS ve TBS-T tamponu

50 ml 20x TBS tamponu, distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı. TBS-T tamponu hazırlamak için ortama 10 ml %10 Triton X-100 eklendi.

5.8.20. Potasyum fosfat (K_2HPO_4) tamponu (50 mM, pH 7,5)

200 ml 50 mM di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi üzerine, pH değeri 7,5 olacak şekilde 50 mM potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.8.21. Sodyum fosfat tamponu (200 mM, pH 7,0)

100 ml 200 mM di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi üzerine, pH değeri 7 olacak şekilde 200 mM sodyum di-hidrojen fosfat çözeltisi eklenerek hazırlandı.

5.8.22. Z tamponu (100 mM fosfat tamponu, 10 mM KCl, 1 mM $MgSO_4$)

50 ml 200 mM sodyum fosfat tamponu (pH: 7,0), 0,4 ml 2,5 mM KCl, 0,2 ml 0,5 mM $MgSO_4$ 49,4 ml deiyonize distile su karıştırılarak hazırlandı.

5.8.23. Z (+) tamponu

50 ml Z tamponuna 175 µl 2-β-merkaptoetanol eklenerek hazırlandı.

5.9. Plazmit Vektörler

Tez kapsamında gerçekleştirilen maya ikili-hibrid testlerinde doğal ve delesyonlu *Sorting Nexin* 2 (SNX2) proteinlerini kodlayan genlerin klonlanmasında maya GAL4 transkripsiyon faktörü aktivasyon domainini kodlayan gene sahip pACT2 maya ekspresyon vektörleri kullanıldı. Bu deneylerde bait (yem) olarak kullanılan, GAL4 transkripsiyon faktörü bağlanma domaini ile kaynaşmış halde influenza A virüsü PA proteinlerini kodlayan plazmitler (pGBD-PA, PA-pGBD, nPA-pGBD ve pGBD-cPA) 112S518 no'lu TÜBİTAK projesi kapsamında Prof. Dr. Kadir TURAN tarafından oluşturulmuştur. Memeli hücrelerinde SNX2 ve PA proteinlerinin geçici olarak sentez edilmesinde kullanılan ekspresyon vektörlerinin hazırlanmasında pCAGGS (Tsai ve ark., 1995), pCHA (Nagata ve ark., 1998) ve pCAGGS-GST (Sugiyama ve ark., 2015) plazmitlerinden yararlanıldı. Bu plazmitler Tsukuba Üniversitesi (Japonya) Enfeksiyon Biyolojisi (Viroloji) Laboratuvarından temin edildi.

5.10. Virüsler

Konak proteinlerinin viral replikasyona etkileri ve viral proteinler ile etkileşimlerinin saptanması için kurulan enfeksiyon deneylerinde insan tipi influenza A/WSN/33-H1N1 (WSN) ve kuş tipi influenza A/duck/Pennsylvania-H5N2 (DkP) virüsleri kullanıldı.

5.11. Bakteriler

Plazmit vektörlerin oluşturulması ve çoğaltılmasında *E. coli* DH5α ve Mach1 bakteri suşlarından faydalanıldı.

5.12. Maya hücreleri

Maya ikili-hibrid metodu kullanılarak influenza A virüsü PA proteini ile insan delesyonlu SNX2 proteinlerin etkileşimlerinin saptanması yönündeki çalışmalarda konak hücre olarak *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A maya ırkı kullanıldı.

Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A: *MAT*a *trp1-901 leu2-3,112 ura3-52 his3-200 gal4(delesyon) gal80(delesyon)LYS2::GAL1-HIS3 GAL2-ADE2 met2::GAL7-lacZ*

5.13. Memeli Hücre Hatları

Memeli hücrelerinde insan SNX2 proteininin influenza A virüsü polimeraz enzimi ile ilişkilerinin araştırılmasına yönelik çalışmalarda insan orijinli HeLa (servikal kanser hücreleri) ve HEK293 (embriyonik böbrek hücreleri) hücre hatları kullanıldı. Bu hücre hatlarından HeLa ilk olarak 1951 yılında Henrietta Lacks isimli serviks kanseri bir hastasının kanserli dokusundan George Gey (Jones ve ark., 1971) tarafından izole edilmiş ve hücre hattı olarak üretilmiştir. HEK-293 hücre hattı ise 1970'li yıllarda Graham ve Alex Van der Eb (Graham ve van der Eb, 1973) tarafından oluşturulmuştur. HEK293 hücreleri hızlı çoğalmaları ve DNA transfeksiyon frekansının yüksek olması gibi özellikleri nedeniyle bilimsel araştırmalarda çokça tercih edilirler.

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

Plazmitlerin oluşturulması ve çoğaltılması aşamalarında konak bakteri olarak *Escherichia coli* DH5α ve/veya Mach1 ırkı kullanıldı. Bu amaçla, -80 °C'da saklanan bakteri stoğundan LBA katı besiyerine öze ile steril koşullarda ekim yapıldı ve 37 °C'da bir gece üretildi. Katı besiyerinde oluşan kolonilerden 2-3 koloni steril kürdan ile alındı ve 5 ml LB sıvı besiyerine ekim yapıldı. Bakteriler 37 °C'da 150 dev/dak çalkalama hızında bir gece üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik doygun kültür 150 ml taze LB besiyerine aktarıldı ve 25 °C'da 150 dev/dak çalkalama hızında inkübe edildi. Kültürün 600 nm dalga boyunda oprik densite (OD_{600}) değeri ortalama 0,25-0,3'e eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4 °C'da 10 dakika, 6000 dev/dak hızda santrifüj edildi ve bakteriler çöktürüldü. Çökelti 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15-20 dakika buzlu su içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 6000 dev/dak 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. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı.

5.15. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada DNA moleküllerinin analizinde %1-1,5'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Bunun için 1 g ya da 1,5 g agaroz 98 ml deiyonize distile su içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 65-70 °C'a düştüğünde üzerine 2 ml 50x konsantre TAE ve 0,1-0,2 µg/ml final konsantrasyonda etidyum bromür eklendi. Çözelti yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel, katılaştıktan sonra TAE tamponu içeren elektroforez tankına yerleştirildi. DNA örnekleri 5:1 oranında 6x konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırılarak jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 25-30 dakikada tamamlandı. Agaroz jel de yürütülen DNA örnekleri UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.16. RNA Analizleri için Formaldehitli Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Formaldehitli jel için 1,5 g agaroz, 80 ml distile su içerisinde kaynatıldı. Üzerine 10 ml 10x konsantre MOPS tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 55-60 °C'ye düştüğünde 9 ml %37 formaldehit eklendi. Çözelti yatay jel kasetlerine dökülerek katılaşması sağlandı. Elektroforez işlemi 1x konsantre MOPS tamponu içerisinde gerçekleştirildi. RNA örnekleri eşit hacimlerde 2x konsantre RNA jel yükleme tamponu ile karıştırıldı ve jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 V sabit direnç altında 45 dakikada tamamlandı. Jeller 0,2 µg/ml konsantrasyonda etidyum bromür içeren distile su içerisinde 30-45 dakika bekletildi. RNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirilerek fotoğrafları çekildi.

5.17. Hücrelerden Total RNA İzolasyonu

Farklı kültür plaklarında (24-kuyulu/12-kuyulu/6-kuyulu) DMEM besiyerinde üretilen hücreler 5-10 dakika tripsin/EDTA çözeltisinde bekletildi. Petri yüzeyinden koparılan hücreler, uygun hacimde besiyerinde süspanse ve 1000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltisi, 200 µl T-FTS içerisinde yeniden süspanse edildi ve RNA izolasyonunda kullanıldı. Total RNA izolasyonunda ticari RNA izolasyon kiti (Roche) kullanıldı ve üretici firma tarafından önerilen yöntem izlendi. Hazırlanan hücre süspansiyonu üzerine 400 µl liziz çözeltisi eklendi ve tüp karıştırıcıda 5-10 saniye karıştırıldı. Hücre lizatı kolonlu bir tüpe aktarıldı ve 10 000

dev/dak hızda 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. RNA bağlı kolon, sırasıyla 500 µl yıkama çözeltisi I ve yıkama çözeltisi II ile yıkandı. Son aşamada kolona 50 µl elüsyon tamponu eklendi ve 10 000 dev/dak hızda 1 dakika santrifüj edilerek RNA molekülleri elüe edildi. Elde edilen total RNA, -80 °C'da saklandı.

5.18. Spektrofotometrik Yöntemle DNA'nın Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalitesi spektrofotometik yöntemle belirlendi. Örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki UV ışığı absorbans değerleri belirlendi ve aşağıda verilen formül uygulanarak miktarları hesaplandı.

DNA konsantrasyonu (µg/ ml) = OD260 D. Kd

RNA konsantrasyonu (µg/ ml) = OD260 D . Kr

[OD_{260}, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçülen örneklerin absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; Kd, (50 µg/ml)]. DNA örneklerinin OD_{260}/OD_{280} değerlerine bakılarak saflıkları hakkında fikir edinildi. (Bu oran kaliteli DNA için ~1,8; RNA için ~2,0 olmalıdır) (Maniatis ve ark., 1982).

5.19. Total RNA Üzerinden cDNA'ları Elde Edilmesi

HEK-293 ya da HeLa hücrelerinden elde edilen total RNA üzerinden oligo dT primer ya da gene özgü primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA'lar hazırlandı. İnfluenza virüsleri ile enfekte edilen hücrelerde segment 8 üzerinden viral mRNA (+cRNA) kantitasyonu için hazırlanacak cDNA'lar için 5'-TACAGAGGCCATGGTCATTT-3' (WSN) ya da 5'-TCTGACTTCAACTCTTTCTCGC-3' (DkP) dizisine sahip oligonukleotid primerler kullanıldı. Reverz transkripsiyon reaksiyonu 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. 1,5 ml'lik plastik tüpe ~500 ng total RNA ve 50 pmol oligo dT primer (ya da 5 pmol gene özgü primer) eklendi ve hacim 12,5 µl'ye tamamlandı. Ortamdaki RNA molekülleri 65 ºC'da 10 dakika tutularak denatüre edildi. Daha sonra reaksiyon ortamına sırasıyla 4 µl 5x konsantre reaksiyon tamponu, 0,5 µl (40U/µl) RNaz inhibitörü, 2 µl (10 mM) dNTP karışımı 1 µl (100U µl) reverz transkriptaz enzimi (Toyobo) eklendi. Reaksiyon 45 °C'da 60 dakikada tamamlandı. Reaksiyon ortamı 80 °C'da 10 dakika bekletilerek reverz transkriptaz enzimi inhibe edildi ve ileride kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.20. Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

Tez çalışması kapsamında insan SNX2 proteini ile influenza A virüsü PA proteini arasındaki ilişkiyi hem memeli hücrelerinde hem de maya hücrelerinde araştırmak amacıyla bir dizi ekspresyon vektörü oluşturuldu.

5.20.1. Delesyonlu SNX2 kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması

İnsan orijinli HEK293 ve HeLa hücrelerinde doğal ve delesyonlu SNX2 proteinlerini kodlayacak plazmit vektörler, SNX2 cDNA'larının pCHA plazmitine klonlanması ile elde edildi. Tam boyutta SNX2 varyant.1 cDNA'sı taşıyan pCHA-SNX2 plazmiti Prof. Dr. Kadir TURAN tarafından (TÜBİTAK projesi: 112S518) oluşturulmuştur. İnsan SNX2 geninin 1-3. ekzon (SNX2dN) bölgesi, 4-8. ekzon (SNX2dM) bölgesi ve 9-15. ekzon (SNX2dC) bölgeleri çıkartılmış, bu bölgeler bakımından delesyonlu SNX2 proteini kodlayan plazmit vektörler, pCHA-SNX2 plazmiti üzerinden aşağıda verilen oligonukleotit primerler kullanılarak ters (inverz) PZR tekniği ile elde edildi.

Primerler:

Primer adı	Nükleotid dizisi (5'- 3')
pCHA–TAG-For	TAGATATCTTAAGTGACTGAATTC
pCHA-Vec-Rev	GATATCACGCGTGGTGACC
SNX-dN-For	*ATGATTGAAGAAGAAGCAAATGG*
SNX-dM-For	CTGCCTAGAGCAGTTAATACAC
SNX-dM-Rev	CTCTTCCCTGGATCTATCAAAG
SNX-dC-Rev	CTCTGAACTTTCCAAGAACTG

pCHA-SNX2 plazmit vektörü üzerinde SNX2 genine ait belirli ekzon bölgelerinin dışında kalan kısmının çoğaltılmasında kullanılan primer çiftleri, PZR öncesinde T4-polinukleotid kinaz enzimi ile fosforillendi. Bunun için aşağıda verilen reaksiyon karışımı hazırlandı. Reaksiyon ortamı 37 °C'da 1 saat bekletildi ve sonrasında 85 °C'da 5 dakika bekletilerek T4 polinukleotid kinaz enzimi inaktive edildi.

Reaksiyon Karışımı

İleri primer	:	*2,0 µl (200 pMol)*
Geri Primer	:	*2,0 µl (200 pMol)*
rATP karışımı (100 mM)	:	*0,8 µl*
Reaksiyon tamponu (x10)	:	*2,0 µl*
Deiyonize distile su	:	*12,7 µl*
T4 polinukleotid kinaz (10U/µl)	:	*0,5 µl*
Toplam hacim	:	***20,0 µl***

Ters PZR 0,2 ml'lik plastik tüplerde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı. Delesyonlu SNX2-dN kodlayan plazmit için pCHA-Vec-Rev/SNX-dN-For primer çifti; SNX2-dM kodlayan plazmit için SNX-dM-For/SNX-dM-Rev primer çifti; SNX2-dC kodlayan plazmit için ise pCHA–TAG-For/SNX-dC-Rev primer çifti kullanıldı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

pCHA-SNX2 (10 ng/ µl)	:	*2,0 µl*
Fosforillenmiş İleri/Geri Primer karışımı (5 pmol/ µl)	:	*4,0 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM)	:	*4,0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	:	*2,0 µl*
Tampon (x10)	:	*4,0 µl*
Deiyoize distile su	:	*23,25 µl*
KOD-plus (1U/µl)	:	*0,75 µl*
Toplam hacim	:	***40,0 µl***

Reaksiyon koşulları, 95 °C'da 5 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü, "95°C - 20 sn" / "50-58°C arası- 20 sn" / "68°C-6 dk" ve bir döngü 68 °C'da - 10 dk olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. İnverz PZR ile çoğaltılan SNX2 geninin belirli bölgeleri delesyonlu DNA fragmentler jel ekstraksiyon kiti ile saflaştırıldı ve ligasyonda kullanıldı.

PZR Ürünlerinin Agaroz Jel Elektroforezi ile Saflaştırılması

PZR ile elde edilen ürünler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. Bunun için PZR ürünlerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Ortam 14 000 dev/dak hızda, oda sıcaklığında 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. Örnekler 10-15 dakika buz üzerinde bekletildi. DNA molekülleri 4°C'da 15 dakika 14 000 dev/dak hızda santrifüj edilerek çökeltildi. DNA çökeltisi %70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 20 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA çözeltileri 0,2-0,3 hacim 6x konsantre DNA yükleme tamponu ile karıştırıldı ve %1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit direnç altında 25-30 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası beklenen boyutlardaki DNA bantları, UV ışık altında bir bisturi yardımıyla kesilip çıkartıldı ve 1,5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. DNA moleküllerinin agaroz jelden geri alınmasında DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen) kullanıldı. Ekstraksiyon işlemleri üretici firma tarafından önerilen yönteme uygun olarak gerçekleştirildi. Saflaştırılan DNA örnekleri ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Ligasyon ve Transformasyon

Yukarıda 5.20.1.'de açıklandığı şekilde hazırlanan SNX2 genine ait belirli ekzonları taşımayan fosforillenmiş doğrusal plazmit DNA'ları kendi içlerinde ligasyona uğratılarak halkasal şekle dönüştürüldü. 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 20-30 ng DNA örneği distile su eklenerek 12,5 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına 1,5 µl 10x konsantre T4-ligaz tamponu ve 1 µl (1U) T4 DNA ligaz (TaKaRa) eklendi. Ligasyon 15 °C'da 15-16 saat sürede tamamlandı ve sonrasında ligasyon ürünleri kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Bunun için örneklere 5.14.'te anlatıldığı şekilde hazırlanan kompetent *E. coli* hücrelerinden 100 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 1 dakika 42 °C'da su banyosunda, 2 dakika buz üzerinde sonrasında 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Transformasyon ortamına 500 µl antibiyotik içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 30-45 dakika inkübe

edildi. Daha sonra hücre süspansiyonundan 150 µl, antibiyotikli LBA besiyerine cam baget ile yayılarak ekildi ve 37 °C'da 1 gece üremeye bırakıldı. Plazmit alan, pozitif transformant koloniler, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi ve bu kolonilerden hazırlanan 5 ml sıvı kültürlerden küçük ölçekte plazmit DNA'lar izole edildi.

Koloni-PZR Yöntemi ile Pozitif Kolonilerin Saptanması

Transformasyon sonrası katı besiyerlerinde oluşan kolonilerden her bir plazmit örneği için ortalamam 8-12 koloni, steril kürdan ile alınarak 5 µl distile su içerinde süspanse edildi. Hücrelerin parçalanmasını sağlamak amacıyla örnekler PZR cihazında 95 °C'da 5 dakika bekletildikten sonra buz üzerine alındı. Örneklerin üzerine 2 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu, 1 µl (10 pmol/µl) ileri primer (pCHA-seq-For: 5'-*GTTCGGCTTCTGGCGTGTGA*-3'), 1 µl (10 pmol/ µl) geri primer (pCHA-seq-Rev: 5'-*CACACCAGCCACCACCTTCT*-3'), 1 µl dNTP (2.5 mM), 2 µl $MgCl_2$ (25 mM), 9 µl deiyonize distile su ve 0.2 µl Taq DNA polimeraz enzimi (5U/µl) eklendi. (Fazla sayıda örnekle çalışıldığı için örnek sayısıyla orantılı olarak bir karışım hazırlandı ve bu karışımdan her bir PZR tüpüne 15 µl eklendi). PZR koşulları 95 °C'da 2 dakika ön denatürasyondan sonra 30 döngü, 95 °C-20 sn/ 53 °C-20 sn/ 72 °C-1 dakika olarak belirlendi. Elde edilen PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

5.20.2. GAL4 aktivasyon domaini ile kaynaşmış halde SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteinleri kodlayan maya ekspresyon vektörlerinin oluşturulması

Doğal ve belirli ekzon bölgeleri delesyona uğranılmış *SNX2* genleri, maya ikili-hibrit metodu ile SNX2 ve PA proteinleri arasındaki etkileşimi değerlendirmek amacıyla pACT2 plazmitinde GAL4-AD kodlayan dizi ile kaynaşmış halde klonlanarak bir dizi maya ekspresyon vektörü elde edildi. Bunun için aşağıda verilen yol izlendi.

SNX2 ve delesyonlu SNX2 cDNA'larının elde edilmesi

SNX2, SNX2dN, SNX2dM ve SNX2dC cDNA'ları aşağıda Tablo 2'de verilen plazmit vektörler üzerinden fosforillenmiş primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı.

Tablo 2. SNX2 ve delesyonlu SNX2 cDNA'larının PZR ile çoğaltılmasında kullanılan plazmit vektörler ve oligonukleotit primerler.

cDNA	Kalıp Plazmit	Primer Adı	Primer Dizisi
SNX2	pCHA-SNX2	SNX2-For	ATCATGGCGGCCGAGAGGGAA
		SNX2-Rev	ATCTAGGCAATGGCTTTGGCTTC
SNX2dN	pCHA-SNX2dN	SNX2dN-For	*ATGATTGAAGAAGAAGCAAATGG*
		SNX2-Rev	ATCTAGGCAATGGCTTTGGCTTC
SNX2dM	pCHA-SNX2dM	SNX2-For	ATCATGGCGGCCGAGAGGGAA
		SNX2-Rev	ATCTAGGCAATGGCTTTGGCTTC
SNX2dC	pCHA-SNX2dC	SNX2-For	ATCATGGCGGCCGAGAGGGAA
		SNX2dC-Rev	CTCTGAACTTTCCAAGAACTG

PZR 0,2 ml'lik tüplerde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı.

PZR İçin Reaksiyon Karışımı

Plazmit DNA(10 ng/µl)	:	*2,0 µl*
Fosforillenmiş primer çifti (10 pM /µl)	:	*2,0 µl*
dNTP karışımı (2,5 mM)	:	*2,0 µl*
$MgSO_4$ (25 mM)	:	*2,0 µl*
Tampon (x10)	:	*4,0 µl*
Deiyoize distile su	:	*27,5 µl*
KOD-plus (1U/µl)	:	*0,5 µl*
Toplam hacim	:	***40,0 µl***

Reaksiyon koşulları, tüm cDNA'lar için 95 °C da 5 dakika ön denatürasyondan sonra 32 döngü, 95°C-15 sn / 55°C-15 sn / 68°C-75 saniye ve bir döngü 68°C da 10 dakika olarak belirlendi. Elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

pACT2 plazmit DNA'sının ligasyon için hazırlanması

pACT2 plazmit DNA'sı GAL4-AD kodlayan diziden hemen sonra *Bgl*II noktasından kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu işlemler için 5 µg pACT2 plazmit DNA'sı, deiyonize distile su ile 45 µl'ye tamamlandı, üzerine 5 µl 10x konsantre reaksiyon tampon ve 1 µl (10U) *Bgl*II restriksiyon endonükleazı eklendi ve 37 °C'da 1 saat

inkübe edildi. Plazmit DNA'nın kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Reaksiyon ortamı, daha önce belirtilidği şekilde eşit hacimde fenol: kloroform: izoamil alkol ile ekstre edildi ve üst fazda kalan DNA etil alkol ile çöktürüldü. Çökelti 42,5 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, üzerine 2,5 µl 2,5 mM dNTP ve 1 µl (1U) Klenow enzimi eklendi ve 30 dakika 37 °C'da inkübe edildi. Sonrasında ortam 65 C'da 20 dakika bekletilerek Klenow enzimi inaktive edildi. Deforsforilasyon için reaksiyon ortamına 2 µl (2U) SAP (*İng. shrimp alkaline phosphatase*) eklendi ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA örneği fenol: kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. DNA çökeltisi 30 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Ligasyon ve Transformasyon

PZR ile çoğaltılan SNX2 cDNA'ları ve doğrusal hale getirilen pACT2 plazmit DNA'larının yaklaşık konsantrasyonları agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Yaklaşık 20-30 nanogram plazmit DNA'sı ve 50-100 ng SNX2 cDNA örnekleri ile karıştırıldı. Reaksiyon karışımının hacmi, deiyonize distile su ile 16 µl'ye tamamlandı. Reaksiyon ortamına 2 µl 10x T4 DNA ligaz tamponu ve 2 µl T4 DNA ligaz enzimi (TaKaRa) eklendi. Ligasyon 15 °C'da yaklaşık 15-16 saatte tamamlandı. Ligasyon sonrası örnekler 5.15'de anlatıldığı şekilde kompetent *E. coli* hücrelerine transforme edildi. Transformatlar arasından pozitif koloniler koloni-PZR ile seçildi. SNX2, SNX2dN ve SNX2dM geni taşıyan plazmit vektörlerin seleksiyonunda *pGAD seq For* (5'-*CGATGATGAAGATACCCCAC-3'*) ve *SNX-2 Rev* (*ATCTAGGCAATGGCTTTGGCTTC*) primer çifi; SNX2-dC geni taşıyan plazmitlerin seleksiyonunda ise *pGAD seq For* ve *SNX2dC-Rev* (*CTCTGAACTTTCCAAGAACTG*) primer çiftinden yararlanıldı.

5.21. Küçük Ölçeklerde Plazmit DNA İzolasyonu

Koloni-PZR sonucunda pozitif sonuç veren bakteri kolonilerinden 3 ml doygun kültürler hazırlandı. Bunun için steril kürdan ile alınan koloniler 3 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve ortam 37 °C'da 120 dev/dak çalkalanma hızında 15-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler 8000 dev/dak hızda 5 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 karıştırıldıktan sonra 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Parçalanan hücrelerin üzerine 150 µl DNA ekstraksiyon tamponu III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 10-15 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genom DNA'ları, 4 °C'da, 14000 dev/dak hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA'ları içeren üst sıvı üzerine 2,5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 10 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 20 °C'da, 14000 dev/dak hızda 10 dakika santrifüj edilerek DNA çökeltildi. DNA çökeltisi 1 ml %70 etil alkol ile yıkandı ve kurutuldu. Kurutulduktan sonra 100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri PEG/NaCl çözeltisi kullanılarak çöktürülerek kısmen saflaştırıldı.

5.22. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile Saflaştırılması ve Dizi Analizleri

Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrulukları gösterilen plazmit DNA'ları PEG/NaCl ile çöktürme yöntemiyle kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizine tabi tutuldu. TE tamponu içerisinde çözündürülen DNA örneklerinin üzerine 4 hacim PEG : NaCl (%20-a/h : 1,25M) çözeltisi eklendi ve iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat buz üzerinde bekletildi. Sürenin sonunda 4 °C'da 14000 dev/dak hızda, 20 dakika santrifüj edildi. Üst sıvı atıldı ve çökelti 1 ml %70 etil alkol ile yıkandı. DNA çökeltileri kurutuldu ve 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Uygun görülen DNA örnekleri dizi analizlerinde kullanıldı. DNA dizi analizleri için hizmet alımına gidildi.

5.23. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

Memeli hücrelerinde ekspresyon için oluşturulan plazmit vektörler orta ölçekte çoğaltıldı ve memeli hücrelerine transfekte edilebilecek kalitede saflaştırıldı. Bu amaçla ilgili plazmitleri taşıyan bakteri kolonilerinden steril bir kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekim yapıldı ve 37 °C'da bir gece üretilerek ön kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 150 ml ampisilin içeren taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 37 °C'da 120 dev/dak çalkalanma hızında 15-16 saat süreyle üretildi. Hazırlanan kültürler plazmit DNA izolasyonunda kullanıldı. Plazmitlerin

izolasyonunda orta-ölçekte plazmit izolasyon kiti (Qiagen) kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA örnekleri 500-750 µl TE tamponunda çözündürüldü. DNA örneklerinin miktarı ve kalitesi, 5.19'da anlatıldığı gibi 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçümler alınarak saptandı. Elde edilen plazmit vektörler uygun restriksiyon enzimi ile yeniden kesilerek kontrol edildi ve -20 °C'da saklandı.

5.24. Plazmit DNA'lar Restriksiyon Endonukleaz Enzimi ile Kesilerek Kontrol Edilmesi

Çalışma kapsamında oluşturulan ve gerek küçük ölçeklerde gerekse orta ölçeklerde hazırlanan plazmit DNA'lar deneylerde kullanılmadan önce Tablo 3'te restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilerek kontrolleri yapıldı. Kesimi yapılan plazmitler ve bu plazmitlerin kesi Bunun için 0,5-1 µg arasında değişen miktarlarda DNA örnekleri deiyonize distile su ile 18 µl'ye tamamlandı. Ortama 2 µl kesimde kullanılan enzimler için uygun x10 konsantre tampon ve 2-5 U arasında değişen miktarlarda restriksiyon endonukleaz enzimi, 0,4 µl (10 µg/µl) RNaz enzimi (küçük ölçekte hazırlanan DNA örneklerine) eklendi. Reaksiyon karışımları 37 °C'da 1-2 saat su banyosunda bekletildi. Daha sonra örneklere 5 µl 6x konsantre DNA jel yükleme tamponu eklendi ve agaroz jel elektroforezi ile analiz edildi.

Tablo 3. Tez çalışmaları kapsamındaki plazmitler için kullanılan restriksiyon endonukleaz eznzimleri ve reaksiyon tamponları.

Plazmit	Restriksyon endonukleaz enzim(ler)i	x10 Reaksiyon Tamponu
pCHA-SNX2	EcoRI (NEB)	NEBuffer 2.1
pCHA-SNX2dN	EcoRI (NEB)	NEBuffer 2.1
pCHA-SNX2dM	EcoRI (NEB)	NEBuffer 2.1
pCHA-SNX2dC	EcoRI (NEB)	Tango Buffer
pACT2-SNX2	DraI (Fermentas)	Tango Buffer
pACT2-SNX2dN	DraI (Fermentas)	Tango Buffer
pACT2-SNX2dM	DraI (Fermentas)	Tango Buffer
pACT2-SNX2dC	DraI (Fermentas)	Tango Buffer

5.25. Bait (Yem) Proteini (İnfuenza PA) Kodlayan Plazmitlerin Maya Hücrelerine Transformasyonu

Maya hücreleri (*Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A) hem bait hem de insan SNX2 proteinlerini kodlayan plazmit vektörler ile iki aşamalı olarak transforme edildi. İlk aşamada bait proteinlerini kodlayan vektörler maya hücrelerine aktarıldı ve plazmit taşıyan koloniler seçildi. Maya hücrelerinin transformasyonunda lityum asetat/polietilen glikol (LiAc/PEG) yöntemi (Gietz ve Schiestl, 2007) izlendi. Bunun için katı besiyerinde üretilen *S. cerevisiae* PJ69-4A maya kolonilerinden steril koşullarda öze ile alınarak 5 ml YPAD sıvı besiyerine ekildi ve kültürler 30 °C'da 200 dev/dak çalkalanma hızında 20-24 saat üretildi. Daha sonra kültür 3000 dev/dak hızda santrifüj edilerek hücreler çökeltildi. Hücreler 10 ml FTS içerisinde süspanse edildi ve 20 °C'da 5 dakika 3000 dev/dak hızda santrifüj edildi. Hücre çökeltileri 10 ml LiAc/TE tamponunda süspanse edildi ve 10 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hücreler tekrar santrifüj edilerek çökeltildi ve 1 ml LiAc/TE tamponunda süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonu plazmit transformasyonunda kullanıldı. Bunun için steril 1,5 ml'lik plastik tüplere 0,5-1 µg plazmit DNA'sı, 50 µg (5 µg/µl) ssDNA ve 100 µl LiAc/TE tamponunda hazırlanan hücre süspansiyonu eklenerek karıştırıldı. Ortama 700 µl LiAc/PEG/TE eklendi ve 30 °C'da 30 dakika inkübe edildi. İnkübasyondan sonra 88 µl DMSO eklendi ve 42 °C'da 6 dakika bekletilerek hücreler sıcaklık şoku etkisinde bırakıldı. Hücreler oda sıcaklığında 2 dakika 3000 dev/dak hızda santrifüj edilerek çökeltildi. Hücre çökeltileri iki kez 1 ml FTS ile yıkandı ve 500 µl FTS içerisinde süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 200 µl triptofan içermeyen katı seçici SD besiyerine (SD+LHA) cam bagetle yayılarak ekildi. Kültürler 30°C'da 48 saat süre ile üremeye bırakıldı. Katı besiyerinde üreyen ve bait plazmiti taşıyan maya hücreleri GAL4 aktivasyon domaini ile kaynaşmış halde SNX2 proteinlerini kodlayan plazmit vektörler ile ikinci kez transforme edildi. Transformasyon deneylerinde 0,5-1 µg plazmit DNA'sı kullanıldı ve bait plazmitleri için izlenen transformasyon yöntemi aynı şekilde uygulandı. İkili transformant hücreler triptofan ve lösin içermeyen katı seçici SD besiyerine (SD+HA) üretilerek seçildi.

5.26. Maya Hücrelerimde PA ve SNX2 Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Araştırılması

Maya GAL4 bağlanma domaini ile kaynaşmış halde sentez edilen influenza PA proteinleri ile GAL4 aktivasyon domaini ile kaynaşmış halde sentez edilen insan SNX2 proteinleri arasındaki etkileşim iki farklı yöntemle değerlendirildi. Birincisi, yukarıda anlatıldığı şekilde hazırlanan maya ikili transformantlar adenin, histidin, lösin ve triptofan içermeyen SD besiyerine ekildi ve üreme özelliklerine bakıldı. İkincisinde ise, ikili transformantlar lösin ve triptofan içermeyen sıvı SD besiyerinde (SD+HA) çoğaltıldı ve mayalarda belirteç β-galaktozidaz enzimi aktivitesi ölçüldü. Bunun için belirli ikili transformantlar 3 ml SD+HA sıvı besiyerine ekildi ve 30 °C'da 200 dev/dak çalkalanma hızında 20-24 saat üretildi. Elde edilen kültürlerinden 500 µl örnek 1,5 ml'lik plastik tüplere alındı ve 5 dakika 3500 dev/dak hızda santrifüj edildi. Hücre çökeltileri 100 µl Z (-) tamponu içerisinde süspanse edildi. Hücreler 5-6 kez -80 °C'da dondurulup 37 °C'da çözdürüldü. Hücre süspansiyonuna 700 µl Z (+) tamponu eklendi. Daha sonra örneklere 160 µl ONPG (4 mg/ml) substrat çözeltisi eklendi. Örnekler 1-3 saat arasında değişen süreler ile 30 °C'da su banyosunda bekletildikten sonra üzerine 400 µl 0,5 M Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Örnekler oda sıcaklığında 15000 dev/dak hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücre artıkları çökeltildi. Üst sıvıların 420 nm dalga boyunda verdikleri absorbans değerleri spektrofotometrede belirlendi.

5.27. Memeli Hücrelerinin Plazmit DNA'lar ile Transfeksiyonu

Plazmit vektörlere klonlanan SNX2 genlerinin insan hücrelerinde anlatım yapıp yapmadıklarını belirlemek, sentez edilen SNX2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarını saptamak, bu proteinlerin influenza PA proteini ile olan ilişkisini ve viral RNA polimeraz enzimi üzerinde olası etkilerini araştırmak amacıyla, HeLa ve HEK-293 hücreleri plazmit DNA'lar ile geçici olarak transfekte edildi. Plamitlerin transfeksiyonunda katyonik polimer olan polietilenimin (PEI) kullanıldı. Hücreler, deneyin amacına göre 6 cm'lik petrilere (5-10x10^5 hücre/petri), 6-kuyulu plaklara (2.5-5x10^5 hücre/kuyu), 12-kuyulu plaklara (1-2.5x10^5 hücre/kuyu) ya da 24 kuyulu plaklara (1x10^5 hücre/kuyu) ekildi ve 16-24 saat standart kültür koşullarında (37 °C, %5 CO_2 ve %90-95 nispi nem) üremeye bırakıldı. Transfeksiyonda 6 cm'lik petri için

5 µg, 6-kuyulu plaklar için 2-3 µg, 12-kuyulu plaklar için 1-2 µg, 24-kuyulu plaklar için ortalama 0,3-0,5 µg total plazmit DNA'sı kullanıldı. Plazmit DNA'lar ve PEI sırasıyla 20 ng/µl ve 40 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde OPTI-MEM (Gibco, ABD) içerisinde seyreltildi ve eşit hacimlerde karıştırıldıktan (DNA/PEI oranı: 1/2) sonra kompleks oluşumu için 10-15 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Hazırlanan DNA/PEI karışımları kültür ortamlarına eklendi. Kültürler 45-48 saat süre ile standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı ve sonrasında deneyin amacına göre kullanıldı.

5.28. Plazmit Vektörlere Klonlanan Genlerin Anlatımlarının Western Melezleme Tekniği ile Analiz Edilmesi

Plazmit vektöre (pCHA) klonlanan SNX2 genlerinin HEK-293 hücrelerinde anlatım yapıp yapmadıklarını saptamak ya da bu proteinlerin influenza virüsü PA ile ilişkilerini birlikte immünçöktürme testleri ile analiz etmek için sodyum dodesil sülfat - poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE) ve sonrasında Western melezleme tekniğinden yararlanıldı. HEK-293 hücreleri D'MEM içeren 12-kuyulu plaklarda (5x105 hücre/kuyu) üretildi ve yukarıda anlatıldığı şekilde 2 µg plazmit DNA ile transfekte edildi (bak. 5.27). Transfeksiyon sonrası kültürler 48 saat 37 °C'da inkübe edildi. Daha sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl x1 konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponu içerisinde bir silikon sıyırıcı yardımıyla toplandı. Hücre lizatı 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 95 °C'da 5 dakika bekletilerek proteinlerin daha iyi denatüre olması sağlandı. Elde edilen hücre lizatları SDS-PAGE/western melezleme deneylerinde kullanıldı.

5.28.1. Poliakrilamid jellerin hazırlanması

Protein elektroforezi için 100x100x1 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller %10 (a/h) ayırma jeli ve %6 (a/h) paketleme jeli olarak iki kısım halinde hazırlandı. İki kaset ayırma jelini hazırlamak için, 4 ml %30 (a/h) stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi 3 ml 4x konsantre ayırma jel tamponu ile karıştırıldı ve hacim distile su ile 12 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 50 µl APS (%10 -a/h) ve 20 µl TEMED eklendi ve her bir jel kasetlerine 5,5 ml döküldü. Jel yüzeyinin düzgün polimerize olması için üzerine yaklaşık 500 µl distile su eklendi ve jellerin polimerizasyonu için 15-20 dakika oda sıcaklığında beklendi. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki su atıldı. Paketleme jeli 1 ml %30 (a/h) stok akrilamid/bisakrilamid çözeltisi, 1,25 ml x4

konsantre paketleme jel tamponu, 2,5 ml distile su, 15 µl APS (%10 w/v) ve 7,5 µl TEMED karıştırılarak hazırlandı. Karışım daha önce hazırlanan ayırma jeli üzerine döküldü, jel tarakları yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerizasyonu sağlandı. Elektroforez işlemi tris-glisin tamponunda gerçekleştirildi. Protein örnekten 10-20 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez her bir jel kaseti için ilk 20 dakika 40 volt, daha sonra 75 volt gerilim altında yaklaşık 1 saatte tamamlandı.

5.28.2. Proteinlerin nitrosellüloz membranlara transferi

Elektroforez işlemi ile poliakrilamid jel üzerinde ayrılan proteinler nitroselüloz membranlara transfer edildi. Bunun için transfer kasetleri arasında "*sünger-filtre kâğıdı - nitrosellüloz membran - jel - filtre kâğıdı - sünger*" sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi ve 45 voltta 45 dakika ve 90 voltta 75 dakika sürede transfer işlemi tamamlandı.

5.28.3. Membran üzerinde proteinlerin görüntülenmesi

Protein transferi işleminden sonra nitroselüloz membranlar, antikorların olası özgün olmayan bağlanmalarını önlenmek için 1 saat bloklama çözeltilsinde bekletildi. Daha sonra membranlar bir gece boyunca, bloklama çözeltisinde 1/500 - 1/1000 oranlarında seyreltilerek primer antikorların etkisinde bırakıldı. Primer antikor olarak fare orijinli monoklonal anti-HA (Santa Cruz: sc-7392) ve tavşan anti-PA serumu kullanıldı. Primer antikor uygulaması sonrasında membranlar bir kez 20 dakika TBS-T ve iki kez TBS ile yıkandı. Membranlar 30 dakika 1/5000 oranında TBS içerisinde seyreltilen yaban turpu peroksidazı (*İng. horseradish peroxidase - HRP*) bağlı anti-fare IgG (Invitrogen / Thermo:3 1420) ya da anti-tavşan IgG (Invitrogen / Thermo: 31423) antikorları ile işleme kondu. Sonrasında membranlar 20 dakika bir kez TBS-T ve iki kez TBS ile yıkandı. Proteinler kemilüminesans substrat (GE Healthcare, RPN2232) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntülendi.

5.29. Proteinlerinin Hücre İçi Lokalizasyonlarının İmmünfloresan Teknikler ile Belirlenmesi

Ekspresyon vektörleri üzerinden kodlanan proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonlarının saptanmasında HeLa hücreleri kullanıldı. HeLa hücreleri 12-

kuyulu plaklarda (2-3x10^5hücre/kuyu) 9 mm çapında yuvarlak lameller üzerinde standart kültür koşullarında 24 saat üretildi. Daha sonra hücreler 5.27'de verildiği gibi PEI kullanılarak plazmit DNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 44-48 saat sonra hücreler fikse edilerek SNX2 proteinleri için immünfloresan yöntem ile analiz edildi. Lameller üzerinde üretilen transfekte hücreler T-FTS ile 2 kez 10'ar dakika yıkandı ve sonra %3 paraformaldehit içerisinde 20 dakika bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon işleminin sonunda hücreler T-FTS ile 1 kez yıkandı ve 10 dakika oda sıcaklığında %0,1'lik NP-40 etkisinde bırakılarak hücre zarları geçirgen hale getirildi. Daha sonra istenmeyen antikor bağlanmalarını en aza indirmek için hücreler %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 30 dakika bekletildi. Sürenin sonunda hücreler %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde 1/250-1/500 oranında seyreltilerek hazırlanan primer antikorlar ile 1 saat muamele edildi. Hücreler 3'er kez 15 dakika boyunca T-FTS ile yıkandı ve tekrar 20 dakika %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde bekletildi. Primer antikorlar ile işlem gören hücreler 1/300 oranında %1'lik yağsız süt proteini çözeltisi içerisinde seyreltilen Alexa-488 konjuge anti mouse IgG (Abcam:ab150117) ve/veya Alexa-568 konjuge anti tavşan IgG antikoru (Abcam: ab175471) ile 1 saat muamele edildi. Hücre nukleuslarının görüntülenebilmesi için antikor çözeltilerine 1/2000 oranında DAPI eklendi. Hücreler T-FTS ile ile 3 kez tekrar 15'er dakika yıkandı. Lameller temiz lamlar üzerine damlatılan 2-3 µl kapatma solüsyonu üzerine kapatıldı ve çevrelerine şeffaf oje sürüldü. Hazırlanan hücre preparatları DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

5.30. Konak Proteini (SNX2) ile PA Proteini Arasındaki Olası Fiziksel Etkileşimin Araştırılması

Maya ikili-hibrid metodu ile *S. cerevisiae* hücrelerinde ilişkileri saptanan PA ve konak hücre proteinlerinin memeli hücrelerinde olası etkileşimleri immünfloresan, birlikte immünçöktürme ve PLA (Proximity Ligation Assay) teknikleri ile araştırıldı.

5.30.1. İki farklı proteinin hücre içi birlikte-lokalizasyonlarının immünfluoresan teknikler ile analizi

Memeli hücrelerde birlikte sentez edilen proteinlerin hücre içi lokalizasyon profilleri söz konusu proteinler arasındaki ilişki hakkında önemli ipuçları vermektedir. Bu tez

kapsamında influenza A virüsü PA proteinlerini ve insan SNX2 proteinlerini kodlayan plazmit DNA'lar ile birlikte transfekte edilen HeLa hücreleri immünfloresan yöntem ile incelendi. 12-kuyulu plaklarda yuvarlak lameller üzerinde üretilen hücreler 1 µg SNX2 ve/veya 1 µg PA proteini kodlayan plazmit ile transfekte edildi (bak. 5.27). Transfeksiyondan 40-45 saat sonra hücreler yukarıda anlatıldığı şekilde (bak. 5.29) fare anti-HA(SNX2 proteinleri için) ve tavşan anti-PA antikorları kullanılarak immünfloresan yöntem ile analiz edildi.

5.30.2. PLA (Proximity Ligation Assay) testi

PLA tekniği Fredriksson ve arkadaşları (Fredriksson et al., 2002) tarafından geliştirilen ve Olink Bioscience (http://www.olink.com) tarafından ticarileştirilen oldukça yeni bir tekniktir. Hücrelerde 40 nm'den daha yakın mesafede bulunan proteinlerin etkileşimini göstermek için uygulanmaktadır. Bu çalışmada immünfloresan testlerde olduğu gibi yuvarlak lameller üzerinde çoğaltılan HeLa hücreleri SNX2 ve PA proteini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 45 saat sonra hücreler fare monoklonal anti-HA ve tavşan poliklonal anti-PA antikor karışımı ile muamele edildi (bak. 5.29) Primer antikor uygulamasından sonra hücreler üç kez 5 dakika yıkama tampon- I (10 mM tris, pH 7,4, 150 mM NaCl, %0,05 Tween-20) içerisinde hafifçe karıştırılarak yıkandı ve 37 °C'da 2 saat boyunca aşağıdaki verildiği şekilde hazırlanan sekonder antikor bağlı probların etkisinde bırakıldı.

PLA prob karışımı:

- ✓ *5 hacim : Probe Anti-Mouse MINUS (DUO92004, Sigma-Aldrich)*
- ✓ *5 hacim : Probe Anti-Rabbit PLUS(DUO92002, Sigma-Aldrich)*
- ✓ *15 hacim : Antikor Seyreltme çözeltisi (82008, OLINK Bioscience)*

Antikor bağlı prob uygulamasından sonra hücreler üç kez 5 dakika yıkama tamponu-I ile yıkandı ve 37°C'da 45 dakika ligasyon çözeltisinde tutuldu.

Ligasyon çözeltisi:

- ✓ *x5 ligasyon tamponu : 5 µl*
- ✓ *Deiyonize distile su : 19,4 µl*
- ✓ *Ligaz enzimi (1 unit/µL - DUO82027) : 0,6 µl*

İnkübasyon sonrası hücreler tekrar üç kez 5 dakika yıkama tamponu-I ile yıkandı ve 37 °C'da 2,5 saat DNA amplifikasyon çözeltisinde bekletildi.

Amplifikasyon çözeltisi:

- ✓ *x5 Amplification Red : 5 µl*
- ✓ *DNA Polimeraz (10 unit/µL - DUO82030) : 0,3 µl*
- ✓ *Deiyonize distile su : 19,7 µl*

Son aşamada hücreler üç kez 5 dakika yıkama tamponu-B (100 mM Tris-Cl, pH 7,5) içerisinde, bir kez 1 dakika 1/100 seyreltilmiş yıkama tamponu-B içerisinde yıkandı. Son aşamada üzerinde hücre bulunan lameller, temiz lamlara damlatılan DAPI içeren 2-3 µl kapatma solüsyonu (DUOLINK 82040-0005) üzerine kapatıldı ve Zeiss *LSM 700 mikroskop ile incelendi.*

5.30.3. Birlikte immünçöktürme

Hücrelerde birlikte sentez edilen ya da aynı ortamda bulunan proteinlerden birine özgün antikorlar bağladıktan sonra protein A sepharose ile çöktürme işlemi, proteinlerin işlevlerini ve farklı proteinler arasındaki ilişkileri saptanmak için uygulanan önemli bir biyokimyasal yöntemidir. Bu çalışmada 6 cm petrilerde çoğaltılan HEK293 hücreleri 2,5 µg SNX2 kodlayan plazmit ve 2,5 µg PA proteini kodlayan plazmit ile 5.27'de anlatıldığı şekilde birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 40-45 saat sonra hücreler, bir kez T-FTS ile yıkandı ve 0,75 ml RIPA tamponunda toplandı. Hücre süspansiyonları 1,5 ml'lik plastik tüplerde aktarıldı ve en az beş kez dondurma (-80 °C) / çözme (37 °C) işlemine tabi tutuldu. Hücre lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 14000 dev/dak hızda 4 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar immünçöktürme testlerinde kullanıldı. Bunun için 300 µl hücre lizatına 3 µl fare anti-HA antikoru eklendi ve örnekler 4 °C'da 2 saat boyunca tüp karıştırıcı ile karıştırıldı. Daha sonra hücre lizatına 20 µl protein A-sepharose süspansiyonu eklendi. Örnekler 4 °C'da bir gece boyunca karıştırıldı. Sonrasında örnekler 3000 dev/dak hızda 2 dakika santrifüj edilerek protein A-sepharose boncuklar ve boncuklara bağlı proteinler çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırıldı, çökelti 500 µl yıkama tamponunda (150 mM NaCl, 50 mM Tris, 1 mM DTT, pH 8) süspanse edildi ve 5 dakika tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Örnekler tekrar santrifüj

edilerek protein A sepharose boncuklar ve boncuklara bağlı proteinler çöktürüldü. Yıkama işlemi iki kez daha tekrar edildi. Elde edilen çökeltiler 50 µl x2 konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda süspanse edildi ve kaynar suda 5 dakika bekletilerek boncuklara bağlı proteinler denatüre edildi. Daha sonra örnekler hem PA hem de konak hücre proteinleri SNX2 için SDS-PAGE/western melezleme tekniği ile analiz edildi (bak. 5.28.).

5.31. İnsan SNX2 Proteininin İnfluenza Virüs Replikasyonuna Etkilerinin Araştırılması

Hücrelerde SNX2 proteini miktarındaki değişmenin influenza virüsü replikasyonunu nasıl etkilediğini saptamak için iki farklı yol izlendi. Bunlardan birinde, hücreler SNX2 proteini kodlayan plazmitler ile transfekte edildi ve bu protein miktarı geçici olarak arttırılırdı. İkinci bir yol olarak hücreler *SNX2* geni için dizayn edilen siRNA'lar ile transfekte edilerek SNX2 transkript düzeyi düşürüldü (*knock down*). Her iki durumda da hücreler influenza A virüsleri ile enfekte edildi ve viral replikasyonun seyri izlendi.

5.31.1. SNX2 proteinlerindeki artışın influenza virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılması

HEK293 hücrelerinde SNX2 ve delesyonlu SNX2 protein miktarları bu proteinleri kodlayan plazmitlerin geçici transfeksiyonu ile yapay olarak arttırıldı. Bunun için 12-kuyulu plaklarda üretilen hücreler (2-3x10^5 hücre/kuyu) 5.27'de anlatıldığı şekilde 2 µg plazmit DNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36 saat sonra kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler serum içermeyen DMEM (DMEM-) besiyeri ile iki kez yıkandı. Hücrelere % 1 BSA içeresinde 1-2 moi (*İng. multiplicity of infection*) titrede olacak şekilde seyreltilen A/WSN/33-H1N1 ve influenza A/Duck/Pen-H5N2 virüsleri ile enfekte edildi. Plaklar 5 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C'da 30 dakika bekletilerek virüslerin tutunması sağlandı. Virüs süspansiyonu uzaklaştırıldı ve ortama 2 ml DMEM (+) besiyeri eklendi ve CO_2-etüvde 37 °C'da inkübe edildi. Virüsler ile enfeksiyondan 8 ve 12 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl SDS-PAGE protein yükleme tamponunda toplandı. Hücre lizatları 10-15 kez insülin iğnesinden geçirildi ve 95-100 °C'da dakika bekletilerek proteinler denatüre edildi. Hazırlanan örneklerden 10-15 µl poliakrilamid jele uygulandı. Yukarıda (bak. 5.28)

anlatıldığı şekilde ayrıştırılan ve PVDF membranlara transfer edilen proteinler içerisinde endojen aktin beta (ACTB) proteini ve influenza virüsü proteinleri (PA, M1) Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Bu deneylerde primer antikor olarak monoklonal fare anti-aktin ile poliklonal tavşan anti-PA antikorları ve anti-M1antikorları kullanıldı. Deney sonucu elde edilen veriler üzerinde viral proteinler ve hücresel ACTB proteini bant yoğunlukları karşılaştırılarak sonuca gidildi.

5.31.2. SNX2 genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde influenza virüsü replikasyonunu araştırılması

Hücrelerdeki *SNX2* geni transkripsiyon düzeyini düşürmek (*knock down*) için HeLa hücreleri, *SNX2* genine özgü siRNA ile transfekte edildi. D'MEM (+) besiyerinde üretilen hücreler tripsin-EDTA ile süspansiyon haline getirildi ve 1000 devir/dakika hızda, 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücreler Opti-MEM içerisinde süspanse edildi ve hücre sayısı belirlendi. Hücreler 1×10^6 hücre/ml olacak şekilde Opti-MEM içerisinde seyreltildi ve siRNA'lar ile transfeksiyonda kullanıldı. Bunun için 40 pMol (2 µl) SNX2 siRNA (10620318,Life Technology) ve negatif kontrol siRNA (sc-37007, Santa Cruz) 250 µl Opti-MEM içerisinde seyreltildi ve aynı hacimde Opti-MEM içerisinde seyreltilen 4 µl RNAi-max (13778075-Invitrogen) ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletildi. Hazırlanan siRNA/RNAi-Max karışımı 0,5 ml hücre süspansiyonu ile karıştırıldı ve 37 ºC'da düşük hızda dönen bir karıştırıcıda 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra hücreler her bir kuyusunda 3 ml D'MEM (+) içeren 6-kuyulu plaklara aktarıldı ve standart kültür koşullarında inkübe edildi. İnkübasyonun 24. saatinde besiyerleri taze besiyerleri ile değiştirildi ve 48 saat daha inkübasyona devam edildi. Daha sonra hücreler tripsin-EDTA ile süspansyon haline getirildi ve hücre sayıları belirlendi. Hücrelerin bir kısmından SNX2 transkript düzeyini saptamak için total RNA ekstraksiyonunda kullanıldı (bak. 5.18). Kalan hücrelerden 24-kuyulu plaklara ($1\text{-}2\text{x}10^5$ hücre/kuyu) ekim yapıldı ve 24 saat 37 °C'da inkube edildi. İnkübasyondan sonra hücreler 1-2 moi titrede influenza A virüsleri ile enfekte edildi (bak. 5.31.1). Enfeskiyondan 6 ve 12 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı. Enfekte hücrelerin bir kısmı 200 µl SDS-PAGE protein yükleme tamponunda toplandı. Hazırlanan hücre lizatlarında ACTB ile influenza A virüsü PA proteinleri Western

melezleme tekniği ile analiz edildi (bak. 5.28). Virüs ile enfekte edilen hücrelerin bir kısmı ise viral mRNA (+cRNA) kantitasyonu için RNA ekstraksiyonunda kullanıldı.

5.31.3. SNX2 Genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde SNX2 ve viral transkript düzeylerinin saptanması

SNX2 siRNA ile transfekte edilen hücrelerde, virüs enfeksiyonu öncesi SNX2 transkript düzey ve virüs enfeksiyonu sonrası viral transkript düzeyi kantitatif gerçek zamanlı PZR ile belirlendi. siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerden total RNA ekstere edildi (bak. 5.17) ve cDNA'lar hazırlandı (bak. 5.19) Hücresel ve viral transkriptlerin çoğaltılmasında aşağıda dizileri verilen oligonukleotid primer çiftleri ve cDNA'lar belirtilen miktarlarda SYBR Green Master mixs (Roche, Germany) ile karışrırıldı. Reaksiyon BioRad CFX96 cihazında gerçekleştirildi. Gerçek zamanlı PZR reaksiyonu koşulları; bir döngü "95 °C, 10 dk" ve 45 döngü "95 °C, 10 sn / 56 °C, 10 sn / 72 °C, 20 sn" olarak uygulandı. SNX2 ve viral transkript düzeyleri iç kontrol olarak kullanılan aktin beta transkript düzeyi ile normalize edilerek değerlendirme yapıldı.

Primerler:

Primer adı	Nükleotid dizisi (5'- 3')
SNX-2/846 For	GAGGATGGTGAACAAGGCTG
SNX-2/992 Rev	ACCAAGGCTTCAACACTGAC
WSN/Seg-8/109 For	TGATGCCCCATTCCTTGA
WSN/Seg-8/278 Rev	TACAGAGGCCATGGTCATTT
DkP/Seg-8/542 For	TCATCGGTGGACTTGAATGG
DkP/Seg-8/686Rev	TCTGACTCAACTCTTCTCGC
Aktin 280 For	CCACACCTTCTACAATGAGC
Aktin 552 Rev	TCATGAGGTAGTCAGTCAGG

Reaksiyon Karışımı:

	Konsantrasyon	Miktar (µl) / tüp
cDNA	-	3
İleri primer	5 pMol/µl	1
Geri Primer	5 pMol/µl	1
x2 SYBR Green master mix	x2	5

5.32. İnsan SNX2 Proteininin İnfluenza RNA Polimeraz Enzimine Etkilerinin Araştırılması

İnsan SNX2 proteinin influenza virüsü RNA polimeraz enzimi üzerinde olası etkisi, bu portenin hücre içi miktarı geçici transfeksiyon ile arttırıldığı (*İng*. *over expression*) koşullarda viral RNA polimeraz için geliştirilen minireplikon plazmit seti (Turan ve ark. 2004) kullanılarak araştırıldı. Deneylerde SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteinin kodlayan plazmitlere ek olarak influenza A virüsü minireplikonunu oluşturan viral protein kodlayıcı pCAGGS-PB2, pCAGGS-PB1, pCAGGS-PA ve pCAGGS-NP plazmitleri ile birlikte pHH21-vNS-luc belirteç plazmiti ve lusiferaz aktivitesinin normalizasyonu için renilla lusiferaz enzimi kodlayan pRL-SV40 plazmiti kullanıldı. Bu deneylerde transfeksiyon frekansı yüksek olan HEK293 hücrelerinden yararlanıldı. Hücreler DMEM (+) besiyerinde 24 kuyulu plaklara ekildi ($5x10^4$ hücre/kuyu) ve 20-24 saat standart kültür koşullarında inkübe edildi. Daha sonra hücreler Tablo 4'te verilen miktarlarda plazmit DNA karışımı ile transfekte edildi. Transfeksiyon, PEI kullanırak 5.27'te anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Tablo 4. SNX2 protein düzeyindeki artışın influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkilerini saptamak için uygulanan minireplikon testinde kullanılan plazmit vektörler ve miktarları (ng/kuyu).

	Miktar (ng/kuyu)	
Plazmit	**WSN minireplikon seti**	**DkP minireplikon seti**
pHMP1-vNS-luc	50	50
pRL-SV40	2	2
pCAGGS-PB2	3	10
pCAGGS-PB2	3	10
pCAGGS-PA	3	3
pCAGGS-NP	50	50
pCHA-SNX2 ya da delesyonlu SNX2 kodlayan plazmit	0-200	0-200
pCAGGS	0-214	0-200
Toplam	**325**	**325**

Transfeksiyondan 44 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 100 µl liziz tamponunda (Promega/assive lysis buffer/E194A) parçalandı. Hazırlanan hücre lizatlarında hem ateş böceği lüsiferazı hem de renilla lüsiferazı aktiviteleri ticari kit kullanılarak ölçüldü. Bunun için 5 µl lizat 25 µl ateş böceği lüsiferaz substratı (Promega / Luciferase Assay System / E1501) ya da renilla lüsiferazı substratı (Promega / *Renilla* Luciferase Assay System / E2820) üzerine eklendi ve bir lüminometre ile 5 saniye süre ile ölçümler alındı. Elde edilen ateş böceği lüsiferaz değerleri renilla lüsifereraz değerleri ile normalize edilerek sonuçlar değerlendirildi.

6. BULGULAR

Daha önce maya ikili hibrit metodu ile yapılan tarama çalışması sonucunda, *Saccharomyces cerevisiae* hücrelerinde influenza A virüsü RNA polimeraz enziminin PA alt ünitesinin insan SNX2 proteini ile ilişkili olduğu gösterildi (Yayınlanmamış veri / TÜBITAK projesi: 112S518 / Proje Yürütücüsü: Prof. Dr. Kadir Turan). Bu çalışmada ise SNX2 proteinin influenza A virüsü PA proteini ile ilişkisi insan orijinli HEK293 ve HeLa hücrelerinde araştırıldı ve bu proteinin viral replikasyonu nasıl etkilediği sorusuna yanıt arandı. Bu bağlamda gerek insan hücrelerinde gerekse mayalarda SNX2 proteinini kodlayan ekspresyon vektörleri oluşturuldu. İnsan hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden kodlanan influenza A virüsü PA proteini ile SNX2 proteini arasındaki ilişki birlikte immünçöktürme ve immünfloresans teknikler ile araştırıldı. Ayrıca plazmit ya da özgün siRNA'lar ile transfeksiyon sonucunda insan hücrelerinde SNX2 proteini düzeyi yapay olarak değiştirildi, bu değişikliklerin viral replikasyona etkisi incelendi.

6.1. İnsan SNX2 Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Çalışma kapsamında insan *SNX2* geni hem maya hem de memeli ekspresiyon vektörlerine klonlandı.

6.1.1. İnsan SNX2 proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler

Maya hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile etkileşim gösteren SNX2 proteini ve belirli domainleri taşımayan delesyonlu SNX2 proteinlerinin memeli hücrelerindeki ilişkisini ve viral replikasyona etkisini araştırmak için bir dizi vektör oluşturuldu. Delesyonlu *SNX2* kodlayan genlerin elde edilmesinde, aşağıda verilen *SNX2* referans cDNA dizisi, bu geninin ekzon intron yapısı ve SNX2 proteininin işlevsel bölgeleri (Şekil 8) göz önünde bulunduruldu.

İnsan SNX2 cDNA'sı dizisi, variant 1 (NCBI Reference Sequence: NM_003100.3):

AGGCCGGCCGGGGGCGGGGAGGCTGGCGGGTCGGCGCGGGCCCAGCCGTGCGTGCTC
ACGTGACGGGTCCGCGAGGCCCAGCTCGCGCAGTCGTTCGGGTGAGCGAAGATGGCG
GCCGAGAGGGAACCTCCTCCGCTGGGGGACGGGAAGCCCACCGACTTTGAGGATCTG

GAGGACGGAGAGGACCTGTTCACCAGCACTGTCTCCACCCTAGAGTCAAGTCCATCA

TCTCCAGAACCAGCTAGTCTTCCTGCAGAAGATATTAGTGCAAACTCCAATGGCCCA

AAACCCACAGAAGTTGTATTAGATGATGACAGAGAAGATCTTTTTGCAG**AAGCCACA**

GAAGAAGTTTCTTTGGACAGCCCTGAAAGGGAACCTATCCTATCCTCGGAACCTTCT

CCTGCAGTCACACCTGTCACTCCTACTACACTCATTGCTCCTAGAATTGAATCAAAG

AGTATGTCTGCTCCCGTGATCTTTGATAGATCCAGGGAAGAGATTGAAGAAGAAGCA

AATGGAGACATTTTTGACATAGAAATTGGTGTATCAGATCCAGAAAAAGTTG**GTGAT**

GGCATGAATGCCTATATGGCATATAGAGTAACAACAAAGACATCTCTTTCCATGTTC

AGTAAGAGTGAATTTTCAGTGAAAAGAAGATTCAGCGACTTTCTTGGTTTGCACAGC

AAATTAGCAAGCAAATATTTACATGTTGGTTATATTGTG**CCACCAGCTCCAGAAAAG**

AGTATAGTAGGGATGACCAAGGTCAAAGTGGGTAAAGAAGACTCATCATCCACTGAG

TTTGTAGAAAAACGGAGAGCAGCTCTTGAAAGGTATCTTCAAAGAACAGTAAAACAT

CCAACTTTACTACAGGATCCTGATTTAAGGCAGTTCTTGGAAAGTTCAGAG**CTGCCT**

AGAGCAGTTAATACACAGGCTCTGAGTGGAGCAGGAATATTGAGGATGGTGAACAAG

GCTGCCGACGCTGTCAACAAAATGACAATCAAGATGAATGAATCGGATGCATGGTTT

GAAGAAAAGCAGCAGCAATTTGAGAATCTGGATCAGCAACTTAGGAAACTTCATGTC

AGTGTTGAAGCCTTGGTCTGTCATAGAAAAG**AACTTTCAGCCAACACAGCTGCCTTT**

GCTAAAAGTGCTGCCATGTTAGGTAATTCTGAGGATCATACTGCTTTATCTAGAGCT

TTGTCTCAGCTTGCAGAGGTTGAGGAGAAGATAGACCAGTTACATCAAGAACAAGCT

TTTGCTGACTTTTATATGTTTTCAGAACTACTTAGTGACTACATTCGTCTTATTGCT

GCAGTGAAAGGTGTGTTTGACCATCGAATGAAGTGCTGGCAGAAATGGGAAGATGCT

CAAATTACTTTGCTCAAAAAACGTGAAGCTGAAGCAAAAATGATGGTTGCTAACAAA

CCAGATAAAATACAGCAAGCTAAAAATGAAATAAGAGAG**TGGGAGGCGAAAGTGCAA**

CAAGGGGAAAGAGATTTTGAACAGATATCTAAAACGATTCGAAAAGAAGTGGGAAGA

TTTGAGAAAGAACGAGTGAAGGATTTTAAAACCGTTATCATCAAGTACTTAGAATCA

CTAGTTCAAACACAACAACAGC**TGATAAAATACTGGGAAGCATTCCTACCTGAAGCC**

AAAGCCATTGCCTAGCAATAAGATTGTTGCCGTTAAGAAGACCTTGGATGTTGTTCC

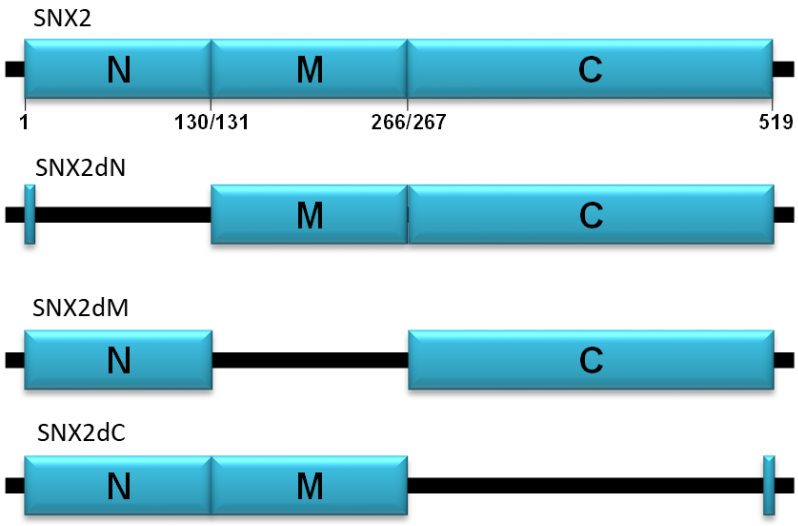
AGTTATGCTGGATTCCACAGTGAAATCATTTAAAACCATCTAAATAAACCACTATAT

ATTTTATGAATTACATGTGGTTTTATATACACACACACACACACACACACACACACA

CACACACTCTGACATTTTATTACAAGCTGCATGTCCTGACCCTCTTTGAATTAAGTG

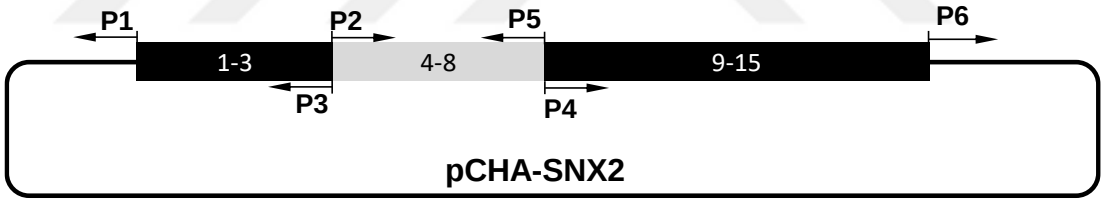
GACTGTGGCATGACATTCTGCAATACTTTGCTGAATTGAACACTATTGTGTCTTAAA

TACTTGCACTAA



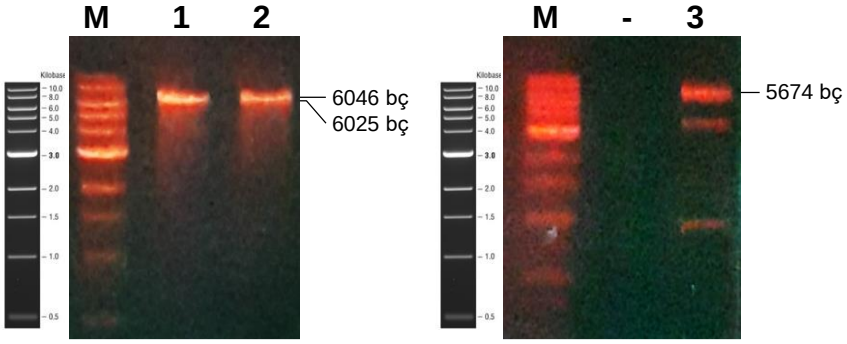
Şekil 9. Delesyonlu *SNX2* genleri üzerinden kodlanan proteinler.

Delesyonlu SNX2 proteini kodlayan plazmit vektörler Metot kısmında (bak. 5.20.1) açıklandığı şekilde özgün primer çiftleri ile pCHA-SNX2 plazmit DNA'sı üzerinden ters PZR ile türetildi. Deneylerde kullanılan özgün primerler ve *SNX2* cDNA'sı üzerindeki bağlanma pozisyonları Şekil 10'da verildi.



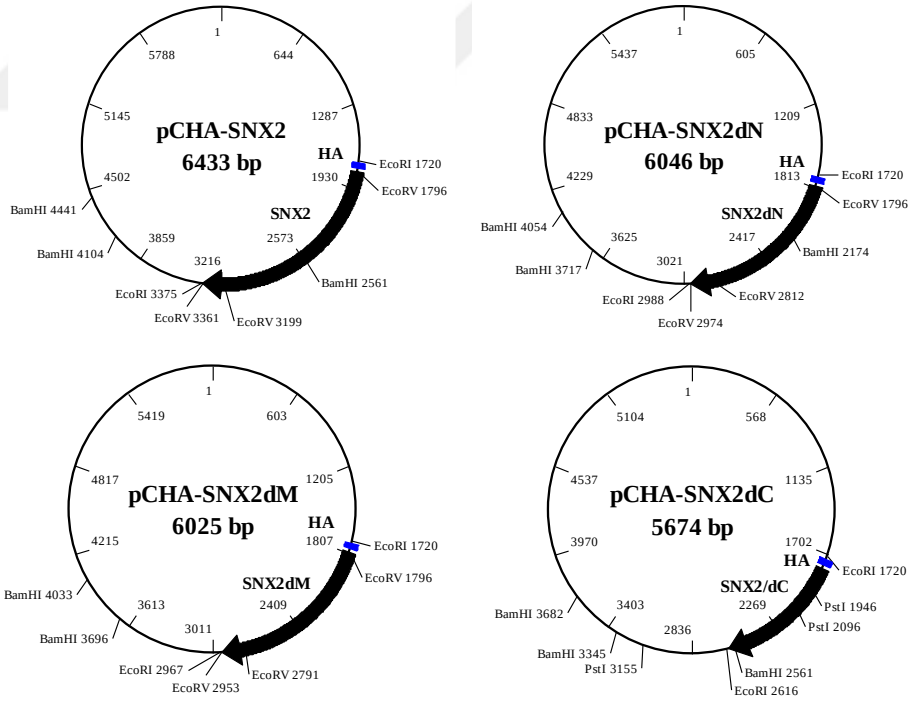
Şekil 10. pCHA-SNX2 plazmit vektörü üzerinden ters PZR ile çoğaltılan delesyonlu *SNX2* genlerinin türetilmesinde kullanılan primerlerin bağlanma noktaları ve yönleri. Primerler: P1: pCHA-Vec-Rev; P2: SNX-dN-For; P3: SNX-dM-Rev ; P4, SNX-dM-For ; P5, SNX-dC-Rev; P6, pCHA-TAG-For.

PZR sonucu elde edilen ürünler agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 11). Elektroforez sonuçları, pCHA-SNX2dN için 6046 bç, pCHA-SNX2dM için 6025 bç ve pCHA-SNX2dC için 5674 bç boyutlarda beklenen büyüklüklerde fragmentlerin oluştuğunu gösterdi.

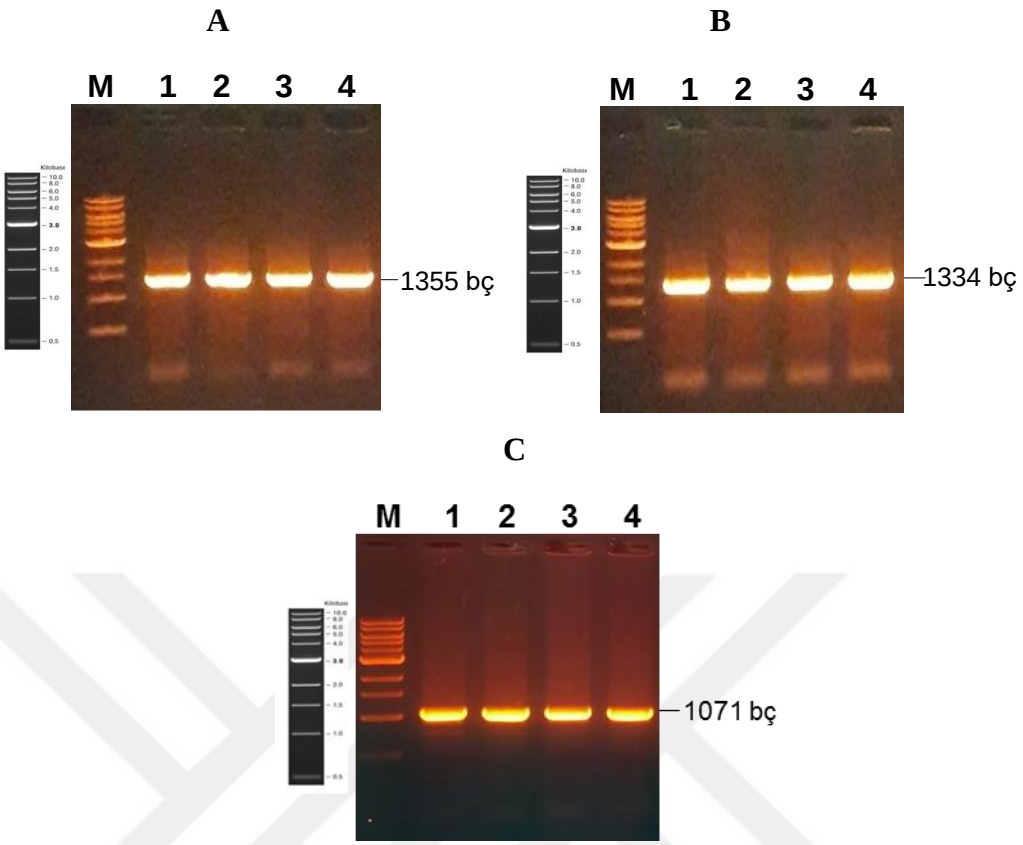


Şekil 11. pCHA-SNX2 plazmiti üzerinden ters PZR ile çoğaltılan, *SNX2* geninde belirli ekzon bölgeleri taşımayan DNA fragmentlerinin elektroforez profilleri. **1**. SNX2 geninde 1-3 ekzonları taşımayan (dN) DNA. **2**. SNX2 geninde 4-8 ekzonları taşımayan (dM) DNA. **3**. SNX2 geninde 9-15 ekzonları taşımayan (dC) DNA. PZR ürünlerinin analizinde %1'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi, x1 TAE tamponunda, 100 volt sabit gerilim altında 25 dakikada tamamlandı. **M**. 1 Kb ladder (NEB/N3232).

PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile ayrıştırılarak saflaştırıldı. Saflaştırılan fragmentler T4 DNA ligaz enzimi ile halkasal forma dönüştürüldü ve Şekil 12'de haritaları verilen plazmit vektörler elde edildi.

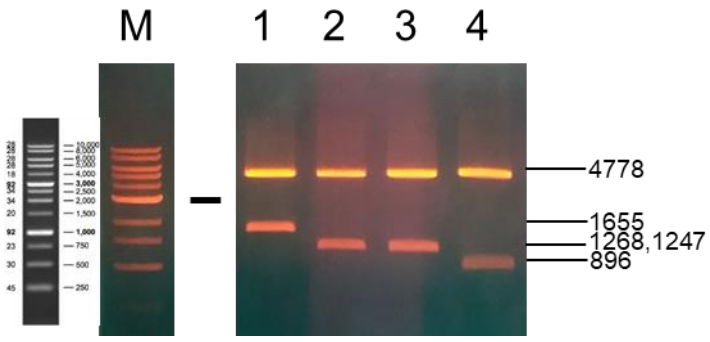


Şekil 12. Tam boyutta insan *SNX2* geni klonlanan pCHA-SNX2 plazmiti ve bu plazmitten türetilen delesyonlu *SNX2* geni taşıyan plazmitlerin restriksiyon haritaları. Transformasyon sonrasında doğru plazmitler koloni PZR ile seçildi. Elde edilen sonuçlar Şekil 13'te verildi. PZR ile test edilen çoğu transformantlar için beklenen boyutlarda DNA fragmentleri (SNX2dN: 1355 bç, SNX2dM:1334 bç, SNX2dC: 963 bç) elde edildi.



Şekil 13. Delesyonlu *SNX2* geni taşıyan pCHA plazmitlerinin koloni-PZR ile seçilmesi. **A**. pCHA-SNX2dN; **B**. pCHA-SNX2dM; **C**. pCHA-SNX2dC. Elektroforez işlemi Şekil 11'de verilen koşullarda gerçekleştirildi. **M**. 1 Kb ladder (NEB/N3232).

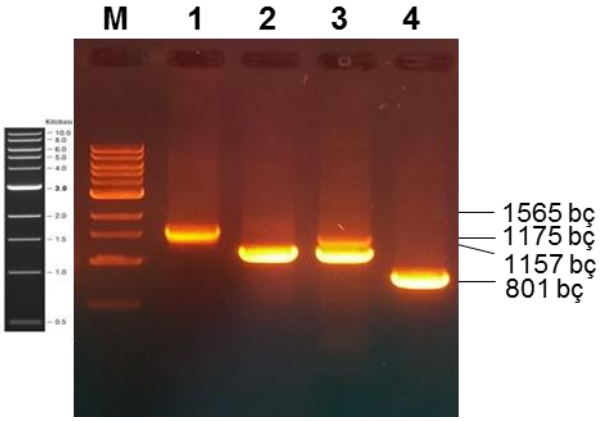
Koloni PZR ile ön seleksiyonu yapılan transformantlardan hazırlanan kültürlerden (5 ml LB besi yerinde) küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Elde edilen plazmitler, restriksiyon haritaları göz önünde bulundurularak belirlenen enzimler ile kesildi. Kesilen DNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile incelendi (Şekil 14). Elektroforez sonuçlar, *SNX2* geni taşıyan pCHA plazmitlerinin doğru olduğunu gösterdi. Agaoz jel üzerinde pCHA-SNX2 için 4778 ve 1655 bç; pCHA-SNX2dN için 4778 ve 1268 bç; pCHA-SNX2dM için 4778 ve 1247 bç; pCHA-SNX2dC için 4778 ve 896 bç büyüklüklerde beklenen DNA fragmentleri saptandı.



Şekil 14. Restriksiyon endonukleaz enzimleri ile kesilen plazmit vektörlerin agaroz jel elektroforezi profilleri. **1**. pCHA-SNX2/EcoRI. **2**. pCHA-SNX2dN/EcoRI. **3**. pCHA-SNX2dM/EcoRI. **4.** pCHA-SNX2dC/EcoRI. **M**. 1 Kb ladder (NEB/N3232). Elektroforez işlemi Şekil 11'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi.

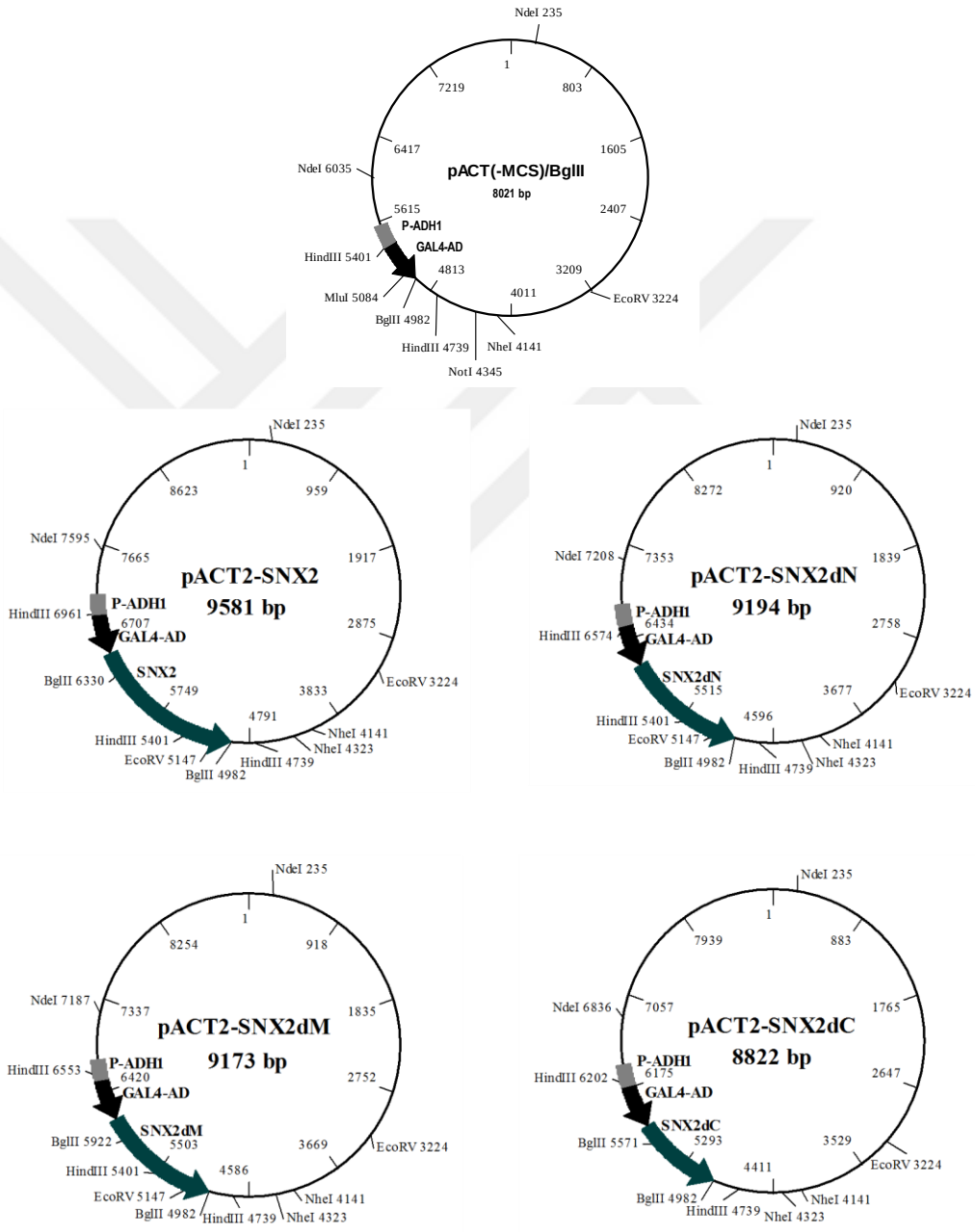
6.1.2. İnsan SNX2 proteini kodlayan maya vektörlerinin oluşturulması ile ilgili veriler

Tam boyutta SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteinlerinin maya hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile ilişkilerini test etmek amacıyla, bu proteinleri kodlayan DNA fragmentleri pACT2 maya plazmitinde GAL4 aktivasyon domainini kodlayan dizi ile kaynaşmış olarak klonlandı. SNX2 proteinlerini kodlayan DNA fragmentleri pCHA-SNX2, pCHA-SNX2dN, pCHA-SNX2dM ve pCHA-SNX2dC plazmitleri üzerinden fosforillenmiş özgün primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. PZR ürünleri agaraoz jel elektroforezi ile kontrol edildi (Şekil 15). SNX2 için 1565 bç; SNX2dN için 1175 bç; SNX2dM için 1157 bç ve SNX2dC için 801 bç boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi.



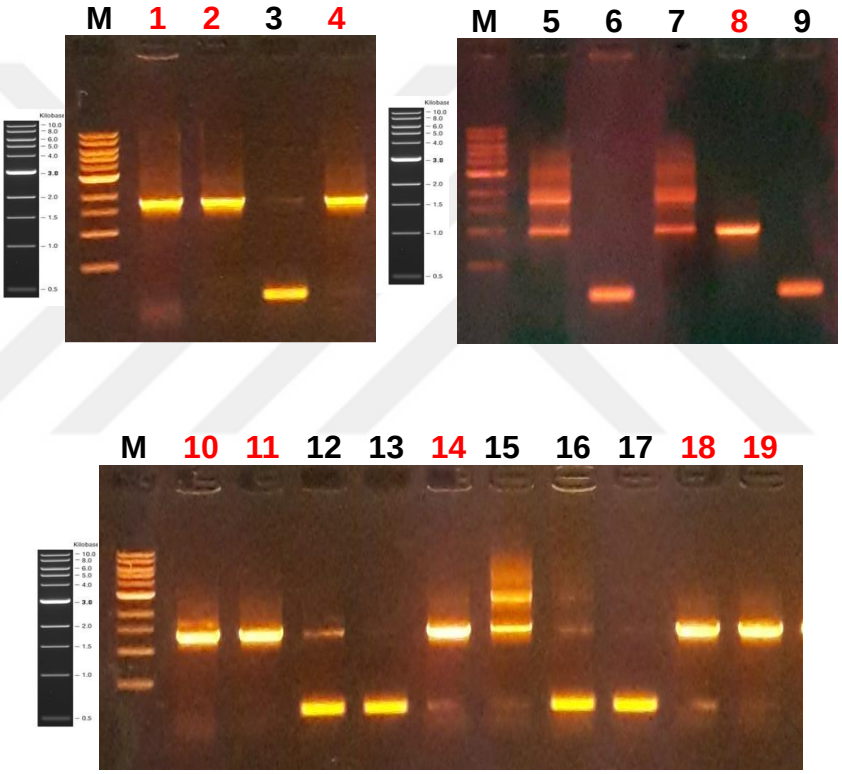
Şekil 15. *SNX2* cDNA'sı taşıyan pCHA plazmit vektörleri üzerinden PZR ile çoğaltılan tam boyutta *SNX2* ve delesyonlu *SNX2* cDNA'ları. Elektroforez işlemi Şekil 11'de verilen koşullarda gerçekleştirildi. **M**. 1 Kb ladder (NEB/N3232).

SNX2 proteinlerini kodlayan DNA fragmentleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldıktan sonra, *Bgl*II enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pACT2 plazmiti (Şekil 16) ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon sonucunda Şekil 16'da restriksiyon haritaları verilen pACT2-SNX2, pACT2-SNX2dN, pACT2-SNX2dM ve pACT2-SNX2dC maya ekspresyon vektörleri elde edildi.



Şekil 16. pACT2 plazmiti ve *SNX2* genleri klonlanan pACT2 plazmitlerinin restriksiyon haritaları.

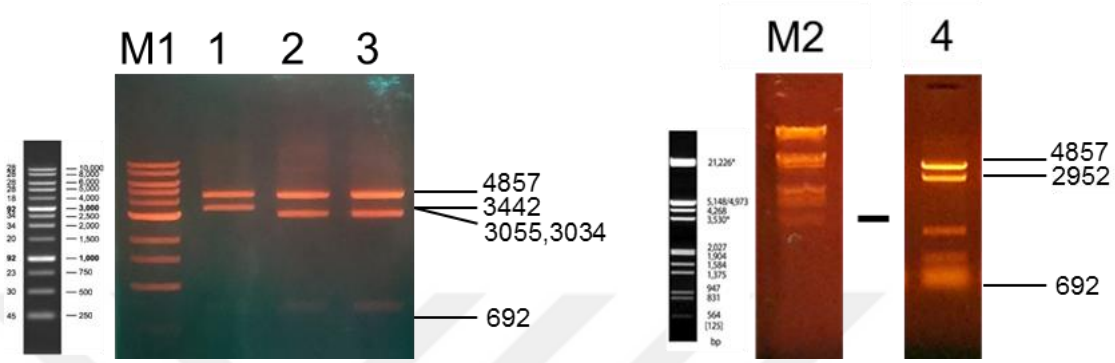
Maya ikili-hibrit testleri için oluşturulan ve maya GAL4 aktivasyon domainini (GAL4-AD) kodlayan dizi ile kaynaşmış halde *SNX2* cDNA'ları taşıyan plazmitlerin transformasyon sonrası seçilmesi koloni PZR ile gerçekleştirildi. Tüm plazmitler için *SNX2* cDNA'larının her iki tarafında vektör içerisinde özgün hedeflere bağlanan AATACCACTACAATGGATGATGT (pGAD-sq-For) ve CCAAGATTGAAACTTAGAGGAGT (pGAD-sq-Rev) dizilerine sahip primer çifti kullanıldı. Elde edilen sonuçlar Şekil 17'de verildi. PZR ile test edilen transformantların ortalama yarısında beklenen boyutlarda DNA fragmentleri (SNX2, 1777 bç; SNX2dN, 1387 bç; SNX2dM, 1366 bç; SNX2dC, 1017 bç) gözlendi.



Şekil 17. pACT2 plazmitinde maya GAL4-AD geni ile kaynaşmış halde *SNX2* (1-4), *SNX2*dC (5-9), *SNX2*dN (10-14) ve *SNX2*dM (15-19) geni klonlanarak elde edilen rekombinant vektörlerin koloni PZR ile seçilmesi. Kırmızı renkle verilen örnekler doğru plazmit taşıyan kolonileri göstermektedir. Elektroforez işlemi Şekil 11'de belirtilen koşullarda gerçekleştirildi. **M**. 1 Kb ladder (NEB/N3232).

Koloni PZR ile ön kontrolü yapılan kolonilerden küçük ölçeklerde plazmit DNA izolasyonu yapıldı. Plazmit DNA'ları DraI restriksiyon enzimi ile kesilerek ikinci kez

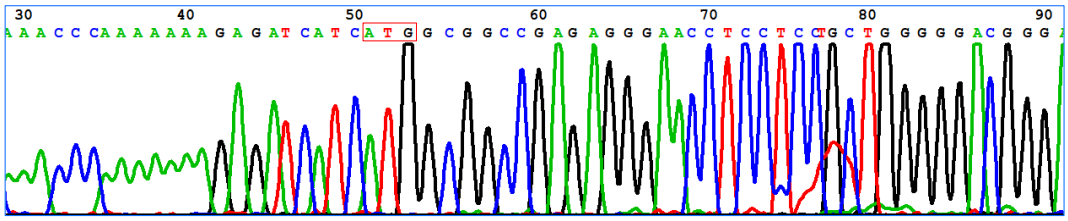
kontrol edildi (Şekil 18). Elektroforez sonuçları pACT2-SNX2 için, 4857, 3442, 692, 283, 269 bç; pACT2-SNX2dN için, 4857, 3055, 692, 283, 269 bç; pACT2-SNX2dM için, 4857, 3034, 692, 283, 269 bç; pACT2-SNX2dC için, 4857, 2952, 692, 283 bç boyutlarda beklenen DNA fragmentlerinin oluştuğunu gösterdi.



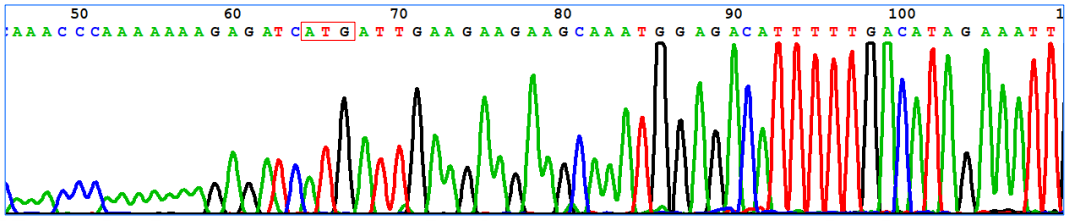
Şekil 18. DraI restriksiyon endonukleaz enzimi ile kesilen plazmit vektörlerinin agaroz jel elektroforezi görüntüleri. **1.** pACT2-SNX2 **2.** pACT2-SNX2dN **3.** pACT2-SNX2dM **4.** pACT2-SNX2dC. Not: Jel üzerinde boyutları küçük olan 283, 269 ve 19 bç'lik DNA fragmentleri görünmemektedir. Elektroforez işlemi Şekil 11'de verilen koşullarda gerçekleştirildi. **M1**: 1 Kb ladder (NEB/N3232). **M2.** λ DNA/HindIII+EcoRI

pACT2 plazmiti üzerinden kodlanan SNX2 proteinlerine özgü antikor laboratuvarımızda mevcut olmadığı için klonlanan genlerin kontrolü sadece DNA dizi analizleri ile yapıldı (Şekil 19). DNA dizi analiz sonuçları *SNX2* genlerinin, tasarladığı şekilde maya GAL4 aktivasyon domainini kodlayan dizi ile uygun çerçeve içerisinde olduğunu ortaya koydu.

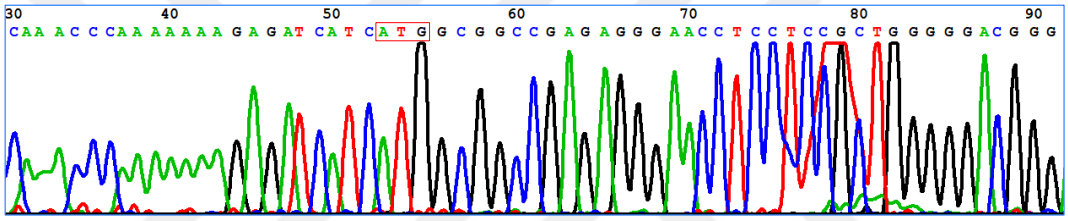
pACT2-SNX2



pACT2-SNX2dN



pACT2-SNX2dC



Şekil 19. pACT2 maya ikili-hibrit plazmitinde GAL4 bağlanma domainini kodlayan dizi ile aynı çerçevede klonlanan *SNX2*, *SNX2*dN ve *SNX2*dC genlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlarda *SNX2* genlerinin GAL4 geni ile bağlantı noktalarının dizisi verilmiştir.

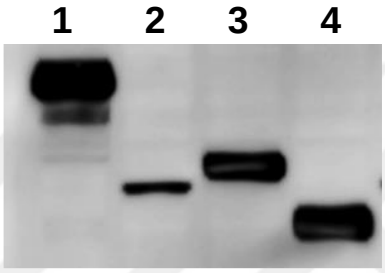
6.2. Plazmit Vektörlere Klonlanan *SNX2* Genlerinin Memeli Hücrelerinde Ekspresyonu ve Hücre İçi Birlikte-Lokalizasyonları ile İlgili Veriler

Tam boyutta *SNX2* (varyant 1) ve delesyonlu *SNX2* geni taşıyan plazmit vektörlerin insan orijinli hücrelerde anlatım yapıp yapmadıkları SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile araştırıldı. Bu proteinlerin HeLa hücrelerinde hücre içi lokalizasyonları ise immünfloresan teknikler ile saptandı.

6.2.1. İnsan SNX2 proteinlerinin Western melezleme teknikleriyle analizi sonuçları

Bu deneylerde HEK293 hücrelerinden yararlanıldı. 12-kuyulu plaklarda üretilen hücreler pCHA-SNX2, pCHA-SNX2dN, pCHA-SNX2dM veya pCHA-SNX2dC plazmitleri ile transfekte edildi. Transfeksiyondan yaklaşık 45-48 saat sonra hücreler

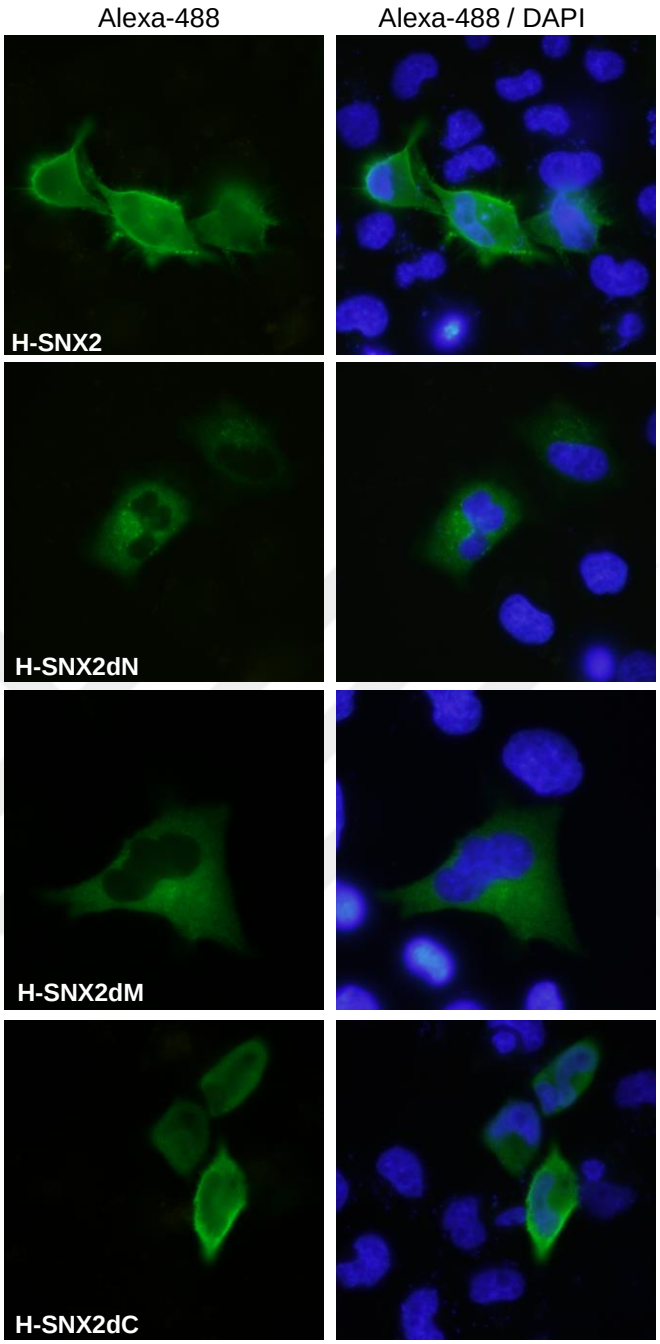
SDS örnek tamponu içerisinde parçalandı ve elde edilen protein lizatlar analiz edildi. Şekil 20'de verilen Western melezleme sonuçları plazmitlerde klonlanan *SNX2* ve delesyonlu *SNX2* genlerinin HEK293 hücrelerinde etkin bir şekilde ekspresyon yaptığını ortaya koydu. Jel üzerinde SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteini için teorik olarak beklenen ortalama boyutlar (SNX2:59 kD; SNX2dN: 45 kD; SNX2dM: 43 kD; SNX2dC:29 kD) protein bantları saptandı. Ortalama 45 kD olan SNX2dN proteinin, 43 kD olan SNX2dM proteinin göre jelde daha hızlı hareket ettiği görüldü. Bu durumun proteinlerin amino asit kompozisyonu ve konformasyonu ile ilişkili olabileceği düşünüldü.



Şekil 20. *SNX2* geni taşıyan plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde plazmitler üzerinden kodlanan proteinlerin Western melezleme tekniği ile analizi. **1**. SNX2, **2**. SNX2dN, **3**.SNX2dM, **4**.SNX2dC. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikoru, sekonder antikor olarak ise HRP konjuge keçi anti-fare IgG antikoru kullanıldı. Elektroforez işleminde 100x100x1 mm boylularında %10 poliakrilamid jeller kullanılarak, 70 V/jel sabit gerilim altında 75 dakikada tamamlandı. Protein bantları kemilüminesans substrat (GE Healthcare, RPN2232) ile görüntülendi. Görüntülemede DNR Bio marka jel görüntüleme cihazı kullanıldı.

6.2.2. İnsan SNX2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları ile ilgili sonuçlar

pCHA plazmitinde HA uzantısı kodlayan dizi ile kaynaşmış olarak klonlanan *SNX2* genleri tarafından kodlanan proteinlerin HeLa hücrelerinde hücre içi lokalizasyonları immünfloresan teknikler ile saptandı. Proteinlerin işaretlenmesinde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikoru kullanıldı. Tam boyutta SNX2 proteininin hücrelerde daha çok hücre membranı periferinde yoğunlaştığı görüldü. SNX2dN, SNX2dM ve SNX2dC proteinlerinin hücrelerde sitozolde ya da organellerde lokalize oldukları saptandı (Şekil 21).

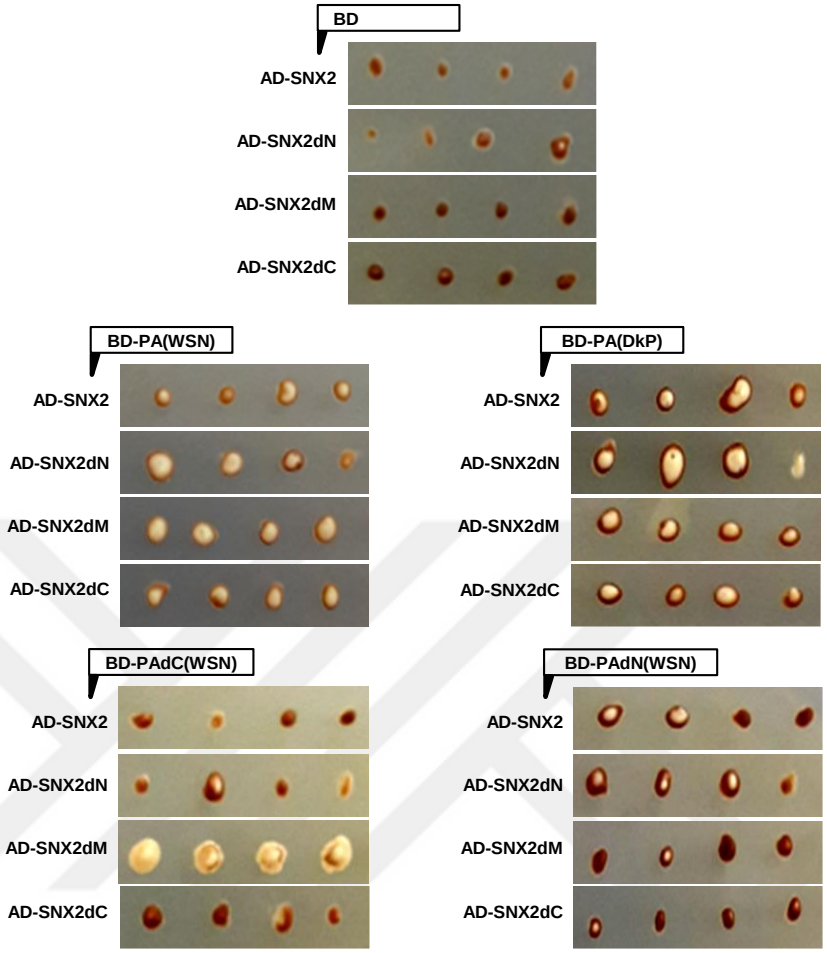


Şekil 21. pCHA-SNX2, pCHA-SNX2dN, pCHA-SNX2dM ve pCHA-SNX2dC plazmit vektörleri ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden kodlanan HA uzantılı SNX2 proteinlerinin hücre içi loklalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikoru (1/500 seyreltme); sekonder antikor olarak ise Alexa 488-konjuge anti-fare IgG antikoru (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

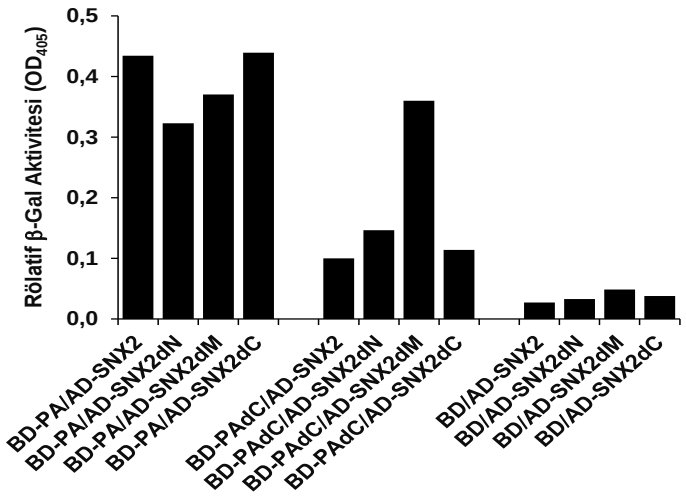
6.3. Maya İkili-Hibrit Metodu ile Elde Edilen Veriler

Daha önce gerçekleştirilen maya ikili hibrit metodu ile taranma çalışmasında influenza A virüsü PA proteini ile etkileşim gösterdiği saptanan peptidin SNX2 proteininin 276 amino asitten oluşan karboksil-terminal bölgesinden ibaret olduğu saptanmıştır. SNX2 proteinin viral PA proteini ile etkileşimini daha detaylı çalışmak için, memeli hücreleri için pCHA plazmitine klonlanan tam boyutta SNX2 cDNA'sı ve delesyonlu cDNA'lar pACT2 maya ikili-hibrit plazmitine aktarıldı ve bu plazmit üzerinden kodlanan proteinlerin maya hücrelerinde PA bait ile olası etkileşimleri yeniden test edildi. Hem influenza PA bait proteinini hem de insan SNX2 proteinini kodlayan maya ikili-hibrit plazmitleri aktarılan maya ikili transformantlarının SD (-) seçici besiyerindeki üreme profilleri Şekil 22'de verildi. Deneylerde influenza A (WSN) ve influenza A (Duck/Pen) virüsüne ait PA proteini bait olarak kullanıldı. Kontrol amaçlı PA geni taşımayan maya GAL4 bağlanma domaini kodlayan plazmit (pGBD-C1) ve *SNX2* geni taşıyan plamzit ile transforme edilen ikili maya transformantlarının SD (-) besiyerinde çok sınırlı düzeyde üreme gösterdiği ve kahverengi koloniler oluşturduğu saptandı. SNX2 ya da delesyonlu SNX2 proteini ile PA proteini kodlayan tüm maya kolonilerinin SD (-) besiyerinde kontrol hücrelere oranla daha hızlı üredikleri saptandı. İnfluenza A (WSN) PA proteinin amino-terminal (PAdC) ve karboksil-terminal (PAdN) yarımlarını kodlayan plazmitler ile yapılan testlerde PAdC proteininin SNX2dM proteini ile güçlü bir etkileşim gösterdiği saptandı (Şekil 22A). Küçük ölçekte sıvı besiyerinde (SD+Ade+His) üretilen ikili maya taransformantlarında, protein etkileşimleri için ikinci bir belirteç olan β-galaktozidaz geni tarafından kodlanan β-galaktozidaz enzimi aktiviteleri ölçüldü (Şekil 22B). Elde edilen sonuçların, SD (-) besiyerinde kolonilerin üreme profilleri ile korelasyon içinde olduğu gözlendi.

A



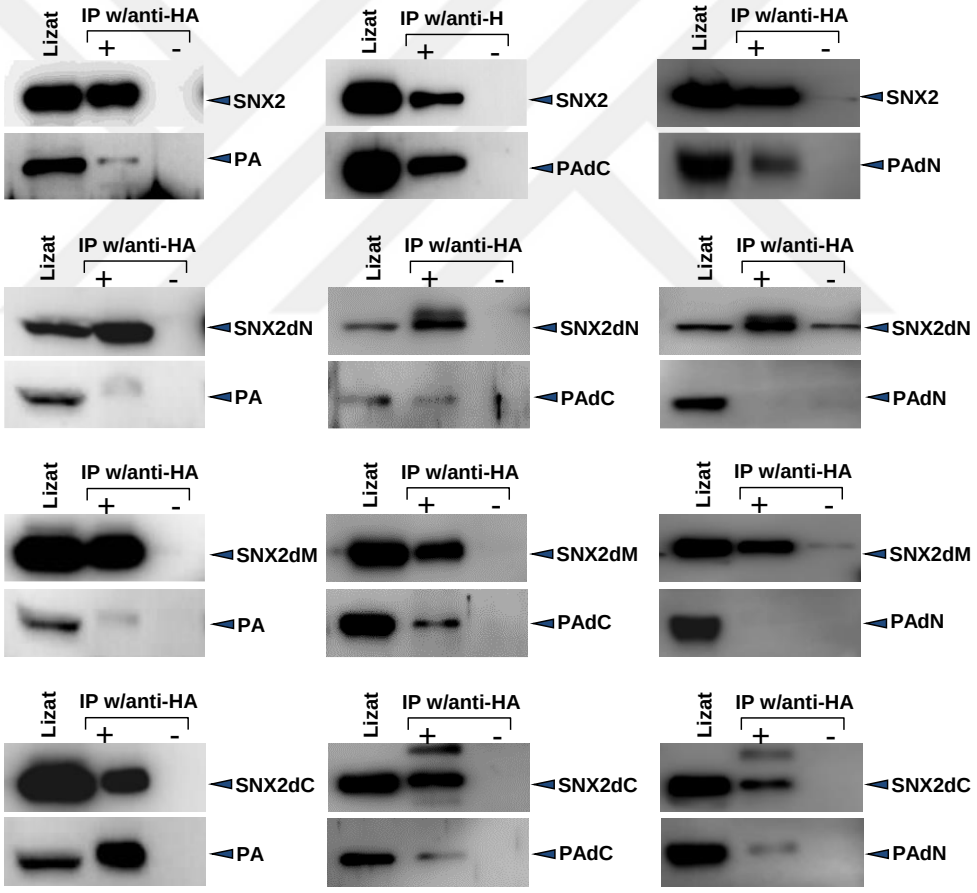
B



Şekil 22. İnfluenza A virüsü PA proteini ve insan SNX2 proteini kodlayan maya ikili hibrit plazmitleri ile transforme edilen S. cerevisiae PJ69-4A hücrelerinin SD (-) seçici besiyerinde gösterdikleri üreme profilleri (A) ve hücrelerde ölçülen β-galaktozidaz enzimi aktiviteleri (B). AD. GAL4 maya transkripsiyon faktörünün aktivasyon domainini BD. ise bağlanma domainini göstermektedir.

6.4. Birlikte İmmünçöktürme ile İlgili Veriler

Maya hücrelerinde ikili hibrit metodu ile ilişkisi saptanan insan SNX2 ve viral PA proteini arasındaki ilişki, influenza A virüsleri için doğal konak olan insan hücrelerinde sentez edilen HA uzantısı taşıyan SNX2 proteinlerinin monoklonal fare anti-HA antikorları kullanılarak çöktürülmesi ve çökeltinin hem SNX2 proteini hem de PA proteinleri için analiz edilmesiyle saptandı. Bunun için gerek SNX2 gerekse viral PA proteinleri, ilgili plazmitlerin transfeksiyonu ile HEK293 hücrelerinde sentez edildi. Gereç ve Yöntemler kısmında (bak. 5.28.) anlatıldığı şekilde bu hücrelerden hazırlanan lizatlarda antikorlarla çöktürülen protein örnekleri SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi ve elde edilen sonuçlar Şekil 23'te verildi.



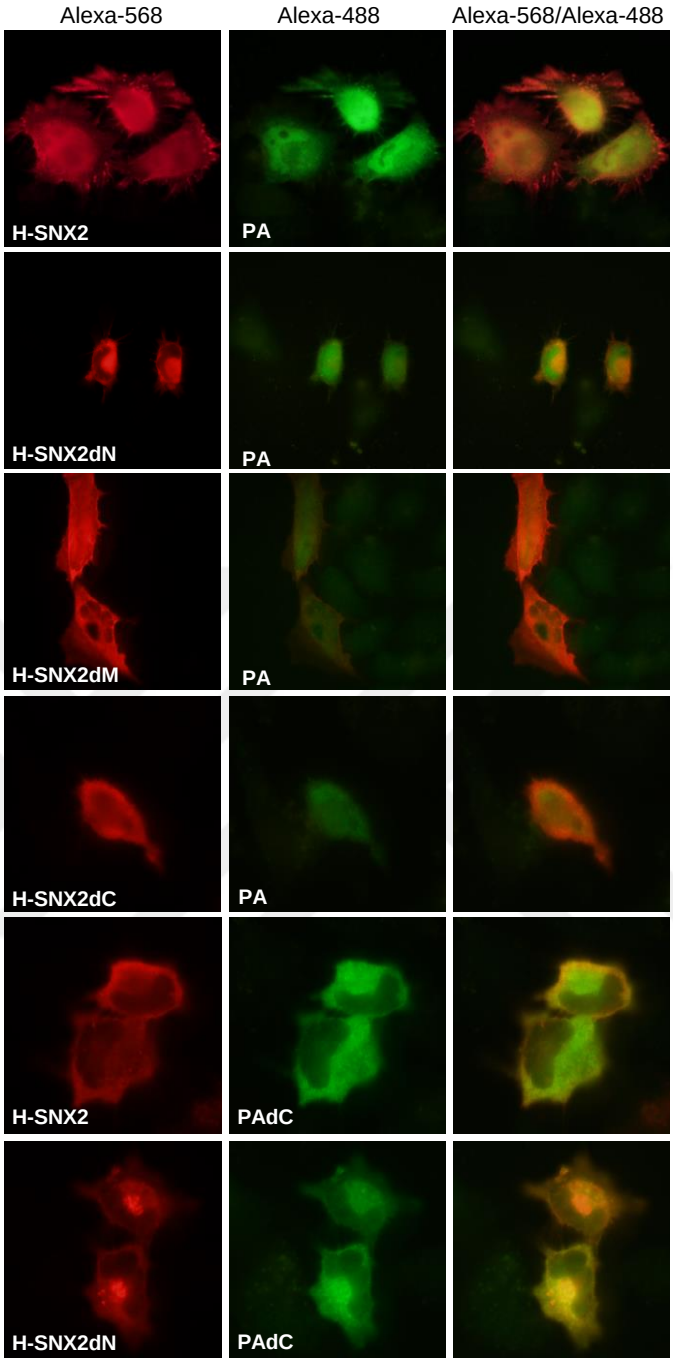
Şekil 23. Plazmitler üzerinden HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen insan SNX2 proteinleri ve influenza PA proteinleri arasındaki ilişkinin birlikte immünçöktürme testi ile araştırılması. Transfekte edilen hücrelerde sentez edilen proteinlerden SNX2 proteinleri monoklonal fare anti-HA antikoru ile çöktürüldü. Çökelen proteinler Western melezleme ile analiz edildi. Western melezleme işlemi

SNX2 proteinleri için anti-HA antikoru ile PA proteinleri için ise poliklonal tavşan anti-PA antikorları ile gerçekleştirildi. Sekonder antikor olarak HRP konjuge anti-fare IgG ya da anti-tavşan IgG kullanıldı. Elektroforez işlemleri Şekil 20'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Birlikte immünçöktürme testleri, interaksiyon için önemli olabilecek bölgeler hakkında veri elde edebilmek için hem tam boyutta proteinler hem de delesyonlu proteinler ile gerçekleştirildi. Elde edilen sonuçlar, SNX2 proteini viral PA ve delsyonlu PA (PAdC ve PAdN) proteinleri farklı düzeylerde birlikte çökeldiğini gösterdi. Amino terminal bölgesi delesyonlu SNX2 proteininin (SNX2dN) PA ve PAdN ile çökelti vermediği; PAdC ile zayıf çökelti verdiği görüldü. SNX2dM proteini SNX2dN proteinin benzer bir sonuç verdi. Karboksi terminal bölgesi delesyonlu SNX2 proteini (SNX2dC) ise hem PA proteini hem de delesyonlu PA proteinleri ile birlikte çökelti oluşturdu.

6.5. Birlikte lokalizasyon ile ilgili veriler

Geçici transfekiyon ile insan HEK293 hücrelerinde olası ilişkileri birlikte immünçöktürme testleri ile analiz edilen influenza PA proteini ve insan SNX2 proteinlerinin, HeLa hücrelerinde birlikte sentez edildiklerinde hücre içi lokalizasyon profillerinin nasıl olacağı immünfloresans teknikler ile araştırıldı. Hücreler SNX2 ve PA proteinlerini kodlayan plazmitlerle birlikte transfekte edildi. Tranfeksiyondan 40-44 saat sonra hücreler Gereç ve Yöntemler kısmında (bak. 5.29.) açıklandığı şekilde paraformaldehit ile fikse edildi; SNX2 proteinleri fare monoklonal anti-HA antikoru ile, PA proteinleri ise tavşan poliklonal anti-PA antikorları ile işleme kondu. Daha sonra Alexa-488 ve Alexa-568 ile konjuge sekonder antikorlar ile işaretlenen proteinler floresan mikroskop altında incelendi (Şekil 24).

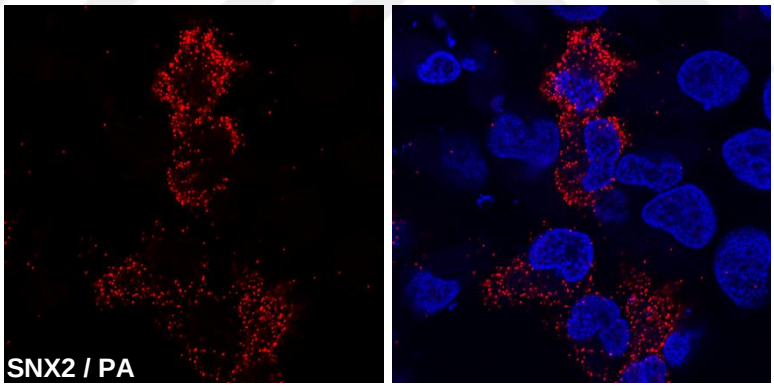


Şekil 24. İnfluenza A virüsü PA proteini ve insan SNX2 proteini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA ve SNX2 proteinlerinin lokalizasyonlarının immünfloresan teknikler ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare orijinli anti-HA antikoru (1/500 seyreltme) ve tavşan orijinli anti-PA antikoru (1/500 seyreltme); sekonder antikor olarak ise Alexa 568-konjuge anti-fare IgG antikoru (1/300 seyreltme) ve Alexa 488-konjuge anti-tavşan IgG antikoru (1/300 seyreltme) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi. Örnekler DP72 peltier soğutmalı kamera bağlı bir floresan mikroskop (Olimpus, Japonya) ile analiz edildi.

Elde edilen veriler, HeLa hücrelerinde plazmit üzerinden sentez edilen influenza A virüsü PA proteininin SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteinleri ile benzer lokalizasyon profilleri verdiğini gösterdi. Özellikle SNX2dN proteinin delesyonlu PA proteini ile (PAdC) önemli ölçüde ko-lokalizasyon gösterdiği saptandı. İmmünfloresans testler ile elde edilen sonuçların birlikte immünçöktürme testlerini doğrular nitelikte olduğu görüldü.

6.6. PL Testi ile İlgili Veriler

HeLa hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden kodlanan influenza A virüsü PA proteini ve insan SNX2 proteini arasındaki ilişki, oldukça yeni bir teknik olan PL testi (PLA; proximity ligation assay) ile de araştırıldı. Gereç ve Yöntemler kısmında (Bak. 5.30.2.) anlatıldığı şekilde hazırlanan hücre örnekleri Zeiss LSM 700 mikroskop ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen PA ve SNX2 proteinlerinin pozitif reaksiyon verdiğini (floresans nokta oluşumları) ve birbirlerine 40 nm'den daha yakın mesafede lokalize olduklarını gösterdi (Şekil 25)



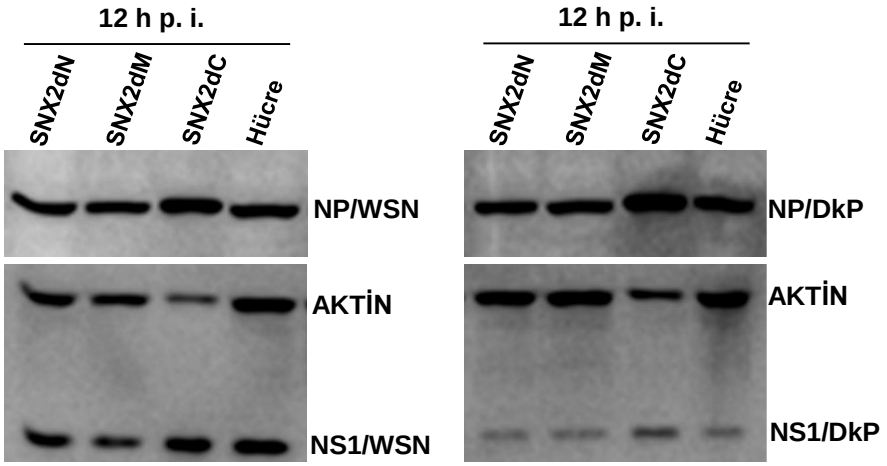
Şekil 25. Hela hücrelerinde plazmit vektörler üzerinden kodlanan influenza PA ve insan SNX2 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının PL testi ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-HA ve tavşan poliklonal anti-PA antikor karışımı; sekonder antikor olarak prob bağlı anti-fare antikoru (Probe Anti-Mouse MINUS) ve anti-tavşan antikoru (Probe Anti-Rabbit PLUS) kullanıldı. Hücre nukleusları DAPI ile işaretlendi.

6.7. SNX2 Proteininin Viral Replikasyona Etkileri ile İlgili Veriler

SNX2 proteininin PA proteini ile etkileşimi ve influenza virüs replikasyonuna etkisinin araştırılması için bu proteininin hücrelerdeki miktarı değiştirilerek iki farklı yol izlendi. Birincisi, SNX2 proteinini kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde protein miktarı geçici olarak arttırıldı. İkinci, *SNX2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde *SNX2* transkript düzeyi düşürüldü (knock down). Her iki durumda da hücreler influenza virüsleri ile enfekte edildi ve viral enfeksiyonun seyri izlendi.

6.7.1. SNX2 ekspresyon düzeyindeki artışın influenza virüs replikasyonuna etkisi ile ilgili veriler

Hücrelerde SNX2 proteinindeki artışın viral replikasyona etkisini araştırmak için, HEK293 hücreleri delesyonlu SNX2 kodlayan plazmit vektörler ile transfekte edildi. Hücreler transfeksiyondan 36 saat sonra influenza A WSN veya DkP tipi virüsler ile enfekte edildi. Viral enfeksiyondan 12 saat sonra hücreler SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda parçalandı ve hücre lizatlarında influenza virüsü NP ve NS1 proteinleri Western melezleme ile analiz edildi (Şekil 26). Elde edilen veriler, SNX2dN ve SNX2dM proteinlerindeki artışın viral protein miktarında önemli bir etki yapmadığını gösterdi. Buna karşın SNX2dC proteininin hem WSN hem de DkP tipi virüs proteinlerinde hücresel aktin proteinine göre nispi bir artışa yol açtığı saptandı.

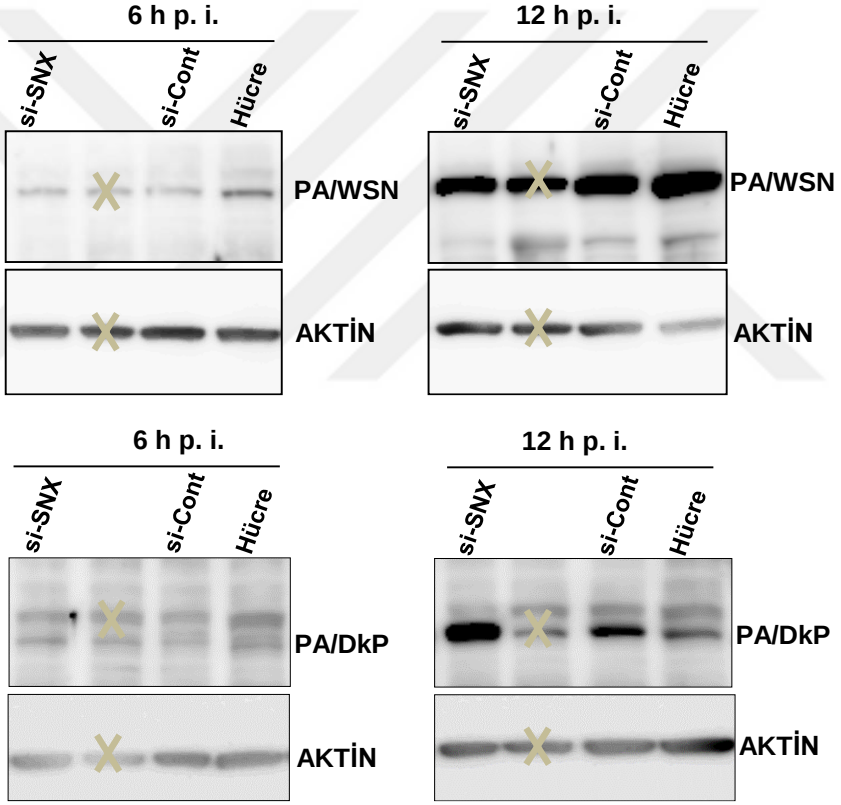


Şekil 26. Delesyonlu SNX2 proteini kodlayan plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilen ve sonrasında influenza A virüsleri ile enfekte edilen HEK293 hücrelerinde viral NP ve NS1 protein miktarlarının Western melezleme tekniği ile incelenmesi. HEK293 hücreleri transfekte edildikten 36 saat sonra influenza

A/WSN/33-H1N1 (2 moi/hücre) ve influenza A/Duck/Pennsylvania-H5N2 virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyonun 12.saatinde viral protein miktarı belirlendi. Elektroforez işlemleri Şekil 20'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

6.7.2. *SNX2* geninin siRNA transfeksiyonu ile traskript düzeyinin düşürülmesinin influenza virüs replikasyonuna etkisi ile ilgili veriler

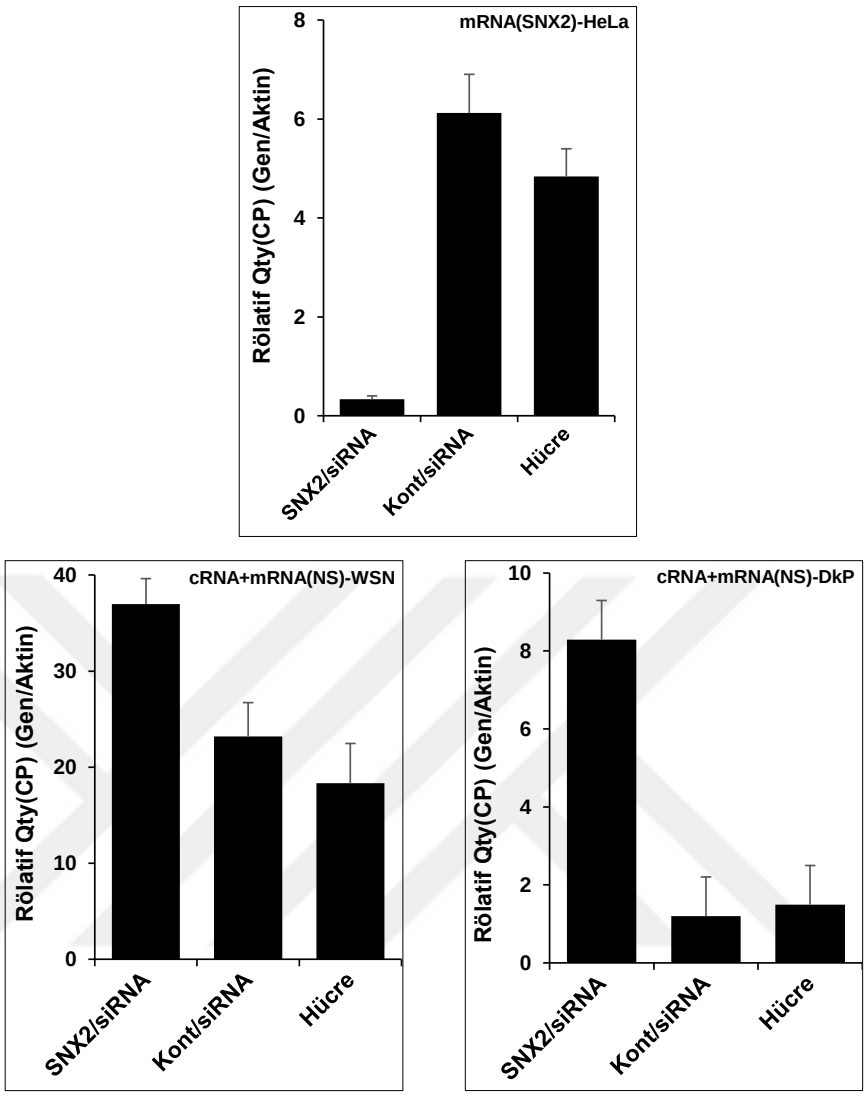
Daha önce Gereç ve Yöntemlerde verildiği şekilde (bak. 5.31.2) *SNX2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilerek SNX2 transkript düzeyi düşürülmüş hücreler influenza A/WSN/33-H1N1 ve influenza A/Duck/Pennsylvania-H5N2 virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 6 ve 12 saat sonra SDS örnek tamponu içerisinde parçalanan hücre lizatlarında influenza virüsü PA proteini miktarları Western melezleme tekniği ile karşılaştırıldı (Şekil 27).



Şekil 27. *SNX2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen ve sonrasında influenza A virüsleri ile enfekte edilen HeLa hücrelerde, enfeksiyondan 6 ve 12 saat sonra PA ve beta aktin proteini miktarlarının Western melezleme tekniği ile analizi. **si-SNX2**. *SNX2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen hücre örnekleri. HeLa hücreleri siRNA'lar ile transfekte edildikten 72 saat sonra influenza A/WSN/33-H1N1 (2 moi) ya da influenza A/Duck/Pennsylvania-H5N2 (1 moi) virüsü ile enfekte edildi. **si-Cont**. Kontrol siRA'lar ile transfekte edilen hücre örnekleri. Deneylerde primer antikor olarak, tavşan poliklonal anti PA antikoru ve fare monoklonal anti aktin beta antikoru; sekonder antikor olarak ise HRP konjuge anti fare IgG ya da anti tavşan IgG kullanıldı. Elektroforez işlemleri Şekil 20'de verilen koşullarda gerçekleştirildi.

Kontrol siRNA'lar ile trasfekte edilmiş hücreler ve siRNA transfeksiyonu yapılmamış HeLa hücrelerinde influenza A/WSN/33-H1N1 PA proteini miktarları, SNX2 genin transkript düzeyi düşürülen hücrelerle karşılaştırıldığında önemli bir farklılık olmadığı görüldü. Buna karşın A/Duck/Pennsylvania-H5N2 virüsleri ile enfekte edilen SNX2 transkript düzeyi düşürülmüş hücrelerde viral PA proteininde belirgin bir artış saptandı. Bu sonuç SNX2 proteininin insan ve kuş tipi influenza A virüslerinin replikasyonunu farklı düzeylerde etkilediğini düşündürrmektedir.

SNX2 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde viral proteinlerin yanısıra *SNX2* geni ve influenza virüsü 8.segmenti transkript düzeyleri gerçek zamanlı PZR ile de değerlendirildi (Şekil 28). Bunun için hücrelerin bir kısmından viral enfeksiyondan hemen önce diğer bir kısmından ise enfeksiyondan 12 saat sonra total RNA ekstre edildi ve cDNA'lar hazırlandı (bak. 5.19.). cDNA'lar üzerinden yapılan kantitasyon çalışması sonucu edilen veriler SNX2 siRNA'lar ile tranfekte edilen hücrelerde *SNX2* geni transkript düzeyinin kontrol siRNA ile transfekte edilen hücrelere göre en az %95 oranında düştüğü saptandı. Aynı hücrelerde influenza A/WSN/33-H1N1virüsü transkript düzeyinde ortalama % 35-40; A/Duck/Pennsylvania-H5N2 virüsü transkript düzeyinde ortalama % 85 oranında bir artış görüldü. Bu sonuçlar enfekte hücrelerde saptanan PA protein miktarları ile paralellik gösterdi.

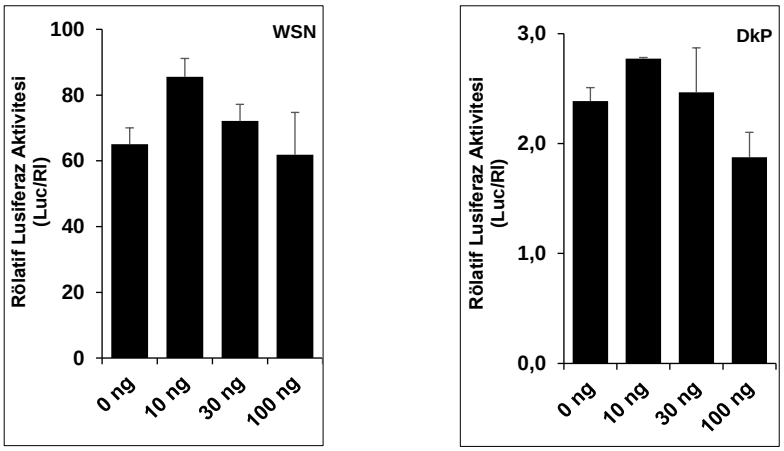


Şekil 28. *SNX2* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen ve sonrasında influenza A virüsleri ile enfekte edilen HeLa hücrelerde, enfeksiyon hücresel SNX2 trasnktipt düzeyi ve enfeksiyondan 12 saat sonra viral transkript düzeylerinin gerçek zamanlı PZR ile analizi. Analizler SYBR Green Master mixs (Roche, Germany) kullanılarak BioRad CFX96 cihazında gerçekleştirildi. SNX2 ve viral transkriptlerin rölatif kantite değerleri hücresel aktin beta transkript değerleri ile oranlanarak belirlendi.

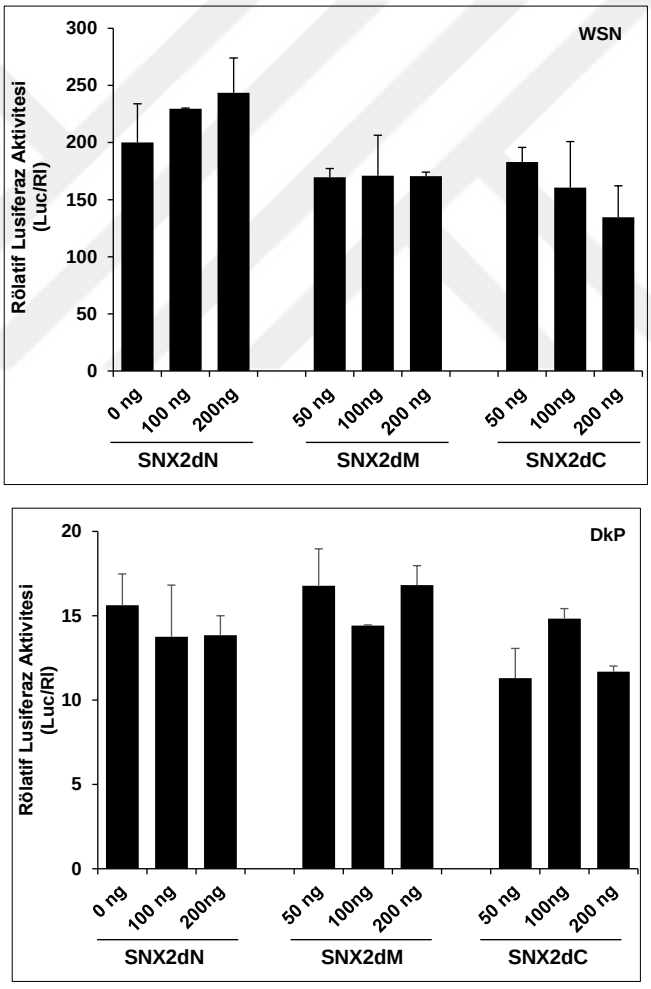
6.8. SNX2 Proteinlerinin İnfluenza A Virüsü RNA Polimeraz Enzimine Etkileri ile İlgili Veriler

İnsan SNX2 proteinin etkileşim halinde olduğu influenza PA proteininin viral RNA polimeraz enziminin alt ünitesi olması nedeniyle, bu proteinin viral RNA polimeraz enzimine olası etkileri minireplikon modeli (Turan ve ark., 2004) üzerinde araştırıldı (Şekil 29).

A



B



Şekil 29. HEK293 hücrelerinde geçici transfeksiyon ile miktarı arttırılan SNX2 proteini (**A**) ve delesyonlu SNX2 proteinlerinin (**B**) influenza A virüsü RNA polimeraz enzimine etkileri. 24-kuyulu kültür plaklarında üretilen HEK293 hücreleri belirlenen miktarlarda minireplikon plazmitleri ve artan miktarlarda SNX2 kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 44 saat sonra hücrelerde belirteç işlevi

gören ateş böceği lüsiferaz aktivitesi ve kontrol renilla lüsiferaz aktiviteleri belirlendi. Belirteç lüsiferaz aktiviteleri renilla lüsiferaz aktiviteleri ile normalize edilerek sonuçlar elde edildi.

Deneylerde hem tam boyutta SNX2, hem de delesyonlu SNX2 proteinlerinin etkileri test edildi. Geçici olarak taransfekte edilen HEK293 hücrelerinde SNX2 protein miktarındaki artışın çalışmada kullanılan her iki tip influenza A virüsü RNA polimerazı üzerinde anlamlı bir etki yapmadığı saptandı (Şekil 29A). Benzer şekilde delesyonlu SNX2 proteinlerinin de insan tipi influenza A virüsü polimeraz enzimi aktivitesi üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (Şekil 29B).

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

Virüsler varlıklarını sürdürebilmek için metabolik olarak aktif konak hücrelere gereksinim duyarlar. Hücreye girişin ilk basamağı olan tutunma aşamasından yeni virüs partiküllerinin serbest kalmasına kadar geçen süreçte viral genom üzerinden kodlanan proteinler birçok konak hücre proteini ile etkileşim gösterir (Skehel ve Wiley, 2000). Bu etkileşimler viral replikasyon üzerinde etkisiz olabileceği gibi negatif ya da pozitif yönde etki de gösterebilir. Diğer taraftan viral ve hücresel proteinler arasındaki etkileşimler hem konak spesifikliğini hem de virüsün enefeksiyon yapma potansiyelini belirler. İnfluenza A virüsleri, membranlarında yer alan özellikle HA proteinleri sayesinde çok farklı hücresel reseptör proteinler ile etkileşime girerek başta kanatlılar olmak üzere çok sayıda memeli türünde ve insanlarda enfeksiyon yapabilecek kadar büyük bir varyasyon gösterir (Webster ve Govorkova, 2006; Yen ve Webster, 2009). HA proteinleri bir bakıma konak hücrelerin giriş kapısını açan bir anahtar niteliği taşır. Dolayısıyla konak spesifikliğini belirleme açısından influenza HA proteinleri büyük önem taşımaktadırlar. Viral enfeksiyonlar açısından viral proteinler kadar hücresel proteinler de önemlidir. Örneğin insan tipi influenza A virüsleri tercihen hücre membranında yer alan glikozile proteinleri tercih ederler (Karlas ve ark., 2010). Buna karşın kuş tipi virüslerin glikozile reseptörlere olan affinitesi daha yüksektir (Shi ve ark., 2014). Bu bakımdan bir adaptasyon süreci gerçekleşmeden kuş tipi bir virüsün insan hücrelerinde etkin enfeksiyon yapabilmesi çok zordur. Buna karşın zaman zaman kuşlardan insanlara geçiş için adaptasyon geçiren influenza A tipi virüsler de ortaya çıkabilmektedir (Garten ve ark., 2018; Li ve ark., 2019). İnfluenza A virüslerinin konak hücreler ile ilk kademe etkileşimi olan HA proteininin reseptörüne kolayca bağlanabilmesi ve sonrasında virüsün hücre içine alınması çok önemli olmakla birlikte, hücre içerinde viral replikasyonun başarılı olmasını garanti etmez. Hücre içerisinde de bir dizi konak proteinlerinin etkileri, diğer viral proteinlerin yapıları ve aktiviteleri ile bu proteinlerin hücresel proteinler ile etkileşimi virüs replikasyonunun seyrini belirler.

İnfluenza A virüslerinin hücre içi replikasyonu açısından önemli olan viral proteinlerin başında RNA polimeraz enzimleri gelmektedir. Viral genomun en büyük üç segmenti üzerinden kodlanan PB2, PB1 ve PA proteinleri aktif bir kompleks oluşturarak virüs

RNA'larının hem transkripsiyonunu hem de replikasyonunu gerçekleştirirler. İnsan ve kuş tipi influenza A virüslerinin RNA polimeraz aktivitelerini saptamak için geliştirilen minireplikon modelleri, kuş tipi RNA polimeraz enziminin memeli hücrelerinde daha düşük aktivite gösterdiğini ortaya koymuştur (Pham ve ark., 2018; Turan ve ark., 2004). Bu da hücre içerinde viral proteinler ile hücresel proteinler arasındaki etkileşimin viral replikasyon açısından önemine işaret etmektedir. Diğer taraftan, farelerde düşük patojenite gösteren influenza A virüs tipinde, reverz genetik teknikler ile PB2 proteininde 292, 627 ve 701'inci nükleotidlerinde oluşturulan mutasyonların virüsü yüksek düzeyde patojen hale getirdiği gösterilmiştir (Kong ve ark., 2019; Zhou ve ark., 2018). Dolayısıyla virüsler için konak spesifikliğini ve viral patojeniteyi belirleyen çok sayıda hücresel protein faktörler ve viral faktörler bulunmaktadır. Son yıllarda proteinler arasındaki etkileşimi saptamak amacıyla yeni teknikler ve *in silico* modelleme teknikleri geliştirilmiştir (Gupta ve ark., 2020). Bununla birlikte maya hücreleri ya da memeli hücreleri için geliştirilen ikili-hibrit teknikleri ve sonrasında uygulanacak olan biyokimyasal ve immünolojik teknikler proteinler arası etkileşimlerin belirlenmesi ve proteinlerin fonksiyonlarının saptanmasında sonuç odaklı tekniklerdir. Bu çalışmaya konu olan konak hücre proteinlerinden SNX2 proteinin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi ile ilişkisi maya ikili-hibrit metodu tekniği ile saptanmıştır (yayımlanmamış veri). Bu verilerden yola çıkılarak tez çalışması kapsamında influenza A virüsü RNA polimeraz alt ünitesi olan PA proteini ile SNX2 proteini arasındaki ilişki insan orijinli hücrelerde biyokimyasal ve immünolojik teknikler ile araştırılmıştır.

Proteinler arasındaki etkileşimleri ve proteinlerin işlevlerini saptamak için kullanılan maya ikili-hibrit metodu etkili bir teknik olmakla birlikte, kesin sonuç almak için çoğunlukla tek başına yeterli bir teknik değildir. Bununla birlikte ele alınan bir proteinin (bait/yem) hücre içerisinde bilinmeyen birçok protein ile etkileşimini araştırmak için ideal bir yöntemdir (Van Criekinge ve Beyaert, 1999). Belirlenen aday proteinlerin farklı teknikler ile etkileşimlerinin test edilmesi gerekmektedir. Bu nedenle, bu tez çalışması kapsamında maya hücrelerinde influenza A virüsü PA proteini ile etkileşim gösterdiği saptanan insan SNX2 proteinin memeli hücrelerindeki davranışları ve influenza A virüsü replikasyonuna etkileri değerlendirilmiştir. Bu hedefler doğrultusunda gerek memeli hücrelerinde SNX2 ve PA proteinleri arasındaki

ilişkiyi yapay sistemler üzerinden belirlemek, gerekse, maya ikili-hibrit metodu ile elde edilen verileri doğrulamak için SNX2 proteinlerini kodlayan bir dizi memeli ve maya ekspresyon vektörü oluşturuldu. Çalışmanın ilk aşamasında, SNX2 proteinin olası fonksiyonel bölgelerini araştırmak için delesyonlu SNX2 proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörleri elde edildi. Bunun için daha önce tam boyutta insan SNX2 geni (varyant 1) cDNA'sının klonlanması ile elde edilen pCHA-SNX2 memeli ekpresyon vektörü üzerinden, ters PZR tekniğinden yararlanarak üç farklı delesyonlu SNX2 proteini kodlayan plazmit vektörleri elde edildi (Şekil 20). Elde edilen delesyonlu genlerin HEK293 hücrelerinde anlatım yaptıkları SDS-PAGE/Westerm melezleme tekiniği ile gösterildi (Şekil 20). SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteinlerini (SNX2dN, SNX2dM ve SNX2dC) kodlayan ekspresyon plazmitleri ile transfekte edilen ve geçici olarak bu proteinleri sentez eden HeLa hücrelerinde proteinlerin lokalizasyonları immünfloresan teknikler ile ortaya kondu (Şekil 21).

Maya ikili-hibrit metodu ile yapılan cDNA tarama çalışmalarında bait protein ile etkileşim gösteren aday proteinler, genellikle kısmi cDNA'lar üzerinde kodlandıkları için tam boyutta değildirler. Bu nedenle çalışmada insan SNX2 cDNA'sı tam boyutta ve delesyonlu şekilde pACT2 maya ikili-hibrit plazmitine yeniden klonlandı (Şekil 16). Bu plazmitler DNA dizi analizleri ile doğrulandıktan sonra, influenza virüsü PA bait proteinleri kodlayan maya hücrelerine transforme edildi. Elde edilen ikili transformatların SD seçici besiyerindeki üreme profilleri ve maya hücrelerinde ikinci belirteç görevi gören β-galaktozidaz aktiviteleri belirlendi (Şekil 22). Bu testler maya hücreleriden tam boyutta ya da delesyonlu SNX2 proteinlerinin influenza A virüsü ile farklı düzeylerde de olsa etkileşim halinde olduğunu gösterdi. Delesyonlu PA proteinleri ile yapılan deneylerde amino terminal yarımdan oluşan PA proteininin (PAdC), beklenmedik bir şekilde iç kısımda delesyon taşıyan SNX2 (SNX2dM) proteini ile güçlü bir etkileşim gösterdiği saptandı. SNX2dM proteininin gösterdiği bu etkileşimin proteinin doğal komformasyondaki değişimden kaynaklanan bir durum olduğu sonucuna varıldı.

DNA teknolojilerindeki gelişmeler bilimsel araştırmalara büyük bir ivme kazandırmakta, proteinlerin işlevselliklerini tanımlama ve başka proteinler ile ilişkilerini saptama konularında kolaylık sağlamaktadır. Bu teknolojilerden

yararlanılarak geliştirilen yapay sistemler ve test modelleri proteinlerin fonksiyonları ve işleyiş mekanizmaları hakkında önemli ipuçları vermektedir. Bu tez çalışması kapsamında da gerek mayalarda gerekse memeli hücrelerinde insan SNX2 proteinleri ve viral proteinler plazmit vektörlerin transformasyonu/transfeksiyonu ile yapay olarak arttırılımış, ya da siRNA teknolojileri ile SNX2 geni transkript düzeyi düşürülmüş ve bu koşullarda viral replikasyonun nasıl etkilendiği değerlendirilmiştir. Plazmit vektörlerin transfeksiyonu ile memeli hücrelerinde geçici olarak sentez edilen proteinlerin fonksiyonlarının ve diğer hücresel proteinler ile ilişkilerinin saptanmasında uygulanan biyokimyasal yöntemler arasında proteinlerin antikorlarla birlikte çöktürülmesi, GST ile birlikte çöktürme ve kromatografı tekniklerini de birlikte fraksiyonlama gibi teknikler öne çıkmaktadır (Brady ve ark., 2011; Brady ve ark., 2004; Ren ve ark., 2003). Bu çalışmada da insan SNX2 proteinlerinin influenza PA proteini ile ilişkisini saptamak amacıyla birlikte immünçöktürme tekniklerinden yararlanılmıştır. Proteinlere özgü antikorlar kullanılarak gerçekleştirilen birlikte immünçöktürme testlerinde ilgili proteinleri sentez eden hücrelerin parçalanması ile elde edilen hücre lizatlarında, aday proteinlerin spesifik antikor ve antikorları bağlayan protein-A-sefaroz (ya da protein-G-sefaroz) ile çöktürülen proteinlerin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi temeline dayanır (Lin ve Lai, 2017; Takahashi, 2015). Bunun için etkileşim içerisinde olduğu düşünülen iki proteinden birine özgü antikorlar kullanılarak çöktürme işlemi gerçekleştirilir. Bu tez çalışmasında, tam boyutta SNX2 geni ve bu genden türetilen delesyonlu SNX2 genleri pCHA plazmitinde, karboksil terminalde HA (YPYDVPDYA) uzantılı protein kodlayacak şekilde klonlanmıştır. Dolayısıyla bu plazmitler ile transfekte edilen HEK293 hücrelerine SNX2 proteinleri HA uzantılı olarak sentez edilmiştir. İmmün çöktürme deneylerinde de, hem viral PA proteini kodlayan hem de insan SNX2 proteinini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HEK293 hücrelerinden hazırlanan lizatlarda HA uzantılı SNX2 proteinlerini bağlamak için monoklonal anti-HA antikoru kullanılmıştır. Antikor bağlı proteinler ya da protein kompleksleri, antikorları bağlayan protein A sepharose boncuklar ile çöktürülmüştür. Protein çökeltileri SDS-PAGE ile ayrıştırılmış ve hem viral PA proteinleri hem de HA uzantılı insan SNX2 proteinleri Western melezleme ile analiz edilmiştir (Şekil 23). Şekil 23'te verilen sonuçlar değerlendirilidğinde HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen tam

boyutta SNX2 proteinin influenza A virüsü PA proteini ile ve delesyonlu PA proteinleri ile (PAdC ve PAdN) farklı düzeylerde birlikte çökelme olduğu belirlendi. SNX2 proteini ile birlikte çökelen doğal PA proteininin oransal olarak daha düşük düzeyde olduğu görülmektedir. Buna karşın birlikte çökelen PAdC protein oranı daha yüksek bulunmştur. Bu farklılıklar, hücrelere transfekte olan plazmit miktarlar ve PA proteinlerinin hücre içi sentez düzeylerinden kaynaklanmış olması ihtimali yüksektir. Bununla birlikte bu sonuçlar HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen insan SNX2 ve influenza PA proteinin etkileşim içerisine girdiklerini ve bu etkileşimde PA proteinin amino-terminal bölgenin daha önemli olabileceğini göstermektedir.

Sorting nexin proteinleri ortalama 400-700 amino asitten oluşan fosfolipid bağlayıcı çok iyi korunmuş bir PX (İng. phox-homology) domaini ile karakterize edilen hidrofilik proteinlerdir (Teasdale ve Collins, 2012; van Weering ve Cullen, 2014). Bu proteinler, hücrelerin sitoplazmasında lokalize olur ve lipit bağlayıcı PX domaini (fosfolipid bağlayıcı motif) ile veya membrana bağlı protein kompleksleri ile protein-protein etkileşimleri oluşturarak membranlara bağlanma potansiyeline sahip büyük bir protein grubudur (Bonifacino ve Hurley, 2008; Teasdale ve Collins, 2012) PX domainine ek olarak SNX proteinleri çoğunlukla BAR (İng. Bin/Amphiphysin/Rvs), FERM (İng. protein 4.1/ezrin/radixin/moesin) ve SH3 domaini gibi diğer domainlere de sahiptirler (Bonifacino ve Hurley, 2008). Bu ilave domainler de temel alındığında SNX protein ailesi beş alt gruba altında değerlendirilebilir. Bunlar; SNX-PX, SNX-BAR, SNX-FERM, SNX-PXA-RGS-PXC ve SNX-MIT alt gruplarıdır (Teasdale ve Collins, 2012). Çalışmalar özellikle üç alt gruba ait SNX proteinleri üzerinde yoğunlaşmıştır. Bu proteinler SNX-PX alt grubundan SNX3; SNX-BAR alt grubundan SNX1, SNX2, SNX5, SNX6; SNX-FERM alt grubundan SNX27 ve SNX17 proteinleridir. Bu proteinler retromer kompleksleri ya da yeni tanımlanmış retriever kompleksileri ile ilişkili proteinlerdir ve farklı endozomal trafik yolaklarında aracılık eder. Son yapılan çalışmalar, bu SNX proteinlerinin, fosfatidilinosititlere bağlanmalarına ek olarak, kargonun tanınmasında da merkezi bir rol oynadıklarını ortaya koymuştur. SNX3 proteininin yer aldığı SNX-PX alt grubu sadece PX yapısal domaine sahip proteinlerdir. SNX-BAR alt grubunda yer alan proteinler ise SNX3'ün aksine ek olarak BAR domaini taşıyan proteinlerdir. Membrandaki bükülmeleri algılayan proteinlerin bu domaininin, membran tübülasyonunu indükleyebileceği

düşünülmektedir (Teasdale ve Collins, 2012; van Weering ve Cullen, 2014). SNX-BAR proteinleri, membrandaki bükülmelerini ve PtdIns'i raslantısal tanıma yoluyla endozomları hedefleyebilir. SNX-BAR alt ailesi içinde yer alan SNX1 veya SNX2 proteinleri, hücrelerdeki SNX5 veya SNX6 ile bir heterodimer oluşturur. SNX-FERM alt ailesinin iki üyesi olan SNX27 ve SNX17 proteinlerinin birçok hücre yüzeyi proteininin geri dönüşümü için kritik olduğu gösterilmiştir. SNX27 ve SNX17 proteinlerinin her ikisi PX domaine ek olarak, FERM domainine de sahiptirler. Bu SNX proteinlerinin FERM domaini; büyüme faktörü reseptörleri, çözünen taşıyıcılar ve integrinleri kapsayacak şekilde NPxY/NxxY motiflerini taşıyan birçok proteinin tanınmasını sağlar. SNX27 proteini amino terminalinde ayırt edici bir PDZ domainine sahip olmasına karşın SNX17 buna benzer bir yapıya sahip değildir. SNX17 proteini bunun yerine karboksi terminalinde ayırt edici bir polipeptit sekansı taşır (Ghai ve ark., 2013). Bir bütün olarak değerlendirildiğinde, SNX proteinleri retromer ya da retriever kompleksleri aracılığıyla kargo özgüllüğü sağlar ve birçok endosomal taşıma yolaklarının oluşturulmasına yardımcı olur. Bu yayınlardan da anlaşıldığı gibi bu tez çalışmasına konu olan SNX2 proteininin de yer aldığı sorting nexin proteinleri hücrelerde membran trafiği ile ilgili birçok kompleks olayda rol almaktadır. Dolayısıyla akla gelen en önemli sorulardan biri bu aile içerisinde yer alan proteinlerin influenza A virüsleri ya da diğer virüsler ile ne tür bir ilişkisi olabilir sorusudur.

Maya ikili-hibrit metodu ile yapılan çalışmalar ve memeli hücrelerinde birlikte immünçöktürme testleri SNX2 proteinin influenza A virüs RNA polimeraz enzimi PA altbirimi ile etkileşim içerinde olduğunu desteklemektedir. Bu etkileşimin viral replikasyon açısından ya da virüs komponentlerinin hücre içi trafiği açısından önemi olabilir. SNX2 ile influenza A virüsü PA proteini arasında bir bağlantı kuran çalışmaya rastlanmamıştır. Buna karşın sorting nexin ailesi içerisinde yer alan birçok proteinin farklı virüsler ile etkileşimlerini ortaya koyan çalışmalara rastlanmaktadır. Sorting Nexin ailesinden SNX17'nin, insan papillomavirüsü (HPV) enfeksiyonunun erken aşamalarında önemli bir rol oynadığı bilinen L2 kapsid proteini ile güçlü bir etkileşim içerisinde olduğu; bu etkileşim, analiz edilen HPV L2 proteinlerinin çoğunda bulunan, yüksek oranda korunmuş SNX17 konsensüs bağlanma motifi ile gerçekleştiği; siRNA'lar ile SNX17 transkript düzeyinin azaltılması ya da SNX17 ile etkileşim bakımından kusurlu L2 proteinlerin kullanılması ile yapılan deneyler sonucunda bu iki

protein arasındaki etkileşimin viral enfeksiyon için esansiyel olduğu gösterilmiştir. Bu etkileşimin viral L2-DNA kompleksinin geç endozomal / lizozomal yapılardan kaçışını kaolaylaştırarak viral enfeksiyona olanak sağladığı ileri sürülmüştür (Bergant Marusic ve ark., 2012). L2 ve SNX17 proteinleri arasındaki etkileşimin tek tip PV için değil diğer birçok PV tipi için de geçerli olduğu ve bu durumun evrimsel olarak yüksek oranda korunan bir virüs giriş mekanizması olduğu belirtilmektedir (Bergant ve Banks, 2013).

Sorting nexin proteinlerinin ilişkili olduğu virüsler PV ile sınırlı değildir. Yapılan çalışmalar SNX27'nin HTLV-1 replikasyonu ile; SNX5'in insan sitomegalovirüsler (HCMV) ile; SNX3'ün vaccinia virüsü (VACV) ile etkileşim içerinde olduğunu ortaya koymuştur (Elwell ve Engel, 2018; Hsiao ve ark., 2015; Lucas ve Hierro, 2017). Al-Saleem ve arkadaşları (Al-Saleem ve ark., 2019) yaptıkları çalışmada insan T-hücresi lösemi tip 1 virüsüne (HTLV-1: human T-cell leukemia-lymphoma virus) ait Tax-1 proteinin SNX27 ile ilişkisini rapor etmişlerdir. Tax-1 proteini; HTLV'ler, sığır lösemi virüsü (BLV: bovine leukaemia virus) ve simian T-lenfotropik virüslerini (STLVs: simian T-lymphotropic viruses) de içine alan primat T-lenfotropik virüs ailesi üyeleri tarafından üretilen bir proteindir. Bu protein transaktivatör olarak işlev görür ve viral replikasyon için hayati öneme sahip proteinlerin sentez edilmesinde rol alır (Filomatori ve ark., 2011). Çalışmalar, Tax-1'in karboksil terminalinde PDZ bağlanma motifi taşıdığını ve bunun HTLV-1 ile indüklenen hücresel transformasyon için önemli olduğunu göstermiştir. Kütle spektrometresi tabanlı proteomik yaklaşımlar kullanılarak, SNX27 proteininin Tax-1 için yeni bir interaktör olduğu; bu etkileşimin Tax-1 proteininin PBM motifi ve SNX27 PDZ domaini aracılığıyla gerçekleştiği belirtilmektedir (Al-Saleem ve ark., 2019). Bu olaylarda SNX27'nin, HTLV-1 virüsünün reseptör moleküllerinden biri olan ve virüsün füzyonu ve hücreye girişi için işlev gören GLUT1 (glikoz transport 1) proteinin plazma membranındaki pozisyonunu belirlediği saptanmıştır. GLUT1 lokalizasyonunundaki değişikliğin Tax-1 ile SNX27 etkileşimi ile sağlandığı ileri sürülmüştür (Al-Saleem ve ark., 2019).

Sorting nexin proteinleri ile sağlıklı bireylerde asemptomatik enfeksiyona neden olan, ancak bağışıklığı baskılanmış hastalar için ciddi bir risk taşıyan insan sitomegalovirüs (HCMV: human cytomegalovirus) arasında da bir ilişki belirlenmiştir. Virüs

enfeksiyonunun geç evresinde, viral kapsid sitoplazmik kurulum odağına taşınır, burada matriks protein katmanı ve viral membran ile sarılır. Kurulum odağı, trans-Golgi ve endozom kaynaklı veziküllerden oluşan bir yapıdır. Maschkowitz ve arkadaşları (Maschkowitz ve ark., 2018) tarafından HCMV'e ait UL35 geni üzerinden kodlanan UL35 proteinlerinin, retromer komplekisinin bir bileşeni ve tersine (retrograd) taşınma yolağının bir parçası olan SNX5 ile etkileşim halinde olduğunu göstermişlerdir. Yabani tipte UL35 proteinlerinin, katyon bağımsız mannoz-6-fosfat reseptörünün (CI-M6PR: the cation-independent mannose-6-phosphate receptor) hücresel yeniden dağılımına neden olması, buna karşın SNX5'e bağlanma kusurlu proteinlerin buna yol açmaması verilerinden yola çıkarak; UL35 proteinlerinin SNX5'e bağlandığını ve SNX5'i hücresel transport yolağını modüle etmek için negatif yönde regüle ettiğinini ileri sürmektedirler. Buna ek olarak HCMV'ün etkin replikasyonu ve fazlaca sentez edilen viral glikoprotein B'nin taşınması için de UL35 proteinlerinin SNX5'e bağlanmasının gerekli olduğu belirtilmiştir (Maschkowitz ve ark., 2018). Sorting nexin proteinleri ile ilişkisi saptanan virüslerden biri de vaccinia virüsüdür (VACV). Hücrelerde Rab5c, Rab7a, Rab34, Rabex5 ve SNX3 proteinlerindeki azalmanın VACV erken gen ekspresyonunda önemli inhibisyona neden olduğu belirtilmiştir. VACV enfeksiyonu sırasında floresans mikroskobu ile yapılan çalışmalar, EGFP-SNX3 füzyon proteinin Rab7a ile benzer kinetiklere olgunlaşmış virion içeren vakuollere alındığını göstermiştir (Rizopoulos ve ark., 2015).

Bu tez kapsamında yapılan çalışmalar sorting nexin proteinlerinden SNX2'nin influenza A virüsünün hücre içi replikasyonu ve/veya kurulumu aşamasında etkili olabileceği sonucunu vermiştir. Birlikte immünçöktürme testleri dışında, SNX2 ve influenza A virüsü PA proteinin birlikte sentez edildiği hücrelerde hücre içi lokalizasyonları immünflorsan teknikler ve PL testleri ile de araştırılmıştır. SNX2 ve PA proteini kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde PA ve SNX2 proteinlerinin benzer lokalizasyonlar göstermesi (Şekil 24) birlikte immünçöktürme testeri ile elde edilen sonuçları destekler nitelikte bulunmuştur. En belirgin birlikte lokalizasyon delesyonlu SNX2dN ve PAdC proteinlerinde gözlenmiştir.

Son yıllarda geliştirlen PL testleri hücre içerisinde 40 nm'den daha yakın mesafelerde bulunan proteinlerin belirlenmesinde etkili yöntemlerden biridir (Fredriksson ve ark., 2002). Bu test sonucu elde edilen pozitif sonuçlar ele alınan iki proteinin etkileşim halinde olduğunun bir göstergesi olarak kabul edilmektedir. Plazmitler ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde SNX2 ve PA proteinleri için yaptığımız PL testlerinde bu iki proteinin etkileşimini gösteren çok sayıda floresan özellikte noktalar saptanmıştır (Şekil 25). Bu sonuçlarda insan SNX2 ve influenza A virüsü PA proteini arasındaki ilişkiyi destekler niteliktedir.

Bu tez çalışması kapsamında yanıt aranan önemli sorulardan biri, insan SNX2 proteini ile influenza A virüsü RNA polimeraz alt ünitesi PA proteini arasında saptanan bu etkileşimin influenza A virüsü replikasyonunu nasıl etkilediği sorusudur. Bu soruya yanıt bulmak amacıyla SNX2 proteininin hem iki farklı influenza A virüsü (WSN ve DkP) enfeksiyonuna etkileri araştırıldı, hem de minireplikon modeli kullanılarak bu virüslerin RNA polimeraz enzimlerine etkileri test edidi. SNX2 proteininin viral enfeksiyona etkilerini saptamak için iki farklı yol izlendi. Birincisinde, HEK293 hücreleri SNX2 proteinini kodlayan plazmitler ile geçici transfekte edildi ve protein miktarı arttırılan (aşırı ekspresyon koşulları) bu hücrelerde virüs enfeksiyonunun seyri, viral NP ve NS1 proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar, HEK293 hücrelerinde plazmit transfeksiyon ile geçici olarak artışı sağlanan amino-terminal bölgesinde 1-3.ekzonlara karşılık gelen bölgeyi taşımayan SNX2 proteininin (SNX2dN) ve 4-8. ekzonlara karşılık gelen bölgeyi taşımayan SNX2 proteininin (SNX2dM) virüs replikasyonu üzerinde dikkate değer bir değişime neden olmadığını gösterdi (Şekil 26). Buna karşın, karboksi terminalinde gendeki 9-15.ekzonlara karşılık gelen bölgeleri taşımayan SNX2 proteininin (SNX2dC) her iki virüs tipine ait NP ve NS1 proteinlerinde nispi bir artışa neden olduğu gözlendi. Bu sonuçlar, belirli bir eşik dozun üzerideki değerlerde SNX2 proteinin influenza A virüsü replikasyonu üzerinde negatif bir etki yapmadığını düşündürdü. Buna karşın SNX2dC proteinindeki artışın viral replikasyon üzerinde neden olduğu pozitif etkinin, literatürde dominant-negatif mutasyon etkisi olarak tanımlanan bir olay (Kashles ve ark., 1991; Sheppard, 1994) sonucu olabileceği sonucunu vermektedir. Kısaca mutasyona uğratılmış SNX2dC proteinindeki artış aktif

formda endojen SNX2 proteininin viral replikasyon üzerindeki negatif etkisini ortadan kaldırıyor olabilir.

SNX2 proteinlerinin influenza A virüsleri üzerindeki etkisini saptamaya yönelik ikinci yol olarak, SNX2 genine özgü siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde SNX2 transkript düzeyi düşürüldü (*knock down*) ve sonrasında hücreler influenza virüsleri ile enfekte edildi ve viral enfeksiyonun seyri izlendi. *Knock down* edilen hücreler enfeksiyondan 6 saat ve 12 saat sonra SDS örnek tamponunda parçalandı ve lizatlarda hücresel beta aktin proteini ve influenza A virüsü PA proteinleri Western melezleme ile analiz edildi (Şekil 27). Elde edilen veriler, influenza A/WSN/33-H1N1 ile enfekte edilen SNX2 için *knock down* olan hücrelerde viral PA proteini düzeyinde önemli bir değişme olmadığını gösterdi. Buna karşın, A/Duck/Pennsylvania-H5N2 virüsleri ile enfekte edilen hücrelerde ve enfeksiyondan 12 saat sonra incelenen örnekte viral PA proteininin kontrol örneklere göre büyük bir artış olduğu gözlendi.

SNX2 geni bakımından *knock down* edilen hücrelerde influenza A virüslerinin replikasyonu, viral enfeksiyondan 12 saat sonra hücrelerdeki SNX2 transkripti ve influenza virüsü 8.segmenti üzerinden sentez edilen transkript düzeyleri (cRNA+mRNA) gerçek zamanlı PZR ile saptanarak da değerlendirildi (Şekil 28). Yapılan analizler, SNX2 siRNA ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde SNX2 transkript düzeyinin en az %95 oranında düştüğünü gösterdi. Enfeksiyondan 12 saat sonra hücrelerden elde edilen RNA'lar içerisinde viral transkript düzeylerinin A/WSN/33-H1N1 virüsü ile enfekte hücrelerde ortalama %35-40; A/Duck/Pennsylvania-H5N2 ile enfekte hücrelerde ise ortalama %85 oranınında düştüğü ortaya kondu.

İnfluenza A virüsü RNA polimeraz enzimi üç at birimden oluşmaktadır. Bunlardan çalışmaya konu olan PA proteininin hücresel SNX2 ile etkileşim göstermesi, viral RNA polimeraz aktivitesinin SNX2 proteininden etkilenebileceği fikrini akla getirmektedir. Bu nedenle SNX2 ve delesyonlu SNX2 proteinlerinin influenza A virüsü RNA polimeraz enzimlerine etkileri minireplikon modelleri kullanılarak test edildi (Şekil 29). Test sonuçları, geçici olarak taransfekte edilen HEK293 hücrelerinde SNX2 proteinlerinin miktarındaki artışın deneyde kullanılan iki farklı tip virüse ait RNA polimeraz enzimleri üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığını göstedi.

Bu durumun ortaya çıkmasında hücrelerin mevcut endojen SNX2 protein düzeyi bakımından doygunluk sınırları içerisinde olmasından kaynaklanmış olabileceği sonucuna varıldı.

Sonuç olarak, bu tez çalışması kapsamında insan hücrelerinde sentez edilen ve özellikle hücre içi membran trafiğinde önemli rol üstlenen sorting nexin proteinlerinden SNX2 proteini ile influenza A virüsü RNA polimeraz enzimi alt ünitesi olan PA proteini arasındaki ilişki, farklı teknikler uygulanarak hem maya hücrelerinde hem de memeli hücrelerine araştırıldı. Buna ek olarak SNX2 proteininin influenza A virüsü replikasyonu üzerindeki etkileri analiz edildi. Elde edilen veriler, mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte insan SNX2 proteininin hem maya hücrelerinde hem de memeli hücrelerinde etkileşim gösterdiğini ortaya koydu. Delesyonlu SNX2 ve PA proteinleri ile yapılan birlikte immünçöktürme testleri ve bu proteinleri kodlayan plazmitler ile transfekte edilen hücrelerde proteinlerin hücre içi lokalizasyon davranışları, bu etkileşimde SNX2 proteini (SNX2, SNX2dN, SNX2dC) ile PA proteini amino terminal bölgesinin (PAdC) ön plana çıktığını gösterdi. İnsan SNX2 proteinin influenza A virüslerinin çoğalması üzerindeki etkilerini saptamaya yönelik yapılan çalışmalarda, SNX2 proteininin viral çoğalmayı negatif yönde etkilediği ve kuş tipi influenza A/DkPen virüslerinin bu proteinden daha çok etkilendiği belirlendi. Dolayısıyla influenza A/DkPen virüslerinin memeli hücrelerinde, insan tipi influenza A/WSN virüsleri kadar etkin çoğalamamasının nedenlerinden biri SNX2 proteini ile olan bu ilişki olabilir. Bununla birlikte SNX2 proteininin moleküler düzeyde hangi viral olayları yavaşlattığı ve mekanizmasının nasıl olduğu sorusu tam olarak yanıt bulmuş değildir. Bu mekanizmaların aydınlatılması, viral replikasyon için kilit görevi gören olayların ve moleküllerin saptanması büyük bir sağlık sorunu oluşturan influenza A virüsleri ile mücadelede önemli katkılar sağlayacaktır.

8. KAYNAKLAR

Abdelwhab EM, Hafez HM: An overview of the epidemic of highly pathogenic H5N1 avian influenza virus in Egypt: epidemiology and control challenges. Epidemiol Infect 2011;139:647-657.

Al-Saleem J, Dirksen WP, Martinez MP, Shkriabai N, Kvaratskhelia M, Ratner L, Green PL: HTLV-1 Tax-1 interacts with SNX27 to regulate cellular localization of the HTLV-1 receptor molecule, GLUT1. PLoS One 2019;14:e0214059.

Baglioni C, Maroney PA, West DK: 2'5'Oligo(A) polymerase activity and inhibition of viral RNA synthesis in interferon-treated HeLa cells. Biochemistry 1979;18:1765-1770.

Ball LA: Induction of 2'5'-oligoadenylate synthetase activity and a new protein by chick interferon. Virology 1979;94:282-296.

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

Bergant M, Banks L: SNX17 facilitates infection with diverse papillomavirus types. J Virol 2013;87:1270-1273.

Bergant Marusic M, Ozbun MA, Campos SK, Myers MP, Banks L: Human papillomavirus L2 facilitates viral escape from late endosomes via sorting nexin 17. Traffic 2012;13:455-467.

Bonifacino JS, Hurley JH: Retromer. Curr Opin Cell Biol 2008;20:427-436.

Bonjardim CA: Interferons (IFNs) are key cytokines in both innate and adaptive antiviral immune responses--and viruses counteract IFN action. Microbes Infect 2005;7:569-578.

Bosse M, Sibold J, Scheidt HA, Patalag LJ, Kettelhoit K, Ries A, Werz DB, Steinem C, Huster D: Shiga toxin binding alters lipid packing and the domain structure of Gb3-containing membranes: a solid-state NMR study. Phys Chem Chem Phys 2019;21:15630-15638.

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

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

Brady AE, Chen Y, Limbird LE, Wang Q: Study of GPCR-protein interactions using gel overlay assays and glutathione-S-transferase-fusion protein pull-downs. Methods Mol Biol 2011;746:347-355.

Brady AE, Wang Q, Limbird LE: Study of G-protein-coupled receptor-protein interactions using gel overlay assays and glutathione-S-transferase-fusion protein pull-downs. Methods Mol Biol 2004;259:371-378.

Bunn SJ, Ait-Ali D, Eiden LE: Immune-neuroendocrine integration at the adrenal gland: cytokine control of the adrenomedullary transcriptome. J Mol Neurosci 2012;48:413-419.

Cann, AJ, Principles of Molecular Virology, 4th Edition, Elsevier Academic Press, San Diego, 2005p.120.

Carlton J, Bujny M, Peter BJ, Oorschot VM, Rutherford A, Mellor H, Klumperman J, McMahon HT, Cullen PJ: Sorting nexin-1 mediates tubular endosome-to-TGN transport through coincidence sensing of high- curvature membranes and 3-phosphoinositides. Curr Biol 2004;14:1791-1800.

Carlton J, Bujny M, Rutherford A, Cullen P: Sorting nexins--unifying trends and new perspectives. Traffic 2005a;6:75-82.

Carlton JG, Bujny MV, Peter BJ, Oorschot VM, Rutherford A, Arkell RS, Klumperman J, McMahon HT, Cullen PJ: Sorting nexin-2 is associated with tubular elements of the early endosome, but is not essential for retromer-mediated endosome-to-TGN transport. J Cell Sci 2005b;118:4527-4539.

Chelbi-Alix MK, Thang MN: 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;141:1042-1050.

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

Chen X, Liu S, Goraya MU, Maarouf M, Huang S, Chen JL: Host Immune Response to Influenza A Virus Infection. Front Immunol 2018;9:320.

Ciblak MA, Grip P: Influenza vaccination in Turkey: prevalence of risk groups, current vaccination status, factors influencing vaccine uptake and steps taken to increase vaccination rate. Vaccine 2013;31:518-523.

Conenello GM, Palese P: Influenza A virus PB1-F2: a small protein with a big punch. Cell Host Microbe 2007;2:207-209.

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

Couch RB: Orthomyxoviruses; in th, Baron S (eds): Medical Microbiology. Galveston (TX), 1996.

Cullen PJ: Endosomal sorting and signalling: an emerging role for sorting nexins. Nat Rev Mol Cell Biol 2008;9:574-582.

De Andrea M, Ravera R, Gioia D, Gariglio M, Landolfo S: The interferon system: an overview. Eur J Paediatr Neurol 2002;6 Suppl A:A41-46; discussion A55-48.

de Vries RD, Herfst S, Richard M: Avian Influenza A Virus Pandemic Preparedness and Vaccine Development. Vaccines (Basel) 2018;6.

Deryabin PG, Garaev TM, Finogenova MP, Odnovorov AI: [Assessment of the antiviral activity of 2HCl*H-His-Rim compound compared to the anti-influenza drug Arbidol for influenza caused by A/duck/Novosibirsk/56/05 (H5N1) (Influenza A virus, Alphainfluenzavirus, Orthomyxoviridae).]. Vopr Virusol 2019;64:268-273.

Dias A, Bouvier D, Crepin T, McCarthy AA, Hart DJ, Baudin F, Cusack S, Ruigrok RW: The cap-snatching endonuclease of influenza virus polymerase resides in the PA subunit. Nature 2009;458:914-918.

Duclos CM, Champagne A, Carrier JC, Saucier C, Lavoie CL, Denault JB: Caspase-mediated proteolysis of the sorting nexin 2 disrupts retromer assembly and potentiates Met/hepatocyte growth factor receptor signaling. Cell Death Discov 2017;3:16100.

Ekiert DC, Bhabha G, Elsliger MA, Friesen RH, Jongeneelen M, Throsby M, Goudsmit J, Wilson IA: Antibody recognition of a highly conserved influenza virus epitope. Science 2009;324:246-251.

Elwell C, Engel J: Emerging Role of Retromer in Modulating Pathogen Growth. Trends Microbiol 2018;26:769-780.

Falguieres T, Romer W, Amessou M, Afonso C, Wolf C, Tabet JC, Lamaze C, Johannes L: Functionally different pools of Shiga toxin receptor, globotriaosyl ceramide, in HeLa cells. FEBS J 2006;273:5205-5218.

Filomatori CV, Iglesias NG, Villordo SM, Alvarez DE, Gamarnik AV: RNA sequences and structures required for the recruitment and activity of the dengue virus polymerase. J Biol Chem 2011;286:6929-6939.

Fodor E, Smith M: The PA subunit is required for efficient nuclear accumulation of the PB1 subunit of the influenza A virus RNA polymerase complex. J Virol 2004;78:9144-9153.

Francis T, Jr.: A New Type of Virus from Epidemic Influenza. Science 1940;92:405-408.

Fredriksson S, Gullberg M, Jarvius J, Olsson C, Pietras K, Gustafsdottir SM, Ostman A, Landegren U: Protein detection using proximity-dependent DNA ligation assays. Nat Biotechnol 2002;20:473-477.

Fukuyama S, Kawaoka Y: The pathogenesis of influenza virus infections: the contributions of virus and host factors. Curr Opin Immunol 2011;23:481-486.

Galabru J, Hovanessian A: Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. J Biol Chem 1987;262:15538-15544.

Garten R, Blanton L, Elal AIA, Alabi N, Barnes J, Biggerstaff M, Brammer L, Budd AP, Burns E, Cummings CN, Davis T, Garg S, Gubareva L, Jang Y, Kniss K, Kramer N, Lindstrom S, Mustaquim D, O'Halloran A, Sessions W, Taylor C, Xu X, Dugan VG, Fry AM, Wentworth DE, Katz J, Jernigan D: Update: Influenza Activity in the United States During the 2017-18 Season and Composition of the 2018-19 Influenza Vaccine. MMWR Morb Mortal Wkly Rep 2018;67:634-642.

Garulli B, Castrucci MR: Protective immunity to influenza: lessons from the virus for successful vaccine design. Expert Rev Vaccines 2009;8:689-693.

Gavin K, Owen R, Barr IG: Annual report of the National Influenza Surveillance Scheme, 2010. Commun Dis Intell Q Rep 2017;41:E348-E368.

Gething MJ, Bye J, Skehel J, Waterfield M: Cloning and DNA sequence of double-stranded copies of haemagglutinin genes from H2 and H3 strains elucidates antigenic shift and drift in human influenza virus. Nature 1980;287:301-306.

Ghai R, Bugarcic A, Liu H, Norwood SJ, Skeldal S, Coulson EJ, Li SS, Teasdale RD, Collins BM: Structural basis for endosomal trafficking of diverse transmembrane cargos by PX-FERM proteins. Proc Natl Acad Sci U S A 2013;110:E643-652.

Gietz RD, Schiestl RH: Large-scale high-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method. Nat Protoc 2007;2:38-41.

Gowen BB, Wong MH, Jung KH, Sanders AB, Mitchell WM, Alexopoulou L, Flavell RA, Sidwell RW: TLR3 is essential for the induction of protective immunity against Punta Toro Virus infection by the double-stranded RNA (dsRNA), poly(I:C12U), but not Poly(I:C): differential recognition of synthetic dsRNA molecules. J Immunol 2007;178:5200-5208.

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

Gruenberg J: The endocytic pathway: a mosaic of domains. Nat Rev Mol Cell Biol 2001;2:721-730.

Gullapalli A, Garrett TA, Paing MM, Griffin CT, Yang Y, Trejo J: A role for sorting nexin 2 in epidermal growth factor receptor down-regulation: evidence for distinct functions of sorting nexin 1 and 2 in protein trafficking. Mol Biol Cell 2004;15:2143-2155.

Guo YJ, Jin FG, Wang P, Wang M, Zhu JM: Isolation of influenza C virus from pigs and experimental infection of pigs with influenza C virus. J Gen Virol 1983;64 (Pt 1):177-182.

Gupta MK, Vemula S, Donde R, Gouda G, Behera L, Vadde R: In-silico approaches to detect inhibitors of the human severe acute respiratory syndrome coronavirus envelope protein ion channel. J Biomol Struct Dyn 2020:1-11.

Hara K, Shiota M, Kido H, Ohtsu Y, Kashiwagi T, Iwahashi J, Hamada N, Mizoue K, Tsumura N, Kato H, Toyoda T: Influenza virus RNA polymerase PA subunit is a novel serine protease with Ser624 at the active site. Genes Cells 2001;6:87-97.

Hay AJ, Gregory V, Douglas AR, Lin YP: The evolution of human influenza viruses. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci 2001;356:1861-1870.

Hsiao JC, Chu LW, Lo YT, Lee SP, Chen TJ, Huang CY, Ping YH, Chang W: Intracellular Transport of Vaccinia Virus in HeLa Cells Requires WASH-VPEF/FAM21-Retromer Complexes and Recycling Molecules Rab11 and Rab22. J Virol 2015;89:8365-8382.

Hsieh YC, Wu TZ, Liu DP, Shao PL, Chang LY, Lu CY, Lee CY, Huang FY, Huang LM: Influenza pandemics: past, present and future. J Formos Med Assoc 2006;105:1-6.

Hsu VW, Prekeris R: Transport at the recycling endosome. Curr Opin Cell Biol 2010;22:528-534.

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

Ishihama A, Nagata K: Viral RNA polymerases. CRC Crit Rev Biochem 1988;23:27-76.

Jennings L, Huang QS, Barr I, Lee PI, Kim WJ, Buchy P, Sanicas M, Mungall BA, Chen J: Literature review of the epidemiology of influenza B disease in 15 countries in the Asia-Pacific region. Influenza Other Respir Viruses 2018;12:383-411.

Johannes L, Popoff V: Tracing the retrograde route in protein trafficking. Cell 2008;135:1175-1187.

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

Jones LD, Nuttall PA: Non-viraemic transmission of Thogoto virus: influence of time and distance. Trans R Soc Trop Med Hyg 1989;83:712-714.

Juozapaitis M, Antoniukas L: [Influenza virus]. Medicina (Kaunas) 2007;43:919-929.

Kanzawa M, Hara S, Semba S, Yokozaki H, Hirokawa M, Itoh T: Sorting Nexin 2 (SNX2): a potential marker of active thyrocytes in normal and hyperfunctioning thyroid disorders. Appl Immunohistochem Mol Morphol 2014;22:302-307.

Karlas A, Machuy N, Shin Y, Pleissner KP, Artarini A, Heuer D, Becker D, Khalil H, Ogilvie LA, Hess S, Maurer AP, Muller E, Wolff T, Rudel T, Meyer TF: Genome-wide RNAi screen identifies human host factors crucial for influenza virus replication. Nature 2010;463:818-822.

Kashles O, Yarden Y, Fischer R, Ullrich A, Schlessinger J: A dominant negative mutation suppresses the function of normal epidermal growth factor receptors by heterodimerization. Mol Cell Biol 1991;11:1454-1463.

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

Kibenge FS, Xu H, Kibenge MJ, Qian B, Joseph T: Characterization of gene expression on genomic segment 7 of infectious salmon anaemia virus. Virol J 2007;4:34.

Kirkham M, Parton RG: Clathrin-independent endocytosis: new insights into caveolae and non-caveolar lipid raft carriers. Biochim Biophys Acta 2005;1745:273-286.

Kobayashi M, Toyoda T, Ishihama A: Influenza virus PB1 protein is the minimal and essential subunit of RNA polymerase. Arch Virol 1996;141:525-539.

Kong H, Ma S, Wang J, Gu C, Wang Z, Shi J, Deng G, Guan Y, Chen H: Identification of Key Amino Acids in the PB2 and M1 Proteins of H7N9 Influenza Virus That Affect Its Transmission in Guinea Pigs. J Virol 2019;94.

Krupovic M, Blomberg J, Coffin JM, Dasgupta I, Fan H, Geering AD, Gifford R, Harrach B, Hull R, Johnson W, Kreuze JF, Lindemann D, Llorens C, Lockhart B, Mayer J, Muller E, Olszewski NE, Pappu HR, Pooggin MM, Richert-Poggeler KR, Sabanadzovic S, Sanfacon H, Schoelz JE, Seal S, Stavolone L, Stoye JP, Teycheney PY, Tristem M, Koonin EV, Kuhn JH: Ortervirales: New Virus Order Unifying Five Families of Reverse-Transcribing Viruses. J Virol 2018;92.

Kuszewski K, Brydak L: The epidemiology and history of influenza. Biomed Pharmacother 2000;54:188-195.

La Gruta NL, Kedzierska K, Stambas J, Doherty PC: A question of self-preservation: immunopathology in influenza virus infection. Immunol Cell Biol 2007;85:85-92.

Lagace-Wiens PR, Rubinstein E, Gumel A: Influenza epidemiology--past, present, and future. Crit Care Med 2010;38:e1-9.

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

Leser GP, Lamb RA: Influenza virus assembly and budding in raft-derived microdomains: a quantitative analysis of the surface distribution of HA, NA and M2 proteins. Virology 2005;342:215-227.

Li YT, Linster M, Mendenhall IH, Su YCF, Smith GJD: Avian influenza viruses in humans: lessons from past outbreaks. Br Med Bull 2019;132:81-95.

Lin JS, Lai EM: Protein-Protein Interactions: Co-Immunoprecipitation. Methods Mol Biol 2017;1615:211-219.

Liu YJ: IPC: professional type 1 interferon-producing cells and plasmacytoid dendritic cell precursors. Annu Rev Immunol 2005;23:275-306.

Lobodzinska M: Reproduction of influenza C Taylor 1233 virus in various tissue systems. Arch Immunol Ther Exp (Warsz) 1972;20:497-505.

Lucas M, Hierro A: Retromer. Curr Biol 2017;27:R687-R689.

Ma C, Zhang J, Wang J: Pharmacological Characterization of the Spectrum of Antiviral Activity and Genetic Barrier to Drug Resistance of M2-S31N Channel Blockers. Mol Pharmacol 2016;90:188-198.

Ma W, Kahn RE, Richt JA: The pig as a mixing vessel for influenza viruses: Human and veterinary implications. J Mol Genet Med 2008;3:158-166.

Maniatis T, Fritsch EF, Sambrook J: Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

Maschkowitz G, Gartner S, Hofmann-Winkler H, Fickenscher H, Winkler M: Interaction of Human Cytomegalovirus Tegument Proteins ppUL35 and ppUL35A with Sorting Nexin 5 Regulates Glycoprotein B (gpUL55) Localization. J Virol 2018;92.

Mayor S, Pagano RE: Pathways of clathrin-independent endocytosis. Nat Rev Mol Cell Biol 2007;8:603-612.

McAuley JL, Gilbertson BP, Trifkovic S, Brown LE, McKimm-Breschkin JL: Influenza Virus Neuraminidase Structure and Functions. Front Microbiol 2019;10:39.

McAuley JL, Hornung F, Boyd KL, Smith AM, McKeon R, Bennink J, Yewdell JW, McCullers JA: Expression of the 1918 influenza A virus PB1-F2 enhances the pathogenesis of viral and secondary bacterial pneumonia. Cell Host Microbe 2007;2:240-249.

McMahon HT, Gallop JL: Membrane curvature and mechanisms of dynamic cell membrane remodelling. Nature 2005;438:590-596.

Mogensen KE, Lewerenz M, Reboul J, Lutfalla G, Uze G: The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. J Interferon Cytokine Res 1999;19:1069-1098.

Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ: The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. Crit Care Med 2010;38:e10-20.

Mourya DT, Yadav PD, Nyayanit DA, Majumdar TD, Jain S, Sarkale P, Shete A: Characterization of a strain of quaranfil virus isolated from soft ticks in India. Is quaranfil virus an unrecognized cause of disease in human and animals?". Heliyon 2019;5:e01368.

Munier-Lehmann H, Mauxion F, Bauer U, Lobel P, Hoflack B: Re-expression of the mannose 6-phosphate receptors in receptor-deficient fibroblasts. Complementary function of the two mannose 6-phosphate receptors in lysosomal enzyme targeting. J Biol Chem 1996;271:15166-15174.

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

Nagata K, Saito S, Okuwaki M, Kawase H, Furuya A, Kusano A, Hanai N, Okuda A, Kikuchi A: Cellular localization and expression of template-activating factor I in different cell types. Exp Cell Res 1998;240:274-281.

Nakagawa Y, Oda K, Nakada S: The PB1 subunit alone can catalyze cRNA synthesis, and the PA subunit in addition to the PB1 subunit is required for viral RNA synthesis in replication of the influenza virus genome. J Virol 1996;70:6390-6394.

Nakajima K: [Influenza virus genome structure and encoded proteins]. Nihon Rinsho 1997;55:2542-2546.

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

Naslavsky N, Caplan S: The enigmatic endosome - sorting the ins and outs of endocytic trafficking. J Cell Sci 2018;131.

Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S: Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res 2009;143:147-161.

Neumann G, Hughes MT, Kawaoka Y: Influenza A virus NS2 protein mediates vRNP nuclear export through NES-independent interaction with hCRM1. EMBO J 2000;19:6751-6758.

Ortiz JR, Lafond KE, Wong TA, Uyeki TM: Pandemic influenza in Africa, lessons learned from 1968: a systematic review of the literature. Influenza Other Respir Viruses 2012;6:11-24.

Osterhaus AD, Rimmelzwaan GF, Martina BE, Bestebroer TM, Fouchier RA: Influenza B virus in seals. Science 2000;288:1051-1053.

Palese P, Schulman JL: Differences in RNA patterns of influenza A viruses. J Virol 1976;17:876-884.

Pfeffer SR: Entry at the trans-face of the Golgi. Cold Spring Harb Perspect Biol 2011;3.

Pham PTV, Turan K, Nagata K, Kawaguchi A: Biochemical characterization of avian influenza viral polymerase containing PA or PB2 subunit from human influenza A virus. Microbes Infect 2018;20:353-359.

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

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

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

Porcheddu R, Serra C, Kelvin D, Kelvin N, Rubino S: Similarity in Case Fatality Rates (CFR) of COVID-19/SARS-COV-2 in Italy and China. J Infect Dev Ctries 2020;14:125-128.

Potter CW: A history of influenza. Journal of applied microbiology 2001;91:572-579.

Quosdorf S, Schuetz A, Kolodziej H: Different Inhibitory Potencies of Oseltamivir Carboxylate, Zanamivir, and Several Tannins on Bacterial and Viral Neuraminidases as Assessed in a Cell-Free Fluorescence-Based Enzyme Inhibition Assay. Molecules 2017;22.

Raynard RS, Murray AG, Gregory A: Infectious salmon anaemia virus in wild fish from Scotland. Dis Aquat Organ 2001;46:93-100.

Ren L, Chang E, Makky K, Haas AL, Kaboord B, Walid Qoronfleh M: Glutathione S-transferase pull-down assays using dehydrated immobilized glutathione resin. Anal Biochem 2003;322:164-169.

Rizopoulos Z, Balistreri G, Kilcher S, Martin CK, Syedbasha M, Helenius A, Mercer J: Vaccinia Virus Infection Requires Maturation of Macropinosomes. Traffic 2015;16:814-831.

Rubino S, Kelvin N, Bermejo-Martin JF, Kelvin D: As COVID-19 cases, deaths and fatality rates surge in Italy, underlying causes require investigation. J Infect Dev Ctries 2020;14:265-267.

Samuel CE: Antiviral actions of interferons. Clin Microbiol Rev 2001;14:778-809, table of contents.

Sandvig K, van Deurs B: Delivery into cells: lessons learned from plant and bacterial toxins. Gene Ther 2005;12:865-872.

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

Sawada T, Fedorov DG, Kitaura K: Binding of influenza A virus hemagglutinin to the sialoside receptor is not controlled by the homotropic allosteric effect. J Phys Chem B 2010;114:15700-15705.

Schild GC: The influenza virus: Antigenic composition and immune response. Postgrad Med J 1979;55:87-97.

Scott CC, Gruenberg J: Ion flux and the function of endosomes and lysosomes: pH is just the start: the flux of ions across endosomal membranes influences endosome function not only through regulation of the luminal pH. Bioessays 2011;33:103-110.

Seet LF, Hong W: The Phox (PX) domain proteins and membrane traffic. Biochim Biophys Acta 2006;1761:878-896.

Senbas Akyazi B, Pirincal A, Kawaguchi A, Nagata K, Turan K: Interaction of influenza A virus NS2/NEP protein with the amino-terminal part of Nup214. Turk J Biol 2020;44:82-92.

Shafiuddin M, Boon ACM: RNA Sequence Features Are at the Core of Influenza A Virus Genome Packaging. J Mol Biol 2019;431:4217-4228.

Sheppard D: Dominant negative mutants: tools for the study of protein function in vitro and in vivo. Am J Respir Cell Mol Biol 1994;11:1-6.

Shi Y, Wu Y, Zhang W, Qi J, Gao GF: Enabling the 'host jump': structural determinants of receptor-binding specificity in influenza A viruses. Nat Rev Microbiol 2014;12:822-831.

Shortridge KF: The 1918 'Spanish' flu: pearls from swine? Nat Med 1999;5:384-385.

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

Smith BJ, Colman PM, Von Itzstein M, Danylec B, Varghese JN: Analysis of inhibitor binding in influenza virus neuraminidase. Protein Sci 2001;10:689-696.

Song J, Feng H, Xu J, Zhao D, Shi J, Li Y, Deng G, Jiang Y, Li X, Zhu P, Guan Y, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H: The PA protein directly contributes to the virulence of H5N1 avian influenza viruses in domestic ducks. J Virol 2011;85:2180-2188.

Stambas J, Guillonneau C, Kedzierska K, Mintern JD, Doherty PC, La Gruta NL: Killer T cells in influenza. Pharmacol Ther 2008;120:186-196.

Stinebring WR: Introduction: the interferon system. In Vitro Monogr 1974:1-3.

Stoorvogel W, Oorschot V, Geuze HJ: A novel class of clathrin-coated vesicles budding from endosomes. J Cell Biol 1996;132:21-33.

Sugiyama K, Kawaguchi A, Okuwaki M, Nagata K: pp32 and APRIL are host cell-derived regulators of influenza virus RNA synthesis from cRNA. Elife 2015;4.

Sullivan SJ, Jacobson RM, Dowdle WR, Poland GA: 2009 H1N1 influenza. Mayo Clin Proc 2010;85:64-76.

Suzuki T, Ainai A, Nagata N, Sata T, Sawa H, Hasegawa H: A novel function of the N-terminal domain of PA in assembly of influenza A virus RNA polymerase. Biochem Biophys Res Commun 2011;414:719-726.

Takahashi Y: Co-immunoprecipitation from transfected cells. Methods Mol Biol 2015;1278:381-389.

Taubenberger JK: The virulence of the 1918 pandemic influenza virus: unraveling the enigma. Arch Virol Suppl 2005:101-115.

Teasdale RD, Collins BM: Insights into the PX (phox-homology) domain and SNX (sorting nexin) protein families: structures, functions and roles in disease. Biochem J 2012;441:39-59.

Thomis DC, Samuel CE: Mechanism of interferon action: evidence for intermolecular autophosphorylation and autoactivation of the interferon-induced, RNA-dependent protein kinase PKR. J Virol 1993;67:7695-7700.

Tooze J, Hollinshead M: Tubular early endosomal networks in AtT20 and other cells. J Cell Biol 1991;115:635-653.

Trilla A, Trilla G, Daer C: The 1918 "Spanish flu" in Spain. Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America 2008;47:668-673.

Tsai HJ, Wang SH, Inoue K, Takagi S, Kimura M, Wakamatsu Y, Ozato K: Initiation of the transgenic lacZ gene expression in medaka (Oryzias latipes) embryos. Mol Mar Biol Biotechnol 1995;4:1-9.

Tscherne DM, Garcia-Sastre A: Virulence determinants of pandemic influenza viruses. J Clin Invest 2011;121:6-13.

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

Van Criekinge W, Beyaert R: Yeast Two-Hybrid: State of the Art. Biol Proced Online 1999;2:1-38.

van Weering JR, Cullen PJ: Membrane-associated cargo recycling by tubule-based endosomal sorting. Semin Cell Dev Biol 2014;31:40-47.

Vavricka CJ, Muto C, Hasunuma T, Kimura Y, Araki M, Wu Y, Gao GF, Ohrui H, Izumi M, Kiyota H: Synthesis of Sulfo-Sialic Acid Analogues: Potent Neuraminidase Inhibitors in Regards to Anomeric Functionality. Sci Rep 2017;7:8239.

Waldburger JM, Masternak K, Muhlethaler-Mottet A, Villard J, Peretti M, Landmann S, Reith W: Lessons from the bare lymphocyte syndrome: molecular mechanisms regulating MHC class II expression. Immunol Rev 2000;178:148-165.

Wang J, Ma C, Wang J, Jo H, Canturk B, Fiorin G, Pinto LH, Lamb RA, Klein ML, DeGrado WF: Discovery of novel dual inhibitors of the wild-type and the most prevalent drug-resistant mutant, S31N, of the M2 proton channel from influenza A virus. J Med Chem 2013;56:2804-2812.

Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y: Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. Cell Host Microbe 2010;7:427-439.

Weber F, Haller O, Kochs G: MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. J Virol 2000;74:560-563.

Webster RG, Govorkova EA: H5N1 influenza--continuing evolution and spread. N Engl J Med 2006;355:2174-2177.

Williams BR: Type I interferons (IFN) are essential mediators of innate and specific immunity against viruses. Viral Immunol 2002;15:1-2.

Worby CA, Dixon JE: Sorting out the cellular functions of sorting nexins. Nat Rev Mol Cell Biol 2002;3:919-931.

Yang G, Wang Y, Zhao X, Han F, Wu S, Hou Y: [Antiviral effect of recombinant antibody to influenza virus HA antigen]. Zhonghua Shi Yan He Lin Chuang Bing Du Xue Za Zhi 2002;16:337-340.

Yen HL, Webster RG: Pandemic influenza as a current threat. Curr Top Microbiol Immunol 2009;333:3-24.

Yewdell JW, Bennink JR: Mechanisms of viral interference with MHC class I antigen processing and presentation. Annu Rev Cell Dev Biol 1999;15:579-606.

Yong X, Zhao L, Deng W, Sun H, Zhou X, Mao L, Hu W, Shen X, Sun Q, Billadeau DD, Xue Y, Jia D: Mechanism of cargo recognition by retromer-linked SNX-BAR proteins. PLoS Biol 2020;18:e3000631.

Yoon SW, Webby RJ, Webster RG: Evolution and ecology of influenza A viruses. Curr Top Microbiol Immunol 2014;385:359-375.

Zamarin D, Ortigoza MB, Palese P: Influenza A virus PB1-F2 protein contributes to viral pathogenesis in mice. J Virol 2006;80:7976-7983.

Zell R, Krumbholz A, Eitner A, Krieg R, Halbhuber KJ, Wutzler P: Prevalence of PB1-F2 of influenza A viruses. J Gen Virol 2007;88:536-546.

Zeng XX, Wang DY, Shu YL: [Research advances on thogoto virus of the family orthomyxoviridae]. Bing Du Xue Bao 2013;29:555-558.

Zhou P, Cao Z, Zeng W, Hao X, Zheng Q, Lin X, He Y, Zhang X, Zheng Y, Wang L, Zhang G, Li S: PB2 E627K or D701N substitution does not change the virulence of canine influenza virus H3N2 in mice and dogs. Vet Microbiol 2018;220:67-72.

GEVHER NESİBE
4. ULUSLARARASI SAĞLIK BİLİMLERİ KONGRESİ

BAŞLIK: İNSAN SORTİNG NEXİN-2 PROTEİNİ İLE İNFLUENZA VİRÜSÜ RNA POLİMERAZ ENZİMİ ARASINDAKİ İLİŞKİNİN MEMELİ HÜCRELERİNDE ARAŞTIRILMASI

TITLE: INVESTIGATION OF THE RELATIONSHIP BETWEEN HUMAN SNX-2 PROTEIN AND INFLUENZA VIRUS RNA POLYMERASE ENZYME IN MAMMALIAN CELLS

***Tuğba Koçmar*[1] *ve Kadir Turan*[1]**

[1]*Temel Eczacılık Bilimleri Bölümü, Eczacılık Fakültesi, Marmara Üniversitesi, İstanbul-Türkiye*

ÖZET

Influenza A virüsleri, insanda sık görülen üst solunum yolu hastalıklarına neden olan viral patojenlerdir. Bu virüslerin yüksek frekanslarda genetik özelliklerini değiştirmesi, aşı ile korunmayı engellemekte, mevcut antiviral ilaçlara karşı dirençli virüs tiplerinin ortaya çıkmasına neden olmaktadır. Dolayısıyla influenza A virüsü enfeksiyonları ile mücadelede alternatif stratejilerin geliştirilmesi gerekmektedir. Bu bağlamda, influenza A virüsü ve konak hücre arasındaki ilişkinin moleküler düzeyde aydınlatılması, virüslerle mücadelede yol gösterici olacaktır. Farklı bir projemizde maya ikili-hibrit yöntemi kullanılarak insan *sorting nexin-2 (*SNX-2) proteini ile influenza virüsü RNA polimeraz enzimi PA alt birimi arasındaki etkileşim gösterilmiştir (TÜBİTAK/112S518). Bu çalışmada ise insan hücrelerinde influenza virüsü PA proteini ve SNX-2 proteini arasındaki ilişkinin memeli hücrelerinde araştırılması ve SNX-2 proteininin influenza virüsü replikasyonu açısından öneminin göstermesi amaçlandı. Bunun için insan kaynaklı HeLa ve HEK293 hücreleri kullanıldı. Plazmit transfeksiyonu ile hücrelerde geçici olarak sentezlenen viral PA proteini ile insan SNX-2 proteini arasındaki fiziksel etkileşim, immün-çöktürme ve immünfloresan yöntemleri ile araştırıldı. Hücrelerdeki endojen SNX-2 proteini düzeyi, geçici transfeksiyon ile arttırıldı ya da gene özgü siRNA'lar kullanılarak azaltıldı (*knock down*). Bu hücrelerde influenza A virüsü replikasyonu incelendi.

Birlikte immün çöktürme testleri, HEK293 hücrelerinde virüs PA proteini ve SNX-2 proteini arasında fiziksel bir ilişki olduğunu ortaya koydu. SNX-2 proteininin karboksil terminal bölgesinin viral PA proteini ile etkileşimde önemli olduğu saptandı. Bu sonuçlar aynı zamanda immünfloresan testler ile de desteklendi. SNX-2 transkript düzeyi düşürülen hücrelerde influenza virüsü replikasyonunun pozitif yönde etkilendiği görüldü. Buna karşın, hücrelerde SNX-2 protein miktarındaki artış, influenza virüsü replikasyonu üzerinde önemli bir etki göstermedi. Bu bulgular, SNX-2 proteininin influenza virüsü replikasyonu üzerinde negatif yönde düzenleyici etkiye sahip olduğunu gösterdi. SNX-2 proteini hücrelerde vezikül transportunda işlev gören bir proteindir. Bu yönüyle ele alındığında, SNX-2 proteininin influenza virüsü replikasyonunu nasıl etkilediği sorusu hala yanıt beklemektedir.

Anahtar kelimeler: Influenza, viral RNA polimeraz, PA protein, SNX-2 protein

***** *Bu çalışma Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Birimi (proje no:SAG-C-YLP-120619-0224) ve TÜBİTAK (proje no:112S518)tarafından desteklenmiştir.*

ABSTRACT

Influenza A viruses are the viral pathogens that cause common upper respiratory diseases in human. These viruses change their genetic characteristics at high frequencies, which leads to the emergence of new virus types, prevent vaccine protection and resistant to existing drugs. Therefore, alternative strategies should be developed to cope with influenza A viruses. In this context, the elucidation of the relationship between influenza A virus and the host cell at the molecular level will be a guide in dealing with the viruses. It has been shown interaction between human sorting nexin-2 (SNX-2) protein and influenza virus RNA polymerase subunit PA by using yeast two hybrid method in our different project (*TUBITAK, grant number: 112S518)*. In this work it was aimed to reveal the relationship between influenza PA and the SNX-2 protein in human cells, and to demonstrate the importance of SNX-2 protein in terms of influenza virus replication. For this purpose, HeLa and HEK293 cells originated from human were utilized. The physical interaction between viral PA protein and human SNX-2, which temporarily synthesized in the cells by plasmid transfection, was investigated by immunoprecipitation and immunofluorescence methods. The endogenous SNX-2 protein level in the cells was increased with transient transfection or reduced (*knock-down*) by gene-specific siRNAs. The replication of influenza A virus were examined in these cells.

Co-immunoprecipitation analyses revealed the interactions between virus PA and SNX-2 protein in HEK293 cells. It was observed that the carboxyl-domains of SNX-2 has interact with viral PA protein. This result was also supported with immunofluorescence assay. Influenza viral replication was positively affected in SNX-2 knock down cells. In contrast, the over-expression of SNX-2 in the cells has not shown a significant effect on influenza virus replication. These results suggest that SNX-2 have a negative regulatory effect on influenza virus replication. SNX-2 has a function in the vesicular trafficking. From this perspective, the question of how SNX-2 protein influences the influenza virus replication still remains to be answered.

Keywords: Influenza, viral RNA polymerase, PA protein, SNX-2 protein

***This work was supported by a grant from the scientific research foundation of Marmara University (grant number: SAG-C-YLP-120619-0224) and a grant from The Scientific and Technological Research Council of Turkey (grant number: 112S518).*

10. ÖZGEÇMİŞ

Adı	TUĞBA	**Soyadı**	KOÇMAR
Doğum Yeri	BAĞCILAR	**Doğum Tarihi**	31.08.1995
Uyruğu	T.C.	**T.C. Kimlik No.**	31562286700
E-mail	tugbakocmar@gmail.com	**Tel**	0505 956 5397

Eğitim Düzeyi

	Mezun Olduğu Kurumun Adı	**Mezuniyet Yılı**
Yüksek Lisans	Marmara Üniversitesi/Sağlık Bilimleri Enstitüsü/Biyokimya	2020
Lisans	İstanbul Üniversitesi/Fen Fakültesi/Biyoloji	2017
Lise	Hasan Polatkan Anadolu Lisesi	2013

İş Deneyimi

Görevi	**Kurum**	**Süre**
1 Stajyer	İstanbul Üniversitesi Cerrahpaşa Tıp Fakültesi/Çocuk Sağlığı ve Hastalıkları ABD /İmmünoloji ve Merkez Biyokimya Lab.	23.06.2014-03.09.2014
2 Stajyer	Medikal Park Sağlık Hizmetleri/Tüp Bebek Laboratuvarı	21.07.2015-20.08.2015
3 Kurucu Ortak	KTK Biyoteknoloji ARGE Sanayi ve Ticaret Limited Şirketi	2020-…

Yabancı Dilleri	**Okuduğunu Anlama***	**Konuşma***	**Yazma***
İngilizce	İyi	İyi	İyi

	Sayısal	**Eşit Ağırlık**	**Sözel**
ALES Puanı	77,22038	79,79134	72,49669

Bilgisayar Bilgisi

Program	**Kullanma becerisi**
Microsoft Office Programları	İyi

***Çok iyi, iyi, orta, zayıf olarak değerlendiriniz.