TÜRKİYE CUMHURİYETİ
MARMARA ÜNİVERSİTESİ
SAĞLIK BİLİMLERİ ENSTİTÜSÜ

İNFLUENZA A VİRÜSÜ NS1 PROTEİNİ İLE İLİŞKİLENDİRİLEN KONAK HÜCRE PROTEİNLERİNİN VİRAL REPLİKASYONA ETKİLERİ

AYŞEGÜL PİRİNÇAL

DOKTORA TEZİ

BİYOKİMYA ANABİLİM DALI

DANIŞMAN

Prof. Dr. Kadir TURAN

2021-İSTANBUL

BEYAN

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

AYŞEGÜL PİRİNÇAL

İmza

KIYMETLİ ANNEMİN ANISINA…

TEŞEKKÜR

Tez çalışmam süresince farklı bakış açıları ve bilimsel katkılarıyla beni aydınlatarak çalışmama yön veren, lisansüstü eğitim süreçlerimde bilgi birikimi ve tecrübelerinden bolca istifade ettiğim değerli Tez Danışman Hocam Sayın Prof. Dr. Kadir TURAN'a minnet ve teşekkürlerimi sunarım.

Tez çalışmama olan değerli katkılarından dolayı Tez İzleme Komitesi hocalarım Sayın Prof. Dr. Azize Şener, Prof. Dr. Kadir TURAN ve Dr. Öğr. Üyesi Erkan RAYAMAN'a teşekkür ederim.

Katkılarından dolayı Biyokimya Anabilim Dalı Başkanı Sayın Prof. Dr. Azize Şener başta olmak üzere M. Ü. Eczacılık Fakültesi, Biyokimya Anabilim Dalı öğretim üyelerine teşekkür ederim.

Bana her konuda desteklerini göstermekten hiçbir zaman çekinmeyen tez çalışmam sırasında kaybettiğim rahmetli annem Servet PİRİNÇAL'a ve kıymetli babam Abdullah PİRİNÇAL'a teşekkür etmeyi bir borç bilirim.

AYŞEGÜL PİRİNÇAL

Bu tez, Marmara Üniversitesi Bilimsel Araştırma Projeleri Komisyonu Başkanlığı tarafından 'İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile İlişkilendirilen Konak Hücre Proteinlerinin Viral Replikasyona Etkileri' konulu ve 'SAG-C-DRP-081117-0617' numaralı proje kapsamında desteklenmiştir.

İÇİNDEKİLER

1. ÖZET **1**

2. SUMMARY **2**

3. GİRİŞ ve AMAÇ **3**

4. GENEL BİLGİLER **7**

4.1. İnfluenza Virüsleri 7

4.2. İnfluenza A Virüslerinin Virion Yapı ve Organizasyonu 8

4.3. İnfluenza A Virüslerinin Genom Yapı ve Organizasyonu 10

4.4. İnfluenza A Virüslerinin Replikasyonu 24

4.5. İnfluenza A Virüslerinde Antijenik Çeşitlilik Mekanizmaları 28

4.6. İnfluenza A Virüslerinin Epidemiyolojisi 30

4.7. İnfluenza A Virüslerine Karşı Konak Hücre Tarafından Oluşturulan Doğal İmmün Yanıtlar 33

4.7.1. İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı ilk doğal koruma bariyeri: Anatomik engeller 33

4.7.2. İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı geliştirilen hücresel savunmalar 34

4.7.3. İnfluenza A virüslerinin algılanmasında görev alan viral sensörler ve doğal immün yanıtların oluşumu 37

4.7.4. İnfluenza A virüslerine karşı konak hücre tarafından sentezlenen koruyucu moleküller: İnterferonlar 41

4.7.5. İnfluenza A virüslerine karşı interferonlar tarafından sentezi uyarılan anti-viral moleküller 44

4.8. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteininin Viral Patogenezdeki Rolü ve Etki Mekanizmaları 48

4.9. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile İlişkilendirilen Hücresel Proteinler 54

4.9.1. Ökaryotik translasyon uzama faktörü-1γ alt ünitesi (EEF1G) proteini 54

4.9.2. 60S ribozomal alt ünitesi nükleer çıkış GTPaz1 (LSG1) proteini 58

4.9.3. ATP- bağımlı RNA Helikaz 56 (DDX56) proteini 62

4.10. CRISPR/Cas9 Teknolojisi ve Genom Düzenleme 66

5. GEREÇ ve YÖNTEM **70**

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler 70

5.2. Enzimler 72

5.3. Ticari Kitler 72
5.4. Antikorlar 73
5.5. Cihaz ve Gereçler 73
5.6. Besiyerleri 74
5.6.1. Bakteriyel besi ortamları 74
5.6.2. Maya besiyerleri 75
5.6.3. Memeli hücre kültürü besiyerleri 76
5.7. Çözeltiler 77
5.7.1. Akrialmid/bis-Akrilamid çözeltisi (% 29 Akrilamid / % 1 bis-Akrilamid – a/h)…… 77
5.7.2. Amido Black Boya Çözeltisi (% 0,5 – a/h) 77
5.7.3. Amonyum persülfat çözeltisi (APS, % 10 – a/h) 77
5.7.4. Bloklama çözeltisi (Yağsız süt tozu, % 5 – a/h) 78
5.7.5. Bovin Serum Albümin çözeltisi (BSA, % 10 – a/h) 78
5.7.6. Dekstroz çözeltisi (% 20 – a/h) 78
5.7.7. Di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi (K_2HPO_4, 50 mM) 78
5.7.8. Di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi (Na_2HPO_4, 200 mM) 78
5.7.9. Di-tiyo bis(süksinimidil propiyonat) çözeltisi (DSP, 0,1 M) 78
5.7.10. Di-tiyotreitol çözeltisi (DTT, 0,1 M) 78
5.7.11. Etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml) 79
5.7.12. Etil alkol çözeltisi (% 70 – h/h) 79
5.7.13. Etilendiamintetraasetik asit çözeltisi (EDTA, 0,5 M, pH:8,0) 79
5.7.14. Fenol : Kloroform : İzoamil Alkol (25:24:1) 79
5.7.15. Fizyolojik tuzlu su (FTS, %0,85 – a/h) 79
5.7.16. Glisin çözeltisi (1 M) 80
5.7.17. Glukoz çözeltisi (1 M) 80
5.7.18. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N) 80

5.7.19. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M) 80
5.7.20. Kapatma çözeltisi 80
5.7.21. Lityum asetat çözeltisi (1 M) 80
5.7.22. Lityum asetat / PEG / TE çözeltisi 80
5.7.23. Lityum asetat / SDS çözeltisi (200 mM lityum asetat / %1 SDS, a/h) 81
5.7.24. Lityum asetat / TE çözeltisi (100 mM lityum asetat / 10 mM Tris-Cl / 1mM EDTA)……..... 81
5.7.25. Magnezyum sülfat çözeltisi (0,5 M) 81
5.7.26. Mangan klorür çözeltisi (0,55 M) 81
5.7.27. Metanol : glasiyel asetik asit çözeltisi (1:1) 81
5.7.28. Nonidet P-40 çözeltisi (NP-40, % 10 – a/h) 81
5.7.29. Orto-Nitrofenil β-Galaktozid çözeltisi (ONPG, 4 mg/ml) 81
5.7.30. Paraformaldehit çözeltisi (%3 – a/h) 81
5.7.31. Proteaz inhibitörü- Fenilmetansülfonilflorid (PMSF, 0,1 M) 82
5.7.32. Polietilen glikol çözeltisi (PEG, %40 – a/h) 82
5.7.33. Polietilen glikol / Sodyum klorür çözeltisi (% 20 PEG/ 1,25 M NaCl) 82
5.7.34. Polietilenimin çözeltisi (PEI, 2 mg/ml) 82
5.7.35. Potasyum asetat çözeltisi (3 M) 82
5.7.36. Potasyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (50 mM) 82
5.7.37. Potasyum klorür çözeltisi (2,5 M) 82
5.7.38. Salmon sperm DNA çözeltisi (ssDNA, 5 mg/ml) 83
5.7.39. Sodyum azid çözeltisi (NaN_3, % 10 – a/h) 83
5.7.40. Sodyum bikarbonat çözeltisi ($NaHCO_3$, % 7,5 – a/h) 83
5.7.41. Sodyum dodesil sülfat çözeltisi (SDS, % 10 – a/h) 83
5.7.42. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N) 83
5.7.43. Sodyum karbonat çözeltisi (1 M) 84

5.7.44. Sodyum klorür çözeltisi (2,5 M) 84
5.7.45. Sodyum di-hidrojen fosfat çözeltisi (200 mM) 84
5.7.46. Tripsin çözeltisi (% 0,25 – a/h) 84
5.7.47. Tripsin-EDTA çözeltisi (%0,05 Tripsin, %0,05 EDTA, a/h) 84
5.7.48. Triton X-100 (% 10 – a/h) 84
5.7.49. Tween-20 çözeltisi (% 10 – a/h) 84
5.7.50. 50x konsantre Adenin (Ade) çözeltisi 84
5.7.51. 10x konsantre Amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi (*İng. drop out-DO*) 85
5.7.52. 100x konsantre Histidin (His) çözeltisi 85
5.7.53. 100x konsantre Lösin (Leu) çözeltisi 85
5.7.54. 5x konsantre Tamponlanmış fizyolojik tuzlu su çözeltisi (T-FTS) 85
5.7.55. 100x konsantre Triptofan (Trp) çözeltisi 85
5.7.56. 1,4-piperazindietanesulfonik asit çözeltisi (PIPES, 1 M) 85
5.7.57. 3-Amino-1,2,4-triazole çözeltisi (3-AT, 1 M) 86
5.8. Tamponlar 86
5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu (pH:6,7) 86
5.8.2. DNA ekstraksiyon tamponu-I (25 mM Tris-Cl, 50 mM glukoz, 10 mM EDTA, pH:8) 86
5.8.3. DNA ekstraksiyon tamponu-II (0,2 N NaOH, % 1 SDS (a/h)) 86
5.8.4. DNA ekstraksyon tamponu-III (3 M Potasyum : 5 M Asetat) 86
5.8.5. Hücre parçalama tamponu (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, %0,1 NP-40 (a/h), pH:8) 86
5.8.6. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris-Cl, 250 mM Glisin, %0,1 SDS (a/h), pH:8,3) 87
5.8.7. Potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH:7,5) 87
5.8.8. Protein transfer tamponu 87
5.8.9. RIPA tamponu (50 mM Tris-Cl, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, %1 NP-40 (a/h), %0,1 SDS (a/h), pH:8) 87

5.8.10. Sodyum asetat tamponu (3 M, pH:5,2) 87

5.8.11. Sodyum fosfat tamponu (200 mM pH:7) 87

5.8.12. TBS ve TBS-T tamponu 88

5.8.13. Tris-HCl tamponu (1 M, pH:7,5) 88

5.8.14. Tris/EDTA tamponu (TE, 10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH:8) 88

5.8.15. Z tamponu (100 mM Sodyum fosfat, 10 mM KCl, 1mM $MgSO_4$, pH:7) .. 88

5.8.16. Z (+) tamponu 88

5.8.17. 4x konsantre Ayırma jeli tamponu (1,5 M Tris, %0,4 SDS (a/h), pH:8,8) 88

5.8.18. 6x konsantre DNA yükleme tamponu 88

5.8.19. 4x konsantre Paketleme jeli tamponu (0,5 M Tris, %0,4 SDS (a/h), pH:6,8) 89

5.8.20. 4x konsantre Protein yükleme tamponu (0,2 M Tris, %8 SDS (a/h), %0,2 bromofenol mavisi (a/h), %4 2-β-merkaptoetanol (h/h), %40 gliserin (h/h), pH:6,8) 89

5.8.21. 20x konsantre TBS tamponu (pH:7,4) 89

5.8.22. 50x konsantre Tris-Asetat-EDTA tamponu (TAE, pH:8) 89

5.8.23. 5x konsantre Tris-glisin tamponu (0,125 M Tris, 1,25 M Glisin, pH:8,3) 89

5.9. Plazmit Vektörler 90

5.10. Virüsler 90

5.11. Bakteriler 91

5.12. Maya Hücresi 91

5.13. Memeli Hücre Hatları 91

5.14. Memeli Hücre Hatlarının Çözündürülmesi, Devamlılığının Sağlanması ve Stoklanması 92

5.15. Transformasyon için *Escherichia coli* Hücrelerinin Kompetent Hale Getirilmesi 92

5.16. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez 93

5.17. RNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez 93

5.18. Spektrofotometrik Yöntemle DNA ve RNA Örneklerinin Kantitatif ve Kalitatif Analizi 94

5.19. Çalışmanın Değişik Aşamalarında Kullanılan Oligonükleotid Primerler . 94

5.20. İnfluenza A Virüslerinin Çoğaltılması 96

5.21. İnfluenza A Virüslerinin Titrasyonu 96

5.21.1. Hemaglutinasyon testi 96

5.21.2. Plak testi 97

5.22. İnfluenza A Virüsü NS1 ve İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının Elde Edilmesi 97

5.22.1. Hücrelerden total RNA'nın izole edilmesi 98

5.22.2. Reverz transkripsiyon ile cDNA'ların elde edilmesi 98

5.22.3. İnfluenza A virüsü NS1 cDNA'larının ve insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması 99

5.22.4. PZR ile çoğaltılan cDNA'ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve saflaştırılması 102

5.23. Maya Hücrelerinde EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması 103

5.23.1. pGAD424 ve pACT2 plazmit DNA'larının ligasyon için hazırlanması.. 103

5.23.2. Ligasyon ve transformasyon 104

5.23.3. Koloni-PZR ile transformant kolonilerin seçilmesi 105

5.23.4. Transformant *E. coli* kolonilerinden küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu……106

5.23.5. Plazmit DNA'ların restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol edilmesi. 106

5.23.6. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile saflaştırılması ve dizi analizleri 107

5.24. Memeli Hücrelerinde İnfluenza A virüsü NS1 Proteinlerini ve NS1 Proteini ile ilişkili Konak Hücre Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması……107

5.24.1. Flag uzantılı influenza A virüsü $NS1_w$ proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörünün oluşturulması 108

5.24.2. GST uzantılı influenza A virüsü $NS1_w$ proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörünün oluşturulması 110

5.24.3. Doğal influenza A virüsü $NS1_w$ proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörünün oluşturulması 112

5.24.4. İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkili konak hücre proteinlerini kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması 113

5.24.5. CRISPR/Cas9 sisteminin uygulandığı *EEF1G ve LSG1* genlerine özgü sgRNA (Rehber RNA) dizilerini taşıyan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması 115

5.25. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması 118

5.26. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu 119

5.27. Memeli Ekspresyon Vektörlerine Klonlanan Genlerin Ekspresyonlarının Western Melezleme Yöntemi ile Kontrolü 120

5.27.1. Plazmit DNA'ların HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve hücre lizatlarının hazırlanması 120

5.27.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve proteinlerin SDS-PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ile ayrılması 120

5.27.3. Western melezleme yöntemi 121

5.28. Viral ve Hücresel Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Saptanması……..122

5.29. İnfluenza A virüsü NS1 Proteini ile İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinleri Arasındaki İlişkinin Maya-İkili Hibrit Metodu ile Analizi 124

5.29.1. NS1-Bait plazmiti ile *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genleri klonlanan maya ikili-hibrit vektörlerinin maya hücrelerine transformasyonu 124

5.29.2. İkili maya transformantların seçici besiyerlerinde üreme özelliklerinin izlemesi…. 127

5.29.3. Seçici besiyerlerinde üreme profilleri izlenen maya kolonilerinde belirteç β-Galaktozidaz enzim aktivitesinin saptanması 127

5.30. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 Proteinleri Arasındaki Etkileşimlerin Memeli Hücrelerinde Araştırılması 128

5.30.1. NS1 proteini ve konak proteinleri arasındaki etkileşimin birlikte-immün çöktürme teknikleri ile analizi 128

5.30.2. NS1 proteini ve konak proteinlerinin GST ile çöktürme yöntemi ile analizi…….130

5.30.3. NS1 ve konak proteinlerinin hücre içi birlikte-lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile analizi 131

5.31. EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerinin İnfluenza A Virüs Replikasyonuna Etkilerinin Araştırılması 131

5.31.1. EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin aşırı ekspresyonlarının influenza A virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılması 132

5.31.2. *DDX56* gen ekspresyonu azaltılan hücrelerde influenza A virüs replikasyonunun araştırılması 132

5.31.3. CRISPR/Cas9 tekniği ile *EEF1G* ve *LSG1* genlerinin susturulması ile ilgili çalışmalar 136

5.32. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile Konak Proteinleri Arasındaki Etkileşimlerin *in siliko* Analizi..... 138

6. BULGULAR 140

6.1. İnfluenza A Virüsü NS1 proteini ile İlişkilendirilen Konak Hücre Proteinlerine Ait Veriler 140

6.2. İnfluenza A Virüslerinin Çoğaltılması ve Titrasyonu ile İlgili Veriler..... 144

6.3. İnfluenza A Virüslerine ait NS1 ve İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının Hazırlanması ile İlgili Veriler 145

6.4. Maya Hücrelerinde EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler..... 151

6.5. Memeli Hücrelerinde İnfluenza A virüsü NS1 Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler..... 154

6.6. Memeli Hücrelerinde İnfluenza A virüsü NS1 Proteini İlişkili Konak Hücre Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler..... 158

6.7. Memeli Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Sisteminin Uygulandığı *EEF1G* ve *LSG1* Genlerine Özgü Rehber RNA (sgRNA) Dizilerini Taşıyan Plazmit Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler 162

6.8. İnfluenza A Virüsü *NS1* Geni ve İnsan *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* Genlerini ve *Cas9* geni Taşıyan Plazmit Vektörlerin Memeli Hücrelerinde Ekspresyonu ile İlgili Veriler 165

6.8.1. İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin Western melezleme teknikleri ve immünfloresans teknikler ile analizine ilişkin veriler 165

6.8.2. İnfluenza A virüsü NS1 proteininin Western melezleme teknikleri ve immünfloresans teknikler ile analizine ilişkin veriler..... 167

6.8.3. CRISPR/Cas9 tekniğinde kullanılan plazmit vektörler üzerinden kodlanan Cas9 enziminin Western melezleme tekniği ile analizine ilişkin veriler 168

6.9. İnfluenza A virüsü NS1 Proteini ile İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Maya-İkili Hibrit Metodu ile Analizine İlişkin Veriler ... 169

6.10. İnfluenza A Virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerinin Memeli Hücrelerindeki Etkileşimlerine İlişkin Veriler 172

6.10.1. NS1 ve konak proteinlerinin birlikte çöktürme teknikleri ile analizine ilişkin veriler…… 173

6.10.2. NS1 ve konak proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile analizine ilişkin veriler..... 176

6.11. EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerinin İnfluenza A Virüs Replikasyonu Üzerine Etkilerine İlişkin Veriler 180

6.11.1. EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin aşırı ekspresyonlarının influenza A virüs replikasyonuna etkileri ile ilgili veriler 180

6.11.2. *DDX56* genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde influenza A virüsü replikasyonu ile ilgili veriler 183

6.12. CRISPR/Cas9 Tekniği ile İnsan *EEF1G* ve *LSG1* Genlerinin İnaktive Edilmesi ile İlgili Veriler 186

6.13. CRISPR/Cas9 Tekniği ile İnsan *EEF1G* ve *LSG1* Genleri Değiştirilen Hücrelerde İnfluenza A Virüsü Replikasyonunun Seyri ile İlgili Veriler..... 198

6.14. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile Konak Proteinleri Arasındaki Etkileşimlerin *in siliko* Analizine İlişkin Veriler 199

7. TARTIŞMA ve SONUÇ **204**

8. KAYNAKLAR **224**

9. EKLER **260**

9.1. Ek-1. Araştırma Makalesi 260

Kısaltmalar ve Simgeler Listesi

^{0}C	Santigrat derece
a/h	Ağırlık/hacim
bç	Baz çifti
CRISPR/Cas9	Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri/Crıspr İlişkili Nükleaz-9
DAPI	4’,6’-diamino-2-fenil-indol
DDX56	ATP-bağımlı RNA Helikaz 56
D’MEM	Dulbecco’s Modified Eagle Medium
DMSO	Dimetil sülfoksit
dNTP	Deoksiribonükleotid trifosfat
DO	Amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi
DSÖ	Dünya Sağlık Örgütü
EDTA	Etilendiamintetraasetik asit
EEF1G	Ökaryotik translasyon uzama faktörü-1γ alt ünitesi
FCS	Fetal buzağı serumu
FTS	Fizyolojik tuzlu su
GAL4-AD	GAL4 aktivasyon bölgesi
GAL4-BD	GAL4 bağlanma bölgesi
gr	Gram
h/h	Hacim/hacim
HEK293	İnsan embriyonik böbrek hücreleri
HeLa	İnsan servikal kanser hücreleri
IFN	İnterferon
IgG-HRP	İmmünglobülin G yabanturpu peroksidazı
kDa	Kilo dalton
LB	Luria bertani
LBA	Luria bertani agar
Leu	Lösin

LSG1	60S ribozomal alt ünitesi nükleer çıkış GTPaz-1
MDCK	Madin-Darby köpek böbrek hücresi
mM	Milimolar
mU	Miliünite
µl	Mikrolitre
NS1	Yapısal olmayan protein-1 (*İng. Non-Structural-1*)
$NS1_W$	İnsan tipi influenza A virüsü NS1 proteini
$NS1_D$	Kuş tipi influenza A virüsü NS1 proteini
OD	Optik dansite
ONPG	Orto-Nitrofenil β-Galaktozid
PAGE	Poliakrilamit jel elektroforezi
PEG	Polietilen glikol
PVDF	Polivinilidin diflorür
PZR	Polimeraz Zincir Reaksiyonu
SD	Sentetik dekstroz besiyeri
SD+HA	Histidin ve adenin içeren SD besiyeri
SDS	Sodyum dodesil sülfat
ssDNA	Salmon sperm DNA
TAE	Tris-asetat-EDTA
TE	Tris-EDTA
TEMED	Tetrametiletilendiamin
Trp	Triptofan
UV	Ultraviyole
YNB	Maya azot kaynağı
w/w	Ağırlık/ağırlık

Şekil Listesi

Şekil 1. İnfluenza A virüsü virion yapısı ve genom yapısı 8
Şekil 2. İnfluenza A/WSN/1933-H1N1 virüs genomuna ait RNA segmentleri ve bu segmentlerden kodlanan viral proteinler. 19
Şekil 3. İnfluenza A virüsü NS1 proteini yapısı.. 22
Şekil 4. İnfluenza A virüslerinin yaşam döngüsü 28
Şekil 5. İnfluenza A virüslerinde antijenik kayma (antijenik shift) ve antijenik sapma (antijenik drift) 29
Şekil 6. İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı geliştirilen immün yanıtlar. 36
Şekil 7. İnfluenza A virüslerine karşı geliştirilen doğal immün sistem sinyal mekanizmaları 40
Şekil 8. İnterferonlar aracılığıyla hücre içi sinyal iletiminde JAK-STAT yolağı 44
Şekil 9. İnterferonlar tarafından sentezi uyarılan anti-viral moleküller 46
Şekil 10. İnfluenza A virüsü NS1 proteinin doğal immun yanıtlar üzerine etkisi 49
Şekil 11. İnfluenza A virüsü NS1 proteini ve etkileşim gösterdiği hücresel proteinler. 53
Şekil 12. EEF1G proteininin ökaryotik translasyon uzama aşamasındaki rolü 56
Şekil 13. EEF1G protein yapısındaki işlevsel bölgeler.. 57
Şekil 14. LSG1 proteini yapısı ve işlevsel bölgeleri. 60
Şekil 15. LSG1 proteininin 60S alt ünitesine bağlanması ve ribozomal biyosentezdeki işlevi. 61
Şekil 16. Ökaryotik hücrelerde çeşitli mekanizmalarda görev alan RNA helikaz enzimleri. 62
Şekil 17. DEAD motif yapısı taşıyan DDX56 proteininin helikaz kor yapısı. 63
Şekil 18. CRISPR/Cas9 sistemi ile genom düzenleme mekanizmaları 68
Şekil 19. *EEF1G* genine ait kromatogram ve BLAST analizi verileri.. 141
Şekil 20. *LSG1* genine ait kromatogram ve BLAST analizi verileri. 142
Şekil 21. *DDX56* genine ait kromatogram ve BLAST analizi verileri. 143
Şekil 22. Hemaglutinasyon testi ile virüs titresinin saptanması. 144
Şekil 23. HeLa ve HEK293 hücrelerinden izole edilen total RNA'ların agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. 146
Şekil 24. NS1, EEF1G, DDX56 ve LSG1 cDNA'larının PZR ile çoğaltılması. 147
Şekil 25. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilen pGAD424 ve pACT2 plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi profilleri. 152
Şekil 26. *EEF1G*, *LSG1* ve *DDX56* genlerinin klonlandığı maya hücrelerinde ekspresyon yapan plazmit vektörlerin restriksiyon haritası. 152
Şekil 27. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen pGAD424-EEF1G, pACT2-LSG1 ve pACT2-DDX56 plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi profilleri. 153
Şekil 28. pGAD424 veya pACT2 maya ekspresyon vektörüne klonlanan insan *EEF1G*, *LSG1* ve *DDX56* genlerine ait nükleotid dizi analizi kromatogramları. 154
Şekil 29. PZR ile çoğaltılan bitim kodonu taşımayan NS1 cDNA'larının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. 155

Şekil 30. Doğrusal hale getirilen plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi profilleri.....155
Şekil 31. İnfluenza A virüsü *NS1$_W$* geni klonlanan plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları. 156
Şekil 32. İnfluenza A virüsü *NS1$_W$* geni taşıyan plazmit DNA'larının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforezi profilleri. 157
Şekil 33. pCAGGS-Flag ve pCAGGS-GST memeli ekspresyon vektörlerinde Flag ve GST kodlayıcı diziler ile kaynaşmış halde klonlanan NS1$_W$ genine ait nükleotid dizi analizi kromatogramları. 158
Şekil 34. *Eco*RV restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA plazmit vektörünün agaroz jel elektroforezi profili.....159
Şekil 35. İnsan *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genleri klonlanan memeli ekspresyon plazmit vektörlerinin restriksiyon haritaları.....159
Şekil 36. İnsan *EEF1G, DDX56* ve *LSG1* geni klonlanan plazmit DNA'larının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforezi profilleri. 160
Şekil 37. pCHA memeli ekspresyon vektörüne klonlanan insan *EEF1G*, *LSG1* ve *DDX56* genlerine ait nükleotid dizi analizi kromatogramları. 161
Şekil 38. Rehber RNA dizilerini kodlayan DNA fragmentlerinin klonlanacağı pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörünün agaroz jel elektroforezi profili.....162
Şekil 39. CRISPR/Cas9 tekniği ile insan *EEF1G* ve *LSG1* genlerini susturmak için oluşturulan plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları.....163
Şekil 40. Plazmit DNA'ların PZR ile yapılan kontrolleri sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez profilleri.....163
Şekil 41. pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörüne klonlanan *EEF1G* ve *LSG1* genlerine özgü rehber RNA kodlayan kısa DNA fragmentlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. 164
Şekil 42. pCHA-LSG1, pCHA-EEF1G ve pCHA-DDX56 plazmit vektörleri ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde HA uzantısı taşıyan LSG1, EEF1G ve DDX56 proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi. 165
Şekil 43. HeLa hücrelerinde, geçici olarak transfekte edilen pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 veya pCHA-DDX56 plazmit vektörleri üzerinden kodlanan HA uzantılı konak proteinlerinin immünfloresans teknikle analiz edilmesi.. 166
Şekil 44. Geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentez edilen NS1 proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme yöntemi ile analiz edilmesi.....167
Şekil 45. HeLa hücrelerinde sentez edilen doğal, Flag veya GST uzantısı taşıyan influenza A virüsü NS1 proteinin hücre içi lokalizasyonunun immünfloresans teknikler ile incelenmesi. 168
Şekil 46. pCas9-EEF-1, pCas9-EEF-2, pCas9-LSG-1 ve pCas9-LSG-2 plazmit vektörleri ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde Cas9 enzimi sentezinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analizi.....169

Şekil 47. Maya ikili hibrit metodu için geliştirilen iki plazmit ile transforme edilen *S. cerevisiae* PJ69-4A maya hücrelerinin SD ve SD+HA seçici katı besiyerlerinde gösterdiği üreme şekilleri..... 171
Şekil 48. Rekombinant β-galaktozidaz enzimi ile hazırlanan standart grafik. 171
Şekil 49. Maya ikili transformant hücrelerinde β-galaktozidaz enzim aktiviteleri. 172
Şekil 50. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-EEF1G proteini ve NS1 proteinlerinin immün çöktürme sonrası SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi..... 174
Şekil 51. pCAGGS-NS1$_W$-GST (veya pCAGGS-GST) ve pCHA-EEF1G plazmitleri ile transfekte edilen HEK293 hücre lizatlarında proteinlerin glutayon sefaroz ile çöktürülmesi ve çökeltilerde NS1$_W$-GST, H-EEF1G ve GST proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analizi..... 175
Şekil 52. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-LSG1 proteini ve NS1 proteinlerinin immün çöktürme sonrası SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi..... 175
Şekil 53. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-DDX56 proteini ve NS1 proteinlerinin birlikte immün çöktürme testi sonrası SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi. 176
Şekil 54. HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen H-EEF1G ve NS1$_W$, NS1$_W$-Flag veya NS1$_W$-GST proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile incelenmesi. 177
Şekil 55. HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen H-LSG1 ile NS1$_W$, NS1$_W$-Flag veya NS1$_W$-GST proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları. 178
Şekil 56. HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen HA uzantılı DDX56 ve doğal, Flag veya GST uzantısı taşıyan influenza A virüsü NS1 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile incelenmesi. 179
Şekil 57. Plazmit transfeksiyonu ile EEF1G, LSG1 ve DDX56 protein düzeyi arttırılan HEK293 hücrelerinde influenza A/WSN/33-H1N1 ve A/Duck/Pen-H5N2 virüs replikasyonunun SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile değerlendirilmesi. 182
Şekil 58. siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinden elde edilen total RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile analizi. 183
Şekil 59. siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde DDX56 transkript düzeyleri ve bu hücrelerde influenza A (WSN) virüs replikasyonunun izlenmesi. 185
Şekil 60. EEF1G veya LSG1 geni hedeflenen farklı klonlara ait total RNA'ların ve genom DNA'ların agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. 186
Şekil 61. Farklı klonlara ait *EEF1G* veya *LSG1* genlerinin PZR ile çoğaltılması. 187
Şekil 62. CRISPR/Cas9 tekniği aracılığıyla düzenlenmesi hedeflenen *EEF1G* ve *LSG1* genlerine ait hedef bölgelerin şematik gösterimi. 188
Şekil 63. *EEF1G* geni hedeflenen ***E8*** klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. 189
Şekil 64. *EEF1G* geni hedeflenen ***E22*** klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. 190

Şekil 65. *EEF1G* geni hedeflenen ***E22*** klonunun genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları. 191
Şekil 66. *LSG1* geni hedeflenen ***L5*** klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. 192
Şekil 67. *LSG1* geni hedeflenen ***L9***-LSG1 klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. 193
Şekil 68. *LSG1* geni hedeflenen ***L9***-LSG1 klonunun 1. hedef bölgesine ait genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve modifikasyonların tespiti. 194
Şekil 69. *LSG1* geni hedeflenen ***L9***-LSG1 klonunun 2. hedef bölgesine ait genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve modifikasyonların tespiti. 195
Şekil 70. *LSG1* geni hedeflenen ***L11***-*LSG1* klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. 196
Şekil 71. *LSG1* geni hedeflenen ***L11*** klonuna ait genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve modifikasyonların tespiti.. 197
Şekil 72. CRISPR/Cas9 tekniği aracılığıyla oluşturulan EEF1G ve LSG1 proteinleri bakımından mutant HeLa hücrelerinin influenza A/WSN/33-H1N1 ve A/Duck/Pen-H5N2 virüsleri ile enfeksiyonu sonrası viral replikasyonun Western melezleme tekniği ile analizi. 198
Şekil 73. İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile insan EEF1G proteini arasındaki etkileşimlerin in siliko analiz ile modellenmesi. 201
Şekil 74. İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile insan LSG1 proteini arasındaki etkileşimlerin in siliko analiz ile modellenmesi. 202
Şekil 75. İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile insan DDX56 proteini arasındaki etkileşimlerin in siliko analizle ile modellenmesi. 203

Tablo Listesi

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler.....95
Tablo 2. *EEF1G* ve *LSG1* genlerine özgü seçilen sgRNA dizileri. (Hedef dizinin intron bölgede yer alan bölümü altı çizili olarak gösterilmiştir).....116
Tablo 3. sgRNA kodlayan DNA fragmentlerinin oluşturulmasında kullanılan primerler.....117

1. ÖZET

İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile İlişkilendirilen Konak Hücre Proteinlerinin Viral Replikasyona Etkileri

Öğrenci Adı: Ayşegül PİRİNÇAL

Danışman Adı: Prof. Dr. Kadir TURAN

Amaç: İnfluenza A virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde yer alan RNA virüsleridir. Bu çalışmada influenza A virüsleri ile enfekte hücrelerde viral NS1 proteini ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinleri arasındaki ilişkinin aydınlatılması ve bu ilişkinin virüs replikasyonu açısından öneminin ortaya konması amaçlanmıştır.

Gereç ve yöntem: İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile konak proteinleri arasındaki etkileşimin saptanmasında maya ikili-hibrit metodu, immün çöktürme, GST ile çöktürme ve immünfloresans tekniklerinden yararlanıldı. Etkileşim modellerinin analizleri *in siliko* yöntemler kullanılarak yapıldı. Geçici transfeksiyon ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 protein miktarları arttırılan; ya da siRNA veya CRISPR/Cas9 teknikleri ile ilgili genleri susturulan hücreler influenza A/WSN/1933-H1N1 (WSN) veya A/Duck/Pennsylvania/1984-H5N2 (DkPen) virüs tipleri ile enfekte edildi ve bu hücrelerde viral replikasyonun seyri izlendi.

Bulgular: Maya ve memeli hücreleri ile yapılan testler NS1 proteininin EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri ile etkileşim gösterdiğini ortaya koydu. HEK293 hücrelerinde EEF1G miktarındaki artışın her iki virüs tipinin replikasyonunu; LSG1'deki artışın sadece DkPen tipi virüs replikasyonunu yavaşlattığı saptandı. Buna karşın DDX56'daki artış virüs replikasyonu üzerinde anlamlı bir değişime neden olmadı. Bununla birlikte, siRNA'lar ile *DDX56* geni susturulan hücrelerde WSN tipi virüs replikasyonunun negatif yönde etkilendiği görüldü. CRISPR/Cas9 tekniği ile *EEF1G* geni mutasyona uğratılan hücrelerde DkPen tipi virüslerin; *LSG1* geni mutasyona uğratılan hücrelerde her iki virüs tipinin replikasyonunda yavaşlama saptandı.

Sonuç: Bu çalışmada *in vivo*, *in vitro* ve *in siliko* analizler sonucunda insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin NS1 proteini ile ilişkili olduğu ortaya kondu. Bu proteinlerden EEF1G proteininin influenza A virüsleri üzerinde negatif yönde, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin ise pozitif yönde etkiye sahip olduğu saptandı.

Anahtar kelimeler: İnfluenza A virüsü, NS1 proteini, EEF1G, LSG1, DDX56

2. SUMMARY

Effects of the Host Cellular Proteins Associated with Influenza A Virus NS1 Protein on the Viral Replication

Student Name: Ayşegül PİRİNÇAL

Name of Supervisor: Prof. Dr. Kadir TURAN

Objective: Influenza A viruses are RNA viruses belonging to the *Orthomyxoviridae* family. In this study, it was aimed to elucidate the relationship between the viral NS1 protein and EEF1G, LSG1 or DDX56 proteins in influenza A virus infected cells, and to reveal the importance of this relationship in terms of virus replication.

Materials and methods: Yeast two-hybrid assay, co-immunoprecipitation, GST pull-down and immunofluorescence techniques were used to determine the interaction between influenza A virus NS1 and host proteins. The interaction models were analyzed by using *in silico* methods. EEF1G, LSG1, or DDX56 proteins were over-expressed in the cells by transiently transfection. The cells were knockdown or knockout with siRNA or CRISPR/Cas9 techniques, respectively. These cells were infected with influenza A/WSN/1933-H1N1 (WSN) or A/Duck/Pennsylvania/1984-H5N2 (DkPen) viruses and the viral replication was examined.

Results: The studies with yeast and mammalian cells revealed that the NS1 protein interacts with EEF1G, LSG1, and DDX56 proteins. The over-expression of LSG1 in HEK293 cells only caused the slowdown of the DkPen type virus replication, while EEF1G slowed down the replication of both virus types. In contrast, the overexpression of DDX56 did not cause a significant change in the replication of viruses. However, it was observed that the WSN type virus replication was negatively affected in the knock down cells for DDX56. It was shown that only influenza A DkPen type viruses replication was a slowdown in the cells mutated for *EEF1G* gene with the CRISPR/Cas9 technique, whereas, both of influenza A WSN and DkPen virus replication were slowdown in the cells mutated for *LSG1* gene.

Conclusion: In this study, the results of *in vivo*, *in vitro* and *in silico* analyzes revealed that human EEF1G, LSG1, and DDX56 proteins have interaction with the NS1 protein. Among these proteins, EEF1G protein was found to have a negative effect on influenza A viruses, whereas LSG1 and DDX56 proteins were found to have a positive effect.

Keywords: Influenza A virus, NS1 protein, EEF1G, LSG1, DDX56

3. GİRİŞ ve AMAÇ

İnsanlarda solunum yolu enfeksiyonlarına neden olan influenza A virüsleri *Orthomyxoviridae* virüs ailesi içerisinde sınıflandırılmaktadır. Bu virüsler tek iplikli negatif polarite gösteren sekiz parçalı RNA genomuna sahip zarflı virüslerdir (Palese ve Schulman, 1976). Geçmişte olduğu gibi günümüzde de influenza A virüsleri mevsimsel salgınlara ve bazen de tüm dünyayı etkileyen pandemilere neden olabilmektedir. Bu nedenle influenza virüsleri insan sağlığı açısından büyük bir tehdit oluşturmaktadır.

İnfluenza A virüsleri membran üzerinde bulunan HA (Hemaglutinin) ve NA (Asetilnöraminik hidrolaz, EC.3.2.1.18) glikoproteinlerinin antijenik farklılıklarına göre çok sayıda alt tipe ayrılır. İnfluenza A virüsleri için 18 HA (H1-H18) ve 11 NA (N1-N11) alt tipi tanımlanmıştır (Jang ve Bae, 2018). Ancak sadece üç HA (H1, H2, H3) ve iki NA (N1, N2) alt tipi insanlarda adapte olmuştur. Sekiz parçadan oluşan ve yaklaşık 13,5 kilobaz büyüklüğünde viral RNA genomu üzerinden 18 farklı protein kodlanmaktadır (Zhang ve ark., 2020). Birinci segment üzerinden PB2 ve PB2-S2 proteinleri; ikinci segment üzerinden PB1, PB1-F2 ve PB1-N40 proteinleri; üçüncü segment üzerinden PA, PA-X, PA-N155 ve PA-N182 proteinleri; dördüncü, beşinci ve altıncı segmentlerden sırasıyla HA, NP ve NA proteinleri; yedinci segment üzerinden M1, M2 ve M42, proteinleri; sekizinci segment üzerinden NS1, NS2 ve NS3 proteinleri sentezlenmektedir.

Virüsün negatif polariteli RNA molekülleri, NP proteini ile birlikte viral RNP (vRNP) halinde paketlenmiş halde bulunur. Viral genomun en büyük üç viral RNA segmenti tarafından kodlanan PB2, PB1 ve PA proteinleri virüsün RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimini oluşturan proteinlerdir ve vRNP'lere bağlı olarak taşınır (Murti ve ark., 1988). Bu proteinler viral RNA'ların transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumludur. HA ve NA proteinleri virüsün en önemli yüzey glikoproteinleridir. HA proteini enfeksiyon sırasında virüsün konak hücre reseptörlerine bağlanmasından ve hücreye girişinden sorumludur. NA proteini ise hücre yüzeyindeki sialik asit bakiyelerini kesen bir enzimdir ve yeni oluşan virüs partiküllerinin tomurcuklanma ile hücre membranından serbest kalmasını sağlar. M1

proteini virüste en fazla miktarda bulunan ve viral membranın hemen altında yer alan bir proteindir. Alternatif işlenme sonucunda M1 mRNA'ları üzerinden kodlanan ve virüsün iyon kanalı proteini olan M2 proteini ise, endozom ve virüs membranlarının pH değişimine bağlı olarak füzyona uğraması ve bunun sonucunda vRNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasına olanak verir. NS1 ve NS2 proteinleri viral genomda sekizinci segment üzerinden sentez edilir. İnfluenza A virüsü NS1 proteini, virüs partikülünde varlığı saptanamamış, yapısal olmayan (*İng. Non-Structural*) bir proteindir. Virüs partikülünde az miktarda bulunan NS2 proteini ise M1 proteini ile birlikte vRNP'lerin hücre içi transportunda işlev görür (Nakajima, 1997).

Bu tez çalışmasının konusu olan influenza A virüsü NS1 proteini virüsün en küçük segmenti üzerinden kodlanır. Virionun yapısal bileşeni olmayan fakat enfekte hücrelerde enfeksiyonun erken evrelerinde yüksek miktarlarda sentez edilen bir proteindir. NS1 proteini yaklaşık 26 kDa molekül ağırlığında olup virüs tipine bağlı olarak 230 veya 237 amino asit bakiyesinden oluşmaktadır (Krug ve Etkind, 1973). Enfekte hücrelerde baskın olarak nükleusta lokalize olurken özellikle enfeksiyonun ilerleyen evrelerinde sitoplazmada bulunmaktadır. NS1 proteini homodimer yapıda iki önemli domain içerir. NS1 proteininin 1-73 amino asit bakiyelerini kapsayan bölümü amino-terminal bölgesi RNA-bağlanma domaini olarak tanımlanır (Liu ve ark., 1997). Bu protein RNA-bağlanma bölgesi ile (Arg38-Lys41) çift zincirli RNA'ya bağlanma özelliği gösterir ve konak hücre tarafından oluşturulan interferon yanıtları bloke ederek viral replikasyona katkı sağlar (Hatada ve Fukuda, 1992). NS1 proteinininde bulunan bir diğer bölge ise efektör domaindir (88-202) (Hale ve ark., 2008). NS1 proteininin bir çok hücresel protein ile interaksiyonu efektör domain bölgesi aracılığıyla gerçekleşir. Virüs tipine bağlı olarak NS1 proteini bir veya iki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) ve nükleer çıkış sinyali taşır (Greenspan ve ark., 1988). Viral RNA sentezinin düzenlenmesi, viral mRNA'ların işlenme mekanizmalarının düzenlenmesi, viral mRNA translasyonunu arttırması, konak apoptik cevapların baskılanması ve PI3K sinyal yolunun aktivasyonu NS1 proteininin işlevleri arasında yer almaktadır (Hale ve ark., 2008).

İnfluenza A virüs enfeksiyonlarına karşı konak organizmalar farklı savunma mekanizmaları geliştirmektedir. Doğal bağışıklık yanıtları, viral enfeksiyonlara karşı

geliştirilen hızlı ancak spesifik olmayan immün yanıtlardır. Doğal bağışıklık sisteminin en önemli bileşenlerden biri olan interferon sentezi viral enfeksiyonlara karşı konak hücrenin oluşturduğu en önemli anti-viral cevaptır. Viral enfeksiyonlarda Tip I interferonların (IFN-α/β) ekspresyonu uyarılmaktadır. İnterferonlar enfekte hücrede veya interferon reseptörleri içeren komşu hücrelerde çeşitli savunma mekanizmalarını harekete geçirerek viral yayılımı engeller. Virüs replikasyonu sırasında hücre içerisinde oluşan çift zincirli RNA molekülü ile aktive olan Protein Kinaz-R (PKR), GTPaz aktivitesine sahip Mx proteinleri, mRNA yıkımından sorumlu 2'-5' oligoadenilat sentaz (OAS) ve RNaz L veya RNA molekülünün yapısal olarak düzenlenmesinden sorumlu adenozin deaminaz (ADAR1) gibi proteinleri kodlayan genler interferonlar tarafından sentezi uyarılan genler arasındadır (Knapp ve ark., 2003). İnterferonlar aracılığıyla konak hücrelerde sentezlenen anti-viral moleküller virüs replikasyonunu yavaşlatıcı ya da inhibe edici etki gösterebilmektedir. Bu anlamda interferonlar virüslerin en önemli hedefleridir.

İnfluenza A virüsleri, 8. segmentten kodlanan NS1 proteini aracılığıyla konak organizmanın hücre içi savunma mekanizmalarını etkisiz hale getirmektedir (Kochs ve ark., 2007). NS1 proteininin viral patogenezde üstlendiği görevlerin yanı sıra, en temel işlevi viral enfeksiyonu inhibe etmek için hücrelerin oluşturduğu interferon yanıtını birçok aşamada bloke etmektir. Bu yönüyle NS1 proteini interferon antagonisti özelliği göstermektedir (Patnaik ve ark., 2010). NS1 proteini bu işlevini yerine getirirken birçok hücresel protein ile etkileşim halindedir. Viral proteinler ile konak hücre proteinleri arasındaki ilişkinin ve bu etkileşimlerin virüs replikasyonunu nasıl etkilediğinin bilinmesi influenza A virüs enfeksiyonları ile mücadelede çok daha etkili stratejiler geliştirme noktasında hayati önem taşıyacaktır. Bu bağlamda, daha önce Yüksek lisans tez çalışmam kapsamında influenza A virüs patogenezi açısından önemli bir viral etken olan NS1 proteini ile ilişkili bir dizi konak hücre proteini maya ikili-hibrit metodunu kullanarak tespit edilmiştir (Pirinçal, 2014). Tespit edilen bu konak hücre proteinlerinden ökaryotik translasyon uzama faktörü-1γ alt ünitesi - EEF1G proteini (eEF-1γ: eukaryotic translation elongation factor 1 gamma), 60S ribozomal alt ünitesi nükleer çıkış GTPaz1 - LSG1 proteini (LSG1: Large 60S subunit nuclear export GTPase1) ve ATP-bağımlı RNA Helikaz 56 - DDX56 proteininin (DDX56: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box - ATP dependent -

RNA helicase) memeli hücrelerinde influenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkisi ve viral replikasyon açısından önemi Doktora tez çalışmamın konusunu oluşturmuştur. Bu proteinlerin memeli hücrelerinde NS1 proteini ile nasıl bir etkileşim halinde olduğu ve bu etkileşimin influenza A virüs replikasyonunu nasıl etkileyeceğinin ortaya konması amaçlanmıştır. Birlikte immün çöktürme, Glutatyon S-transferaz ile çöktürme ve immünfloresans teknikler EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin memeli hücrelerinde de NS1 proteini ile etkileşim halinde olduğunu ortaya koymuştur. Geçici plazmit transfeksiyonu ile bu proteinlerin hücrelerde miktarlarının arttırılması ya da siRNA ve/veya CRISPR/Cas9 teknolojileri ile miktarlarının azaltılmasının, influenza A virüs replikasyonunun seyrini etkilediğini göstermiştir. Dolayısıyla bu çalışma influenza A virüsü ile konak hücre arasındaki ilişkide önemli olan yeni hücresel faktörlerin belirlenmesine imkân vermiştir. Elde edilen veriler influenza A virüsleri ile mücadelede yeni yaklaşımların ve muhtemel çözümlerin ortaya konmasına aracılık edecektir.

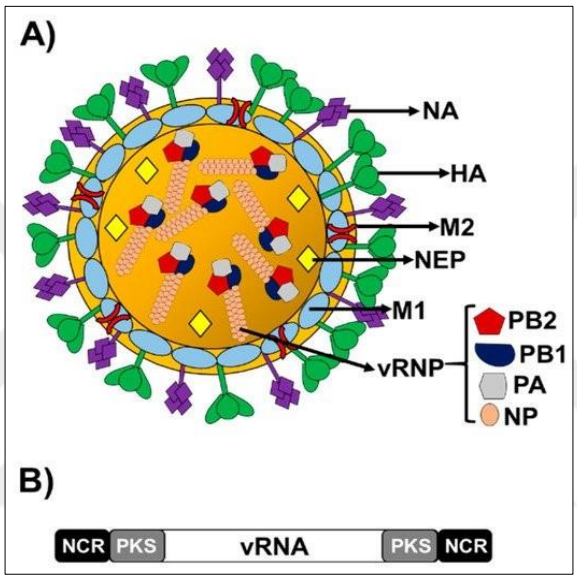
4. GENEL BİLGİLER

4.1. İnfluenza Virüsleri

İnfluenza virüsleri *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde sınıflandırılan, ortalama 80-120 nm çapında, morfolojik olarak farklı şekillerde olabilen membranlı RNA virüsleridir (Palese ve Schulman, 1976; Gultyaev ve ark., 2010; Kawaoka ve Neumann, 2012). Bu virüslerin yedi virüs cinsi bulunmaktadır: İnfluenza A, İnfluenza B, İnfluenza C, İnfluenza D, Isavirus, Thogotovirus ve Quaranjavirusler (Guilligay ve ark., 2014). Isavirus'ler dünya genelinde balık çiftliklerinde rastlanan özellikle Atlantik somon balıklarında enfeksiyon yapabilen güçlü patojeniteye sahip virüslerdir. Enfekte ettikleri balıklarda şiddetli anemiye sebep olurlar (Falk ve ark., 2004). Thogotovirus'ler, Thogoto virüs ve Dhori virüs olmak üzere iki tür içermektedirler. Bazı omurgalıları, kene ve sivrisinekler gibi omurgasızları enfekte eden virüslerdir (Jones ve Nuttall 1989). Quaranjavirus'ler ise eklembacaklılar ve kuşları enfekte etmektedirler (Presti ve ark., 2009). *Orthomyxoviridae* ailesi içerisinde yer alan en önemli grup influenza A virüsleridir. İlk defa 1933 yılında Smith ve ark. tarafından izole edilen influenza A virüsleri kanatlılar başta olmak üzere, insan, domuz, at, sığır, kuş ve deniz memelilerinde grip salgınlarına neden olmaktadırlar (Juozapaitis ve Antoniukas, 2007). 1939 yılında Francis ve ark. insan ve foklarda enfeksiyon yapabilen antijenik olarak influenza A'dan farklı özellik taşıyan influenza B virüslerini tanımlamışlardır (Francis, 1940). İnsanlar ve domuzlarda enfeksiyon yapan influenza C virüsleri 1956 yılında Taylor ve ark. tarafından izole edilmiştir (Lobodzinska, 1972). İnfluenza D virüslerinin ise; domuz ve sığırlarda enfeksiyon yapabildiği bilinmektedir (Flynn ve ark., 2018). İnfluenza virüslerinin yaptıkları etkiye baktığımızda, influenza A virüslerinin epidemilere ve tarihsel süreçler içerisinde tüm Dünya'yı etkileyen pandemilere neden olabildikleri görülmektedir. İnfluenza B virüsleri mevsimsel grip epidemilerine, influenza C virüsleri insan sağlığı açısından önemli bir tehdit oluşturmayan asemptomatik veya özellikle çocuklarda görülen orta şiddette hastalığa neden olurken influenza D virüslerinin ise insanlarda enfeksiyon yapamadıkları bilinmektedir (Matsuzaki ve ark., 2006; Noda, 2012; Huang ve ark., 2014).

4.2. İnfluenza A Virüslerinin Virion Yapı ve Organizasyonu

İnfluenza virüsleri pleomorfik yapı gösteren membranlı virüslerdir. İnfluenza A ve influenza B virionları yapısal olarak küre veya ipliksi (filament) şekilde bulunabilmektedir. Küre formu yaklaşık 120 nm çapında olup ipliksi formu ise çoğu zaman 300 nm uzunluğunu aşmaktadır. İnfluenza C virionları A ve B virionlarından farklı olarak; enfekte hücre yüzeyinde yaklaşık 500 µm uzunluğunda kordon benzeri yapılar oluşturmaktadır (Bouvier ve Palese, 2008).



Şekil 1. İnfluenza A virüsü virion yapısı **(A)** ve genom yapısı **(B)**. Viral segmentler 3' ve 5' uçlarda kodlanmayan bölge (*İng. non-coding region, NCR*) ve paketlenme sinyali (*İng. packaging signals, PKS*) taşımaktadırlar (Nogales ve M, 2019'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

İnfluenza virüsleri yapılarında, viral serbestleşme aşamasında konak hücre membranından türetilen bir membran bulundurmaktadır (Nayak ve ark., 2009). İnfluenza A virion yapısına dıştan içe bakıldığında, membran üzerinde HA (Hemaglutinin) ve NA (Asetilnöraminik hidrolaz, EC.3.2.1.18) glikoproteinleri yer almaktadır. Bir virionda HA sayısı yaklaşık 500 kadardır. HA:NA oranı ise yaklaşık 4/1 dir (Szewczyk ve ark., 2014). Virüsün iyon kanalı proteini olan M2 proteini membran üzerinde daha az sayıda bulunmaktadır. M2:HA oranı ortalama 10-100 HA molekülü için bir M2 kanalı şeklindedir (Zebedee ve Lamb, 1988). Üç integral membran proteini (HA, NA, M2), virionu çevreleyen ve matriks proteini olan M1

proteini üzerinde yer alırlar (Ksenofontov ve ark., 1999). M1 proteini virionun yaklaşık %40'ını oluşturur. M1 matriksin oluşturduğu katmanın içinde, nükleer çıkış proteini olarak bilinen NS2 proteini ve ribonükleoprotein kompleksi (RNP) bulunur. Ribonükleoprotein kompleksi, nükleoprotein (NP) ve heterotrimerik RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimi ile paketlenmiş viral RNA segmentlerinden oluşmaktadır (Coloma ve ark., 2009) (**Şekil 1**). İnfluenza B virionunda, influenza A'dan farklı olarak M2 iyon kanalı proteini yerine NB ve BM2 proteinlerini bulunmaktadır (Kollerova ve Betakova, 2006). Böylece HA ve NA glikoproteinleri ile birlikte toplamda 4 membran proteini bulunur. İnfluenza C virion yapısında ise membran üzerinde HA ve NA proteinlerinin fonksiyonunu gören tek bir major glikoprotein (HEF: Hemaglutinin Esteraz Füzyon) ve bir minor zarf proteini (CM2) yer almaktadır (Hanika ve ark., 2005).

A tipi virüsler membran üzerinde bulunan HA ve NA glikoproteinlerinin antijenik farklılıklarına göre çok sayıda alt tipe ayrılır. Bugüne kadar influenza A virüsleri için 18 HA (H1-H18) ve 11 NA (N1-N11) alt tipi tanımlanmıştır (Luo ve ark., 2020). Bu tanımlama 198 (18H x 11N) farklı alt tip kombinasyonunun ortaya çıkmasına olanak sağlar. Alt tiplerin tamamı herhangi bir belirgin hastalığa neden olmaksızın yabanıl su kuşlarında saptanmıştır (Peiris ve ark., 2007). Sadece H5 ve H7 alt tipleri örneğin kümes hayvanları gibi başka konaklara bulaştıklarında ileri derecede patojen bir özellik kazanır (Munch ve ark., 2001). H17N10 ve H18N11 alt tipleri yapılan son çalışmalarla yarasalarda saptanan alt tiplerdir (Tong ve ark., 2013). İnsanlarda çeşitli alt tipler (H1, H2, H3, H5, H7 ve H9) izole edilmiş olmasına rağmen sadece üç HA (H1, H2, H3) ve iki NA (N1, N2) alt tipi epidemilere neden olmaktadır (Gatherer, 2009). İnfluenza A virüslerinin iki alt tipi (H1N1 ve H3N2) ile influenza B virüsleri insanlar arasında 1977 yılından bu yana mevsimsel olarak ortaya çıkmaktadır (Rambaut ve ark., 2008). Buna bağlı olarak, bir önceki mevsimde dolaşımda olan virüs suşları temel alınarak üretilen ve genellikle üç farklı suşun (trivalen) karışımından oluşan mevsimlik influenza aşıları H1N1, H3N2 ve bir influenza B suşu antijenlerini içermektedir (Beyer ve ark., 1987). İnfluenza A-H2N2 virüsünün 1957-1968 yıllarında insanlarda salgınlara neden olduğu bilinmektedir (Lindstrom ve ark., 2004). İnfluenza B tipi virüsleri için B/Victoria/2/1987 ve

B/Yamagata/16/1988 alt tipleri tanımlanırken, influenza C virüslerinin alt tipleri bulunmamaktadır (Verma ve ark., 2017).

4.3. İnfluenza A Virüslerinin Genom Yapı ve Organizasyonu

İnfluenza virüslerinin genomu negatif polarite gösteren tek iplikli RNA moleküllerinden oluşmaktadır (Luo ve ark., 2020). İnfluenza A ve B virüsleri sekiz adet RNA segmenti taşırken, influenza C ve D virüslerinin genomları yedi adet RNA segmentinden oluşur. Genom büyüklüklerine bakıldığında, influenza A virüsü genomu yaklaşık 13,5 kilobaz uzunluğunda iken, influenza B virüsü genomları yaklaşık 14,6 kilobazdır. İnfluenza C virüsü ve D virüsü genomları ise sırasıyla yaklaşık 12,9 kilobaz ve 13,2 kilobaz uzunluklarındadır (Racaniello ve Palese, 1979; Su ve ark., 2017).

İnfluenza virüslerinde viral genomu oluşturan her bir RNA molekülünün 3'- ve 5'-uçlarında ortalama 12-13 nükleotid uzunluğunda 'korunmuş diziler' olarak adlandırılan kodlanmayan bölgeler bulunmaktadır (Li ve Palese, 1992). Tüm influenza virüs tiplerinin RNA moleküllerinde görülen bu korunmuş diziler promotör, poliadenilasyon sinyali ve viral paketlenme aşamasında paketlenme sinyali olarak işlev görür (Maeda ve ark., 2003). Viral RNA (vRNA) molekülünün uç bölgeleri, kısmen komplementerlik özelliği gösteren bu diziler ile saç tokası yapısı oluşturur (Hsu ve ark., 1987). Viral RNA molekülünün geriye kalan kısmı ise bazik bir aminoasit olan argininden zengin NP proteini ile birlikte ribonükleoprotein partikülleri (vRNP) halinde paketlenmiştir (Ng ve ark., 2008). RNA moleküllerinin transkripsiyonu ve replikasyonunu kataliz eden heterotrimerik RNA polimeraz enzim kompleksi de (PB2-PB1-PA) vRNP'lere bağlı olarak virüs partikülünde taşınmaktadır (Murti ve ark., 1988).

İnfluenza A virüslerini genom organizasyonu açısından ele alınırsa, 8 adet RNA molekülünden oluşan viral genom üzerinden toplam 18 farklı proteinin kodlandığı görülür (Zhang ve ark., 2020). Ancak yakın bir geçmişe kadar veriler, viral genom üzerinden 10 farklı proteinin sentez edildiği şeklindeydi. Bunlar, RNA bağımlı-RNA polimeraz enzimini oluşturan PB2, PB1 ve PA proteinleri, hemaglutinin (HA), nükleoprotein (NP), nöraminidaz (NA), matriks proteini (M1),

iyon kanal proteini (M2), NS1 (yapısal olmayan protein) ve NEP (*İng.* nuclear export *protein*) olarak da bilinen NS2 proteinleridir (Nakajima, 1997). Yapılan çalışmalarla yeni proteinler keşfedilerek influenza A virüslerinin daha kompleks bir genom organizasyonuna sahip olduğu görülmüştür. İlk olarak 2001 yılında Chen ve arkadaşları influenza A virüsü ikinci RNA segmenti üzerinden, PB1 proteinine ek olarak PB1-F2 adı verilen ikinci bir proteinin de sentez edildiğini göstermişlerdir (Chen ve ark., 2001). Ardından birinci segment üzerinden PB2 proteinine ek olarak PB2-S2 (Yamayoshi ve ark., 2016), ikinci segment üzerinden PB1 ve PB1-F2 proteinlerine ek olarak PB1-N40 (Wise ve ark., 2009), üçüncü segment üzerinden PA proteinine ek olarak PA-X (Jagger ve ark., 2012), PA-N155 ve PA-N182 (Muramoto ve ark., 2013) proteinleri, yedinci segment üzerinden M1 ve M2 proteinlerine ek olarak M42 (Wise ve ark., 2012), sekizinci segment üzerinden NS1 ve NS2 proteinlerine ek olarak NS3 (Selman ve ark., 2012) proteininin de sentezlendiği keşfedilmiştir. Böylece viral genomun dördüncü, beşinci ve altıncı segmentlerinden sırasıyla HA, NP ve NA proteinleri olmak üzere sadece birer adet protein, geriye kalan beş segmentten ise en az iki protein kodlandığı saptanmıştır (**Şekil 2**).

Viral genomun en büyük üç RNA segmenti tarafından kodlanan PB2, PB1 ve PA proteinleri virüsün RNA-bağımlı RNA polimeraz enzimini oluşturan proteinlerdir. Bu proteinler viral RNA'ların transkripsiyonu ve replikasyonundan sorumludur (Gonzalez ve ark., 1996).

İnfluenza A virüsü *PB2 proteini* (*İng. polymerase basic protein-2*), 87 kDa ağırlığında olup virüsün 2280 nükleotidten oluşan en büyük birinci segmenti üzerinden kodlanır. PB2 proteini viral mRNA sentezinde önemli bir görev üstlenmektedir. Konak hücrelerde RNA polimeraz II enzimi tarafından sentez edilen mRNA'ların 5′-ucundaki 7-metil guanozin şapka (5′-CAP) yapısına bağlanır (Plotch ve ark., 1981; Braam ve ark., 1983). 5′-CAP yapısı viral mRNA'ların sentez edilmesinde primer olarak kullanılır (Plotch ve ark., 1979). Bu nedenle influenza A virüslerinde genom replikasyonu ve transkripsiyon, diğer RNA virüslerinin aksine konak hücre nükleusunda gerçekleşir (Engelhardt ve ark., 2005). Viral RNA polimeraz bileşenlerinden PB1 ve PA proteinlerinden bağımsız olarak PB2

proteininin, bazı virüs tiplerinde nükleusa ek olarak mitokondride de lokalize olduğu rapor edilmiştir (Long ve Fodor, 2016). Mitokondriyal lokalizasyon, PB2 proteininin N-terminal bölgesinde sahip olduğu mitokondriyal lokalizasyon sinyali aracılığıyla gerçekleşmektedir (Carr ve ark., 2006). PB2 proteininin yapısındaki bazı amino asit farklılıkları viral patogenezi önemli ölçüde etkilemektedir. Proteinin 627. pozisyonda glutamik asitin lizin amino asitine (E627K) dönüşmesine neden olan mutasyon pandemik 1918-H1N1, 1957-H2N2, 1968-H3N2 ve 2009-H1N1 virüslerinde ortak olarak görülmüştür (Shinya ve ark., 2004; Kirui ve ark., 2014). Bu mutasyon sonucu virüs memeli hücrelerine çok daha kolay adapte olabilmektedir (Zhu ve ark., 2010).

PB2-S1 proteini, birinci segment üzerinden kodlanan PB2 mRNA'sının alternatif işlenmesi (*İng. splicing*) sonucu sentez edilir. Beş yüz sekiz amino asit bakiyesinden oluşan PB2-S1 proteininin, PB2 proteini ile amino-terminal bölgedeki ilk 495 amino asit bakiyesi ve karboksi-terminal bölgedeki 13 amino asit bakiyesi ortaktır. Bu proteinin enfekte hücrelerde mitokondride lokalize olduğu saptanmıştır. PB2-S1 proteininin en temel işlevi viral enfeksiyonlar sonucu konak hücre tarafından oluşturulan savunma mekanizmalarından RIG-I bağımlı IFN-β ekspresyonunu mitokondriyel anti-viral sinyal proteinine (MAVS) bağlanarak inhibe etmektedir. Ayrıca PB2-S1 proteininin amino-terminal bölgesi ile PB1 proteinine bağlandığı ve bu bağlanma sonucu viral RNA polimeraz aktivitesini inhibe ettiği gösterilmiştir (Yamayoshi ve ark., 2016).

PB1 proteini (*İng. polymerase basic protein-1*) ikinci viral RNA segmenti üzerinden sentez edilen 757 amino asitten oluşan bir proteindir ve yaklaşık 96 kDa ağırlığındadır. PB1 proteini viral RNA'ların sentezinde polimerizasyondan sorumlu olan katalitik aktiviteye sahip alt ünitedir (Kolpashchikov ve ark., 2004). Proteinin 249-256 amino asit bölgesi promotör-bağlanma ve 286-483 amino asit bölgesi RNA-bağımlı RNA polimeraz bölgesidir. PB1 proteini ayrıca viral RNA polimeraz enzim kompleksinin alt ünitelerinin birleşimini de sağlamaktadır (Gonzalez ve ark., 1996). Amino-terminalde 1-17 amino asit bakiyelerinden oluşan bölge PA-bağlanma bölgesi, 678-757 amino asit bakiyelerinden oluşan karboksi-terminal bölge ise PB2-bağlanma bölgesini içermektedir.

PB1-F2 proteini (*İng. PB1 protein-Frame2*), influenza A virüsü ikinci RNA segmenti üzerinden PB1 proteinine ek olarak sentez edilir. 2001 yılında viral genomun 11. proteini olduğu keşfedilen PB1-F2 proteini, *PB1* geninin ikinci açık okuma çerçevesinde (ORF2) dördüncü başlangıç kodonundan (AUG4) başlayarak kodlanan bir proteindir (Chen ve ark., 2001). Ortalama 11 kDa büyüklüğünde ve 87 veya 90 amino asit bakiyesinden oluşan bu proteine influenza B ve influenza C virüsleri ile enfekte hücrelerde rastlanmamıştır. Ağırlıklı olarak mitokondriyal membranlarda lokalizasyon göstermektedir. PB1-F2 mitokondriyal proteinlerden adenin nükleotid translokatör-3 (ANT3) ve voltaj-bağımlı iyon kanal-1 (VDAC-1) ile interaksiyon göstererek mitokondriyal membran stabilitesini bozar (Zamarin ve ark., 2005). Bunun sonucu olarak apoptoz mekanizmalarını tetikler (Chakrabarti ve Pasricha, 2013). Ayrıca nükleer lokalizasyona da sahip olup PB1 proteini ile interaksiyon göstererek polimeraz aktivitesini düzenlemektedir (Mazur ve ark., 2008). PB1-F2 viral patogenezde önemli bir virülans faktör olarak karşımıza çıkar (Krumbholz ve ark., 2011; Varga ve ark., 2012). Nükleer faktör kappa-B kinaz beta alt ünitesi inhibitörü (IKKβ) ile interaksiyon göstererek Nükleer Faktör kappa-B (NF-κB) sinyalini inhibe eder. Böylece doğal immün sinyal yolaklarını bozarak immün yanıtların düzenlenmesinde de rol oynar (Reis ve McCauley, 2013). Yapılan çalışmalar, PB1-F2 proteini N66S (Asparagin →Serin) mutasyonunun Hong Kong 1997-H5N1 ve pandemik 1918 A/Brevig Mission/18 virüslerinde patojeniteyi arttırdığını göstermiştir (Conenello ve ark., 2011).

PB1-N40 proteini, ikinci viral RNA segment üzerinden sentez edilen üçüncü proteindir. *PB1* geni ile aynı okuma çerçevesinde beşinci başlangıç kodonundan (AUG5) başlayarak kodlanır. PB1-F2 proteini gibi PB1-N40 proteini de alternatif işlenme mekanizması ile değil alternatif translasyona başlama mekanizması sonucu sentezlenmektedir (Wise ve ark., 2011). PB1 mRNA'sının amino-terminal bölgesindeki ilk 39 kodondan sonrasını içermektedir. İlk 17 amino asitlik bölge PB1 proteininin PA proteini ile bağlanma bölgesi olduğundan PB1-N40 proteini, PA proteini ile bağlanamaz. Ancak 639-718 amino asit bakiyesinden oluşan karboksi-terminal bölge bir diğer viral RNA polimeraz alt ünitesi olan PB2 ile bağlanma bölgesidir. Her ne kadar PB1 proteini ile yaklaşık % 95'lik bir benzerlik gösterse de PB1-N40 proteini viral RNA sentezi için gerekli olan üç alt ünitenin birleşimini

sağlayamadığı için polimeraz aktivitesi gösteremez (Vasin ve ark., 2014). Enfeksiyonun erken evresinde sentezlenir ve enfekte hücrelerde nükleer bir lokalizasyon gösterir. İnfluenza A virüslerinin yapısal olmayan proteinlerinden biri olan PB1-N40 proteininin, aynı segmentten sentezlenen PB1 ve PB1-F2 protein ekspresyonları arasındaki dengeyi sağlamakla görevli olduğu düşünülmektedir (Wise ve ark., 2009).

PA proteini (*İng. polymerase acidic protein*), influenza virüsü RNA polimeraz enziminin üçüncü alt ünitesi olup üçüncü viral RNA segmenti üzerinden sentez edilmektedir (Sanz-Ezquerro ve ark., 1998). Yaklaşık 85 kDa ağırlığında olan bu protein, karboksi-terminal bölgesi ile PB1 proteininin amino-terminal bölgesine bağlanır (Coloma ve ark., 2009). Bu bağlanma ile PB1 proteininin viral promotöre karşı afinitesini arttırır (Hara ve ark., 2006). PA proteininin en temel işlevi, amino-terminal bölgede endonükleaz aktivitesi ile hücresel mRNA'lardan 5′-CAP başlığının kesimini gerçekleştirmektir (Dias ve ark., 2009; Resa-Infante ve ark., 2011).

PA-X proteini, üçüncü segmentten kodlanan ikinci proteindir. Yaklaşık 29 kDa ağırlığındadır. Viral genomdaki diğer proteinlerden farklı olarak ribozomal çerçeve değiştirme (*İng. ribosomal frameshift*) mekanizmaları ile sentez edilir (Shi ve ark., 2012). Bu kodlama mekanizması genellikle RNA virüslerinde küçük bir genomun tek bir segmentinden farklı protein yapıları oluşturmasına olanak verir. PA-X proteini, PA proteininin endonükleaz aktivitesine sahip N-terminal bölgesini (1-191 aa.) ve C-terminal bölgesinde PA proteininin alternatif okuma çerçevesiyle oluşturulan 61 amino asitlik X-domainini içermektedir. Ancak 2009-pandemik H1N1 PA-X proteini C-terminal bölgesi 41 amino asitten oluşmaktadır. Fonksiyonel olarak PA-X proteini, hücresel mRNA'ları yıkarak konak protein sentezini baskılar. Bu işlevini hem N-terminal hem de C-terminal bölgesi aracılığıyla gerçekleştirmektedir. Ayrıca C-terminal bölgesinde bulunan ilk 15 amino asitin hem nükleusda hem de sitoplazmada hücresel mRNA'ların yıkılmasında kilit bir rol oynadığı gösterilmiştir (Hayashi ve ark., 2016).

PA-N155 ve *PA-N182 proteinleri,* influenza A virüsünün üçüncü RNA segmenti üzerinden PA ve PA-X proteinlerine ek olarak sentez edilirler. PA-N155

proteini, PA mRNA'sının onbirinci başlangıç kodonundan (AUG11) başlayarak kodlanan ve amino-terminal bölgede 155 kodona karşılık gelen bölgeyi içermeyen bir proteindir. PA-N182 proteini ise, PA mRNA'sının onüçüncü başlangıç kodonundan (AUG13) başlayarak kodlanan ve N-terminal bölgede 182 kodona karşılık gelen bölgeyi içermeyen bir proteindir (Wang ve ark., 2018). PA-N155 protein ekspresyonu olmayan hücrelerde viral replikasyonun daha yavaş gerçekleştiği ancak PA-N182 proteini için anlamlı bir fark görülmediği rapor edilmiştir. Benzer şekilde farelerde yapılan deneylerde PA-N155 proteininin viral patogenez üzerinde etkili olduğu gösterilmiştir. PB1 ve PB2 proteinleri ile birlikte sentez edilseler de polimeraz aktivitesi göstermedikleri ve hücresel immün yanıtlar üzerine de herhangi bir etki yapmadıkları görülmüştür (Muramoto ve ark., 2013).

HA proteini (*İng. hemagglutinin*), dördüncü viral RNA segmenti üzerinden sentez edilen zarf glikoproteinidir. HA proteini konak hücre yüzeyindeki sialik asit (N- asetil nöraminik asit) reseptörlerine tutunmayı sağlar (Ni ve ark., 2018). Ayrıca viral membran ile konak hücre membranlarının füzyonundan sorumludur (Skehel ve Wiley, 2000). İnfluenza A virüsü yüzey antijeni olan HA proteini yapısal olarak başlangıçta tek bir polipeptit molekülü olarak (HA0) sentezlenir (Lu ve ark., 2012). Viral membran üzerinde homotrimerik formda bulunup baş ve gövde olmak üzere iki farklı bölümden oluşmaktadır (Copeland ve ark., 1986). Baş kısmı, viral tutunma için son derece önemli olan hücre yüzeyindeki sialik asit reseptörlerine bağlanma bölgesini içermektedir. Viral enfeksiyon esnasında hücre yüzeyindeki sialik asit reseptörlerine bağlanan virüsler endositoz ile hücre içerisine alınır (Lazarovits ve ark., 1996). Endozom içerisinde yer alan virüsün RNA moleküllerinin (vRNP'ler) serbestleşmesi için viral membran ile endozom membranının füzyona uğraması gerekmektedir. Bu füzyonun gerçekleşebilmesi ise endozom içinde asidik pH'da HA0 proteinlerinin proteolitik kesim sonucunda aktive olması ile mümkündür. pH 5-6' da her bir HA0 proteini tripsin veya serin benzeri hücresel bir proteaz tarafından kesilerek HA1 ve HA2 olmak üzere iki parçaya ayrılır (White ve Wilson, 1987). Bu post-translasyonel modifikasyon virüs patojenitesi ve virülans açısından önemli ve gereklidir (Steinhauer, 1999). HA proteininin proteolitik kesim bölgesinde yer alan amino asitler ve virüs patojenitesi arasındaki muhtemel ilişkiyi araştıran çalışmalarda kesim bölgesinde çok sayıda arginin gibi bazik amino asit içeren influenza

virüslerinin oldukça patojen olduğu ancak daha az sayıda bazik amino asit bakiyesi içeren virüslerin düşük patojeniteye sahip olduğu gösterilmiştir (Senne ve ark., 1996). HA0 proteininin HA1 kısmı, sialik asit reseptörlerine bağlanma bölgesi içerirken, HA2 kısmı amino-terminal ucunda füzyon peptit olarak bilinen hidrofobik aminoasitlerden oluşan bir dizi içerir. Endozom içinde asidik ortamda gerçekleşen HA0'ın post-translasyonel değişimiyle açığa çıkan füzyon peptidleri endozomal membran içine girer ve endozomal membran ile viral membranının kaynaşmasına neden olur. Membranların kaynaşması ile birlikte vRNP'ler sitoplazmada serbest kalır. HA proteininin, meydana gelen bazı mutasyonlar sonucunda konak hücreye bağlanmayı sağlayan sialik asit reseptör duyarlılığında önemli değişmelerin yaşandığı ve bu durumun da patojeniteyi etkilediği gösterilmiştir (Takahashi ve ark., 2009). Örneğin; E190 (Glutamat-190) ve G225 (Glisin-225) mutasyonları, insan 1918-H1 molekülünün bağlanma ilgisini üst solunum yolu reseptörü olan α-2,6-SA'den alt solunum yolu reseptörü olan α-2,3-SA'e kaydırır (Stevens ve ark., 2006).

NP proteini (*İng. nucleoprotein*), virionda en bol bulunan ikinci proteindir ve beşinci viral RNA segmenti üzerinden kodlanır. Yaklaşık 56 kDa ağırlığında bazik bir proteindir. Enfekte hücrelerde fazla miktarda eksprese edilir. Virüsün negatif polarite gösteren RNA molekülleri, RNA-bağlanma bölgesi taşıyan NP ile birlikte viral ribonukleoprotein partikülü (vRNP) şeklinde paketlenmiş halde bulunur (Albo ve ark., 1995). Penetrasyon ve membranların füzyonu sonucu viral RNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasından sonra vRNP'ler NP proteininin sahip olduğu nükleer lokalizasyon sinyalleri (NLS) aracığıyla transkripsiyon ve replikasyon için nükleusa transfer edilir (Shapiro ve Krug, 1988). Ayrıca NP proteini, M1 ve NS2 proteinleriyle birlikte yeni viral RNA'ların nükleustan çıkışını gerçekleştirerek vRNA moleküllerinin nükleer-sitoplazmik transportunu kontrol etmektedir (Ma ve ark., 2001). Nükleoproteinler viral RNA'ların transkripsiyonu ve replikasyonu açısından da büyük önem taşır. Pozitif polariteli viral RNA'nın (cRNA) sentezinde RNA polimeraz aktivitesi üzerinde etkisi bulunmaktadır. NP proteini, Isı Şok Proteini-40 (*İng. Heat-shock protein-40, Hsp40*) proteini aracılığıyla Protein Kinaz R (PKR) aktivasyonunu inhibe eder (Sharma ve ark., 2011). Bu yolla protein sentezi engellenmiş olur. Ayrıca 2009 yılında yapılan bir çalışmada NP proteini ile viral

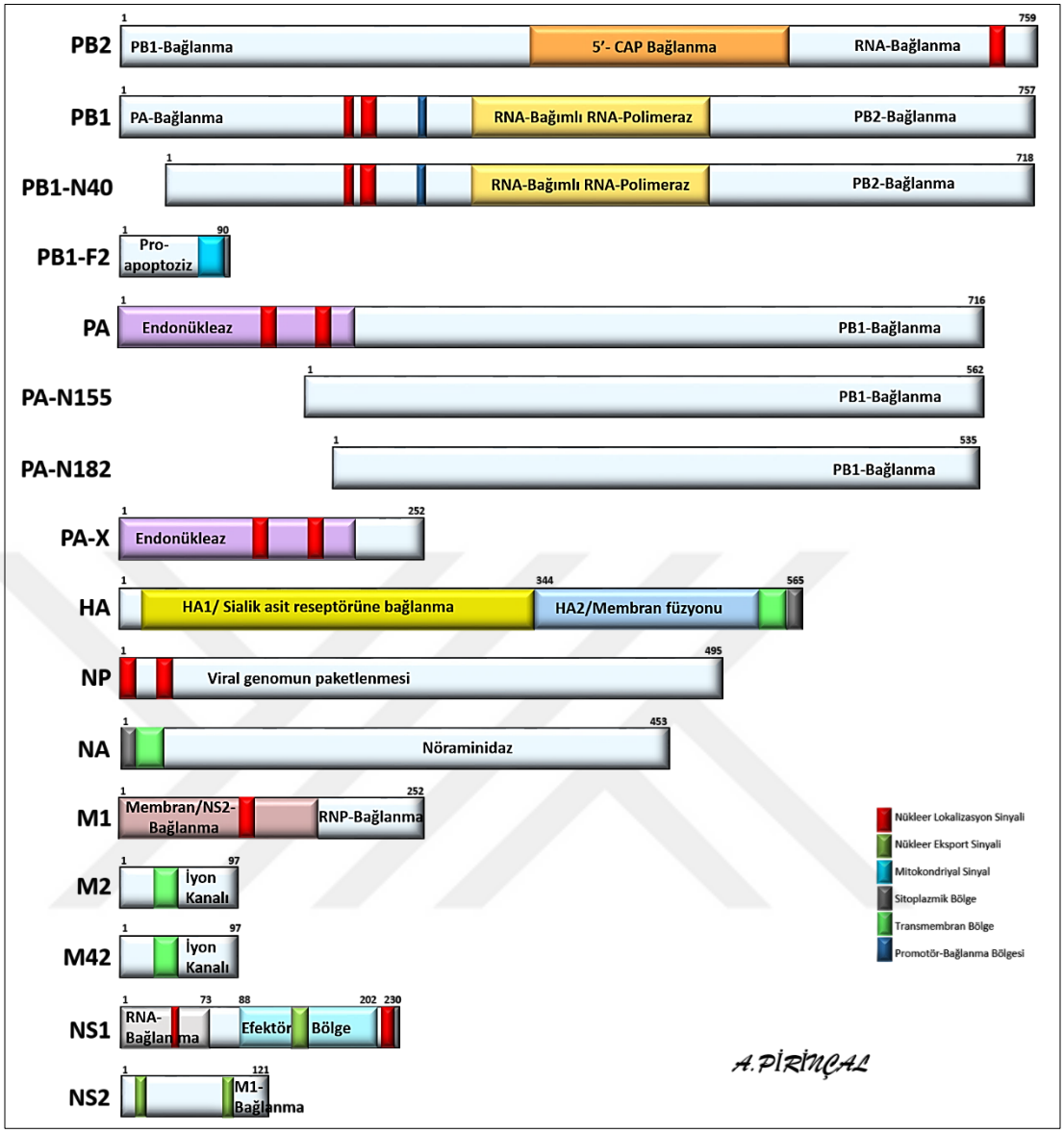
RNA polimeraz kompleksinin pandemik 1918-H1N1 virüsünün patojenitesinde rol aldıkları saptanmıştır (Watanabe ve ark., 2009).

NA proteini (*İng. neuraminidase*), altıncı viral RNA segmenti üzerinden sentez edilen virüsün bir diğer zarf glikoproteini ve yüzey antijenidir. Viral membran üzerinde homotetramerik yapıda bulunmaktadır (Bello, 2019). Her bir monomer 4 yapısal domain içerir: baş, sap, transmembran domain, sitoplazmik domain. Nöraminidaz (NA) proteini enzim aktivitesine sahip bir protein olup konak hücreden virüslerin ayrılmasında önemli rol üstlenmektedir (Gottschalk, 1957). NA proteini, sialik asit içeren glikoproteinlerden terminal sialik asit ve sialik asite komşu olan bir şeker (D-galaktoz veya D-galaktozamin) arasındaki α-glikozid bağının kesilmesini kataliz eder (Zhu ve ark., 2012). Viral serbestleşme esnasında, yeni virionların HA proteini konak hücrenin sialik asit reseptörlerine bağlanma eğilimi gösterir. Ancak NA proteini sialik asit bakiyelerini keserek virüsün enfekte hücreden ayrılmasını sağlar. Böylece bir hücreden diğerine viral yayılım sağlanmış olur (Matrosovich ve ark., 2004). NA proteini bu özelliğiyle birçok anti-viral ilaç geliştirme çalışmalarında hedef molekül olarak ele alınmıştır. Sialik asit analoğu olan Zanamivir, Oseltamivir, Peramivir ve Laninamivir kullanılan NA inhibitörleridir (Shobugawa ve ark., 2012; Doll ve ark., 2017). Bu anti-viraller hem influenza A hem de influenza B virüslerine karşı etkilidir (Burnham ve ark., 2015). H5N1 virüsü NA proteini mutasyonlarından biri olan H274Y (Histidin→Tirozin) değişikliğinin Oseltamivire karşı direnç geliştirici etki oluşturduğu saptanmıştır (Garcia-Sosa ve ark., 2008). Nöraminidaz solunum yollarındaki müsin tabakası üzerine etki ederek nöraminik asidi ayrıştırarak uzaklaştırır ve virüslerin HA proteini aracılığıyla konak hücrelere bağlanmasını kolaylaştırır (Ilyushina ve ark., 2012). NA proteini katalitik aktivitesi ile ayrıca, serbestleşen virüslerin solunum yolu epitelini kaplayan mukopolisakkaritlerin içinden geçişini sağlayarak virionların hücre yüzeyinde kümeleşmesinin önüne geçmektedir.

M1 proteini (*İng. matrix protein-1*), influenza A virüslerinin yedinci RNA segmenti üzerinden kodlanan 252 amino asit uzunluğunda bir proteindir. Viral zarfın altında yer alan Matriks proteini virion proteinlerinin yaklaşık %40'ını oluşturur ve bu yönüyle virüs partikülünde en fazla miktarda bulunan proteindir. Enfekte

hücrelerde hem nükleusta hem de sitoplazmada bulunmaktadır (Arzt ve ark., 2004). İşlevsel olarak M1 proteini, viral transkripsiyonun düzenlenmesinde ve NS2 proteini ile birlikte vRNP'lerin sitoplazmaya taşınmasında görev alır (Bui ve ark., 2000). Viral membran proteinlerinin (HA ve NA) sitoplazmik uçları ile interaksiyon göstermektedir (Elleman ve Barclay, 2004). Ayrıca viral kurulum ve serbestleşme aşamalarında self-oligomerizasyon ve vRNP-NP'ler ile interaksiyon göstererek önemli roller üstlenir. M1-M1 oligomerizasyonu, lipid membran altında viral matriks tabakasının oluşumunu sağlamaktadır (Noton ve ark., 2007). Amino-terminal (91-158. amino asit bakiyeleri) domainler arasında gerçekleşen oligomerizasyon, karboksi-terminal domainlerin aksine pH' ya bağlı olarak gerçekleşir ve asidik pH'da monomerik yapıya dönüşür (Zhang ve ark., 2012).

M2 proteini (*İng. matrix protein-2*), alternatif işlenme sonucunda M1 mRNA' ları üzerinden kodlanan farklı işlevlere sahip ikinci proteindir (Valcarcel ve ark., 1993). Doksan yedi amino asit içeren M2 proteini ektodomain, sitoplazmik uç ve transmembran domain olmak üzere üç bölgeden oluşur (Holsinger ve Lamb, 1991). Transmembran bölgede yer alan His37 ve Trp41 korunmuş amino asit bakiyeleridir (Takeuchi ve ark., 2003). M2 proteini homotetramerik formda virüs membranında yer alan iyon kanalı proteinidir (Pinto ve ark., 1992). Viral enfeksiyonun başlarında viral membran ile endozomal membranın füzyonunun ardından endozomdaki asidik ortam M2 iyon kanalının açılmasını ve virion içine proton girişini sağlar (Hsieh ve Hsu, 2007). Böylece M2 proteini, vRNP'lerin sitoplazmada serbest kalmasında rol oynar. Adamantan türevi bileşikler olan amantadin ve rimantadin sadece influenza A virüslerine ait M2 proteininin fonksiyonunu bozarak anti-viral etki gösterirler (Wang ve ark., 1993). Bu anti-viraller influenza A virüslerinin M2 kanalına bağlanarak iyon kanalını oluşturan bölgenin işlevini bozarlar. Ayrıca M2 proteini viral kurulum aşaması boyunca HA proteininin doğal konformasyonunu da stabilize eder (Takeuchi ve Lamb, 1994). M2 proteini ayrıca, Hsp40 proteini ile PKR proteinin birlikte kompleks oluşturmasını sağlayan $P58^{IPK}$ aktivitesini engelleyerek translasyonu inhibe eder, apoptoz mekanizmalarını aktive eder ve yeni oluşan viral partiküllerin konak hücreden kaçışını sağlar (Guan ve ark., 2010).



Şekil 2. İnfluenza A/WSN/1933-H1N1 virüs genomuna ait RNA segmentleri ve bu segmentlerden kodlanan viral proteinler. İnfluenza A/WSN/1933-H1N1 virüsü tarafından kodlanan proteinlere ait bilgiler *Influenza Research Database* (https://www.fludb.org, Erişim tarihi: 14.05.2021) ve *UniProt* (https://www.uniprot.org, Erişim tarihi: 14.05.2021) bilgi bankaları üzerinden elde edildi. Viral proteinlerin referans numaraları: ABF47965.1 (PB2), ABF47963.1 (PB1), ABF47964.1 (PB1-F2), ABF47962.1 (PA), ABF47955.1 (HA), ABF47959.1 (NP), ABF47958.1 (NA), ABF47956.1 (M1), ABF47957.1 (M2), ABF47960.1 (NS1), ABF47961.1 (NS2).

M42 proteini (*İng. matrix protein-42*), alternatif işlenme sonucunda yedinci viral segment üzerinden kodlanmaktadır (Wise ve ark., 2012). Yapısal olarak

bakıldığında *M* (Matriks protein) geni üzerinden 4 adet mRNA sentez edilir. mRNA-1 işlenmemiş transkripttir ve üç adet 5'-alternatif işlenme bölgesi taşır. 52. pozisyonda influenza A virüsü iyon kanalı proteini olan M2'nin kodlandığı mRNA-2 ve 146. pozisyonda M42 proteininin kodlandığı mRNA-4 bulunur (Jackson ve Lamb, 2008). M42 proteini, M2-benzeri bir protein olarak sadece membran topolojisinden sorumlu ektodomain bölgesinde bazı minör farklılıklar içermektedir. Bununla birlikte M2 proteinin aksine plazma membranında değil cis-Golgi'de lokalize olmaktadır. M2 ve M42 olmak üzere iki iyon kanalı proteininin eksprese edilmesi viral patojenite üzerine de etki etmektedir. 1983 yılında Kuzey Amerika'da görülen yüksek derecede patojenik kuş gribi (H5N2) salgını böylesi bir durumun sonucudur (Wise ve ark., 2012).

NS1 proteini (*İng. non-structural protein-1*), virüsün en küçük segmenti olan 8. segment üzerinden kodlanan virüsün yapısal olmayan proteinidir. Hücrelerde enfeksiyonun erken evrelerinde yüksek miktarda sentezlenen NS1 proteini yaklaşık 26 kDa ağırlığındadır. Bu protein virüs partikülünde saptanamamıştır (Ward ve ark., 1994).

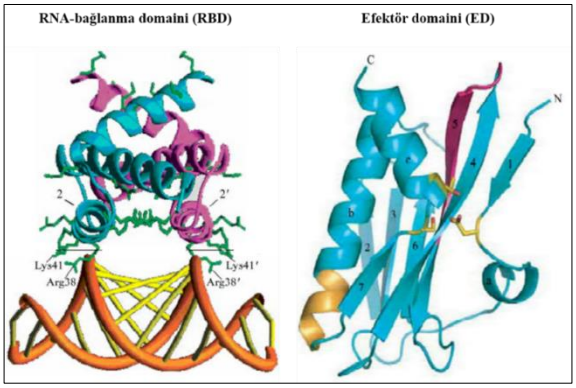
NS2 proteini (*İng. non-structural protein-2*), 8. segment üzerinden sentez edilen mRNA'larının alternatif işlenmesi sonucunda kodlanmaktadır (Dubois ve ark., 2014). NS2 proteini 121 amino asit bakiyesinden oluşmaktadır. İki adet nükleer çıkış sinyali (*İng. nuclear export signal-NES*) ve M1-bağlanma bölgesi içermektedir. Virüs partikülünde çok az miktarda bulunmaktadır (Enami, 1997). NS2 proteini vRNP'lerin nükleustan taşınmasında görev almaktadır. Bu nedenle NEP (*İng. nuclear export protein*) olarak da bilinmektedir (Shimizu ve ark., 2011). Bu taşınma olayında NS2 proteini, nükleer por kompleksi üzerinde bulunan bazı nükleoporin proteinler ile etkileşime girmektedir. Örneğin maya ikili-hibrit metodu ile yapılan çalışmalar sonucu belirlenen hNUP214 ve hNUP98 proteinlerinin hem maya hem de memeli hücrelerinde NS2 proteini ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Senbas Akyazi ve ark., 2020; Chen ve ark., 2010).

NS3 proteini (*İng. non-structural protein-3*), *NS* geni D125G (Aspartik asit→Glisin) mutasyonu *NS* geni üzerinde yeni bir alternatif işlenme bölgesi meydana getirir. Böylece alternatif işlenme sonucu *NS* geni üzerinden yaklaşık 20

kDa ağırlığında yapısal olmayan NS3 proteini kodlanır (Selman ve ark., 2012). NS3 proteininin oluşumuna sebep olan NS-125G (125-Glisin) mutasyonu içeren virüsler üzerinde yapılan filogenetik inceleme sonucunda bu mutasyonun yeni konak türlerinin oluşumuna olanak verdiği görülmüştür. Bu sebeple NS3 proteininin, konak populasyonlarında yeni bir patojenin varlığının tespiti için ideal bir işaret (marker) olabileceği fikri gündeme gelmiştir. Aynı zamanda sözkonusu mutasyonun viral patojenite üzerinde de etkisi olabileceği düşünülmektedir (Selman ve ark., 2012).

Bu tez çalışmasının konusu olan influenza A virüsü NS1 proteini virüsün en küçük segmenti (8. segment) üzerinden kodlanır (Lamb ve Choppin, 1979). Virionun yapısal komponenti olmayan fakat enfekte hücrelerde enfeksiyonun erken evrelerinde yüksek seviyede sentez edilen bir proteindir (Baranovskaya ve ark., 2019). NS1 proteini virüs tipine bağlı olarak bazı farklılıklar göstermektedir. İnfluenza A virüsü NS1 proteini (NS1A) yaklaşık 26 kDa ağırlığında olup genellikle 230 amino asit bakiyesinden oluşmaktadır (Palese ve Shaw, 2007). Ancak gerek 220. ve 231. pozisyondaki bitiş kodonlarını baskılayan gerekse yeni bitiş kodonunun oluşumuna neden olan mutasyonlar nedeniyle NS1 proteininin amino asit sayısında değişiklikler olabilmektedir. Örneğin, 1940'ların sonundan 1980'lerin ortalarına kadar dolaşımda olan insan influenza A virüslerinde NS1 proteini karboksi-terminal bölgede 7 amino asit (231-RRNKMAD-237) uzamış halde bulunmaktadır (Lohrmann ve ark., 2013). Buna karşın, pandemik 2009-H1N1 virüsünde ise NS1 proteini 219 amino asit bakiyesinden oluşmaktadır (Tu ve ark., 2011). Ayrıca influenza B virüsü NS1 proteininin (NS1B) ise 281 amino asit bakiyesi içerdiği bilinmektedir (Donelan ve ark., 2004).

NS1 mRNA'ları üzerinden alternatif işlenme mekanizmaları kullanılarak iki farklı protein sentez edilmektedir. Bunlar, NS2 (NEP) ve NS3 proteinleridir. NS1 ve NS2 mRNA'larının 5'-bölgesinde ilk 10 amino asiti kodlayan diziler ortaktır (Lamb ve Lai, 1980). Enfekte hücrelerde işlenmiş NS2 mRNA'sı miktarı işlenmemiş NS1 mRNA'nın yaklaşık %10'u kadarıdır (Lamb ve ark., 1980). Bu anlamda NS1 proteininin kendi mRNA'larının işlenme mekanizmalarını da düzenleyici bir görev üstlendiği düşünülmektedir.



Şekil 3. İnfluenza A virüsü NS1 proteini yapısı. NS1 proteini homodimer yapıda iki önemli domain içerir. RNA-bağlanma domain monomerlerinin herbiri üç α-heliksten oluşur ve Arg38-Lys41 bakiyeleri aracılığıyla çift zincirli RNA'ya bağlanma özelliği gösterir. Efektör domain ise herbiri 7 β-zinciri ve üç α-heliksden oluşan monomerden oluşur. NS1 proteini önemli hücresel proteinler ile interaksiyonunu efektör domain bölgesi aracılığıyla göstermektedir (Lin ve ark., 2007'den değiştirilerek kullanılmıştır).

NS1A proteini hem protein-protein hem de protein-RNA interaksiyonlarını içeren çok fonksiyonlu bir protein olarak tanımlanmaktadır (Hale ve ark., 2008). NS1 proteini taşıdığı fonksiyonel bölgeler aracılığıyla bazı önemli işlevleri hayata geçirebilmektedir. İnfluenza A virüsü NS1 proteini en az 4 ayrı domain içermektedir: ***i.*** NS1 proteininin 1-73 amino asit bakiyelerini kapsayan bölümü amino-terminal bölgesi. Bu bölge, proteinin dimerizasyonu ve çift zincirli RNA (dsRNA) moleküllerine bağlanması açısından oldukça önemlidir (Qian ve ark., 1995). RNA-bağlanma domaini (RBD) olarak da adlandırılan bu bölge düşük afinitede çeşitli RNA türlerine bağlanma özelliğine sahiptir. NS1 proteininin bağlandığı RNA'ların, viral enfeksiyon sonrası oluşan dsRNA, RNA moleküllerinin işlenmesinde rol alan protein/RNA (spliceosome) kompleksinin bir üyesi olan U6 snRNA ve adenin bazlarından oluşan poli-A yapısı olduğu rapor edilmiştir (Qiu ve Krug, 1994). NS1 proteini, RNA-bağlanma bölgesi ile çift zincirli RNA molekülüne bağlanma özelliği sayesinde konak hücre tarafından oluşturulan interferon yanıtlarını bloke ederek viral replikasyona katkı sağlanmaktadır (Basu ve ark., 2009). Ancak NS1 proteininin dsRNA molekülüne bağlanabilmesi için dimerik formda olması gerekmektedir (Wang ve ark., 1999). NMR ve X ışınlarıyla yapılan çalışmalarda NS1A amino-terminal (1-73 aa.) bölgesinin simetrik homodimer yapısında olduğu gösterilmiştir (Chien ve ark., 1997). Her bir monomer üç α-heliksten oluşmaktadır. Heliks

bakiyeleri Asn4-Asp24 (Heliks 1), Pro31-Leu50 (Heliks 2) ve Ile54-Lys70 (Heliks 3) şeklindedir. NS1A 1-73. amino asit bölgesindeki ikinci heliks dsRNA'ya bağlanma bölgesini içermektedir. Yapılan biyofiziksel deneylerle ikinci heliksteki bazik ve hidrofilik Arg38-Lys41 (R38-K41) bakiyeleri arasında bulunan yaklaşık 10 °A'luk boşluğun bir benzerinin dsRNA yapısındaki fosfat omurgasında da mevcut olduğu belirlenmiştir (Chien ve ark., 2004). Ayrıca R38-K41 bakiyelerinin alaninle değiştirildiği çalışmalarda NS1 proteininin RNA bağlanma aktivitesinin engellendiği saptanmıştır (Hale ve ark., 2008). İnfluenza B virüsü NS1 proteinlerine baktığında, NS1B 15-93. amino asit bölgesinde de dsRNA ile bağlanabilmeyi sağlayan aynı amino asit bakiyelerinin bulunduğu görülmektedir (Yin ve ark., 2007). Ayrıca NS1A amino-terminal bölgesinin farklı çift zincirli nükleik asitler ile etkileşim gösterip-göstermediği de araştırılmıştır. Elde edilen veriler, NS1A 1-73. amino asit bölgesinin A formundaki dsRNA'ya bağlanabildiğini ancak NS1 proteinin dsDNA (tip B) ve dsRNA-DNA hibritlerine (tip A-B) bağlanamadığını göstermiştir (Lin ve ark., 2007). NS1 proteininin amino-terminal bölgesi bazı interlökin proteinlerinin sentezi ile de ilişkilendirilmiştir. Bu bölgenin interlökin-1β (IL-1β) ve IL-18 sentezini inhibe ettiği belirtilmektedir (Stasakova ve ark., 2005). ***ii.*** RNA-bağlanma domaini (RBD) takiben, 10-15 amino asit uzunluğunda *Linker domain* (L) yer almaktadır. Oldukça esnek yapıda olan bu bölge, RBD ile efektör domain arasında bağlantıyı sağlamaktadır (Carrillo ve ark., 2014). ***iii.*** NS1A proteinin 88-202. amino asit bakiyelerini kapsayan bölümü karboksi-terminal bölgesidir. Efektör domaini (ED) olarak da adlandırılan bu bölge homodimer yapısındadır (Bornholdt ve Prasad, 2006). Her bir monomer 7 β-zinciri ve 3 α-heliksden oluşmaktadır. 6 β-zincir, merkezdeki en uzun heliksin etrafında bükülmüş durumdadır. NS1 proteinin bazı işlevlerini yerine getirmesi açısından karboksi-terminal bölge de önemli roller üstlenmektedir. Farklı influenza A virüsleri tarafından kodlanan NS1 proteinlerinin tamamında görülmese de bu bölgenin şu ana kadar bilinen en az 50 konak hücre proteinleri ile interaksiyonu tespit edilmiştir. Örnek olarak; CPSF30, PABPII, eIF4GI, RIG-I ve PKR verilebilir. Ayrıca efektör bölgenin IFN α/β sentezi, virüs ile enfekte makrofajlarda tümor nekroz faktör-α (TNF-α), IL-6 ve kemokin ligand-3 (CCL3) sentezinin düzenlenmesinde rol oynadığı düşünülmektedir (Newby ve ark., 2007). ***iv.*** Son olarak, 11-33 amino asit uzunluğundaki karboksi-terminal kuyruk

(CTT) bölgesi bulunur. Bu bölge ise virüs patogenezi açısından önemli olan PDZ-bağlanma motif yapısı içerir (Kim ve ark., 2014) (**Şekil 3**).

NS1 proteini influenza A virüsünün yapısal olmayan proteinidir. Enfekte hücrelerde yüksek seviyede nükleusta lokalize olurken özellikle enfeksiyonun ilerleyen evrelerinde sitoplazmada bulunmaktadır. NS1 proteininin nükleusa geçişi hücresel kargo proteini olan importin-α'ya bağlanarak nükleer lokalizasyon sinyalleri aracılığıyla gerçekleşir (Han ve ark., 2010). Virüs tipine bağlı olarak NS1 proteini bir veya iki nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) içermektedir (Greenspan ve ark., 1988). İnfluenza A/Udorn/72 NS1 proteini iki adet NLS içerirken (NLS1-NLS2) influenza A/WSN/33 NS1 proteininde ise sadece NLS1 bulunmaktadır. NLS1 tek parçalıdır ve dsRNA'ya bağlanma bölgelerini de içine alan R35-R38-K41 bakiyelerinden oluşur. NLS2 ise iki parçalıdır ve C-terminal bölgesinde K219-R220-R231-R232 amino asit bakiyelerini içerir. Ayrıca yapıda NLS2 ile aynı ve ek olarak R224-R229 bakiyelerini de içeren nükleolar lokalizasyon sinyal dizisi (NoLS) bulunmaktadır (Melen ve ark., 2007). NS1 proteininin sitoplazmik lokalizasyonu nükleer çıkış sinyalleri (*İng. nuclear export signal- NES*) sayesinde gerçekleşir. Nükleer çıkış sinyalleri 137-146 bakiyeleri arasında yer almaktadır. Yeni sentezlenen NS1 proteininin nükleer lokalizasyon sinyalinin maskelenmesi sonucu sitoplazmada alıkonulabileceği düşünülmektedir (Li ve ark., 1998). Ayrıca nükleer çıkış sinyalinde 138-141-144-146 bakiyelerinde meydana getirilen mutasyonların sonucunda NS1 proteinin enfeksiyonun geç evresinde dahi sitoplazmaya geçemeyip nükleusda biriktiği ve durumun viral replikasyonu inhibe ettiği gösterilmiştir (Tynell ve ark., 2014).

4.4. İnfluenza A Virüslerinin Replikasyonu

Konak hücrelerin influenza A virüsleri tarafından enfeksiyonu ve virüslerin replikasyonları farklı aşamalarda değerlendirilebilir. Bu aşamalar:

- Adsorpsiyon, hücreye giriş (penetrasyon) ve kot atma
- Viral mRNA sentezi ve viral RNA Replikasyonu
- Viral mRNA'ların post-transkripsiyonel modifikasyonları
- Translasyon ve viral proteinlerin post-translasyonel modifikasyonları

- Viral kurulum ve viral partiküllerin hücreden çıkışı

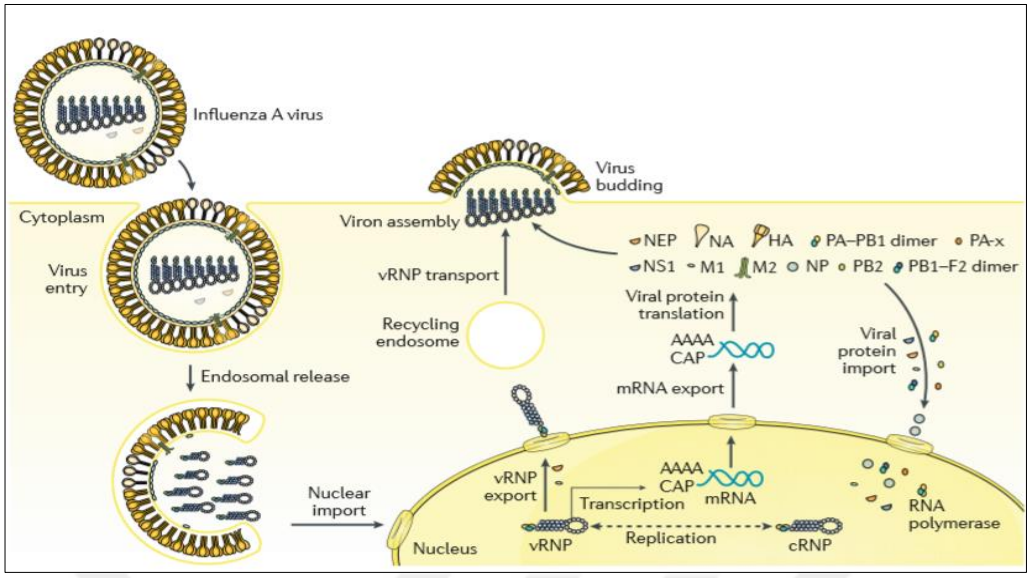
Virüslerin yaşam döngüsü ilk olarak konak hücre yüzeyine tutunmayla başlar (adsorpsiyon). İnfluenza A virüsleri konak hücre yüzeyinde yer alan N-asetil nöraminik asiti (sialik asit) tanır. Sialik asit, membran yüzeyinde oligosakkarit zincirinin en ucunda yer alan ve membrana negatif yük kazandıran asidik bir şekerdir. Oligosakkarit zincirinde yer alan sialik asit ve galaktoz arasındaki glikozit bağının tipi organizmaya göre değişiklik göstermekte ve bu durum da influenza virüslerinin konak özgüllüğünü belirlemektedir. Tutunma olayı virüsün HA proteininin konak hücre yüzeyindeki sialik asit bakiyesine bağlanmasıyla gerçekleşir (Skehel ve Wiley, 2000). Daha sonra virüs endositoz ile hücre içine alınır (penetrasyon). Virüs partiküllerinin endositoz ile hücre içine alınmasında reseptör-bağımlı mekanizmalar (klatherin-klavolin) kullanılır (Fujioka ve ark., 2011). Endozom içerisindeki asidik pH, viral replikasyon açısından önemli iki olayı tetikler (Li ve ark., 2014). Bunlardan birincisi; düşük pH, HA proteininde konformasyonel değişime neden olur ve viral membran ile endozom membranının füzyonunu sağlayacak füzyon peptitin açığa çıkmasını sağlar. Böylece viral membran ile endozom membranın kaynaşması gerçekleşir. İkincisi ise, endozomdaki asidik ortam virüsün M2 iyon kanalının açılmasını ve virion içine proton girişini sağlar (Schnell ve Chou, 2008). Bu durum viral membranın altında yer alan M1 proteinlerin oluşturduğu katmanın dağılmasına, M1-vRNP ilişkisinin bozulmasına ve vRNP'lerin matriks proteininden serbest kalmasına neden olur (Baudin ve ark., 2001). Viral membran ile endozom membran arasında gerçekleşen pH'ye bağlı füzyon ve por oluşumunun ardından vRNP'ler açılan bölgeden sitoplazmaya geçerek serbestleşirler (kot atma) (Stauffer ve ark., 2014).

Birçok RNA virüsü konak hücre sitoplazmasında replike olurken, influenza A virüsleri replikasyon ve transkripsiyon olaylarını hücre nükleusunda gerçekleştirmektedir (Shapiro ve ark., 1987). İnfluenza A virüsleri için nükleus hem 5'-CAP yapısı ve 3'-ucunda poli-A kuyruğu taşıyan viral mRNA'ların sentezlendiği (transkripsiyon) hem de yeni virüs partiküllerinin genomunu oluşturan vRNA segmentlerinin sentezlendiği (replikasyon) yerdir. Sitoplazmaya geçerek serbestleşen vRNP'lerin hücre çekirdeğine taşınması sahip oldukları özel nükleer

lokalizasyon sinyalleri ve hücresel importin-α/β aracılığıyla gerçekleşir. Viral RNA'ların transkripsiyonu ve replikasyonu viral RNA polimeraz kompleksi katalizörlüğünde gerçekleşir. Bu enzim virüsün üç polipeptidinin (PB2, PB1, PA) bir araya gelmesi ile oluşmuştur (Honda ve ark., 1988). Viral RNA'ların transkripsiyonu, konak hücre RNA polimeraz II enzimine bağımlıdır. Viral mRNA'ların sentez edilebilmesi için hücresel mRNA'ların 5′-ucundaki 7-metil guanozin şapka (5′-CAP) yapısı ile birlikte 10-15 nükleotid uzunluğunda bir bölgeyi primer olarak kullanır (Pflug ve ark., 2018). Böylelikle viral mRNA transkripsiyonu başlatılmış olur. Hücresel mRNA'lardan 5′-CAP yapısının kesiminde viral RNA polimeraz enzim kompleksinin PB2 ve PA alt üniteleri görev almaktadır (Guilligay ve ark., 2008; Dias ve ark., 2009). PB2 proteini RNA polimeraz II enzimi tarafından sentez edilen mRNA'ların 5′-CAP yapısına bağlanırken, PA proteini endonükleaz aktivitesi ile hücresel mRNA'lardan 5′-CAP başlığının kesimini gerçekleştirir. Viral mRNA'ların nükleustan sitoplazmaya geçebilmesi için 3′-ucunda poli-A kuyruğu taşıması gerekmektedir. Spesifik bir poli-A polimeraz enzimi ile poliadenilasyon gerçekleştiren hücresel mRNA'ların aksine, viral mRNA'ların poliadenilasyonu virüsün kendi mekanizmaları aracılığıyla gerçekleşir. Negatif polariteli vRNA'nın 5′-ucundaki kodlanmayan bölgesinde poli-A sinyali olarak görev yapan 5-7 adet urasil molekülü bulunur (Lewandowski ve ark., 1971). Bu uzantılar viral RNA polimeraz tarafından pozitif polariteli mRNA'ya transkribe edilirken adenin molekülleri ile eşleştirilir. Böylece poli-A kuyruğu şekillenmiş olur. 5′-CAP ve 3'-poli-A kuyruğu taşıyan pozitif polariteli viral mRNA'lar, viral proteinlerin sentezi için sitoplazmaya taşınır. Viral RNA'ların replikasyonunda ise öncelikle negatif polariteli viral RNA'lar üzerinden komplementer kopya RNA'lar (cRNA) sentezlenir (Zhang ve ark., 2010). Bu RNA molekülleri ara bir molekül olup vRNA'ların tam bir kopyasıdır. 5′-CAP yapısı ve 3′-poli-A kuyruğu taşımazlar. Virüsün RNA polimeraz enzimi katalizörlüğünde, yeni oluşacak vRNA'lar cRNA kalıpları üzerinden sentez edilir. İnfluenza virüslerinde tek bir replikasyon döngüsü yaklaşık 4-6 saatte tamamlanmaktadır. Sitoplazmaya taşınan mRNA'ların ribozomlardaki translasyonu sonucunda viral proteinler sentezlenir. Sentezlenen viral proteinler görevleri ile ilişkili olarak hücrede yeniden konumlanırlar. Öncelikle PB2, PB1, PA ve NP proteinleri nükleusa taşınarak yeni sentezlenen genomun vRNP şeklinde

paketlenmesini sağlarlar. Ayrıca RNA polimeraz enziminin alt üniteleri de viral RNA polimeraz enzim kompleksini oluştururlar. Sitoplazmada sentez edildikten sonra çekirdeğe taşınan M1 ve NS2 (NEP) proteinleri ise yeni oluşan vRNP'lerin çekirdekten sitoplazmaya taşınmasını düzenlemektedirler. Viral membranda yer alan HA, NA ve M2 proteinlerinin sentezi endoplazmik retikuluma bağlı ribozomlar tarafından tarafından gerçekleştirilir. Bu viral proteinler endoplazmik retikulumdan sonra post-translasyonel modifikasyon için golgi kompleksine taşınırlar (Schuy ve ark., 1986; Sakaguchi ve ark., 1996). Virüsün membran proteinleri olan HA, NA ve M2 proteinleri golgide glikozillendikten sonra özel sinyaller aracılığı ile kurulum için hücre membranına yönelirler. M1 proteini ayrıca vRNP-NEP kompleksini hücre zarına yönlendirir ve HA, NA ve M2 proteinleriyle bir araya gelmelerini sağlayarak virüsün kurulması işlemini başlatır. İnfluenza A virüsleri 8 segmentten oluşan tam bir genom içermedikleri sürece enfektif özellikte değildirler. Bu sebeple yaşam döngüsü içinde viral paketlenme son derece önemli bir aşamadır. Paketlenme ile ilgili ilk düşünceler vRNA segmentlerinin virion içerisinde rastgele bir şekilde paketlendiği şeklindeydi. Ancak daha sonra segmentlerin virion içine seçilerek yerleştirildiği ve vRNA'nın kodlama yapmayan 3′ ve 5′ bölgelerindeki sis-etkili (cis-acting) sinyallerin paketleme de rol oynadığı ileri sürülmüştür (Noda, 2015; Noda, 2020).

Konak hücre yüzeyinde influenza virüsünün tomurcuklanması M1 matriks proteininin konak hücre sitoplazmik membranının altında birikmesiyle başlar. Tomurcuklanma işlevi tamamlandığında viral membran üzerindeki HA proteinleri virionların hücre yüzeyindeki sialik asitlere bağlanmaya devam eder. Bu aşamada NA proteini, hücre membranındaki sialik asit bakiyelerini keserek HA proteinin sialik asite yapışmasını önler. Böylece virüsün enfekte hücreden diğer hücrelere geçişine olanak sağlar. İlave olarak NA proteini solunum yolu mukozasında bulunan sialik asit bakiyelerini de keserek virüsün epiteli kaplayan mukopolisakkaritlerin içinden geçişini de kolaylaştırmaktadır (Samji, 2009; Watanabe ve ark., 2010) (**Şekil 4**).



Şekil 4. İnfluenza A virüslerinin yaşam döngüsü (Krammer ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.5. İnfluenza A Virüslerinde Antijenik Çeşitlilik Mekanizmaları

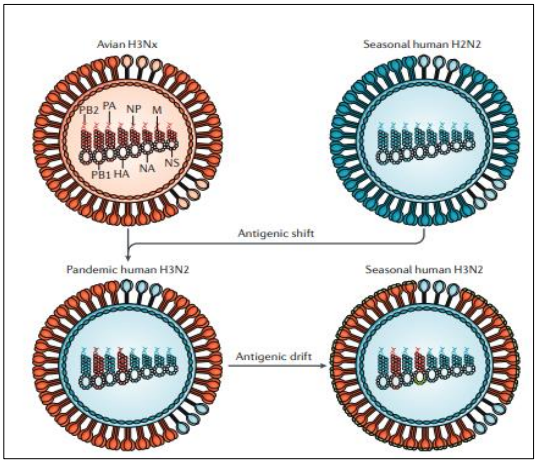
İnfluenza A virüsleri farklı mekanizmalar ile antijenik değişikliğe uğramaktadırlar. Bu mekanizmalardan yaygın olanları şöyle sıralanabilir:

- RNA polimeraz enzimi hatalarından kaynaklanan değişiklikler
- Parçalı genom yapısından kaynaklanan değişiklikler
- RNA rekombinasyonu
- Glikozilasyon

RNA polimeraz hatalarından kaynaklanan değişiklikler, minör değişiklikler olup antijenik sapma (*İng. antigenic drift*) olarak tanımlanmaktadır. İnfluenza virüsleri negatif iplikli RNA molekülü içerdiklerinden, konak hücrede mRNA'larını sentezleyebilmek için virion içinde RNA bağımlı-RNA polimeraz enzimi taşımaktadır. Virüse ait bu viral RNA polimeraz enziminin hata oranı oldukça yüksek olmakla birlikte oluşan hataları düzeltme (*İng. proof-reading*) yeteneği de bulunmamaktadır (Couch, 1996). Her yıl influenza A virüs proteinlerine ait aminoasit dizisinin yaklaşık % 0,18–0,21'i viral polimeraz enziminin hatalarından dolayı değişime uğramaktadır (Belanov ve ark., 2015). Dolayısıyla virüsün her replikasyonunda virüs genomunun çeşitli segmentlerinde nokta mutasyonlar oluşur.

Bu mutasyonların büyük çoğunluğu nötraldir ve proteinlerin konformasyonunda herhangi bir değişikliğe neden olmazlar. Ancak bazı mutasyonlar, konak antikorlarının bağlanmalarını etkileyecek şekilde virüsün özellikle HA ve NA yüzey antijenlerinde değişikliklere neden olurlar (Schweiger ve ark., 2002). Sonuç olarak, bir önceki dolaşan suşlara karşı geliştirilmiş veya aşılanma ile sentezi uyarılmış antikorlar, antijenik değişime uğramış yeni karakterli enfeksiyon etkeni virüslere karşı koruma sağlayamazlar. Antijenik drift influenza virüsü A, B ve C tiplerinde görülür ve epidemilere yol açar.

Parçalı genom yapısından kaynaklanan değişiklikler, majör değişiklikler olup antijenik kayma (*İng. antigenic shift*) veya yeniden düzenlenme (*İng. reassortment*) olarak tanımlanmaktadır. Aynı anda en az iki farklı influenza A virüsü ile enfekte bir konak hücresinde virüs alt tiplerinin segmentleri arasında değişimler meydana gelmektedir. Kurulum aşamasında bu segmentler gelişigüzel bir araya gelerek yeni virüs partikülü halinde paketlenir. Genetik karışım ile viral antijenlerin tamamen değişimi sonucu viral gen segmentleri yeniden düzenlenmiş olur ve yeni virüs tipleri oluşur (Nakajima, 2003). Yeni alt tipte eski suşa göre % 20-50 oranında farklı bir aminoasit içeriği bulunabilir. Sadece tip A virüslerinde görülen antijenik kaymalar insan popülasyonu için daha önceden bağışıklık geliştirmediği için hastalık hızla yayılarak pandemi seviyelerine ulaşır. 1918-1919 İspanyol gribi (H1N1) olarak tanımlanan pandeminin bu şekilde oluştuğu ve *HA, NA ve PB1* genlerindeki değişimle birlikte virüsün yüksek virulansa sahip olduğu düşünülmektedir (**Şekil 5**).



Şekil 5. İnfluenza A virüslerinde antijenik kayma (antijenik shift) ve antijenik sapma (antijenik drift) (Krammer ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır).

RNA rekombinasyonu, farklı suşların RNA segmentlerinden parçaların rekombinasyonu şeklinde olabildiği gibi iki farklı RNA segmentinden parçaların rekombinasyonu halinde de gelişebilir. Homoloji göstermeyen rekombinasyonlar daha yaygın olarak görülmektedir (Orlich ve ark., 1994). RNA rekombinasyonlarının en önemli sonucu, virüsün patojenitesinde değişmelere yol açarak düşük patojeniteli bir suşu daha yüksek patojeniteye sahip suşa dönüştürebilmesidir (Suarez ve ark., 2004).

Glikozilasyon, transmembran proteinlerin çoğunda görülen glikozillenmiş protein oluşturma sürecidir. Glikoproteinlerin yapılarında yer alan karbohidratlar genellikle O- ve N-bağlı oligosakkaritlerdir. İnfluenza virüsü yüzey antijenlerinden HA monomerlerinin küresel bir yapı gösteren baş kısmı ve sap bölümünde oligosakkaritler yerleşik durumdadır. Glikozilasyonun HA proteinin işlevsel özelliklerini etkilediği düşünülmektedir. Farklı kuş tipi influenza A (H1N1) virüslerindeki glikozilasyon kalıplarının klasik reseptör bağlanma yeteneklerini etkilediği hatta değiştirdiği yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Mishin ve ark., 2005; Chen ve ark., 2012).

4.6. İnfluenza A Virüslerinin Epidemiyolojisi

Mevsimsel grip, influenza A virüslerinin neden olduğu bir üst solunum yolu enfeksiyonudur ve her sene kış aylarında mevsimsel salgın yaparak milyonlarca kişinin hastalanmasına neden olur. Dünya Sağlık Örgütü (DSÖ) verilerine göre, mevsimsel grip epidemilerinde her yıl dünya nüfusunun yaklaşık %10'u (ortalama 1 milyar insan) influenza A veya B virüsleri tarafından enfekte olmaktadır. Bunların yaklaşık 3-5 milyonu şiddetli hastalık seviyesinde olup 300.000-500.000 arasında insan ise hayatını kaybetmektedir (Rosario-Ferreira ve ark., 2020). İnfluenza virüsünün insidans ve mortalite özelliklerine ilave olarak enfeksiyonların büyük bir ekonomik maliyet getirdiği de görülmektedir. Dünya çapında yapılan istatistikler her yıl hastanede tedavi için 3 milyar doların üzerinde harcama yapıldığını göstermektedir (Molinari ve ark., 2007). İnfluenza A virüsü pandemilerinin dünya genelindeki mali etkisi ise ortalama 3 trilyon dolara kadar çıkabilmektedir (Zambon, 2014). Örneğin, son yıllarda görülen kuş gribi (H5N1) ve domuz gribi (H1N1)

pandemilerinden etkilenen ülkelerin 80 milyar dolardan fazla harcama yaptıkları bilinmektedir.

İnfluenza A virüslerinin doğal kaynağı yabani kuşlardır. Ancak bu virüsler insan, evcil kuşlar, domuz, at, sığır, deniz memelileri gibi çok geniş konak özgüllüğü göstermektedir (Long ve ark., 2019). İnfluenza virüslerinin konak özgüllüğünü, virüsün HA proteini ve hücre yüzeyi reseptörleri olan sialik asit moleküllerinin galaktoz ile bağlanma bölgesi belirlemektedir. İnfluenza A virüslerinin HA proteini sialik asit içeren konak hücre reseptörlerine virüsün tutunmasından sorumludur. İnsan influenza A virüsleri HA proteini, üst solunum yolları epitel hücrelerinde α-2,6 glikozit bağları ile bağlı sialik asit bakiyelerine bağlanırken; alt solunum yolları epitel hücrelerinde ise α-2,3 glikozit bağları ile bağlı sialik asit bakiyelerine bağlanır. İnsanda hastalık yapan influenza suşları daha çok SA α-2,6 galaktoz reseptörüne bağlanmayı tercih etmektedir. Kanatlı kaynaklı influenza ırkları galaktoza α-2,3 gikozit bağı ile bağlı olan sialik asit bakiyelerine güçlü bir şekilde bağlanabilmektedir. Kuş tiplerinin insana geçişi sınırlı olup insanda zayıf replikasyon gösterirler. Buna karşın H5N1 gibi kuşlardan insanlara bulaşan influenza A virüsleri insan sağlığı açısından çok daha büyük riskler taşımaktadır. Domuzlar, epitel hücrelerinin hem α-2,6 hem de α-2,3 glikozit bağları ile bağlı sialik asit bakiyeleri taşıması nedeniyle aynı anda farklı virüs ırkları ile enfekte olabilme özelliğine sahiptir. Bu özellik rekombinasyona uğramış yeni virüs tiplerinin ortaya çıkmasında domuzları uygun bir konak haline getirmektedir (Broszeit ve ark., 2019).

İnfluenza A virüsleri mevsimsel epidemilere ve kimi zamanda dünya ölçeğinde yaygın, şiddetli pandemilere neden olmaktadırlar (Cunha, 2004). Tarihte ilk grip salgını, M.Ö. 412 yılında Hipokrat ve Livy tarafından 'öksürüğü takiben gelişen pnömoni salgını' şeklinde tanımlanarak bildirilmiştir (Kuszewski ve Brydak, 2000). Bununla birlikte influenza virüslerinin gerçek anlamda tanımlanması XVI. yüzyılda İngiliz doktor Caius tarafından 'ter hastalığı' olarak 1551 yılında yapılabildi (Hunter, 1991). 1580 yılında Avrupa'da köken alıp Afrika'ya da yayılarak kıtasal atlama yapan salgın bilinen ilk influenza pandemisidir (Potter, 2001). Ancak elimizde kayıtların ve bigilerin olduğu 20. yüzyılın ilk pandemisi 1918-1919 yıllarında yaşanmıştır (Smith ve ark., 2009). Amerika Birleşik Devletleri'nde başlayan ve savaş

döneminde askerlerin Avrupa'ya hareketleri aracılığıyla kolayca Avrupa'ya da yayılan bu salgında dünya nüfusunun 1/3'ünün etkilendiği ve yaklaşık 40-50 milyon kişinin hayatını kaybettiği belirtilmektedir (Morens ve Taubenberger, 2018). O dönemde ülkeler savaş halinde olduklarından en iyi dökümantasyonu İspanya yaptığı için tarihe İspanyol gribi olarak geçen bu salgında etkili olan influenza A virüs tipi H1N1'dir (Taubenberger ve Morens, 2006). Yaklaşık olarak 1 milyonun üzerinde can kaybına neden olan 1957-1958 yıllarında Asya gribi (influenza A H2N2) ve 1968-1969 yıllarında Hong Kong gribi (influenza A H3N2) geçen yüzyılın diğer pandemileridir. Ayrıca 1977–1978 yıllarında daha önce ortaya çıkan influenza A H1N1 virüsleri Rus gribi olarak da adlandırılan yeni bir salgına yol açmıştır (Beveridge, 1991). Bu yüzyılın ilk pandemisi ise 2009 yılında yaşanmıştır. Şubat-mart aylarında Meksika'da ortaya çıkan, nisan ayında ABD'de tanımlanan ve hızla dünyaya yayılan "domuz kaynaklı influenza A (H1N1)" virüsü yeni bir pandemiye neden olmuştur (Morens ve ark., 2010). Bu pandemi dünya genelinde 212'den fazla ülkede milyonlarca grip olgusuna ve en az 16 bin kişinin ölümüne neden olmuştur. Ülkemizde salgının hızı Kasım 2009'da zirveye ulaşmış ve Sağlık Bakanlığı verilerine göre Türkiye genelinde yaklaşık 6,5 milyon kişinin enfekte olduğu ve 656 kişinin de hayatını kaybettiği belirtilmiştir.

20. ve 21. yüzyılların başlarında pandemiye neden olan influenza A (H1N1) virüslerinin genetik olarak analizleri ve muhtemel benzerliklerinin araştırıldığı bazı çalışmalar hayata geçirilmiş ve bazı çarpıcı sonuçlar elde edilmiştir. Buna göre; 2009 yılında ortaya çıkan H1N1 virüsünün üç farklı influenza virüsünden özellikler taşıdığı ayrıca 1918-H1N1 virüsünden gelen bazı yapıları da içerecek şekilde benzerliklere sahip olduğu gösterilmiştir. 2009-H1N1 virüsünün segment analizinde; PB2 ve PA segmentlerinin Kuzey Amerika domuz gribi virüsü (H3N2); PB1 segmentinin 1968 yılında kuşlardan insanlara geçen H3N2 virüsü; HA, NP ve NS segmentlerinin Kuzey Amerika'da bulunan domuzlarda grip etkeni olan H1N1 virüsünden ve son olarak NA ve M segmentlerinin ise Kuzey Amerika'da kuşlarda enfeksiyona neden olan ve 1979 yılından itibaren Avrupa ve Asya'da domuzlarda viral etken olarak devam eden virüsler ile ilişkili olduğu gösterilmiştir (Medina ve Garcia-Sastre, 2011).

4.7. İnfluenza A Virüslerine Karşı Konak Hücre Tarafından Oluşturulan Doğal İmmün Yanıtlar

Doğada en basit yapılı organizmadan en kompleks organizmaya kadar tüm canlı sistemler, kendi kalıtsal yapılarına yabancı olan bütün maddelere karşı sistemli bir şekilde tepkiler geliştirmektedirler. Örneğin, arkea ve bakteriler kendilerini bakteriyofajlardan, arkeal virüslerden veya plazmit gibi yabancı DNA moleküllerinden korumak için restriksiyon-modifikasyon sistemi, CRISPR/Cas9 sistemi olarak tanımlanan savunma mekanizmaları geliştirmişlerdir (Bikard ve Marraffini, 2012). 2000'lerin başında keşfi gerçekleşen CRISPR/Cas9 sistemi ile, fajlar tarafından enfekte edilen bakteriler konak Cas9 enzimleri ile viral DNA moleküllerini keserler. Bakteriler bu DNA parçalarını kendi genetik yapısına bir düzen içinde bulunan diziler arasına aktararak virüs DNA'sını hafızasında tutar. Böylece bakteriler aynı virüs tarafından tekrar enfekte edildiği zaman virüse karşı daha hızlı bir savunma gerçekleştirir (Gasiunas ve ark., 2012). Bu anlamda CRISPR/Cas9 sistemi, arkea ve bakterilerin kazanılmış bağışıklık sistemlerinin bir parçası olarak düşünülebilir. Yüksek yapılı organizmalarda ise doğal (innate) bağışıklık ve kazanılmış (edinsel, adaptif) bağışıklık yanıtları olarak adlandırılan bu tepkiler, özelleşmiş işlevlere sahip farklı doku, hücre ve moleküllerden oluşan karmaşık bir yapıya sahiptir.

Doğal bağışıklık yanıtları, viral enfeksiyonlara karşı ilk olarak geliştirilen hızlı ancak spesifik olmayan immün yanıtların oluşturulduğu mekanizmaları içermektedir. Viral enfeksiyonun ortalama 0-4 saatlik zaman diliminde gelişen yanıtlardır. Doğal (spesifik olmayan) bağışıklık sistemi en genel çerçevede anatomik engeller, hücresel yapılar ve salgı molekülleri (sitokinler, kompleman sistemi) olarak bileşenlerine ayrılabilir (Goraya ve ark., 2015).

4.7.1. İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı ilk doğal koruma bariyeri: Anatomik engeller

Anatomik bariyerler; vücudun normal yapısal elemanlarını ve fizyolojik olaylarını içeren doğal bağışıklığın birinci safha koruma yollarıdır. Mukoza başta olmak üzere deri, lizozimleri içeren ter ve gözyaşı, mide ve terin düşük pH'sı,

öksürme, hapşırma vb. olarak sıralayabileceğimiz anatomik bariyerlerin en temel görevi patojenlerin vücuda girişini ve yayılmasını önlemektir (S, 1950; Beppu ve ark., 1997).

İnfluenza A virüsleri primer olarak ağız, burun veya mukozal yüzeylerden erişim sağlayarak solunum yolu epitel hücrelerini hedef alan grip etkenine sahip virüslerdir. Dolayısıyla nazal açıklıklar ve üst solunum yolu, influenza A virüslerinin insanlarda enfeksiyon için ana giriş yerleridir. Epitel hücreler viral enfeksiyonlardan solunum yollarını korumak için mukozal bir tabaka oluştururlar. İnfluenza A virüslerine karşı geliştirilen bu ilk savunma, solunum yolu lenfoid dokularından ve immünoglobulinlerden oluşur. İnfluenza A virüs enfeksiyonu sırasında, mukozal sekresyonlarda enfeksiyonu sınırlamak için üç ana immünoglobulin grubu (IgG, IgA ve IgM) bulunmaktadır (Li ve ark., 2014). IgA ve IgM, IgG tipinden daha fazla miktarlarda bulunmaktadır. SalgısaI IgA ve IgM viral girişi önlemek için mukozada bulunan nötralizan antikorlardır. SalgısaI IgA mukozal yüzeyde vücut salgılarında bulunan primer izotiptir. IgA, viral patojeni mukozal bariyeri geçmeden ve hücreleri enfekte etmeden önce engeller. Virüsün epitel hücre reseptörlerine bağlanmayı sağlayan HA proteinini ve enzim aktivitesiyle mukozalar üzerindeki müsin viskozitesini azaltmayı sağlayan NA proteinini nötralize eder. Böylece viral yüzeyi kaplayarak influenza virionlarının hücrelere tutunmasını ve girişini engeller. IgM ise pentamerik yapısıyla antijenleri ağ gibi sararak aglütine eder (Murphy ve Clements, 1989).

4.7.2. İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı geliştirilen hücresel savunmalar

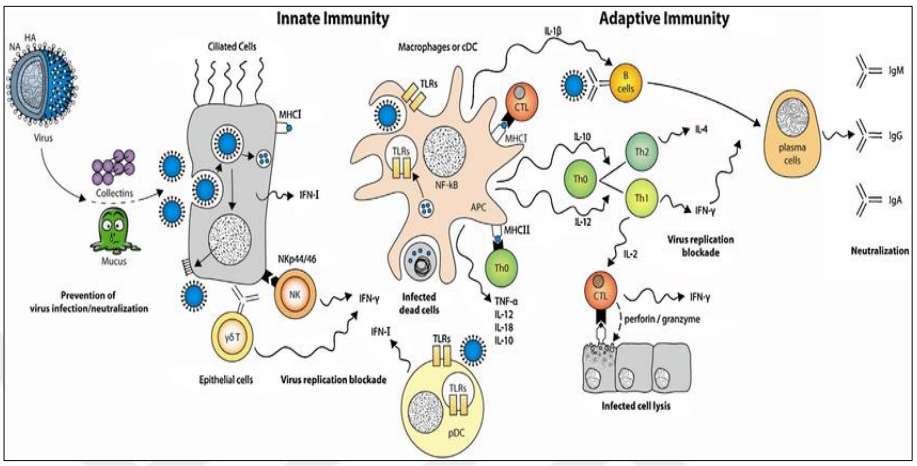
Vücudun doğal bariyerlerini aşan patojenler, bir sonraki aşama olarak doğal bağışıklık yanıtı hücreleri tarafından oluşturan bir savunma mekanizması ile karşılaşırlar. Savunmada görev alan tüm hücre tiplerinin viral replikasyonu sınırlamak ve ayrıca antijen-spesifik immünite ve hafıza için adaptif immün cevabı başlatmak için enfekte hücreler ile etkileşme mekanizmaları kendilerine özgüdür (**Şekil 6**).

Solunum yolu epitel hücreleri (Tip I ve Tip II pnömositler), influenza virüslerinin ilk hedefi olan hücre grubudur. İnfluenza A virüsleri, ilk doğal koruma bariyeri olan mukus tabakasından geçtikten sonra solunum yolu epitel hücrelerini hedeflemektedir. İnfluenza A virüsünün, solunum yolu epitel hücresindeki başlıca tutunma alanı hücre yüzeyinde bulunan sialik asit (SA, N-asetilnöraminik asit) reseptörleridir. Bu reseptörler influenza A virüslerinin konak tercihinde etkili olmaktadırlar. İnsanda hastalık yapan influenza suşları daha çok SA-α-2,6 galaktoz reseptörüne bağlanmayı tercih etmektedir. Solunum yolu epitel hücreleri anti-viral ve kemotaktik moleküller üreterek immün cevap oluşumunu başlatırlar. İnsanda infuenza A virüsüne karşı cevap olarak Tip II alveolar hücreler tarafından Tip III IFN (interferon), bronşial epitel hücrelerden ise Tip I IFN sentezlenir. Solunum yolu epitel hücrelerinde Tip I IFN cevabının artması influenza enfeksiyonunun sınırlanması için önemli ve kritik bir basamak olarak kabul edilmektedir (Seng ve ark., 2014). Kuş tipi H5N1 influenza virüsünün Tip I IFN üretimini bozması nedeniyle şiddetli virülansa sahip olarak daha ağır enfeksiyon tablosuna yol açtığı gösterilmiştir (Chan ve ark., 2010). IFN-aracılı anti-viral cevaba ilave olarak influenza virüs enfeksiyonu epitel hücrelerinden çeşitli sitokinler ve kemokinlerin de (IL-1β, IL-6, TNF-α, IL-8/CXCL8, CXCL10, CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1α), CCL5, CXCL10 (IP-10)) salgılanmasına neden olmaktadır (Chan ve ark., 2005).

Nötrofiller insan kanında en fazla miktarda bulunan lökositlerdir. Fagositik hücre sınıfında yer alır ancak antijen sunumu yapamazlar. Viral enfeksiyon alanına en hızlı ulaşan hücrelerdir. Dokuda yerleşik olan makrofajlarla birlikte hücresel savunmanın ilk aşamasında yer almaktadırlar. Nötrofillerin influenza virüslerini fagosite ederek virüsün çoğalmasını ve yayılmasını kontrol ettiği gösterilmiştir (Fujisawa, 2001). Nötrofiller ayrıca enfeksiyon bölgesine influenza virüslerine özgü CD8+ T hücrelerini yönlendirerek kazanılmış bağışıklığı da düzenlemektedir (Robinson ve ark., 2014).

Monositler kemik iliğinde üretilip kan dolaşımına katılırlar. İnfluenza virüsü ile enfekte olmuş kişilerin nazal mukozasında ve periferik kanında çok sayıda bulunan koruyucu hücrelerdir. Enfekte farelerde, Tip I IFN sinyallerinin kök hücrelerin CCL2 üreten monositlere farklılaşmasını arttırdığı gösterilmiştir (Seo ve

ark., 2011). Enfeksiyon alanında toplanan monositler makrofajlara dönüştükleri gibi monosit-kökenli dendritik hücrelere de (moDH) farklılaşabilmektedir (Cao ve ark., 2012). *İn vitro* çalışmalarda, insan monositlerinin influenza virüsleri ile enfeksiyonu sonucunda TNF-α ve GM-CSF sekresyonunun arttığı ve böylece monositlerin hızlıca dendritik hücrelere dönüşmesinin sağlandığı gösterilmiştir (Hou ve ark., 2012).



Şekil 6. İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı geliştirilen immün yanıtlar (Crisci ve ark., 2013'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Makrofajlar hem dokuda bulunan alveolar makrofajlardan hem de dolaşımdan enfeksiyon bölgesine ulaşan monositlerin farklılaşması ile oluşan hücrelerdir. Makrofagositler olarak da adlandırılmaktadır. Viral enfeksiyonun erken evresi, alveolar makrofajları ve monositleri aktifleştirerek TNF-α ve IL-6 gibi pro-inflamatuar sitokin cevapların oluşumunu sağlar. Alveolar makrofajlar, influenza virüsü ile enfekte apoptotik hücreleri fagosite ederek ya da influenza virüs partiküllerinin fagosit aracılı opsonofagosite ederek viral yayılımın sınırlandırılmasında kritik rol üstlenmektedir (Hashimoto ve ark., 2007; Herold ve ark., 2008). Ayrıca kazanılmış immün cevapların düzenlenmesinde de görev alırlar. İnfluenza A virüsleri için uygun konak olan domuzlarda yapılan bir çalışmada, alveolar makrofajların yokluğunda, influenza virüs replikasyonun arttığı ve hastalığın daha ağır şiddette hatta mortalite ile sonuçlandığı bu sebeple akciğerlerde alveolar makrofajların viral yayılımın kontrolü açısından vazgeçilmez oldukları gösterilmiştir (Kim ve ark., 2008).

Dendritik Hücreler (DC), fagositik hücre sınıfında yer alan ve antijen sunan hücrelerdir (*İng. antigen-presenting cells, APC*). Dendritik hücreler doğal immün sistemin önemli bir bileşeni olmanın yanında ayrıca kazanılmış (edinsel) bağışıklık cevaplarının başlatılmasını sağlayan hücrelerdir. Doğal bağışıklık sistemi ve edinsel bağışıklık sistemi arasında haberci olarak hareket ederler (Steinman ve Hemmi, 2006). İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarında, viral antijenler dendritik hücreler tarafından Th (yardımcı T) ve Tc (sitotoksik T) hücrelerine getirirler. Uyarılan Tc lenfositler özgül olarak bağlandığı virüsle enfekte hücreyi lizize yol açarak öldürür. Th hücreleri ise IFN-γ ve TNF-β gibi sitokinleri salgılayarak sitotoksik T lenfositlerince gerçekleştirilen hücre ölümlerinin kapasitesini arttırırlar (Guermonprez ve ark., 2002). Salgılanan sitokinler ayrıca B lenfositlerini de aktive ederler. Böylece virüse özgü antikor sentezi gerçekleştirilerek humoral yanıt da oluşturulur.

Doğal Öldürücü Hücreler (*İng. Natural Killer, NK*), doğal immün sistemin önemli sitotoksik lenfositleridir. Lenfositlerin yaklaşık %10'nunu oluştururlar. İnsan NK hücreleri NKp30, NKp44 ve NKp46 doğal sitotoksik reseptörlerine sahiptir. Bu reseptörler virüs veya tümör ilişkili moleküllerin tanınmasını ve NK hücrelerin aktivasyonunu sağlarlar. İnfluenza virüsleriyle enfekte olmuş hücrelerin yüzeyinde sunulan viral HA molekülü NK hücrelerinin NKp44 ve NKp46 reseptörleri tarafından tanınır. İnfluenza A virüsü HA molekülü ile sitotoksik NKp44 ve NKp46 reseptörlerinin bağlanması sonucu enfekte hücre liziz edilir (Draghi ve ark., 2007; Mendelson ve ark., 2010; Luczo ve ark., 2021). NK hücreleri için bir diğer mekanizma ise hücre yüzeylerinde bulunan IgG reseptörü (FcγRIII/CD16) sayesinde gerçekleştirilir. Antikor-bağımlı hücre-aracılı sitotoksisite olarak tanımlanan bu olayda, antikorlar tarafından işaretlenen enfekte hücreler NK hücreleri tarafından tanınarak parçalanırlar (Wines ve ark., 2016).

4.7.3. İnfluenza A virüslerinin algılanmasında görev alan viral sensörler ve doğal immün yanıtların oluşumu

İnfluenza A virüslerinin hücre içine girişi ile birlikte, viral bileşenler (*İng. Pathogen Associated Molecular Patterns, PAMPs*) konak hücrenin adeta radar görevi üstlenen antijen tanıma reseptörleri (*İng. Pathogen Recognition Receptors,*

PRRs) tarafından tanınırlar. Bu durum çeşitli sitokin ve anti-viral üretimini uyaracak doğal immün sinyal mekanizmaların aktivasyonuna neden olur (Akira, 2009). Doğal immünitenin aktivasyonu viral enfeksiyonun hızlı ve etkili bir şekilde sınırlandırılabilmesi ve akabinde kazanılmış immün yanıtların başlatılabilmesi açısından son derece önemlidir. Bu sebeple doğal immün sistem influenza A virüslerini tanıyabilmek için farklı PRR'leri kullanmaktadır. İnfluenza A virüslerine duyarlı üç farklı reseptör (PRR) bulunmaktadır (Pothlichet ve ark., 2013; Okamoto ve ark., 2017). Bunlar RLR (*İng. Retinoic acid inducible gene I (RIG-I)-like receptors*), TLR (*İng. Toll-like receptors*) ve NLR (*İng. Nucleotide binding oligomerization domain (NOD)-like receptors*)'dir (**Şekil 7**).

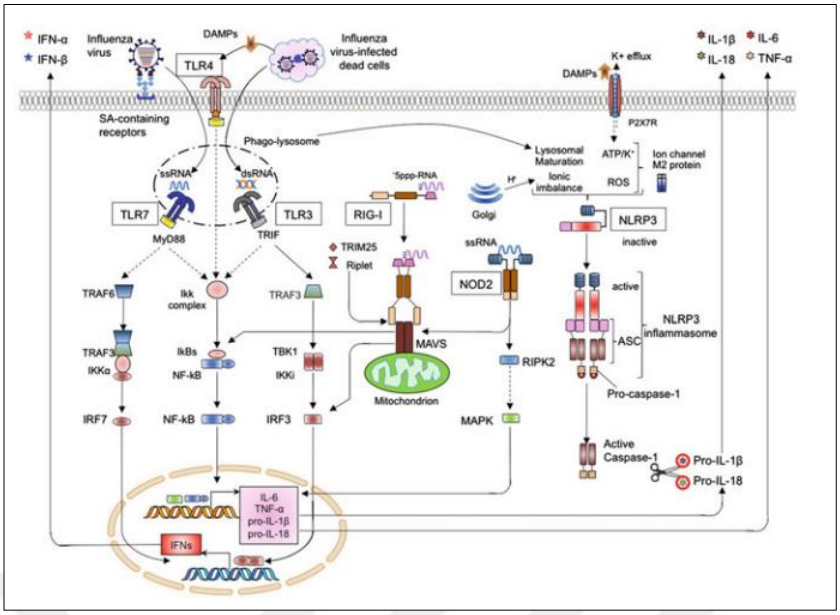
***RIG-I-benzeri Reseptörler* (RLR)**, memeli hücrelerinde yer alan sitozolik reseptör grubudur. Viral enfeksiyonlar sonucu hücre içinde oluşan viral RNA moleküllerinin tanınmasında görev alırlar. İşlevleri bilinen üç üyeden oluşmaktadırlar: RIG-I, MDA5 (*Melanoma Differentiation-Associated 5*) ve LGP2 (*Laboratory of Genetics and Physiology 2*). Yapısal olarak RNA helikaz domainine ilave olarak amino-terminal bölgede RIG-I ve MDA5 2 tane CARD domaini (*Caspase recruitment domain*) bulundururken LGP2 ise 1 tane CARD domaini taşır. Fonksiyonel olarak LGP2'nin RIG-I ve MDA5 sinyal mekanizmalarının negatif regülatörü gibi görev aldığı bilinmektedir (Saito ve Gale, 2008; Yoneyama ve Fujita, 2009).

RIG-I (*Retinoic acid inducible gene I protein*) *reseptörleri*, retinoik asit tarafından sentezi uyarılan sitoplazmik reseptör grubudur. Bir RNA helikaz enzimi olan RIG-I, insanlarda *DDX58* geni tarafından kodlanır. RIG-I, influenza A virüsü enfeksiyonu sırasında hücre içindeki viral ssRNA'yı tanıyarak aktifleşir (Goubau ve ark., 2014). Özellikle viral replikasyon devam ederken oluşan ssRNA'nın 5'-ucunda bulunan trifosfat (5'-PPP) grubuna duyarlıdırlar. RIG-I gibi MDA5'de viral tek iplikli RNA moleküllerini tanır (Takeuchi ve Akira, 2008). Viral ajanların RIG-I tarafından algılanmasıyla birlikte, RIG-I'in amino-terminal bölgede CARD domainleri konformasyonel değişikliğe uğrayarak TRIM25 (*Tripartite motif containing 25*) gibi E3 ligazlar aracılığıyla ubikitinlenmektedir. Ardından RIG-I mitokondri yüzeyinde bulunan mitokondriyal anti-viral sinyalleme (MAVS) proteini

ile bağlanarak transkripsiyon faktörlerinden IRF3 ve NF-κB'nin aktive olması sağlanır. Bunun sonucunda Tip I IFN ve pro-inflamatuar sitokinler ve kemokinlerin (IL-6, TNF-α, pro-IL-1β, pro-IL-18) üretimi indüklenir (Loo ve Gale, 2011). Yapılan çalışmalarda influenza A enfeksiyonları sırasında solunum yolu epitel hücreleri, makrofajlar, dendritik hücreler ve mast hücrelerinde RIG-I reseptörlerinin ekspresyon ve aktivasyonunun arttığı gösterilmiştir (Crotta ve ark., 2013; Graham ve ark., 2013).

Toll-benzeri Reseptörler **(TLR)**, lösin amino asiti bakımından zengin tekrarlardan (*İng. leucine-rich repeats, LRR*) oluşan bir ektodomain ile IL-1 reseptörüne benzer olduğu için TIR (Toll like/Interleukin-1 Receptor) olarak adlandırılan sinyal iletiminde görevli bir transmembran domaininden oluşan Tip I transmembran proteinleridir (Kawai ve Akira, 2010). İnsanlarda 10 (TLR1–TLR10) farelerde ise 12 (TLR1–TLR9, TLR11–TLR13) farklı fonksiyonel TLR tanımlanmıştır. Hücre içi lokalizasyonları ve hedefledikleri ligandlara bağlı olarak iki gruba ayrılırlar: TLR1, TLR2, TLR4, TLR5, TLR6 ve TLR10'dan oluşan bir grup hücre yüzeyinde bulunur ve genel olarak lipid, lipoprotein ve protein gibi mikrobiyal membran bileşenlerini tanır. TLR3, TLR7, TLR8, TLR9, TLR11, TLR12 ve TLR13'den oluşan diğer grup ise endolizomal, lizozomal, endozomal ve endoplazmik retikulum gibi hücre içi vesiküllerde bulunur. Bu reseptörler influenza A virüsleri dahil olmak üzere birçok RNA virüslerine ait viral nükleik asitleri tanır (Akira ve ark., 2006; Botos ve ark., 2011).

TLR3 reseptörleri, makrofaj ve dendritik hücrelerde endozomlarda bulunur ve çift zincirli RNA'yı (dsRNA) tanır. TLR3 reseptörleri influenza A virüs replikasyonu sırasında hücre içinde oluşan dsRNA'yı da tanıyabilmektedir (Le Goffic ve ark., 2007). TLR3 reseptörlerinin membran içine uzanan bölgesi sinyal iletiminde görev alan bir adaptör protein olan TRIF ile etkileşim halindedir. Viral patojenlerin TLR3 tarafından algılanması ile TRIF-bağımlı sinyal mekanizmaları uyarılır. IκKε (Serin-treonin kinaz kappa epsilon) ve kinaz aktiviteli bir enzim olan TBK1 aktifleşir ve sitoplazmada inaktif halde bulunan IRF3 transkripsiyon aktivatörünü fosforiller. Fosfat bağlı aktif formdaki IRF3 dimerleşerek nükleusa taşınır ve IFN-β ekspresyonunu başlatır.



Şekil 7. İnfluenza A virüslerine karşı geliştirilen doğal immün sistem sinyal mekanizmaları (Pulendran ve Maddur, 2015'den değiştirilerek kullanılmıştır).

NOD-benzeri Reseptörler **(NLR)**, NLRP reseptör proteini, adaptör protein olan ASC ve pro-kaspazlardan meydana gelen multiprotein yapıda inflamazom kompleksidir. En az 20 üyeden oluştuğu bilinmektedir. Doğal immün sistemde inflamatuar yanıtların başlamasında görev alan sitozolik reseptörlerdir. NLR reseptörleri MAPK, NF-κB ve MAVS-IRF3 dahil olmak üzere birçok sinyal mekanizmasını uyararak IL-6, TNF-α, pro-IL-1β, pro-IL-18 ve tip I IFN yanıtlarının oluşmasını sağlar. NLRP3, NLRC2/NOD2 ve NLRX1 influenza A virüsleriyle ilişkilendirilen reseptörlerdir (Franchi ve ark., 2009; Shaw ve ark., 2010).

NLRP3 reseptörleri (NOD-benzeri reseptör protein-3); dendritik hücreler, makrofajlar, nötrofiller, monositler ve insan pulmoner epitel hücreleri gibi immün sistem hücrelerine ulaşan tehlike sinyallerini tanıyan ve IL-1β ile IL-18 aracılı inflamatuar yanıtların başlamasında görev alan sitozolik reseptör proteinidir (Allen ve ark., 2009). NF-κB aracılı gen transkripsiyonu sonucu pro-inflamatuar sitokinlerden pro-IL-1β ve pro-IL-18 öncül formları meydana gelir. Hücre membranında yerleşim gösteren katyon kanalı aracılığı ile hücre içine K^+ iyonunun girmesi inaktif durumdaki NLRP3'ün multiprotein kompleks yapısının NLRP3 inflamazom yapısına dönüşümünü sağlar. Böylece NLRP3 proteinin yapısında

bulunan pro-kaspaz-1 aktifleştirilerek pro-IL-1β ve pro-IL-18'in aktif formu olan IL-1β ve IL-18 üretimi gerçekleşir. NLRP3 reseptör proteinin influenza A virüslerine karşı oluşturduğu yanıtları virüsün iyon kanalı proteini olan ve yeni sentezlenen viral M2 proteini üzerinden geliştirdiği ayrıca NLRP3 aktivasyonu için virülans protein olan PB1-F2'nin makrofajlardaki agregasyonunun da tek başına yeterli olabileceği saptanmıştır (McAuley ve ark., 2013). Yapılan son çalışmalarla, viral NS1 proteinin RNA- ve TRIM25-bağlanma domainlerinin NLRP3 aracılı IL-1β üretiminin baskılanmasında rol oynadıkları gösterilmiştir (Moriyama ve ark., 2016).

4.7.4. İnfluenza A virüslerine karşı konak hücre tarafından sentezlenen koruyucu moleküller: İnterferonlar

Viral enfeksiyonlara karşı konak hücrenin oluşturduğu en önemli anti-viral cevap interferon sentezidir. İnterferonlar doğal bağışıklık sisteminin en önemli bileşenlerinden biridir. Viral sensörler tarafından viral komponentlerin saptanmasının ardından, konak hücrelerde ilk olarak interferonları da içine alan anti-viral genlerin transkripsiyonunu kontrol eden transkripsiyon faktörlerinin aktivasyonu gerçekleştirilir. Çift zincirli RNA molekülü (dsRNA) tarafından aktive edilen ve DRAF kompleksinin (*dsRNA activated transcription factor complex*) alt birimleri olan transkripsiyon faktörler AP1 (ATF2/c-JUN), NF-κB (p50/p65), IRF3 (*interferon düzenleyici faktör-3*) ve IRF7'dir.

IRF-3 ve IRF-7 viral enfeksiyonlara karşı oluşturulan doğal immün yanıtında *IFN-α/β* genlerinin transkripsiyonunda önemli bir rol oynayan transkripsiyon aktivatörleridir (Hiscott ve ark., 1999). İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına duyarlı sensörlerden TLR3/7, sitoplazmada inaktif halde bulunan IRF3/7'nin karboksi-terminal bölgesinin fosforilasyonunu tetikleyerek aktive ederler (Mielcarska ve ark., 2019). Fosforillenmiş aktif formdaki IRF3/7 dimerleşerek homodimer yapıda nükleusa taşınır. Bir diğer transkripsiyon aktivatörü ise NF-κB'dir (Thanos ve Maniatis, 1995). NF-κB sitoplazmada kendi inhibitörüne (IκB) bağlanmış halde bulunur. IκB proteini, NF-κB'nin nükleer lokalizasyon sinyalini maskeleyerek nükleusa taşınmasını engeller. NF-κB proteinin aktivasyonu, inhibitör IκB proteinin IκB kinaz enzimi ile fosforillenerek proteozomlar tarafından yıkılmasıyla gerçekleşir. İnhibitör proteini uzaklaştırılan NF-κB kompleksi nükleusa taşınır

(Karin ve Delhase, 2000). Nükleusa gelen IRF3/7, NF-κB ve AP1 (ATF2/c-JUN) transkripsiyon aktivatörleri, bir histon asetiltransferaz olan p300/CBP ko-aktivatörleri ile birleşerek enhancesome kompleksini oluştururlar (Weaver ve ark., 1998). Böylece *IFN-α/β* genlerinin ve pro-inflamatuar sitokinlerin (IL-6, TNF-α, pro-IL-1β, pro-IL-18) ekspresyonu uyarılır.

İnterferonlar (IFN), çeşitli patojenik uyarıcılara karşı konak hücre tarafından üretilen glikoproteinlerdir. Sitokin olarak bilinen, glikoproteinlerin en büyük sınıfına dahildirler (Chelbi-Alix ve Wietzerbin, 2007). İnterferonlar ilk kez 1957 yılında Isaacs ve Lindenmann tarafından influenza virüsleri üzerinde yaptıkları çalışmalar sonucunda keşfedilmiştir (Isaacs ve Lindenmann, 1957). Bu proteinler sadece virüslere karşı değil aynı zamanda bakteriler, parazitler ya da tümör hücrelerine de yanıt olarak salgılanırlar. Bir enfeksiyon durumunda interferonlar otokrin veya parakrin yollarla etki ederek enfekte hücrede veya interferon reseptörleri taşıyan komşu hücrelerde çeşitli savunma mekanizmalarını harekete geçirerek patojenin yayılmasını engellerler (Sen, 2001).

İnterferonlar genel olarak üç grup altında sınıflandırılır. Bunlar Tip I, Tip II ve Tip III interferonlardır. Tip I interferon grubu içinde 13 farklı alt tipi bulunan IFN-α (IFN-α1, -α2, -α4, -α5, -α6, -α7, -α8, -α10, -α13, -α14, -α16, -α17 ve -α21), IFN-β, IFN-δ, IFN-ε, IFN-κ, IFN-τ ve IFN-ω yer almaktadır. İnsanlarda IFN-α, IFN-β, IFN-e, IFN-κ ve IFN-ω bulunurken; IFN-δ ve IFN-τ sırasıyla sadece domuz ve sığırlarda bulunur. Tip I interferonları kodlayan genler insanlarda 9. kromozomda farelerde ise 4. kromozomda yer alır. Tip I interferonlardan IFN-α lökositler, IFN-β ise fibroblastlar tarafından üretilirler. Tip I interferonlar viral enfeksiyonlarda etkilidir. Tip II interferon grubu ise sadece IFN-γ içerir (Bach ve ark., 1997). Sitokin kodlayan bu gen insanlarda 12. kromozomda farelerde ise 10. kromozomda yer alır. Tip II IFN'lar mitojenik veya antijenik uyarıcılarla immün düzenleyici reaksiyonlarda etkilidirler. Tip III interferon grubunda ise 4 farklı alt tipten oluşan IFN-λ (IFN-λ1, IFN-λ2, IFN-λ3, IFN-λ4) yer alır (Ank ve Paludan, 2009).

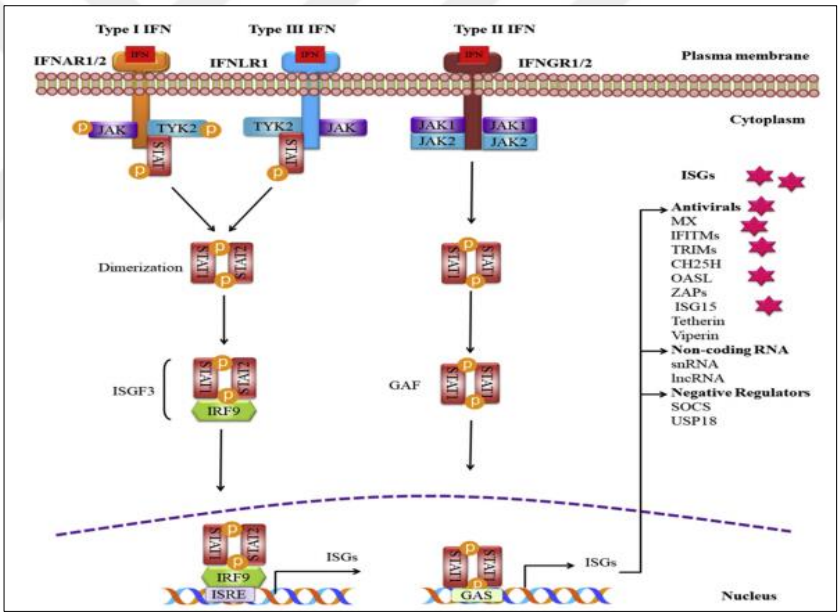
İnterferonların hücre membranı üzerinde kendilerine özgü reseptörlere bağlanması ile birlikte bir dizi immün düzenleyici reaksiyonlar başlatılır. Bu reseptörler yapı ve fonksiyonlarına göre farklı şekilde sınıflandırılmaktadırlar.

“Reseptör tirozin kinaz” (RTK) gibi, kendileri enzimatik bir aktiviteye sahip olan reseptörler, doğrudan sitoplazmik protein kinaz kaskadını başlatırlar. Ancak Tip I, Tip II ve Tip III gibi reseptörler ise hücre içine uzanan kısımlarına eşlik eden katalitik proteinler (JAK ailesi) aracılığıyla hücre içi sinyal yollarını aktive ederler. Tip I IFN’lar, heteromerik özellik gösteren interferon-α/β reseptörlerine (IFNAR-1 ve IFNAR-2) bağlanırlar. Her iki reseptörü kodlayan gen de insanda 21.kromozomda, farede ise 16. kromozomda yer alır (Mogensen ve ark., 1999). Tip II IFN-γ ise IFNGR-1 ve IFNGR-2 alt ünitelerinden oluşan heterodimerik yapıdaki interferon-γ reseptörlerine (IFNGR) bağlanırlar. IFNGR-1 ve IFNGR-2 reseptörlerini kodlayan genler insanda sırasıyla 6. ve 21. kromozomda yer alır (Bach ve ark., 1997). Bu reseptörlerin alt ünitelerinin tamamı Janus kinaz ailesi ile interaksiyon göstererek sinyal iletimini gerçekleştirir. Tip I IFN reseptörünün IFNAR-1 alt ünitesi TYK2 (Trozin kinaz 2) ile IFNAR-2 alt ünitesi ise JAK1 (Janus kinaz 1) ile etkileşim halindedir. Tip II IFN reseptörünün IFNGR-1 alt ünitesi ise JAK1 ile IFNGR-2 alt ünitesi ise JAK2 ile etkileşim halindedir (Darnell ve ark., 1994). Tip III IFN’lar da IFNLR reseptörlerine bağlanırlar. Bu reseptör TYK2 ve JAK1 ile etkileşim halindedir (Kotenko ve ark., 2003).

İnterferonlarla hücre içerisine sinyal iletiminde iki protein ailesi görev alır. Bunlardan birincisi tirozin kinaz olarak bilinen Janus Kinazlardır (JAK). JAK protein ailesinin tanımlanan 4 üyesi (Jak-1, Jak-2, Jak-3, Tyk-2) bulunmaktadır. Diğer protein ailesi ise; sinyal ileten ve trankripsiyonu aktive eden (*İng. signal transducer and transcription activator, STAT*) proteinlerdir. STAT protein ailesinin bilinen 7 tane üyesi (Stat-1, Stat-2, Stat-3, Stat-4, Stat-5a, Stat-5b, Stat-6) vardır (Leonard ve O'Shea, 1998). STAT proteinleri sitoplazmada inaktif haldedir. JAK proteinleri tarafından fosforillenmesi sonucu aktif forma dönüşür. Bu proteinler interferon reseptörlerinden aldıkları sinyalleri nükleusa taşıyarak, belirli genlerin transkripsiyonunu başlatırlar (Schindler ve ark., 2007). Yapılan çalışmalar sonucunda, interferon dışında pek çok sitokin, hormon ve büyüme faktörleri ile hücre içi sinyal iletisinde de JAK-STAT yolaklarının kullandığını ortaya konmuştur.

JAK-STAT sinyal ileti yolağında, interferonların uygun reseptörlere bağlanması sonucu reseptörlerin membran içine uzanan bölgeleri ile etkileşim

halinde olan Janus kinazlar aktifleşir. Aktif formdaki bu kinaz enzimleri STAT proteinlerinin fosforilasyonunu sağlar. Fosfat bağlı aktif formdaki STAT proteinleri dimerik yapı oluştururlar. Tip I ve Tip III interferonlar tarafından uyarılan JAK-STAT sinyal ileti yolağında dimerleşmiş STAT proteinleri yapısına IRF9 (interferon düzenleyici faktör-9) bağlanır. Üç proteinden oluşan ve ISGF3 (interferon-stimulated gene factor-3) olarak tanımlanan bu kompleks sitoplazmadan nükleusa taşınır. Aktif STAT proteinleri nükleusda interferon tarafından uyarılan genlerin (*İng. interferon stimulated genes, ISG*) enhancer bölgelerine bağlanarak bu genlerin transkripsiyonlarını sağlar. Tip II IFN'lar tarafından uyarılan sinyal iletiminde ise dimerleşmiş aktif STAT proteinleri doğrudan nükleusa taşınır ve nükleusda IFN-γ tarafından aktive edilen bölgeye (*İng. IFN-γ activated site, GAS*) bağlanarak gen ekspresyonunu başlatır (Darnell ve ark., 1997) (**Şekil 8**).



Şekil 8. İnterferonlar aracılığıyla hücre içi sinyal iletiminde JAK-STAT yolağı (Goraya ve ark., 2020'den değiştirilerek kullanılmıştır).

4.7.5. İnfluenza A virüslerine karşı interferonlar tarafından sentezi uyarılan anti-viral moleküller

İnfluenza A virüsü enfeksiyonlarına karşı konak hücrelerin ortaya koyduğu en önemli savunma mekanizmalarından biri interferon sentezidir. Konak hücreyi

korumaya dönük olarak viral enfeksiyonlara cevaben interferonlar aracılığıyla sentezlenen bazı anti-viral moleküller (ISG) virüslerin replikasyonunu yavaşlatıcı ya da tamamen inhibe edici etki gösterebilmektedir (Evans, 1996) (**Şekil 9**). Bu molekülleri influenza A virüsleri üzerindeki etkilerini göz önünde bulundurarak üç ayrı katagoriye ayırabiliriz: ***i.*** Konak hücreye giriş ve/veya viral füzyon aşamalarında engelleyici etki gösterenler. ***ii.*** Viral replikasyon ve translasyon aşamalarında engelleyici etki gösterenler. ***iii.*** Viral paketlenme ve serbestleşme aşamalarında engelleyici etki gösterenler.

Konak hücreye giriş ve/veya viral füzyon aşamalarına etki eden anti-viral proteinler:

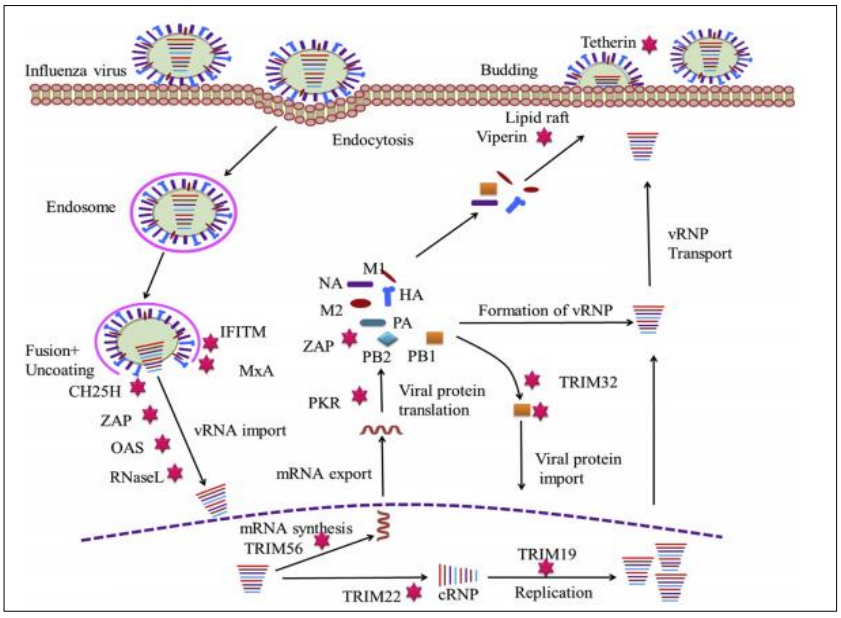
IFITM proteinleri *(*Interferon-induced transmembrane protein), yeni tanımlanmış ISG ailesidir. İnsanda tanımlanmış en az 3 IFITM proteini bulunmaktadır. Bunlardan IFITM1 baskın olarak plazma membranında lokalize olurken, IFITM2 ve IFITM3 proteinleri sırasıyla endozomal ve lizozomal kompartmanlarda yer almaktadır (Brass ve ark., 2009). IFITM proteinleri, konak hücrenin membran özelliklerini değiştirerek virüsün hücre içine girişini ilk basamakta önleyebilmektedir (Bailey ve ark., 2014). IFITM proteinlerinden özellikle IFITM3 proteinin virüs-konak hücre füzyonunu ve akabinde viral tutunma ve endositozu bozarak influenza A virüsü replikasyonunu sınırladığı gösterilmiştir (John ve ark., 2013).

Viral replikasyon ve translasyon aşamalarına etki eden anti-viral proteinler:

Mx proteinleri, viral enfeksiyonlara karşı savunmada ilk olarak farelerde tanımlanan protein grubudur (Pavlovic ve ark., 1993). İnsan ve fare hücrelerinde interferonların uyarısı ile sentez edilen iki Mx proteini vardır. Bunlar insan MxA (Myxovirus resistance protein A) ve MxB proteinleri; farede Mx1 ve Mx2 proteinleridir. İnsan *MxA ve MxB* genlerinin her ikiside 21. kromozomda lokalize olmuşlardır. İnsan MxA, MxB ve fare Mx2 sitoplazmik proteinlerdir. Fare Mx1 proteini ise nükleer lokalizasyon göstermektedir (Pavlovic ve ark., 1990; Nakayama ve Ishihama, 1992). Yapılan çalışmalarda MxA proteinlerinin influenza A virüsleri başta olmak üzere birçok RNA virüsü replikasyonunu inhibe ettiği bildirilmiştir (Weber ve ark., 2000). MxA proteininin, influenza A virüsü NP proteini ile

etkileşmesi sonucu viral proteinin fonksiyonlarını bloke ederek viral genomun sitoplazmada tutulmasını böylece nükleus içerisine girişini, transkripsiyonu ve replikasyonu engellediği gösterilmiştir (Turan ve ark., 2004). Benzer şekilde Mx1 proteinin influenza A virüslerinin erken transkripsiyon mekanizmalarına engel olduğu belirlenmiştir.

Protein Kinaz-R (PKR), interferonların uyarısı ile hücrelerde bol miktarda sentez edilen RNA bağımlı anti-viral enzimdir (Thomis ve Samuel, 1993). Viral replikasyonu inhibe eden PKR enzimleri baskın bir şekilde hücre sitoplazmasında lokalize olmakla birlikte az miktarda da nükleusta bulunmaktadırlar. İnsanda PKR enzimi *EIF2AK2* geni tarafından kodlanır. Proteinin C-terminal bölgesi protein kinaza pro-apoptik bir özellik gösterirken, N-terminal bölgesi viral replikasyon ve gen ekspresyonları sonucu oluşan çift zincirli RNA'ya bağlanma işlevi görür. Viral enfeksiyonlarda PKR, çift zincirli RNA'ya (dsRNA) bağlanarak dimerleşir ve buna bağlı olarak otofosforilasyon reaksiyonu sonucunda aktive olur. Aktive olan PKR, ökaryotik translasyon başlatıcı faktörünü (EIF2α) fosforiller. Böylece fosforile EIF2α enfekte hücrelerde, hücresel ve viral protein sentezini inhibe eder (Galabru ve Hovanessian, 1987; Merrick, 1992).



Şekil 9. İnterferonlar tarafından sentezi uyarılan anti-viral moleküller (Goraya ve ark., 2020'dan değiştirilerek kullanılmıştır).

OAS (Oligoadenilat sentaz) ve RNaz L (Ribonükleaz L) proteinleri, viral RNA'ların yıkımında görevli anti-viral enzimlerdir. Virüs enfeksiyonlarında interferonlar tarafından sentezi uyarılan 2′-5′ oligo adenilat sentetaz (OAS) enzimi insanlarda *OAS1* geni tarafından kodlanır (Ball, 1979). OAS enziminin anti-viral etkisi viral RNA'ların yıkımı şeklinde olur. Viral RNA'ların yıkımı için aktif formda OAS ve RNaz L olmak üzere iki enzime ihtiyaç 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 katalizler ve böylece viral replikasyonun inhibe olması sağlanır (Baglioni ve ark., 1979).

ADAR1 (Adenozin deaminaz) enzimi, interferon tarafından uyarılan proteinlerden bir diğeridir. Adenozin deaminazlar RNA'nın yapısal olarak düzenlenmesinden sorumludurlar. Post-transkripsiyonel modifikasyonlar sonucu çift zincirli RNA'da adenozinin inosine dönüşümü gerçekleşir (Wang ve ark., 1995). Yapılan çalışmalar deaminasyonla viral RNA transkriptlerinin ve hücresel pre-mRNA'ların düzenlendiğini göstermektedir (Bass ve ark., 1997).

TRIM proteinleri (tripartite motif protein), E3 ubikitin ligaz olan ve anti-viral immünitede rol oynayan bir diğer ISG ailesidir. TRIM14, TRIM22 ve TRIM41 proteinleri influenza A virüsü NP proteinini poli-ubikitinleyerek proteozomal yıkımını sağlarlar ve böylece viral replikasyonun sınırlanmasına katkı sağlamaktadırlar (Di Pietro ve ark., 2013; Patil ve ark., 2018; Wu ve ark., 2019). TRIM22 ayrıca influenza A virüsü genomunun kapsülden çıkmasını da bloke etmektedir. TRIM25 ise doğal immunitenin en önemli öğesidir. TRIM25, RIG-I'in mitokondri içine yeniden yerleşmesini, RIG-I'in ubikuitinasyonu, RIG-I aracılı interferon üretimini ve MAVS sinyal transdüksiyonunu düzenleyerek viral enfeksiyonlara karşı doğal immün cevap oluşumuna katkı sağlamaktadır (Gack ve ark., 2007).

ISG15, ubikitin-benzeri küçük bir proteindir ve hedefteki viral proteinlere kovalent olarak bağlanır (ISGlasyon). Bu bağlanma immün sistem ve viral bağışıklıkta önemli işlevlere sahiptir. ISG15 viral replikasyonu, virüs salımı ve viral

proteinlerin translasyonunu önleyerek sınırlamaktadır. ISG15 ilk anti-viral yanıtını NS1B proteininin RNA-bağlanma bölgesine bağlanarak influenza B virüslerine karşı oluşturduğu rapor edilmiştir (Yuan ve Krug, 2001). Ayrıca ISG15, influenza A virüsü NS1 proteini RBD bölgesinde yer alan nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS-1) Lys41 bakiyesini hedefleyerek NS1 proteini ile importin-α arasındaki bağlantıyı bozar. Böylece NS1 proteininin nükleusa girişine engel olur (Zhao ve ark., 2010).

Viral paketlenme ve serbestleşme aşamalarına etki eden anti-viral proteinler:

Viperin endoplazmik retikulumda bulunan anti-viral efektördür. Virüsün tomurcuklanma bölgeleri için spesifik olan lipid yığınlarının oluşumunu etkileyerek konak hücreden influenza virüs serbestleşmesini sınırlayıcı etki göstermektedir (Wang ve ark., 2007).

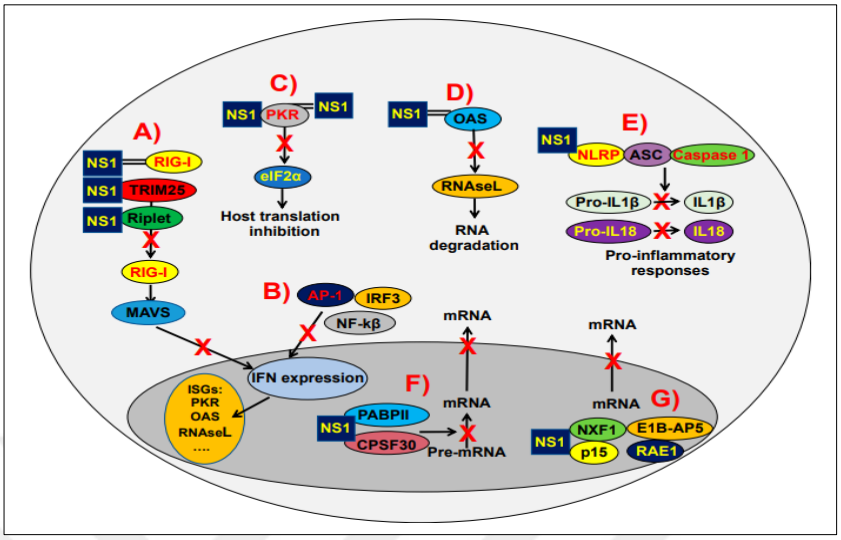
Tetherin zara bağlı bir proteindir. Tetherin ekstraselüler boşlukta yeni sentezlenen virüslerin serbest kalmasını engellemek için, aynı anda hem viral zarfa tutunması ve hemde plazma membranına bağlanmasına yardımcı olan amino ve karboksi-terminal bölgeleri ile membrana bağlı halde bulunur. Böylece yeni sentezlenen virüslerin enfekte hücre yüzeyinden serbestleşmesini sınırlamaktadır (Yondola ve ark., 2011).

4.8. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteininin Viral Patogenezdeki Rolü ve Etki Mekanizmaları

İnfluenza A virüslerinin patogenezi ve virülansı, bir kısmı konak hücre ile ilgili bir kısmı da virüsün kendisi ile ilgili bazı faktörlerden oluşan dinamik bir süreçtir. Konak hücreler tarafından doğal ve edinsel bağışıklık yanıtlarıyla sağlanan korunma yollarına rağmen influenza virüsleri, viral patogenezde çeşitli mekanizmalar geliştirerek konak hücrenin bağışıklık taramalarından kaçabilmektedir.

Bu tez çalışmasına konu olan influenza A virüsü NS1 proteinin en temel işlevi, viral enfeksiyonu inhibe etmek için konak hücrelerin oluşturduğu interferon yanıtlarını bloke etmektir (**Şekil 10**). Böylece NS1 proteini bazı hücresel faktörlerle

direkt ya da indirekt olarak etkileşim göstererek doğal immün yanıtlarının anti-viral etkilerine karşı etkili bir virülans faktör görevi üstlenir (Basu ve ark., 2009).



Şekil 10. İnfluenza A virüsü NS1 proteinin doğal immun yanıtlar üzerine etkisi (Nogales ve ark., 2018'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Virüsün major interferon antagonisti olan NS1 proteini, bir RNA helikaz olan ve viral enfeksiyonlar sonucu interferon üretimini tetikleyen hücresel algı proteini RIG-I (DDX58)'i işlevsiz hale getirerek viral replikasyona katkı sağlar (Guo ve ark., 2007). RIG-I virüs replikasyonu sırasında hücre içerisinde oluşan çift zincirli RNA'yı (dsRNA) tanır. NS1 proteininin RNA-bağlanma bölgesinde (R38-K41) dsRNA molekülüne bağlanma özelliği bulunur. Böylece NS1 proteini dsRNA molekülüne bağlanarak RIG-I sensör proteininin viral replikasyonu algılamasına engel olur. NS1 proteininin RIG-I üzerine etkisi bir başka yolla dolaylı olarak da gerçekleşmektedir: RIG-I proteininin işlev görebilmesi için aktifleşmesi gerekir. Bu aktifleşme anti-viral moleküllerden TRIM25 ve Riplet proteinlerinin RIG-I proteinine bağlanması ile gerçekleşir. NS1 proteini, TRIM25 ile hem RNA-bağlanma bölgesinde (RBD) hemde efektör domainde (E96-E97) bağlanma özelliği gösterir (Gack ve ark., 2009). Böylece NS1 proteini TRIM25 proteini ile direkt bağlanarak RIG-I/TRIM25 kompleksinin oluşumunu engeller ve dolaylı yolla interferon sentezini inhibe eder (Koliopoulos ve ark., 2018).

NS1 proteini, IFN transkripsiyon faktörlerinden AP1 (ATF2/c-JUN), NF-κB (p50/p65), IRF-3/7 aktivasyonunu engelleyerek viral korunmaya katkı sağlar (Talon ve ark., 2000; Ludwig ve ark., 2002). AP1, NF-κB ve IRF-3/7 proteinleri çift zincirli RNA tarafından aktive edilen DRAF (dsRNA-activated transcription factor) kompleksinin alt birimleridir. İnfluenza NS1 proteini çift zincirli RNA molekülüne bağlanma özelliği ile DRAF kompleksinin aktivasyonunu engelleyerek dolaylı olarak interferon sentezini bloke eder.

NS1 proteini, NF-κB transkripsiyon aktivatörü inhibitörleri olan IKKα ve IKKβ ile karboksi-terminal kuyruk (CTT) bölgesinde bağlanarak bu inhibitörlerin fosforilasyon fonksiyonlarını bloke eder (Gao ve ark., 2012). Gerçekleşen bu interaksiyon sonucunda NF-κB proteini aktifleşemez ve nükleusa taşınamaz. Bu durum interferon sentezi ve pro-inflamatuar yanıtların bloke olmasına neden olur (Wang ve ark., 2000).

NS1 proteini, interferon uyarısı sonucunda hücrelerde sentez edilen anti-viral özellikte proteinlerden Protein Kinaz-R (PKR) ile etkileşmektedir. Çift zincirli RNA tarafından aktive edilen PKR, ökaryotik translasyon başlatıcı faktörlerden biri olan EIF2α'yı fosforile ederek hücresel ve viral protein sentezini inhibe eder. İlk çalışmalar, NS1 proteininin çift zincirli RNA'ya bağlanarak protein kinazı bloke ettiği yönündedir (Lu ve ark., 1995). Ancak daha sonraki çalışmalarda, RNA-bağlanma bölgesinde mutasyonlar içeren NS1 proteininin, PKR ve EIF2α'nın fosforilasyonunu inhibe etmediği görülmüştür (Hatada ve ark., 1999). Bu veriden yola çıkılarak NS1'in blokaj etkisinin PKR ile muhtemel direkt etkileşimlerin bir sonucu olabileceği düşünülmüştür. Yapılan araştırmalar NS1 proteini 123-127 amino asit bakiyelerinin PKR-bağlanma bölgesi olduğu, ayrıca bu bölgenin influenza A virüsü virülansında da etkili olduğu tespit edilmiştir (Min ve ark., 2007).

NS1 proteini, interferon tarafından sentezi uyarılan anti-viral enzimlerden olan 2'- 5' oligo adenilat sentetaz (OAS) üzerinde de inhibe edici bir etkiye sahiptir (Min ve Krug, 2006). OAS enzimi de çift zincirli RNA moleküllerine bağlanarak aktifleşir. Aktifleşen OAS, RNaz L enzimlerini aktifleştirir. Aktif RNaz L ise enzimleri virüse ait RNA moleküllerinin yıkılmasını kataliz eder ve viral replikasyonun inhibe olmasını sağlar. Ancak NS1 proteininin çift zincirli RNA moleküllerine

bağlanabilme özelliği, OAS/Rnaz L aracılı interferon yanıtını bloke ederek viral replikasyona katkı sağlar (Krug, 2015).

NS1 proteini, influenza virüslerinin algılanmasında görevli sitozolik reseptörlerden NLRP3 inflamazom kompleksinin aktivasyonunu engelleyerek inflamatuar yanıtlardan IL-1β sentezini baskılar. NS1 proteininin NLRP3 ile interaksiyonu RNA-bağlama bölgesinin bazik R38-K41 bakiyelerinde ve TRIM25-bağlama bölgesinin asidik E96-E97 bakiyelerinde gerçekleşmektedir (Moriyama ve ark., 2016).

NS1 proteini, hücresel öncül mRNA'ların transkripsiyon sonrası 3'-ucundaki mekanizmalarda rol alan CPSF (*Cleavage and polyadenylation specificity factor*) proteininin 30kDa alt ünitesine bağlanabilmektedir (Nemeroff ve ark., 1998). Proteinler arasındaki interaksiyon, NS1 proteinin hidrofobik bölgesini oluşturan ve karboksi-terminal (efektör domain) bölgesinde yer alan K110, I117, I119, Q121, V180, G183, G184 ve W187 bakiyelerinde gerçekleşir. NS1 proteini CPSF30 proteinine bağlanarak hücresel pre-mRNA'ların 3'-ucunun kesilmesini ve poliadenilasyonunu inhibe eder (Das ve ark., 2008). Böylece hücresel mRNA'lar olgunlaşamaz ve nükleustan sitoplazmaya taşınamaz. Bu yolla, interferonları da içine alan anti-viral aktiviteli hücresel proteinlerin sentezi engellenmiş olur.

Poliadenilasyon hücresel öncül mRNA'ların 3'-uçlarında gerçekleşen nükleositoplazmik transport için gerekli olan post-transkripsiyonel modifikasyonlar arasındadır. PABPI, PABPII (polyA-binding protein II) ve PUBPI proteinleri poli-A bağlayıcı proteinlerdendir (Huang ve Carmichael, 1996). NS1 proteini RNA-bağlanma bölgesi 1-81 bakiyelerinde PABPI ile yüksek afinitede bağlandığı ancak bu interaksiyonun NS1 proteininin dsRNA molekülü ile bağlanmasıyla zayıfladığı saptanmıştır (Arias-Mireles ve ark., 2018). Ayrıca viral NS1 proteini karboksi-terminal bölgesinde (223-237. amino asitler) PABII proteinine bağlanarak fonksiyonunu engeller (Chen ve ark., 1999). Bu engellenme ile, öncül mRNA'lara uzun poli-A kuyrukları (100-200 nükleotid) yerine yaklaşık 12-13 nükleotidlik kısa poli-A kuyrukları eklenir. 3'-uçlarında kısa poli-A kuyrukları taşıyan pre-mRNA'lar sitoplazmaya taşınamaz ve bu durum enfekte hücrelerin nükleuslarında birikmeye neden olur. PABII ve NS1 arasındaki ilişkinin araştırıldığı bir çalışmada, 219 amino

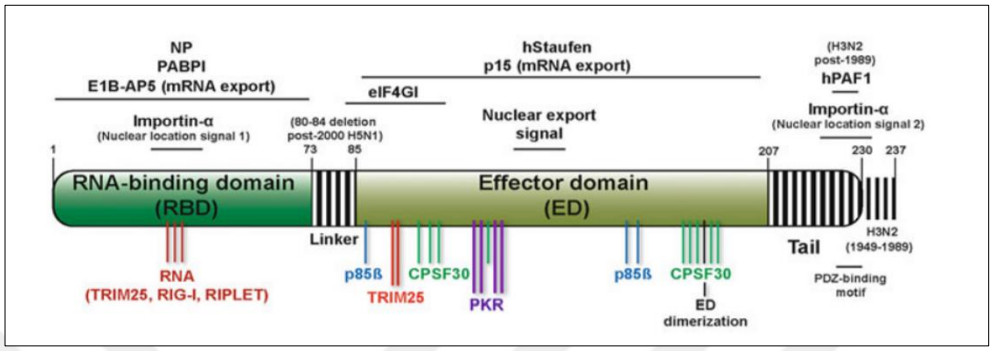
asit bakiyesinden oluşan ve dolayısıyla C-terminal bölgede PABII proteini ile bağlanma bölgesi içermeyen pandemik 2009-H1N1 virüsü NS1 proteini ile 230 amino asit bakiyesinden oluşan mevsimsel-H1N1 virüsü NS1 proteininin *IFN-β* gen ekspresyonu inhibisyonuna olan etkileri karşılaştırılmış ve pandemik 2009-H1N1 virüsü NS1 proteininin IFN-β mRNA inhibisyonu üzerinde etkili olmadığı, buna karşın mevsimsel NS1/230 proteininin bu inhibisyonu arttırdığı görülmüştür (Tu ve ark., 2011).

NS1 proteini, hem amino-terminal bölgesinin (19-38. amino asitler) hem de karboksi-terminal bölgesinin (223-230. amino asitler) hücresel mRNA'ların 3'-ucundaki poli-A kuyruğuna direkt olarak bağlanabildiği de gösterilmiştir. NS1 proteini enfeksiyonun erken döneminde fazla miktarda sentezlenen bir proteindir. NS1 proteini yeterli seviyeye ulaştığında hücresel mRNA'ların 3'-ucundaki poli-A dizisine direkt bağlanarak hücresel mRNA'ların nükleustan taşınmasını bloke eder. Böylece hücresel mRNA'lar nükleusta birikir ve viral mRNA'ların replikasyon için ihtiyaç duyduğu 5'-CAP başlığının tedarikçisi görevini üstlenirler. 5'-CAP başlığının aksine viral mRNA'lardaki poli-A kuyruklarının sentezi viral RNA polimeraz enzimi aracılığıyla hücresel süreçlerden bağımsız olarak gerçekleşir. Burada şaşırtıcı bir şekilde NS1 proteininin hücresel mRNA'ların poli-A kuyruğuna bağlanarak yaptığı doğrudan blokaj yeteneğini seçici bir şekilde viral mRNA'larda kaybettiği görülür (Qiu ve Krug, 1994). Bunun sonucu olarak olgun viral mRNA'lar sitoplazmaya taşınır ve başka konak hücrelerinin enfekte olması sağlanır.

NS1 proteininin, öncül mRNA'ların işlenme (splicing) mekanizmaları üzerinde de etkileri bulunmaktadır (Qiu ve ark., 1995). Spliceosomelar (protein-RNA kompleksi) pre-mRNA'dan intronları uzaklaştırıp ekzonları birleştirerek olgun mRNA halinde translasyon için hazır hale getirirler. NS1 proteinleri RNA-bağlanma bölgeleri ile spliceosome alt ünitesi olan U6 snRNA'ya bağlanabilmektedir. Bu bağlanma ile öncül mRNA'ların işlenme mekanizmaları inhibe edilerek nükleustan taşınmaları ve anti-viral proteinlerin sentezlenmesi engellenmiş olur (Fortes ve ark., 1994).

İnfluenza A virüsü NS1 proteini, nükleer por kompleksine etki ederek mRNA'ların eksport mekanizmalarına engel olur. NS1 proteini, amino terminal

bölgede NXF1 (*Nuclear RNA export factor-1*), p15, RAE1 (*Ribonucleic Acid Export-1*) ve E1B-AP5 (*Adenovirus early region 1B-associated protein-5*) proteinlerine bağlanarak mRNA'ların nükleer por kompleksi araclığıyla sitoplazmaya geçişini engeller (Satterly ve ark., 2007) (**Şekil 11**).



Şekil 11. İnfluenza A virüsü NS1 proteini ve etkileşim gösterdiği hücresel proteinler (Ayllon ve Garcia-Sastre, 2015'den değiştirilerek kullanılmıştır).

NS1 proteininin JAK-STAT sinyal yolağı inhibitörlerinden SOCS1 (*suppressors of cytokine signaling*) ve SOCS3 ekspresyonunu uyardığı görülmüştür (Jia ve ark., 2010). Benzer şekilde NS1 proteini, PI3K (*fosfotidilinositol 3-kinaz*) altünitesi p85 aracılığıyla PI3K/Akt sinyal yolunu aktive etmektedir. NS1 proteini 89-93 amino asit bölgesinin p85-SH2 bağlama bölgesi, 164-167 ve 213-216 amino asit bölgesinin ise p85-SH3 bağlama bölgesi olduğu belirlenmiştir (Hale ve ark., 2008).

Mutasyon çalışmaları ile NS1 proteininin amino asit diziliminde meydana getirilen değişiklikler ile bu proteinin bazı fonksiyonlarında patojeniteye ve virülansa etki edecek düzeyde farklılıklar tespit edilmiştir. Örneğin; Hong Kong 1997-H5N1 virüsünde yapılan çalışmalarda P42S (Prolin→Serin) mutasyonunun, NS1 proteininin antagonist olarak interferon sistemleri üzerindeki etkisini daha da arttırdığı (Jiao ve ark., 2008), ayrıca translasyon başlatıcı faktör eIF4F'ün bir alt ünitesi olan hücresel eIF4GI-bağlanma bölgesi içinde kalan 5 amino asit bakiyesinde (85-94. amino asitler) yapılan delesyonun ise interferon üretiminin inhibisyonuna eşlik ederek H5N1 virüsünün virülans ve patojenitesini arttırdığı gösterilmiştir (Zhou ve ark., 2010).

NS1 proteininin interferon antagonisti olmanın yanında viral patogenez açısından önemli bazı görevleri de bulunmaktadır. Enfeksiyonun erken evresinde fazla miktarda sentez edilen NS1 proteini amino-terminal bölgesi ile vRNP kompleksinden NP proteinine direkt olarak bağlanarak viral RNA sentezi ve regülasyonuna katkı sağlamaktadır (Robb ve ark., 2011). Ayrıca, NS1 proteininin viral mRNA'ların translasyonu üzerine de etkileri bulunmaktadır. Viral mRNA'ların 5'-UTR dizisine bağlanarak translasyonun başlamasını uyarmaktadır (Park ve Katze, 1995; Burgui ve ark., 2003). NS1 proteini 81-113 bakiyelerini içeren bölgesi ile translasyon başlatıcı faktörlerden eIF4GI proteini ile interaksiyon göstererek hücresel proteinin influenza A mRNA'ları için translasyon aktivatörü olarak kullanımını sağlar (Aragon ve ark., 2000).

4.9. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile İlişkilendirilen Hücresel Proteinler

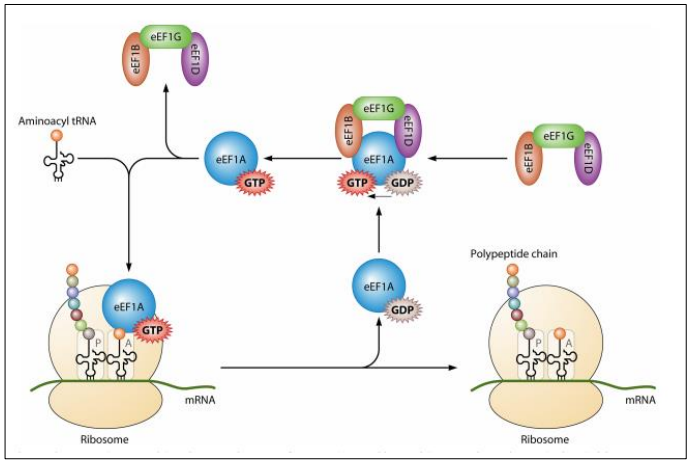
İnfluenza A virüsü NS1 proteini çok işlevli bir proteindir. Yapılan çalışmalar bu proteinin işlevlerini gerçekleştirirken çok sayıda hücresel protein ile etkileşim içerisine girdiğini göstermektedir. Aşağıda bu tez çalışmasına konu olan ve NS1 proteini ile ilişkisi saptanan proteinler verilmektedir.

4.9.1. Ökaryotik translasyon uzama faktörü-1γ alt ünitesi (EEF1G) proteini

Protein sentezi (translasyon); mRNA, tRNA, amino asitler, ribozomlar, enzimler, protein faktörler ve ATP/GTP olmak üzere çok sayıda bileşenin yer aldığı oldukça kompleks bir mekanizmadır. Translasyon başlama, uzama ve sonlanma basamakları olmak üzere üç aşamada gerçekleşir. Translasyonun uzama aşaması, uzayan polipeptid zincirinin karboksil ucuna amino asitlerin eklenmesi mekanizmalarını içerir. Amino asit yüklü tRNA'lar ribozomun A bölgesine bağlanır. Uzamakta olan peptid zinciri ribozomun P bölgesinden A bölgesine taşınarak yeni gelen amino asit ile peptid bağı oluşturur. Peptid bağı oluşumu peptidiltransferaz enzimi tarafından katalizlenir. Peptid bağının oluşumunun ardından ribozom translokasyon ile mRNA'nın 3'-ucuna doğru ilerler. Böylece yüksüz tRNA'nın ribozomun E bölgesine ve peptidil tRNA'nın ise ribozomun P bölgesine taşınması sağlanır. Bu döngü zincir tamamlanıncaya kadar tekrarlanır. Başlama ve sonlanma

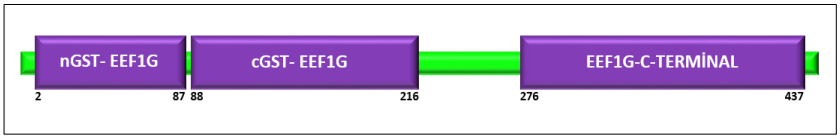
aşamalarında olduğu gibi translasyonun uzama aşamasında da protein faktörlerin ve yüksek enerjili bileşiklerin katılımı gerekmektedir (Riis ve ark., 1990). Ökaryotik translasyon uzama basamağında protein faktör olarak eEF1 (*İng. eukaryotic elongation factor-1*) ve eEF2 proteinleri görev alırken, enerji kaynağı olarak her bir döngüde 2 molekül GTP kullanılır. Yüksek enerjili bağın bir tanesi eEF1 proteini aracılığıyla amino asil-tRNA'ların ribozoma bağlanmasında diğer GTP molekülü ise eEF2 proteini ile ribozom translokasyonu için kullanılır (Neelagandan ve ark., 2020).

Ökaryotik translasyon uzama faktörlerinden eEF1 (eEF1H) proteini eEF1A (eEF1α) ve eEF1B (eEF1β) olmak üzere iki fonksiyonel bölgeden oluşur (Sang Lee ve ark., 2002). eEF1B kompleksi; eEF1B2 (eEF1Bα, eEF1B), eEF1D (eEF1δ, eEF1Bδ) ve eEF1G (eEF1γ, eEF1Bγ) olmak üzere üç alt üniteden oluşur. Bu yönüyle eEF1 kompleksi, iki eEF1α molekülü ve bir eEF1β kompleksinden oluşan pentamerik yapıda bir makromolekül olarak düşünülebilir. eEF1B2 ve eEF1D proteinleri amino-terminal bölgeleri ile eEF1G proteinine bağlanırken karboksi-terminal bölgede eEF1A proteinine bağlanır (Mansilla ve ark., 2002; Cao ve ark., 2014). Translasyon uzama döngüsünde GTP-bağlı aktif eEF1A molekülü, ribozomun A bölgesine kodona uygun amino asil-tRNA'ların bağlanmasını sağlar. Kodon tanıma ile doğru kodon-antikodon eşleşmesinin ardından GTP hidrolizi ile ribozom yapısında konformasyonel değişim meydana gelir. Bunun sonucunda GDP-bağlı inaktif eEF1A molekülü yapıdan ayrılır ve peptid bağı oluşumu aşamasına geçilir. eEF1B kompleksi yapısındaki alt üniteler ile birlikte guanin nükleotidi değişim faktörü (*İng. guanine nucleotide exchange factor, GEF*) gibi davranarak inaktif eEF1A molekülünün yeniden GTP-bağlı aktif hale gelebilmesini sağlar. Translasyonun uzama basamağının herbir döngüsünde tekrarlanan bu mekanizma ile amino asit yüklü tRNA'ların ribozoma bağlanması sağlanır (Brilot ve ark., 2013) (**Şekil 12**).



Şekil 12. EEF1G proteininin ökaryotik translasyon uzama aşamasındaki rolü (Li ve ark., 2013'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Tez çalışmasına konu olan, translasyonun uzama aşamasında görev alan insan EEF1G proteinini kodlayan gen, 11. kromozomun uzun kolunda (11q12.3 bölgesinde) yer almakta ve yaklaşık 14,5 kbç'lik bir bölgeyi kapsamaktadır. EEF1G proteini 438 amino asit bakiyesinden oluşur ve yaklaşık 50 kDa ağırlığındadır. İnsan EEF1G proteini mayalarda bulunan TEF4 proteini ile %38 homoloji göstermektedir. Hidrofobik özellik gösteren EEF1G proteini, yapısında üç fonksiyonel bölge taşır (Koonin ve ark., 1994; Jeppesen ve ark., 2003) (**Şekil 13**). Bunlar; Glutatyon-S-transferaz (GST)-benzeri amino-terminal domain (NT-eEF1G), Glutatyon-S-transferaz (GST)-benzeri karboksi-terminal domain (CT-eEF1G) ve karboksi-terminal domaindir (CD-eEF1G). EEF1G proteini NT-eEF1G domaini aracılığıyla eEF1B2 ve eEF1D proteinlerinin amino-terminal bölgeleri ile direkt olarak bağlanabilmektedir (van Damme ve ark., 1991). Sitoplazmik bir protein olan EEF1G, translasyon sonrası modifikasyonlardan fosforilasyon, asetilasyon (K132, K147, K434) ve S-nitrozilasyona (C194) tabi tutulur (Choudhary ve ark., 2009; Han ve Chen, 2008). Siklin bağımlı kinaz-1 (CDK1) aracılığıyla gerçekleştirilen fosforilasyon için EEF1G proteininin bilinen en az dört pozisyonu bulunmaktadır: T43, T230, S286, S406 (Le Sourd ve ark., 2006).



Şekil 13. EEF1G protein yapısındaki işlevsel bölgeler. **nGST-EEF1G,** Glutatyon-S-Transferaz (GST)-benzeri amino-teminal bölge. **cGST-EEF1G,** GST-benzeri karboksi-teminal bölge.

Translasyondaki görevine ilave olarak, yapılan çalışmalar sonucunda EEF1G proteininin çeşitli hücresel mekanizmalarda yer aldığı ve bazı proteinler ile interaksiyon gösterdiği saptanmıştır. EEF1G proteininin RNA-bağlanma özelliği ve RNA metabolizmasındaki rolü ilk kez hücre iskeletini oluşturan ara filament vimentin proteininin 3'-UTR bölgesine bağlandığının tespiti sonucunda ortaya konmuştur (Al-Maghrebi ve ark., 2002). Devam eden çalışmalarla EEF1G proteininin insan vimentin geni promotör bölgesine bağlandığı da gösterilmiştir (Corbi ve ark., 2010). Ökaryotik RNA polimeraz II enzimi alt ünitelerinden biri olan ve RNA polimeraz II enziminin alt ünitelerinin biraraya gelmesini sağlayan RPB3 proteininin bait (yem) olarak kullanıldığı maya ikili-hibrit deneylerinde, EEF1G proteini ile RNA polimeraz II enzimi alt ünitesi arasında fiziksel interaksiyon tespit edilmiştir (Corbi ve ark., 2010). Ayrıca ökaryotik gen ekspresyonunun 3'-uç işlenme mekanizmalarında da yer aldığı saptanmıştır. EEF1G proteini hücre iskeletini oluşturan proteinlerden tubulin ve ara filament protein olan keratine bağlanabilmektedir (Shi ve ark., 2009). EEF1G proteini N-terminal bölgede bulundurduğu GST domaini ile serbest radikallerin detoksifikasyonuna dahil olmaktadır (Lew ve ark., 1992; Palacios ve ark., 2017; Hassan ve ark., 2018). Yapılan çalışmalar ile EEF1G'nin lenfoma, beyin, karaciğer, böbrek, pankreas kanserleri gibi birçok kanser türü ile ilişkisi tespit edilmiştir. Bu çalışmalardaki ortak sonuç; kanser hücrelerinde EEF1G protein ekspresyonunun aşırı artışıdır. Bu sonucun EEF1G proteininin GST aktivitesi ile oksidatif strese verdiği cevapla ilişkili olduğu düşünülmektedir. Bununla birlikte *in vitro* çalışmalarda viral hepatitler (HBV, HCV) ile ilişkili hepatoselüler karsinom hücrelerinde EEF1G ekspresyonunun azaldığı tespit edilmiştir (Yoon ve ark., 2006). Translasyon uzama faktörü EEF1G proteini bazı virüsler ile ilişkilendirilmiş ve viral replikasyon ve patogenezde viral polimeraz

enzimi, yapısal olan/olmayan viral proteinler veya viral RNA'lar ile etkileşimleri saptanmıştır. EEF1G proteininin, HIV-1 enfeksiyonlarında rol oynadığı ve enfeksiyonun geç döneminde reverz transkripsiyonu uyardığı saptanmıştır (Warren ve ark., 2012). EEF1G proteininin FMDV'ün (Foot-and-mouth disease virus) yapısal olmayan ve interferon antagonisti olan 2B proteini ile ilişkisi, maya ikili-hibrit testleriyle saptanmış ve yapılan çalışmalarla memeli hücrelerinde de doğrulanmıştır (Zhang ve ark., 2017). Özellikle domateslerde patojen etki gösteren bitki virüslerinden TBSV'ün (Tomato bushy stunt virus) replikasyon ve patojenitesinin EEF1G protein ekspresyonu ile paralel olarak değiştiği ve EEF1G proteininin TBSV replikaz enzimi ile RNA sentezinde önemli roller üstlendiği saptanmıştır (Sasvari ve ark., 2011).

4.9.2. 60S ribozomal alt ünitesi nükleer çıkış GTPaz-1 (LSG1) proteini

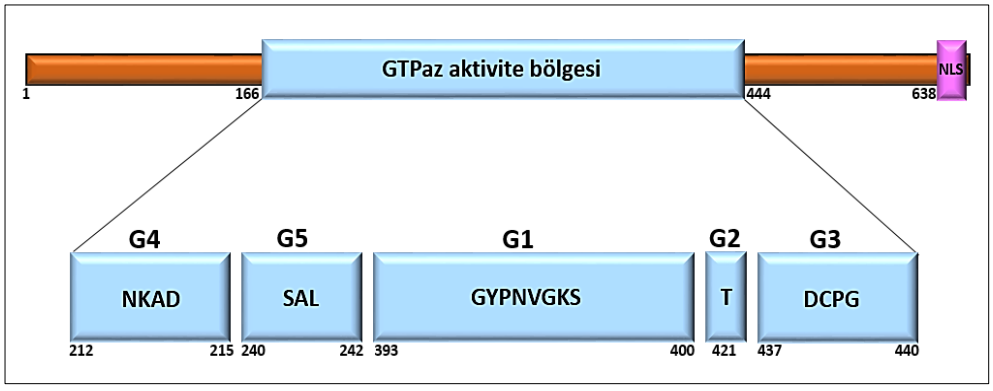
Ribozomlar, genetik kodun mRNA üzerinden translasyon ile proteine dönüşümünü sağlayan canlı organizmaların tamamında bulunan sitozolik bileşenlerdir. Ökaryotik hücrelerde bulunan 80S ribozomlar 40S ve 60S'lik iki alt üniteden oluşur. 40S ribozom alt ünitesi (küçük alt ünite), 18S ribozomal RNA molekülü ve 33 ribozomal proteinden oluşur. Translasyonda mRNA molekülünün bağlanması, çözülmesi ve taranması görevlerini yapar. 5S, 5.8S ve 28S rRNA molekülü ve 47 ribozomal proteinden oluşan 60S ribozom alt ünitesi (büyük alt ünite) ise peptid bağlarının oluşumunu ve peptidlerin kalite kontrolünü gerçekleştirir. Ribozom biyosentezi nükleolusta başlayarak nükleer por kompleksi aracılığıyla sitoplazmada sonlanan oldukça kompleks bir işlemdir. Ökaryotik ribozomların biyosentezinde başlıca snoRNA'lar, ekzo/endonükleazlar, metiltransferazlar, RNA helikazlar, ATPaz ve GTPaz'lar olmak üzere ribozomal olan/olmayan yaklaşık 200 faktör işlev görür (Weis ve ark., 2014). İnsan hücrelerinde ribozomal biyosentez RNA polimeraz I enzimi katalizörlüğünde, 18S, 5.8S ve 28S rRNA dizilerini içeren ribozomal DNA (rDNA) genlerinin 47S öncül-rRNA'lara (mayalarda 35S) transkripsiyonu ile başlar. 47S öncül-rRNA'lar, nükleoplazmada RNA polimeraz III enzimi ile transkribe edilen 5S rRNA ve sitoplazmada sentezlenen ribozomal proteinler ile birleşerek 90S yapısını oluşturur. Ribozomal protein mRNA'larının tanskripsiyonu nükleusta RNA polimeraz II ile gerçekleşir. Sitoplazmada proteine

dönüştükten sonra alt ünitelerin yapısına katılmak üzere nükleolusa dönerler. Meydana gelen bir dizi dinamik reaksiyonun sonunda 90S yapısı, ribozomal RNA ve proteinlerden oluşan olgunlaşmamış öncül-40S ribozomal küçük alt ünite ve öncül-60S ribozomal büyük alt ünitesine dönüşür. Nükleer eksportun ardından sitoplazmaya gelen öncül alt üniteler doğrudan translasyonda görev alamazlar. Alt ünitelerin farklı mekanizmalarla gerçekleştirdikleri sitoplazmik olgunlaşma reaksiyonları sonrası birleşmeleriyle translasyonda işlev gören 80S ribozom meydana gelmiş olur (Wilson ve Doudna Cate, 2012; Pelletier ve ark., 2018). Memeli hücrelerinde ortalama 10 milyon ribozom bulunduğu bilinmektedir.

Öncül-60S ribozomal büyük alt ünitesinin biyosentezi, bir eksport adaptör proteini olan Nmd3 (Nonsense-mediated mRNA decay-3) proteininin nükleolusta öncül-60S alt ünitesine (Heliks-38, Heliks-69 ve Heliks-89) bağlanması ile sitoplazmada devam eder (Gadal ve ark., 2001; Johnson ve ark., 2002). Ndm3 proteini karboksi-terminal bölgede lösin amino asitinden zengin nükleer eksport sinyal (NES) dizileri içeren bir proteindir. Bu diziler eksport reseptör proteini olan Crm1 proteini tarafından tanınır ve böylece öncül-60S alt ünitesinin sitoplazmaya geçişi eksportinler aracılığıyla Ran-GTP-bağımlı olarak Nmd3 proteini aracılığıyla gerçekleşir (Ho ve ark., 2000; Thomas ve Kutay, 2003). Transport sonrası yapıdan ayrılan Nmd3 proteini nükleolusa geri döner ve NLS sağlayıcısı olarak yeni öncül-60S alt ünitelerinin sitoplazmaya taşınmasını sağlar. Nmd3 proteini, öncül-60S alt ünitesi üzerinde peptidil transferaz merkezi olarak bilinen peptid bağı oluşumunun ve peptid salınımının gerçekleştirildiği bölgeleri (E, P ve A) kapsayan geniş bir alana bağlanır (Malyutin ve ark., 2017). NLS dizileri aracılığıyla sitoplazmaya transportu sağladıktan sonra Nmd3 proteininin, öncül-60S alt ünitesinin olgunlaşma mekanizmaları çerçevesinde, bağlandığı peptidil transferaz bölgesinden ayrılması gerekir. Translasyon mekanizmaları açısından son derece önemli olan bu aşama, GTPaz aktiviteli bir enzim olan LSG1 proteini aracılığıyla gerçekleşir (Kallstrom ve ark., 2003; Hedges ve ark., 2005). GTPaz'ların hücre bölünmesi, hücre döngüsü, sinyal iletimi, ribozomal alt ünitelerin birleşimi ve translasyon gibi birçok hücresel mekanizmada görev aldıkları bilinmektedir. LSG1 proteini TRAFAC (TRAnslation FACtors) sınıfında yer alan ve ribozom biyosentezinde görev yapan Ylqf-ilişkili GTPaz (YRG) ailesinin (Lsg1/Kre35, Bms1, Efl1/Ria1, Nog1, Nug1 ve Nug2/Nog2)

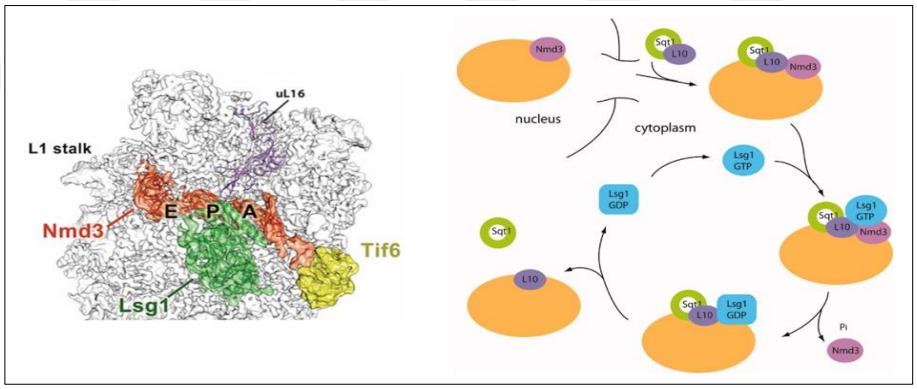
bir üyesidir (Leipe ve ark., 2002; Karbstein, 2007). Bu GTPaz'lardan LSG1 ve Efl1 sitoplazmik olgunlaşmanın son basamağında işlev görürken; diğerleri biyosentezin nükleus ve nükleolusdaki basamaklarında görev alır. Yapılan çalışmalarla LSG1 proteininin GTPaz aktivite bölgesinde yapılan mutasyonların sonucunda; Nmd3 proteininin sitoplazmada birikemediği ve ayrıca nükleolusa geri dönüp öncül-60S alt ünitesine bağlanamadığı tespit edilmiştir (Hedges ve ark., 2005). Böylece LSG1 proteininin öncül-60S alt ünitesinin sitoplazmik aktivasyonu açısından önemli roller üstlendiği görülmüştür.

İnsan LSG1 proteinini kodlayan gen, 3. kromozomun uzun kolunda (3q29 bölgesinde) yer almakta ve yaklaşık 31,5 kbç'lik bir bölgeyi kapsamaktadır. LSG1 proteini 659 amino asit bakiyesinden oluşan ve yaklaşık 75 kDa ağırlığında nükleotid bağlanma ve hidroliz aktivitelerine sahip bir proteindir. LSG1 proteini halkasal formda G4-G5-G1-G2-G3 şeklinde sıralanan 5 adet G-motifinden oluşan HSR1-MMR domaini taşımaktadır (Reynaud ve ark., 2005) (**Şekil 14**). Bu domain fonksiyonel olarak ribozom biyosentezinde işlev gören GTPaz domainidir. İnsan LSG1 proteini nükleositoplazmik olarak halkasal nükleer cajal cisimlerinde ve endoplazmik retikulumda lokalizasyon gösterir. Karboksi-terminal bölgede (638-654. amino asitler) nükleer lokalizasyon sinyali (NLS) taşır. Nükleus ve sitoplazma arasındaki geçişlerini Crm1-bağımlı eksport mekanizmaları ile gerçekleştirmektedir.



Şekil 14. LSG1 proteini yapısı ve işlevsel bölgeleri. LSG1 proteini GPTaz aktivite bölgesi 5 adet G-motifinden oluşmaktadır. G-motiflerine ait amino asit dizileri şekil üzerinde belirtilmiştir. **NLS,** nükleer lokalizasyon sinyali.

LSG1 proteininin en temel görevi ökaryotik ribozomal büyük alt ünitesinden adaptör Nmd3 proteininin ayrılmasını katalizleyerek olgun-60S alt ünitelerini meydana getirmektir. LSG1 proteini öncül-60S alt ünitesinin Heliks-69 sarmalında A2256 bazı ile; ayrıca Nmd3 proteini ile amino-terminal bölgede etkileşim halindedir. LSG1 proteini biyosentezdeki işlevini yerine getirebilmek için bir ribozomal protein olan RPL10 (uL16) proteinine ihtiyaç duyar. RPL10 bir şaperon olan Sqt1 proteini ile kompleks halinde bulunur. RPL10 proteininin büyük alt ünitenin heliks-38-89 yarığına bağlanmasıyla birlikte meydana gelen konformasyonel değişiklikler sonucunda peptidil transferaz merkezi boyunca yerleşmiş olan Nmd3 proteininin E ve P bölgelerindeki bağlanma stabilitesi bozulur. RPL10 proteini aracılığıyla meydana getirilen yeni konformasyonda açığa çıkan guanozin-2261 bazı ile LSG1 proteini etkileşim gösterir ve GTPaz aktivitesi uyarılır. Bunun sonucunda GTP hidrolizi gerçekleşir ve LSG1 proteininde meydana gelen konformasyonel değişiklikler ile Nmd3 proteininin öncül-60S yapısından ayrılması sağlanır (Kargas ve ark., 2019) (**Şekil 15**).



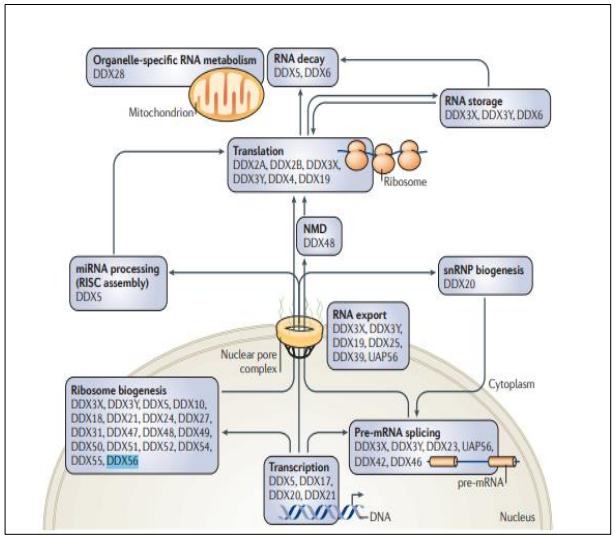
Şekil 15. LSG1 proteininin 60S alt ünitesine bağlanması ve ribozomal biyosentezdeki işlevi (Karbstein, 2007; Malyutin ve ark., 2017'den değiştirilerek kullanılmıştır).

LSG1 proteini hücre canlılığı için esansiyel bir proteindir. RNA interferens teknikler kullanılarak *LSG1* geni knock-down edilen HeLa hücrelerinde yapılan bir çalışma ile hücre sayılarında hızlı bir düşüş görüldüğü rapor edilmiştir. Benzer şekilde LSG1 transkript düzeyi azaltılan hücrelerde p53 aracılı hücresel yaşlanma yanıtlarının güçlü bir şekilde tetiklendiği saptanmıştır. Bu hücrelerde yaşlanma ile

ilişkili pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin (IL-6, IL-8) sentezinin sınırlandığı görülmüştür. Ayrıca LSG1 protein inhibisyonunun endoplazmik retikulumda hasarlanmalara yol açtığı da gösterilmiştir (Pantazi ve ark., 2019).

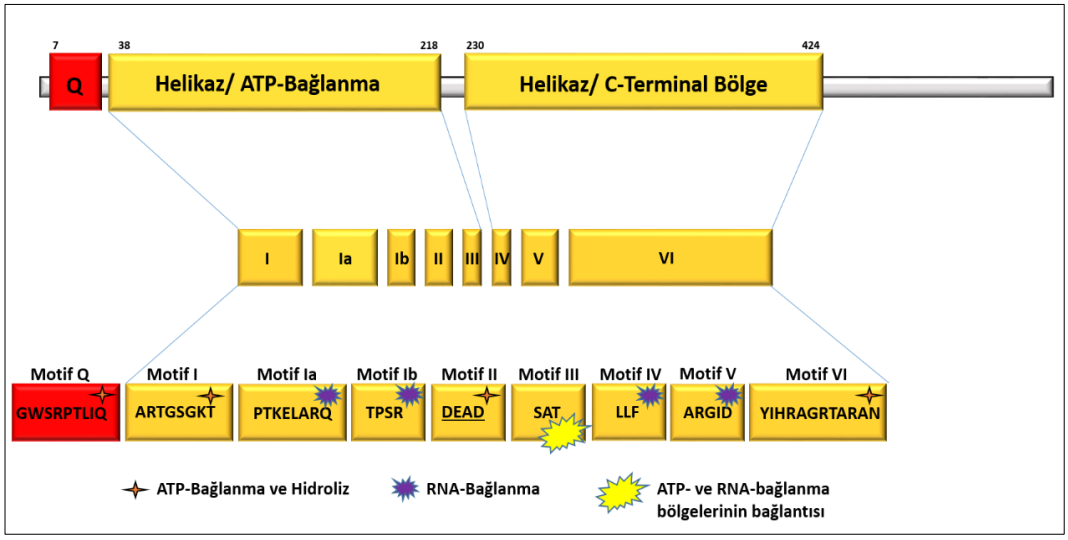
4.9.3. ATP- bağımlı RNA Helikaz 56 (DDX56) proteini

Helikazlar, DNA ve RNA moleküllerinin çift zincirli sarmal yapılarını ATP-bağımlı bir reaksiyon ile nükleotidler arasındaki hidrojen bağlarını koparark ayıran enzimlerdir. Helikaz enzimleri virüsler de dahil olmak üzere bakterilerden insanlara kadar birçok organizmada bulunur. İnsanlarda 64 RNA helikaz ve 31 DNA helikaz olmak üzere 95 helikaz enzimi tanımlanmıştır (Umate ve ark., 2011). Nükleik asit helikazlar amino asit dizileri, yapısal ve fonksiyonel özellikleri temel alınarak 6 büyük aileye (SF1-SF6) ayrılırlar (Singleton ve ark., 2007). DNA helikazlar SF1 ailesinde yer alır ve Walker A motifi [GXXXXGKT] taşırlar. RNA helikazlar ise SF1 ve SF2 ailesinde bulunur. RNA yapılarının yeniden düzenlenmesi, RNA-RNA veya RNA-protein interaksiyonlarını gerçekleştiren RNA helikaz enzimleri; ribozom biyosentezi, transkripsiyon, translasyon, mRNA işlenme mekanizmaları, mRNA'nın nükleositoplazmik transportu, RNA yıkımı, mRNA stabilitesi, hücre farklılaşması ve RNA virüslerinde replikasyon gibi çeşitli hücresel mekanizmalarda önemli görevler üstlenirler (Linder ve Jankowsky, 2011) (**Şekil 16**).



Şekil 16. Ökaryotik hücrelerde çeşitli mekanizmalarda görev alan RNA helikaz enzimleri (Linder ve Jankowsky, 2011'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Diğer beş grup ile kıyaslandığında, SF2 en büyük ve bilimsel araştırmaların yoğun olarak yapıldığı helikaz sınıfıdır (Gorbalenya ve ark., 1989; He ve ark., 2010). SF2 sınıfı RNA helikazları amino-terminal ve karboksi-terminal domainler ile çevrelenen korunmuş helikaz kor yapısı taşırlar (Buttner ve ark., 2007). Helikaz domaini, en az 12 motif yapısından oluşan (Motif-Q, I, Ia, Ib, Ic, II, III, IV, IVa, V, Va, VI) ve yapısal olarak bakteriyel rekombinaz A proteinine benzeyen (RecA-like domain) iki alt domainden oluşmaktadır (Pyle, 2008). Q, I, II ve VI motifleri ATP-bağlanma ve hidroliz; Ia, Ib, Ic, IV, IVa ve V motifleri RNA-bağlanma; III ve Va motifleri ise ATP-bağlanma ve RNA-bağlanma bölgeleri arasındaki etkileşimi sağlamada görev alırlar. SF2-RNA helikazları, motif-II yapısını oluşturan amino asit dizisine göre 5 alt sınıfa (DEAD, DEAH, RIG-I-benzeri DExH, SKI2-benzeri DexH ve viral DexH) ayrılır. DEAD *(Asp-Glu-Ala-Asp)* ve DEAH *(Asp-Glu-Ala-His)* dizilimli RNA helikazlar SF2 sınıfının en geniş üyeleridir (Fuller-Pace, 2006). DDX56 proteini, motif-II'de DEAD dizisi taşıyan ATP-bağımlı RNA helikaz (DEAD box- ATP dependent- RNA helicase) enzimidir. İnsan DDX56 proteinini kodlayan gen, 7. kromozomun kısa kolunda (7p13 bölgesinde) yer almakta ve yaklaşık 8,1 kbç'lik bir bölgeyi kapsamaktadır. DDX56 proteini 548 amino asit bakiyesinden oluşmakta ve yaklaşık 61,5 kDa ağırlığındadır. *S. cerevisiae* hücrelerine ait Dbp9 proteininin homoloğudur (Daugeron ve ark., 2001).



Şekil 17. DEAD motif yapısı taşıyan DDX56 proteininin helikaz kor yapısı. İki alt domainden oluşan kor yapısına ait korunmuş motiflerin amino asit dizileri ve fonksiyonları şekil üzerinde belirtilmiştir.

DDX56 proteini ilk kez Zirwes ve ark. tarafından ökaryotik hücrelerde 60S ribozom alt ünitesinin biyosentezinde görev alan faktörden biri olarak tanımlanmıştır (Zirwes ve ark., 2000). Yapılan çalışmalar ile DDX56 protein miktarı azaltılan BJ-fibroblast hücrelerinde RNA polimeraz I aracılı 47S rRNA transkript seviyesinin %50'den fazla azaldığı rapor edilmiştir (Zhang ve ark., 2011). Benzer şekilde HeLa hücrelerinde DDX56-siRNA'lar kullanılarak 60S ribozomal alt ünitesinin bir bileşeni olan RPL29 proteininin nükleusta biriktiği saptanmıştır (Wild ve ark., 2010).

Nükleolar helikaz olan DDX56 proteini RNA-bağlanma, ATP-bağlanma ve hidrolaz aktivitelerine sahip iki alt domainden oluşmaktadır (**Şekil 17**). Katalitik döngüde, DDX56 proteini direkt olarak RNA sarmalına bağlanır. Bu bağlanmayı takiben ATP molekülü de helikazın iki alt domainin arasında bulunan boşluğa bağlanarak RNA molekülü ile karşılıklı olarak konumlanır. RNA ve ATP moleküllerinin bağlanmasıyla meydana gelen konformasyonel değişim sonucunda RNA sarmalı lokal olarak açılır. Helikaz aktivitesi ATP molekülünün varlığında gerçekleşen bir olaydır. Zincirlerin açılmasının ardından helikaz enzimi ATP hidrolizi ile RNA zincirinden ayrılır ve aktivite göstermek üzere yeniden döngüye katılır (Andreou ve Klostermeier, 2013; Martin ve ark., 2013).

RNA helikazlar viral enfeksiyonlar başta olmak üzere nörolojik hastalıklar, kanser ve yaşlanma gibi birçok hücresel mekanizmada yer alırlar (Steimer ve Klostermeier, 2012). Viral enfeksiyonlarda gerek viral gerekse anti-viral etkiye sahip çok sayıda RNA helikaz enzimi tanımlanmıştır (Steimer ve Klostermeier, 2012). Hepatit C virüslerine (HCV) ait NS3 proteini viral helikazlardandır ve viral replikasyonda ve virüs partiküllerinin birleşmesinde görev alır (Dumont ve ark., 2006). Kendilerine ait RNA helikaz enzimleri bulunmayan virüsler yaşam döngülerinde konak hücreye ait hücresel RNA helikazları kullanır. Hücresel helikazlardan DDX1 ve DDX3 proteinleri HIV-1 virüsü Rev proteini ile interaksiyon göstererek viral gen ekspresyonunun düzenlenmesinde rol oynarlar (Jeang ve Yedavalli, 2006; Edgcomb ve ark., 2012). Ayrıca HIV-1 transkriptlerinin Rev-aracılı olarak nükleustan taşınmasını sağlarlar. Benzer şekilde HIV-1 ile ilişkilendirilen DDX5 (p68), DDX6, DDX17, DDX21, DDX24, DDX47, DHX30 ve DHX36 helikazları enfeksiyonda transkripsiyonun regülasyonu, transkript lokalizasyonu,

viral kurulum ve paketlenmede görev alır (Ma ve ark., 2008; Zhou ve ark., 2008; Yu ve ark., 2011). DDX3 proteininin vaccinia virüsü K7 proteini ile interaksiyon göstererek interferon genlerinin transkripsiyonel aktivasyonunu engellediği de saptanmıştır (Schroder ve ark., 2008). DHX9 (RHA) proteini retrovirüs, adenovirüs ve flavovirüs enfeksiyonlarında kofaktör görevi üstlenerek replikasyona katkı sağlar (Li ve ark., 1999; Fujii ve ark., 2001). FMDV RNA'ları 3'- ve 5'-terminal bölgelerde DHX9 proteini ile bağlanarak viral replikasyonun ve viral protein sentezinin düzenlenmesini sağlar (Lawrence ve Rieder, 2009). Viral enfeksiyonlarda görev alan hücresel RNA helikazlardan bazıları anti-viral immün yanıtların oluşmasını tetikleyici etki gösterir. Viral enfeksiyonlar sonucu hücre içinde oluşan viral RNA moleküllerinin tanınmasında sitozolik bir reseptör olan RIG-I (DDX58) ve MDA5 helikaz proteinleri işlev görür (Yoneyama ve ark., 2005). RIG-I proteininin viral RNA'yı algılaması sonucu hücrede doğal immün yanıtların oluşumu tetiklenir (Yoneyama ve ark., 2004). Ayrıca yapılan çalışmalarla DDX3 proteininin HCV ve HIV-1 virüslerinin aksine hepatit B virüs (HBV) replikasyonu üzerinde sınırlandırıcı etkisi saptanmıştır. DDX3 proteini HBV polimeraz enzimine bağlanarak reverz transkripsiyon aktivitesini inhibe eder (Wang ve ark., 2009).

Yapılan çalışmalarla çok sayıda hücresel RNA helikaz proteininin influenza A virüs replikasyonu üzerine de etki ettiği tespit edilmiştir. Hücresel RNA helikazlardan UAP56 (DDX39B) proteininin çift zincirli RNA molekülünün oluşumunu, dolayısıyla doğal immün yanıtların aktivasyonunu engelleyici etki gösterdiği saptanmıştır (Wisskirchen ve ark., 2011). Ayrıca influenza A/PR/8 virüsü NP proteininin bait olarak kullanıldığı maya ikili-hibrit testi sonucunda hücresel mRNA eksport proteini UAP56'nın viral NP proteininin nükleik asit bağlanma bölgesiyle interaksiyon gösterdiği ve böylece viral genomun NP proteini ile paketlenmesinde rol oynadığı ileri sürülmektedir (Morris ve ark., 2020). DDX19 proteininin enfekte hücrelerde viral mRNA'nın eksportunda görev aldığı bilinmektedir (Diot ve ark., 2016). IFN-β sinyal faktörü olarak tanımlanan DDX3 RNA helikaz proteini, influenza A virüsü enfeksiyonunda TBK1 ve IKKε ile birlikte IRF3 fosforilasyonunu gerçekleştirerek interferon yanıtlarının oluşumunu sağlamaktadır (Gu ve ark., 2013). İnfluenza A virüsü interferon antagonistlerinden PB1-F2 proteini DDX3 proteininin proteozomal yıkımını sağlayarak IRF3

fosforilasyonunu inhibe eder. PB1-F2 proteininin bu etkisinin 1918 influenza A virüsü pandemisinde virülansa büyük katkı sağladığı düşünülmektedir (Park ve ark., 2019). Bir başka hücresel RNA helikaz olan MOV10 (Moloney leukemia virus 10) proteininin ise viral nükleoproteinlerin nükleer transportunu inhibe ettiği ve bu yönüyle anti-influenza virüs faktörü gibi davrandığı saptanmıştır (Zhang ve ark., 2016).

4.10. CRISPR/Cas9 Teknolojisi ve Genom Düzenleme

Genom düzenlenmesinde hedeflenmiş nükleazlar yaygın olarak kullanılmaktadır. 'Moleküler makas' olarak adlandırabileceğimiz bu moleküller; çinko parmak nükleazlar (*İng. Zinc Finger Nucleases, ZFN*), transkripsiyon aktivatör benzeri nükleazlar (*İng. Transcription Activator Like Effector Nucleases, TALEN*), meganükleazlar ve CRISPR/Cas9 nükleazıdır (Gaj ve ark., 2013).

ZFN'ler, ilk olarak 2005 yılında bitki genomunda değişiklik yapmak için kullanılan ve böylece genomda tanımlanan ilk modifikasyon enzimleridir. 18-36 nükleotidlik bir hedefi tanıyabilmektedirler. Bu enzimlerin, DNA'ya bağlanma bölgesi çinko parmak motifinde olduğu için çinko parmak nükleaz olarak tanımlanmaktadır (de Pater ve ark., 2009). İkinci olarak keşfedilen genom modifikasyon enzimi TALEN'dir. İlk defa 2011 yılında bitki genomunun düzenlemesinde kullanılmıştır. ZFN tekniği ile oldukça benzer özelliklere sahip olmasının yanı sıra, toksisitesi ve hedef dışı etkisi daha düşüktür (Cermak ve ark., 2011). En son geliştirilen genom düzenleme aracı ise biyoteknoloji alanında önemli bir dönüm noktası olan CRISPR/Cas9 (Düzenli Aralıklarla Bölünmüş Kısa Palindromik Tekrar Kümeleri/Crıspr İlişkili Nükleaz-9; *İng. Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats/ CRISPR Associated Cas 9*) tekniğidir.

CRISPR/Cas9 sistemi, bakterilerin faj DNA'ları ile her temas ettiklerinde 14 adet 29 nükleotidlik tekrar dizileri arasına 32 nükleotidlik DNA (spacer) dizilerinin dahil edilmesinin (insert) keşfedilmesiyle 1987 yılında ilk olarak *E. coli* bakterisinde tanımlanmıştır (Ishino ve ark., 1987). 2000 yılında ise benzer kümelenmiş tekrarların başka bakteri ve arkealarda da keşfedilmesiyle CRISPR sekansının aslında bakteriyofajlara karşı geliştirilen direnç mekanizmalarından kazanılmış bağışıklık

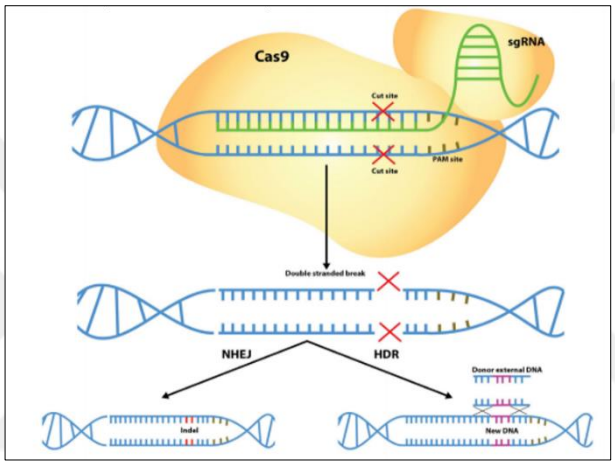
sistemi olduğu anlaşılmıştır (Gasiunas ve ark., 2012). Yapılan çalışmalarla sürekli olarak yeni özellikleri keşfedilen bu sistem hakkındaki bilgilerimiz 2012 yılında Jennifer A. Doudna ve Emmanuelle Charpentier'in Cas proteinlerinin ve Tip II CRISPR sisteminin moleküler mekanizmasını aydınlatmalarıyla birlikte daha ileri bir seviyeye taşınmıştır (Jiang ve Doudna, 2015). CRISPR-Cas9 sisteminin ökaryotik hücrelerde genom düzenleme aracı olarak kullanılabileceği ise ilk olarak F. Zhang tarafından gösterilmiştir (Cong ve ark., 2013). Bununla birlikte, CRISPR/Cas9 sistemi Science dergisi tarafından 2015 yılında "Yılın Atılımı" olarak seçilmiş (https://science.sciencemag.org/content/350/6267/1456.summary, Erişim tarihi: 14.05.2021) ve 2020 yılında E. Charpentier ve J.A. Doudna'ya Nobel Kimya Ödülünü kazandırmıştır (Luthy ve Lamb, 2020). Kasım 2018'de Çin'de He Jiankui isimli bir araştırmacı T lenfositlerinin yüzeyinde yer alan ve HIV-1 virüsünün hücreye tutunmasını sağlayan reseptör genini (*CCR5*) bu tekniği kullanarak yeniden düzenlediğini ve böylece HIV-1 virüsüne karşı doğal bağışık olarak ikiz kız bebeklerin dünyaya getirildiği bilgisini paylaştı. Her ne kadar eleştiri ve etik tartışmalarını beraberinde getirse de; Lulu ve Nana bebekler CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak modifiye edilmiş DNA ile dünyaya gelen bilinen ilk insan vakası olmuştur (Baig, 2019).

CRISPR/Cas9 sistemi basitliği, düşük maliyeti ve yüksek verimlilikle uygulanabilirliği bakımından ZFN ve TALEN sistemlerine göre çeşitli avantajlara sahiptir. Ancak CRISPR/Cas9 sisteminin diğer endonükleaz sistemlerinden en önemli farklılığı, DNA molekülüne bağlanma mekanizmasının protein aracılığıyla değil yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda bir kısa rehber RNA (small guide RNA, sgRNA) molekülü aracılığıyla gerçekleşiyor olmasıdır (Jansen ve ark., 2002).

CRISPR/Cas9 sisteminin üç temel bileşeni bulunmaktadır: ***i.*** Tip II CRISPR sistemi içinde yer alan Cas9 endonükleaz enzimi. ***ii.*** Hedef DNA'ya bağlanabilen ve Cas9 enziminin izole edildiği bakteri türüne bağlı olarak 20-22 nükleotid uzunluğunda sentetik olarak dizayn edilebilen sgRNA molekülü. ***iii.*** Cas9 enziminin çalışabilmesi için sgRNA molekülünün genomda karşılık geldiği bölgede bulunması zorunlu olan ve Cas9 enziminin izole edildiği bakteri türüne bağlı olarak nükleotid

dizisi (NGG-NNNNGATT) ve uzunluğu (3-8 nt) değişebilen protoaralık bitişik motif dizisi *(İng. protospacer adjacent motif, PAM)* (Mali ve ark., 2013).

Rehber RNA (sgRNA) molekülü, kodlayıcı olmayan trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) molekülü ve hedef DNA dizisine spesifik olan CRISPR RNA (crRNA) molekülünün kimerik halde bir birleşimidir (Khan ve ark., 2019). crRNA molekülü genomda hedeflenecek alanı belirlerken, tracRNA molekülü Cas9 enziminin hedef bölgeye gelmesini indükleyerek Cas9 enziminin rehber RNA'ya bağlanmasına aracılık eder.



Şekil 18. CRISPR/Cas9 sistemi ile genom düzenleme mekanizmaları (Cribbs ve Perera, 2017'den değiştirilerek kullanılmıştır).

Çok fonksiyonlu bir DNA endonükleaz olan Cas9 enzimi, genom düzenleme sistemi içinde ilk olarak (gRNA) rehber RNA'ya bağlanır. Bu bağlanma sonucunda genomda kesim yapılacak bölge hedeflenmiş olur. İkinci olarak, oluşan gRNA-Cas9 kompleksi hedef DNA dizisine bağlanır. Ancak bu bağlanma da hedef DNA dizisinin 3'-bölgesinde bulunan PAM tanıma dizisi oldukça önemlidir. Çünkü Cas9 enzimi PAM tanıma dizisini tanıyarak hedef DNA dizisine bağlanmakta ve hedef DNA molekülünü PAM dizisinin 5'- upstream bölgesinde 3. ve 4. bazlarının arasından çift zincir halinde kesebilmektedir. CRISPR/Cas9 sistemi ile DNA'nın her iki zincirinde oluşturulan kırıklar, DNA tamir mekanizmalarından homolog olmayan uç birleştirmesi (NHEJ) veya homolog uç birleştirmesi (HR) ile tamir edilmektedir (**Şekil 18**). Bunun bir sonucu olarak da genom düzenleme stratejileri, DNA tamir

mekanizmaları sonucu ortaya çıkan insertsiyonlara veya delesyonlara dayanmaktadır (Bortesi ve Fischer, 2015).

5. GEREÇ ve YÖNTEM

5.1. Kullanılan Kimyasal Maddeler

Adenin	Sigma Aldrich, ABD
Agar	Difco, ABD
Agaroz	Sigma Aldrich, ABD
Akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Amido black	Merck, Almanya
Amonyum persülfat	Merck, Almanya
Ampisilin	Carlo Erba, İtalya
Bis-akrilamid	Sigma Aldrich, ABD
Bromofenol mavisi	Sigma Aldrich, ABD
BSA-Fraksiyon-5	Roche, İsviçre
Dekstroz	Sigma Aldrich, ABD
Dimetil sülfoksit (DMSO)	Sigma Aldrich, ABD
Di-potasyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Di-sodyum hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Di-tiyo bis(süksinimidil propiyonat) **(**DSP)	Sigma Aldrich, ABD
Di-tiyotreitol (DTT)	Sigma Aldrich, ABD
Etidyum bromür	Fluka, Almanya
Etil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Etilendiamintetraasetik asit (EDTA)	Sigma Aldrich, ABD
Fenilindiamin	Sigma Aldrich, ABD
Fenol	Sigma Aldrich, ABD
Formaldehit	Merck, Almanya
Dimetilformamid	Sigma Aldrich, ABD
Glasiyal asetik asit	Sigma Aldrich, ABD
Gliserin	Sigma Aldrich, ABD
Glukoz	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
Kloroform	Merck, Almanya
Lityum asetat	Merck, Almanya
Lösin	Sigma Aldrich, ABD
Magnezyum sülfat	Merck, Almanya
Mangan klorür	Merck, Almanya
Metil alkol	Sigma Aldrich, ABD
Orto-Nitrofenil Galaktozid (ONPG)	Sigma Aldrich, ABD
Nonidet P-40	Sigma Aldrich, ABD
Paraformaldehit	Santa Cruz, ABD
Polietilenglikol-4000	Santa Cruz, ABD
Penisilin/Streptomisin	Sigma Aldrich, ABD
Polietilenimin (PEI)	Sigma Aldrich, ABD
Potasyum asetat	Merck, Almanya
Potasyum di-hidrojen fosfat	Merck, Almanya
Potasyum klorür	Merck, Almanya
Puromisin	Sigma Aldrich, ABD
Salmon sperm DNA (ssDNA)	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum asetat	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum azid	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum dodesil sülfat (SDS)	Sigma Aldrich, ABD
Sodyum di-hidrojen fosfat	Merck, Almanya
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
Triton X-100	Sigma Aldrich, ABD
Tween-20	Sigma Aldrich, ABD
Yağı alınmış süt tozu	Sigma Aldrich, ABD

Urasil	Sigma Aldrich, ABD
1,4-Piperazindietanesulfonik asit (PIPES)	Sigma Aldrich, ABD
2-*β*-Merkaptoetanol (2-*β*-ME)	Sigma Aldrich, ABD
3-Amino-1,2,4-triazole (3-AT)	Sigma Aldrich, ABD
4',6'-diamino-2-fenil-indol (DAPI)	Sigma Aldrich, ABD
8-Hidroksikinolin	Sigma Aldrich, ABD

5.2. Enzimler

Restriksiyon Endonükleaz Enzimleri:

Genlerin klonlanması çalışmalarının çeşitli aşamalarında ve elde edilen plazmit DNA'ların kontrol edilmesinde *Bam*HI, *Bbs*I, *Bgl*II, *Bsa*AI, *Eco*RI, *Eco*RV, *Eco*0109I, *Hind*III, *Pst*I, *Xba*I (MBI Fermentas, Roche veya New England Biolabs) restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanıldı.

DNA Modifikasyon Enzimleri:

Karides Alkalen Fosfataz (*İng. shrimp alkaline phosphatase- SAP*) enzimi (MBI Fermentas), Klenow Enzimi, T4 DNA Ligaz (TaKaRa) ve T4 Polinükleotid Kinaz (New England Biolabs) enzimleri gen klonlama çalışmalarında kullanıldı.

Termostabil DNA polimerazlar:

PZR ile DNA moleküllerinin çoğaltılması ve elde edilen rekombinant plazmit DNA'ların kontrol deneylerinde Taq DNA polimeraz enzimleri (New England Biolabs, Episozyme ve Intron Biotechnolgy), *Phusion* High-Fidelity DNA Polymerase (Thermo Scientific) ve Kod-plus (Toyobo) enzimlerinden yararlanıldı.

Diğer enzimler:

Çalışmada cDNA sentezinde Reverz Transkriptaz enzimi (Toyobo), DNA veya RNA kontaminasyonlarının giderilmesinde DNaz veya RNaz enzimleri ve maya kontrol deneyleri için β-galaktozidaz enziminden yararlanıldı.

5.3. Ticari Kitler

Çalışmanın değişik aşamalarında, total RNA izolasyon kiti (Qiagen), genomik DNA izolasyon kiti (Invitrogen), DNA jel ekstraksiyon kiti (Qiagen ve Invitrogen),

DNA ligasyon kiti (TaKaRa) ve orta-ölçekte plazmit izolasyon kiti (Qiagen) kullanıldı.

5.4. Antikorlar

Primer Antikorlar:

Fare monoklonal anti-NS1 (Santa Cruz, sc-130568), tavşan poliklonal anti-NS1 (Invitrogen, PA5-32243), fare monoklonal anti-HA (Santa Cruz, sc-7392), tavşan orjinli poliklonal anti-Flag (Invitrogen, MA1-91878), tavşan poliklonal anti-GST (Abcam, ab9085), tavşan poliklonal anti-M1 serum ve fare monoklonal anti-Aktin beta (Abcam, ab11003) antikorları kullanıldı.

Sekonder Antikorlar:

Yaban turpu peroksidazı (*İng. horseradish peroxidase- HRP*) konjuge keçi anti-fare IgG (Invitrogen, 31420), HRP-konjuge keçi anti-tavşan IgG (Invitrogen, 31423), Alexa488-konjuge keçi anti-fare IgG (Abcam, ab150113) ve Alexa568-konjuge keçi anti-tavşan IgG (Abcam, ab175471) antikorları kullanıldı.

5.5. Cihaz ve Gereçler

CO_2 etüv	Sanyo, Japonya
Çalkalayıcı etüv	N- Biotek, Güney Kore
Çalkalayıcı su banyosu	GFL, Almanya
Derin dondurucu (-80°C)	Panasonic, Japonya
Dikey jel elektroforez cihazları	Omnipage, İngiltere
Dikey tüp karıştırıcısı	Dynal Biotech, ABD
Etüv (Maya- Bakteri)	Memmert, Almanya/ N-Biotek, G.Kore
Floresans mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Gerçek Zamanlı PZR cihazı	Bio-Rad, ABD
Hassas terazi	Shimadzu, Japonya
Jel görüntüleme cihazı	DNR Bio-imaging systems, Israil
Karıştırıcı	N- Biotek, Güney Kore
Manyetik karıştırıcı	Heidolph, Almanya

Mikropipetler	Gillson-Thermo-Eppendorf
Otoklav	N- Biotek, Güney Kore
pH metre	Hanna instruments, Portekiz
PZR cihazları	ABI, ABD / Techne, ABD
Saf su cihazı	GFL, Almanya
Soğutmalı santrifüjler	Sigma, ABD / Beckman Coulter, ABD
Spektrofotometre	Shimadzu BioSpec-1601, Japonya
Steril çalışma kabini	Holten, Danimarka
Sterilizatör	Heraeus, Almanya
Su banyosu	GFL-Thermolab / Isolab, Almanya
Ters/Inverted mikroskop	Olympus BH40, Japonya
Tüp karıştıcı (vorteks)	Heidolph, Almanya
U.V. Transillüminatör	Vilber Lourmat, Fransa
Yatay jel elektroforez cihazı	Labnet, ABD

5.6. Besiyerleri

5.6.1. Bakteriyel besi ortamları

Luria Bertani (LB) besiyeri:

10 gr tripton (Bacto), 5 gr maya özütü (Bacto) ve 10 gr sodyum klorür distile su içerisinde çözündürülerek 1 litreye tamamlandı. Hazırlanan LB besiyeri, 1 atmosfer basınç altında, 121 °C'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi.

Luria Bertani Agar (LBA) besiyeri:

LB sıvı besiyerine % 1,5 (a/h) oranında agar eklenerek hazırlandı. Hazırlanan LBA besiyeri, 1 atmosfer basınç altında, 121 °C'da 20 dakika otoklavda bekletilerek steril edildi. Otoklav işleminin ardından, besiyeri 10 cm'lik petrilere döküldü. Oda sıcaklığında katılaşan besiyerleri 4 °C'da saklandı.

Gerektiğinde LB ve LBA besiyerlerine 100 µg/ml final konsantrasyonda ampisilin eklendi.

5.6.2. Maya besiyerleri

YPAD (Yeast-Pepton-Adenin-Dekstroz) besiyeri:

10 gr maya özütü, 20 gr pepton ve 0,1 gr adenin distile su içerisinde çözündürülerek 900 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için ortama 100 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyerleri 1 atmosfer basınçta, 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklav sonrası ortama 100 ml % 20 (a/h) konsantrasyonda steril dekstroz çözeltisi eklendi. Katı YPAD besiyerlerinin hazırlanmasında, otoklavlama işleminden önce besi ortamına % 2 oranında agar katıldı. Otoklav sonrasında, besiyerine dekstroz eklendi ve 10 cm'lik petrilere döküldü. Oda sıcaklığında katılaşan besiyerleri 4 °C'da saklandı.

Katı Sentetik Dekstroz (SD) besiyeri:

6,7 gr amino asit içermeyen maya azot kaynağı (*İng. yeast nitrogen base: YNB*) yaklaşık 500 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Üzerine 20 gr agar eklendi ve ortam hacmi 800 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için besi ortamına 100-200 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyeri 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklav işleminden sonra, ortama 100 ml steril edilmiş %20 (a/h) dekstroz ve 100 ml x10 konsantre histidin, lösin ve triptofan içermeyen amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi (*İng. 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 katılaşmaları sağlanarak 4 °C'da saklandı.

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

1,34 gr amino asit içermeyen YNB distile su içerisinde çözündürülerek 152 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için besi ortamına 20-40 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyeri 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Otoklavlama işleminden sonra ortama önceden steril edilen 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 katılaşması sağlanarak 4 °C'da saklandı.

Sentetik Dekstroz /+his+ade (SD+HA) besiyeri:

1,34 gr amino asit içermeyen YNB distile su içerisinde çözündürülerek 154 ml'ye tamamlandı. pH ayarı için besi ortamına 20-40 µl 2 N NaOH eklendi. Besiyeri 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutularak steril edildi. Sterilizasyon sonrası besiyerine 20 ml daha önceden steril edilen % 20 (a/h) dekstroz, 20 ml 10x konsantre DO çözeltisi, 2 ml 100x konsantre histidin ve 4 ml 50x konsantre adenin eklendi. Katı SD+HA besiyeri hazırlamak için besi ortamına sterilizasyon öncesi 2 g agar katıldı. Sterilizasyondan sonra gerekli maddeler eklendikten sonra 10 cm'lik petrilere ekildi ve oda sıcaklığında katılaşmaya bırakıldı. Ardından 4 °C'da saklandı.

5.6.3. Memeli hücre kültürü besiyerleri

Memeli hücrelerinin üretilmesinde kullanılan besiyeri:

Memeli hücrelerinin üretilmesinde glukoz konsantrasyonu 1 gr/L olan D'MEM-(Dulbecco's Modified Eagle's Medium besiyeri; Gibco, ABD) kullanıldı. Öncelikle 4x konsantre stok besiyeri hazırlandı. Bunun için 20 gr toz haldeki D'MEM, steril deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek çözelti hacmi 500 ml'ye tamamlandı ve 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi. Memeli hücreleri, sıcaklık ile (56 °C'da 30 dk. inkübasyon ile) inaktive edilmiş % 10 (h/h) oranında FCS (fetal calf serum) içeren D'MEM besiyerinde üretildi. Besiyeri; 125 ml 4x konsantre D'MEM, 325 ml steril deiyonize distile su, 50 ml FCS (Gibco) ve 5 ml 100x konsantre penisilin (100 IU/mL) / streptomisin (100 µg/mL) (Gibco) karıştırılarak hazırlandı. Besiyerine 4-5 ml % 7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek pH 7,3-7,4'e ayarlandı.

Memeli hücrelerinin devamlılığının sağlanmasında kullanılan muhafaza besiyeri:

Memeli hücrelerinin üretilmesinden ziyade, sadece canlılığının sürdürülmesinin amaçlandığı çalışmalarda muhafaza besiyeri (*İng. maintenance medium*) kullanıldı. Besiyeri 12,5 ml 4x konsantre D'MEM, 35,5 ml steril deiyonize distile su, 0,5 ml 100x konsantre vitamin, 0,5 ml 100x konsantre penisilin /streptomisin, 1 ml % 10 BSA ve

1 µl % 0,25 tripsin çözeltisi karıştırılarak hazırlandı. Besiyerine 0,3-0,4 ml % 7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek ortam pH' sı 7,3-7,4'e ayarlandı.

Virüs titrasyonunun saptandığı plak testi deneylerinde agaroz içeren muhafaza besiyeri kullanıldı. Bunun için; % 0,8-1,2 agaroz çözeltisi 121 ºC'da 20 dakika otoklavda tutulduktan sonra 43 ºC'a ayarlı su banyosuna alınarak deney boyunca aralıklarla karıştırıldı. Besiyeri, bu şartlarda hazırlanan agaroz çözeltisinin üzerine eşit hacimde ve sıcaklıkta 2x konsantre muhafaza besiyerinin eklenmesi ile hazırlandı.

Serum içermeyen besiyeri:

Plak testlerinde hücrelerin yıkama işlemleri için serum (FCS) içermeyen D'MEM besiyeri kullanıldı. Bunun için, 25 ml 4x konsantre D'MEM ve 75 ml steril deiyonize distile su karıştırıldı. Ortama 0,4-0,5 ml % 7,5 sodyum bikarbonat çözeltisi eklenerek pH ayarı yapıldı.

5.7. Çözeltiler

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

29 gr akrilamid ve 1 gr bis-akrilamid, deiyonize distile su içinde çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçirildi.

5.7.2. Amido Black Boya Çözeltisi (% 0,5 – a/h)

0,5 gr amido black boyar maddesi 45 ml etanol içerisinde çözündürüldü. Çözelti üzerine 10 ml asetik asit eklenerek çözelti hacmi deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlandı.

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

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

5.7.4. Bloklama çözeltisi (Yağsız süt tozu, % 5 – a/h)

25 gr yağsız süt tozu, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 474 ml'ye tamamlandı. Çözeltiye 25 ml 20x TBS, 5 ml % 10 Triton X-100 ve 1 ml % 10 Sodyum azid (NaN_3) eklendi. Çözelti 4 °C'da saklandı.

5.7.5. Bovin Serum Albümin çözeltisi (BSA, % 10 – a/h)

10 gr BSA-Fraksiyon-5, tamponlanmış fizyolojik tuzlu su içerisinde çözündürüldü ve hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçildi.

5.7.6. 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 tutularak steril edildi.

5.7.7. Di-potasyum hidrojen fosfat çözeltisi (K_2HPO_4, 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).

5.7.8. Di-sodyum hidrojen fosfat çözeltisi (Na_2HPO_4, 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).

5.7.9. Di-tiyo bis(süksinimidil propiyonat) çözeltisi (DSP, 0,1 M)

0,4 gr DSP, DMSO (Dimetil sülfoksit) içerisinde çözündürüldü ve hacim 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı (DSP, Mw:404,42).

5.7.10. Di-tiyotreitol çözeltisi (DTT, 0,1 M)

0,15 gr DTT, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve hacim 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı (DTT, Mw:154,25).

5.7.11. Etidyum bromür çözeltisi (10 mg/ml)

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

5.7.12. Etil alkol çözeltisi (% 70 – h/h)

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

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

186,1 gr EDTA, 800 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Pellet halde NaOH eklenerek çözeltinin pH'sı 8'e ayarlandı ve hacmi 1000 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildi (EDTA, Mw:292,24).

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

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

5.7.15. Fizyolojik tuzlu su (FTS, %0,85 – a/h)

8,5 gr sodyum klorür, distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 1 litreye tamamlandı. Çözelti, otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi.

5.7.16. Glisin çözeltisi (1 M)

1,5 gr glisin, distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 20 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı (Glisin, Mw:75,07).

5.7.17. Glukoz çözeltisi (1 M)

90 gr glukoz, distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi (Glukoz, Mw:180,16).

5.7.18. Hidroklorik asit çözeltisi (3 N)

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

5.7.19. Kalsiyum klorür çözeltisi (2,5 M)

100 gr kalsiyum klorür, distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 300 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda steril edildi ($CaCl_2$, Mw:110,98).

5.7.20. Kapatma çözeltisi

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

5.7.21. Lityum asetat çözeltisi (1 M)

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).

5.7.22. Lityum asetat / PEG / TE çözeltisi

6,7 ml % 50 PEG-4000, 1 ml 1 M LiAc, 0,2 ml 0,5 M Tris-Cl (pH:7,5), 0,02 ml 0,5 M EDTA (pH: 7,5) distile su ile hacmi 9,6 ml'ye tamamlandı.

5.7.23. Lityum asetat / SDS çözeltisi (200 mM lityum asetat / %1 SDS, a/h)

35 ml deiyonize distile su, 10 ml 1 M lityum asetat ve 5 ml % 10 SDS karıştırılarak hazırlandı.

5.7.24. Lityum asetat / TE çözeltisi (100 mM lityum asetat / 10 mM Tris-Cl / 1mM EDTA)

25 ml 1 M lityum asetat, 5 ml 0,5 M Tris-Cl (pH:7,5), 0,5 ml 0,5 M EDTA (pH:7,5) distile su ile 250 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.7.25. Magnezyum sülfat çözeltisi (0,5 M)

11,42 gr magnezyum sülfat, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 100 ml'ye tamamlandı ($MgSO_4$, Mw:228,45).

5.7.26. Mangan klorür çözeltisi (0,55 M)

54,4 gr mangan klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldükten sonra hacmi 500 ml'ye tamamlandı ($MnCl_2.4H_2O$, Mw:197,9).

5.7.27. Metanol : glasiyel asetik asit çözeltisi (1:1)

Eşit hacimde metanol ve glasiyel asetik asit karıştırılarak hazırlandı.

5.7.28. Nonidet P-40 çözeltisi (NP-40, % 10 – a/h)

5 gr (4,72 ml) NP-40, deiyonize distile içerisinde çözündürülerek hacmi 50 ml'ye tamamlandı (NP-40, d:1,06 g/ml).

5.7.29. Orto-Nitrofenil β-Galaktozid çözeltisi (ONPG, 4 mg/ml)

10 mg ONPG, Z tamponunda çözündürülerek 2,5 ml'ye tamamlandı.

5.7.30. Paraformaldehit çözeltisi (%3 – a/h)

3 gr paraformaldehit, 10 ml 0,1 N NaOH içinde çözündürüldü. Çözeltinin pH'sı 1 M HCl ile yaklaşık 7-7,5 olarak ayarlandı (pH kağıdı ile kontrol edildi) ve hacim deiyonize distile suyla 80 ml'ye tamamlandı. Üzerine 20 ml 5x konsantre T-FTS eklendi.

5.7.31. Proteaz inhibitörü- Fenilmetansülfonilflorid (PMSF, 0,1 M)

175 mg PMSF, izopropanol içerisinde çözündürülerek hacmi 10 ml'ye tamamlandı. Çözelti 1 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı (PMSF, Mw:174,19).

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

40 gr PEG-4000, distile su içinde çözündürüldü ve toplam hacim 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,45 µm'lik filtreden geçirilerek steril edildi ve oda sıcaklığında saklandı.

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

%40 PEG-4000 çözeltisi ve 2,5 M NaCl çözeltisi eşit hacimlerde karıştırılarak hazırlandı (NaCl, Mw:58,44).

5.7.34. Polietilenimin çözeltisi (PEI, 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.

5.7.35. Potasyum asetat 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 (KCH_3COO, Mw:98,14).

5.7.36. Potasyum di-hidrojen fosfat 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).

5.7.37. Potasyum klorür 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 (KCl, Mw:74,55).

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

50 mg ssDNA, 10 ml TE tamponunda (pH:8) çözündürüldü. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 1 dakika tutuldu. Otoklav sonrası DNA eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi. Bunun için DNA çözeltisine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve karıştırıldı. Karışım 4500 dev./dk hızda 15 dk 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 sn karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10-15 dk bekletildi ve 4500 dev./dk hızda 4 °C'da 25 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi üzerine 5 ml %70 etil alkol eklendi ve tekrar 4500 dev./dk hızda 4 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi oda sıcaklığında kurutuldu ve 8 ml TE tamponu içerisinde çözündürüldü. DNA konsantrasyonu spektrofotometrik yöntemle ölçüldü ve konsantrasyon 5 mg/ml'ye ayarlandı. Denatüre edilmiş ve kırılmış ssDNA örneği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildikten sonra ileride kullanılmak üzere 0,5 ml'lik porsiyonlar halinde -20 °C'da saklandı.

5.7.39. Sodyum azid çözeltisi (NaN_3, % 10 – a/h)

10 gr sodyum azid, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5.7.40. Sodyum bikarbonat çözeltisi ($NaHCO_3$, % 7,5 – a/h)

7,5 gr sodyum bikarbonat, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti 0,2 µm filtreden geçirilerek steril edildi.

5.7.41. Sodyum dodesil sülfat çözeltisi (SDS, % 10 – a/h)

10 gr sodyum dodesil sülfat, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı.

5.7.42. Sodyum hidroksit çözeltisi (2 N)

8 gr sodyum hidroksit, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 100 ml'ye tamamlandı (NaOH, Mw:39,99).

5.7.43. Sodyum karbonat çözeltisi (1 M)

21,19 gr sodyum karbonat, deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve çözeltinin hacmi 200 ml'ye tamamlandı (Na_2CO_3, Mw:105,99).

5.7.44. Sodyum klorür çözeltisi (2,5 M)

36,6 gr sodyum klorür, deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 250 ml'ye tamamlandı (NaCl, Mw:58,5).

5.7.45. Sodyum di-hidrojen fosfat 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).

5.7.46. Tripsin çözeltisi (% 0,25 – a/h)

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

5.7.47. 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:7,3) karıştırılarak hazırlandı.

5.7.48. Triton X-100 (% 10 – a/h)

10 gr (9,43 ml) Triton X-100, deiyonize distile su ile karıştırılarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı (Triton X-100, d:1,06 g/ml).

5.7.49. Tween-20 çözeltisi (% 10 – a/h)

10 gr (9 ml) Tween-20, deiyonize distile su ile karıştırılarak hacmi 100 ml'ye tamamlandı (Tween-20, d:1,11 g/ml).

5.7.50. 50x konsantre Adenin (Ade) çözeltisi

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

5.7.51. 10x konsantre Amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi (*İng. drop out-DO*)

Histidin, lösin ve triptofan içermeyen 10x konsantre amino asit karışımı (+urasil) çözeltisi; hazır halde temin edilen (Clontech, 630428) drop out karışımı kullanılarak hazırlandı. Bunun için 3 gr amino asit karışımı 500 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve otoklavda 121 ºC'da 20 dakika tutularak steril edildi.

5.7.52. 100x konsantre Histidin (His) çözeltisi

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

5.7.53. 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.

5.7.54. 5x konsantre Tamponlanmış fizyolojik tuzlu su çözeltisi (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.

5.7.55. 100x konsantre Triptofan (Trp) çözeltisi

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

5.7.56. 1,4-piperazindietanesulfonik asit çözeltisi (PIPES, 1 M)

30,2 gr PIPES, 80 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, pH'sı 7,5'e ayarlandıktan sonra hacmi 100 ml'ye tamamlandı. Çözelti otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildikten sonra oda sıcaklığında saklandı (PIPES, Mw:302,37).

5.7.57. 3-Amino-1,2,4-triazole çözeltisi (3-AT, 1 M)

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

5.8. Tamponlar

5.8.1. Bakteri transformasyon tamponu (pH:6,7)

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

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

5 ml 1 M Tris-HCl (pH:8), 10 ml 1 M glukoz ve 4 ml 0,5 M EDTA (pH:8) çözeltileri karıştırıldı, deiyonize distile su ile hacmi 200 ml'ye tamamlandı.

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

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

5.8.4. DNA ekstraksyon tamponu-III (3 M Potasyum : 5 M Asetat)

60 ml 5 M potasyum asetat ve 11,5 ml glasiyal asetik asit deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı (CH_3CO_2K, Mw:98,14).

5.8.5. Hücre parçalama tamponu (50 mM Tris-Cl, 150 mM NaCl, %0,1 NP-40 (a/h), pH:8)

2,5 ml 1 M Tris-HCl (pH:8), 3 ml 2,5 M NaCI ve 0,5 ml %10 NP-40 çözeltisi deiyonize distile su ile 50 ml'ye tamamlandı. Deneylerde kullanımdan önce tampon

çözeltisine 1 mM final konsantrasyonunda olacak şekilde 1 M DTT ve 2 mM final konsantrasyonunda olacak şekilde 0,1 M PMSF eklendi.

5.8.6. Poliakrilamid jel elektroforezi tamponu (25 mM Tris-Cl, 250 mM Glisin, %0,1 SDS (a/h), pH:8,3)

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

5.8.7. Potasyum fosfat tamponu (50 mM, pH:7,5)

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

5.8.8. Protein transfer tamponu

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

5.8.9. RIPA tamponu (50 mM Tris-Cl, 5 mM EDTA, 150 mM NaCl, %1 NP-40 (a/h), %0,1 SDS (a/h), pH:8)

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 ve 1 ml %10 sodyum dodesil sülfat distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.10. Sodyum asetat tamponu (3 M, pH:5,2)

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 (CH_3COONa, Mw: 82,03).

5.8.11. Sodyum fosfat tamponu (200 mM pH:7)

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

5.8.12. TBS ve TBS-T tamponu

1x konsantre TBS tamponu için; 50 ml 20x TBS tamponu, distile su ile 1 litreye tamamlandı. TBS-T tamponu hazırlamak için ise; ortama 10 ml %10 Triton X-100 veya 10 ml %10 Tween-20 eklendi.

5.8.13. Tris-HCl tamponu (1 M, pH:7,5)

121,1 gr Tris 800 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü. 3 N HCl çözeltisi ile pH'sı 7,5'e ayarlandıktan sonra hacmi 1 litreye tamamlandı. Tris-Cl tamponu otoklavda 121 °C'da 1 atmosfer basınç altında 20 dakika tutularak steril edildi (Tris, Mw:121,1).

5.8.14. Tris/EDTA tamponu (TE, 10 mM Tris / 1 mM EDTA, pH:8)

10 ml 1 M Tris-Cl tamponu (pH:8) ve 2 ml 0,5 M EDTA çözeltisi (pH:8) deiyonize distile su ile 1 litreye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.15. Z tamponu (100 mM Sodyum fosfat, 10 mM KCl, 1mM $MgSO_4$, pH:7)

50 ml 200 mM sodyum fosfat tamponu (pH:7), 0,4 ml 2,5 mM KCl, 0,2 ml 0,5 mM $MgSO_4$ deiyonize distile su ile 100 ml'ye tamamlanarak hazırlandı.

5.8.16. Z (+) tamponu

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

5.8.17. 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).

5.8.18. 6x konsantre DNA yükleme tamponu

25 mg bromofenol mavisi 6,55 ml deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü, üzerine 3,45 ml % 87'lik gliserin eklendi ve hacmi 10 ml'ye tamamlandı.

5.8.19. 4x konsantre Paketleme jeli tamponu (0,5 M Tris, %0,4 SDS (a/h), 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.

5.8.20. 4x konsantre Protein yükleme tamponu (0,2 M Tris, %8 SDS (a/h), %0,2 bromofenol mavisi (a/h), %4 2-β-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. Üzerine 2 ml 2-β-merkaptoetanol ve 23 ml %87'lik gliserin eklendi. Çözeltinin pH'sı 1 N HCl ile 6,8'e ayarlandıktan sonra distile su ile toplam hacim 50 ml'ye tamamlandı.

5.8.21. 20x konsantre TBS tamponu (pH:7,4)

160 gr NaCl, 4 gr KCl ve 60 gr Tris, 800 ml distile su içerisinde çözündürüldü. Çözeltiye 32 ml HCl ilave edildi ve toplam hacmi distile su 1 litreye tamamlandı.

5.8.22. 50x konsantre Tris-Asetat-EDTA tamponu (TAE, pH:8)

242 gr Tris deiyonize distile su içerisinde çözündürülerek hacmi 843 ml'ye tamamlandı. Çözelti üzerine 57 ml glasiyel asetik asit, 100 ml 0,5 M EDTA (pH:8) çözeltisi eklendi. Agaroz jel elektroforez deneylerinde 1:50 oranında seyreltilerek kullanıldı.

5.8.23. 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).

5.9. Plazmit Vektörler

Tez çalışması kapsamında, maya ikili-hibrit testlerinde kullanılmak üzere, ökaryotik translasyon elongasyon faktörü-1 gama (*İng. Elongation factor 1-gamma*; *EEF1G*), 60S büyük alt birimi nüklear eksport GTPaz-1 (*İng. Large 60S Subunit Nuclear Export GTPase 1*; *LSG1*) ve DEAD-box helikaz 56 (*İng. DEAD-box helicase 56*; *DDX56*) genlerinin klonlanmasında maya GAL4 transkripsiyon faktörü aktivasyon domainini (GAL4-AD) kodlayan geni taşıyan pGAD424 ve pACT2 maya ekspresyon vektörleri kullanıldı. Bu deneylerde bait (yem) olarak kullanılan GAL4 transkripsiyon faktörü bağlanma domaini (GAL4-BD) ile füzyon halinde insan ve kuş tipi influenza A virüsü NS1 proteinlerini ($NS1_W$, $NS1_D$) kodlayan plazmitler (pGBD-$NS1_W$, pGBD-$NS1_D$) yüksek lisans tez çalışmam sırasında oluşturuldu (Pirinçal, 2014). Memeli hücrelerinde influenza A virüsü yapısal olmayan protein-1 (*İng. Non Structural Protein 1, NS1*), EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin sentezlenmesi amacıyla pCHA (Nagata ve ark., 1998), pCAGGS (Tsai ve ark., 1995), pCAGGS-GST (Sugiyama ve ark., 2015) ve pCAGGS-p16 (Turan ve Ata, 2011) memeli ekspresyon vektörlerinden yararlanıldı. CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak endojen *EEF1G* ve *LSG1* gen ekspresyonu durdurulan *(İng. knock out)* klonlar oluşturma çalışmalarında ise memeli hücrelerinde ekspresyon yapan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörü (Ran ve ark., 2013) kullanıldı. Bu plazmit vektörü *Addgene*'den (Addgene, 62988) temin edildi.

5.10. Virüsler

Tez çalışması kapsamında, düşük patojenite gösteren insan tipi influenza A/WSN/1933-H1N1 (WSN) ve kuş tipi influenza A/Duck/Pennsylvania/1984-H5N2 (DkPen) virüsleri kullanıldı. İnfluenza A virüsleri Tsukuba Üniversitesi (Japonya) Enfeksiyon Biyolojisi (Viroloji) laboratuvarından temin edildi. Virüsler spesifik patojen içermeyen (*İng. specific pathogen free- SPF*) embriyonlu tavuk yumurtaları veya MDCK hücrelerinde çoğaltıldı. Virüs titresi, standart plak testleri ve/veya hemaglütinasyon testleri (Turan ve ark., 1996) ile saptandı.

5.11. Bakteriler

Çalışmada plazmit vektörlerin oluşturulması ya da mevcut plazmitlerin çoğaltılmasında *E. coli* DH5α ve Mach1 bakteri suşlarından yararlanıldı.

5.12. Maya Hücresi

Maya ikili-hibrit metodu kullanılarak influenza A virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerini arasındaki etkileşimlerin saptandığı çalışmalarda aşağıda kısmi genotipik özellikleri verilen *Saccharomyces cerevisiae* PJ69-4A maya ırkı (James ve ark., 1996) kullanıldı.

Saccharomyces cerevisiae PJ69-4A: MATa 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

Tez çalışması kapsamında kullanılan insan tipi ve kuş tipi influenza A virüslerinin hücre kültüründe üretilmesi ve plak testleri ile virüs titrasyonunun saptanması çalışmalarında konak hücre olarak MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücrelerinden yararlanıldı. MDCK hücreleri ilk kez 1958 yılında Madin ve Darby tarafından cocker spaniel cinsi köpek böbreğinden elde edilen epitel kökenli hücrelerdir. Bu hücreler influenza A virüslerinin çoğaltılması, izolasyonu ve titrasyonu gibi çalışmalarda sıklıkla kullanılmaktadır. Memeli hücrelerinde influenza A virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin ilişkilerinin araştırılmasında insan orjinli HeLa (insan servikal kanser hücreleri) ve HEK293 (insan embriyonik böbrek hücreleri) hücre hatları kullanıldı. HeLa hücreleri ilk kez 1951 yılında Henrietta Lacks isimli serviks kanseri hastasının kanserli dokusundan George Gey tarafından izole edilmiş ve üretilmiştir (Jones ve ark., 1971). Düşük transfeksiyon etkinliğine sahip olmasına rağmen diğer hücre hatlarına göre daha dayanıklı olmaları nedeniyle birçok araştırmada tercih nedeni olmuş ve günümüze kadar devamlılığı sağlanmıştır. HEK293 hücreleri ise 1970'li yıllarda Graham ve Alex Van der Eb

(Graham ve ark., 1977) tarafından kültüre edilmiştir. HEK293 hücreleri hızlı çoğalmaları ve transfeksiyon etkinliğinin yüksek olması nedeniyle bilimsel araştırmalarda sıklıkla tercih edilen hücrelerdir.

5.14. Memeli Hücre Hatlarının Çözündürülmesi, Devamlılığının Sağlanması ve Stoklanması

Derin dondurucuda (-80 °C) saklanılan memeli hücreleri, 37 °C'da su banyosunda bekletilerek çözüldü. Hücreler, 5 ml D'MEM besiyeri bulunan 15 ml'lik tüplere aktarıldı ve 1000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 5 ml D'MEM besiyeri içinde süspanse edildi ve içerisinde 10 ml D'MEM besiyeri olan 10 cm'lik petri kutularına aktarıldı. Kültür standart kültür koşullarında (37 °C, % 5 CO_2 ve % 95 nispi nem) inkübasyona bırakıldı. Hücrelerin devamlılığı, petri kutularında yaklaşık %80-90 doygunluğa erişen hücrelerin (ortalama 3-4 gün) pasajlanması ile sağlandı. Bunun için kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı, zemine tutunmuş olan hücreler 3-4 ml Tripsin-EDTA ile yıkandı ve 37 °C'da 5 dakika 1-2 ml Tripsin-EDTA çözeltisinin etkisinde bırakıldı. Tripsin etkisi ile ayrışan hücreler 5 ml D'MEM besiyerinde süspanse edildi ve 0,25-0,5 ml hücre süspansiyonu 10 ml taze besiyeri içeren petrilere aktarıldı. Hücreler standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Hücrelerin dondurularak saklanması için; Tripsin-EDTA etkisi ile süspanse edilen hücreler 1000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edilerek çöktürüldü. Hücre çökeltisi ortalama 0,5-1x10^6 hücre/ml olacak şekilde %10 (h/h) DMSO içeren FCS içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonları 1 ml'lik porsiyonlar halinde 2-3 saat -20 °C'da bekletildi ve sonrasında -80 °C'a ayarlı derin dondurucuya aktarıldı.

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

Rekombinant plazmit vektörlerin elde edilmesinde ve mevcut plazmitlerin çoğaltılmasında *E. coli* DH5α veya Mach1 ırkı kullanıldı. Bunun için hücreler plazmit DNA'ların aktarılması için etkin hale (kompetent) getirildi. Derin dondurucuda, -80 °C'da saklanan bakterilerden antibiyotik içermeyen LBA katı besiyerine öze ile ekim

yapıldı ve 37 °C'da bir gece boyunca üretildi. Katı besiyerinde oluşan kolonilerden tek bir koloni alındı ve 5 ml LB (-) sıvı besiyerine ekim yapıldı. Kültür 37 °C'da 150 dev./dk çalkalanma hızında bir gece boyunca üretildi. Hazırlanan 5 ml'lik kültür 150 ml taze LB (-) besiyerine aktarıldı ve 23 °C'da 150 dev./dk çalkalanma hızında üremeye bırakıldı. Kültür, OD_{600}= 0,25-0,3 değerine eriştiğinde kompetent hücre hazırlamak için kullanıldı. Kültür 4 °C'da 10 dakika, 4000 dev./dk hızda santrifüj edilerek bakteriler çöktürüldü. Çökelti 40 ml soğuk bakteri transformasyon tamponu içerisinde süspanse edildi ve 15-20 dakika buz içerisinde bekletildi. Hücreler 4 °C'da 10 dakika 4000 dev./dk hızda tekrar santrifüj edildi. Hücre çökeltisi 10 ml soğuk transformasyon tamponunda süspanse edildi. Hücre süspansiyonu üzerine 10 dakika ara ile iki kez 350 µl DMSO eklendi. Hazırlanan hücreler ya direkt olarak transformasyonda kullanıldı ya da ileride kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı (Inoue ve ark., 1990).

5.16. DNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Çalışmada kullanılan DNA moleküllerinin analizinde % 1-1,5'lik (a/h) agaroz jeller kullanıldı. Analiz edilecek DNA moleküllerinin boyutuna göre 1 ya da 1,5 gr agaroz 100 ml 1x TAE içerisinde kaynatılarak çözündürüldü. Çözeltinin sıcaklığı 60-70 °C'a düştüğünde 0,1-0,2 µg/ml final konsantrasyonda olacak şekilde etidyum bromür eklendi ve yatay jel kasetlerine döküldü. Agaroz jel donduktan 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. DNA bantları UV transillüminatör ile görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.17. RNA Analizleri için Agaroz Jellerin Hazırlanması ve Elektroforez

Hücrelerden izole edilen total RNA molekülleri sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren %1'lik agaroz jeller ile analiz edildi (Aranda ve ark., 2012). 1 gr agaroz 94 ml distile su içerisinde kaynatılarak çözündürüldü ve sonrasında 2 ml 50x konsantre

TAE tamponu eklendi. Çözeltinin sıcaklığı 60-70 ºC'a kadar soğutulduktan sonra çözeltiye 4 ml ticari sodyum hipoklorit eklendi ve jel kasetlerine döküldü. Jeller katılaştıktan sonra 1x konsantre TAE tamponuna alındı. RNA örnekleri 2x konsantre RNA yükleme tamponuyla 1:1 oranında karıştırıldı, 65 ºC'da 5 dakika bekletildikten sonra jele uygulandı. Elektroforez işlemi 100 volt sabit direnç altında 45-50 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrasında jeller 0,2 μg/ml final konsantrasyonunda etidyum bromür içeren deiyonize distile su içerisinde 40 dev./dk hızında 1 saat tutuldu. RNA moleküllerine bağlanmayan etidyum bromür kalıntılarını uzaklaştırmak için jeller deiyonize distile su ile 30 dakika 40 devir/dakika hızında yıkandı. RNA molekülleri UV transillüminatörde görüntülendi ve fotoğrafları çekildi.

5.18. Spektrofotometrik Yöntemle DNA ve RNA Örneklerinin Kantitatif ve Kalitatif Analizi

DNA ve RNA moleküllerinin miktar ve kalite tayinlerinde spektrofotometik yöntemlerden yararlanıldı. Örneklerin 260 ve 280 nm dalga boylarındaki absorbans değerleri aşağıda verilen formüllere uygulanarak miktarları saptandı (Maniatis, 1982).

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

$$RNA\ konsantrasyonu\ (\mu g/\ ml) = OD_{260} \,.\, D \,.\, K_r$$

[OD_{260}, 1 cm çapında quartz küvet kullanılarak 260 nm dalga boyunda ölçülen örneklerin absorbans değeri; D, sulandırım katsayısı; K_d, (50 μg/ml); K_r, (40 μg/ml)].

DNA ya da RNA örneklerinin OD_{260}/OD_{280} değerlerine bakılarak saflıkları hakkında fikir edinildi. (Bu oran kaliteli DNA için ~1.8; RNA için ise ~2.0'dir).

5.19. Çalışmanın Değişik Aşamalarında Kullanılan Oligonükleotid Primerler

Polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile DNA fragmentlerinin çoğaltılması, rekombinant plazmit taşıyan bakteri kolonilerinin seçilmesi (koloni-PZR) ve DNA dizi analizlerinde Tablo 1'de verilen oligonükleotid primerlerden yararlanıldı.

Tablo 1. Çalışmada kullanılan oligonükleotid primerler.

Primer Adı	Nükleotid Dizisi
NS1/W-For	5′- TTGAATTCGGAGGATCTGGAATGGATCCAAACACTGTGTC -3′
NS1/W-Rev	5′- TTGAATTCTCAAACTTCTGACCTAATTG -3′
$NS1_W$-minus-Rev	5′- AACTTCTGACCTAATTGTTC -3′
NS1/D-For	5′- TTGAATTCGGAGGATCTGGAATGGACTCCAACACGATAAC -3′
NS1/D-Rev	5′- TTGAATTCTCAAACTTCTGACTCAACTC -3′
EEF1G-For	5′- TTGATATCATGGCGGCTGGGACCCTGTA -3′
EEF1G-Rev	5′- TTGATATCTCACTTGAAGATCTTGCCCTGATTG -3′
LSG1-For	5′- ATCATGGGCCGGAGGAGAGCCC -3′
LSG1-Rev	5′- ATTCACATATCCAGGTGCTTGTAGAG -3′
DDX56-For	5′- ATCATGGAGGACTCTGAAGCACTG -3′
DDX56-Rev	5′- ATTCAGGAGGGCTTGGCTGTG -3′
DDX56/831-For	5′- CTTGGAACAGTTCAGCATCC -3′
DDX56/959-Rev	5′- AGGACTTCAGCATCAGTTGC -3′
ACTB/280-For	5′- ATGGAGTCCTGTGGCATCC -3′
ACTB/552-Rev	5′- CCAGCACAATGAAGATCAAG -3′
Flag-For	5′- GATTATAAAGATGATGATAAATGAGAATTC -3′
GST-For	5′- ATGGGCTCCCCTATACTAGG -3′
pCA-For	5′- AGATCTTTTTCCCTCTGCCAAAAATTATG -3′
pCA-Vec-Rev	5′- GGTGGCGGCGAATTCTTTG -3′
GST-Vec-Rev	5′- GGCGGCGCGAGCTCGAGG -3′
GST-Gly-Rev	5′- TCCAGATCCTCCCAGATCCCGATTTTGGAGGAGATGGTC -3′
GAL4-For	5′- ATGAAGCTACTGTCTTCTATCG -3′
pGAD-Seq-For	5′- AATACCACTACAATGGATGATGT -3′
pGAD-Seq-Rev	5′- CCAAGATTGAAACTTAGAGGAGT -3′
pU6-Seq-For	5- GATACAAGGCTGTTAGAGAG -3′
EEF-gF	5′- CTTGGTATTTCGGAGGATTCTG -3′
EEF-gR	5′- GACCCACACAGCACTTCATC -3′
LSG-gF1	5′- TCAAGTTTGAGCCTGAACTAC -3′
LSG-gR1	5′- GCAGTAACCAACCGCTTCTG -3′
LSG-gF2	5′- GGATGCCAAGAGCAGAAGAG -3′
LSG-gR2	5′- ACCTGTAATCCCAGCACTTTG -3′

5.20. İnfluenza A Virüslerinin Çoğaltılması

Çalışmamızda kullanılan düşük patojenite gösteren insan tipi influenza A/WSN/1933–H1N1 ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984–H5N2 virüslerinin çoğaltılmasında konak hücre olarak MDCK (Madin-Darby canine kidney) hücrelerinden yararlanıldı. Bunun için MDCK hücreleri $1x10^6$ hücre/kuyu olacak şekilde 6-kuyulu plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında 24 saat üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml serum içermeyen besiyeri ile 2 kez yıkandı. Yıkama işleminden sonra hücrelere %1 BSA içerisinde ortalama 2 moi (*İng. multiplicity of infection*) titresinde olacak şekilde seyreltilen 500 µl influenza A/WSN/33-H1N1 veya influenza A/Duck/Pen-H5N2 virüs örnekleri eklendi. Plaklar 5 dakika aralıklarla hafifçe karıştırılarak 37 °C'da 30 dakika inkübe edildi. Hücrelere adsorbe olmayan virüsler uzaklaştırıldı ve üzerine 2 ml muhafaza besiyeri eklendi. Kültürler 48 saat inkübe edildi. İnkübasyondan sonra, virüs içeren besiyerleri 0,22 µm filtreden geçirilerek hücresel artıklardan arındırıldı ve küçük porsiyonlar (0,1-0,2 ml) halinde -80 °C'da saklandı.

5.21. İnfluenza A Virüslerinin Titrasyonu

İnfluenza A/WSN/1933 (H1N1) ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984 (H5N2) virüslerinin titrasyonunda 2 farklı yöntem izlendi:

5.21.1. Hemaglutinasyon testi

MDCK hücrelerinde çoğaltılan influenza A virüslerinin yaklaşık titresinin belirlenmesinde hemaglutinasyon testi kullanıldı. Bu yöntem ile enfektif virüs partikülü sayısının tespitinden ziyade eritrositleri aglutine edebilen virüs miktarı hemaglutinasyon ünitesi (HAU) olarak belirlendi. Hemaglutinasyon testi için %1'lik 0 grubu insan kanı hazırlandı. Bunun için 0 grubu insan kanı 1500 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edilerek eritrositler çöktürüldü. Üst faz (serum) ve eritrositler üzerinde toplanan lökositler uzaklaştırıldı. Eritrositler tamponlanmış fizyolojik tuzlu su (T-FTS) içerisinde süspanse edildi ve tekrar aynı koşullarda santrifüj edildi. Bu işlem 2 kez tekrar edildi. Yapılan yıkamaların ardından eritrosit çökeltisi T-FTS

içerisinde 1/100 (h/h) oranında süspanse edilerek hemaglutinasyon testlerinde kullanıldı. İnfluenza A virüslerinin titrasyonunda uygulanan hemaglutinasyon testi için; 96-kuyulu plaklarda virüs örneklerinin 100 µl tamponlanmış FTS içerisinde ikişer katlar halinde azalan seyreltme serileri hazırlandı. Her bir virüs örneği için iki seri çalışıldı. Sulandırım serilerinin üzerine eşit hacimde %1'lik 0 grubu insan kanı eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen plaklarda hemaglutinasyon pozitif olan sulandırımlar tespit edildi. Virüs titresi aşağıdaki formül üzerinden hemaglutinasyon ünitesi olarak hesaplandı (Mahy, 1985).

$$1 \text{ HAU} = 2 \times 10^5 \text{ p.f.u}$$

[HAU: Hemaglutinasyon ünitesi; p.f.u: Plak oluşturan ünite (*İng. Plaque Forming Units*)].

5.21.2. Plak testi

İnfluenza A virüslerinin titresinin belirlenmesinde bir diğer yöntem olarak plak testi kullanıldı. Plak testi için MDCK hücrelerinden yararlanıldı. MDCK hücreleri 6-kuyulu plaklarda %10 serum içeren D'MEM besiyerinde ortalama $1x10^6$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi. Hücreler 37 °C'da, % 5 CO_2'li ortamda tam tabaka oluşturacak şekilde çoğaltıldı. İnkübasyon sonrası besiyeri uzaklaştırıldı ve hücreler üç kez 1 ml serum içermeyen besiyeri ile yıkandıktan sonra 500 µl %1 BSA içerisinde seyreltilen virüs örnekleri ile enfekte edildi. Virüslerin hücrelere tutunması için plaklar 37 °C'da 30 dakika bekletildi. Tutunamayan virüsler uzaklaştırıldı ve hücrelere 42 °C'a soğutulan % 0,8 agaroz içeren muhafaza besiyeri eklendi. Agaroz katılaştıktan sonra plaklar ters çevrilerek 35 °C'da 2-3 gün inkübe edildi. İnkübasyon sonrası hücreler metanol- asetik asit (1:1) ile 2-3 saat fikse edildi. Ardından % 0,5'lik amido black ile boyanarak virüs plaklarının görünür hale gelmesi sağlandı. Oluşan plak sayıları değerlendirilerek virüs stoklarının titresi plak oluşturan ünite (pfu) olarak belirlendi.

5.22. İnfluenza A Virüsü NS1 ve İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının Elde Edilmesi

İnsan ve kuş tipi influenza A virüsü NS1 cDNA'ları, virüs ile enfekte edilen HeLa hücrelerinden izole edilen total RNA üzerinden reverz transkripsiyon–polimeraz

zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile elde edildi. NS1 cDNA'sı hazırlamak için HeLa hücreleri insan tipi influenza A/WSN/1933 (H1N1) ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984 (H5N2) virüsleri ile enfekte edildi. Hücreler $5x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 12-kuyulu plaklara ekildi ve 24 saat standart kültür koşullarında inkübe edildikten sonra %1 BSA içerisinde seyreltilen virüs örnekleri ile 5.20'de anlatıldığı gibi enfekte edildi. Enfeksiyondan 12 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler silikon sıyırıcı ile 200 µl T-FTS içerisinde toplandı. Daha sonra hücrelerden ticari RNA izolasyon kiti (Qiagen) ile total RNA izolasyonu yapıldı. İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'ları HEK293 hücrelerinden izole edilen total RNA üzerinden RT-PZR ile elde edildi. Bunun için 200 µl T-FTS içerisinde süspanse edilen ortalama $1x10^6$ hücreden total RNA izolasyonu yapıldı.

5.22.1. Hücrelerden total RNA'nın izole edilmesi

HEK293 ve influenza A virüsleri ile enfekte HeLa hücrelerinden total RNA izolasyonunda ticari RNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanıldı ve yöntem olarak üretici firma tarafından önerilen yöntem izlendi. Yukarıda belirtildiği şekilde 200 µl T-FTS içerisinde hazırlanan hücre süspansiyonları üzerine 350 µl liziz tamponu eklendi ve 5 kez 27G insülin iğnesi takılı enjektörden geçirilerek hücrelerin parçalanması sağlandı. Hücre lizatına 350 µl %70 etil alkol eklendi ve pipetaj yapılarak karıştırıldı. Lizat saflaştırma kolonlu tüplere aktarıldı ve 10000 dev./dk hızda 1 dakika santrifüj edildi. Süzüntü atıldı. RNA bağlı kolon, sırasıyla bir kez 700 µl yıkama çözeltisi I ve iki kez 500 µl yıkama çözeltisi II ile yıkandı. Son aşamada kolona 30-50 µl elüsyon tamponu eklendi ve 10000 dev./dk hızda 2 dakika santrifüj edilerek RNA molekülleri elüe edildi. Hazırlanan RNA'ların miktarları nanodrop (mikroplaka okuyucu spektrofotometre) ile spektrofotometrik olarak belirlendi ve sonraki deneylerde kullanılabilmek üzere -80 °C'da saklandı.

5.22.2. Reverz transkripsiyon ile cDNA'ların elde edilmesi

Hücrelerden izole total RNA'lar üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA'lar hazırlandı. Reaksiyon ortalama 500 ng total RNA kullanılarak 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. İlk aşamada 10 µl hacimde RNA ve oligo-dT primer karışımı 65 °C'da 10 dakika tutularak RNA moleküllerinin

denatürasyonu sağlandı. Ardından örneklere 10 µl aşağıda miktarları belirtilen reaksiyon karışımı eklendi:

RNA/oligo-dT Karışımı	
Total RNA (500 ng)	2-3 µl
Oligo-dT primer (10 pM/µl)	5 µl
Nükleaz içermeyen distile su	3-2 µl
Total hacim	**10 µl**

Reaksiyon Karışımı	
Reaksiyon tamponu (x10)	2 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	2 µl
RNaz inhibitörü (40U/µl)	0,5 µl
Reverz transkriptaz enzimi (200U/µl)	0,8 µl
Nükleaz içermeyen distile su	4,7 µl
Total hacim	**20 µl**

cDNA sentezi 45 °C'da 60 dakikada tamamlandı. Ardından reaksiyon ortamı 80 °C'da 10 dakika tutularak enzimlerin inaktivasyonu sağlandı. Elde edilen cDNA'lar, viral NS1 genlerinin ve insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 genlerinin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı.

5.22.3. İnfluenza A virüsü NS1 cDNA'larının ve insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının polimeraz zincir reaksiyonu (PZR) ile çoğaltılması

Hazırlanan virüsle enfekte HeLa hücrelerine ait cDNA'lar, insan tipi influenza A virüsü (WSN) *NS1 ($NS1_W$)* ve kuş tipi influenza A virüsü (DkPen) *NS1 ($NS1_D$)* genlerinin; HEK293 hücrelerine ait cDNA'lar ise insan *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genlerinin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı.

Genlerin PZR ile çoğaltılmasında; $NS1_W$ geni için *NS1/W-For* ve *NS1/W-Rev* primerleri, $NS1_D$ geni için *NS1/D-For* ve *NS1/D-Rev* primerleri, *EEF1G* geni için *EEF1G-For* ve *EEF1G-Rev* primerleri, *LSG1* geni için *LSG1-For* ve *LSG1-Rev* primerleri ve *DDX56* geni için *DDX56-For* ve *DDX56-Rev* primer çifti kullanıldı. Primerlere ait nükleotid dizileri Tablo 1'de verilmiştir. Kullanılan primerlerin oluşturulmasında NCBI Genom Data Bankası'nda yer alan referans gen dizilerden yararlanıldı. (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/FLU/Database, Erişim tarihi: 14.05.2021, **NS1W**/NCBI-accessions: ABF47960, **NS1D**/NCBI-accessions: BAF41910). (*https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide*, Erişim tarihi: 14.05.2021, **EEF1G**/NCBI-accessions: NM_001404, **LSG1**/NCBI-accessions: NP_060855, **DDX56**/NCBI-accessions: NP_061955).

Tüm genlerin çoğaltılmasında kullanılan sentetik primerler, T4 polinükleotid kinaz enzimi ile fosforillendikten sonra PZR deneylerinde kullanıldı. Primerlerin fosforilasyonu için aşağıdaki reaksiyon karışımı hazırlandı:

Reaksiyon Karışımı	
İleri primer (100 pM/µl)	2 µl
Geri Primer (100 pM/µl)	2 µl
ATP karışımı (10 mM)	8 µl
Reaksiyon tamponu (x10)	2 µl
Deiyonize distile su	5 µl
T4 polinükleotid kinaz (10U/µl)	1 µl
Total hacim	**20 µl**

Reaksiyon 37 °C'da 1 saatte tamamlandı. Sonrasında örnekler 80 °C'da 15 dakika tutularak T4 polinükleotid kinaz enziminin inaktive olması sağlandı. cDNA'lar fosforillenmiş primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı. PZR reaksiyonları 0,2 ml'lik PZR tüplerinde 50 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Reaksiyon karışımı ve koşulları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı:

Reaksiyon Karışımı (*LSG1* ve *DDX56* için)	
cDNA	2 µl
Fosforillenmiş primer çifti (10 pM/µl)	3 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	5 µl
$MgSO_4$ (25 mM)	2,5 µl
Reaksiyon tamponu (x10)	5 µl
Deiyoize distile su	32,5 µl
KOD-plus (1U/µl)	1 µl
Total hacim	**50 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	96 °C	2 dk.
30 döngü	96 °C	15 sn.
	56 °C	15 sn.
	68 °C	75 sn.
1 döngü	68 °C	10 dk.

Reaksiyon Karışımı (*NS1* genleri ve *EEF1G* için)	
cDNA	2 µl
İleri primer (10 pM/µl)	5 µl
Geri primer (10 pM/µl)	5 µl
Deiyoize distile su	13 µl
Phusion High Fidelity PCR Master Mix	25 µl
Total hacim	**50 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	95 °C	3 dk.
30 döngü	95 °C	15 sn.
	56 °C	15 sn.
	72 °C	45 sn.
1 döngü	72 °C	5 dk.

PZR reaksiyonları sonucu elde edilen ürünler 5:1 oranında DNA yükleme tamponu ilave edilerek %1'lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit direnç altında 25 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası cDNA bantları, bir UV transillüminatör yardımıyla görünür hale getirildi ve fotoğrafları çekildi.

5.22.4. PZR ile çoğaltılan cDNA'ların restriksiyon enzimleri ile kesilmesi ve saflaştırılması

Polimeraz zincir reaksiyonu ile elde edilen ürünler fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. Bu amaçla, PZR ürünlerinin hacmi 100 µl'ye tamamlandı, üzerine eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol eklendi ve 5 saniye tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Ortam 15000 dev./dk hızda 20 °C'da 5 dakika santrifüj edildi. Üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve üzerine 0,1 hacim 3M sodyum asetat ve 2,5 hacim saf etil alkol eklendi. Örnekler 10 dakika buz üzerinde bekletildi. Ardından 15000 dev./dk hızda 4 °C'da 15 dakika santrifüj edildi. DNA çökeltisi 500 µl % 70 etil alkol ile yıkandıktan sonra kurutuldu. Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi yapılmayacak olan LSG1 ve DDX56 cDNA örnekleri 20 µl TE tamponunda çözündürülerek direkt saflaştırılma işlemine geçildi. Restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesimi yapılacak NS1 cDNA'ları ($NS1_W$ ve $NS1_D$) ve EEF1G cDNA'sı 90 µl TE tamponunda çözündürüldü. NS1 cDNA'ları ($NS1_W$ ve $NS1_D$) *Eco*RI restriksiyon endonükleaz enzimi ile; EEF1G cDNA'sı ise *Eco*RV restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. Bunun için; 90 µl DNA örnekleri üzerine 10 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu ve 2 µl *Eco*RI veya *Eco*RV (10 U/µl) restriksiyon endonükleazı eklendi ve 2 saat 37 °C'da su banyosunda inkübe edildi. Reaksiyon sonrası DNA örnekleri yukarıda belirtildiği şekilde tekrar fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edilip etil alkol ile çökeltildi ve 20 µl TE tamponunda çözündürüldü.

DNA örnekleri %1'lik agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı. Bu amaçla; 20 µl TE tamponunda çözündürülen örneklerin üzerine 5 µl 6x konsantre DNA yükleme tamponu eklendi ve % 1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, TAE tamponu içerisinde 100 V sabit direnç altında 25 dakikada tamamlandı. Elektroforez sonrası cDNA 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 (Invitrogen) kullanıldı. Kit için önerilen yöntem uygulandı. 30 µl elüsyon tamponu ile elüe edilen DNA örnekleri, agaroz jel elektroforezi ile yapılan kontrolün ardından çalışmaların ileri aşamalarında kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.23. Maya Hücrelerinde EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

Maya ikili-hibrit metodu kullanılarak yapılan tarama çalışmasında pACT2 maya ikili hibrit vektörünün GAL4 aktivasyon domaini ile füzyon halinde klonlanan insan orjinli HEK293 hücrelerinden hazırlanan cDNA kitaplığı kullanılmıştır. Bu kitaplık üzerinden GAL4-AD ile füzyon halinde konak hücreye ait proteinler kodlanmaktadır. Aktivasyon bölgesi ile füzyon halindeki cDNA'lar genellikle ilgili genin tam dizisini kapsamamaktadır. Bu sebeple NS1 proteini ile olan etkileşimlerini doğrulama deneyleri için kontrol amaçlı olarak, EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerini kodlayan tam boyutta cDNA dizileri GAL4 aktivasyon domaini taşıyan pGAD424 veya pACT2 maya ekspresyon vektörlerine klonlandı.

5.23.1. pGAD424 ve pACT2 plazmit DNA'larının ligasyon için hazırlanması

Çalışmamızda konak hücre proteinlerini kodlayan genler (*EEF1G, LSG1 ve DDX56*), GAL4 aktivasyon domaini (GAL4-AD) taşıyan pGAD424 veya pACT2 maya ekspresyon vektörlerine klonlandı. Plazmit vektörler restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildikten sonra fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi ve etil alkol ile çöktürüldü. Ardından Klenow enzimi ile küt uçlu hale getirilen plazmit DNA'ları, defosforile edilerek konak hücre proteinlerini kodlayan genler ile ligasyona hazır hale getirildi.

pGAD424 plazmit vektörü *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi ile pACT2 plazmit vektörü ise *Bgl*II restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu işlem için 5 µg plazmit DNA'sı deiyonize distile su ile 90 µl'ye tamamlandı. pGAD424 plazmit DNA'sı üzerine 10 µl 10x konsantre *Bam*HI tamponu ve 1 µl (10 U) *Bam*HI enzimi eklenirken; pACT2 plazmit DNA'sına 10 µl 10x konsantre Buffer R (Fermantas) tamponu ve 1 µl (10 U) *Bgl*II enzimi eklendi. Örnekler 37 °C'da 2 saat inkübe edildi. Plazmit DNA'larının kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Reaksiyon ortamı, daha önce belirtildiği şekilde (bkz. 5.22.4) eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi ve DNA'lar etil alkol ile çöktürüldü. DNA çökeltileri 42,5 µl deiyonize distile su içerisinde

çözündürüldü. Doğrusal hale getirilen DNA örnekleri Klenow enzimi ile küt uçlu hale getirildi. Bu işlem için aşağıda belirtilen reaksiyon ortamı oluşturuldu:

Reaksiyon Karışımı	
Doğrusal pGAD424 veya pACT2 plazmit DNA'sı	42,5 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	2,5 µl
Klenow tamponu (x10)	5 µl
Klenow enzimi (1U/µl)	1 µl
Total hacim	**50 µl**

Reaksiyon ortamı 37 °C'da 30 dakika inkübe edildi. Daha sonra Klenow enzimini inaktive etmek için örnekler 75 °C'da 20 dakika bekletildi. Küt uçlu hale getirilen DNA örnekleri SAP (*Shrimp Alkalen Phosphatase*) enzimi ile defosforile edildi. Defosforilasyon için reaksiyon ortamına 2 µl (2U) SAP enzimi eklendi ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA örnekleri 5.22.4'de belirtildiği şekilde fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. Plazmit DNA'lar 30 µl TE içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.23.2. Ligasyon ve transformasyon

Doğrusal hale getirilen ve defosforile edilen pGAD424 ve pACT2 plazmit DNA'ları ile 5.22.3'de belirtildiği şekilde hazırlanan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının yaklaşık miktarları agaroz jel elektroforezi ile konsantrasyonu bilinen bir standart DNA ile karşılaştırılarak belirlendi. Ligasyon işlemi 0,2 ml'lik tüplerde 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Ligasyon için yaklaşık 30 ng plazmit DNA'sı ve 25 ng cDNA karıştırıldı ve toplam hacim deiyonize distile su ile 10 µl'ye tamamlandı. DNA karışımına 10 µl DNA ligasyon kiti (TaKaRa) eklendi. Ligasyon işlemi 15 °C'a ayarlı PZR cihazında 15-16 saat sürede gerçekleştirildi. Daha sonra örnekler transformasyon için 1,5 ml'lik plastik tüpe aktarıldı. Üzerlerine daha önce 5.15'de anlatıldığı şekilde hazırlanan kompetent hücrelerden 100 µl eklendi ve sırasıyla 20 dakika buz üzerinde, 1,5 dakika 42 °C'da su banyosunda, 2 dakika buz üzerinde ve 5 dakika oda sıcaklığında bekletildi. Transformasyon ortamına 500 µl antibiyotik

içermeyen LB besiyeri eklendi ve 37 °C'da 30 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 transformant kolonilerden istenilen rekombinant plazmiti taşıyanlar, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi.

5.23.3. Koloni-PZR ile transformant kolonilerin seçilmesi

Ligasyon ve transformasyon deneylerinden sonra, LBA (+amp) besiyerlerinde üreyen plazmit alan transformant kolonilerden istenilen rekombinant plazmiti taşıyanlar, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi. PZR reaksiyonlarında ileri primer olarak Tablo 1'de nükleotid dizileri verilen hedef bölgesi vektör içerisinde olan *pGAD-Seq-For* ile geri primer olarak pGAD424-EEF1G plazmit vektörü için *EEF1G-Rev*; pACT2-LSG1 plazmit vektörü için *LSG1-Rev* ve pACT2-DDX56 plazmit vektörü için *DDX56-Rev* primerleri kullanıldı. Transformasyon sonrası katı besiyerlerinde üreyen kolonilerden ortalama 8-12 koloni steril kürdan ile alınarak 5 µl deiyonize distile su içerisinde süspanse edildi. Hücrelerin parçalanmasını sağlamak amacıyla örnekler PZR cihazında 95 °C'da 5 dakika bekletildikten sonra buz üzerine alındı. Koloni PZR'de fazla sayıda örnekle çalışıldığı için örnek sayısıyla orantılı olarak bir karışım hazırlandı ve bu karışımdan her bir PZR tüpündeki örneğin üzerine aşağıda belirtildiği şekilde hazırlanan 15 µl reaksiyon karışımı eklendi. Reaksiyon sonrası PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Reaksiyon Karışımı	
pGAD-Seq-For (10 pM/µl)	1 µl
Geri primer (10 pM/µl)	1 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	1 µl
$MgCl_2$ (25 mM)	2 µl
Reaksiyon tamponu (x10)	2 µl
Deiyoize distile su	7,9 µl
Taq Polimeraz (5U/µl)	0,1 µl
Total hacim	**15 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	95 °C	2 dk.
32 döngü	94 °C	15 sn.
	54 °C	15 sn.
	72 °C	60 sn.
1 döngü	72 °C	5 dk.

5.23.4. Transformant *E. coli* kolonilerinden küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu

Koloni-PZR ile ön seleksiyonu yapılan kolonilerden restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrol ve DNA dizi analizi çalışmalarında kullanılmak üzere küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Plazmit DNA izolasyonlarında alkali-SDS liziz yöntemi kullanıldı. Seçilen kolonilerden ampisilin içeren 5 ml LB besiyerine ekim yapıldı. Örnekler 37 °C'da bir gece boyunca çalkalayıcı etüvde inkübe edilerek doygun kültürler hazırlandı. Elde edilen doygun kültürler 6000 dev./dk hızda 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltisi 100 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu-I içerisinde süspanse edildi. Hücre süspansiyonuna taze hazırlanmış 200 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu-II eklendi ve hafifçe karıştırılarak hücrelerin parçalanması sağlandı. Parçalanan hücrelerin üzerine 150 µl DNA Ekstraksiyon Tamponu-III eklendi ve karıştırıldıktan sonra buz üzerinde 10 dakika bekletildi. İstenmeyen hücresel artıklar ve genomik DNA, 4 °C'da, 15000 dev./dk hızda 15 dakika santrifüj edilerek çökelti halinde uzaklaştırıldı. Plazmit DNA içeren üst sıvı üzerine 2,5 hacim etil alkol eklendi ve karıştırıldı. Örnekler 15-20 dakika oda sıcaklığında bekletildikten sonra 14000 dev./dk hızda 20 °C'da 15 dakika santrifüj edilerek DNA çöktürüldü. DNA çökeltisi % 70 etil alkol ile yıkandı ve kurutulduktan sonra 50-100 µl TE tamponu içerisinde çözündürüldü. Hazırlanan küçük ölçekte plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre uygun restriksiyon endonükleazları ile kesildi ve agaroz jel elektroforezi ile doğrulukları kontrol edildi. Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profillerini veren DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı.

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

Küçük ölçekte hazırlanan rekombinant plazmit DNA örnekleri, restriksiyon haritalarına göre seçilen restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Buna göre; pGAD424-EEF1G plazmit DNA'sı *Bam*HI ve *Eco*RV, pACT2-LSG1 plazmit DNA'sı *Hind*III, pACT2-DDX56 plazmit DNA'sı ise *Xba*I restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesildi. Bunun için yaklaşık 0,5-1 µg

DNA örnekleri deiyonize distile su ile 18 µl'ye tamamlandı. Üzerine 2 µl 10x konsantre reaksiyon tamponu ve 2-5 U arasında değişen miktarlarda restriksiyon enzimi eklendi. Örnekler 37 °C'da 1-2 saat kesime bırakıldı. Sonrasında örnekler 5:1 oranında 6x konsantre DNA jel yükleme tamponu ile karıştırıldı ve % 1'lik agaroz jele uygulandı. Elektroforez işlemi, 100 V sabit gerilim altında 25 dakikada tamamlandı. DNA bantları UV ışık altında görüntülendi.

5.23.6. Plazmit DNA'ların PEG/NaCl ile saflaştırılması ve dizi analizleri

Küçük ölçekte hazırlanan ve restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek kontrolleri yapılan plazmit DNA örnekleri, PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı. Bu amaçla; TE tamponunda çözündürülen plazmit DNA'ları eşit hacimde fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi. DNA içeren üst faz yeni bir tüpe aktarıldı ve 1:4 oranında PEG/NaCl (% 20/1,25 M) çözeltisi ile iyice karıştırıldıktan sonra 1 saat buz üzerinde bekletildi. Sürenin sonunda 4 °C'da 15000 dev./dk hızda 25 dakika santrifüj edilerek DNA'lar çöktürüldü. Çökelti 500 µl % 70 etil alkol ile yıkandı, kurutuldu ve 50-100 µl TE içerisinde çözündürüldü. Uygun görülen DNA örnekleri dizi analizlerinde kullanıldı. DNA dizi analizleri için özel bir şirketten hizmet alımına gidildi.

5.24. Memeli Hücrelerinde İnfluenza A virüsü NS1 Proteinlerini ve NS1 Proteini ile ilişkili Konak Hücre Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması

İnsan tipi influenza A virüsü $NS1_W$ (WSN) geni ve insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerini kodlayan genler tez çalışması kapsamında; western melezleme tekniği, immünfloresans testler, birlikte immün-çöktürme (İng. co-immunoprecipitation) testleri, GST ile çöktürme testleri ve birlikte immün-lokalizasyon testleri gibi yöntemlerle protein analizlerinin yapılabilmesini sağlaması bakımından bazı uzantılar (HA, GST ya da FLAG) taşıyacak şekilde klonlandı. Bu amaçla; sözkonusu uzantıları kodlayan dizileri taşıyan pCHA (Nagata ve ark., 1998), pCAGGS-GST (Sugiyama ve ark., 2015) ve pCAGGS-p16 (Turan ve Ata, 2011) plazmit vektörlerinden yararlanıldı. Ayrıca $NS1_W$ geni memeli hücrelerinde herhangi

bir uzantı taşımaksızın kodlanabilmesi için pCAGGS (Tsai ve ark., 1995) plazmit vektörüne de klonlandı.

5.24.1. Flag uzantılı influenza A virüsü $NS1_W$ proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörünün oluşturulması

NS1 geni; pCAGGS-Flag vektörüne Flag uzantısı (DYKDDDK) ile füzyon halinde anlatım yapacak şekilde klonlandı. pCAGGS-Flag plazmit DNA'sının hazırlanmasında, p16 ile füzyon halinde Flag peptidini kodlayan pCAGGS-p16-Flag vektöründen yararlanıldı.

pCAGGS-Flag Plazmit DNA'sının Ligasyon için Hazırlanması

pCAGGS-p16-Flag vektörü (Turan ve Ata, 2011) Tablo 1'de dizisi verilen *Flag-For* ve *pCA-Vec-Rev* primerleri kullanılarak ters (invers) PZR tekniği ile doğrusal hale getirildi. Yapılan ters PZR ile; yaklaşık 50 ng pCAGGS-p16-Flag plazmit DNA'sı kalıp olarak kullanılarak, p16 proteini kodlayan bölgesi dışında kalan plazmit DNA'sı PZR ile çoğaltılmış oldu. PZR reaksiyonları 0,2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. PZR için reaksiyon karışımı ve koşulları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı:

Reaksiyon Karışımı	
pCAGGS-p16-Flag (25 ng/µl)	2 µl
Flag-For (10 pM/µl)	2 µl
pCA-Vec-Rev (10 pM/µl)	2 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	4 µl
$MgSO_4$ (25 mM)	2 µl
Reaksiyon tamponu (x10)	4 µl
Deiyoize distile su	24 µl
KOD-plus (1U/µl)	1 µl
Total hacim	**40 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	98 °C	2 dk.
32 döngü	97 °C	15 sn.
	55 °C	20 sn.
	68 °C	5 dk.
1 döngü	68 °C	10 dk.

PZR ürünü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve fenol:kloroform ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. Ardından agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bkz. 5.22.4). DNA örneği ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Bitiş Kodonu Taşımayan NS1 cDNA'sının Hazırlanması

pCAGGS-Flag vektörüne *$NS1_W$* geninin Flag uzantısı (DYKDDDK) ile füzyon oluşturacak şekilde klonlanabilmesi için; NS1 cDNA'sının translasyonu sonlandıracak bitim kodonunu içermemesi gerekmektedir. Bu amaçla; sonlandırıcı kodonu taşımayan NS1 cDNA'sının çoğaltılmasında dizileri Tablo 1'de verilen primerlerden *NS1/W-For* ve *$NS1_W$-minus-Rev* primer çifti kullanıldı. Ancak primer çiftlerinin PZR'de kullanılmalarının öncesinde, Bölüm 5.22.3'de belirtildiği şekilde fosforilasyonları sağlandı. PZR reaksiyonu için kalıp DNA olarak yüksek lisans tez çalışmam kapsamında oluşturulan maya ekspresyon vektörlerinden pGBD-$NS1_W$ plazmit DNA'sından yararlanıldı. Polimeraz zincir reaksiyonu karışımı ve koşulları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı:

Reaksiyon Karışımı	
pGBD-$NS1_W$ (25 ng/µl)	1 µl
NS1/W-For (10 pM/µl)	3 µl
$NS1_W$-minus-Rev (10 pM/µl)	3 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	4 µl
$MgSO_4$ (25 mM)	2 µl
Reaksiyon tamponu (x10)	4 µl
Deiyoize distile su	23 µl
KOD-plus (1U/µl)	1 µl
Total hacim	**40 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	98 °C	2 dk.
33 döngü	97 °C	10 sn.
	52 °C	20 sn.
	68 °C	45 sn.
1 döngü	68 °C	10 dk.

PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi, daha sonra saflaştırılarak (bkz. 5.22.4) ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Ligasyon ve Transformasyon

Doğrusal hale getirilen pCAGGS-p16-Flag plazmit vektöründen oluşturulan ve Flag dizisi taşıyan yaklaşık 30 ng pCAGGS-Flag plazmit DNA'sı, bitiş kodonu taşımayan yaklaşık 25 ng $NS1_W$ cDNA'sı ile ligasyona uğratıldı. Örneklerin yaklaşık konsantrasyonları, agaroz jel üzerinde bilinen standart DNA ile karşılaştırılarak saptandı. Ligasyon ve transformasyon işlemleri 5.23.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Koloni-PZR ile Transformant Kolonilerin Seçilmesi

Ligasyon ve transformasyon deneylerinden sonra, ampisilin içeren LBA besiyerlerinde üreyen plazmit alan transformant kolonilerden istenilen rekombinant plazmiti taşıyanlar, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi (bkz. 5.23.3). PZR reaksiyonlarında pCAGGS-$NS1_W$-Flag plazmit vektörü için ileri primer olarak Tablo 1'de nükleotid dizileri verilen hedef bölgesi vektör içerisinde olan *pCA-For* ile geri primer olarak *NS1/W-Rev* primerleri kullanıldı.

Transformant E. coli Kolonilerinden Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu, Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü, Saflaştırılması ve Dizi Analizleri

Koloni-PZR ile ön seleksiyonu yapılan kolonilerden kontrol ve DNA dizi analizi amaçlı kullanılmak üzere küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonları gerçekleştirildi. Plazmit DNA izolasyonlarında alkali-SDS liziz yöntemi kullanıldı (bkz. 5.23.4). Hazırlanan küçük ölçekte rekombinant pCAGGS-$NS1_W$-Flag plazmit vektörü *Hind*III ile kesilerek kontrol edildi (bkz. 5.23.5). Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profillerini veren plazmit DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı (bkz. 5.23.6).

5.24.2. GST uzantılı influenza A virüsü $NS1_W$ proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörünün oluşturulması

Çalışmamızda viral NS1 proteini ile hücresel proteinler arasındaki muhtemel fiziksel etkileşimleri araştırmak amacıyla GST *(Glutatyon-S-Transferaz)* ile birlikte

çöktürme tekniğinden yararlanıldı. Bu amaçla $NS1_W$ geni; pCAGGS-GST vektörüne GST uzantısı ile füzyon halinde anlatım yapacak şekilde klonlandı.

pCAGGS-GST Plazmit DNA'sının Ligasyon için Hazırlanması

pCAGGS-GST vektörü (Sugiyama ve ark., 2015) Tablo 1'de dizisi verilen *GST-For* ve *GST-Vec-Rev* primerleri kullanılarak ters (invers) PZR ile doğrusal hale getirildi. PZR reaksiyonları 0,2 ml'lik PZR tüplerinde 40 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. PZR için reaksiyon karışımı ve koşulları aşağıda verildiği şekilde hazırlandı:

Reaksiyon Karışımı	
pCAGGS-GST (25 ng/µl)	2 µl
GST-For (10 pM/µl)	2 µl
GST-Vec-Rev (10 pM/µl)	2 µl
dNTP karışımı (2,5 mM)	2 µl
$MgSO_4$ (25 mM)	2 µl
Reaksiyon tamponu (x10)	4 µl
Deiyoize distile su	25 µl
KOD-plus (1U/µl)	1 µl
Total hacim	**40 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	95 °C	3 dk.
33 döngü	95 °C	25 sn.
	52 °C	15 sn.
	68 °C	5 dk.
1 döngü	68 °C	10 dk.

Reaksiyon sonrası PZR ürünü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve fenol:kloroform ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çöktürüldü. Ardından agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bkz. 5.22.4). DNA örneği ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Bitiş Kodonu Taşımayan NS1 cDNA'larının Hazırlanması

pCAGGS-$NS1_W$-GST plazmit vektörünün elde edilmesinde; GST uzantısı ile füzyon halinde kodlanacak bitiş kodonu içermeyen NS1 cDNA'sı kullanıldı. Bu

cDNA'ların hazırlanması, pCAGGS-NS1$_W$-Flag plazmit vektörünün oluşturulmasında detaylı bir şekilde anlatılmıştır.

Ligasyon ve Transformasyon

Doğrusal hale getirilen yaklaşık 40 ng pCAGGS-GST plazmit DNA'sı, bitiş kodonu taşımayan yaklaşık 25 ng NS1$_W$ cDNA'sı ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ve transformasyon işlemleri 5.23.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Koloni-PZR ile Transformant Kolonilerin Seçilmesi

Ligasyon ve transformasyon deneylerinden sonra, ampisilin içeren LBA besiyerlerinde üreyen plazmit alan transformant kolonilerden istenilen rekombinant plazmiti taşıyanlar, koloni-PZR yöntemi ile belirlendi (bkz. 5.23.3). PZR reaksiyonlarında pCAGGS-NS1$_W$-GST plazmit vektörü için *NS1/W-Rev* ve *GST-Gly-Rev* primerleri kullanıldı. Primerlere ait nükleotid dizileri Tablo 1'de verilmiştir.

Transformant E. coli Kolonilerinden Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu, Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü, Saflaştırılması ve Dizi Analizleri

Koloni-PZR ile pozitif reaksiyon veren kolonilerden alkali-SDS liziz yöntemi kullanılarak küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu gerçekleştirildi (bkz. 5.23.4). Hazırlanan rekombinant pCAGGS-NS1$_W$-GST plazmit vektörü *Hind*III restriksiyon enzimi ile kesime bırakılarak kontrol edildi (bkz. 5.23.5). Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profillerini veren plazmit DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı (bkz. 5.23.6).

5.24.3. Doğal influenza A virüsü NS1$_W$ proteini kodlayan memeli ekspresyon vektörünün oluşturulması

Çalışmamızda herhangi bir peptit uzantısı taşımayan ve böylece plazmit vektör üzerinden füzyon halinde değil doğal halde kodlanan NS1$_W$ proteini de kullanılmıştır. Bu amaçla NS1$_W$ cDNA'sı tavuk ovalbümin gen promotörü kontrolünde kodlanacak şekilde pCAGGS plazmit vektörüne klonlandı.

pCAGGS Plazmit DNA'sının Ligasyon için Hazırlanması

pCAGGS plazmit vektörü (Tsai ve ark., 1995) *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu işlem için 2,5 µg pCAGGS plazmit DNA'sı kullanıldı. Plazmit DNA'nın kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Ardından plazmit DNA'sı defosforile edildi (bkz. 5.23.1).

Ligasyon ve Transformasyon

*Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCAGGS plazmit DNA'sı, benzer şekilde aynı enzimle kesilerek hazırlanan $NS1_W$ cDNA'sı (bkz. 5.22) ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ürünleri kompetent *E. coli* DH5α ırkı hücrelerine transforme edildi ve ardından ampisilin içeren LBA besiyerlerine ekildi. Ligasyon ve transformasyon işlemleri 5.23.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Koloni-PZR ile Transformant Kolonilerin Seçilmesi

Ligasyon ve transformasyon deneylerinden sonra, istenilen rekombinant plazmiti taşıyan transformant koloniler koloni-PZR yöntemi ile belirlendi (bkz. 5.23.3). PZR reaksiyonlarında ileri primer olarak *pCA-For*; geri primer olarak *NS1/W-Rev* primerleri kullanıldı (Tablo 1).

Transformant E. coli Kolonilerinden Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu, Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü

Koloni-PZR ile ön seleksiyonu yapılan kolonilerden alkali-SDS liziz yöntemi ile küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonları gerçekleştirildi (bkz. 5.23.4). Hazırlanan küçük ölçekte rekombinant pCAGGS-$NS1_W$ plazmit vektörünün kontrolü için *Hind*III restriksiyon enzimi kullanıldı. Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profilini veren plazmit DNA örneği, DNA dizi analizi yapılmaksızın orta ölçekli olarak çoğaltıldı.

5.24.4. İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkili konak hücre proteinlerini kodlayan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması

Viral patogenez açısından önemli roller üstlenen NS1 proteini ile ilişkisi araştırılacak olan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri yüksek lisans tez çalışmam

kapsamında maya ikili-hibrit metodunu kullanarak tespit ettiğimiz proteinler arasından seçilmiştir. Çalışmamızda konak hücre proteinlerini kodlayan genler, memeli hücrelerinde NS1 proteini ile etkileşimlerini araştırmak amacıyla memeli hücrelerinde ekspresyon yapan ve HA (Hemaglutinin) peptidini kodlayan pCHA plazmit vektörüne klonlandı.

pCHA Plazmit DNA'sının Ligasyon için Hazırlanması

pCHA vektörü, memeli hücrelerinde ekspresyon yapan pCAGGS vektörünün MCS (Multiple Cloning Site) bölgesine influenza HA epitopunu kodlayacak 9 aminoasitlik dizinin (YPYDVPDYA) eklenmesiyle elde edilmiş bir vektördür (Nagata ve ark., 1998). HA uzantılı konak hücre proteinlerini kodlayabilmesi için pCHA plazmit vektörü öncelikle *Eco*RV restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu işlem için 2,5 µg pCHA plazmit DNA'sı kullanıldı. Plazmit DNA'sının kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Ardından plazmit DNA'sı defosforile edildi (bkz. 5.23.1).

Ligasyon ve Transformasyon

Doğrusal hale getirilen pCHA plazmit DNA'sı, 5.22'de belirtildiği şeklinde hazırlanan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'ları ile ligasyona uğratıldı. Ligasyon ürünleri kompetent *E. coli* DH5α ırkı hücrelerine transforme edildi ve ardından ampisilin içeren LBA besiyerlerine ekildi. Ligasyon ve transformasyon işlemleri 5.23.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi.

Koloni-PZR ile Transformant Kolonilerin Seçilmesi

Ligasyon ve transformasyon deneylerinden sonra, istenilen rekombinant plazmiti taşıyan transformant koloniler koloni-PZR yöntemi ile belirlendi (bkz. 5.23.3). PZR reaksiyonlarında ileri primer olarak *pCHA-For* ile geri primer olarak pCHA-EEF1G plazmit vektörü için *EEF1G-Rev*; pCHA-LSG1 plazmit vektörü için *LSG1-Rev* ve pCHA-DDX56 plazmit vektörü için *DDX56-Rev* primerleri kullanıldı (Tablo 1).

Transformant E. coli Kolonilerinden Küçük Ölçekte Plazmit DNA İzolasyonu, Restriksiyon Enzimleri ile Kontrolü, Saflaştırılması ve Dizi Analizleri

Koloni-PZR ile ön seleksiyonu yapılan kolonilerden kontrol ve DNA dizi analizi amaçlı kullanılmak üzere küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonları gerçekleştirildi (bkz. 5.23.4). Hazırlanan rekombinant plazmit DNA örneklerinden pCHA-EEF1G plazmit vektörü *Bam*HI ile, pCHA-LSG1 plazmit vektörü *Xba*I ile ve pCHA-DDX56 plazmit vektörü ise *Hind*III restriksiyon enzimleri ile kesilerek kontrolleri yapıldı. Agaroz jel üzerinde beklenen elektroforez profillerini veren plazmit DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı (bkz. 5.23.6).

5.24.5. CRISPR/Cas9 sisteminin uygulandığı *EEF1G ve LSG1* genlerine özgü sgRNA (Rehber RNA) dizilerini taşıyan memeli ekspresyon vektörlerinin oluşturulması

Maya ikili hibrit metodu ile yapılan testler sonucunda infuenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkili olduğu saptanan insan EEF1G ve LSG1 proteinlerinin, influenza A virüs replikasyonu için önemini ortaya koymak amacıyla; bu proteinleri kodlayan genler bakımından kusurlu (İng. *knock out*) hücre hatları elde etmek için CRISPR/Cas9 teknolojisinden (Jiang ve Doudna, 2015) yararlanıldı. Bunun için, Cas9 enzimi ve rehber RNA kodlayacak şekilde tasarlanan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektöründen yararlanıldı. HeLa hücrelerinde *EEF1G* ve *LSG1* genlerini hedef alacak rehber oligonükleotidler oluşturuldu ve plazmit vektöründe U6 promotörü kontrolünde klonlandı.

EEF1G ve LSG1 Genlerini Hedef Alan Rehber RNA'lar Kodlayacak Oligonükleotidlerin Tasarlanması

Hedefe yönelik olarak gerçekleştirilecek genom düzenlemesi için en kritik aşamalardan biri; Cas9 enzimini hedef bölgeye yönlendirmede işlev gören rehber RNA için oligonükleotidleri tasarlamaktır. CRISPR/Cas9 sistemi ile ilgili gelişmelerin

artmasıyla birlikte gRNA tasarımı için çok sayıda biyoinformatik program geliştirilmiştir. Programlarda kullanılan algoritmalar ile etkinliği yüksek ancak hedef dışı etkisi *(İng. off-target)* en az seviyede olan oligoların tahmini yapılmaktadır. Çalışmamızda HeLa hücrelerinde *EEF1G* ve *LSG1* genlerinin hedeflenmesi için GenScript programı (https://www.genscript.com/, Erişim tarihi: 14.05.2021) kullanılarak oligonükleotidler tasarlandı. Her bir gen için iki farklı hedef bölge seçildi. Seçilen hedef bölgelerin nükleotid dizileri ve genler üzerindeki lokasyonları Tablo 2'de verildi.

Tablo 2. *EEF1G* ve *LSG1* genlerine özgü seçilen sgRNA dizileri. (Hedef dizinin intron bölgede yer alan bölümü altı çizili olarak gösterilmiştir).

sgRNA ADI	**GEN**	**POZİSYON**	**NÜKLEOTİD DİZİSİ (5'→3')**
EEF1G-sgRNA-1	*EEF1G*	Ekzon-2	GTACACGTATCCTGAAAAC
EEF1G-sgRNA-2		Ekzon-2 & İntron-2	CCCAACTCACCTTGCCGGC
LSG1-sgRNA-1	*LSG1*	Ekzon-1	TATGCGCCATCAGACTCAG
LSG1-sgRNA-2		Ekzon-2	TTGCTACTGCAGAACTTGC

EEF1G ve *LSG1* genlerini hedef alan rehber RNA'lar için tasarlanan çift zincirli DNA fragmentleri aşağıda verildi:

EEF1G -1:

5′–CACC**G**GTACACGTATCCTGAAAAC–3′
3′–CCATGTGCATAGGACTTTTGCAAA–5′

EEF1G -2:

5′–CACC**G**CCCAACTCACCTTGCCGGC–3′
3′–CGGGTTGAGTGGAACGGCCGCAAA–5′

***LSG1*-1:**

5′–CACC**G**TATGCGCCATCAGACTCAG–3′
3′–CATACGCGGTAGTCTGAGTCCAAA–5′

***LSG1*-2:**

5′–CACC**G**TTGCTACTGCAGAACTTGC–3′
3′–CAACGATGACGTCTTGAACGCAAA–5′

Bu çift zincirli kısa DNA moleküllerini oluşturmak için kullanılan oligonükleotid primerlerin dizileri Tablo 3'de verildi.

Tablo 3. sgRNA kodlayan DNA fragmentlerinin oluşturulmasında kullanılan primerler.

PRİMER ADI	**NÜKLEOTİD DİZİSİ (5'⟶3')**
EEF-CRP-For-1	CACC**G**GTACACGTATCCTGAAAAC
EEF-CRP-Rev-1	AAACGTTTTCAGGATACGTGTAC**C**
EEF-CRP-For-2	CACC**G**CCCAACTCACCTTGCCGGC
EEF-CRP-Rev-2	AAACGCCGGCAAGGTGAGTTGGG**C**
LSG-CRP-For-1	CACC**G**TATGCGCCATCAGACTCAG
LSG-CRP-Rev-1	AAACCTGAGTCTGATGGCGCATA**C**
LSG-CRP-For-2	CACC**G**TTGCTACTGCAGAACTTGC
LSG-CRP-Rev-2	AAACGCAAGTTCTGCAGTAGCAA**C**

Birbirinin tamamlayıcısı olan oligonükleotid primerler bir araya getirilerek plazmit vektör ile ligasyon için uygun çift zincirli DNA fragmentleri haline dönüştürüldü. Bunun için ilk aşamada primer çiftleri 5.22.3'de belirtildiği şekilde fosforillendi. Ardından reaksiyon karışımı 85°C sıcaklıkta 5 dakika tutularak T4 polinükleotid kinaz enzimi inhibe edildi. Tamamlayıcı primerlerin birbirine bağlanmasını *(İng. annealing)* sağlamak için reaksiyon karışımı 95 °C sıcaklıkta 2 dakika bekletilerek primerlerin denatürasyonu sağlandı. Ardından 0,1°C/saniye soğutmaya ayarlı bir PZR cihazında örneklerin kademeli olarak 25 °C'a kadar soğutulması sağlandı. Çift zincirli hale getirilen kısa DNA fragmentleri klonlama çalışmalarında kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Cas9 ve Rehber RNA Kodlayan Plazmit Vektörün Hazırlanması

Çalışmada, *EEF1G* ve *LSG1* genlerini hedef alan rehber RNA'lar için tasarlanan çift zincirli DNA fragmentlerinin her biri pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörüne, U6 promotörü kontrolündeki trans-aktive edici CRISPR RNA (*tracrRNA*) kodlayan dizinin sonunda yer alan *Bbs*I enzimi hedef bölgesine klonlandı. Bu nedenle pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörü *Bbs*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Bu işlem için 45 µl'lik hacim içerisinde 2,5 µg plazmit DNA'sına 5 µl 10x konsantre tampon (NEBuffer 2.1) ve 0.5

µl *Bbs*I (5 U) enzimi eklendi. Kesim işlemi 37 °C'da 2 saat sürede gerçekleştirildi. Plazmit DNA'sının kesilip kesilmediği agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Reaksiyon ortamı, *Bbs*I enzimini inaktive etmek amacıyla 20 dakika 65 °C'da bekletildi. Plazmit DNA'nın defosforilasyonu için örnek üzerine 2 µl (2 U) SAP enzimi eklendi ve 37 °C'da 1 saat inkübe edildi. Defosforile edilen plazmit DNA örneğinin hacmi deiyonize distile su ile 100 µl'ye tamamlandı ve 5.22.4'de belirtildiği şekilde fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildikten sonra etil alkol ile çökeltildi. DNA çökeltisi kurutuldu, 25 µl deiyonize distile su içerisinde çözündürüldü ve ligasyonda kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

Ligasyon ve Transformasyon

Ligasyon işlemi 10 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Yaklaşık 25 ng pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit DNA'sı ve 1-2 ng rehber RNA kodlayan DNA fragmentleri kullanıldı. Ligasyon ve transformasyon işlemi 5.23.2'de anlatıldığı şekilde gerçekleştirildi. Transformasyon sonrası LBA katı besiyerinde oluşan kolonilerden rekombinant plazmiti taşıyanlar, *pU6-Seq-For* primeri ve her bir DNA fragmentine özgü tasarlanan geri yönlü primerler kullanılarak koloni-PZR yöntemi ile belirlendi. Koloni-PZR'de pozitif sonuç veren kolonilerden küçük ölçekte plazmit DNA izolasyonu yapıldı. DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı. Klonlanan kısa DNA fragmentleri DNA dizi analizi ile kontrol edildi.

5.25. Orta Ölçekte Plazmit DNA'ların Hazırlanması

DNA dizi analizleri sonuçlarına göre doğruluğu kesinleşen plazmit DNA'ları orta ölçekte çoğaltıldı ve saflaştırıldı. Bu amaçla plazmitler kompetent *E. coli* Mach1 hücrelerine transforme edildi. Plazmit taşıyan bakteri kolonilerinden steril bir kürdan ile 5 ml ampisilin içeren LB besiyerine ekildi ve 37 °C'da bir gece inkübe edilerek ön kültürler hazırlandı. Hazırlanan kültürler, 150 ml taze LB besiyerlerine aktarıldı ve 37 °C'da 180 dev./dk hızda 14-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen doygun kültürler plazmit DNA izolasyonu ve saflaştırmasında kullanıldı. Plazmitlerin izolasyonu ve saflaştırmasında orta ölçekte plazmit izolasyon kiti (Qiagen) kullanıldı. Yöntem olarak üretici firmanın önerdiği yol izlendi. Elde edilen DNA'ların miktarı ve

kalitesi, 260/280 nm dalga boylarında spektrofotometrede ölçümler alınarak saptandı. Plazmit DNA'ları, restriksiyon haritalarına uygun olarak seçilen enzimler ile kesilerek agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve daha sonraki deneylerde kullanılmak üzere -20 °C'da saklandı.

5.26. Plazmit DNA'ların Memeli Hücrelerine Transfeksiyonu

Tez çalışması kapsamında transfeksiyon deneylerinde HEK293 ve HeLa hücre hatları kullanıldı. Hücreler %10 serum içeren D'MEM besiyerinde çalışma amacına uygun olarak 6 cm'lik petrilere $1x10^6$ hücre/petri, 6-kuyulu plaklara $5x10^5$ hücre/kuyu, 12-kuyulu plaklara $2,5x10^5$ hücre/kuyu veya 24-kuyulu plaklara $1,5x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. İnkübasyondan 20-24 saat sonra çoğalan hücreler plazmit DNA'ları ile transfekte edildi. Transfeksiyon deneylerinde 6 cm'lik petri için 4-5 µg, 6-kuyulu plaklar için 2-3 µg, 12-kuyulu plaklar için 1-2 µg ve 24-kuyulu plaklar için ortalama 0,5-1 µg plazmit DNA'sı kullanıldı. Plazmit DNA'lar 15-20 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde OPTI-MEM içerisinde seyreltildi. Plazmit DNA'ların transfeksiyonunda; katyonik bir polimer olan polietilenimin'den (PEI) veya HEK293 hücreleri için ticari olarak geliştirilen 293fectin'den (Invitrogen) yararlanıldı. 293fectin ile yapılan transfeksiyonlarda DNA (µg) : 293fectin (µl) oranı 1 : 2,5 olarak kullanıldı. PEI ile gerçekleştirilen transfeksiyon deneylerinde ise; farklı miktarlarda PEI test edilerek mikrogram DNA için gerekli olan uygun miktar belirlendi. Yapılan optimizasyon sonucunda DNA (µg) : PEI (µg) oranı 1 : 2 olarak saptandı. Uygun hacimlerde OPTI-MEM içerisinde seyreltilen 293fectin veya PEI, plazmit DNA örnekleri ile karıştırıldı. Karışım 10 dakika oda sıcaklığında bekletilerek DNA komplekslerinin oluşumu sağlandı. Ardından oluşan DNA kompleksleri kültür ortamına eklendi. Kültürler 45-48 saat standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. İnkübasyon sonrası hücreler deneyin amacına uygun olarak kullanıldı.

5.27. Memeli Ekspresyon Vektörlerine Klonlanan Genlerin Ekspresyonlarının Western Melezleme Yöntemi ile Kontrolü

İnsan *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genlerini taşıyan pCHA plazmit vektörlerinin, influenza A virüsü $NS1_w$ (WSN) genini taşıyan pCAGGS, pCAGGS-GST ve pCAGGS-Flag plazmit vektörlerinin ve *Cas9* geni taşıyan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörünün memeli hücrelerinde ekspresyon yapıp yapmadıkları ve bu genlerin ekspresyon düzeyleri Western melezleme tekniği ile incelendi. Bu amaçla; plazmit vektörler HEK293 hücrelerine transfekte edildi ve bu hücrelerden hazırlanan protein örnekleri sodyum dodesil sülfat-poliakrilamid jel elektroforezi (SDS-PAGE)/Western melezleme yöntemi ile analiz edildi.

5.27.1. Plazmit DNA'ların HEK293 hücrelerine transfeksiyonu ve hücre lizatlarının hazırlanması

Plazmit DNA'ların ekspresyonlarının kontrol edildiği transfeksiyon deneylerinde HEK293 hücreleri kullanıldı. Hücreler 12-kuyulu plaklara %10 serum içeren D'MEM besiyerinde ortalama $2{,}5x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve üremeye bırakıldı. İnkübasyondan 20-24 saat sonra her bir kuyucukta çoğalan hücreler 2 µg plazmit DNA'sı ile transfekte edildi. Transfeksiyon aşamaları 5.26'da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Transfeksiyondan 45-48 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 200 µl x4 konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponu içerisinde bir silikon sıyırıcı yardımıyla toplandı. Hücre lizatları 15-20 kez insülin enjektöründen geçirildi. 95-100 °C'da 5 dakika bekletilerek, proteinlerin denatüre olması sağlandı. Lizatlarda bulunan proteinler SDS/PAGE ile ayrıştırıldı ve Western melezleme tekniği ile analiz edildi.

5.27.2. Poliakrilamid jellerin hazırlanması ve proteinlerin SDS-PAGE (Poliakrilamid Jel Elektroforezi) ile ayrılması

Protein elektroforezi için 100x100x1 mm boyutlarında jeller kullanıldı. Jeller %10 (a/h)'luk ayırma jeli ve % 5 (a/h)'lik paketleme jeli olarak iki bölüm halinde aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı:

	%10 Ayırma Jeli	%5 Paketleme Jeli
Akrilamid/bisakrilamid çözeltisi (%29/%1 -a/h)	2 ml	0,5 ml
Ayırma jel tamponu (x4)	1,5 ml	-
Paketleme jel tamponu (x4)	-	0,75 ml
Deiyonize distile su	2,5 ml	1,75 ml
APS (%10 -a/h)	25 µl	10 µl
TEMED	10 µl	5 µl

Jel kasetine önce ayırma jeli döküldü ve jel yüzeyine 500 µl deiyonize distile su uygulanarak jel yüzeyinin düzgün bir şekilde polimerize olması sağlandı. Polimerizasyon tamamlandıktan sonra jel yüzeyindeki su uzaklaştırıldı ve yukarıda belirtildiği şekilde hazırlanan paketleme jeli, ayırma jelinin üzerine döküldü. Hemen sonrasında; hava kabarcığı oluşmayacak şekilde jel tarakları yerleştirildi ve oda sıcaklığında polimerizasyonu sağlandı. Bir önceki bölümde belirtildiği şekilde hazırlanan hücre lizatları 5-15 µl arasında değişen miktarlarda jele uygulandı. Elektroforez işlemi, poliakrilamid jel elektroforez tamponu içerisinde iki jel kaseti için ilk 15 dakika 80 volt, daha sonra 75 dakika 140 volt gerilim altında gerçekleştirildi. Elektroforez sonrası, jel üzerinde ayrılan proteinler Western melezleme yöntemi ile analiz edildi.

5.27.3. Western melezleme yöntemi

Western melezleme yöntemi; proteinlerin membranlara transferi, bloklama, birincil antikor uygulaması ve yıkama, ikincil antikor uygulaması ve yıkama ve görüntüleme aşamalarından oluşan bir protein analiz tekniğidir. Tez çalışması kapsamında oluşturulan plazmit vektörler ile transfekte edilen hücrelerde ilgili genlerin anlatım yapıp yapmadıkları Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Yukarıda anlatıldığı şekilde SDS/PAGE ile ayrıştırılan proteinler 0,45 µm PVDF membranlara transfer edildi. Bunun için transfer kasetleri arasında "Sünger-Filtre Kağıdı – PVDF Membran - Jel - Filtre Kağıdı - Sünger" sırasına göre transfer sandviçi hazırlandı. Hazırlanan transfer sandviçi transfer tamponu ile doldurulmuş tanka yerleştirildi. Transfer işlemi; aşırı ısınmayı önlemek için soğutulan ortamda ilk 45 dakika 45 volt, daha sonra 75 dakika 90 volt gerilim altında gerçekleştirildi. Protein

transferi işleminden sonra membranlar oluşabilecek özgün olmayan bağlanmaların önlenmesi için en az 1 saat bloklama solüsyonunda bekletildi. Bloklama işlemi sonrası membranlar, bloklama çözeltisi içerisinde 1:500-1:1000 oranlarında seyreltilen proteinlere özgü birincil antikorlar ile 15-16 saat süre ile muamele edildi.

Birincil antikor olarak, pCHA plazmit vektöründe klonlanan dolayısıyla HA uzantısı taşıyan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerin analizinde, fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru (Santa Cruz, sc-7392); pCAGGS vektöründe klonlanan doğal $NS1_w$ proteininin analizinde, tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru (Invitrogen, PA5-32243); pCAGGS-GST plazmit vektörüne klonlanan, dolayısıyla GST uzantısı taşıyan $NS1_w$-GST proteininin analizinde, tavşan orjinli poliklonal anti-GST antikoru (Abcam, ab9085); pCAGGS-Flag plazmit vektöründe klonlanan ve karboksi terminal uçta Flag uzantısı bulunan $NS1_w$-Flag proteininin analizinde ve CRISPR/Cas9 sistemi için oluşturulan pCas9-EEF-1, pCas9-EEF-2, pCas9-LSG-1 ve pCas9-LSG-2 plazmit vektörlerinde yer alan, Flag uzantısı (3xFlag) taşıyan Cas9 proteinlerinin analizinde, tavşan orjinli poliklonal anti-Flag antikoru (Invitrogen, MA1-91878) kullanıldı.

Birincil antikor uygulaması sonrasında membranlar bir kez 25 dakika TBS-T, iki kez 25 dakika TBS ile 80 dev./dk hızda bir karıştırıcıda karıştırılarak yıkandı. Yıkama işleminden sonra membranlar TBS tamponunda 1/7500 oranında seyreltilen HRP-konjuge keçi anti-fare IgG (Invitrogen, 31420) veya anti-tavşan IgG (Invitrogen, 31423) ikincil antikorları ile muamele edildi ve ardından bir kez 25 dakika TBS-T, iki kez 25 dakika TBS ile 80 dev./dk hızda bir karıştırıcıda karıştırılarak yıkandı. Proteinler kemilüminesans substrat (Invitrogen, WP20005 veya GE-Healthcare, RPN2235) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntülendi.

5.28. Viral ve Hücresel Proteinlerin Hücre İçi Lokalizasyonlarının Saptanması

pCHA, pCAGGS, pCAGGS-GST veya pCAGGS-Flag plazmit vektörleri üzerinden kodlanan $NS1_W$, EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarının saptanmasında immünfloresans tekniklerden yararlanıldı. Bu

deneylerde HeLa hücreleri kullanıldı. HeLa hücreleri, transfeksiyon öncesi lameller yerleştirilmiş olan 12-kuyulu plaklara %10 serum içeren D'MEM besiyerinde ortalama $1x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekilerek üremeye bırakıldı. İnkübasyondan 20-24 saat sonra her bir kuyucukta çoğalan hücreler 1-2 µg plazmit DNA'sı ile transfekte edildi. Bunun için, plazmit DNA'lar 20 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde OPTI-MEM içerisinde seyreltildi. Transfeksiyonda katyonik bir polimer olan polietilenimin'den (PEI) yararlanıldı. DNA (µg) : PEI (µg) oranı 1:2 olarak belirlendi. Oluşturulan DNA kompleksleri kültür ortamına eklendi. Transfeksiyondan yaklaşık 40 saat sonra hücreler immünfloresans testlerinde kullanıldı. Lameller üzerinde üretilen HeLa hücreleri 1 ml T-FTS içerisinde 10 dakika bekletilerek yıkandı. Ardından 0,75 ml %3 paraformaldehit çözeltisinde 15 dakika bekletilerek fikse edildi. Fiksasyon sonrası hücreler 1 ml T-FTS içerisinde 10 dakika bekletilerek yıkandı ve 0,75 ml %0,1 NP-40 çözeltisi içerisine alınarak antikorlar için geçirgenlikleri arttırıldı. İstenmeyen bağlanmaları en aza indirmek için hücreler T-FTS içerisinde hazırlanmış 1 ml %1 yağsız süt tozu çözeltisi içinde 30 dakika bekletildi ve sonrasında %1 yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde 1/250-1/500 oranlarında seyreltilerek hazırlanan birincil antikorlar ile 1 saat muamele edildi. Birincil antikor olarak, pCHA plazmit vektöründe HA epitopu kodlayan dizi ile kaynaşmış halde klonlanan, dolayısıyla HA uzantısı taşıyan EEF1G, LSG1 ve DDx56 proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarında fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru (Santa Cruz, sc-7392); pCAGGS-GST, pCAGGS-Flag ve pCAGGS vektörleri üzerinden kodlanan farklı formlardaki $NS1_w$ proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarını saptamak için, tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru (Invitrogen, PA5-32243) veya fare orjinli monoklonal anti-NS1 antikoru (Santa Cruz, sc-130568) kullanıldı. Birincil antikor sonrası 1 ml T-FTS ile yapılan yıkama işleminden sonra hücreler 20 dakika %1 yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde bekletildi. İkincil antikor olarak; %1 yağsız süt tozu çözeltisi içerisinde 1/300 oranında seyreltilen Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru veya Alexa568-konjuge anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Ayrıca ikincil antikorlarla birlikte hücre nükleuslarının işaretlenmesi için 1/500-1000 oranında 5 mg/ml konsantrasyonda DAPI (4',6'-diamino-2-fenil-indol) çözeltisi kullanıldı. Uygulama 1 saat sürede karanlık ortamda gerçekleştirildi. Sonrasında hücreler tekrar 1 ml T-FTS içerisinde 10 dakika süre ile 3 kez yıkandı. Yapılan yıkama işlemlerinden sonra üzerinde hücre bulunan lameller 2-3

µl kapatma çözeltisi eklenmiş bir lam üzerine kapatıldı. Lamellerin etrafına şeffaf oje sürüldü ve proteinler DP72 soğutmalı kamera bağlı bir floresans mikroskop (Olympus, BH40) altında görüntülendi.

5.29. İnfluenza A virüsü NS1 Proteini ile İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinleri Arasındaki İlişkinin Maya-İkili Hibrit Metodu ile Analizi

İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile maya GAL4 proteini aktivasyon domaini ile kaynaşmış halde EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri arasındaki ilişki Yüksek lisans tez çalışmam sırasında maya ikili-hibrit testleri ile saptanmıştır. DNA dizi analizleri, *GAL4-AD* geni ile kaynaşmış haldeki bu cDNA'ların tam boyutta EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlamadıkları, bu proteinlerin karboksi terminal bölgelerini kodlayan dizilerden ibaret olduğunu göstermiştir. Bu nedenle Doktora tezi çalışması kapsamında tam boyutta EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan genler maya ikili-hibrit metodu için geliştirilen plazmit vektörlere klonlandı. Elde edilen bu plazmitler ile *Saccharomyces cerevisiae* maya hücrelerinde tam boyutta EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin NS1 proteini ile ilişkileri ikili-hibrit metodu ile incelendi.

5.29.1. NS1-Bait plazmiti ile *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genleri klonlanan maya ikili-hibrit vektörlerinin maya hücrelerine transformasyonu

İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinleri arasındaki ilişkiyi saptamak için; pGBD-C1 plazmit vektöründe GAL4 bağlanma bölgesini kodlayan dizi ile aynı çerçevede klonlanarak elde edilen pGBD-$NS1_W$ veya pGBD-$NS1_D$ plazmit vektörleri (bait) ile pGAD424 ya da pACT2 plazmitlerinde GAL4 aktivasyon bölgesini kodlayan dizi ile aynı çerçevede *EEF1G*, *LSG1* veya *DDX56* geni taşıyan plazmitler *S. cerevisiae* PJ69-4A maya hücrelerine transforme edildi. Transformasyon işlemi iki aşamada gerçekleştirildi. İlk aşamada *S. cerevisiae* bait plazmitleri ile, daha sonra *EEF1G, LSG1* veya *DDX56* geni taşıyan plazmitler ile transforme edildi.

NS1 Bait (yem) Proteini Kodlayan Plazmitlerin Maya Hücrelerine Transformasyonu

Küçük ölçekte (5 ml) hazırlanan *S. cerevisiae* PJ69-4A maya kültürleri pGBD-C1 (kontrol plazmiti), pGBD-$NS1_W$ veya pGBD-$NS1_D$ bait plazmitleri ile LiAc/PEG yöntemi kullanılarak transforme edildi. Bu amaçla YPAD katı besiyerinde üretilen *S. cerevisiae* PJ69-4A maya kolonilerinden tek bir koloni steril koşullarda öze ile alınarak 5 ml YPAD sıvı besiyerine ekildi ve kültürler 30 °C'da 200 dev./dk çalkalanma hızında 20-24 saat süreyle inkübe edildi. Daha sonra kültür 3000 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Hücreler 10 ml FTS içerisinde süspanse edildi ve 20 °C'da 3000 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edildi. Çökeltilen hücreler 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 edilerek plazmitlerin transformasyonunda kullanıldı. Steril 1,5 ml'lik plastik tüplere 0,5-1 µg pGBD C1 (kontrol plazmiti), pGBD-$NS1_W$ veya pGBD-$NS1_D$ 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 10 dakika bekletilerek hücreler sıcaklık şoku etkisinde bırakıldı. Hücreler oda sıcaklığında 5000 dev./dk hızda 2 dakika santrifüj edilerek çökeltildi. Hücre çökeltileri iki kez 1ml FTS ile yıkandı ve 500 µl FTS içerisinde süspanse edildi. Hazırlanan hücre süspansiyonundan 150 µl, triptofan içermeyen katı SD+LHA besiyerine cam bagetle yayılarak ekildi. Kültürler 30 °C'da 48 saat süre ile üremeye bırakıldı.

Maya Hücrelerinden Plazmit DNA İzolasyonu

Triptofan içermeyen katı SD+LHA katı besiyerinde üretilen maya kolonilerinden tek bir koloni steril koşullarda öze ile alınarak 3 ml triptofan içermeyen sıvı SD+LHA besiyerine ekildi ve kültürler 30 °C'da 200 dev./dk çalkalanma hızında 20-24 saat süreyle inkübe edildi. Üretilen kültürden 500 µl alınarak 3000 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Çökeltilen hücreler 100 µl LiAc/SDS ile süspanse edildi ve 75 °C' da 5 dakika bekletildi. Daha sonra ortama 300 µl saf etil alkol eklendi, karıştırıldı ve 15000 devir/dakika hızda 3 dakika santrifüj edilerek DNA ve hücre artıkları çöktürüldü. Çökelti 500 µl %70 etil alkol ilavesiyle yıkandıktan sonra aynı hızda 2 dakika santrifüj edildi. Çökelti 100 µl TE tamponu eklenerek iyice

karıştırıldı. Karışım 15000 devir/dakika hızda 2 dakika santrifüj edildi. DNA içeren üst faz PZR için kalıp olarak kullanıldı (Looke ve ark., 2011).

Maya Hücrelerinden İzole Edilen NS1 Yem ve Kontrol Plazmitlerinin PZR ile Kontrol Edilmesi

Maya hücrelerinden izole edilen plazmit DNA'ları PZR reaksiyonu ile kontrol edildi. PZR reaksiyonları 0,2 ml'lik PZR tüplerinde 20 µl hacim içerisinde gerçekleştirildi. Plazmitlerin tamamı için ileri primer olarak hedef bölgesi vektör içerisinde olan *GAL4-For* kullanılırken; geri primer olarak pGBD-C1 kontrol plazmiti için *pGAD-Seq-Rev*; pGBD-NS1$_W$ plazmiti için *NS1/W-Rev*; pGBD-NS1$_D$ plazmiti için *NS1/D-Rev* primerleri kullanıldı. Reaksiyon karışımı ve PZR koşulları aşağıda belirtildiği şekilde hazırlandı. Reaksiyon sonrası PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi.

Reaksiyon Karışımı	
Plazmid DNA	4 µl
İleri primer (10 pM/µl)	1 µl
Geri primer (10 pM/µl)	1 µl
Deiyoize distile su	4 µl
PCR Master Mix (2x)	10 µl
Total hacim	**20 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	95 °C	3 dk.
33 döngü	95 °C	15 sn.
	53 °C	15 sn.
	72 °C	90 sn.
1 döngü	72 °C	10 dk.

EEF1G, LSG1 veya DDX56 Geni Taşıyan Maya İkili-Hibrit Plazmitlerin, Bait Plazmiti Taşıyan Maya Hücrelerine Transformasyonu

pGBD-C1 (kontrol plazmiti), pGBD-NS1$_W$ veya pGBD-NS1$_D$ bait plazmitleri transforme edilen maya hücrelerine EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan maya ikili-hibrit plazmitleri transforme edildi. Bunun için küçük ölçeklerde kültürler hazırlandı ve maya transformasyonunda yukarıda detayları ile belirtilen metod izlendi. Transformasyon işlemi sonrasında her bir hücre süspansiyonundan 150 µl triptofan ve lösin içermeyen katı SD+HA besiyerine ekim yapıldı. Kültürler 30

°C'da 48 saat süre ile üremeye bırakıldı. Katı besiyerinde üreyen ikili transformant maya kolonileri, influenza A virüsü NS1 proteinleri ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteini arasındaki fiziksel etkileşimi saptamak amacıyla kullanıldı.

5.29.2. İkili maya transformantların seçici besiyerlerinde üreme özelliklerinin izlemesi

İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinleri arasındaki etkileşimi değerlendirmek amacıyla, her iki maya ikili-hibrit plazmiti taşıyan transformant (BAİT/pGAD424-EEF1G, BAİT/pACT2-LSG1 veya BAİT/pACT2-DDX56 plazmit çiftleri) maya kolonilerinden beşer adet SD (Sentetik Dekstroz besiyeri; Trp, His, Leu ve Ade içermeyen) ve SD+HA besiyerlerine (kontrol amaçlı) ekimleri yapılarak üreme profilleri izlendi.

5.29.3. Seçici besiyerlerinde üreme profilleri izlenen maya kolonilerinde belirteç β-Galaktozidaz enzim aktivitesinin saptanması

S. cerevisiae PJ69-4A maya ırkı, iki hibrit proteinin etkileşimine duyarlı üç belirteç gen taşımaktadır. Bu genlerden biri, GAL4 transkripsiyon aktivatör proteini tarafından uyarılan β-galaktozidaz genleridir. Bu bilgi ışığında; maya hücrelerinde tespit edilen interaksiyonun doğruluğunu kontrol etmek için seçici SD besiyerinde üreme profilleri izlenen kolonilerin β-galaktozidaz enzim aktiviteleri ölçüldü. Seçici besiyerinde üreyebilen kolonilerden 3 ml SD+HA sıvı besiyerine ekim yapıldı ve 30 °C'da 200 dev./dk çalkalanma hızında 15-16 saat süreyle üremeye bırakıldı. Elde edilen kültürlerden 750 µl alınarak 7000 dev./dk hızda 3 dakika santrifüj edilerek hücreler çöktürüldü. Hücre çökeltileri 100 µl Z (-) tamponunda süspanse edildi. 5-6 kez tekrarlanan dondurma (-80°C) / çözme (37°C) işleminin ardından 2-β-Merkaptoetanol içeren Z (+) tamponundan 700 µl eklenip karıştırıldı. 160 µl ONPG (4 mg/ml) substrat çözeltisi eklendi ve 30-60 dakika arasında değişen sürelerde 30 °C'da inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örneklere 400 µl 0,5 M Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Örnekler oda sıcaklığında 15000 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edilerek hücre artıkları çökeltildi. Üst sıvıların 420 nm dalga boyunda absorbans değerleri ölçüldü. Elde edilen absorbans değerlerine karşılık gelen β-

galaktozidaz aktivite değerleri, aktivitesi bilinen rekombinant β-galaktozidaz enzimi için hazırlanan bir standart grafiğin eğim formülü üzerinden hesaplandı.

β-Galaktozidaz Enzimi için Standart Grafiğinin Oluşturulması

Standart grafiğinin oluşturulmasında stok konsantrasyonu 200 mU/µl olan β-galaktozidaz enzimi (Giacomini ve ark., 1992) kullanıldı. Enzim stoğu 300 µl Z (+) tamponu içerisinde 1mU, 0,5 mU, 0,25 mU, 0,125 mU ve 0,0625 mU konsantrasyon değeri olacak şekilde seyreltildi. Her bir konsantrasyon değeri için 3 örnekle çalışıldı. Daha sonra örneklerin üzerine 60 µl (4 mg/ml) ONPG subsrat çözeltisi eklendi ve 30 dakika ve 3 saat arasında değişen sürelerde 30 °C'da inkübe edildi. İnkübasyon sonrası örneklere 300 µl 0,5 M Na_2CO_3 çözeltisi eklenerek reaksiyon durduruldu. Örneklerin 420 nm dalga boyunda absorbans değerleri belirlendi. Absorbans değerleri ve bu değerlere karşılık gelen enzim miktarları üzerinden standart grafikler hazırlandı.

5.30. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 Proteinleri Arasındaki Etkileşimlerin Memeli Hücrelerinde Araştırılması

NS1 proteini ve konak hücre proteinleri (EEF1G, LSG1, DDX56) arasındaki fiziksel etkileşimler birlikte-immün çöktürme, GST ile çöktürme ve immünfloresans teknikler ile araştırıldı.

5.30.1. NS1 proteini ve konak proteinleri arasındaki etkileşimin birlikte-immün çöktürme teknikleri ile analizi

Hücrelerde birlikte sentez edilen iki protein arasındaki fiziksel etkileşimin saptanmasında proteinleri birlikte-immün çöktürme yöntemi kullanıldı. Yapılan çalışmada, HA uzantılı konak hücre proteinlerini (EEF1G, LSG1 veya DDX56) ve influeza A virüsü NS1 proteini kodlayan plazmit DNA'ları 6 cm'lik petrilerde $1x10^6$ hücre/petri olacak şekilde ekimi yapılan HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Bölüm 5.26'da belirtildiği şekilde, 2,5 µg NS1 kodlayan plazmit ve 2,5 µg konak proteini kodlayan plazmit DNA'sı HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 45-48 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 1 ml T-FTS ile yıkandı. Hücrelere T-FTS içinde seyreltilen 750 µl 1 mM DSP çözeltisi eklendi ve

4 °C'da 2 saat bekletildi. Daha sonra reaksiyonu durdurmak için ortama 75 µl 0,1M Glisin eklendi. Oda sıcaklığında 5 dakika 100 dev./dk hızda bir karıştırıcıda karıştırıldıktan sonra DSP-Glisin karışımı uzaklaştırıldı. Hücreler 650 µl RIPA tamponu içerisinde veya hücre parçalama tamponunda (50 mM Tris, 150 mM NaCl, %0,1 NP-40, 1 mM DTT, 2 mM PMSF, pH:8) parçalandı. Lizatlar 4-5 kez dondurma (-80 °C) /çözme (37 °C) işleminin ardından 15-20 kez 27G insülin iğnesi takılı enjektörden geçirildi ve 15000 dev./dk hızda 5 dakika santrifüj edildi. Üst sıvılar birlikte immün-çöktürme testlerinde kullanıldı.

Birlikte immün-çöktürme deneyleri transfeksiyon/enfeksiyon koşullarında da gerçekleştirildi. Bunun için HEK293 hücreleri sadece konak hücre proteinlerini kodlayan plazmit DNA'ları (pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 veya pCHA-DDX56) ile transfekte edildi ve transfeksiyondan 40 saat sonra hücreler influenza A virüsleri ile enfekte edildi. HEK293 hücreleri 6-kuyulu plaklarda ($5x10^5$ hücre/kuyu) çoğaltıldı ve 3 µg konak hücre proteinlerini kodlayan plazmit DNA'sı ile transfekte edildi. Transfeksiyon işlemleri 5.26'da belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Transfeksiyon sonrası hücreler %1 BSA içerisinde 1 moi titrede seyreltilen 500 µl WSN veya DkPen tipi influenza A virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyon aşamaları 5.20'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Enfeksiyondan 8 saat sonra besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler 500 µl T-FTS ile yıkandı. Hücreler, birlikte transfekte olan örneklerde olduğu gibi DSP etkisinde bırakıldı ve RIPA tamponunda parçalanarak immün çöktürme testlerinde kullanıldı.

Birlikte-immün çöktürme testleri için; 300 µl hücre lizatına 200 µl Bağlanma-Yıkama tamponu (50 mM Tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH:8) ve 3 µl monoklonal fare anti-HA antikoru eklendi ve örnekler 4 °C'da 2 saat boyunca dikey tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Daha sonra hücre lizatına 25 µl IgG antikorlarının değişmez bölgelerine (*İng. constant-Fc*) karşı yüksek afinite gösteren (Stone ve ark., 1989) protein A-Sefaroz (GE-Healthcare, CL-4B) boncuklar eklendi. Örnekler 4 °C'da bir gece boyunca dikey tüp karıştırıcısında karıştırıldı. Sonrasında 2000 dev./dk hızda 2 dakika santrifüj edilerek protein A-Sefaroz boncuklar çöktürüldü. Üst sıvı uzaklaştırıldı, çökelti 500 µl Bağlanma-Yıkama tamponunda süspanse edildi ve 5-10 dakika tüp karıştırıcıda karıştırıldı. Yıkama işlemi 3 kez daha tekrar edildi. Kontrol

için antikor eklenmemiş lizat örneklerine de protein A-Sefaroz boncuklar ile çöktürme işlemi uygulandı. Protein A-Sefaroz boncuklar ve boncuklara bağlı proteinler 50 µl 2x konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda süspanse edildi ve 5 dakika 95-100 °C'da bekletildi. Örnekler hem NS1 hem de konak hücre proteinleri (EEF1G, LSG1 veya DDX56) için SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi (bkz. 5.27.3). Western melezleme deneylerinde birincil antikor olarak fare monoklonal anti-HA veya tavşan poliklonal anti-NS1 antikorları; ikincil antikor olarak, HRP-konjuge keçi anti-fare IgG veya anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Proteinler kemilüminesans substrat (Invitrogen, WP20005 veya GE-Healthcare, RPN2235) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntülendi.

5.30.2. NS1 proteini ve konak proteinlerinin GST ile çöktürme yöntemi ile analizi

Birlikte immün çöktürme testlerinde olduğu gibi, bu testlerde de 6-kuyulu plaklarda çoğaltılan HEK293 hücreleri HA uzantılı konak hücre proteinlerini ve GST uzantılı NS1 proteinini kodlayan plazmit vektörler ile birlikte transfekte edildi. Transfekte edilen hücreler; bir önceki bölümde anlatıldığı şekilde RIPA tamponu veya hücre parçalama tamponu kullanılarak parçalandı. Hazırlanan hücre lizatlarında GST uzantılı NS1 proteininin glutatyon (GSH)-Sefaroz boncuklar ile çökelmesi sağlandı. Antikor kullanılmadan gerçekleştirilen çökelme deneylerinde; 300 µl hücre lizatına 200 µl Bağlanma-Yıkama tamponu (50 mM tris, 150 mM NaCl, 1 mM DTT, pH:8) ve 25 µl GSH-Sefaroz süspansiyonu eklenerek örneklerin 4 °C'da bir gece boyunca boyunca dikey tüp karıştırıcısında karıştırılması sağlandı. GSH-Sefaroz boncuklar ve boncuklara bağlı proteinler yukarıda belirtildiği şekilde yıkama tamponu ile yıkandı. GSH-Sefaroz çökeltileri 50 µl x2 konsantre SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda süspanse edildi ve 95-100 °C'da 5 dakika bekletildi. Örnekler hem NS1 hem de HA uzantılı konak hücre proteinleri için SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi (bkz. 5.27.3). Western melezleme deneylerinde birincil antikor olarak fare monoklonal anti-HA ve tavşan poliklonal anti-GST antikorları; ikincil antikor olarak HRP-konjuge keçi anti-fare IgG veya anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Proteinler kemilüminesans substrat (Invitrogen, WP20005 veya GE-Healthcare, RPN2235) kullanılarak jel görüntüleme sistemi (DNR Bio-Görüntüleme sistemi) ile görüntülendi.

5.30.3. NS1 ve konak proteinlerinin hücre içi birlikte-lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile analizi

Birlikte sentez edilen iki protein arasındaki etkileşimler; proteinlerin aynı bölgelerde lokalize olmalarına ve bunun bir sonucu olarak da birbirlerinin hücre içi konumlarında değişmelere neden olabilmektedir. Bu sebeple; birlikte sentez edilen proteinlerin hücre içerisinde benzer şekilde lokalize olup olmadıklarının saptanması, proteinler arası fiziksel etkileşimlerin varlığına dair önemli ipuçları vermektedir. Bu amaçla proteinlerin hücre içi birlikte-lokalizasyonlarının tespitinde immünfloresans tekniklerden yararlanıldı. Deneylerde 12-kuyulu plaklara yerleştirilmiş olan lameller üzerinde üretilen HeLa hücreleri kullanıldı. Hücreler 1 µg NS1 (doğal NS1, Flag veya GST uzantılı NS1) proteini kodlayan plazmit ve 1 µg HA uzantılı insan EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edildi (bkz. 5.26). Transfeksiyondan yaklaşık 40 saat sonra hücrelerde sentez edilen proteinler immünfloresans yöntemlerle görüntülendi (bkz. 5.28). Deneylerde birincil antikor olarak, HA uzantısı taşıyan insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri için fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru (Santa Cruz, sc-7392); NS1 proteinleri ($NS1_W$, $NS1_W$-Flag, $NS1_W$-GST) için ise tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru (Invitrogen, PA5-32243) kullanıldı. İkincil antikor olarak, Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru ve Alexa568-konjuge anti-tavşan IgG antikoru kullanıldı. Aynı hücrede sentezlenen, farklı dalga boyunda ışıma yapan florokromlar ile konjuge ikincil antikorlarla işaretlenen proteinlere ait görüntüler çakıştırılarak sonuçlar analiz edildi.

5.31. EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerinin İnfluenza A Virüs Replikasyonuna Etkilerinin Araştırılması

EEF1G, LSG1 ve DDX56 konak proteinlerinin viral replikasyon üzerine olası etkilerini saptanmak için üç farklı yol izlendi: *i.* Konak proteinlerinin miktarları arttırılan (*İng. over-expression*) hücrelerde influenza A virüs replikasyonunun izlenmesi. *ii*. RNA interferens tekniklerinden yararlanarak ilgili protein sentez düzeyi azaltılan (*İng. knock down*) hücrelerde viral replikasyonun izlenmesi. *iii.*

CRISPR/Cas9 tekniğinden yararlanarak ilgili proteinlerin sentezi durdurulan (*İng. knock out*) hücrelerde viral replikasyonun izlenmesi.

5.31.1. EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin aşırı ekspresyonlarının influenza A virüs replikasyonuna etkilerinin araştırılması

EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerini kodlayan plazmit DNA'ların geçici transfeksiyonu ile söz konusu protein miktarları yapay olarak arttırılan HEK293 hücrelerinde influenza A virüs replikasyonu, yapılan enfeksiyonun ardından hücrelerde viral M1 protein miktarının SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi ile izlendi. Bunun için; 12-kuyulu plaklarda ekimi yapılan HEK293 hücreler ($2,5x10^5$ hücre/kuyu) bölüm 5.26'da anlatıldığı şekilde 2 µg plazmit DNA'lar ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36-40 saat sonra kültürlerin besiyerleri uzaklaştırıldı ve hücreler %1 BSA içerisinde 1 moi titresinde olacak şekilde seyreltilen 250 µl influenza A/WSN/33-H1N1 veya influenza A/Duck/Pen-H5N2 virüs süspansiyonu ile enfekte edildi. Enfeksiyon işlemi 5.20'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Enfeksiyondan 8 ya da 10 saat sonra hücreler 200 µl 2x SDS-PAGE örnek yükleme tamponu içerisinde bir silikon sıyırıcı yardımıyla toplandı. Hazırlanan hücre lizatları influenza A virüsü M1 proteini ve hücresel Aktin beta proteini için SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi (bkz. 5.27). Bu deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-Aktin beta, fare monoklonal anti-HA ve tavşan poliklonal anti-M1 antikorları, ikincil antikor olarak; HRP-konjuge keçi anti-fare IgG veya anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Proteinler kemilüminesans substrat kullanılarak jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Elde edilen sonuçlar üzerinde viral ve hücresel proteinlerin bant yoğunlukları karşılaştırılarak konak proteinlerin viral replikasyon üzerine olası etkileri analiz edildi.

5.31.2. *DDX56* gen ekspresyonu azaltılan hücrelerde influenza A virüs replikasyonunun araştırılması

Endojen *DDX56* gen transkript düzeyi bu gene özgü siRNA (*İng. small interfering RNA*) kullanılarak baskılanan HeLa hücrelerinde influenza A virüs replikasyonunun nasıl etkilendiğini saptamak amacıyla bu deneyler gerçekleştirildi.

HeLa Hücrelerinin DDX56-siRNA ile Transfeksiyonu

DDX56 geni transkript düzeyini azaltmak için (*İng. knock down*) HeLa hücreleri *DDX56* genine özgü siRNA ile transfekte edildi. Bunun için 30 pMol DDX56-siRNA'sı (Invitrogen, 1299001/ HSS182589) 100 µl OPTI-MEM içerisinde seyreltildi. Aynı hacimde seyreltilen 3 µl RNAi-max (Thermo Fisher Scientific, USA) ile karıştırıldıktan sonra oda sıcaklığında 10 dakika bekletilerek kompleks oluşumu sağlandı. Kontrol için aynı şekilde hazırlanan negatif kontrol siRNA (Invitrogen, 12935–200) kullanıldı. %10 serum içeren D'MEM besiyerinde üretilen HeLa hücreleri Tripsin-EDTA çözeltisi ile süspansiyon haline getirildi ve 1000 devir/dakika hızda 5 dakika santrifüj edilerek çökeltildi. Hücreler OPTI-MEM içerisinde süspanse edildi ve Thoma lamı ile hücre sayıları belirlendi. Hücreler, $3x10^5$ hücre/0,5 ml olacak şekilde 1,5 ml'lik tüplere aktarıldı ve üzerine siRNA/RNAi-max kompleksi eklendi. Hücre süspansiyonları 37 ºC'da dikey tüp karıştırıcısında 30 dakika karıştırıldı. Daha sonra hücreler her bir kuyusunda 2 ml besiyeri içeren 6-kuyulu plaklara aktarıldı ve standart kültür koşullarında inkübasyona bırakıldı. İnkübasyondan 20-24 saat sonra besiyerleri taze besiyerleri ile değiştirildi ve toplam 48 saat olacak şekilde inkübasyona devam edildi. İnkübasyon sonrası; üremeye bırakılan hücrelerin bir kısmı RNA izolasyonunda kullanılırken, bir kısmı viral enfeksiyonda kullanıldı.

DDX56-siRNA ile Transfekte Hücrelerden RNA İzolasyonu ve DDX56 Transkript Düzeyinin Saptanması

Yukarıda belirtildiği şekilde DDX56-siRNA ile transfekte edilen hücrelerden her bir örnek için $5x10^5$ hücre alındı ve RNA izolasyonunda kullanıldı. Aynı miktarda transfekte olmamış HeLa hücresi de kontrol amaçlı hazırlandı. Total RNA izolasyonu ticari RNA izolasyon kiti (Qiagen) ile gerçekleştirildi. Yöntem olarak üretici firma tarafından önerilen ve 5.22.1'de ayrıntılı olarak verilen yöntem izlendi. Hücrelerden elde edilen total RNA molekülleri sodyum hipoklorit (çamaşır suyu) içeren %1' lik agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi ve yaklaşık olarak miktarları belirlendikten sonra cDNA sentezinde kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı. DDX56-siRNA ile transfekte hücrelerden izole edilen RNA üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA hazırlandı. cDNA'ların hazırlanmasında 5.22.2'de

verilen yöntem izlendi. Elde edilen cDNA'lar DDX56 transkript düzeyini saptamak için kantitatif PZR' de kalıp olarak kullanıldı.

siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde DDX56 transkript düzeyinin kantitasyonu gerçek zamanlı-PZR yöntemi ile belirlendi. Çalışmalar, sentezlenen cDNA'lar üzerinden FastStart Universal SYBR Green Master mix (Roche) kullanılarak CFX96 TouchTM Real-Time PCR (BioRad) cihazında gerçekleştirildi. Deneylerde cDNA örnekleri aynı koşullarda hazırlanan 3'lü seriler halinde çalışıldı ve bu ölçümlerin ortalaması analizlerde kullanıldı. Kantitatif PZR'de iç kontrol olarak HeLa hücrelerine ait Aktin beta geni transkript miktarı kullanılarak sonuçların normalizasyonu sağlandı. Standart olarak ise; pCHA-ACTB plazmit DNA'sı 1 pg/µl, 10 pg/µl, 100 pg/µl ve 1 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde kullanıldı. Reaksiyon karışımı ve koşulları aşağıda verildiği şekilde uygulandı:

Reaksiyon Karışımı	
cDNA veya standart DNA	2 µl
İleri primer (2.5 pM/µl)	1,5 µl
Geri primer (2.5 pM/µl)	1,5 µl
FastStart SYBR Green Master mix	5 µl
Total hacim	**10 µl**

PZR Koşulları		
Ön denatürasyon	94 °C	5 dk.
45 döngü	94 °C	10 sn.
	58 °C	30 sn.
	72 °C	15 sn.
1 döngü	68 °C	10 dk.

Floresans ışımalar 58 °C'da primerlerin bağlanma *(İng. annealing)* aşamasında ölçüldü. Özgül olmayan amplifikasyon ürünlerinin ve primer dimerlerinin oluşumunun tespiti için 65-95°C'da erime eğrisi *(İng. melting curve)* analizi yapıldı. Kantitatif PZR reaksiyonlarında; DDX56 cDNA'sı için *DDX56/831-For* ve *DDX56/959-Rev* primer çiftleri, Aktin beta cDNA'ları için *ACTB/280-For* ve *ACTB/552-Rev* primer çiftleri kullanıldı.

DDX56-siRNA ile Transfekte HeLa Hücrelerinde İnfluenza A Virüs Replikasyonunun Araştırılması

siRNA ile *DDX56* geni baskılanan hücrelerde viral replikasyonun nasıl etkileneceği, yapılan enfeksiyonun ardından hem viral protein miktarının SDS-PAGE/Western melezleme tekniğiyle analizi hem de virüs titrasyonunun plak testi ile analizi şeklinde araştırıldı. DDX56-siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücreleri 24-kuyulu plaklara $1,5x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 20 saat standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Hücrelere %1 BSA içerisinde 1 moi titresinde olacak şekilde seyreltilen influenza A/WSN/33-H1N1 virüs süspansiyonundan 150 µl eklendi. Enfeksiyon aşamaları 5.20'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Hücreler serum içeren 1 ml D'MEM besiyerinde inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyondan 8 saat sonra hücreler 100 µl 2x SDS-PAGE örnek yükleme tamponu içerisinde toplandı. Hazırlanan hücre lizatları influenza A virüsü M1 proteini ve hücresel Aktin beta proteini SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi (bkz. 5.27). Bu deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-Aktin beta ve tavşan poliklonal anti-M1 antikorları; ikincil antikor olarak, HRP- konjuge keçi anti-fare IgG veya anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Proteinler kemilüminesans substrat kullanılarak jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Elde edilen sonuçlar üzerinden transfekte olmamış, kontrol siRNA'lar ile transfekte olmuş ve DDX56-siRNA'lar ile transfekte olmuş hücrelere ait viral proteinlerin bant yoğunlukları karşılaştırılarak değerlendirme yapıldı.

DDX56-siRNA veya negatif kontrol siRNA ile transfekte hücrelerde virüs titrasyonu için, DDX56-siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücreleri 12-kuyulu plaklara $4x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve 0,1 moi titresinde influenza A/WSN/33-H1N1 virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyon işlemi 5.20'de belirtildiği şekilde gerçekleştirildi. Hücrelere 1 ml muhafaza besiyeri eklendi ve inkübasyona bırakıldı. Enfeksiyonun 8, 12 ve 24. saatlerinde serbestleşen virüsleri içeren 100-200 µl besiyeri alındı ve virüs titrasyonunu saptamak için plak testlerinde kullanılmak üzere -80 °C' da saklandı. Plak testi için MDCK hücreleri kullanıldı. MDCK hücreleri 12-kuyulu plaklara $4x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde ekildi ve standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. Tam tabaka oluşturan MDCK hücreleri, %1 BSA

içerisinde toplam 250 µl hacimde olacak şekilde 8.,12. ve 24. enfeksiyon saatinde toplanan virüsler ile enfekte edildi (bkz. 5.20) ve % 1 agaroz içeren muhafaza besiyerinde 35 °C'da 2-3 gün inkübe edildi. Inkübasyon sonrası hücreler metanol-asetik asit ile fikse edildi. Plaklara tutunan hücreler % 0,5'lik amido black ile boyandı ve virüs plakları görünür hale getirildi (bkz. 5.21.2). Kültürdeki virüs titresi 'plak formasyon ünitesi, pfu' olarak hesaplandı. DDX56-siRNA veya negatif kontrol siRNA ile transfekte hücrelerde saptanan virüs titreleri karşılaştırılarak sonuçlar değerlendirildi.

5.31.3. CRISPR/Cas9 tekniği ile *EEF1G* ve *LSG1* genlerinin susturulması ile ilgili çalışmalar

HeLa hücrelerinde EEF1G ve LSG1 proteinlerinin influenza A virüs replikasyonunu nasıl etkilendiğini saptamak amacıyla, CRISPR/Cas9 tekniğinden yararlanılarak bu proteinleri kodlayan genlerin susturulmasına (*İng. knock out*) yönelik çalışmalar yapıldı.

HeLa Hücrelerinin EEF1G veya LSG1 Genlerine Özgü Rehber RNA Kodlayan Vektörlerle Transfeksiyonu

HeLa hücreleri 5.24.5'de belirtildiği şekilde *EEF1G* ve *LSG1* genlerini susturmak için oluşturulan plazmit vektörler (pCas9-EEF-1, pCas9-EEF-2, pCas9-LSG-1, pCas9-LSG-2) ile transfekte edildi. HeLa hücreleri $2{,}5x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde %10 serum içeren D'MEM besiyerinde 6-kuyulu plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında 24 saat üremeye bırakıldı. Hücreler her bir gen için iki ayrı bölgede aynı anda hedef olacak şekilde iki plazmit vektörün karışımı ile (*EEF1G* geni için pCas9-EEF-1 ve pCas9-EEF-2; *LSG1* geni için pCas9-LSG-1 ve pCas9-LSG-2) ile transfekte edildi. Her bir transfeksiyon için toplamda 3 µg plazmit DNA'sı kullanıldı. DNA örnekleri, 20 ng/µl konsantrasyonda olacak şekilde OPTI-MEM içerisinde sulandırıldı ve eşit hacimde OPTI-MEM ile sulandırılan PEI ile karıştırıldı. Karışım oda sıcaklığında kompleks oluşumu için 15 dakika bekletildikten sonra besiyerlerine eklendi. Kültürler standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı.

EEF1G veya LSG1 Genleri Bakımından Knock Out Olma Olasılığı olan Hücre Klonlarının Seçilmesi

pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörü memeli hücrelerinde seleksiyona olanak tanıyan puromisin direnç geni taşıdığı için, plazmit almayan hücreleri bertaraf etmek amacıyla puromisin antibiyotiği kullanıldı. Transfeksiyondan 24 saat sonra kültürlerin besiyerlerine 0,50 µg/µl, 0,75 µg/µl veya 1µg/µl final konsantrasyonda olacak şekilde puromisin eklendi ve inkübasyona devam edildi. Ortalama 3 gün ara ile besiyerleri antibiyotik içeren taze D'MEM besiyerleri ile değiştirilerek ölü hücrelerin ortamdan uzaklaştırılması sağlandı. Bu işlem puromisine dirençli koloniler belirgin bir şekilde oluşana kadar (yaklaşık 9 gün) devam ettirildi. Yapılan bu ön seleksiyondan sonra puromisine dirençli hücreler Tripsin-EDTA etkisinde bırakılarak süspanse edildi. Hücreler 0,25 µg/µl puromisin içeren besiyerinde ortalama 2-3 hücre/100 µl olacak şekilde sulandırıldı ve bu sulandırımdan 96-kuyulu plaklara 100'er µl ekim yapıldı. Hücrelerin 96 kuyulu plaklarda üremesi belirli zaman aralıklarında mikroskop altında incelendi ve tek hücreden gelişen klonlar tespit edildi. Bu klonlar 12-kuyulu plaklara aktarılarak çoğalmaları sağlandı. Tek bir hücreden türetilen hücre klonlarının hem mRNA hem de genomik DNA üzerinden *EEF1G* veya *LSG1* genleri bakımından *knock out* olup olmadıkları analiz edildi.

CRISPR/Cas9 Tekniği ile EEF1G veya LSG1 Genleri Bakımından Knock Out Edilen Hücrelerin Analiz Edilmesi

Knock out olduğu düşünülen hücre klonlarında *EEF1G* ve *LSG1* genlerinde bir bozulma olup olmadığı; bu hücrelerden hazırlanan *EEF1G* ve *LSG1* cDNA'larının ya da genom DNA'ları üzerinde çoğaltılan *EEF1G* ve *LSG1* gen fragmentlerinin DNA dizi analizleri ile incelenmesi ile belirlendi. Bunun için hücre klonlarından total RNA ve/veya genom DNA izolasyonu yapıldı. Her iki molekül grubunun izolasyonunda da ticari kitler kullanıldı. Total RNA'lar üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak reverz transkripsiyon ile cDNA'lar hazırlandı (bkz. 5.22.2). Daha sonra *EEF1G* ve *LSG1* genlerine özgü primerler kullanılarak PZR ile *EEF1G* ve *LSG1* cDNA'ları çoğaltıldı. PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı (bkz. 5.22.4). cDNA'lar üzerinde Cas9 enzimine hedef olan bölgeler DNA dizi analizi ile incelendi. Benzer şekilde

klonlardan izole edilen genom DNA'ları üzerinden, *EEF1G* ve *LSG1* genleri için tasarlanan primerler kullanılarak PZR ile Cas9 enzimi için hedef olan bölgeler çoğaltıldı. Bunun için Tablo 1'de dizileri verilen *EEF-gF/EEF-gR, LSG-gF1/LSG-gR1 veya LSG-gF2/LSG-gR2* primer çiftleri kullanıldı. PZR sonrası elde edilen ürünler, agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldı ve DNA fragmentleri üzerinde hedef diziler DNA dizi analizi ile incelendi.

CRISPR/Cas9 Tekniği Aracılığıyla EEF1G veya LSG1 Genlerinde Oluşturulan Mutasyonların İnfluenza A Virüs Replikasyonuna Etkilerinin Araştırılması

DNA dizi analizi ile *EEF1G* veya *LSG1* genlerinde mutasyon olduğu saptanan klonlarda influenza A viral replikasyonunun nasıl etkileneceği araştırıldı. Bu amaçla, mutant hücre klonları $2x10^5$ hücre/kuyu olacak şekilde 24-kuyulu plaklara ekildi ve standart kültür koşullarında üremeye bırakıldı. İnkübasyondan 20-24 saat sonra hücreler hem insan tipi (A/WSN/1933-H1N1) hemde kuş tipi (A/Duck/Pen/1984-H5N2) influenza A virüsleriyle enfekte edildi (bkz. 5.20). Enfeksiyondan 10 saat sonra hücreler 100 µl 2x SDS-PAGE örnek yükleme tamponu içerisinde toplandı. Hücre lizatları 5.27.1'de belirtildiği şekilde hazırlandı ve lizatlar viral M1 proteini ve hücresel Aktin beta proteini için SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Deneylerde primer antikor olarak fare monoklonal anti-Aktin beta ve tavşan poliklonal anti-M1 antikorları; ikincil antikor olarak, HRP-konjuge keçi anti-fare IgG veya anti-tavşan IgG antikorları kullanıldı. Proteinler kemilüminesans substrat kullanılarak jel görüntüleme sistemi ile görüntülendi. Elde edilen sonuçlar, kontrol HeLa hücrelerinde ve mutant hücre klonlarında M1 proteini ve Aktin beta proteini bant yoğunlukları karşılaştırılarak değerlendirildi.

5.32. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile Konak Proteinleri Arasındaki Etkileşimlerin *in siliko* Analizi

Maya ve memeli hücrelerinde NS1 proteini ile ilişkisi saptanan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin, NS1 proteini ile olası bağlanma şekilleri *in siliko* yöntemler ile değerlendirildi. Bunun için çevrim içi I-TASSER (https://zhanglab.ccmb.med.umich.edu/I-TASSER/, Erişim tarihi: 14.05.2021) ve

moleküler doking için pyDOCK programından (https://life.bsc.es/pid/pydock/, Erişim tarihi: 14.05.2021) yararlanıldı. Veri bankalarında bu proteinlere ait kanıtlanmış üç boyutlu yapıları yer almadığından, proteinlerin üç boyutlu yapıları (PBD formatında) I-TASSER veri tabanı üzerinden elde edildi (Roy ve ark., 2010). Elde edilen PBD formatındaki protein verileri arasındaki tahmini etkileşim modellemeleri yine çevrimiçi olarak pyDOCK programları ile oluşturuldu (Jimenez-Garcia ve ark., 2013). Modelleme sonuçlarından en yüksek bağlanma afinitesine (en düşük serbest bağlanma enerjisine) sahip olan modeller VegaZZ modelleme programı (Pedretti ve ark., 2020) ile analiz edildi.

6. BULGULAR

6.1. İnfluenza A Virüsü NS1 proteini ile İlişkilendirilen Konak Hücre Proteinlerine Ait Veriler

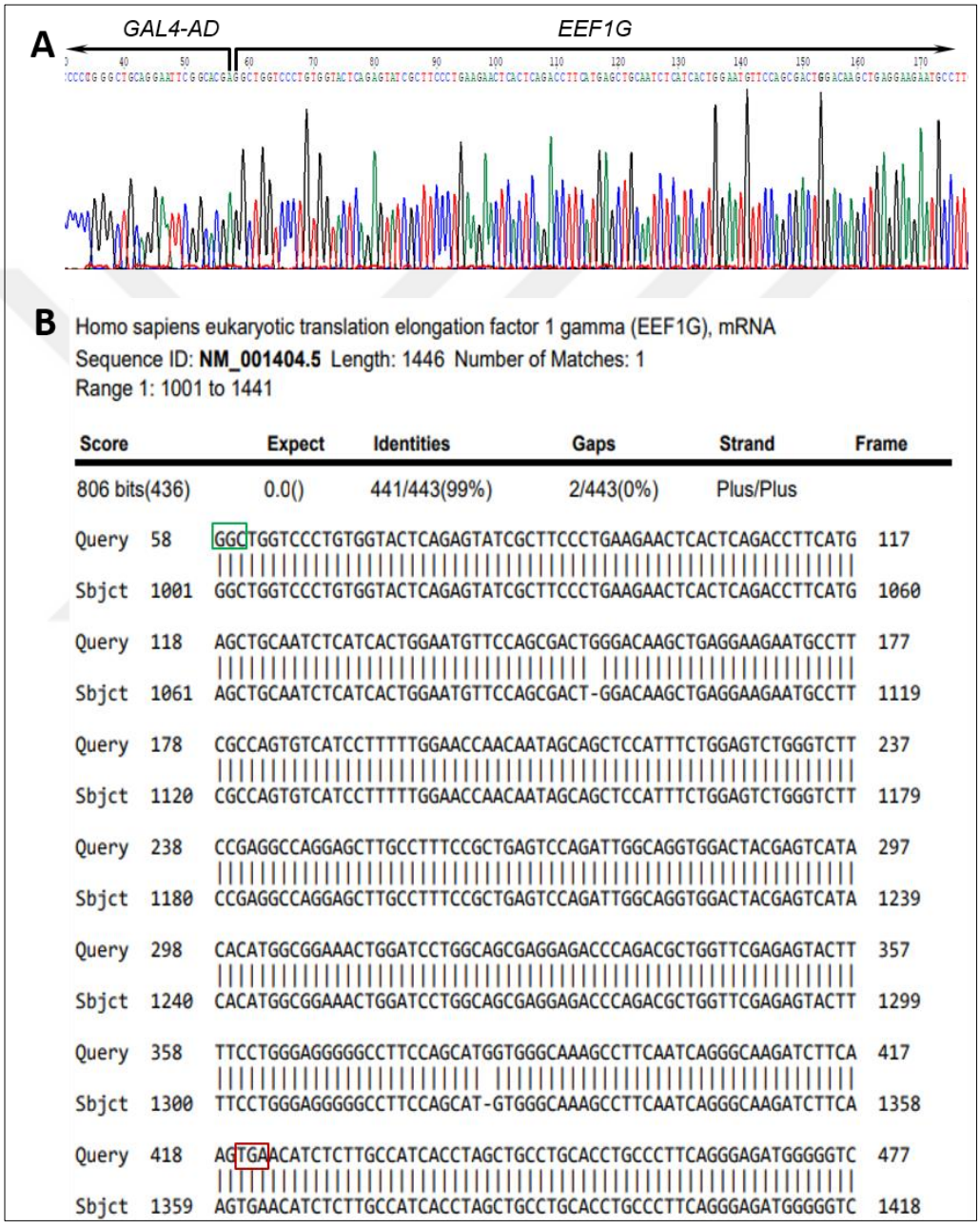
Viral patogenez açısından önemli roller üstlenen NS1 proteini ile ilişkilendirilen konak hücre proteinleri yüksek lisans tez çalışmam kapsamında maya ikili-hibrit metodunu kullanarak tespit ettiğimiz proteinler arasından seçilmiştir. Bu proteinler:

- Ökaryotik translasyon uzama faktörü-1γ alt ünitesi (eEF-1γ: eukaryotic translation elongation factor 1 gamma)
- 60S ribozomal alt ünitesi nükleer çıkış GTPaz-1 (LSG1: Large 60S subunit nuclear export GTPase1)
- ATP- bağımlı RNA Helikaz 56 (DDX56: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box -ATP dependent -RNA helicase

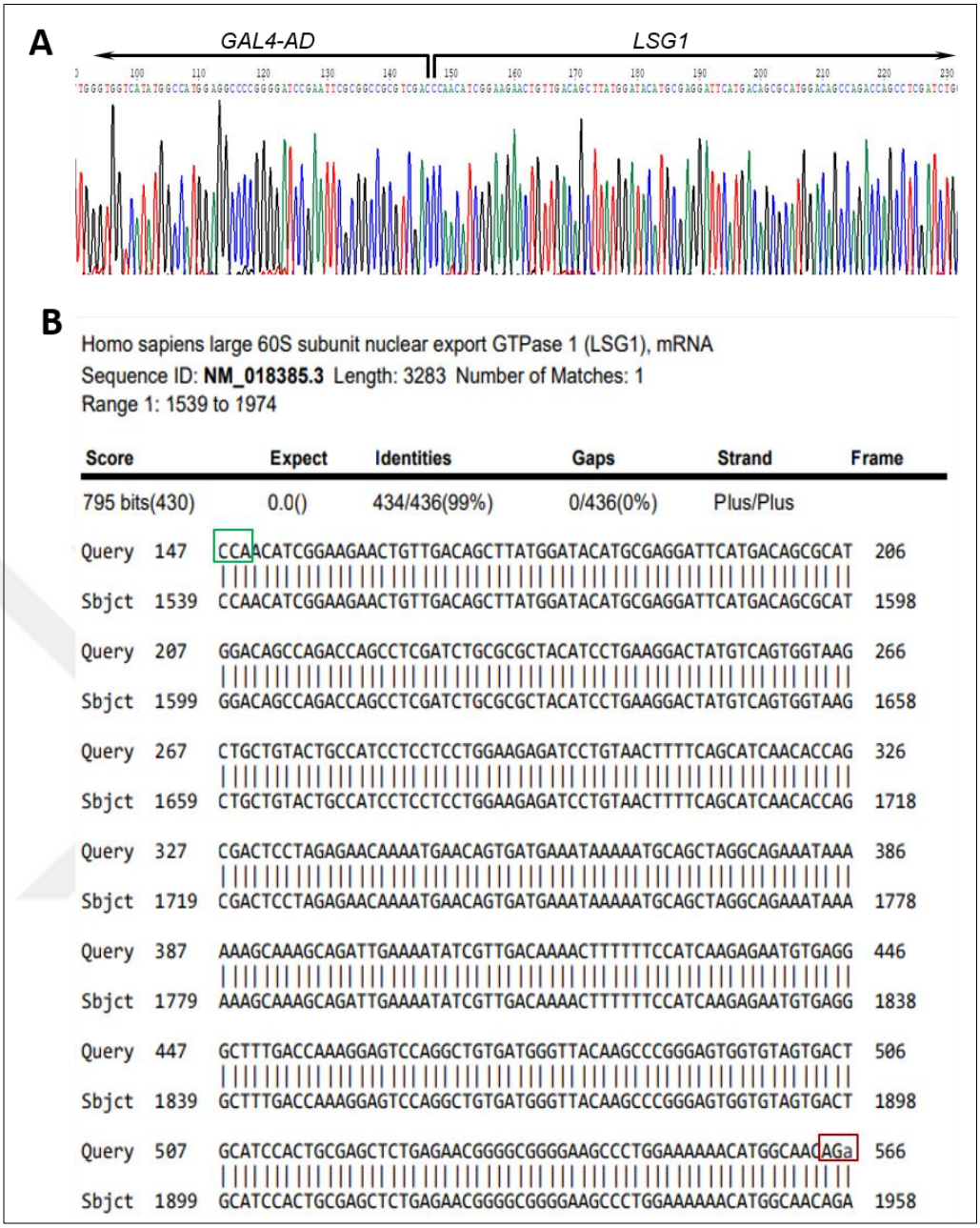
Maya hücrelerinde yapılan deneylerde anlamlı sonuçlar vermeleri, viral replikasyon açısından daha önemli olabileceği düşüncesi ve NS1 proteini ile ilişkisini gösteren yayımlanmış bir veri olmayışı nedeniyle bu proteinler tez çalışması kapsamına alınmıştır. Ayrıca yapılan mevcut çalışmalarda influenza A virüsleri dışındaki diğer bazı virüsler ile de ilişkilendirilmeleri, bu proteinlerin influenza A virüslerinin replikasyonu açısından da önemli olabilecekleri düşüncesini güçlendirmektedir.

İkili-hibrit testleri sonucunda influenza A virüsü NS1 proteini ile pozitif reaksiyon veren ve maya GAL4 transkripsiyon aktivatörü aktivasyon domaini (GAL4-AD) ile füzyon halinde taşınan HEK293 hücrelerine ait cDNA'ların hangi genlere ait oldukları DNA dizi benzerliği bilgi bankaları üzerinden BLAST *(İng. Basic Local Alignment Search Tool)* analizleri ile ortaya kondu. Elde edilen sonuçlar; 438 amino asitten oluşan insan EEF1G proteininin C-terminal bölgede son 121 amino asitlik bölümü kodlayan dizi (**Şekil 19**), 659 amino asitten oluşan insan LSG1 proteininin C-terminal bölgede 140 amino asitlik kısmı kodlayan dizi (504-643 rezidüleri arası) (**Şekil 20**) ve son olarak 548 amino asitten oluşan insan DDX56 proteininin ise C-terminal bölgede son 141 amino asitlik kısmı kodlayan dizi GAL4-AD ile okuma

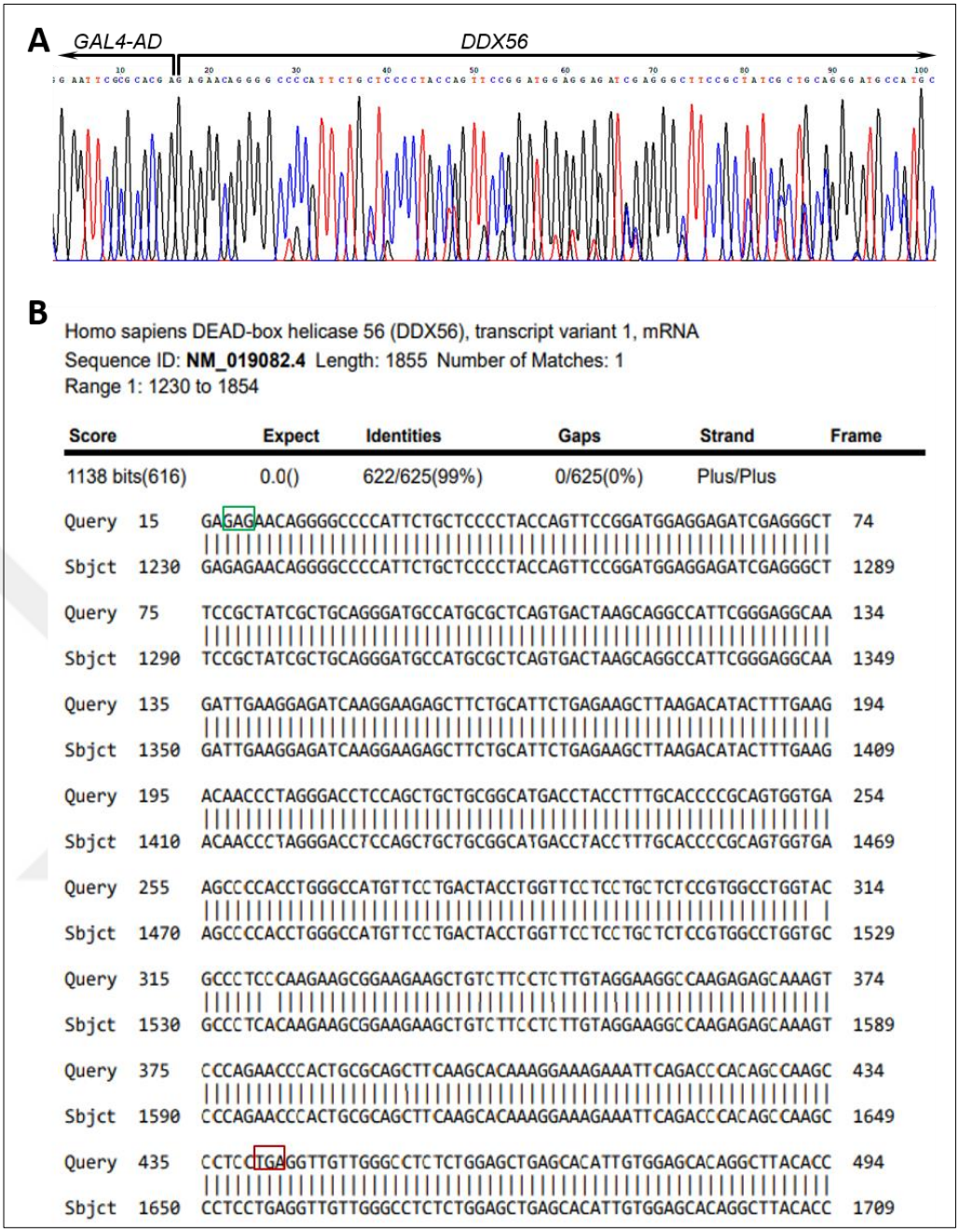
çerçevesini bozmayacak şekilde füzyon halinde bulunduğunu gösterdi (**Şekil 21**). Bu verilerden yola çıkılarak; memeli hücrelerinde insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin influenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkisi ve viral replikasyona olası etkileri tez çalışması kapsamında araştırıldı.



Şekil 19. *EEF1G* genine ait kromatogram (**A**) ve BLAST analizi (**B**) verileri. HEK293 cDNA'ları üzerinden tespit edilen *EEF1G* geninin GAL4-AD ile füzyon halinde kodlanan bölümü BLAST analizi sonuçları üzerinde işaretlendi.



Şekil 20. *LSG1* genine ait kromatogram (**A**) ve BLAST analizi (**B**) verileri. HEK293 cDNA'ları üzerinden tespit edilen *LSG1* geninin GAL4-AD ile füzyon halinde kodlanan bölümü BLAST analizi sonuçları üzerinde işaretlendi.



Şekil 21. *DDX56* genine ait kromatogram (**A**) ve BLAST analizi (**B**) verileri. HEK293 cDNA'ları üzerinden tespit edilen *DDX56* geninin GAL4-AD ile füzyon halinde kodlanan bölümü BLAST analizi sonuçları üzerinde işaretlendi.

6.2. İnfluenza A Virüslerinin Çoğaltılması ve Titrasyonu ile İlgili Veriler

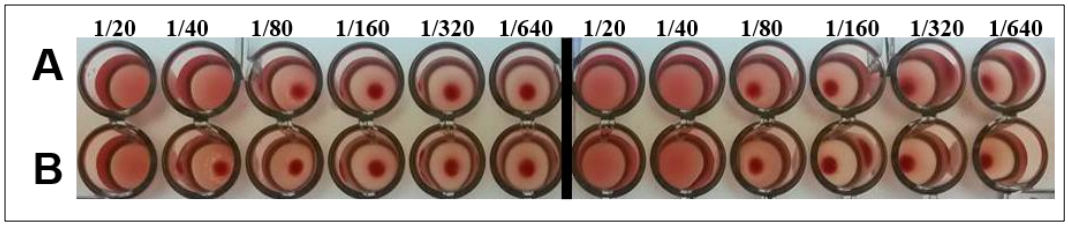
Çalışmamızda kullanılan düşük patojenite gösteren insan tipi influenza A/WSN/1933–H1N1 ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984–H5N2 virüslerinin çoğaltılmasında konak hücre olarak MDCK hücrelerinden yararlanıldı. Enfekte hücre kültürlerinde besiyeri yapılan filtrasyon işlemi ile hücresel artıklardan arındırıldı ve küçük miktarlara (0,1-0,2 ml) bölünerek tez çalışması kapsamında kullanılmak üzere -80 °C'da saklandı.

Elde edilen insan tipi influenza A/WSN/1933 (H1N1) ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984 (H5N2) virüslerinin titrasyonunda ise; Gereç ve Yöntem bölümünde detaylandırılan (bkz. 5.21) iki farklı yol izlendi: Hemaglutinasyon testlerinde; 96-kuyulu plaklarda tamponlanmış FTS ile 1/20-1/640 aralığında ikişer katlar halinde sulandırılarak hazırlanan virüs örnekleri üzerine eşit hacimde %1'lik eritrosit süspansiyonu eklendi. Oda sıcaklığında 30 dakika bekletilen plaklarda hemaglutinasyon pozitif olan sulandırımlar tespit edildi. Her iki influenza A virüs tipi için iki seri halinde gerçekleştirilen deney sonuçlarına göre; 1/80 sulandırımına kadar tam hemaglutinasyon görüldü (**Şekil 22**). 100 µl virüs süspansiyonu içinde ortalama 60 HAU (Hemaglutinasyon ünitesi) virüs olduğu saptandı. Buna göre, 1 ml virüs süspansiyonunda ortalama 600 HAU influenza A virüsü elde edildiği belirlendi. Aşağıda verilen formül üzerinden yaklaşık plak oluşturan virüs titresi tespit edildi.

$$1 \text{ HAU} = 2 \times 10^5 \text{ p.f.u}$$

[HAU: Hemaglutinasyon ünitesi; p.f.u: Plak oluşturan ünite (*İng. Plaque Forming Units*)].

Buna göre virüs titresi $1{,}2 \times 10^8$ pfu/ml olarak hesaplandı.



Şekil 22. Hemaglutinasyon testi ile virüs titresinin saptanması. **A**. İnsan tipi influenza A/WSN/1933 –H1N1. **B**. Kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984 –H5N2. Belirtilen oranlarda hazırlanan 100 µl virüs süspansiyonu üzerine 100 µl eritrosit süspansiyonu eklenerek oda sıcaklığında 30 dakika bekletildi.

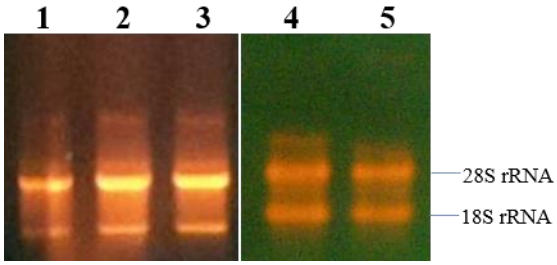
İnfluenza A virüslerinin titresinin belirlenmesinde bir diğer yöntem olarak plak testi kullanıldı. MDCK hücrelerinden yararlanılan plak testi ile, hemaglutinasyon testinin aksine çok daha hassas olarak virüs titresi tespit edildi. Kültürlerdeki virüs titresi 'plak formasyon ünitesi, pfu' olarak ortaya kondu. Plak testi ile elde edilen sonuçlara göre; influenza A virüs tipleri için titrasyon değerleri şöyle tespit edildi:

	Virüs Titresi
İnfluenza A/WSN/1933 –H1N1	$1x10^8$ pfu/ml
İnfluenza A/Duck/Pen/1984 –H5N2	$5x10^7$ pfu/ml

6.3. İnfluenza A Virüslerine ait NS1 ve İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının Hazırlanması ile İlgili Veriler

İnsan tipi influenza A/WSN/1933 (H1N1) ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984 (H5N2) virüsü NS1 cDNA'ları, virüs ile enfekte edilen HeLa hücrelerinden elde edildi. cDNA'lar, enfeksiyondan 12 saat sonra izole edilen total RNA molekülleri üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak ters transkripsiyon–polimeraz zincir reaksiyonu (RT-PZR) ile çoğaltıldı. İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'ları ise; HEK293 hücrelerinden izole edilen total RNA molekülleri üzerinden RT-PZR ile elde edildi.

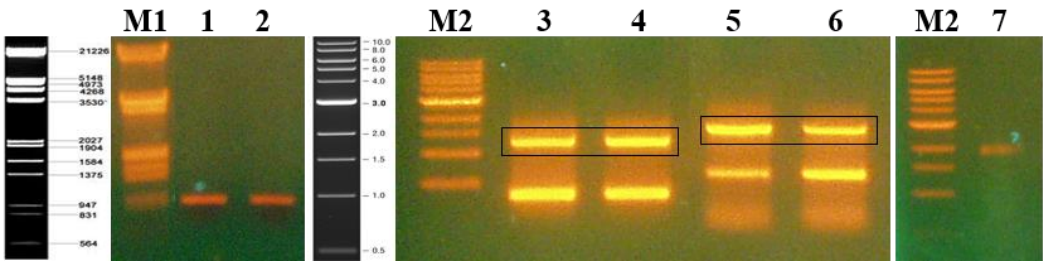
HEK293 hücrelerinden ve virüs ile enfekte HeLa hücrelerinden izole edilen total RNA'nın izolasyonunda ticari RNA izolasyon kiti (Qiagen) kullanıldı. İzole edilen RNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. Agaroz jel elektroforezi sonrası, total RNA'da baskın olarak bulunan 18S ve 28S ribozomal RNA'ların herhangi bir yıkıma uğramaksızın tek bant halinde ayrıldıkları gözlendi. Dolayısıyla elde edilen total RNA'ların, çalışmanın bir sonraki aşaması olan reverz transkripsiyonda cDNA hazırlamak için kalıp olarak kullanılabilecek kalitede ve miktarda olduğu görüldü (**Şekil 23**).



Şekil 23. HeLa ve HEK293 hücrelerinden izole edilen total RNA'ların agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. **1**. İnfluenza A/WSN/1933 –H1N1 virüsü ile enfekte HeLa hücrelerinden elde edilen total RNA. **2**. İnfluenza A/Duck/Pen/1984 –H5N2 virüsü ile enfekte HeLa hücrelerinden elde edilen total RNA. **3**. Enfekte edilmemiş HeLa hücrelerinden elde edilen total RNA. **4**,**5**. HEK293 hücrelerinden hazırlanan total RNA örnekleri. Elektroforez işlemi, %1 lik agaroz jelde, 100 V sabit gerilim altında 30 dakikada tamamlandı.

HeLa ve HEK293 hücrelerinden izole edilen ve kontrolleri yapılan total RNA'lar üzerinden oligo-dT primerler kullanılarak ters transkripsiyon ile cDNA'lar hazırlandı. Hazırlanan cDNA'lardan; enfekte HeLa hücresi cDNA'ları insan tipi influenza A virüsü (WSN) NS1 ($NS1_W$) ve kuş tipi influenza A virüsü (Duck/Pen) NS1 ($NS1_D$) genlerinin; HEK293 hücresi cDNA'sı ise insan *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genlerinin PZR ile çoğaltılmasında kalıp olarak kullanıldı. Genlerin PZR ile çoğaltılmasında aşağıda verilen bu genlere ait referans dizilerinden yararlanılarak oluşturulan primer çiftleri (Tablo 1) kullanıldı. $NS1_W$ cDNA'sı için *NS1/W-For* ve *NS1/W-Rev* primer çiftleri, $NS1_D$ cDNA'sı için *NS1/D-For* ve *NS1/D-Rev* primerleri, EEF1G cDNA'sı için *EEF1G-For* ve EEF1G-*Rev* primerleri, LSG1 cDNA'sı için *LSG1-For* ve *LSG1-Rev* primerleri ve DDX56 cDNA'sı için *DDX56-For* ve *DDX56-Rev* primer çiftleri kullanılarak PZR ile çoğaltıldı.

PZR ürünleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi. PZR deneyleri sonucunda $NS1_W$ ve $NS1_D$ genleri için 693 bç boyutlarında, *EEF1G, DDX56* ve *LSG1* genleri için sırasıyla 1314, 1644 ve 1977 bç boyutlarında beklenilen DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 24**).



Şekil 24. NS1, EEF1G, DDX56 ve LSG1 cDNA'larının PZR ile çoğaltılması. **1**. İnfluenza A/WSN/1933 virüsü NS1 cDNA'sı ($NS1_W$). **2**. İnfluenza A/Duck/Pen/1984 virüsü NS1 cDNA'sı ($NS1_D$). **3**,**4**. İnsan EEF1G cDNA'sı. **5**,**6**. İnsan DDX56 cDNA'sı. **7.** İnsan LSG1 cDNA'sı. PZR ürünlerinin analizinde % 1'lik agaroz jel kullanıldı. Elektroforez işlemi 100 V sabit gerilimde 25 dakikada gerçekleştirildi. **M1**. *Hind*III ve *Eco*RI enzimleri ile kesilen Lambda DNA'sı (λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI). **M2**. 1 kb DNA Ladder (NEB, 3232S).

İnfluenza A/WSN/1933 NS1 cDNA dizisi: (NCBI Reference Sequence: ABF47960)

*ATG*GATCCAAACACTGTGTCAAGCTTTCAGGTAGATTGCTTTCTTTGGCATGTCCGC
AAAAGAGTTGCAGACCAAGAACTAGGTGATGCCCCATTCCTTGATCGGCTTCGCCGA
GATCAGAAGTCCCTAAGAGGAAGAGGCAGCACTCTCGGTCTGGACATCGAAACAGCC
ACCCGTGCTGGAAAGCAAATAGTGGAGCGGATTCTGAAGGAAGAATCTGATGAGGCA
CTCAAAATGACCATGGCCTCTGTACCTGCATCGCGCTACCTAACTGACATGACTCTT
GAGGAAATGTCAAGGCACTGGTTCATGCTCATGCCCAAGCAGAAAGTGGCAGGCCCT
CTTTGTATCAGAATGGACCAGGCGATCATGGATAAGAACATCATACTGAAAGCGAAC
TTCAGTGTGATTTTTGACCGGCTGGAGACTCTAATATTACTAAGGGCCTTCACCGAA
GAGGGGACAATTGTTGGCGAAATTTCACCACTGCCCTCTCTTCCAGGACATACTGAT
GAGGATGTCAAAAATGCAGTTGGGGTCCTCATCGGAGGACTTGAATGGAATAATAAC
ACAGTTCGAGTCTCTGAAACTCTACAGAGATTCGCTTGGAGAAGCAGTAATGAGAAT
GGGAGACCTCCACTCACTCCAAAACAGAAACGGAAAATGGCGGGAACAATTAGGTCA
GAAGTT*TGA*

İnfluenza A duck/Pennsylvania/1984 NS1 cDNA dizisi: (NCBI Reference Sequence: BAF41910)

*ATG*GACTCCAACACGATAACCTCGTTTCAGGTAGATTGCTATCTATGGCACATAAGA
AAGCTGCTCAGCATGAGAGACATGTGTGATGCTCCCTTTGATGATAGACTCAGGAGA

GATCAAAAGGCATTAAAGGGAAGAGGCAGCACACTTGGGCTCGACCTGCGAGTGGCT
ACAATGGAAGGCAAAAAGATTGTTGAGGACATCCTAAAGAGTGAGACGGATGAAAAT
CTCAAGATTGCAATTGCATCCAGCCCTGCCCCTCGGTACATCACTGATATGAGCATA
GAGGAAATAAGCAGAGAATGGTACATGCTCATGCCCAGGCAGAAGATAACAGGGGGT
CTAATGGTGAAAATGGATCAGGCCATTATGGACAAGAGGATAATACTCAAAGCAAAT
TTCTCTGTCCTATTCGATCAACTGGAGACATTAGTCTCACTGAGGGCTTTCACAGAC
GATGGCGCCATTGTAGCTGAAATATCTCCCATTCCCTCTATGCCAGGACATTCTACA
GAGGATGTCAAAAATGCAATTGGAATCCTCATCGGTGGACTTGAATGGAATGATAAC
TCAATTCGAGCGTCTGAAAATATACAGAGATTCGCTTGGGGAATCCGTGATGAGAAT
GGGGGACCTTCACTCCCTCCAAAGCAGAAACGCTACATGGCGAGAAGAGTTGAGTCA
GAAGTTTGA

EEF1G cDNA dizisi: (NCBI Reference Sequence: NM_001404)

ATGGCGGCTGGGACCCTGTACACGTATCCTGAAAACTGGAGGGCCTTCAAGGCTCTC
ATCGCTGCTCAGTACAGCGGGGCTCAGGTCCGCGTGCTCTCCGCACCACCCCACTTC
CATTTTGGCCAAACCAACCGCACCCCTGAATTTCTCCGCAAATTTCCTGCCGGCAAG
GTCCCAGCATTTGAGGGTGATGATGGATTCTGTGTGTTTGAGAGCAACGCCATTGCC
TACTATGTGAGCAATGAGGAGCTGCGGGGAAGTACTCCAGAGGCAGCAGCCCAGGTG
GTGCAGTGGGTGAGCTTTGCTGATTCCGATATAGTGCCCCCAGCCAGTACCTGGGTG
TTCCCCACCTTGGGCATCATGCACCACAACAAACAGGCCACTGAGAATGCAAAGGAG
GAAGTGAGGCGAATTCTGGGGCTGCTGGATGCTTACTTGAAGACGAGGACTTTTCTG
GTGGGCGAACGAGTGACATTGGCTGACATCACAGTTGTCTGCACCCTGTTGTGGCTC
TATAAGCAGGTTCTAGAGCCTTCTTTCCGCCAGGCCTTTCCCAATACCAACCGCTGG
TTCCTCACCTGCATTAACCAGCCCCAGTTCCGGGCTGTCTTGGGCGAAGTGAAACTG
TGTGAGAAGATGGCCCAGTTTGATGCTAAAAAGTTTGCAGAGACCCAACCTAAAAAG
GACACACCACGGAAAGAGAAGGGTTCACGGGAAGAGAAGCAGAAGCCCCAGGCTGAG
CGGAAGGAGGAGAAAAAGGCGGCTGCCCCTGCTCCTGAGGAGGAGATGGATGAATGT
GAGCAGGCGCTGGCTGCTGAGCCCAAGGCCAAGGACCCCTTCGCTCACCTGCCCAAG
AGTACCTTTGTGTTGGATGAATTTAAGCGCAAGTACTCCAATGAGGACACACTCTCT
GTGGCACTGCCATATTTCTGGGAGCACTTTGATAAGGACGGCTGGTCCCTGTGGTAC
TCAGAGTATCGCTTCCCTGAAGAACTCACTCAGACCTTCATGAGCTGCAATCTCATC
ACTGGAATGTTCCAGCGACTGGACAAGCTGAGGAAGAATGCCTTCGCCAGTGTCATC
CTTTTTGGAACCAACAATAGCAGCTCCATTTCTGGAGTCTGGGTCTTCCGAGGCCAG

GAGCTTGCCTTTCCGCTGAGTCCAGATTGGCAGGTGGACTACGAGTCATACACATGG
CGGAAACTGGATCCTGGCAGCGAGGAGACCCAGACGCTGGTTCGAGAGTACTTTTCC
TGGGAGGGGGCCTTCCAGCATGTGGGCAAAGCCTTCAATCAGGGCAAGATCTTCAAG
TGA

DDX56 cDNA dizisi: (NCBI Reference Sequence: NP_061955)

ATGGAGGACTCTGAAGCACTGGGCTTCGAACACATGGGCCTCGATCCCCGGCTCCTT
CAGGCTGTCACCGATCTGGGCTGGTCGCGACCTACGCTGATCCAGGAGAAGGCCATC
CCACTGGCCCTAGAAGGGAAGGACCTCCTGGCTCGGGCCCGCACGGGCTCCGGGAAG
ACGGCCGCTTATGCTATTCCGATGCTGCAGCTGTTGCTCCATAGGAAGGCGACAGGT
CCGGTGGTAGAACAGGCAGTGAGAGGCCTTGTTCTTGTTCCTACCAAGGAGCTGGCA
CGGCAAGCACAGTCCATGATTCAGCAGCTGGCTACCTACTGTGCTCGGGATGTCCGA
GTGGCCAATGTCTCAGCTGCTGAAGACTCAGTCTCTCAGAGAGCTGTGCTGATGGAG
AAGCCAGATGTGGTAGTAGGGACCCCATCTCGCATATTAAGCCACTTGCAGCAAGAC
AGCCTGAAACTTCGTGACTCCCTGGAGCTTTTGGTGGTGGACGAAGCTGACCTTCTT
TTTTCCTTTGGCTTTGAAGAAGAGCTCAAGAGTCTCCTCTGTCACTTGCCCCGGATT
TACCAGGCTTTTCTCATGTCAGCTACTTTTAACGAGGACGTACAAGCACTCAAGGAG
CTGATATTACATAACCCGGTTACCCTTAAGTTACAGGAGTCCCAGCTGCCTGGGCCA
GACCAGTTACAGCAGTTTCAGGTGGTCTGTGAGACTGAGGAAGACAAATTCCTCCTG
CTGTATGCCCTGCTCAAGCTGTCATTGATTCGGGGCAAGTCTCTGCTCTTTGTCAAC
ACTCTAGAACGGAGTTACCGGCTACGCCTGTTCTTGGAACAGTTCAGCATCCCCACC
TGTGTGCTCAATGGAGAGCTTCCACTGCGCTCCAGGTGCCACATCATCTCACAGTTC
AACCAAGGCTTCTACGACTGTGTCATAGCAACTGATGCTGAAGTCCTGGGGGCCCCA
GTCAAGGGCAAGCGTCGGGGCCGAGGGCCCAAAGGGGACAAGGCCTCTGATCCGGAA
GCAGGTGTGGCCCGGGGCATAGACTTCCACCATGTGTCTGCTGTGCTCAACTTTGAT
CTTCCCCCAACCCCTGAGGCCTACATCCATCGAGCTGGCAGGACAGCACGCGCTAAC
AACCCAGGCATAGTCTTAACCTTTGTGCTTCCCACGGAGCAGTTCCACTTAGGCAAG
ATTGAGGAGCTTCTCAGTGGAGAGAACAGGGGCCCCATTCTGCTCCCCTACCAGTTC
CGGATGGAGGAGATCGAGGGCTTCCGCTATCGCTGCAGGGATGCCATGCGCTCAGTG
ACTAAGCAGGCCATTCGGGAGGCAAGATTGAAGGAGATCAAGGAAGAGCTTCTGCAT
TCTGAGAAGCTTAAGACATACTTTGAAGACAACCCTAGGGACCTCCAGCTGCTGCGG
CATGACCTACCTTTGCACCCCGCAGTGGTGAAGCCCCACCTGGGCCATGTTCCTGAC
TACCTGGTTCCTCCTGCTCTCCGTGGCCTGGTGCGCCCTCACAAGAAGCGGAAGAAG

CTGTCTTCCTCTTGTAGGAAGGCCAAGAGAGCAAAGTCCCAGAACCCACTGCGCAGC
TTCAAGCACAAAGGAAAGAAATTCAGACCCACAGCCAAGCCCTCCTAG

LSG1 cDNA dizisi: (NCBI Reference Sequence: NP_060855)

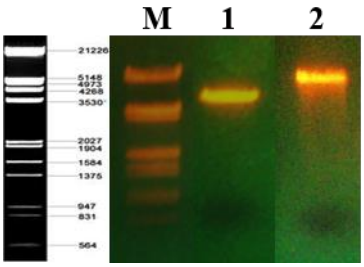
ATGGGCCGGAGGAGAGCCCCGGCCGGTGGGTCGCTGGGACGGGCCCTTATGCGCCAT
CAGACTCAGCGGAGCCGAAGCCATCGTCACACTGACTCCTGGTTGCACACAAGTGAA
CTCAATGATGGCTATGATTGGGGTCGTCTTAATCTTCAGTCAGTGACTGAACAGAGC
TCCCTTGATGACTTCCTTGCTACTGCAGAACTTGCAGGAACAGAGTTTGTAGCTGAG
AAACTTAATATTAAGTTTGTGCCTGCTGAGGCTAGAACTGGACTACTGTCTTTCGAG
GAGAGCCAGAGAATTAAGAAGCTCCATGAAGAAAACAAACAGTTCTTGTGTATACCG
AGGAGACCAAACTGGAACCAAAATACTACCCCAGAAGAACTCAAACAAGCAGAGAAA
GATAACTTTCTAGAATGGAGACGTCAGCTTGTCCGGCTAGAAGAGGAACAGAAGCTG
ATATTGACTCCATTTGAACGAAATTTGGACTTTTGGCGCCAGCTCTGGAGAGTCATT
GAGAGAAGTGATATTGTGGTCCAGATAGTAGATGCTCGAAACCCACTCCTGTTTAGA
TGTGAGGATTTGGAATGTTATGTGAAAGAAATGGATGCCAATAAGGAGAACGTCATT
CTGATCAACAAGGCAGACTTGCTGACTGCTGAGCAGCGGAGTGCCTGGGCCATGTAC
TTCGAAAAAGAAGATGTGAAGGTTATTTTCTGGTCAGCTTTGGCCGGAGCCATTCCC
CTGAATGGTGACTCTGAGGAAGAGGCAAACAGAGATGATAGACAAAGCAACACAACC
AAGTTTGGACATTCCAGTTTCGACCAGGCTGAAATTTCCCACAGTGAATCCGAACAT
CTCCCAGCTAGGGATTCTCCTTCACTTAGTGAAAATCCCACAACGGATGAAGATGAC
AGTGAGTATGAGGACTGTCCAGAGGAGGAGGAAGACGACTGGCAGACGTGCTCAGAA
GAAGACGGTCCCAAGGAAGAGGACTGCAGCCAGGACTGGAAGGAAAGCTCTACTGCA
GATTCTGAGGCTCGGAGCAGGAAAACCCCACAGAAGAGGCAGATACACAATTTTAGC
CATCTGGTATCCAAGCAGGAGTTACTGGAGCTCTTTAAGGAGCTACACACTGGGAGA
AAGGTGAAAGATGGGCAACTTACGGTCGGACTGGTGGGCTACCCTAATGTTGGTAAG
AGTTCAACAATCAACACCATCATGGGCAACAAGAAAGTATCTGTGTCTGCCACACCT
GGTCACACAAAGCACTTTCAGACTCTCTATGTGGAGCCTGGCCTCTGCCTGTGTGAC
TGTCCTGGCTTGGTGATGCCATCTTTTGTGTCTACCAAGGCAGAAATGACTTGCAGC
GGAATCCTCCCAATTGATCAGATGAGAGATCATGTTCCTCCTGTATCACTAGTTTGC
CAGAATATTCCAAGACATGTTTTAGAAGCTACCTATGGCATTAACATCATAACGCCT
AGAGAGGATGAAGATCCCCACCGACCTCCAACATCGGAAGAACTGTTGACAGCTTAT
GGATACATGCGAGGATTCATGACAGCGCATGGACAGCCAGACCAGCCTCGATCTGCG
CGCTACATCCTGAAGGACTATGTCAGTGGTAAGCTGCTGTACTGCCATCCTCCTCCT

GGAAGAGATCCTGTAACTTTTCAGCATCAACACCAGCGACTCCTAGAGAACAAAATG
AACAGTGATGAAATAAAAATGCAGCTAGGCAGAAATAAAAAAGCAAAGCAGATTGAA
AATATCGTTGACAAAACTTTTTTCCATCAAGAGAATGTGAGGGCTTTGACCAAAGGA
GTCCAGGCTGTGATGGGTTACAAGCCCGGGAGTGGTGTAGTGACTGCATCCACTGCG
AGCTCTGAGAACGGGGCGGGGAAGCCCTGGAAAAAACATGGCAACAGAAATAAAAAA
GAAAAAAGTCGTAGACTCTACAAGCACCTGGATATGTGA

Polimeraz zincir reaksiyonu ile çoğaltılan NS1 cDNA'ları ($NS1_W$ ve $NS1_D$) *Eco*RI restriksiyon endonükleaz enzimleri ile, EEF1G cDNA'sı ise *Eco*RV restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi. DDX56 ve LSG1 cDNA'larının çoğaltılmasında fosforillenmiş primerler kullanıldığı için herhangi bir kesim işlemi yapılmadı. Elde edilen DNA örnekleri fenol:kloroform:izoamil alkol ile ekstre edildi ve %1'lik agaroz jel elektroforezi ile saflaştırıldıktan sonra ligasyonda kullanıldı.

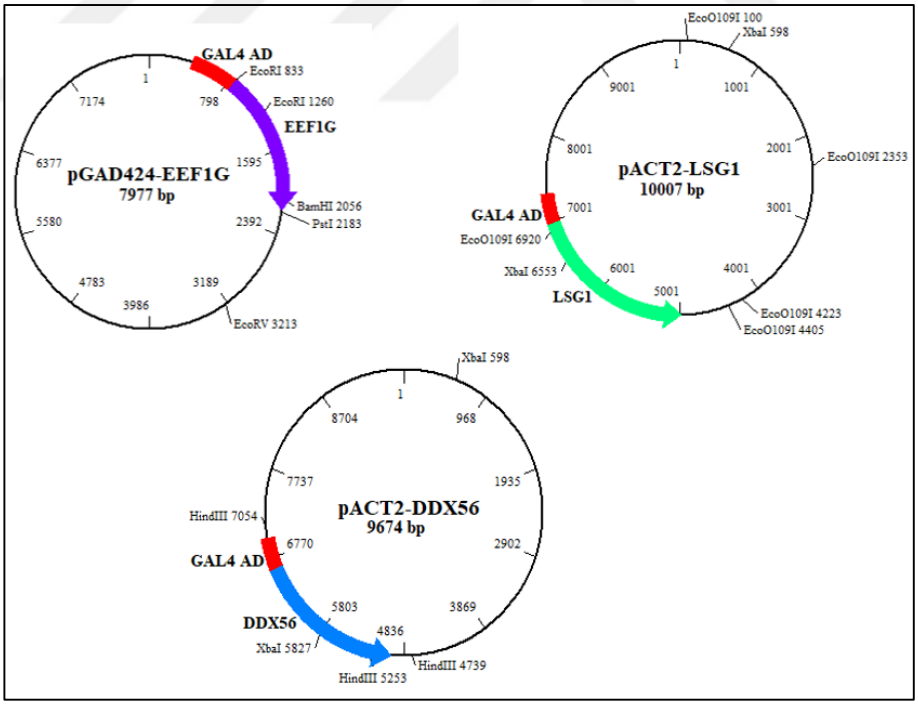
6.4. Maya Hücrelerinde EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Maya ikili-hibrit deneyleriyle influenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkileri tespit edilen konak proteinlerini kodlayan cDNA'lar, ilgili genin tam dizisini kapsamayan kısmi cDNA'lardır (bkz. 6.1). Bu sebeple NS1 proteini ile olan etkileşimlerini kontrol etmek için, HEK293 hücrelerinden reverz transkripisyon-PZR ile elde edilen tam boyutta EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'ları (**Şekil 24**) GAL4 aktivasyon domaini taşıyan pGAD424 veya pACT2 maya ekspresyon vektörlerine klonlandı. Bu amaçla; pGAD424 plazmit vektörü *Bam*HI restriksiyon endonükleaz enzimi ile pACT2 plazmit vektörü ise *Bgl*II restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi. Kesim işlemi sonrası Klenow enzimi ile küt uçlu hale getirilen plazmit DNA'ları defosforile edildi. Ardından agaroz jel elektroforezi ile kontrolleri yapıldı. Agaroz jel elektroforezi sonucunda pGAD424 plazmit DNA'sı için 6653 bç. ve pACT2 plazmit DNA'sı için 8025 bç. boyutlarında beklenilen DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 25**).



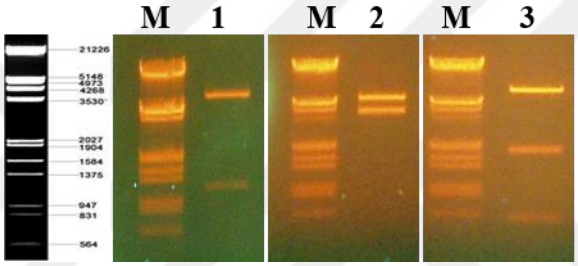
Şekil 25. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek doğrusal hale getirilen pGAD424 (**1**) ve pACT2 (**2**) plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi profilleri. **M.** λ/*Hind*III+*Eco*RI.

EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'ları, doğrusal hale getirilen pGAD424 veya pACT2 plazmit DNA'ları ile ligasyona uğratılarak **Şekil 26**'da restriksiyon haritaları verilen pGAD424-EEF1G, pACT2-LSG1 ve pACT-DDX56 plazmit vektörleri elde edildi.



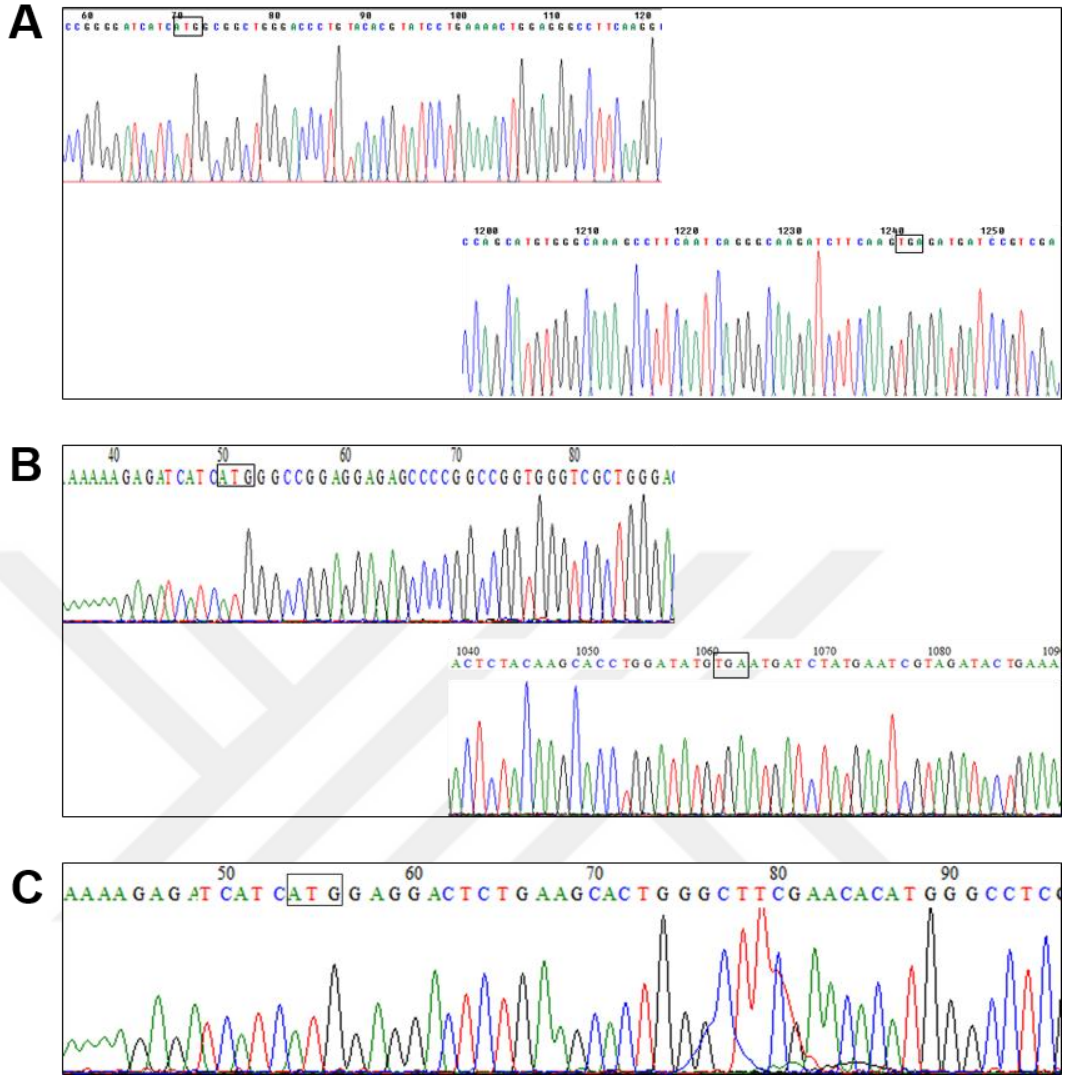
Şekil 26. *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genlerinin klonlandığı maya hücrelerinde ekspresyon yapan plazmit vektörlerin restriksiyon haritası. Vektörlerin haritalarının oluşturulmasında *BioEdit* programından yararlanıldı.

Elde edilen pGAD424-EEF1G, pACT2-LSG1 ve pACT-DDX56 plazmit vektörlerinin doğrulukları ilk aşamada restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek yapıldı. Kesim işleminde pGAD424-EEF1G plazmit DNA'sı için *Bam*HI ve *Eco*RV, pACT2-LSG1 plazmit DNA'sı için *Hind*III ve pACT2-DDX56 plazmit DNA'sı için *Xba*I restriksiyon endonükleaz enzimleri kullanıldı. Yapılan agaroz jel elektroforezi sonucunda; oluşturulan plazmitlerin tamamında beklenilen boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi. pGAD424-EEF1G plazmit DNA'sı için 1157 ve 6820 bç, pACT2-LSG1 plazmit DNA'sı için 4052 ve 5955 bç ve pACT2-DDX56 plazmit DNA'sı için 514, 1801 ve 7359 bç boyutlarında DNA fragmentleri gözlendi (**Şekil 27**).



Şekil 27. Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilen pGAD424-EEF1G (**1**) pACT2-LSG1 (**2**) ve pACT2-DDX56 (**3**) plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi profilleri. **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.

Ön kontrolleri yapılan plazmit DNA örnekleri PEG/NaCl ile çöktürülerek kısmen saflaştırıldı ve DNA dizi analizinde kullanıldı. DNA dizi analizlerinde nükleotid dizileri Tablo 1'de verilen *pGAD-seq-For* ve *pGAD-seq-Rev* primerlerinden yararlanıldı. DNA dizi analizi sonuçlarına göre; *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genlerinin tam dizisi ve maya GAL4 proteininin aktivasyon bölgesiyle füzyon halinde oluşturulan genlerin okuma çerçevesi içinde bir bozulma olmadan teorik olarak tasarlanan dizi ile birebir uygunluk gösterdiği belirlendi (**Şekil 28**). *DDX56* geni için tek yönlü olarak dizi analizi yapıldığından genin sadece 5'- bölgesine ait nükleotid dizi analizi kromatogramı verildi (**Şekil 28C**).

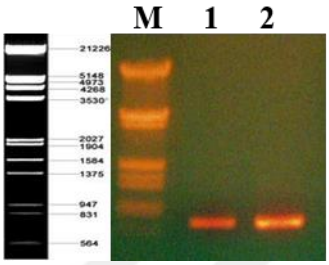


Şekil 28. pGAD424 veya pACT2 maya ekspresyon vektörüne klonlanan insan *EEF1G* (**A**), *LSG1* (**B**) ve *DDX56* (**C**) genlerine ait nükleotid dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar genlerin 5′- ve 3′- bölgelerinin sadece bir bölümünü kapsamaktadır.

6.5. Memeli Hücrelerinde İnfluenza A virüsü NS1 Proteini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler

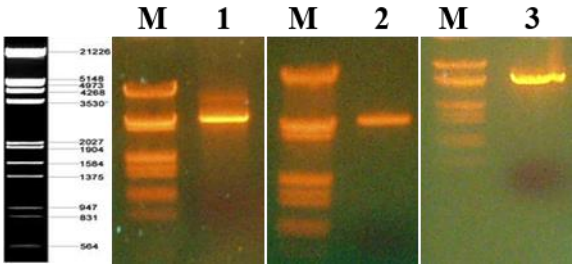
Çalışmada insan tipi influenza A/WSN/1933 (H1N1) virüsü *NS1*$_W$ geni değişik amaçlarda kullanılmak üzere 3 farklı plazmit vektörüne klonlandı. Bu plazmit vektörler; NS1$_W$ proteinini flag uzantılı (DYKDDDK) halde kodlayan pCAGGS-Flag vektörü, GST uzantılı olarak kodlayan pCAGGS-GST vektörü ve doğal NS1$_W$ proteinini kodlayan pCAGGS vektörüdür. Flag ve GST uzantılı NS1 proteini kodlayacak NS1$_W$ cDNA'ları translasyonu sonlandıracak bitiş kodonu içermeyecek

şekilde klonlandı. Bu nedenle sonlandırıcı kodon taşımayan $NS1_W$ cDNA'sı daha önce oluşturulan pGBD-$NS1_W$ maya ekspresyon vektörü (Pirinçal, 2014) üzerinden PZR ile elde edildi. PZR reaksiyonlarında dizileri Tablo 1'de verilen *$NS1_W$-For* ve *$NS1_W$-minus-Rev* primer çifti kullanıldı. Reaksiyon sonrası PZR ürünü agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (**Şekil 29**).



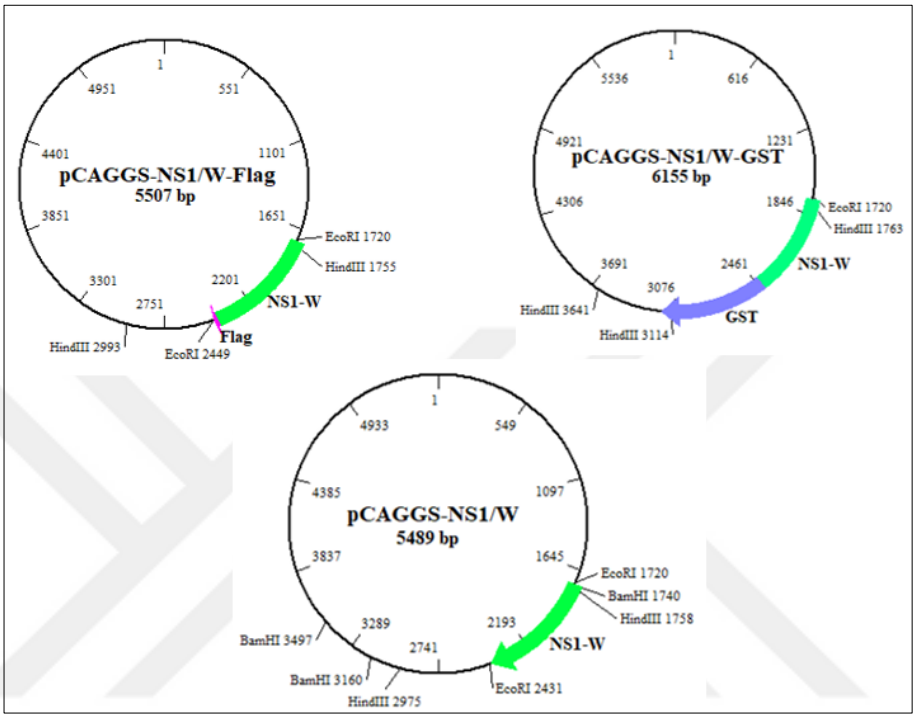
Şekil 29. PZR ile çoğaltılan bitim kodonu taşımayan NS1 cDNA'larının agaroz jel elektroforezi ile incelenmesi. **1**,**2**. İnfluenza A/WSN/1933 virüsüne özgü NS1 cDNA'ları ($NS1_W$). **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.

Sonlandırıcı kodon taşımayan $NS1_W$ cDNA'sının klonlanmasında kullanılan vektörlerden pCAGGS-Flag plazmit DNA'sının hazırlanmasında pCAGGS-p16-Flag vektöründen yararlanıldı. pCAGGS-p16-Flag vektörü ters PZR (*İng. Inverse-PCR*) tekniği ile çoğaltılarak doğrusal hale getirildi. Benzer şekilde pCAGGS-GST plazmit DNA'sı da ters PZR ile çoğaltılarak ligasyon için doğrusal hale getirildi. pCAGGS plazmit vektörü ise *Eco*RI restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildikten sonra defosforile edildi. Plazmit DNA'ları ligasyon öncesinde agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (**Şekil 30**).



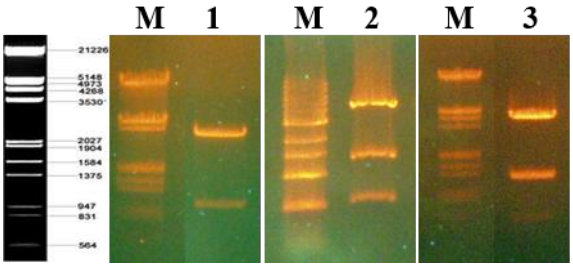
Şekil 30. Doğrusal hale getirilen plazmit DNA'larının agaroz jel elektroforezi profilleri. **1**. Ters PZR ile çoğaltılan pCAGGS-Flag plazmit DNA'sı. **2**. Ters PZR ile çoğaltılan pCAGGS-GST plazmit DNA'sı. **3**. *Eco*RI restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilen pCAGGS plazmit DNA'sı. **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.

Doğrusal hale getirilen ve saflaştırılan pCAGGS-Flag, pCAGGS-GST ve pCAGGS plazmit vektörleri ile $NS1_W$ cDNA'sı ligasyona uğratılarak **Şekil 31**'de restriksiyon haritaları verilen pCAGGS-$NS1_W$-Flag, pCAGGS-$NS1_W$-GST ve pCAGGS-$NS1_W$ plazmit vektörleri elde edildi.



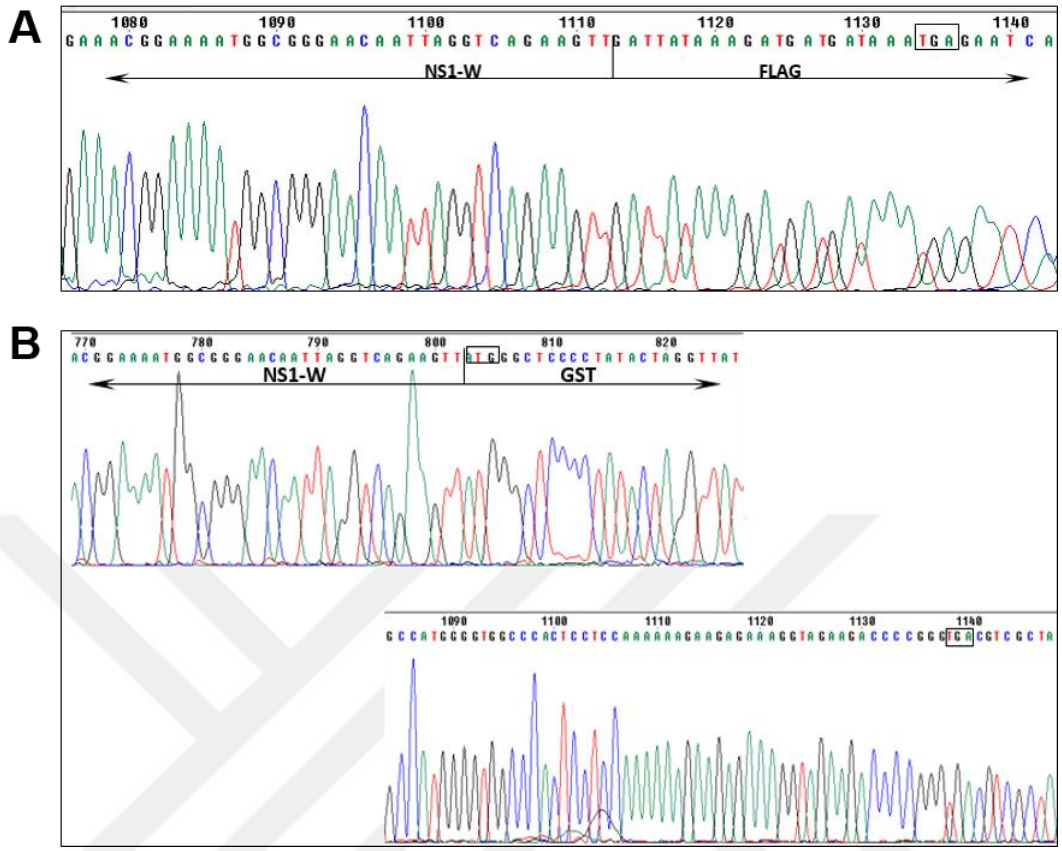
Şekil 31. İnfluenza A virüsü *NS1W* geni klonlanan plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları. Vektörlerin haritalarının oluşturulmasında *BioEdit* programından yararlanıldı.

$NS1_W$ cDNA'sı klonlanan memeli ekspresyon vektörlerinin doğrulukları restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek gösterildi. Bunun için, her üç plazmit de (pCAGGS-$NS1_W$-Flag, pCAGGS-$NS1_W$-GST, pCAGGS-$NS1_W$) *Hind*III restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesildi ve agaroz jel elektroforezi ile incelendi. Agaroz jel elektroforezi sonucunda, plazmitler için beklenilen boyutlarda DNA fragmentleri elde edildi. pCAGGS-$NS1_W$-Flag plazmit DNA'sı için 1238-4269 bç boyutlarında, pCAGGS-$NS1_W$-GST plazmit DNA'sı için 527-1351-4277 bç boyutlarında ve pCAGGS-$NS1_W$ plazmit DNA'sı için 1217-4272 bç boyutlarında DNA fragmentleri gözlendi (**Şekil 32**).



Şekil 32. İnfluenza A virüsü *NS1W* geni taşıyan plazmit DNA'larının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforezi profilleri. **1**. pCAGGS-NS1W-Flag plazmiti. **2**. pCAGGS-NS1W-GST plazmiti. **3**. pCAGGS-NS1W plazmiti. **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.

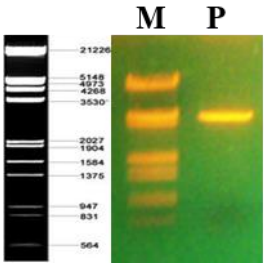
Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek ön kontrolleri yapılan plazmit DNA örnekleri kısmen saflaştırılarak DNA dizi analizinde kullanıldı. DNA dizi analizi sonuçları, bitim kodonu taşımayacak şekilde tasarlanan *NS1W* geninin dizisi ve oluşturulan füzyon halindeki *NS1W-Flag* ve *NS1W-GST* genlerinin uygun okuma çerçevesi içinde teorik olarak tasarlanan dizi ile tamamen aynı olduğunu gösterdi (**Şekil 33**).



Şekil 33. pCAGGS-Flag (**A**) ve pCAGGS-GST (**B**) memeli ekspresyon vektörlerinde Flag ve GST kodlayıcı diziler ile kaynaşmış halde klonlanan $NS1_W$ genine ait nükleotid dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar genlerin 5′- ve/veya 3′-bölgelerinin sadece bir bölümünü kapsamaktadır.

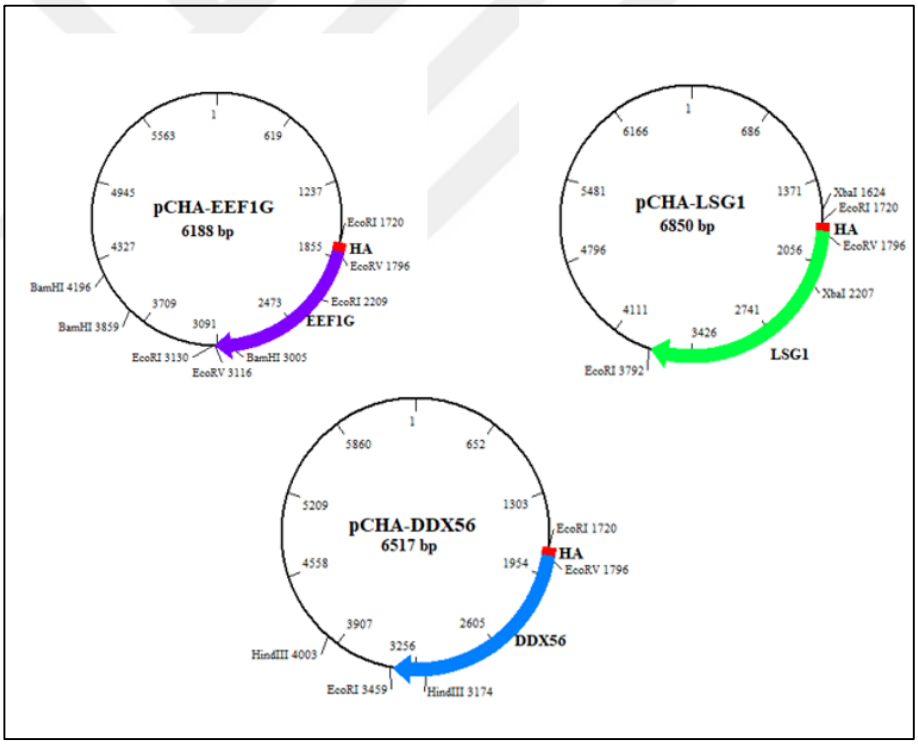
6.6. Memeli Hücrelerinde İnfluenza A virüsü NS1 Proteini İlişkili Konak Hücre Proteinlerini Kodlayan Plazmit Vektörlerin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Tez çalışması kapsamında konak hücre proteinlerini kodlayan genler, NS1 proteini ile etkileşimlerini araştırmak amacıyla memeli hücrelerinde ekspresyon yapan ve HA uzantısı (YPYDVPDYA) kodlayan pCHA plazmit vektörüne klonlandı. Bu amaçla pCHA plazmit vektörü *Eco*RV restriksiyon enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirildi ve defosforile edildi. Plazmit DNA'sı ligasyon öncesi yapılan agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (**Şekil 34**).



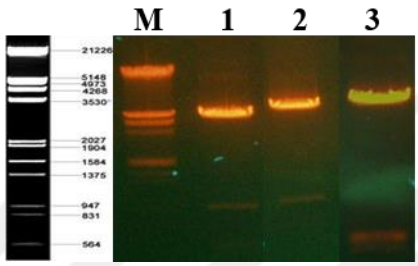
Şekil 34. *Eco*RV restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pCHA plazmit vektörünün agaroz jel elektroforezi profili. **P**. pCHA plazmit DNA'sı. **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.

Doğrusal hale getirilen ve saflaştırılan pCHA plazmit vektörü ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 cDNA'ları ile ligasyona uğratılarak **Şekil 35**'de restriksiyon haritaları verilen pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 ve pCHA-DDX56 plazmit vektörleri elde edildi.



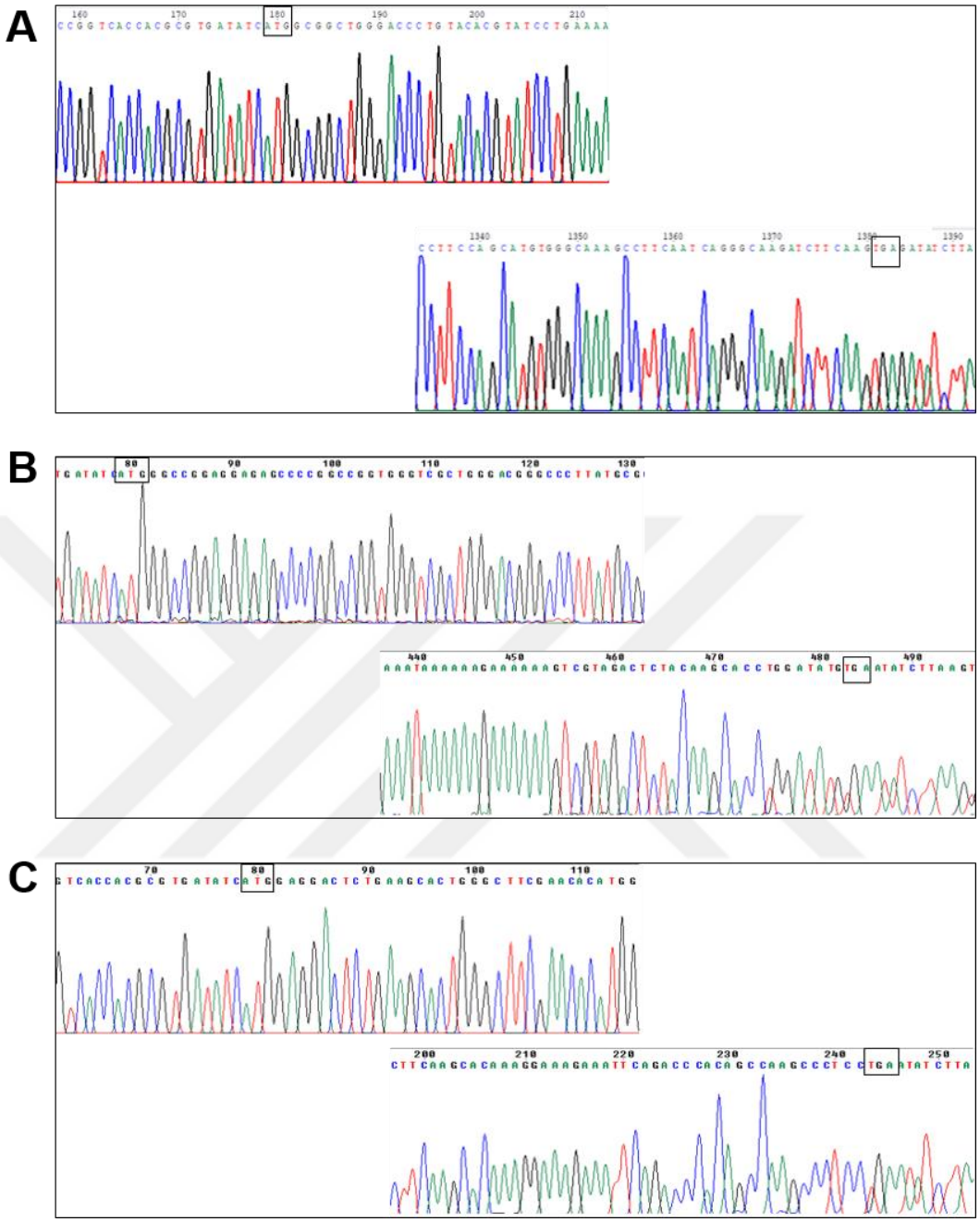
Şekil 35. İnsan *EEF1G*, *LSG1* ve *DDX56* genleri klonlanan memeli ekspresyon plazmit vektörlerinin restriksiyon haritaları. Vektörlerin haritalarının oluşturulmasında *BioEdit* programından yararlanıldı.

İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 cDNA'larının klonlanması ile elde edilen memeli ekspresyon vektörlerinin doğrulukları restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek gösterildi. Bunun için, pCHA-EEF1G plazmit vektörü için *Bam*HI, pCHA-LSG1 plazmit vektörü için *Xba*I ve pCHA-DDX56 plazmit vektörü için *Hind*III restriksiyon enzimleri kullanıldı. Agaroz jel elektroforezi sonucunda; pCHA-EEF1G plazmit DNA'sı için 337-854-4997 bç, pCHA-DDX56 plazmit DNA'sı için 829-5688 bç ve pCHA-LSG1 plazmit DNA'sı için 583-6267 bç boyutlarında beklenilen DNA fragmentleri elde edildi (**Şekil 36**).



Şekil 36. İnsan *EEF1G, DDX56* ve *LSG1* geni klonlanan plazmit DNA'larının restriksiyon endonükleaz enzimleriyle kesimi sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforezi profilleri. **1**. pCHA-EEF1G plazmiti. **2**. pCHA-DDX56 plazmiti. **3**. pCHA-LSG1 plazmiti. **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.

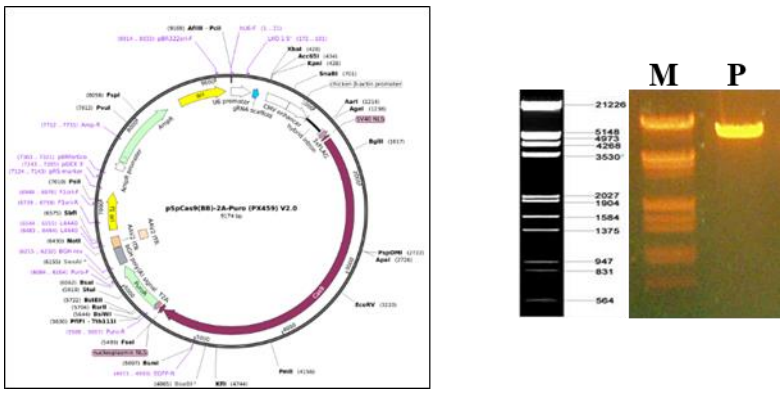
Restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesilerek ön kontrolleri yapılan DNA örnekleri kısmen saflaştırılarak DNA dizi analizinde kullanıldı. DNA dizi analizi sonuçları; *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genlerinin influenza HA epitopunu kodlayan dizi ile uygun okuma çerçevesi içerisinde olduğunu gösterdi (**Şekil 37**).



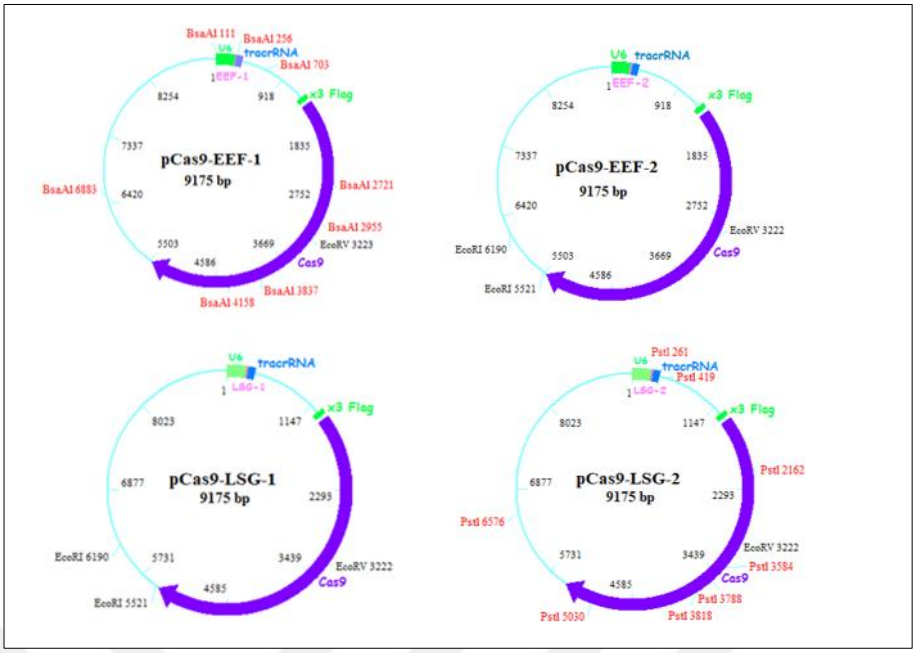
Şekil 37. pCHA memeli ekspresyon vektörüne klonlanan insan *EEF1G* (**A**), *LSG1* (**B**) ve *DDX56* (**C**) genlerine ait nükleotid dizi analizi kromatogramları. Kromatogramlar genlerin 5′- ve 3′- bölgelerinin sınırlı bir bölümünü kapsamaktadır.

6.7. Memeli Hücrelerinde CRISPR/Cas9 Sisteminin Uygulandığı *EEF1G* ve *LSG1* Genlerine Özgü Rehber RNA (sgRNA) Dizilerini Taşıyan Plazmit Vektörlerinin Oluşturulması ile İlgili Veriler

Tez çalışmasında CRISPR/Cas9 sistemi kullanılarak endojen *EEF1G* ve *LSG1* gen ekspresyonu durdurulan *(İng. knock out)* hücrelerde viral replikasyonun seyrinin takip edilmesi amaçlandı. Bunun için; öncelikle Cas9 enzimi ve *EEF1G* ve *LSG1* genlerini hedef alan rehber RNA dizilerini kodlayan pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörleri oluşturuldu. Her bir gen için iki farklı rehber RNA dizisi tasarlandı. Rehber dizilerini kodlayan çift zincirli DNA fragmentleri, *Bbs*I restriksiyon endonükleaz enzimi ile kesilerek doğrusal hale getirilen pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörüne klonlandı (**Şekil 38**). Bu şekilde 20 nükleotid uzunluğundaki rehber RNA kodlayan DNA fragmentlerini U6 promotörü kontrolünde trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) molekülü ile füzyon halinde sentezlenmesine olanak sağlayan vektörler elde edildi. pCas9-EEF-1, pCas9-EEF-2, pCas9-LSG-1 ve pCas9-LSG-2 olarak isimlendirilen plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları **Şekil 39**'da verildi.

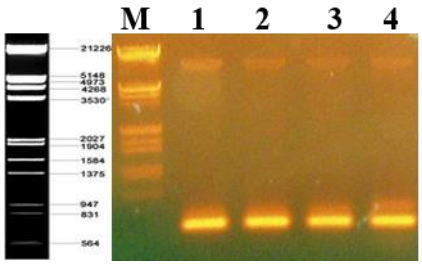


Şekil 38. Rehber RNA dizilerini kodlayan DNA fragmentlerinin klonlanacağı pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörünün agaroz jel elektroforezi profili. **P**. pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit DNA'sı. **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.



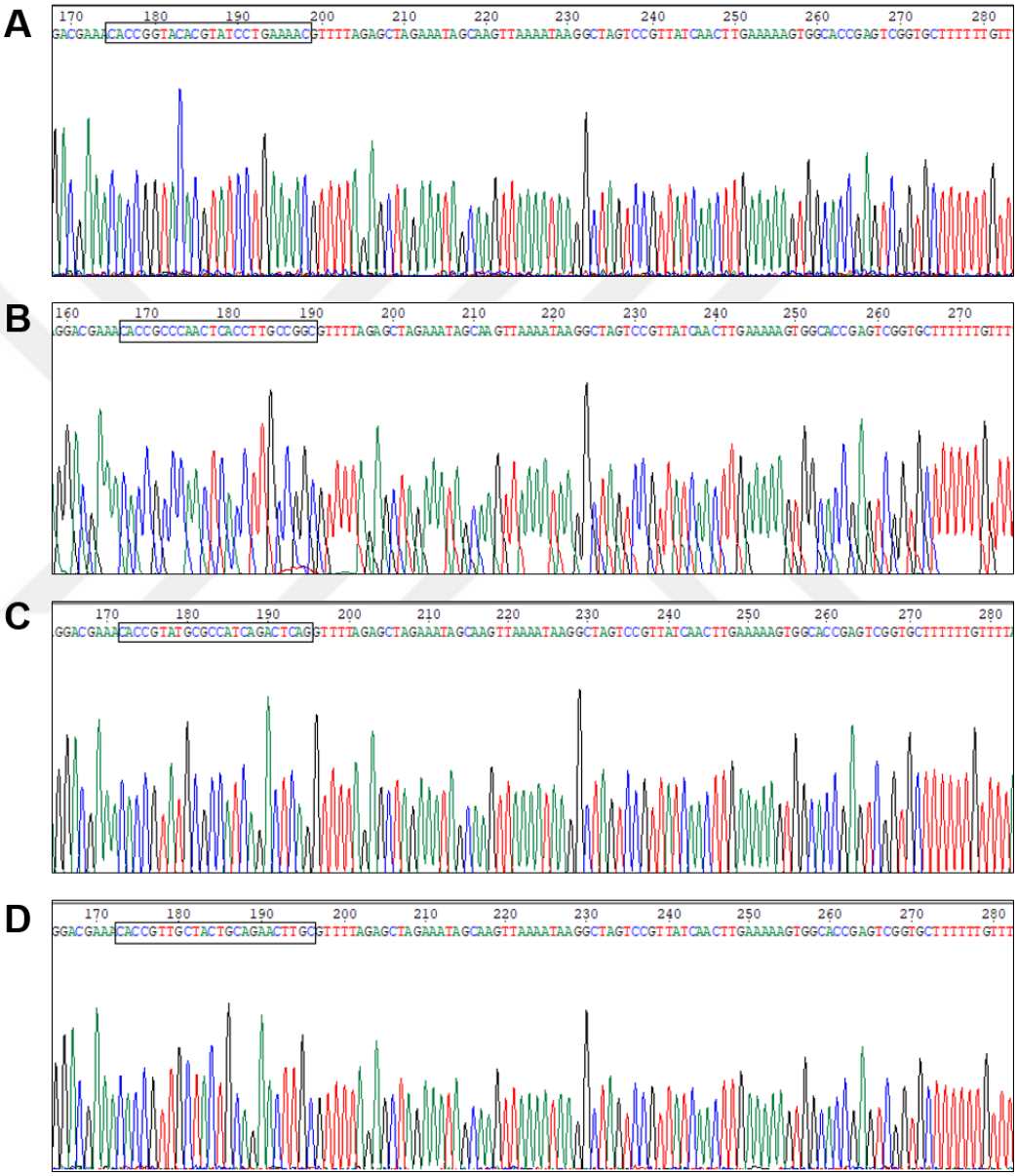
Şekil 39. CRISPR/Cas9 tekniği ile insan *EEF1G* ve *LSG1* genlerini susturmak için oluşturulan plazmit vektörlerin restriksiyon haritaları. Vektör haritalarının oluşturulmasında *BioEdit* programından yararlanıldı.

Küçük ölçekte hazırlanan pCas9-EEF-1, pCas9-EEF-2, pCas9-LSG-1 ve pCas9-LSG-2 plazmit vektörleri için dizi analizi öncesinde ön kontroller PZR tekniği ile yapıldı. Plazmit vektörlerinde klonlanan 20 nükleotid uzunluğundaki DNA fragmentini içine alan bölge PZR ile çoğaltıldı. PZR reaksiyonu için hedef dizisi vektör içinde olan *pU6-For* ve klonlanan fragmentlere ait geri yönlü primerler (*EEF-CRP-Rev-1*, *EEF-CRP-Rev-2*, *LSG-CRP-Rev-1 ve LSG-CRP-Rev-2*) kullanıldı (bkz. Tablo 1). PZR ürünleri agaroz elektroforezi ile incelendi (**Şekil 40**).



Şekil 40. Plazmit DNA'ların PZR ile yapılan kontrolleri sonucu oluşan fragmentlerin agaroz jel elektroforez profilleri. **1**. pCas9-EEF-1 plazmiti. **2**. pCas9-EEF-2 plazmiti. **3**. pCas9-LSG-1 plazmiti. **4**. pCas9-LSG-2 plazmiti. **M**. λ/*Hind*III+*Eco*RI.

pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmitlerine klonlanan kısa DNA fragmentleri DNA dizi analizleri ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlar *EEF1G* ve *LSG1* genleri için tasarlanan hedef dizileri ve bu dizilerin trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) molekülü ile füzyon halinde ve teorik olarak tasarlanan dizi ile aynı olduğunu gösterdi (**Şekil 41**).



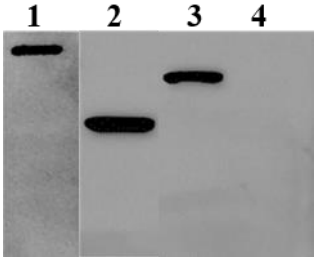
Şekil 41. pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörüne klonlanan *EEF1G* ve *LSG1* genlerine özgü rehber RNA kodlayan kısa DNA fragmentlerinin DNA dizi analizi kromatogramları. **A**. EEF1G-sgRNA-1, **B**. EEF1G-sgRNA-2, **C**. LSG1-sgRNA-1, **D**. LSG1-sgRNA-2. Rehber RNA dizileri kromatogramlar üzerinde işaretlendi.

6.8. İnfluenza A Virüsü *NS1* Geni ve İnsan *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* Genlerini ve *Cas9* geni Taşıyan Plazmit Vektörlerin Memeli Hücrelerinde Ekspresyonu ile İlgili Veriler

pCHA, pCAGGS, pCAGGS-GST veya pCAGGS-Flag plazmit vektörlerine klonlanan influenza A virüsü $NS1_W$ (WSN) geni ve insan *EEF1G, LSG1* ve *DDX56* genlerinin memeli hücrelerinde anlatım yapıp yapmadığı ve bu genlerin ekspresyon düzeyleri Western melezleme teknikleri ile; bu proteinlerin hücre içi lokalizasyonları ise immünfloresans teknikler ile analiz edildi.

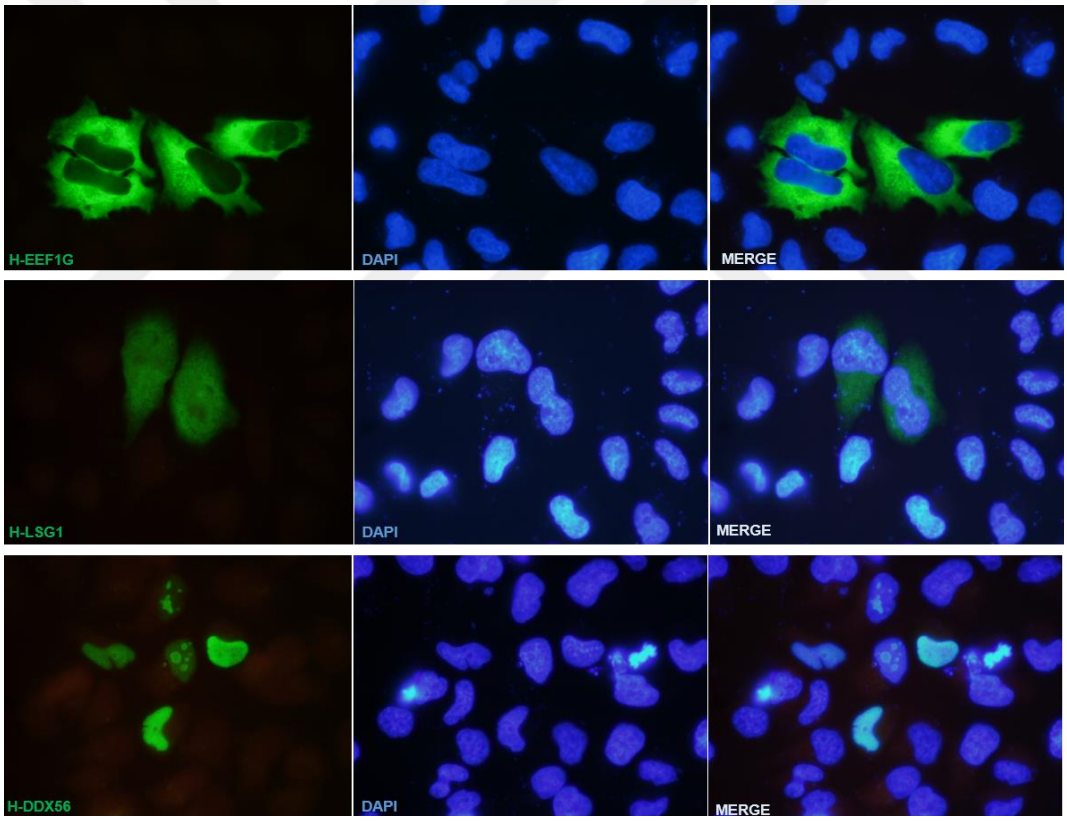
6.8.1. İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin Western melezleme teknikleri ve immünfloresans teknikler ile analizine ilişkin veriler

Western melezleme yöntemi ile analizler için, 12-kuyulu plaklarda üretilen HEK293 hücreleri pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 ve pCHA-DDX56 plazmitleri ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 45-48 saat sonra SDS-örnek yükleme tamponunda parçalanan hücre lizatlarındaki proteinler SDS-PAGE/Western melezleme yöntemi ile analiz edildi. pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 ve pCHA-DDX56 plazmitlerinin HEK293 hücrelerinde etkin bir şekilde ekspresyon yaptığı ortaya kondu. Poliakrilamid jel üzerinde H-LSG1 proteini için ~75 kDa, H-EEF1G proteini için ~50 kDa ve H-DDX56 proteini için ~61 kDa büyüklüklerde beklenen protein bantları saptandı (**Şekil 42**).



Şekil 42. pCHA-LSG1, pCHA-EEF1G ve pCHA-DDX56 plazmit vektörleri ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde HA uzantısı taşıyan LSG1 (**1**) EEF1G (**2**) ve DDX56 (**3**) proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi. **4**. Transfekte olmamış HEK293 hücreleri. Elektroforez işlemi %10'luk poliakrilamid jel kullanılarak, ilk 15 dakika 40 V/jel, devamında 75 dakikada 80 V/jel sabit gerilim altında tamamlandı. Proteinlerin analizinde birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru, ikincil antikor olarak ise anti-fare IgG-HRP antikoru kullanıldı. Proteinler DNR Bio-Görüntüleme sistemi ile görüntülendi.

HA uzantılı konak proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları immünfloresans teknikler ile analiz edildi. 12-kuyulu plaklarda lameller üzerinde üretilen HeLa hücreleri pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 ve pCHA-DDX56 plazmitleri ile geçici olarak transfekte edildi. Birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru, ikincil antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru kullanıldı. Nükleusların işaretlenmesinde bir nükleik asit boyası olan DAPI kullanıldı. Elde edilen veriler sonucunda; EEF1G proteininin hücre sitoplazmasında, LSG1 proteininin hücrenin hem nükleus hem de sitoplazmasında ve DDX56 proteininin ise ağırlıklı olarak hücre nükleolusunda olmakla birlikte nükleusta lokalize oldukları saptandı (**Şekil 43**). Yapılan literatür taramasında da, hücrelerde doğal olarak sentez edilen bu proteinlerin tespit edildiği gibi lokalizasyon verdikleri saptandı.



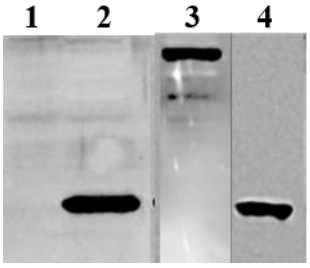
Şekil 43. HeLa hücrelerinde, geçici olarak transfekte edilen pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 veya pCHA-DDX56 plazmit vektörleri üzerinden kodlanan HA uzantılı konak proteinlerinin immünfloresans teknikle analiz edilmesi. Deneylerde birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru, ikincil antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru kullanıldı. Hücre nükleusları DAPI ile

işaretlendi.Proteinler DP72 soğutmalı kamera bağlı bir floresans mikroskop (Olympus: BH40) altında görüntülendi.

6.8.2. İnfluenza A virüsü NS1 proteininin Western melezleme teknikleri ve immünfloresans teknikler ile analizine ilişkin veriler

Plazmit vektörler üzerinden kodlanan Flag veya GST uzantılı veya doğal influenza A virüsü NS1 proteinlerinin ekspresyon analizlerinde HEK293 hücreleri kullanıldı. Geçici olarak transfekte edilen hücrelerden hazırlanan lizatlarındaki proteinler SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile incelendi. Flag uzantılı NS1 ($NS1_W$-Flag) proteini analizinde tavşan orjinli poliklonal anti-Flag antikoru; GST uzantılı NS1 ($NS1_W$-GST) proteini analizinde tavşan orjinli poliklonal anti-GST antikoru; doğal $NS1_W$ proteini analizinde ise tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru; ikincil antikor olarak HRP- konjuge anti-tavşan IgG antikoru kullanıldı.

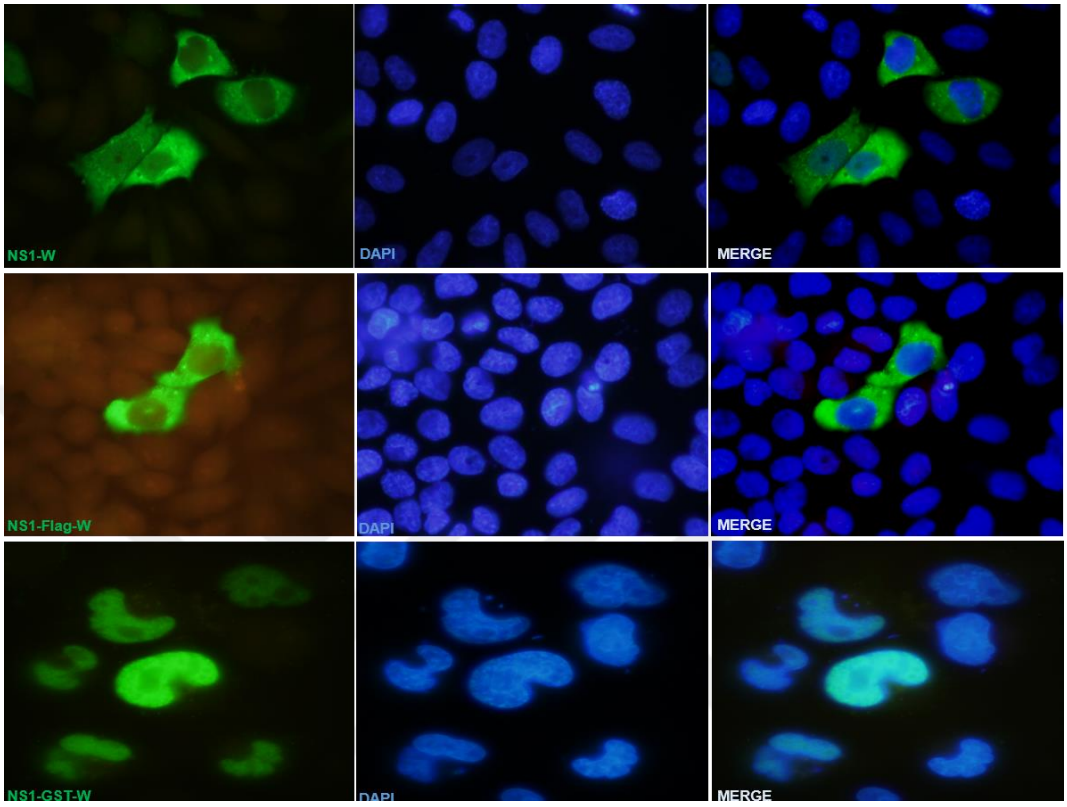
Şekil 44'de görüldüğü gibi; Western melezleme deneyleri sonucunda, plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde $NS1_W$-Flag, $NS1_W$-GST ve doğal $NS1_W$ proteinlerinin etkin bir şekilde sentez edildiği ortaya kondu. Poliakrilamid jel üzerinde beklenen büyüklüklerde ($NS1_W$-Flag proteini: ~26 kDa, $NS1_W$-GST proteini: ~54 kDa ve doğal $NS1_W$ proteini: ~26 kDa) saptandı.



Şekil 44. Geçici olarak transfekte edilen HEK293 hücrelerinde sentez edilen NS1 proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme yöntemi ile analiz edilmesi. **1**. Transfekte olmamış HEK293 hücreleri. **2**. $NS1_W$-Flag proteini. **3**. $NS1_W$-GST proteini. **4**. $NS1_W$ proteini.

Geçici olarak transfekte edilen HeLa hücrelerinde sentez edilen influenza A virüsü NS1 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu immünfloresans teknikler ile saptandı. Flag uzantılı $NS1_W$-Flag proteini ve uzantı taşımayan doğal $NS1_W$

proteinlerinin baskın bir şekilde hücrenin sitoplazmasında lokalize olduğu saptandı. GST uzantılı NS1 proteinlerinin ($NS1_W$-GST) ise hücre nükleusunda lokalizasyon gösterdiği belirlendi (**Şekil 45**).

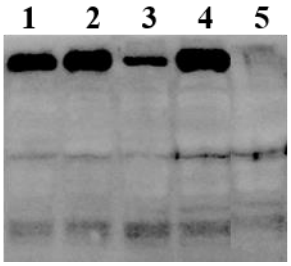


Şekil 45. HeLa hücrelerinde sentez edilen doğal, Flag veya GST uzantısı taşıyan influenza A virüsü NS1 proteinin hücre içi lokalizasyonunun immünfloresans teknikler ile incelenmesi. Deneylerde birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-NS1 antikoru; ikincil antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru kullanıldı. Hücre nükleusları DAPI ile işaretlendi. Proteinler DP72 soğutmalı kamera bağlı bir floresans mikroskop (Olympus: BH40) altında görüntülendi.

6.8.3. CRISPR/Cas9 tekniğinde kullanılan plazmit vektörler üzerinden kodlanan Cas9 enziminin Western melezleme tekniği ile analizine ilişkin veriler

CRISPR/Cas9 tekniği ile gen susturma amaçlı oluşturulan pCas9-EEF-1, pCas9-EEF-2, pCas9-LSG-1 ve pCas9-LSG-2 plazmit vektörlerinin memeli hücrelerinde Cas9 enzimini kodlayıp kodlamadıkları Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Plazmitlerde taşınan *Cas9* geni flag uzantılı (3xFlag) Cas9 proteini kodladığından Western melezleme deneylerinde antikor olarak tavşan orjinli monoklonal anti-Flag antikoru kullanıldı. Elde edilen veriler, CRISPR/Cas9 plazmitlerinin HEK293

hücrelerinde etkin bir şekilde ekspresyon yaptıklarını ortaya koydu. Poliakrilamid jel üzerinde Cas9 enzimi için beklenen ~150 kDa büyüklüğünde protein bantları saptandı (**Şekil 46**).



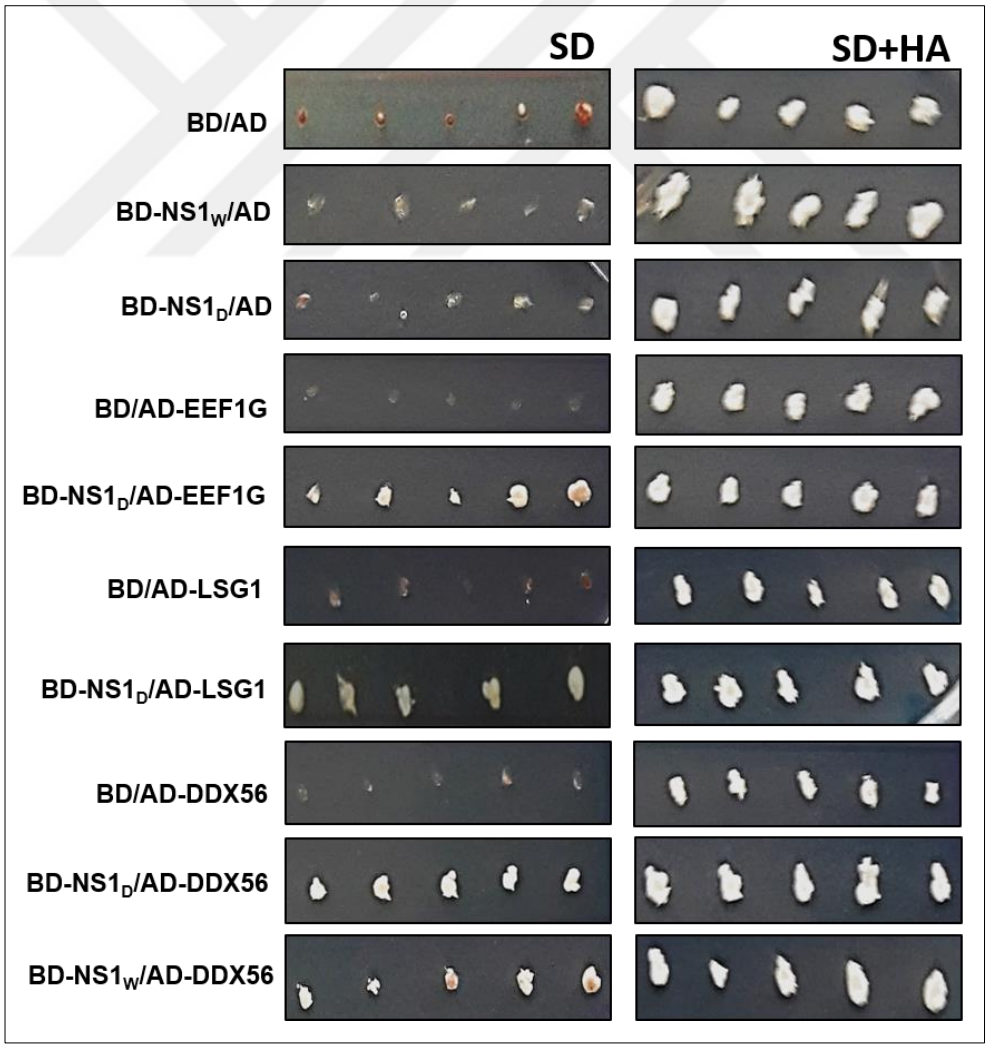
Şekil 46. pCas9-EEF-1 (**1**), pCas9-EEF-2 (**2**), pCas9-LSG-1 (**3**) ve pCas9-LSG-2 (**4**) plazmit vektörleri ile transfekte edilen HEK293 hücrelerinde Cas9 enzimi sentezinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analizi. **5**. Transfekte olmamış HEK293 hücreleri. SDS/PAGE elektroforez işlemi %7,5'luk poliakrilamid jel kullanılarak gerçekleştirildi. Western melezleme işlemlerinde Flag uzantılı Cas9 proteinini işaretlemek için tavşan orjinli monoklonal anti-Flag antikoru ve anti-tavşan IgG-HRP antikoru kullanıldı.

6.9. İnfluenza A virüsü NS1 Proteini ile İnsan EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinleri Arasındaki Etkileşimin Maya-İkili Hibrit Metodu ile Analizine İlişkin Veriler

Maya hücrelerinde NS1 proteini ile EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri arasındaki etkileşimin saptanması amacıyla yapılan deneylerde, *S. cerevisiae* PJ69-4A maya hücreleri önce GAL4 transkripsiyon faktörü bağlanma domaini (GAL4-BD) ile füzyon halinde insan veya kuş tipi influenza A virüsü NS1 proteinlerini kodlayan bait plazmitleri (pGBD-$NS1_W$, pGBD-$NS1_D$) veya pGBD-C1 kontrol plazmiti ile; daha sonra tam boyutta EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini GAL4 aktivasyon domain ile füzyon halinde kodlayan pGAD424 veya pACT2 maya ikili-hibrit plazmitleri (bkz. 6.4) ile transforme edildi. Transformasyon sonrası elde edilen ikili plazmit (BAİT/pGAD424-EEF1G, BAİT/pACT2-LSG1 veya BAİT/pACT2-DDX56 plazmit çiftleri) taşıyan maya hücrelerinin seçici katı besiyerlerindeki üreme özellikleri, SD (Sentetik Dekstroz besiyeri) ve SD+HA besiyerlerine ekimi yapılarak kontrol edildi.

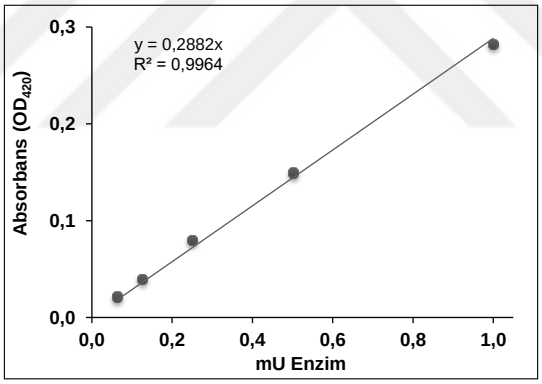
SD+HA besiyeri, tüm ikili transformantların üreyebildiği bir besiyeridir. Dolayısıyla, ikili transformant maya hücreleri SD+HA besiyerinde ürediği görüldü

(**Şekil 47**). SD besiyeri ise, sadece NS1 bait proteini ile pozitif etkileşim gösteren konak proteinlerinin sentez edildiği ikili transformantların üreyebildiği besiyeridir. Protein kodlamayan kontrol plazmit çiftiyle (pGBD-C1/pGAD424) transforme edilen maya hücreleri ve NS1 bait kodlayan plazmit ile pGAD424 plazmiti taşıyan ikili transformantların SD besiyerinde üremediği görüldü. GAL4 aktivasyon domaini ile füzyon halinde konak proteinlerini kodlayan plazmitler ile birlikte pGBD-C1 plazmiti taşıyan maya hücrelerinin de beklenildiği gibi seçici SD besiyerinde üremediği saptandı. Buna karşın, $NS1_W$ veya $NS1_D$ bait plazmiti ile birlikte EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan plazmitlerle transforme edilen maya hücrelerinin SD besiyerinde ürediği görüldü. Elde edilen bu sonuçlar maya hücrelerinde NS1 proteininin EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri ile fiziksel etkileşim gösterdiğini ortaya koydu.

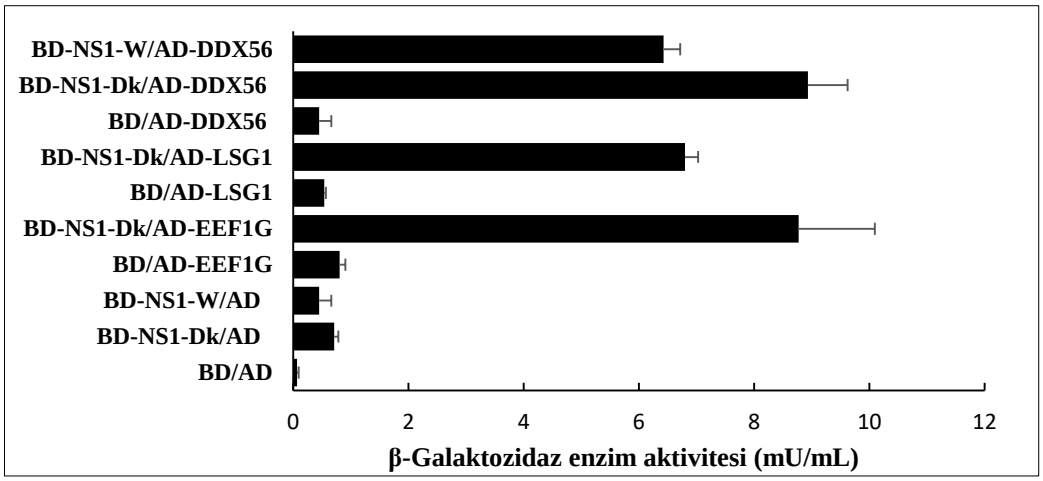


Şekil 47. Maya ikili hibrit metodu için geliştirilen iki plazmit ile transforme edilen *S. cerevisiae* PJ69-4A maya hücrelerinin SD ve SD+HA seçici katı besiyerlerinde gösterdiği üreme şekilleri. **BD**. GAL4 proteininin bağlanma bölgesini; **AD**. GAL4 proteininin aktivasyon bölgesini göstermektedir.

S. cerevisiae PJ69-4A maya ırkının iki hibrit proteinin etkileşimine duyarlı olarak taşıdığı belirteç genlerinden biri; GAL4 transkripsiyon aktivatör proteini tarafından uyarılan β-galaktozidaz genleridir. Bu genlerin anlatım yapmaları hücre içerisinde sentez edilen iki ayrı hibrit proteinin etkileşimine bağlıdır. Hibrit proteinlerin birbirine bağlanması ile oluşan kompleks transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görür ve durum belirteç genlerin anlatım yapmasına neden olur. Bu sebeple maya hücrelerinde tespit edilen protein etkileşimlerini doğrulamak için seçici SD besiyerinde üreyen hücrelerde β-galaktozidaz enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen absorbans değerleri temel alınarak kültürlerin β-galaktozidaz aktiviteleri, **Şekil 48**'de verilen standart grafik üzerinden "mU/ml kültür" olarak belirlendi.



Şekil 48. Rekombinant β-galaktozidaz enzimi ile hazırlanan standart grafik.



Şekil 49. Maya ikili transformant hücrelerinde β-galaktozidaz enzim aktiviteleri. SD+HA katı besiyerinde üreyen ikili transformant kolonilerden rastgele seçilen üç örneğin β-galaktozidaz enzim aktivitesi ölçüldü ve ortalaması grafiğe yansıtıldı.

Şekil 49'da verilen sonuçlardan da anlaşıldığı gibi maya hücrelerinde GAL4 aktivasyon bölgesi ile füzyon halinde sentez edilen insan EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerinin, GAL4 bağlanma bölgesi ile füzyon halinde sentez edilen NS1 proteinleri ile birlikte bulunmaları belirteç işlevi gören β-galaktozidaz enzimi aktivitesinde önemli ölçüde artışa neden olmuştur. Buna karşın *NS1* geni taşımayan kontrol plazmiti (pGBD-C1) ve konak proteinlerini kodlayan plazmitler ile birlikte transforme edilen hücrelerde çok düşük β-galaktozidaz aktiviteleri ölçüldü. Benzer şekilde pGBD-C1 ve pGAD424 plazmitleri ile transforme edilen maya hücrelerinde de çok daha düşük düzeylerde β-galaktozidaz aktiviteleri ölçüldü. Bu verilerden maya hücrelerinde viral NS1 proteininin insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri ile fiziksel etkileşim halinde olduğunu sonucuna varıldı.

6.10. İnfluenza A Virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerinin Memeli Hücrelerindeki Etkileşimlerine İlişkin Veriler

S. cerevisiae hücrelerinde ilişkileri saptanan NS1 proteini ve konak proteinleri (EEF1G, LSG1 ve DDX56) arasındaki fiziksel etkileşimler memeli hücrelerinde de araştırıldı. Bu amaçla; birlikte-immün çöktürme, GST ile çöktürme ve immünfloresans teknikler kullanıldı.

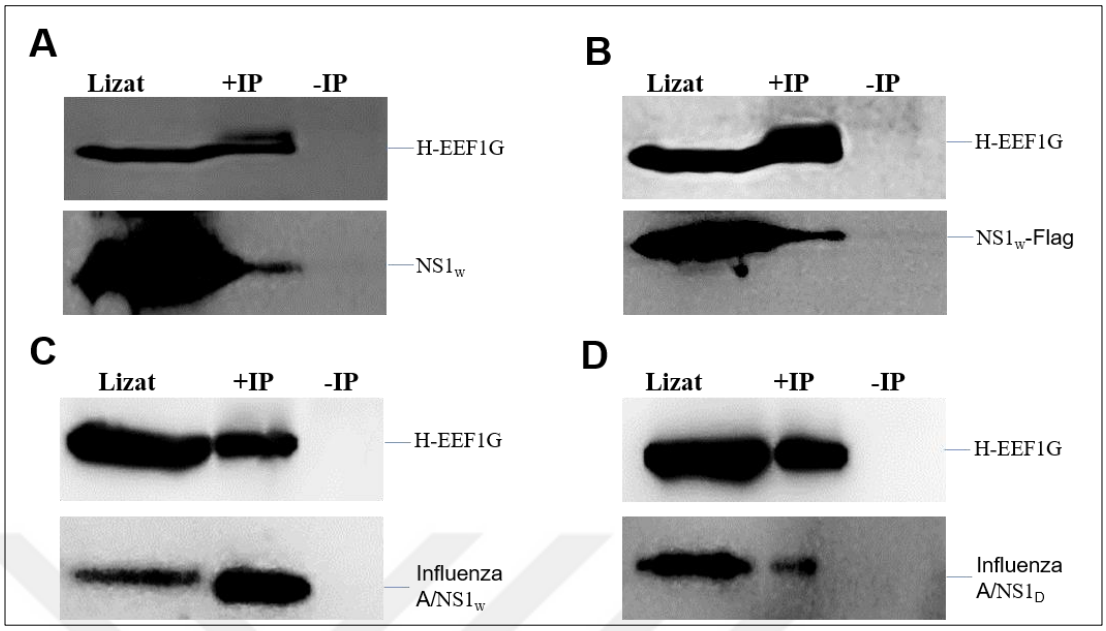
6.10.1. NS1 ve konak proteinlerinin birlikte çöktürme teknikleri ile analizine ilişkin veriler

Memeli hücrelerinde birlikte sentez edilen NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri arasındaki fiziksel etkileşimin saptanmasında birlikte-immün çöktürme ve/veya GST ile çöktürme tekniklerinden yararlanıldı. Birlikte-immün çöktürme deneylerinde, HA uzantılı konak hücre proteinlerini (EEF1G, LSG1 veya DDX56) ve influeza A virüsü NS1 proteinlerini kodlayan plazmit DNA'ları 6 cm'lik petrilerde çoğaltılan HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyon deneylerinde 6 cm'lik petrilerde çoğaltılan hücreler için toplam 5 µg plazmit DNA'sı kullanıldı. Transfeksiyondan 44-48 saat sonra hücrlerden hazırlanan lizatlarda proteinler fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru ve protein A-Sefaroz boncuklar kullanılarak çöktürme yapıldı. Sonuçlar SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi.

Birlikte immün çöktürme deneyleri sadece plazmit DNA'sı üzerinden kodlanan NS1 proteini ile değil, aynı zamanda viral enfeksiyon sırasında sentez edilen doğal NS1 proteini ile de gerçekleştirildi. Bu deneylerde 6 cm'lik petrilerde çoğaltılan HEK293 hücreleri önce EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan plazmitler ile transfekte edildi, daha sonra virüsler ile enfekte edildi. Hücrelerden hazırlanan lizatlar birlikte immün çöktürme amaçlı kullanıldı.

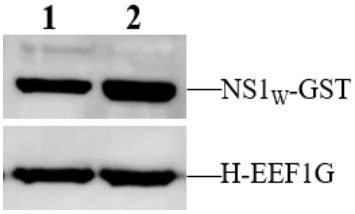
Memeli hücrelerinde birlikte sentez edilen EEF1G ile influenza A virüsü NS1 proteinleri arasındaki fiziksel etkileşimi saptanmak için yapılan analiz sonucunda, doğal $NS1_W$ proteini veya $NS1_W$-Flag ile EEF1G proteini HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edildiğinde, her iki NS1 proteinin de EEF1G proteini ile birlikte çökeldiği saptandı. Buna karşın, antikor kullanılmadan kontrol amaçlı yapılan çöktürme işleminde ele alınan proteinlerde bir çökelme olmadı (**Şekil 50A,B**).

EEF1G proteini kodlayan plazmit ile transfeksiyondan sonra virüs ile enfekte edilen hücrelerden hazırlanan lizatlar ile yapılan immün çöktürme deneylerinde de hem insan tipi influenza A virüsü (H1N1) $NS1_W$ proteininin hem de kuş tipi influenza A virüsü (H5N2) $NS1_D$ proteininin birlikte çökeldiği görüldü (**Şekil 50C,D**).



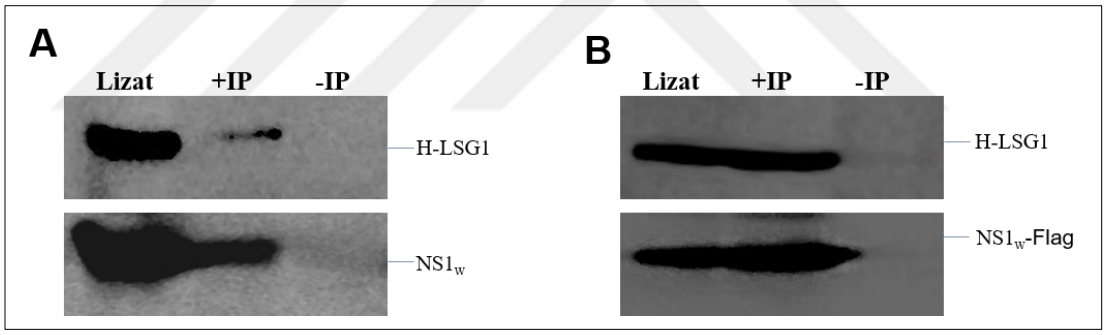
Şekil 50. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-EEF1G proteini ve NS1 proteinlerinin immün çöktürme sonrası SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi. pCHA-EEF1G ve pCAGGS-$NS1_W$ plazmiti (**A**) ya da pCAGGS-$NS1_W$-Flag plazmiti (**B**) ile transfekte edilen hücre lizatlarında çöktürülen proteinler. pCHA-EEF1G plazmit DNA'sı ile transfekte edilen, sonrasında influenza A virüsü (WSN) (**C**) ya da influenza A virüsü (DkPen) (**D**) ile enfekte edilen hücre lizatlarında çöktürülen proteinler. **+IP**. Spesifik antikor (anti-HA) kullanılarak yapılan çöktürme testi. **-IP**. Antikor kullanmadan yapılan çöktürme testi (kontrol). Western melezleme deneylerinde birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru ve tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru; ikincil antikor olarak ise anti-fare IgG-HRP antikoru ve anti-tavşan IgG-HRP antikoru kullanıldı.

NS1 ve EEF1G proteinleri arasında immün çöktürme ile saptanan bu fiziksel etkileşim glutatyon-sefaroz ile çöktürme deneyleri ile de doğrulandı. HA uzantılı EEF1G proteini ve GST uzantılı NS1 proteinini ($NS1_W$-GST) kodlayan plazmit vektörlerin birlikte transfekte edildiği hücrelerden hazırlanan lizatlarda, $NS1_W$-GST proteini glutatyon-sefaroz boncuklar kullanılarak çöktürüldü. Çökelen proteinler hem $NS1_W$-GST hem de EEF1G proteinlerini için SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Elde edilen veriler, EEF1G proteininin $NS1_W$-GST proteini ile birlikte çökeldiğini gösterdi (**Şekil 51**).



Şekil 51. pCAGGS-NS1W-GST ve pCHA-EEF1G plazmitleri ile transfekte edilen HEK293 hücre lizatlarında proteinlerin glutatyon sefaroz ile çöktürülmesi ve çökeltilerde NS1W-GST ve H-EEF1G proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analizi. **1**. pCHA-EEF1G ve pCAGGS-NS1W-GST plazmitleri ile transfekte edilen hücre lizatı. **2**. Glutatyon-sefaroz ile çöktürülen proteinler.

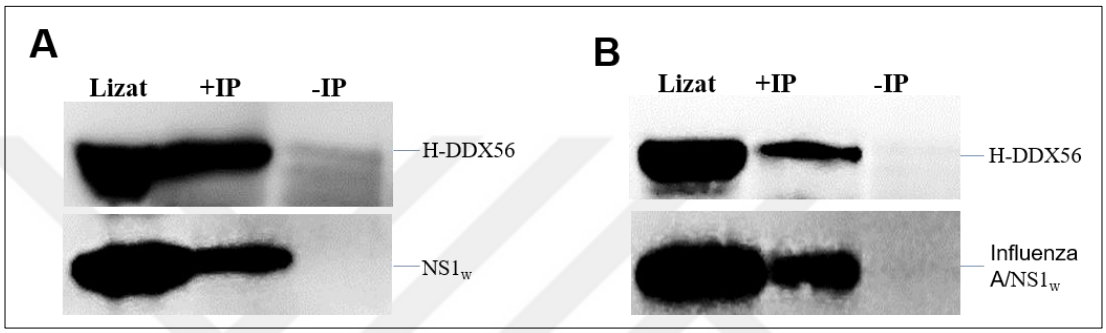
İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile H-LSG1 proteini arasındaki etkileşimi saptamak için yapılan birlikte immün çöktürme testi sonuçları **Şekil 52**'de verildi. NS1 ve H-LSG1 protein kodlayan plazmit ile birlikte transfekte edilen hücre lizatlarında NS1 proteinlerinin H-LSG1 ile birlikte çökeldiği görüldü.



Şekil 52. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-LSG1 proteini ve NS1 proteinlerinin immün çöktürme sonrası SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi. pCHA-LSG1 ve pCAGGS-NS1W plazmıtı (**A**) ya da pCHA-LSG1 ve pCAGGS-NS1W-Flag plazmiti (**B**) ile transfekte edilen hücre lizatlarında çöktürülen proteinler. **+IP**. Spesifik antikor (anti-HA) kullanılarak yapılan çöktürme testi. **-IP**. Antikor kullanmadan yapılan çöktürme testi (kontrol). Western melezleme deneylerinde birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru ve tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru; ikincil antikor olarak ise anti-fare IgG-HRP antikoru ve anti-tavşan IgG-HRP antikoru kullanıldı.

Tez çalışması kapsamında üzerinde çalışılan proteinlerden biri de DDX56 proteinidir. DDX56 proteini ile NS1 proteini arasındaki ilişkiyi saptamak için de birlikte immün çöktürme tekniğinden yararlanıldı. Plazmitler ile transfekte HEK293

hücrelerinde sentez edilen NS1 proteini ($NS1_W$) HA uzantılı DDX56 proteini ile birlikte çökeldiği saptandı (**Şekil 53**). İmmün çöktürne testleri transfeksiyon/enfeksiyon koşullarında da gerçekleştirildi. HEK293 hücreleri H-DDX56 proteini kodlayan plazmit ile transfekte edildikten sonra influenza A (WSN) virüsü ile enfekte edildi. Bu hücrelerden hazırlanan lizatlar ile yapılan testlerde viral NS1 proteininin H-DDX56 proteini ile birlikte çökeldiği görüldü (**Şekil 53B**).



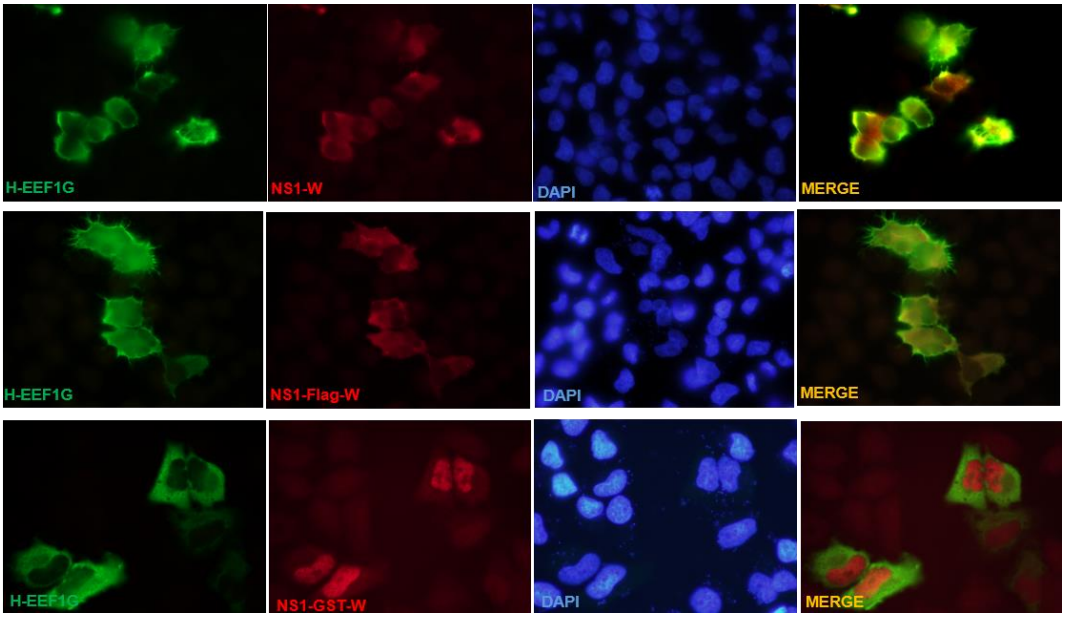
Şekil 53. HEK293 hücrelerinde birlikte sentez edilen H-DDX56 proteini ve NS1 proteinlerinin birlikte immün çöktürme testi sonrası SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilmesi. **A**. pCHA-DDX56 ve pCAGGS-$NS1_W$ plazmitleri ile transfekte edilen hücrelerde çöktürülen proteinler. **B**. pCHA-DDX56 plazmit DNA'sı ile transfekte edildikten sonra influenza A virüsü (WSN) ile enfekte edilen hücrelerde çöktürülen proteinler. **+IP**. spesifik antikor (anti-HA) kullanılarak yapılan çöktürme testi. **-IP**. Antikor kullanmadan yapılan çöktürme testi (kontrol). SDS-PAGE/Western işlemlerinde **Şekil 52'**de belirtilen koşullar uygulandı.

6.10.2. NS1 ve konak proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile analizine ilişkin veriler

Aynı hücrede sentez edilen iki protein arasındaki etkileşimler, proteinlerin hücre içi lokalizasyonları üzerinde etkili olabilmektedir. Bu bakımdan birlikte sentez edilen proteinlerin hücre içerisinde benzer şekilde lokalize olup olmadıklarının saptanması, proteinler arasındaki fiziksel etkileşimlerin tespitinde yol göstericidir. Çalışmada plazmit DNA'lar üzerinden sentez edilen influenza A virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ya da DDX56 proteinlerinin hücre içi birlikte-lokalizasyonları immünfloresans teknikler ile incelendi. Bunun için 12-kuyulu plaklarda lameller üzerinde üretilen HeLa hücreleri, NS1 proteini ($NS1_W$, $NS1_W$-Flag veya GST-$NS1_W$)

ve EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan bir plazmit ile birlikte transfekte edildi. Transfeksiyondan 40-44 saat sonra hücrelerde sentez edilen proteinler immünfloresans yöntemlerle görüntülendi.

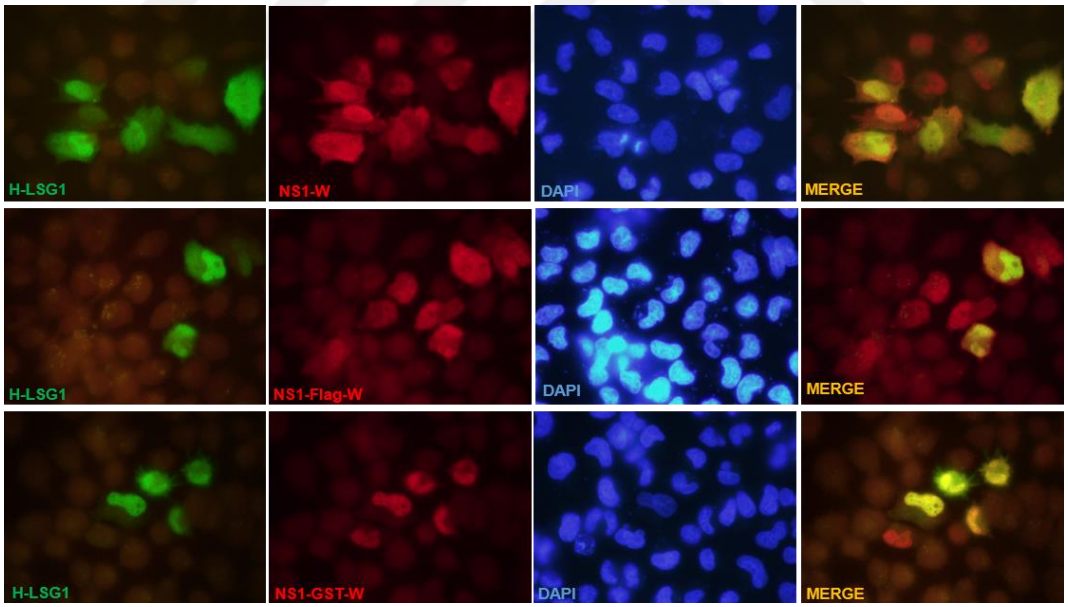
Geçici olarak transfekte edilen HeLa hücrelerinde tek başına sentez edilen influenza A virüsü $NS1_W$ proteini ve $NS1_W$-Flag proteininin hücre sitoplazmasında lokalize olduğu, buna karşın $NS1_W$-GST proteininin hücre nükleusunda lokalize oldukları saptandı (bkz. **Şekil 45**). Ökaryotik translasyon uzama faktörü-1 kompleksinin bir alt birimi olan EEF1G proteini ise hücrede tek başına sentezlendiğinde hücre sitoplazmasında lokalizasyon göstermektedir (bkz. **Şekil 43**). **Şekil 54**'de ise HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen NS1 proteinleri ve EEF1G proteininin hücre içi lokalizasyonları verilmektedir. Standart floresans mikroskobu bulguları proteinlerin birlikte lokalizasyonları hakkında net bir sonuç sunmamakla birlikte, çakıştırılmış (merge) hücre görüntüleri değerlendirildiğinde, $NS1_W$/EEF1G ve $NS1_W$-Flag/EEF1G proteinlerinin birbirine yakın bölgelerde yoğunlaştıkları anlaşılmaktadır. Buna karşın aynı hücrelerde görüntülenen $NS1_W$-GST ve EEF1G proteinlerinin farklı bölgelerde lokalize oldukları görülmektedir.



Şekil 54. HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen H-EEF1G ve $NS1_W$, $NS1_W$-Flag veya $NS1_W$-GST proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler

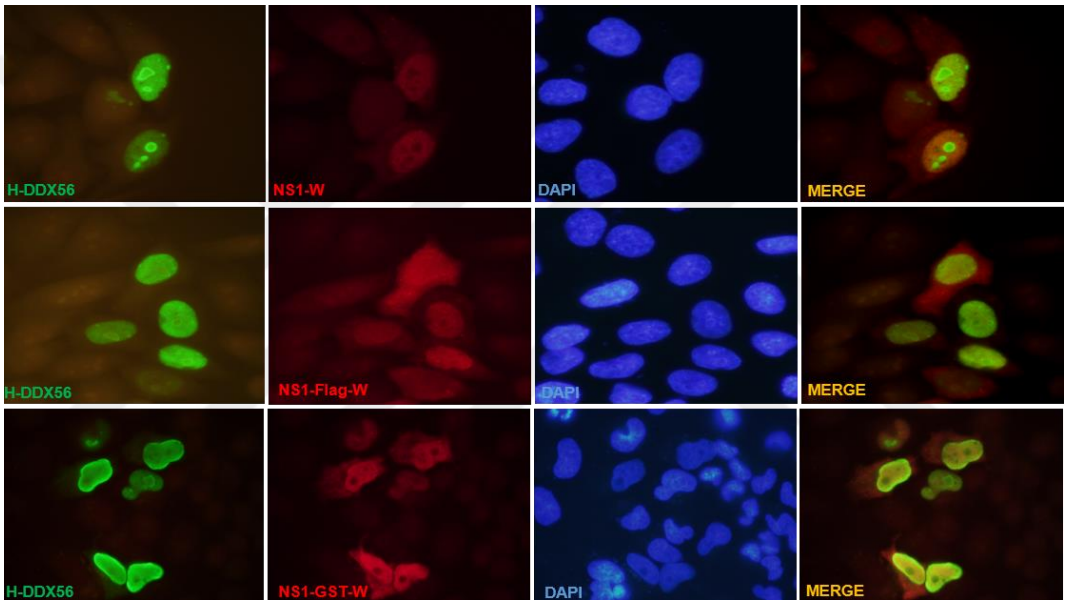
ile incelenmesi. Deneylerde birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru ve tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru; ikincil antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru ve Alexa568-konjuge anti-tavşan IgG antikoru kullanıldı. Nükleuslar DAPI ile işaretlendi. Proteinler DP72 soğutmalı kamera bağlı bir floresans mikroskop (Olympus: BH40) altında görüntülendi.

Ökaryotik hücrelerde ribozom biyosentezinde görev alan LSG1 proteininin HeLa hücrelerinde tek başına sentezlendiğinde hem nükleusta hemde sitoplazmada lokalizasyon gösterdiği saptandı (bkz. **Şekil 43**). Bu proteinin influenza A virüsü NS1 proteinleri ile birlikte sentez edildiğinde gösterdiği hücre içi lokalizasyonları **Şekil 55**'de verildi. **Şekil 45**'de verilen sonuçlardan da görüldüğü gibi, tek başına bulunduğunda ağırlıklı olarak hücre sitoplazmasında lokalize olan $NS1_W$ ve $NS1_W$-Flag proteinlerinin LSG1 proteini ile birlikte sentez edildiklerinde belirgin bir şekilde hücrenin nükleusunda lokalize oldukları saptandı. Aynı şekilde transfekte hücrelerde $NS1_W$-GST proteini de LSG1 proteini ile benzer lokalizasyon şekli gösterdi. Bu sonuçlar immün çöktürme testleri ile elde edilen bulguları destekler niteliktedir.



Şekil 55. HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen H-LSG1 ile $NS1_W$, $NS1_W$-Flag veya $NS1_W$-GST proteinlerinin hücre içi lokalizasyonları. Deneylerde birincil antikor olarak fare monoklonal anti-HA antikoru ve tavşan poliklonal anti-NS1 antikoru; ikincil antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru ve Alexa568-konjuge anti-tavşan IgG antikoru kullanıldı. Proteinler DP72 soğutmalı kamera bağlı bir floresans mikroskop (Olympus: BH40) ile görüntülendi.

Bir RNA helikaz olan DDX56 proteininin hücre nükleusunda lokalize olduğu ve özellikle nükleolus bölgelerinde yoğunlaştığı bilinmektedir (bkz. **Şekil 43**). HeLa hücrelerinde influenza A virüsü NS1 proteinleri ile birlikte sentez edildiğinde DDX56 proteininin hücre içi lokalizasyonunda bir değişiklik görülmedi (**Şekil 56**). Buna karşın daha çok sitoplazmada lokalize olan $NS1_W$ ve $NS1_W$-Flag proteinlerinin (bkz. **Şekil 45**), H-DDX56 proteini ile birlikte sentez edildiğinde hücre nükleuslarında lokalize olma eğilimine girdiği belirlendi. Plazmit vektör üzerinden sentez edilen GST uzantılı $NS1_W$-GST proteini de DDX56 proteinleri ile hücre nükleuslarında lokalizasyon gösterdi (**Şekil 56**).



Şekil 56. HeLa hücrelerinde birlikte sentez edilen HA uzantılı DDX56 ve doğal, Flag veya GST uzantısı taşıyan influenza A virüsü NS1 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonlarının immünfloresans teknikler ile incelenmesi. Deneylerde birincil antikor olarak fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru ve tavşan orjinli poliklonal anti-NS1 antikoru; ikincil antikor olarak ise Alexa488-konjuge anti-fare IgG antikoru ve Alexa568-konjuge anti-tavşan IgG antikoru kullanıldı. Nükleuslar DAPI ile işaretlendi. Proteinler DP72 soğutmalı kamera bağlı bir floresans mikroskop (Olympus: BH40) altında görüntülendi.

Genel olarak değerlendirildiğinde; bu çalışmaya konu olan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin, influenza A virüsü NS1 proteinleri ile memeli hücrelerinde benzer lokalizasyon profilleri gösterdiği sonucuna varıldı. Bu veriler immün çöktürme testleri ile elde edilen sonuçları destekler niteliktedir.

6.11. EEF1G, LSG1 ve DDX56 Proteinlerinin İnfluenza A Virüs Replikasyonu Üzerine Etkilerine İlişkin Veriler

Çoğalabilmek için konak hücrenin biyosentez mekanizmalarını kullanan virüsler ile konak hücre proteinleri arasında sıkı bir etkileşim sözkonusudur. Bu bağlamda, bazı konak hücre proteinleri virüs replikasyonu açısından kritik önem taşımaktadır. Örneğin, bazı proteinler viral replikasyonu pozitif yönde etkilerken, bazıları yavaşlatıcı hatta inhibe edici etkiye sahip olabilirler. Bu sebeple, maya ve memeli hücrelerinde yapılan testler sonrasında viral NS1 proteini ile etkileşim halinde olduğu tespit edilen insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin influenza A virüs replikasyonuna etkileri araştırıldı. Bunun için farklı yöntemler uygulanarak hücrelerde ele alınan proteinlerin düzeyleri değiştirildi ve bu hücrelerde virüs replikasyonunun seyri değerlendirildi.

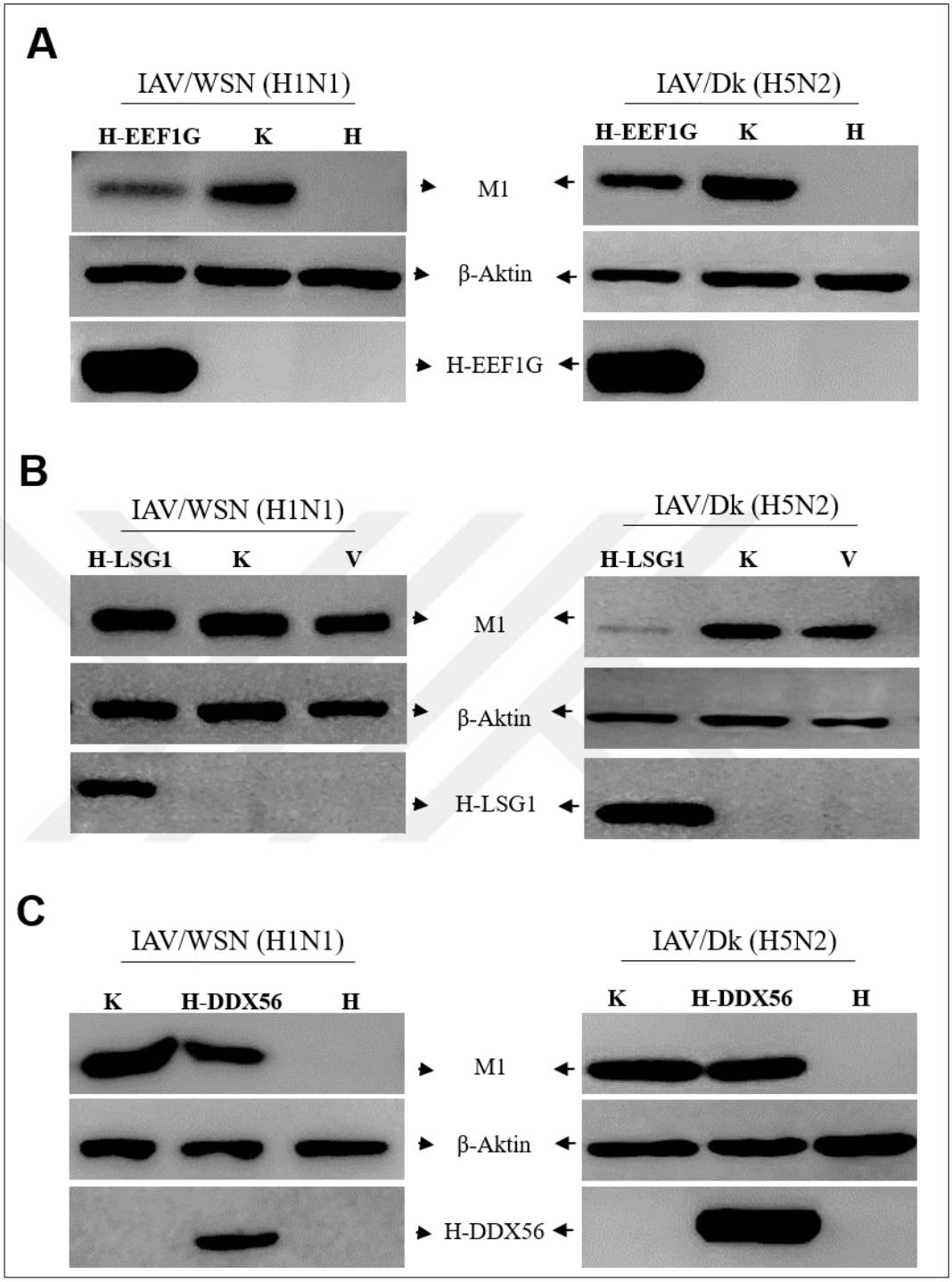
6.11.1. EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin aşırı ekspresyonlarının influenza A virüs replikasyonuna etkileri ile ilgili veriler

Hücrelerde EEF1G, LSG1 ve DDX56 protein miktarının geçici transfeksiyon ile arttırılmasının (*İng. over expression*) influenza A virüs replikasyonuna etkilerini saptamak amacıyla, HEK293 hücreleri bu proteinleri kodlayan plazmitler ile transfekte edildi. Transfeksiyondan 36-40 saat sonra hücreler influenza A (WSN) ve influenza A (DkPen) virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8 veya 10 saat sonra hücreler SDS-PAGE örnek yükleme tamponunda parçalandı. Elde edilen hücre lizatlarında influenza A virüsü M1 proteini ve konak hücre aktin beta proteini miktarları SDS-PAGA/Western melezleme tekniği ile değerlendirildi. Sonuçların değerlendirilmesinde transfekte olmamış hücrelerdeki M1 protein miktarı ve aktin beta protein miktarları referans alındı.

Elde edilen veriler, EEF1G düzeyi arttırılan hücrelerde hem insan tipi (WSN) hemde kuş tipi (DkPen) influenza A virüsü M1 protein miktarının kontrol hücrelerine oranla belirgin olarak düşük olduğunu göstedi. Dolayısıyla memeli hücrelerinde EEF1G proteini miktarındaki artışın hem WSN hem de DkPen tipi virüs replikasyonunu negatif yönde etkilediği sonucuna varıldı (**Şekil 57A**).

pCHA-LSG1 plazmiti ile transfekte edilerek LSG1 protein miktarı arttırılan hücrelerde ise insan tipi influenza A (WSN) virüsü M1 protein miktarının kontrol hücre grubuna yakın düzeyde olduğu; buna karşın kuş tipi influenza A (DkPen) virüsü M1 protein miktarının kontrol hücrelerine oranla çok daha düşük olduğu görüldü (**Şekil 57B**). Bu sonuç LSG1 protein miktarındaki artışın farklı influenza A virüsü tipleri üzerinde farklı etkiler yapabileceğini düşündürdü.

Geçici transfeksiyon ile DDX56 protein miktarı arttırılan ve enfekte edilen hücrelerde, viral M1 protein miktarının transfekte olmamış kontrol hücrelerdeki miktarlara yakın olduğu, dolayısıyla hücrelerde DDX56 protein miktarının artışının influenza A virüs replikasyonu üzerinde anlamlı bir değişikliğe neden olmadığı görüldü (**Şekil 57C**).

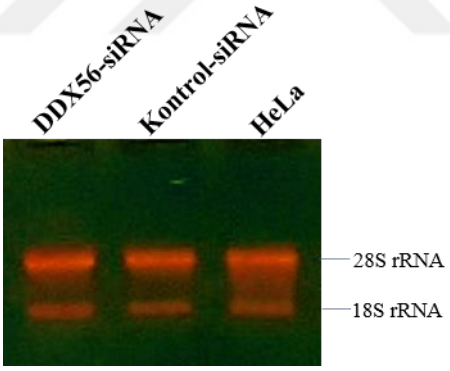


Şekil 57. Plazmit transfeksiyonu ile EEF1G, LSG1 ve DDX56 protein düzeyi arttırılan HEK293 hücrelerinde influenza A/WSN/33-H1N1 ve A/Duck/Pen-H5N2 virüs replikasyonunun SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile değerlendirilmesi. **K**. Transfekte olmamış virüs ile enfekte HEK293 hücreleri. **V**. pCHA plazmit ile transfekte edilen HEK293 hücreleri. **H**. İşlem görmemiş HEK293 hücreleri.

6.11.2. *DDX56* genine özgü siRNA ile transfekte edilen hücrelerde influenza A virüsü replikasyonu ile ilgili veriler

Özgün siRNA'lar ile *DDX56* geni transkript düzeyi azaltılan *(İng. knock down)* HeLa hücrelerinde influenza A virüs replikasyonunun nasıl etkilendiği sorusuna cevap arandı. Bu amaçla bölüm 5.31.2'de anlatıldığı gibi öncelikle HeLa hücreleri *DDX56* genine özgü siRNA veya Kontrol-siRNA ile transfekte edildi. Transfeksiyonun 48. saatinde hücrelerin bir kısmından (ortalama $5x10^5$ hücre/örnek) total RNA izolasyonu yapıldı. Kalan hücreler ise influenza A virüsleri ile enfekte edilerek endojen DDX56 transkript düzeyi düşürülen hücrelerde viral replikasyonun seyrini belirlemek için kullanıldı.

DDX56-siRNA veya Kontrol-siRNA ile transfekte edilen hücrelerden ve transfekte olmamış HeLa hücrelerinden hazırlanan total RNA örnekleri agaroz jel elektroforezi ile kontrol edildi (**Şekil 58**). Elde edilen total RNA'lar üzerinden oligo-dT primerler ile cDNA'lar hazırlandı.

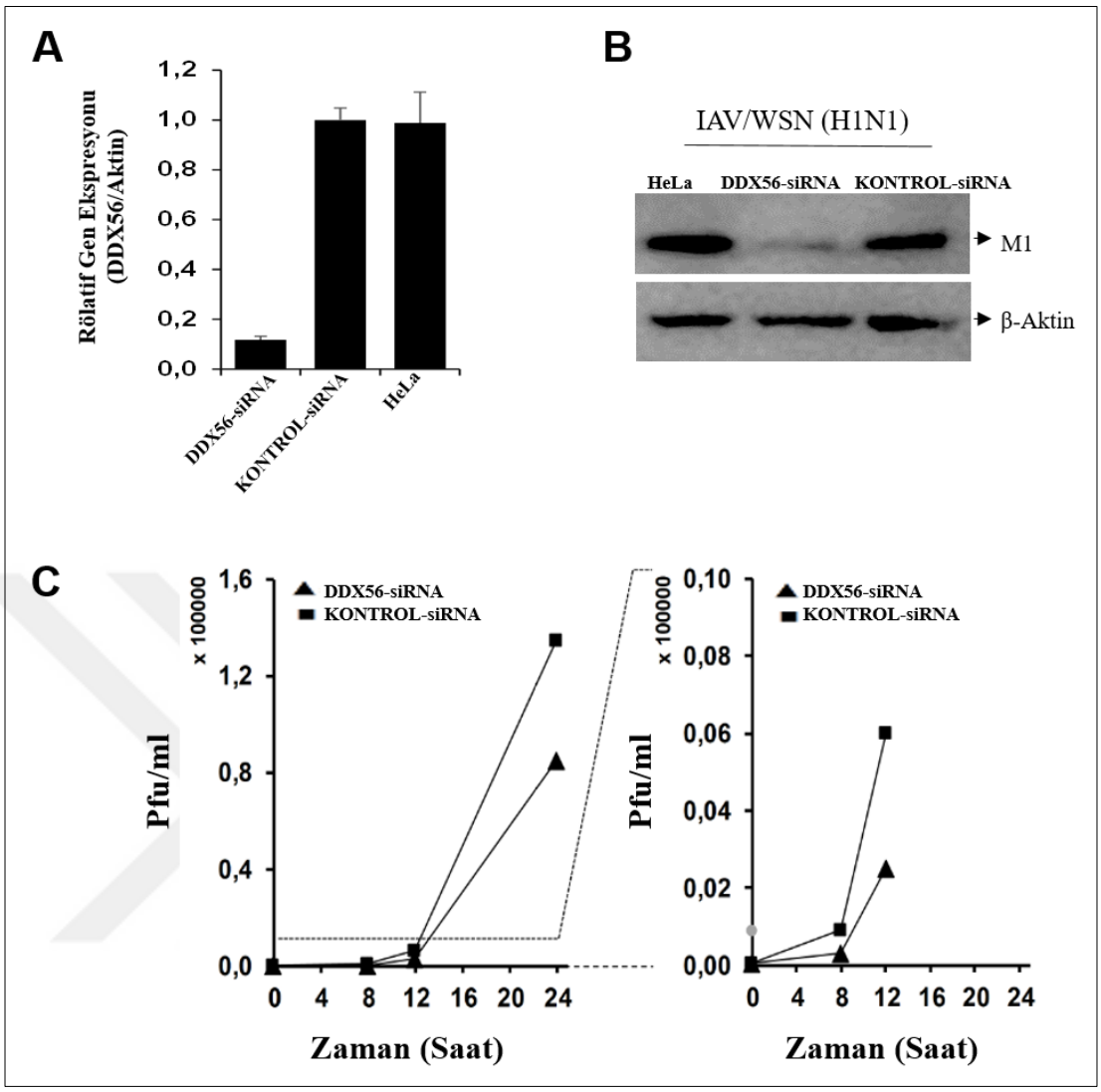


Şekil 58. siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinden elde edilen total RNA'nın agaroz jel elektroforezi ile analizi.

Farklı cDNA'larda, DDX56 ve aktin beta transkript düzeyleri gerçek zamanlı kantitatif PZR ile saptandı. *DDX56* geni için elde edilen transkript değerleri aktin beta transkript değerlerine oranlanarak farklı hücre örneklerinde rölatif DDX56 transkript oranları saptandı. **Şekil 59A**'da verilen bar grafiğinden de anlaşıldığı gibi DDX56-siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelerde DDX56 transkript düzeyinin kontrol

hücrelerine göre yaklaşık %90 oranında azaldığı görüldü. DDX56 transkript düzeyi düşürülen bu hücreler yaklaşık 1 moi titrede influenza A (WSN) virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8 saat sonra hücreler SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı ve lizatlarda viral M1 proteini ve aktin beta protein miktarları Western melezleme tekniği ile değerlendirildi. Elde edilen veriler DDX56-siRNA'lar ile transfekte olmuş hücrelerdeki M1 protein miktarının kontrol hücrelerine oranla çok düşük düzeyde olduğunu gösterdi (**Şekil 59B**). Böylece DDX56 transkript düzeyindeki azalmanın viral replikasyonu negatif yönde etkilediği sonucuna varıldı.

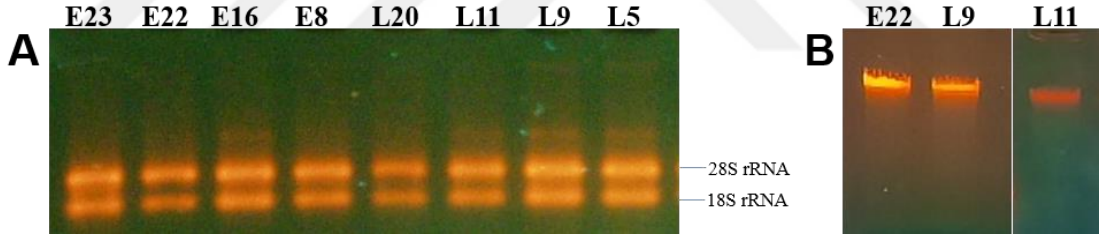
DDX56 geni susturulan HeLa hücrelerinde influenza A virüs replikasyonu, kültür ortamında serbestleşen virüs miktarının plak testi ile belirlenmesi ile de izlendi. Hücreler ortalama 1 pfu/hücre olacak şekilde influenza A (WSN) virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8, 12 ve 24 saat sonra besiyeri örnekleri alındı. Besiyerlerindeki virüs titresi plak testleri ile saptandı ve enfekte kültürlerde zamana göre virüs miktarı belirlendi (**Şekil 59C**). Elde edilen sonuçlar *DDX56* geni susturulan hücrelerde virüs artış hızının kontrol siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelere oranla daha düşük olduğunu gösterdi. Böylece DDX56 proteininin influenza A virüs replikasyonu üzerinde pozitif etkiye sahip olduğu sonucuna varıldı.



Şekil 59. siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde DDX56 transkript düzeyleri ve bu hücrelerde influenza A (WSN) virüs replikasyonunun izlenmesi. **A**. siRNA'lar (siRNA-DDX56 veya Kontrol-siRNA) ile transfekte olmuş ya da transfekte olmamış HeLa hücrelerinde rölatif DDX56 transkript düzeyleri. **B**. siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinde influenza A virüs replikasyonunun, virüse özgü M1 proteini üzerinden SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile incelenmesi. Deneylerde primer antikor olarak, tavşan poliklonal anti-M1 antikoru ve fare monoklonal anti-aktin antikoru; sekonder antikor olarak, HRP konjuge anti-fare IgG ve anti-tavşan IgG kullanıldı. **C**. siRNA'lar ile transfekte edilen HeLa hücrelerinin influenza A virüsleri ile enfekte edilmesi ve enfekte kültürlerde zaman göre artan virüs titresinin plak testleri ile belirlenmesi.

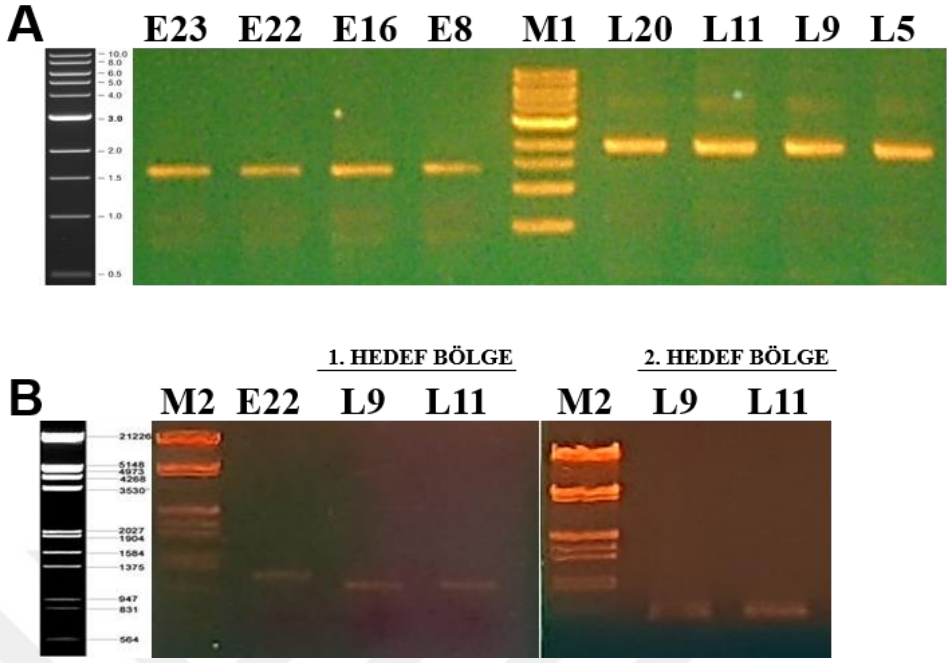
6.12. CRISPR/Cas9 Tekniği ile İnsan *EEF1G* ve *LSG1* Genlerinin İnaktive Edilmesi ile İlgili Veriler

İnsan EEF1G ve LSG1 proteinlerinin influenza A virüs replikasyonuna etkilerini araştırmak için HeLa hücrelerinde bu proteinleri kodlayan genlerin CRISPR/Cas9 teknolojisi ile inaktive edilmesi *(İng. knock out)* amaçlandı. Bu amaç doğrultusunda; Gereç ve Yöntem bölümünde (bkz. 5.24.3) anlatıldığı şekilde HeLa hücreleri pCas9-EEF-1/pCas9-EEF-2 ve pCas9-LSG-1/pCas9-LSG-2 plazmitleri ile transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hücrelerin ön seleksiyonu puromisin antibiyotiği kullanılarak gerçekleştirildi. Puromisine dirençli hücreler uygun oranlarda seyreltilerek 96-kuyulu plaklara tek hücre düşecek şekilde ekim yapıldı ve bu hücrelerden gelişen klonlar elde edildi. Elde edilen klonların *EEF1G* ve *LSG1* genleri bakımından mutasyonlu olup olmadıkları hem bu genlere ait cDNA'lar hem de genom DNA'ları üzerinden yapılan DNA dizi analizleri ile araştırıldı. Mutasyona uğradığı düşünülen klonlardan total RNA ve genom DNA ekstraksiyonu yapıldı. Ekstre edilen nükleik asitler agaroz jel elektroforezi ile incelendi (**Şekil 60**).



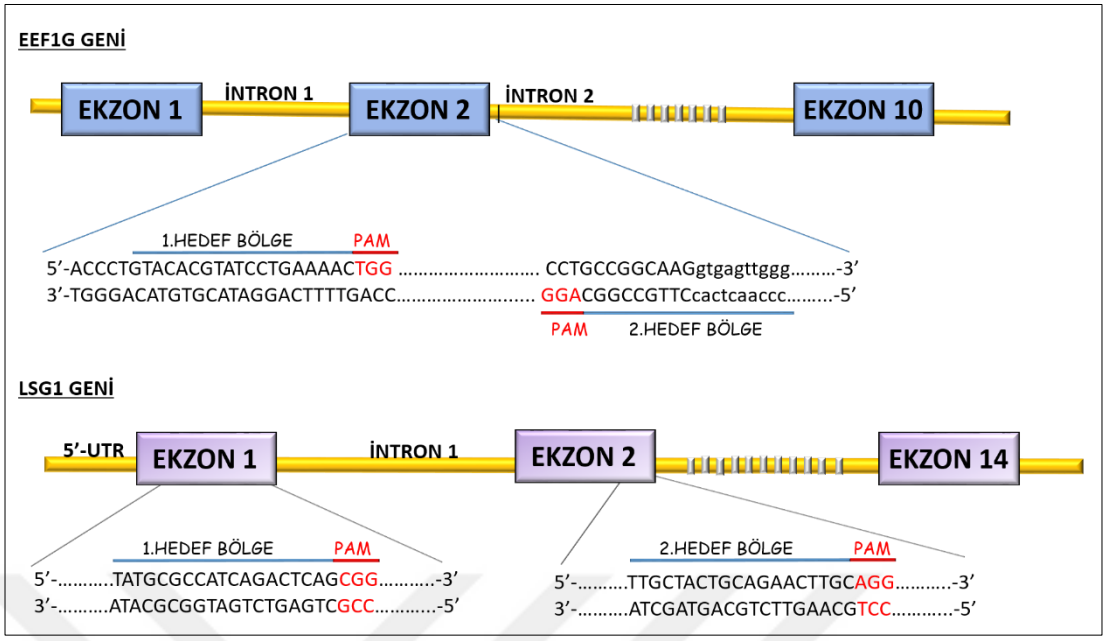
Şekil 60. EEF1G veya LSG1 geni hedeflenen farklı klonlara ait total RNA'ların (**A**) ve genom DNA'ların (**B**) agaroz jel elektroforezi ile kontrol edilmesi. ***E22, E23, E16, E18.*** EEF1G geni hedeflenen klonlar. ***L20, L11, L9, L5.*** LSG1 geni hedeflenen klonlar.

EEF1G ve *LSG1* genlerinde oluşabilecek mutasyonları saptamak için bu genlere ait cDNA'lar ve genom DNA üzerinden bu genlere özgü hedef bölgeler özgün primerler kullanılarak PZR ile çoğaltıldı (**Şekil 61**).



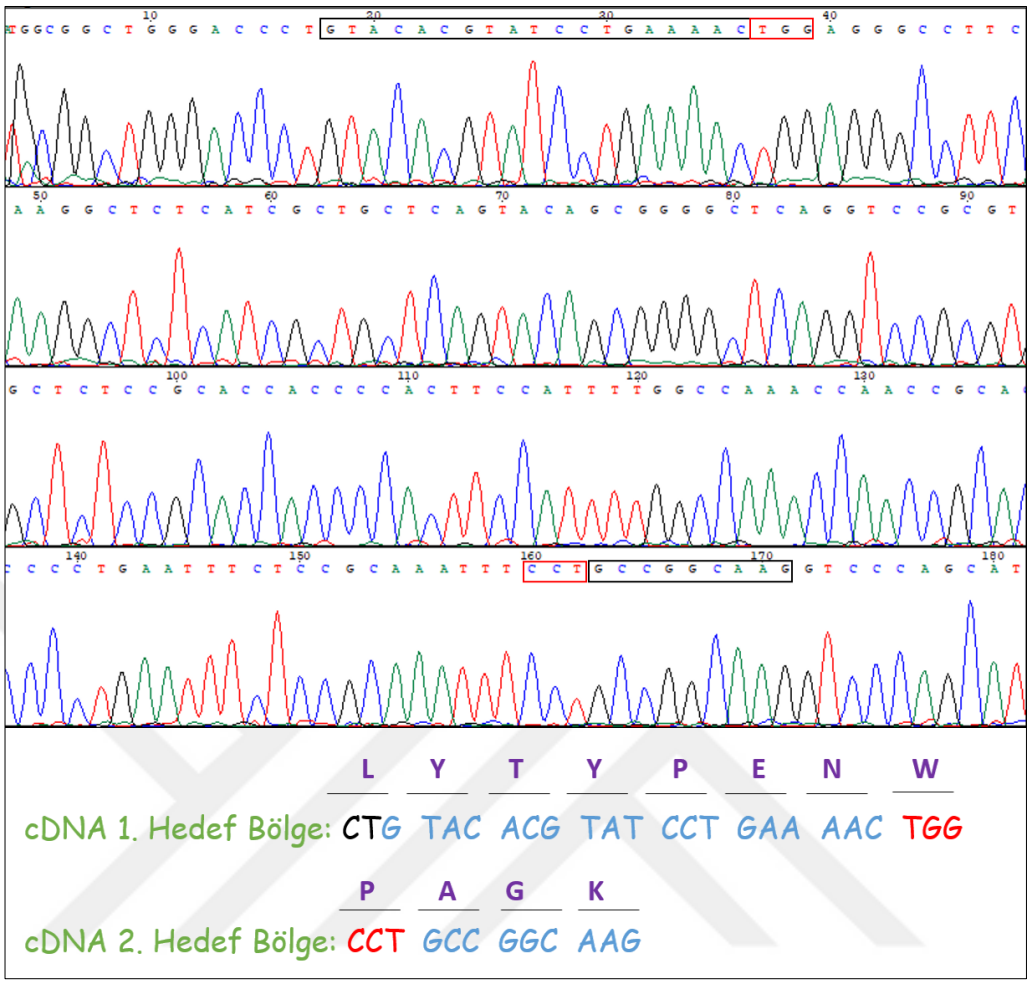
Şekil 61. Farklı klonlara ait *EEF1G* veya *LSG1* genlerinin PZR ile çoğaltılması. **A**. Total RNA'lar üzerinden yapılan ters-transkripsiyon sonrası genlere özgü cDNA'ların PZR ile çoğaltılması. PZR reaksiyonlarında dizileri Tablo 1'de verilen *EEF1G-For, EEF1G-Rev, LSG1-For* veya *LSG1-Rev* primerleri kullanıldı. **B**. Genomik DNA'lar üzerinden genlere özgü hedef bölgelerin PZR ile çoğaltılması. PZR reaksiyonlarında *EEF-gF, EEF-gR, LSG-gF1, LSG-gR1, LSG-gF2* veya *LSG-gR2* primerleri (Tablo 1) kullanıldı. Genlere özgü hedef bölgeler genom DNA'ları üzerinden ayrı ayrı çoğaltıldı. **M1**. 1 kb DNA Ladder (NEB, 3232S). **M2**. *Hind*III ve *Eco*RI enzimleri ile kesilen Lambda DNA'sı (λ DNA/*Hind*III+*Eco*RI).

PZR ile çoğaltılan cDNA'ların nükleotid dizileri belirlenerek genler üzerinde hedef alınan bölgeler mutasyonlar bakımından analiz edildi. *EEF1G ve LSG1* genleri üzerinde Cas9 enzimi ile kesim için her bir gende iki farklı bölge seçildi. Genler üzerinde hedef alınan bölgeler ve bu bölgelere ait nükleotid dizileri **Şekil 62**'de verildi.



Şekil 62. CRISPR/Cas9 tekniği aracılığıyla düzenlenmesi hedeflenen *EEF1G* ve *LSG1* genlerine ait hedef bölgelerin şematik gösterimi. **PAM**. Protoaralık bitişik motif dizisi *(İng. protospacer adjacent motif- PAM).*

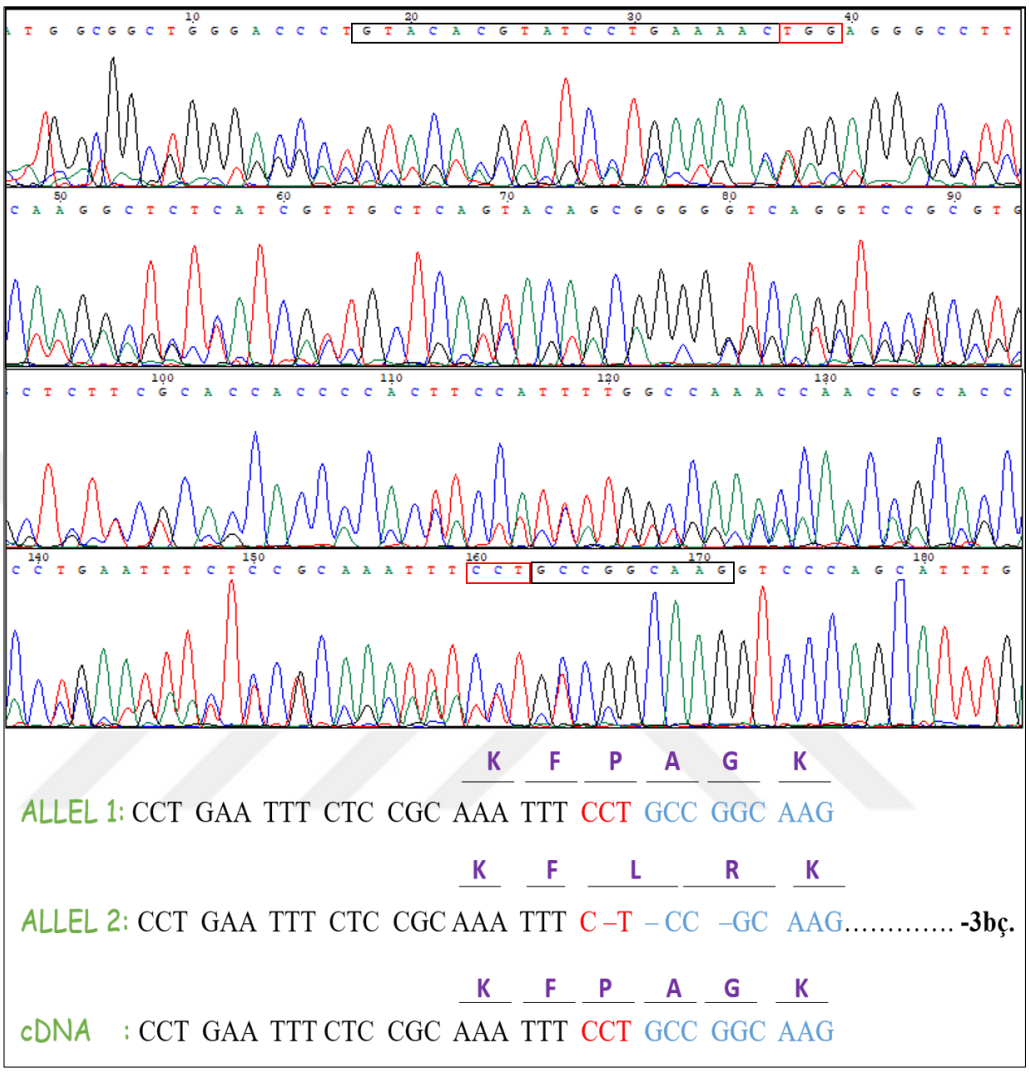
CRISPR/Cas9 plazmiti ile transfekte edilen hücrelerden *EEF1G* ve *LSG1* genleri için seçilen 10'ar klonda cDNA ve/veya genom DNA'sı üzerinde ilgili bölgelerin nükleotid dizileri belirlendi. Tek hücreden üretilen ve *EEF1G* geni hedeflenen 10 klondan dokuzunda EEF1G cDNA'sı (ya da genom üzerinde *EEF1G* gen dizisi) üzerinde mutasyon saptanamadı. Bu klonlara ait örneklerden sadece birine (***E8***-EEF1G) ait EEF1G cDNA dizileme sonucu **Şekil 63**'de verildi. *EEF1G* geni için analiz edilen, ***E22***-EEF1G olarak isimlendirilen bir klonda mutasyon belirlendi.



Şekil 63. *EEF1G* geni hedeflenen ***E8*** klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. Her iki hedef bölge dizisi ve PAM dizileri sekans üzerinde işaretlendi. cDNA dizisi referans alınarak ***E8*** klonunda meydana gelen mutasyonlar tespit edildi. Yapılan analizlere göre; *EEF1G* geni hedeflenen ***E8*** klonunda orjinal sekansın korunduğu görüldü.

E22-EEF1G klonunda mutasyon analizi hem cDNA hem de genom DNA'sı üzerinde gerçekleştirildi. Elde edilen diziler ve kromatogramlar orjinal diziler ile karşılaştırılarak mutasyon şekli belirlenmeye çalışıldı. **Şekil 64**'de ***E22***-EEF1G klonuna ait *EEF1G* geni cDNA'sı dizi analiz kromatogramları verildi. Kromatogram verileri, gen üzerinde hedef alınan ikinci bölgeden itibaren nükleotid dizisinde bir bozulma olduğunu ortaya koymaktadır. Bununla birlikte, hücrede EEF1G geni taşıyan iki DNA molekülünden birinin mutasyon sonucu düzenlenirken (allel 2), diğerinin

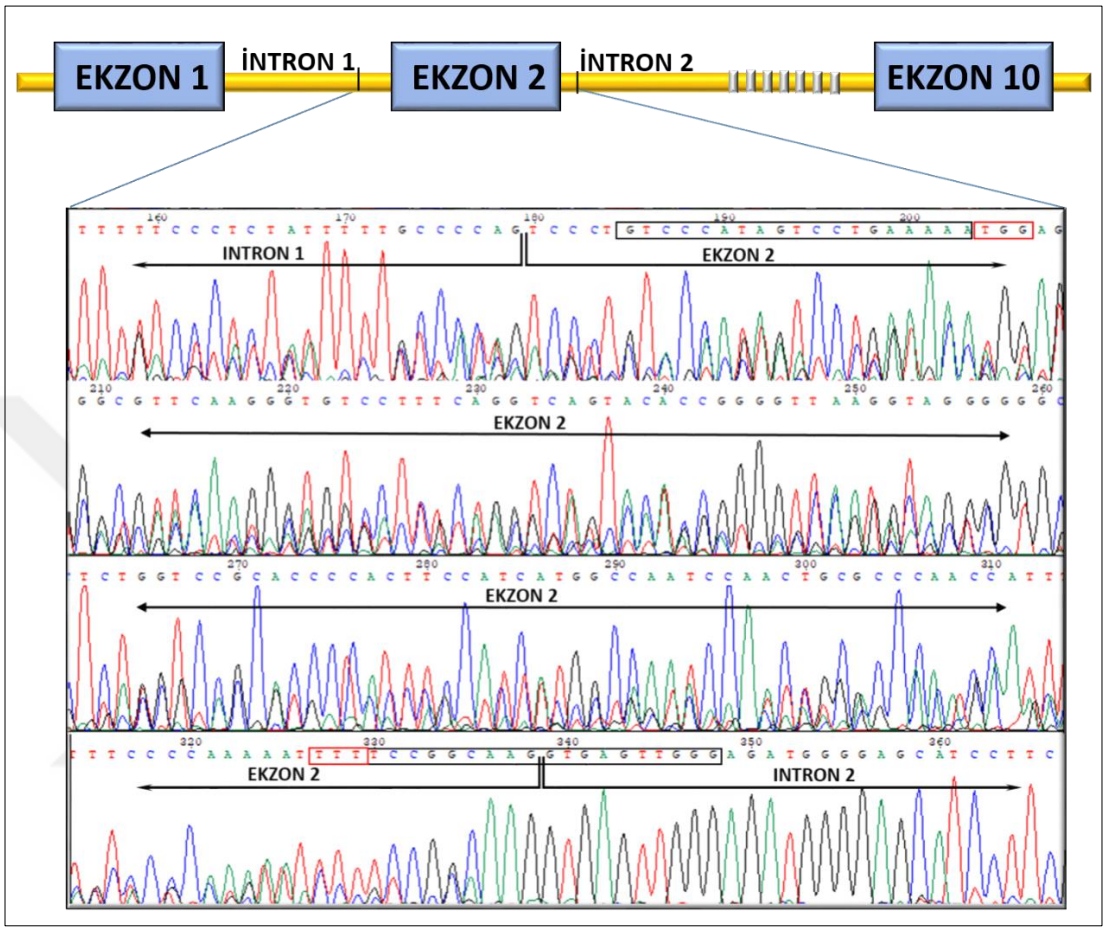
(allel 1) ise orjinal haline benzer şekilde bulunduğu ve düzenlenen allelin iç pikler halinde 2. hedef bölgede 3 nükleotid delesyona uğradığı tespit edildi.



Şekil 64. *EEF1G* geni hedeflenen ***E22*** klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. Her iki hedef bölge dizisi ve PAM dizileri sekans üzerinde işaretlendi. cDNA dizisi referans olarak kullanılarak ***E22*** klonunda meydana gelen mutasyonlar tespit edildi. Allellerden birinin (allel 1) orjinal diziyi verdiği, diğerinin (allel 2) ise 2. hedef bölgede 1 kodon delesyona uğradığı görüldü.

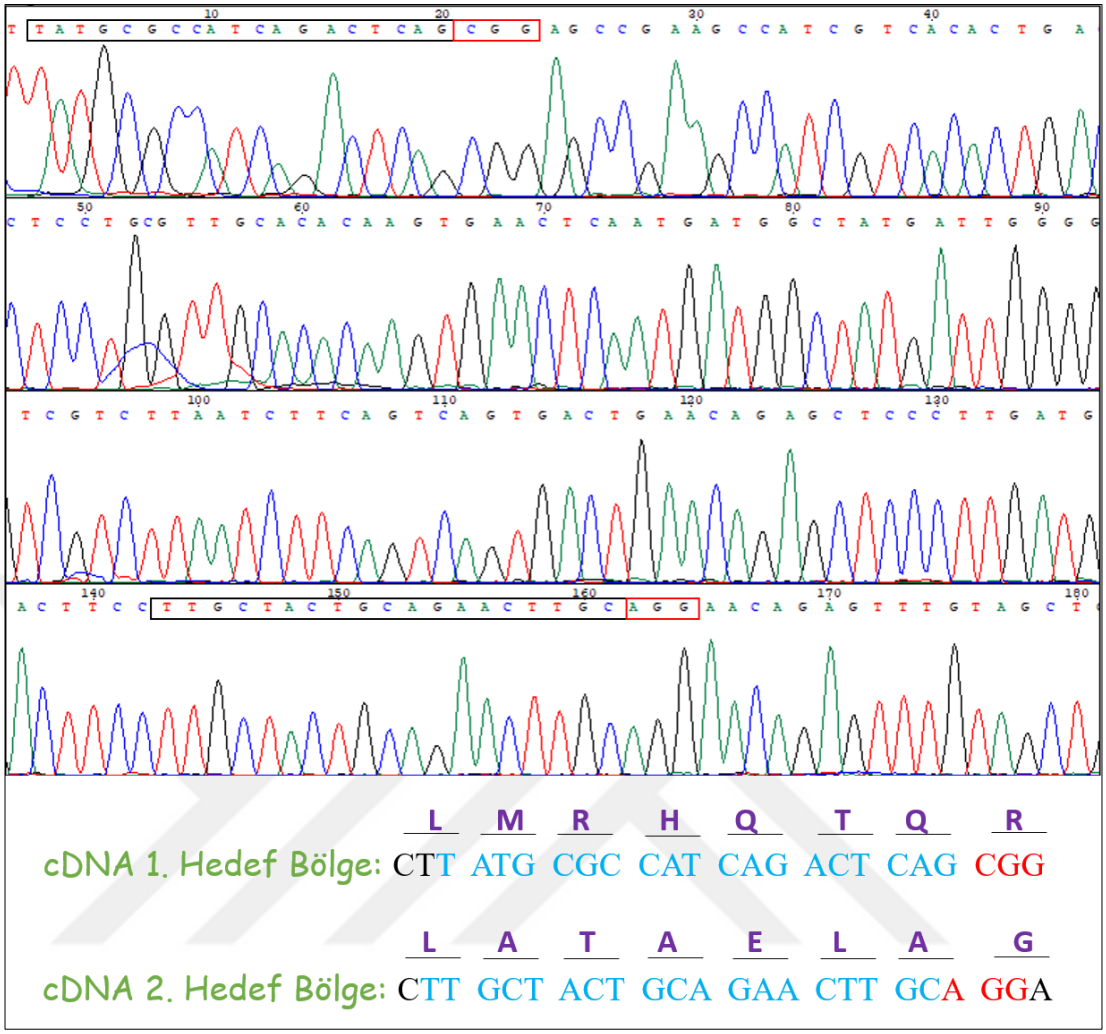
E22-EEF1G klonundaki mutasyon, genom DNA'sı üzerinden çoğaltılan hedef bölgelerinin DNA dizileri belirlenerek de değerlendirildi. Elde edilen DNA dizi analizi kromatogramı **Şekil 65**'de verildi. Genin 3'-bölgesinden 5'-bölgesine doğru nükleotid dizisi değerlendirildiğinde; Cas9 enzimi için seçilen ikinci hedef bölgeye kadar olan kısım için net tek tip nükleotid dizisi saptanırken, bu bölgeden sonra kromatogramda

karışmalar saptandı. Bu da beklenildiği gibi ***E22***-EEF1G klonunda *EEF1G* geninin homozigot halde mutasyona sahip olmadığını gösterdi.



Şekil 65. *EEF1G* geni hedeflenen ***E22*** klonunun genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları. Her iki hedef bölge dizisi ve PAM dizileri sekans üzerinde işaretlendi. 1. intron bölgesinden başlayarak 2. hedef bölgenin sonuna kadar sekansın bozulduğu ve PAM dizisi de dahil olmak hedef bölgelerde nükleotid dizilerinin değiştiği görüldü.

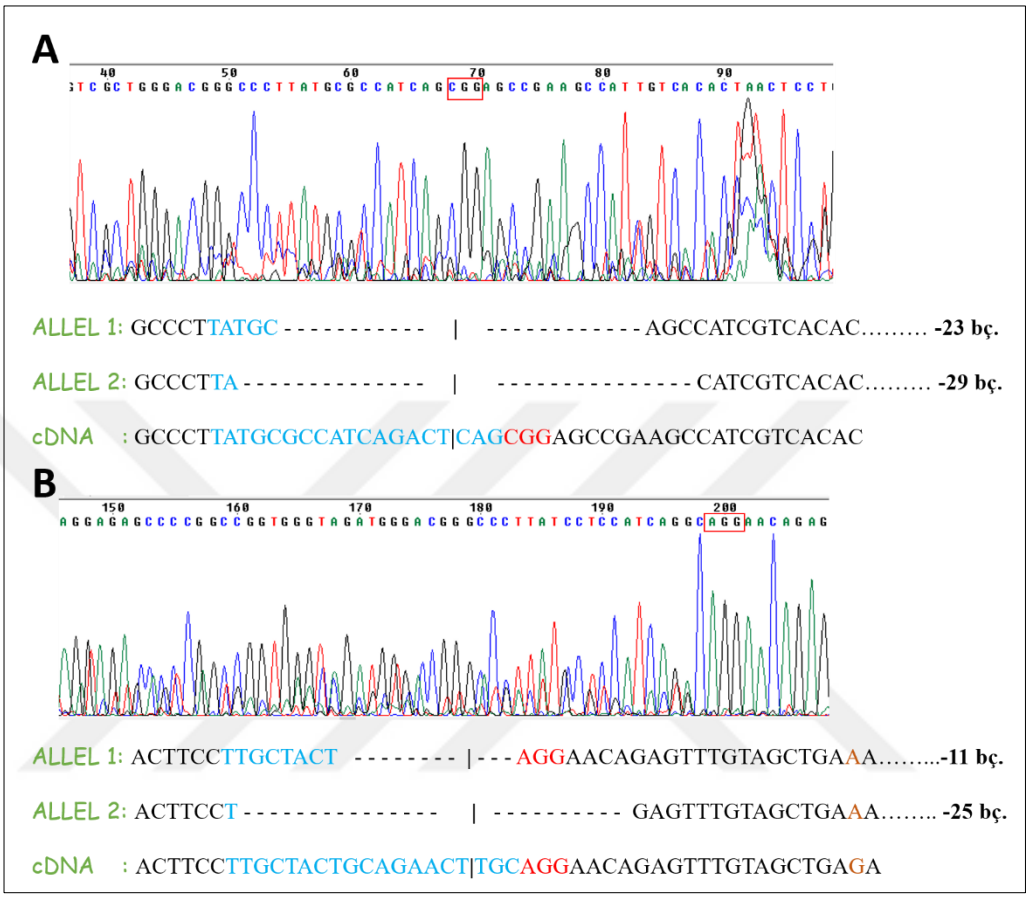
İnsan *LSG1* genini mutasyona uğratmak için CRISPR/Cas9 plazmiti ile transfekte edilen hücrelerden seçilen 10 klondan sadece iki klonda mutasyon belirlendi. Diğer klonlardan elde edilen cDNA ve/veya genom DNA üzerinden PZR ile çoğaltılan hedef bölgelerin dizi analizi sonuçları bu klonlarda mutasyon olmadığını gösterdi. *LSG1* geni mutasyonu taşımayan klonlardan birine ait (***L5***-LSG1) cDNA dizi analizi kromatogramı **Şekil 66**'da verildi.



Şekil 66. *LSG1* geni hedeflenen ***L5*** klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. Her iki hedef bölge dizisi ve PAM dizileri sekans üzerinde işaretlendi. cDNA dizisi referans alınarak ***L5*** klonunda meydana gelen mutasyonlar tespit edildi. Yapılan analizlere göre; *LSG1* geni hedeflenen ***L5*** klonunda orjinal sekansın korunduğu görüldü.

LSG1 geni mutasyonu saptanan klonlar ***L9***-LSG1 ve ***L11***-LSG1 olarak isimlendirildi. Bu klonlarda *LSG1* geni mutasyonu ayrıntılı olarak değerlendirildi. ***L9***-LSG1 klonu cDNA dizi analizi sonuçları, Cas9 enzimi için belirlenen her iki hedef bölgesini de kapsayacak şekilde orjinal dizide bozulma olduğunu gösterdi (**Şekil 67**). Heterozigot mutasyonlardan dolayı dizileme kromatogramlarında çakışan pikler "*Inference of CRISPR Edits-ICE*" (https://ice.synthego.com/, Erişim tarihi: 14.05.2021) programından yararlanılarak çözümlendi. Elde edilen veriler; ***L9***-LSG1 klonunda LSG1 allellerinin Cas9 enzimi kesimi sonrasında farklı şekillerde onarıldığı;

allel genlerde birinci hedef bölgesinde 23 ve 29 baz çifti, ikinci bölgede ise 11 ve 25 baz çifti delesyonu olduğu sonucunu gösterdi (**Şekil 67**).



Şekil 67. *LSG1* geni hedeflenen ***L9***-LSG1 klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. **A**. ***L9*** klonuna ait *LSG1* geni **1. hedef** bölgesi DNA dizi analizi. **B**. ***L9*** klonuna ait *LSG1* geni **2. hedef** bölgesi DNA dizi analizi. Her iki hedef bölgenin PAM (NGG) dizisi sekans üzerinde işaretlenerek gösterildi. cDNA dizisi referans olarak kullanılarak ***L9*** klonunda meydana gelen mutasyonlar tespit edildi. Cas9 enziminin hedef dizilerdeki kesim noktaları dikey çizgiler ile gösterildi.

L9-LSG1 klonunda *LSG1* geninde oluşan mutasyonlar, genomik DNA üzerinden yapılan dizi analizleri ile her bir hedef bölge için ayrı ayrı incelendi. *LSG1* geni için seçilen 1. hedef bölge genomik DNA üzerinde kodlayıcı olmayan 5'-bölgesinde (5'-UTR) ve 1. intron bölgeleri arasında kalan 1. ekzon bölgesinde yer almaktadır. Birinci hedef bölge için elde edilen dizi analizi verilere göre; ***L9***-LSG1 klonunda *LSG1* geninin 5'-UTR bölgesinden başlayarak hedef bölgenin sonuna kadar

nükleotid diziliminin bozulduğu görüldü. Dolayısıyla 1.hedef bölgede CRISPR/Cas9 sistemi aracılığıyla *LSG1* geninin kodlanmayan bölgelerinde de genom düzenlenmesinin gerçekleştiği sonucuna varıldı (**Şekil 68**).



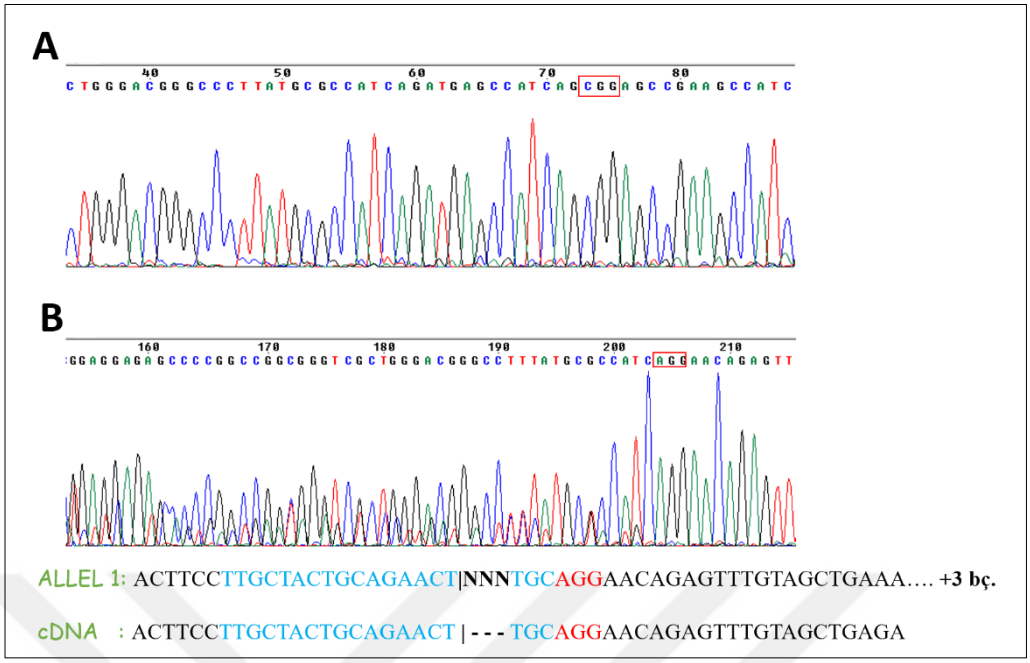
Şekil 68. *LSG1* geni hedeflenen ***L9***-LSG1 klonunun **1. hedef** bölgesine ait genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve modifikasyonların tespiti. Hedef bölge PAM dizisi sekans üzerinde işaretlenerek gösterildi. Yapılan analiz sonucu ile genin kodlayıcı olmayan 5'-UTR bölgesinde de düzenlendiği görüldü.

LSG1 geni için seçilen 2. hedef bölge genomik DNA üzerinde 2. ekzon bölgesinde yer almaktadır. ***L9***-LSG1 klonunun 2. hedef bölgesi için genomik DNA üzerinden yapılan dizi analizi verilerine göre, genin 2. ekzon ve 2. intron sınırından dizilenen bölgenin sonuna kadar devam eden çakışık çoklu sekanslar tespit edildi (**Şekil 69**). Bu sonuç ***L9***-LSG1 klonu hücrelerinde *LSG1* geninin kodlayıcı olmayan bölgesinde de mutasyona uğradığını gösterdi.



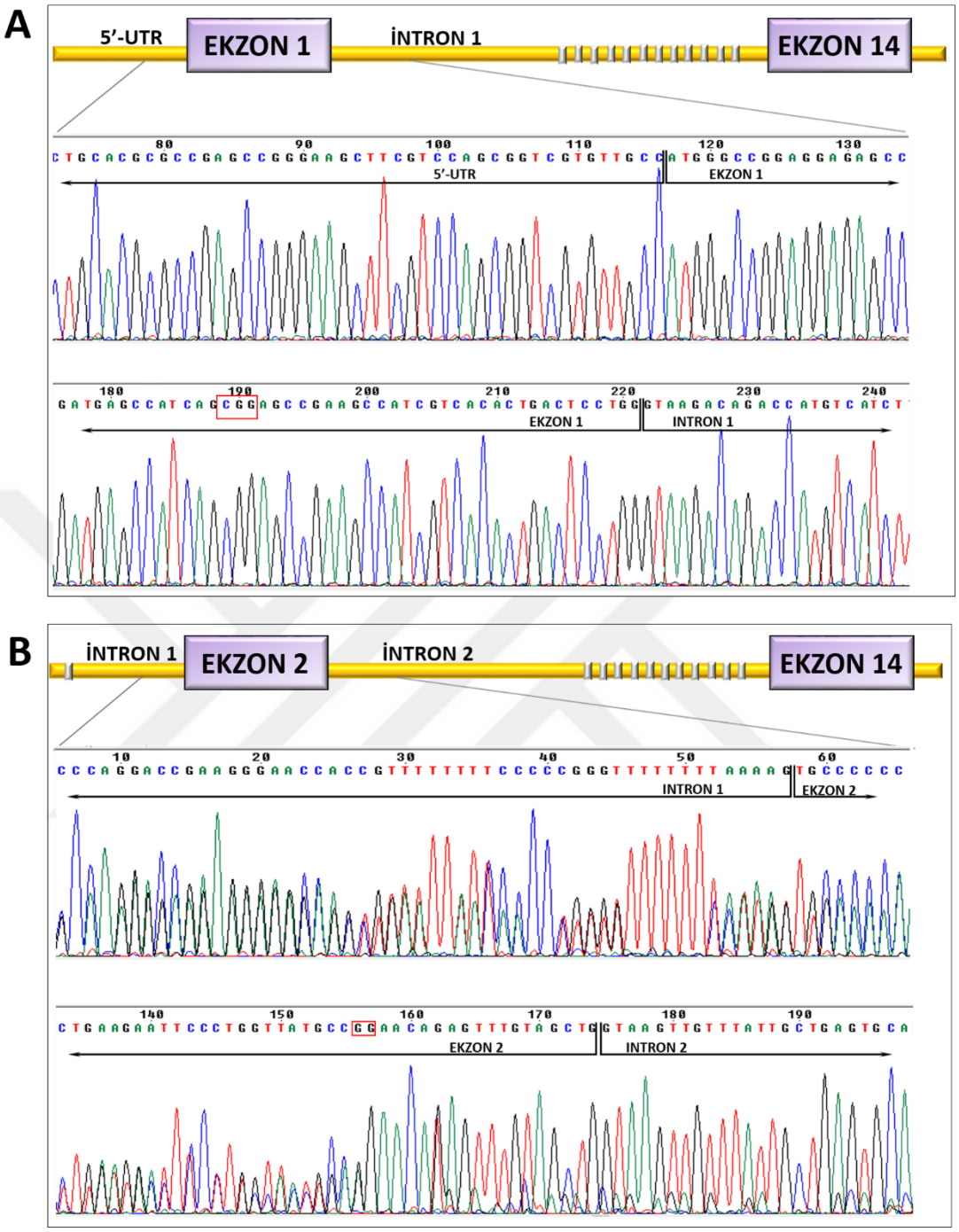
Şekil 69. *LSG1* geni hedeflenen ***L9***-LSG1 klonunun **2. hedef bölgesi**ne ait genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve modifikasyonların tespiti. Hedef bölge PAM dizisi sekans üzerinde işaretlendi. Yapılan analiz sonucunda genin kodlayıcı olmayan 2. intron bölgesinde de düzenlendiği görüldü.

LSG1 geninde mutasyon saptanan HeLa ***L11***-LSG1 klonunda da Cas9 enzimi için hedef alınan iki bölge hem cDNA hemde genom üzerinden dizileme yapılarak analiz edildi. ***L11***-LSG1 klonundan elde edilen LSG1 cDNA dizi analizi sonuçları gen üzerinde hedef alınan 1.bölgede bir mutasyon olmadığını gösterdi (**Şekil 70A**). Buna karşın "*Inference of CRISPR Edits-ICE*" programı ile yapılan değerlendirme ile elde edilen veriler *LSG1* geninde 2. hedef bölgede allellerin birbirinden farklı şekilde onarıldığını; allellerden birinde 3 nükleotid insertsiyonu olduğunu gösterdi (**Şekil 70B**). Mutant ***L11***-*LSG1* klonunda 2. hedef bölgesinde üç nükleotidin eklenmesi gen çerçevesinde bir kayma olmaksızın proteinin yapısına bir amino asitin eklenmesi anlamına gelmektedir. Dolayısıyla bu gen üzerinden kodlanan LSG1 proteininin işlevsel özelliğini koruyor olma olasılığı yüksektir.



Şekil 70. *LSG1* geni hedeflenen ***L11***-*LSG1* klonunun cDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve mutasyonların tespiti. **A**. ***L11*** klonuna ait *LSG1* geni **1. hedef** bölgesi DNA dizi analizi. **B**. ***L11*** klonuna ait LSG1 geni **2. hedef** bölgesi DNA dizi analizi. Her iki hedef bölge PAM dizisi sekans üzerinde işaretlendi. cDNA dizisi referans olarak kullanılarak ***L11*** klonunda meydana gelen mutasyonlar tespit edildi. Cas9 enziminin hedef dizilerdeki kesim noktaları dikey çizgiler ile gösterildi.

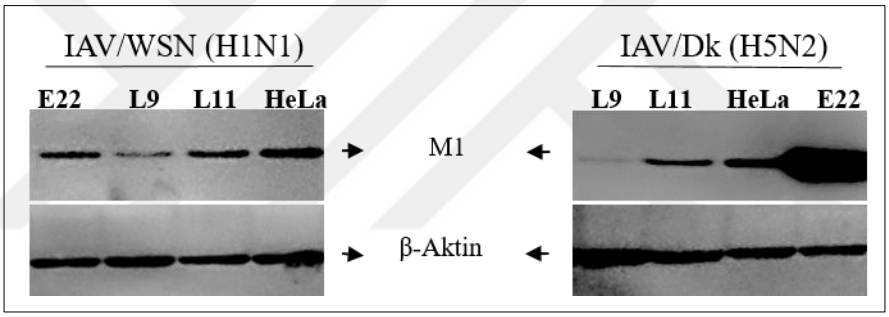
L11-LSG1 klonu cDNA'ları üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları, genom DNA'sı üzerinden yapılan dizi analizleri ile doğrulanmıştır. Genom DNA üzerinden *LSG1* geni için belirlenen 1. bölgeyi kapsayacak şekilde PZR ile çoğaltılan DNA fragmenti dizi analizi sonucunda, çakışık diziler içermeyen düzgün piklerden oluşan kromatogram elde edilmiştir (**Şekil 71A**). Buna karşın Cas9 enzimi kesimi için belirlenen 2. bölgenin DNA dizi analizi sonuçlarına göre, bu bölgede hatalı onarıma bağlı olarak orjinal gen diziliminde bozulma olduğu saptanmıştır (**Şekil 71B**).



Şekil 71. *LSG1* geni hedeflenen ***L11*** klonuna ait genomik DNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları ve modifikasyonların tespiti. **Şekil 71A.** ***L11***-LSG1 klonunun **1. hedef bölgesi**ne ait gDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları. Yapılan analiz sonucunda genin kodlayıcı olmayan bölgelerinde orjinal sekansın korunduğu görüldü. **Şekil 71B.** ***L11***-LSG1 klonunun **2. hedef bölgesi**ne ait gDNA üzerinden yapılan DNA dizi analizi sonuçları. Yapılan analiz sonucu ile genin kodlayıcı olmayan 1. intron bölgesinde de düzenlendiği görüldü. Hedef bölgelere ait PAM dizileri sekans üzerinde işaretlendi.

6.13. CRISPR/Cas9 Tekniği ile İnsan *EEF1G* ve *LSG1* Genleri Değiştirilen Hücrelerde İnfluenza A Virüsü Replikasyonunun Seyri ile İlgili Veriler

CRISPR/Cas9 tekniği kullanılarak *EEF1G* ve *LSG1* genlerinde oluşturulan mutasyonların viral replikasyon açısından anlamlı olup olmadığı, mutasyon saptanan HeLa hücre klonlarının virüsler ile enfekte edilmesi ve viral replikasyonun izlenmesi ile araştırıldı. Bunun için ***E22***-EEF1G, ***L9***-LSG1 ve ***L11***-LSG1 hücre klonları influenza A (WSN) ve influenza A (DkPen) virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 10 saat sonra hücreler SDS-örnek yükleme tamponunda parçalandı ve lizatlarda viral M1 proteini ve aktin beta protein miktarları Western melezleme tekniği ile belirlendi. Sonuçlar, virüsler ile enfekte edilen HeLa hücreleri ve mutant hücrelerde viral M1 proteinleri ve hücresel aktin beta protein miktarları karşılaştırılarak değerlendirildi. Elde edilen bulgular **Şekil 72**'de verildi.



Şekil 72. CRISPR/Cas9 tekniği aracılığıyla oluşturulan EEF1G ve LSG1 proteinleri bakımından mutant HeLa hücrelerinin influenza A/WSN/33-H1N1 ve A/Duck/Pen-H5N2 virüsleri ile enfeksiyonu sonrası viral replikasyonun Western melezleme tekniği ile analizi. **E22**. *EEF1G* geni bakımından mutant hücre klonu. **L9, L11**. *LSG1* geni bakımından mutant hücre klonları. **HeLa**. *Knock out* mekanizmalarının kullanılmadığı enfekte edilen kontrol hücre grubu.

Şekil 72'de verilen sonuçlar değerlendirildiğinde; enfekte *EEF1G* geni mutasyona uğratılan ***E22***- EEF1G hücrelerinde influenza A (WSN) virüsü M1 protein miktarının kontrol HeLa hücrelerine yakın düzeyde olduğu, buna karşın influenza A (DkPen) virüsü M1 protein miktarının ise kontrol grubu hücrelerine kıyasla çok daha yüksek düzeyde olduğu görüldü. Bu sonuç; DkPen tipi influenza A virüslerinin EEF1G proteinlerine karşı daha duyarlı olduğunu ve viral replikasyonunu negatif yönde etkilediğini düşündürdü. Bu hücrelerde *EEF1G* geninde mutasyonlar

saptanmakla birlikte, bu gen üzerinden kodlanan doğal EEF1G proteinine karşı antikorumuz bulunmadığından enfekte hücrelerde bu proteinin ekspresyonu hakkında veri elde edilemedi. İnfluenza A virüsleri ile enfekte edilen *LSG1* geni bakımından mutasyonlu ***L9***-LSG1 ve ***L11***-LSG1 hücre konlarında farklı sonuçlar alındı. İki farklı virüs tipi ile enfekte edilen ***L11***-LSG1 hücrelerinde viral M1 protein miktarının kontrol hücrelerindeki miktarlarına yakın düzeylerde olduğu saptandı. Buna karşın virüs ile enfekte edilen ***L9***-LSG1 hücre klonunda viral M1 protein miktarlarının kontrol hücrelerindeki miktarlara oranla çok daha düşük düzeylerde olduğu görüldü (**Şekil 72**). İki farklı LSG1 mutantı hücre klonunda viral replikasyonun farklı düzeylerde gerçekleşmesinin mutasyonun farklı şekillerde gerçekleşmiş olmasından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Diğer taraftan, ***L9***-LSG1 mutant hücrelerde viral replikasyonun kontrol hücrelerine oranla daha düşük düzeyde seyretmesi, LSG1 proteinlerinin influenza A virüs replikasyonunu pozitif yönde etkilediği sonucunu vermektedir.

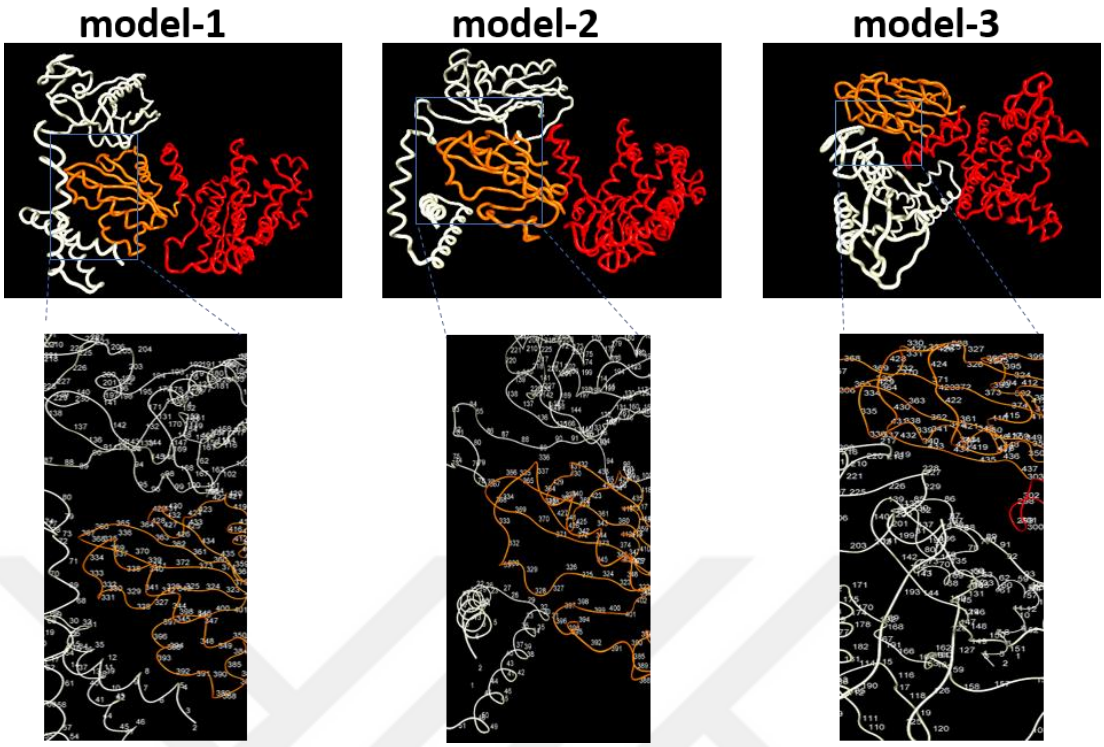
6.14. İnfluenza A Virüsü NS1 Proteini ile Konak Proteinleri Arasındaki Etkileşimlerin *in siliko* Analizine İlişkin Veriler

Proteinlerin işlevlerini ve farklı proteinler arasındaki etkileşimleri saptamak için, *in vivo*, *in vitro* ve *in siliko* temelinde farklı teknikler kullanılmaktadır. Son yıllarda proteinlerin üç boyutlu yapıları ile ilgili artan veriler ve proteinlerin üç boyutlu yapılarını teorik olarak belirlemeye yönelik geliştirilen programlar; proteinlerin üç boyutlu yapılarını ve farklı proteinler arasındaki olası etkileşimleri saptamaya yönelik *in siliko* yöntemleri ön plana çıkartmıştır.

In siliko yöntemler, teknolojik gelişmelerle birlikte bilgisayar ortamında simülasyonlar ile gerçekleştirilen çalışmaları ifade etmektedir. Bir moleküler modelleme yöntemi olan *doking;* bilgisayar ortamında belirlenen ya da X-ışını kristallografi çalışmaları ile oluşturulmuş proteinlerin üç boyutlu modelleri arasında kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kararlı bir kompleks oluşumlarını, moleküllerin uzayda tercih ettikleri pozisyonları, bağlanma afinitelerini ve bu bağlanmada etkili olan amino asitleri tahmin etmede kullanılan yöntemdir (Trott ve Olson, 2010). Moleküler *doking* yöntemi ile elde edilen enzim-substrat, ilaç-protein,

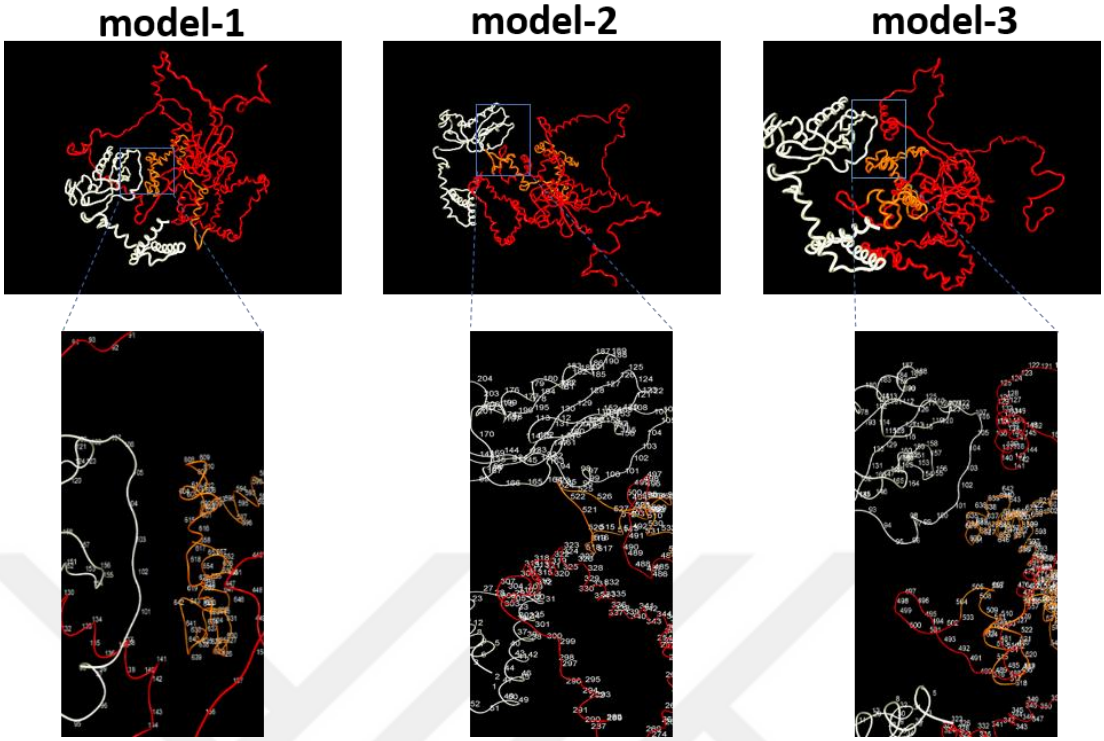
ilaç-nükleik asit, protein-nükleik asit ve protein-protein etkileşimlerini içeren *in siliko* analiz verileri birçok biyolojik mekanizmanın anlaşılmasında önemli rol oynamaktadır (Huang ve Zou, 2010). Tez çalışmamın bu aşamasında influenza A virüsü NS1 proteini ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinleri arasındaki etkileşimler *in siliko* modelleme çalışmaları ile değerlendirilmiştir. Biyoinformatik araçlar kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalarda, NS1, EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin üç boyutlu modelleri protein veri bankalarında belirlenemediği için çevrim içi erişim ile I-TASSER algoritması (https://zhanglab.dcmb.med.umich.edu/I-TASSER/, Erişim tarihi: 14.05.2021) kullanılarak bu proteinlerin pdb formatında (*İng. Protein Data Bank, pdb*) olası üç boyutlu yapıları belirlenmiştir (Roy ve ark., 2010). Yine çevrim içi erişim ile pyDOCK moleküler *doking* programı (https://life.bsc.es/pid/pydock/, Erişim tarihi: 14.05.2021) kullanılarak protein modellemeleri arasında serbest bağlanma enerjilerine göre en yüksek bağlanma afinitesini gösteren etkileşim modelleri saptanmıştır (Jimenez-Garcia ve ark., 2013). Son olarak, protein etkileşim alanlarının hesaplamalı analizi, bir diğer moleküler modelleme programı olan VegaZZ programı ile gerçekleştirilmiştir (Pedretti ve ark, 2002). İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini için belirlenen olasılığı en yüksek olan üç boyutlu bir model ile EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinden her biri için belirlenen üç farklı model arasındaki olası etkileşimler belirlenmiştir (**Şekil 73-75**).

İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile 438 amino asit bakiyesinden oluşan insan EEF1G proteini arasındaki olası interaksiyon modellerinin analizinde, EEF1G proteini karboksi terminal bölgesinin viral NS1 proteini ile bağlanmada önemli olduğu görüldü. Elde edilen bu veri, NS1 proteini ile EEF1G proteini arasındaki fiziksel etkileşimin, EEF1G proteininin C-terminal bölgesinde son 121 amino asit bakiyesi aracılığıyla ile gerçekleştiğini (Bkz. 6.1, **Şekil 19**) ortaya koyan maya ikili-hibrit çalışması sonuçlarını destekler niteliktedir (**Şekil 73**).



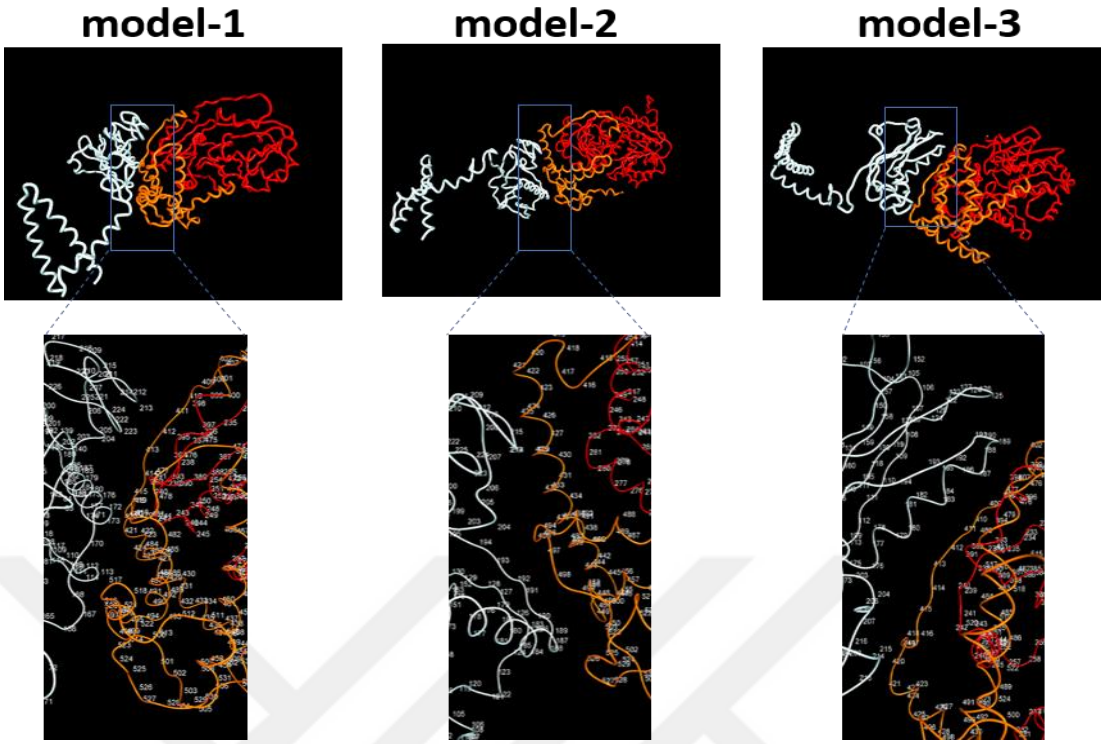
Şekil 73. İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile insan EEF1G proteini arasındaki etkileşimlerin in siliko analiz ile modellenmesi. Analizlerde modelleme sonuçlarından en düşük bağlanma enerjisine sahip olan üç interaksiyon modeli seçildi (Modellere ait serbest bağlanma enerjileri (ΔG): -53.066 (model 1), -51.836 (model 2), -48.641 (model 3)). Viral NS1 proteini beyaz renkli, EEF1G proteini kırmızı ve turuncu renkli olarak gösterildi. Alt panelde NS1 proteini ile EEF1G proteinleri için tahmin edilen interaksiyon bölgesinin numaralandırılmış amino asit bakiyeleri ile büyütülmüş formu verildi. Modelleme çalışmalarının analizinde VegaZZ programı kullanıldı.

İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile 659 amino asit bakiyesinden oluşan insan LSG1 proteini arasındaki olası interaksiyon modellerinin analizinde, LSG1 proteininin farklı bölgelerindeki amino asit bakiyeleri ile viral NS1 proteinine bağlanabildiği görüldü. Elde edilen bu veri, LSG1 proteininin 504. ve 643. amino asit bakiyeleri arasında (139 amino asitten oluşan bölge) NS1 proteini ile fiziksel etkileşim halinde bulunduğu (Bkz. 6.1, **Şekil 20**) sonucuna varılan maya ikili-hibrit verilerini kısmen doğrulamaktadır (**Şekil 74**).



Şekil 74. İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile insan LSG1 proteini arasındaki etkileşimlerin in siliko analiz ile modellenmesi. Analizlerde modelleme sonuçlarından en düşük bağlanma enerjisine sahip olan üç interaksiyon modeli seçildi (Modellere ait serbest bağlanma enerjileri (ΔG): -59.529 (model 1), -54.974 (model 2), -54.848 (model 3)). Viral NS1 proteini beyaz renkli, LSG1 proteini kırmızı ve turuncu renkli olarak gösterildi. Alt panelde NS1 proteini ile LSG1 proteinleri için tahmin edilen interaksiyon bölgesinin numaralandırılmış amino asit bakiyeleri ile büyütülmüş formu verildi. Modelleme çalışmalarının analizinde VegaZZ programı kullanıldı.

İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile insan DDX56 proteini arasındaki tahmini interaksiyon modellerinin analizinde ise; DDX56 proteininin karboksi terminal bölgesi aracılığıyla viral NS1 proteinine bağlandığı görüldü. Elde edilen bu veri, sözkonusu etkileşimlerin NS1 proteini ile DDX56 proteininin son 141 amino asit bakiyesi aracılığıyla gerçekleştiğini gösteren (Bkz. 6.1, **Şekil 21**) maya ikili-hibrit çalışması sonuçlarını desteklemektedir (**Şekil 75**).



Şekil 75. İnfluenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile insan DDX56 proteini arasındaki etkileşimlerin in siliko analizle ile modellenmesi. Analizlerde modelleme sonuçlarından en düşük bağlanma enerjisine sahip olan üç interaksiyon modeli seçildi (Modellere ait serbest bağlanma enerjileri (ΔG): -56.267 (model 1), -50.429 (model 2), -47.185 (model 3)). Viral NS1 proteini beyaz renkli, DDX56 proteini kırmızı ve turuncu renkli olarak gösterildi. Alt panelde NS1 proteini ile DDX56 proteinleri için tahmin edilen interaksiyon bölgesinin numaralandırılmış amino asit bakiyeleri ile büyütülmüş formu verildi. Modelleme çalışmalarının analizinde VegaZZ programı kullanıldı.

7. TARTIŞMA ve SONUÇ

İnfluenza A virüsleri, genetik değişime uğramaları, geniş konak çeşitliliğine sahip olmaları, epidemilere ve yüksek morbidite veya mortalite ile sonuçlanan pandemilere yol açmaları sebebiyle geçmişten günümüze kadar güncelliklerini korumuşlardır. Bu virüsler, her yıl yaşanan mevsimsel gribin etkeni olmalarının yanı sıra tarihsel süreç içinde çok sayıda pandemilere de neden olmuşlardır. 2009 yılında yaşanan pandeminin etkeni domuz kaynaklı influenza A (H1N1) virüsleridir. İnfluenza A virüsleri dışında halk sağlığını derinden etkileyen ve pandemilere neden olan başka virüslerin de ortaya çıkabileceği yaşanan SARS-CoV2 pandemisi ile anlaşılmıştır. 2019 yılı Aralık ayında Çin'in Wuhan şehrinde ortaya çıkan *Coronoviridae* ailesi üyesi ve RNA genomu taşıyan SARS-CoV2 virüsü, geçirdiği mutasyon sonucunda insandan insana çok kolay bir şekilde bulaşabilme özelliği kazanarak yüksek oranda ölümler ile sonuçlanan büyük bir pandemiye neden olmuştur. DSÖ'nün verilerine göre dünyada SARS-CoV2 virüsünün neden olduğu COVID-19 vaka sayısı 160 milyon 686 bin 749, hayatını kaybedenlerin sayısı ise 3 milyon 335 bin 948 olarak açıklanmıştır (https://covid19.who.int/, Erişim tarihi: 14.05.2021). Ulaşımın çok kolaylaştığı ve insanların yoğun bir temas içerisinde olduğu günümüzde özellikle virüs kaynaklı hastalıklar çok daha kolay ve hızlı bir şekilde yayılmaktadır. Bu nedenle çok büyük bir çeşitlilik gösteren ve SARS virüslerine oranla genetik yapısı çok daha hızlı değişen influenza A virüslerinin yeni pandemilere neden olma potansiyeli çok yüksektir.

İnfluenza A virüslerine karşı vücudumuz, virüsün solunum yoluyla girişinden itibaren başta mukoza ve mukozal sekresyonlar olmak üzere hem doğal hem de kazanılmış bağışıklık mekanizmalarını devreye sokarak kendini korumaya alır (Semkow ve ark., 1982). Bununla birlikte, influenza A virüsleri, minör ve majör antijenik yapı değişimleri ile vücudun savunma mekanizmalarını aşabilmektedir (Nakajima, 2003). Bu durum önemli sağlık sorunlarına neden olmaktadır. Virüslerde meydana gelen bu değişimler, sadece vücudun savunma mekanizmalarını değil aynı zamanda mevcut korunma-tedavi yöntemleri olan aşıların ve anti-virallerin de etkinliklerini önemli ölçüde azaltmaktadır.

İnfluenza A virüslerine karşı konak hücreler en güçlü savunma mekanizması olarak doğal bağışıklık sistemini harekete geçirirler. Sitokin sınıfı içinde yer alan glikoprotein yapılı interferonlar doğal bağışıklık sisteminin en önemli bileşenlerinden biridir (Katze ve ark., 2002). Viral sensörler tarafından viral komponentlerin algılanmasının ardından; interferonlar enfekte hücrede veya interferon reseptörleri taşıyan komşu hücrelerde çeşitli savunma mekanizmalarını harekete geçirerek patojenlerin yayılmasını engeller (Isaacs ve Lindenmann, 1957). Buna karşın influenza A virüsleri de hücresel savunma mekanizmalarını aşmak veya etkisiz hale getirmek için bazı mekanizmalar geliştirmektedir. İnfluenza A virüsü genomunun en küçük parçası olan sekizinci RNA segmenti üzerinden kodlanan ve bu tez çalışmasına konu olan NS1 proteini konak hücrelerin interferon savunma mekanizmasının zayıflatılmasında çok önemli bir rol üstlenir (Krug, 2015).

Virüsler çoğalabilmek için konak hücrenin biyosentez mekanizmalarını kullanmaktadır. Bunun bir sonucu olarak da hücreye girişin ilk basamağı olan adsorpsiyon aşamasından yeni virüs partiküllerinin serbestleşmesine kadar geçen replikasyon döngüsü boyunca viral genom üzerinden kodlanan proteinlerin birçok konak hücre proteini ile etkileşim halinde olması kaçınılmaz bir durumdur. Bu açıdan bakıldığında, viral enfeksiyonun erken evresinde çok miktarda sentezlenen ve interferon antagonisti olan NS1 proteini ile ilişkili hücresel proteinlerin tanımlanması influenza virüsleri ile mücadelede yeni yaklaşımların ortaya konması bakımından büyük önem taşımaktadır. Yapılan çalışmalarla NS1 proteini ve bu proteinin ilişkili olduğu bazı hücresel proteinlerin de yer aldığı, virüs replikasyonunu pozitif yönde etkileyen hücresel metabolik yolaklar tanımlanmıştır. Virüs tipine bağlı olarak 230 veya 237 amino asitten oluşan influenza A virüsü NS1 proteini yapısında taşıdığı fonksiyonel bölgeler aracılığıyla bazı hücresel proteinler ile direkt olarak etkileşim göstermektedir. Örneğin, NS1 proteinin 123-127 amino asit bakiyeleri aracılığıyla interferon uyarısı sonucunda hücrelerde sentez edilen anti-viral proteinlerden RNA bağımlı protein kinaz enzimine (PKR) bağlanarak enzim aktivitesini bloke ettiği bilinmektedir (Min ve ark., 2007). Benzer şekilde NS1 proteini R38-K41 ve E96-E97 bakiyeleri de viral sensörlerden sitozolik reseptör NLRP3 inflamazom kompleksi ile direkt olarak interaksiyon göstererek inflamatuar yanıtlardan IL-1β sentezini baskılamaktadır (Moriyama ve ark., 2016).

Yapılan çalışmalarla NS1 proteini ve bazı hücresel proteinler ile ilgili önemli veriler sunulmuş olmakla birlikte influenza A virüsleri ile konak hücre metabolik yolakları arasındaki ilişkide aydınlatılmayı bekleyen çok sayıda bilinmeyen nokta vardır. Bu Doktora tez çalışması kapsamında da NS1 proteini ile ilişkili hücresel proteinlerin tanımlanması ve viral replikasyon üzerindeki etkilerinin saptanması amaçlanmıştır. Bu amaç doğrultusunda, maya ikili-hibrit metodu ile NS1 proteini ile ilişkisi saptanan bazı konak hücre proteinlerinin influeza A virüs replikasyonu açısından önemi araştırılmıştır.

İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkisi araştırılacak hücresel proteinler Yüksek lisans tez çalışmam kapsamında maya ikili-hibrit metodu kullanılarak tespit edilen proteinler arasından seçilmişlerdir. Hücrelerde proteinler arası etkileşimleri saptamak için kullanılan etkin yöntemlerden biri olan maya ikili-hibrit yöntemi, ilk kez 1989'da Field ve Song tarafından *S. cerevisiae* hücrelerinde SNF1 ve SNF4 proteinleri arasındaki ilişkiyi saptamak amacıyla geliştirilmiştir (Fields ve Song, 1989). GAL4 transkripsiyon aktivatörünün DNA'ya bağlanan ve transkripsiyonu aktive eden bölgelerinin modüler olma özelliği temeline kurulan bu yöntem ile proteinler arası etkileşimlerin saptanması ve proteinlerin işlevlerinin aydınlatılması çalışmaları yapılmıştır. Bu deneylerde maya GAL4 transkripsiyon aktivatörü bağlanma domaini (GAL4-BD) ile füzyon halinde sentezlenen insan tipi influenza A/WSN/1933 (H1N1) virüsü NS1 proteini ($NS1_W$) yem (bait) olarak kullanılarak, NS1 proteini ile ilişkili olması muhtemel konak proteinleri taranmıştır. Bunun için insan HEK293 hücrelerine ait proteinleri, GAL4 transkripsiyon aktivatörü aktivasyon domaini (GAL4-AD) ile füzyon halinde kodlayan, pACT2 plazmitine klonlanmış cDNA kitaplığı kullanılmıştır. Bu çalışmalarla elde edilen sonuçlar, ökaryotik translasyon uzama faktörü-1γ alt ünitesi (eEF-1γ: eukaryotic translation elongation factor 1 gamma), 60S ribozomal alt ünitesi nukleer çıkış GTPaz1 (LSG1: Large 60S subunit nuclear export GTPase1) ve ATP- bağımlı RNA Helikaz 56 (DDX56: DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box -ATP dependent -RNA helicase) proteinlerinin de içinde bulunduğu bazı hücresel proteinlerin influenza A virüsü $NS1_W$ proteini ile *S. cerevisiae* PJ69-4A maya hücrelerinde etkileşim gösterdiklerini ortaya koydu (Pirinçal, 2014) (**Şekil 19-21**).

İnfluenza A virüsleri antijenik sürüklenme ve kaymalar ile genetik yapısını sürekli olarak değiştirmektedir. Dolayısıyla gerek aynı konak organizmayı enfekte eden virüsler arasında gerekse farklı konak organizmalarda enfeksiyon yapan influenza A virüsleri arasında genetik varyasyonlar gözlenmektedir (Macken ve ark., 2006). Bu varyasyonlar, virüsün konak özgüllüğü açısından son derece önemli olan HA yüzey antijen proteini başta olmak üzere viral genom üzerinden kodlanan tüm proteinler için de geçerlidir ve çoğu zaman viral patogenez açısından önemlidir. Örneğin insanlarda ve kuşlarda enfeksiyon yapan virüslere ait NS1 cDNA'ları ve proteinleri karşılaştırıldığında; influenza A/WSN/1933 (H1N1) $NS1_W$ cDNA'sı ve influenza A/Duck/Pen (H5N2) $NS1_D$ cDNA'sı arasında nükleotid düzeyinde yaklaşık %30 oranında, insan ve kuş tipi *NS1* genleri üzerinden kodlanan proteinlerde ($NS1_W$, $NS1_D$) ise amino asit kompozisyonu düzeyinde yaklaşık %34 oranında farklılık bulunmaktadır. Bu farklılıklar göz önünde bulundurularak tez çalışması kapsamında EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri, insan ve/veya kuş tipi influenza A virüsü NS1 proteinleri ile ilişkileri ve virüs tipine bağlı olarak viral replikasyon üzerindeki etkileri açısından değerlendirildi.

Maya hücreleri ile yapılan deneylerde transkripsiyon aktivatörü aktivasyon bölgesi ile füzyon halindeki cDNA'ların genellikle ilgili genin tam dizisini kapsamaması nedeniyle elde edilen sonuçlarda da EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin sadece karboksi-terminal bölgelerinin NS1 proteini ile etkileşim halinde oldukları görüldü. Bu sebeple Doktora tez çalışmasının ilk aşamasında maya hücrelerinde tam boyuttaki EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin NS1 proteini ile ilişkileri ikili-hibrit metodu ile incelendi. Bunun için *S. cerevisiae* PJ69-4A maya hücreleri önce GAL4-BD ile füzyon halinde $NS1_W$ proteini veya $NS1_D$ proteinlerini kodlayan bait plazmitleri (pGBD-$NS1_W$, pGBD-$NS1_D$) ile daha sonra tam boyuttaki EEF1G, LSG1 veya DDX56 cDNA'larının aktivasyon domaini taşıyan pGAD424 veya pACT2 maya ekspresyon vektörlerine klonlanmasıyla elde edilen pGAD424-EEF1G, pACT2-LSG1 veya pACT-DDX56 plazmit vektörleri (**Şekil 26**) ile transforme edildi. Transformasyon sonrası elde edilen ikili transformantların seçici SD katı besiyerlerindeki üreme özellikleri kontrol edildi ve bu kolonilerden çoğaltılan maya hücrelerinde belirteç β-galaktozidaz enzim aktiviteleri ölçüldü. Elde edilen sonuçlar; $NS1_W$ veya $NS1_D$ bait plazmiti ile birlikte EEF1G, LSG1 veya DDX56

proteinlerini kodlayan plazmitlerle transforme edilen maya hücrelerinin, sadece NS1 bait proteini ile pozitif etkileşim gösteren konak proteinlerinin sentezlendiği ikili transformantların üreyebildiği besiyeri olan SD besiyerinde üretiğini gösterdi (**Şekil 47**). Buna karşın kontrol amaçlı plazmit çiftiyle transforme edilen maya hücrelerinin (pGBD-C1/pGAD424; pGBD-NS1$_W$/pGAD424; pGBD-NS1$_D$/pGAD424; pGBD-C1/pGAD424-EEF1G; pGBD-C1/pACT2-LSG1 veya pGBD-C1/pACT2-DDX56) seçici SD besiyerinde üremediği saptandı. *S. cerevisiae* PJ69-4A maya hücreleri ikili hibrit sistemine duyarlı olan ve ekspresyonu GAL4 transkripsiyon aktivatör proteini tarafından uyarılan belirteç β-galaktozidaz genleri taşımaktadır. GAL4-BD ile füzyon halinde kodlanan NS1 proteini ve GAL4-AD ile füzyon halinde kodlanan EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerinin aralarındaki etkileşimler sonucunda birbirine bağlanması ile oluşan kompleks transkripsiyon aktivatörü olarak işlev görür ve β-galaktozidaz genlerinin anlatım yapmasına neden olur (Bram ve ark., 1986). Bu sebeple maya hücrelerinde tespit edilen protein etkileşimlerini doğrulamak için seçici SD besiyerinde (SD + His +Ade) üreyen hücrelerden rastgele seçilen üç örnekte β-galaktozidaz enzim aktiviteleri de ölçüldü. NS1 proteinleri ile birlikte EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerinin sentez edildiği maya hücrelerinde yüksek β-galaktozidaz enzim aktivitesi saptandı (**Şekil 49**). Elde edilen farklı düzeylerdeki enzim aktiviteleri, NS1 proteini ile EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinleri arasındaki etkileşimlerin de farklı düzeylerde olabileceğine işaret etmektedir. Bununla birlikte kontrol plazmiti içeren maya hücrelerinde ise beklenildiği gibi çok daha düşük düzeylerde enzim aktiviteleri kaydedildi. Bu anlamda seçici SD besiyerinde gözlemlenen üreme profillerinin β-galaktozidaz enzim aktiviteleri ile paralellik gösterdiği saptandı. Bu verilerden yola çıkarak, influenza A virüsü NS1 proteininin insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri ile maya hücrelerinde fiziksel etkileşim halinde olduğunu sonucuna varıldı.

Biyolojik olaylar, binlerce molekülün birbirleriyle etkileşim halinde işlevlerini gerçekleştirmelerinin bir sonucu olarak ortaya çıkmaktadır. Bu anlamda proteinler arası etkileşimlerinin saptanması, ilgili proteinlerin hücre içindeki fonksiyonlarını anlamak için önemlidir. Tez çalışması kapsamında proteinler arasındaki etkileşimlerin saptanması amacıyla geliştirilen yöntemlerden birlikte-immün çöktürme, GST ile birlikte çöktürme ve birlikte immün-lokalizasyon tekniklerinden yararlanılarak *S.*

cerevisiae maya hücrelerinde ilişkileri saptanan NS1 proteini ve EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinleri arasındaki fiziksel etkileşimler memeli hücrelerinde de araştırıldı.

Memeli hücrelerinde yürütülen çalışmaların ilk aşamasında NS1, EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan plazmit vektörler oluşturuldu. HEK293 hücrelerinde hazırlanan cDNA'lar üzerinden elde edilen EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerini kodlayan genler, HA uzantısı (YPYDVPDYA) taşıyacak şekilde pCHA memeli ekspresyon vektörüne klonlanarak rekombinant pCHA-EEF1G, pCHA-LSG1 ve pCHA-DDX56 plazmit vektörleri elde edildi (**Şekil 35**). İnfluenza A virüsü $NS1_W$ cDNA'ları Flag uzantısı (DYKDDDK) veya GST (Glutatyon-S-Transferaz) uzantısı ile füzyon halinde anlatım yapacak şekilde sırasıyla pCAGGS-Flag ve pCAGGS-GST memeli ekspresyon vektörlerine klonlandı. Çalışmada ayrıca herhangi bir peptid uzantısı taşımayan doğal $NS1_W$ proteini de kullanıldı. Bunun için $NS1_W$ cDNA'sı, tavuk ovalbümin gen promotörü kontrolünde pCAGGS vektörüne klonlandı. Bu çalışmalar sonucunda influenza A virüsü $NS1_W$ proteinini üç farklı kombinasyonda kodlayan pCAGGS-$NS1_W$-Flag, pCAGGS-$NS1_W$-GST ve pCAGGS-$NS1_W$ memeli ekspresyon vektörleri elde edildi (**Şekil 31**). Oluşturulan plazmit vektörler, koloni-PZR, restriksiyon endonükleaz enzimleri ile kesim ve son olarak DNA dizi analizleri ile kontrol edildi. Yapılan kontrollerin ardından plazmitlere klonlanan genlerin memeli hücrelerinde anlatım yapıp yapmadıkları SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile belirlendi. HEK293 hücreleri oluşturulan plazmit vektörler ile geçici olarak transfekte edildi. Transfeksiyondan 45-48 saat sonra, SDS-örnek yükleme tamponunda parçalanarak hazırlanan hücre lizatlarındaki proteinler poliakrilamid jel üzerinde ayrıştırıldı ve proteinler Western melezleme tekniği ile incelendi. Western melezleme çalışmalarında fare orjinli monoklonal anti-HA antikoru, tavşan orjinli poliklonal anti-Flag, anti-GST ve anti-NS1 antikorları kullanıldı. Analizler sonucunda; HEK293 hücrelerinde H-EEF1G, H-LSG1, H-DDX56, $NS1_W$-Flag, $NS1_W$-GST ve doğal $NS1_W$ proteinlerinin etkin bir şekilde sentez edildiği görüldü (**Şekil 42, 44**).

HeLa hücrelerine geçici olarak transfekte edilen plazmitler tarafından kodlanan proteinlerin hücre içindeki lokalizasyonları immünfloresans teknikler ile belirlendi. Elde edilen veriler; H-EEF1G proteininin hücre sitoplazmasında, H-LSG1 proteininin hem nükleus hem de sitoplazmada, H-DDX56 proteininin ise ağırlıklı olarak hücre

nükleolusunda olmakla birlikte nükleusta lokalize olduğunu göstedi (**Şekil 43**). Memeli hücrelerinde endojen EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin immünfloresans teknikler ile belirlenen bölgelerde benzer şekilde lokalize oldukları literatür verilerinden bilinmektedir. İnfluenza A virüsü NS1 proteinlerinin hücre içi lokalizasyonu ile ilgili yapılan analizler; Flag uzantılı $NS1_W$-Flag proteini ve doğal $NS1_W$ proteinlerinin baskın bir şekilde hücrenin sitoplazmasında lokalize olduğunu, buna karşın GST uzantılı NS1 proteinlerinin ($NS1_W$-GST) ise hücre nükleusunda lokalizasyon gösterdiğini ortaya koydu (**Şekil 45**). NS1 proteinleri arasında tespit edilen lokalizasyon farklılığının GST uzantısından kaynaklanabileceği düşünülmektedir. Füzyon halinde sentez edilen proteinlerde, proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarında farklılaşma olağan bir durumdur. Nitekim parazitik bir helmit olan *Schistosoma japonicum*'a ait GST enziminin de memeli hücrelerinde sitoplazmada lokalizasyon göstermektedir (Smith ve Johnson 1988; Raza ve ark., 1991). Ayrıca iki farklı proteinin farklı oryantasyonlarda füzyon halinde sentezlenmesi de proteinlerin hücre içi lokalizasyonlarını etkileyebilmektedir. GST uzantılı füzyon proteinlerinin oryantasyon farklılığına bağlı olarak hücre içinde farklı lokalizasyon davranışı sergiledikleri yapılan çalışmalarla gösterilmiştir (Uğurlu, 2016).

Memeli hücrelerinde influenza A virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinleri arasındaki fiziksel etkileşimleri araştırmak amacıyla birlikte-immün çöktürme, GST ile birlikte çöktürme ve birlikte immün-lokalizasyon tekniklerinden yararlanıldı. Birlikte-immün çöktürme testleri için, influeza A virüsü NS1 proteinlerini ($NS1_W$ veya $NS1_W$-Flag) ve konak hücre proteinlerini (H-EEF1G, H-LSG1 veya H-DDX56) kodlayan plazmitler HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfekte hücrelerden hazırlanan lizatlarda HA-uzantılı proteinler anti-HA antikoru ve protein A-Sefaroz boncuklar kullanılarak çöktürüldü. Çökeltide hem HA-uzantılı proteinler hem de influenza A virüsü NS1 proteini SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edildi. Elde edilen sonuçlara, insan EEF1G, DDX56 veya LSG1 proteinlerinin doğal $NS1_W$ proteini veya flag uzantılı $NS1_W$ proteinleri ile birlikte çökeldiğini gösterdi (**Şekil 50,52,53**). Birlikte immün çöktürme testleri, HA-uzantılı protein kodlayan plazmit ile transfekte edilen ve sonrasında influenza A virüsü ile enfekte edilen hücreler ile de gerçekleştirildi. Enfeksiyon deneylerinde, MDCK hücrelerinde çoğaltılan ve hemaglütinasyon testi ve/veya plak testleri ile titresi

belirlenen düşük patojeniteye sahip insan tipi influenza A/WSN/1933–H1N1 ve kuş tipi influenza A/Duck/Pen/1984–H5N2 virüsleri kullanıldı (**Şekil 22**). Bu deneyler sonucunda elde edilen veriler de insan tipi influenza A virüsü (H1N1) $NS1_W$ ve/veya kuş tipi influenza A virüsü (H5N2) $NS1_D$ proteinlerinin anti-HA antikorları ile çöktürülen insan EEF1G proteini ve DDX56 proteinleri ile birlikte çökeldiğini ortaya koydu (**Şekil 50 ve 53**).

Protein etkileşimlerinin saptanmasında yaygın olarak kullanılan bir diğer yöntem, antikor kullanmaksızın gerçekleştirilen GST ile birlikte çöktürme tekniğidir. GST ile birlikte çöktürme testleri için, GST uzantılı influeza A virüsü NS1 proteini ($NS1_W$-GST) ve H-EEF1G kodlayan plazmitler HEK293 hücrelerine birlikte transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hazırlanan lizatlarda $NS1_W$-GST proteininin glutatyon-sefaroz boncuklar ile çöktürülmesi sağlandı. SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile yapılan analizlerde insan EEF1G proteini ile $NS1_W$-GST proteini ile birlikte çökeldiği görüldü (**Şekil 51**).

Ökaryotik hücrelerde sitoplazma, hücre organelleri ve memranlar arasında süregelen bir protein trafiği mevcuttur. Proteinler arası etkileşimler bu trafiği etkileyen önemli faktörlerdir. Bazen iki proteinin birbirine bağlanması oluşan kompleksin hücre içi lokalizasyonu değiştirir. Bir çok hücresel transkripsiyon faktörü başka proteinler ile etkileşime girerek hücre nükleusuna taşınır (Fukuzawa ve ark., 2003). Bu nedenle proteinlerin işlevlerinin ve diğer proteinler ile etkileşimlerinin saptanmasında immünfloresans teknikler ile proteinlerin işaretlenmesi ve analizi önemli veriler sağlar. Özellikle yeni geliştirilen lazer taramalı floresan mikroskoplar ve yüksek çözünürlüklü lazer taramalı floresan mikroskoplar protein etkileşimlerinin saptanmasında çok güçlü araçlardır. Bu çalışmada influenza A virüsü NS1 proteini ile hücresel proteinler arasındaki ilişkiyi destekleyecek veriler elde etmek amacıyla, geçici olarak bu proteinleri kodlayan plazmitler ile birlikte transfekte edilen HeLa hücrelerinde NS1 ve konak hücre proteinleri immünfloresans teknikler ile analiz edildi. Hücrelerde birlikte sentez edilen NS1 proteinlerinin ($NS1_W$, $NS1_W$-Flag veya $NS1_W$-GST) ve EEF1G, DDX56 veya LSG1 proteinlerinin HeLa hücrelerinde aynı bölgelerde lokalize olma eğiliminde oldukları belirlendi (**Şekil 54-56**). Buna karşın, hücrelerde tek başına sentezlendiğinde daha çok nükleer lokalizasyon gösteren $NS1_W$-

GST proteini ile sitoplazmik EEF1G proteininin birlikte lokalize olmadıkları görüldü (**Şekil 54**). Bu durum, birlikte-immün çöktürme ve GST ile birlikte çöktürme testleri ile fiziksel etkileşim gösterdiği saptanan $NS1_W$-GST ve EEF1G proteinlerinin sadece sınırlı bir zaman aralığında birlikte lokalizasyon göstermelerinden kaynaklanabilir. Yapılan birlikte çöktürme ve birlikte immün-lokalizasyon testleri sonucu elde edilen verilerden yola çıkarak, influenza A virüsü NS1 proteininin insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri ile memeli hücrelerinde de fiziksel etkileşim halinde olduğu sonucuna varıldı.

İnfluenza A virüsü NS1 proteini ile maya ve memeli hücrelerinde ilişkisi saptanan EEF1G proteini, translasyonun uzama basamağında amino asit yüklü tRNA'ların ribozoma bağlanmasında görevlidir. Konak hücreye ait birçok biyokimyasal olayda olduğu gibi translasyon üzerinde de etkili olan virüsler geliştirdikleri mekanizmalarla veya viral genom üzerinden sentezlenen proteinler aracılığıyla hücresel mRNA'ların translasyonunu engellerken aynı zamanda viral proteinlerin daha etkili bir şekilde sentezlenmesini sağlarlar. Çift zincirli RNA virüslerinden rotavirüsler yapısal olmayan NSP3 proteini ile translasyon başlama faktörlerinden eIF4G (p220) proteinine bağlanarak eIF4G-PABPI interaksiyonunu engeller ve böylece hücresel mRNA translasyonu inhibe edilir (Piron ve ark., 1998). HIV-1 virüsü Rev proteini polizom oluşumu ve viral mRNA'ların translasyonunda görev alırken Gag proteini uzama faktörlerinden EEF1A ile interaksiyon göstermektedir (Cimarelli ve Luban, 1999; Perales ve ark., 2005). eIF4G proteini pikarnovirüsler tarafından sentezlenen viral bir proteaz tarafından kesilerek hücresel mRNA'ların tanınması engellenir (Bushell ve Sarnow, 2002). Adenovirüsler ise L4-100K proteini aracılığıyla eIF4E (p24) proteinini defosforile ederek hücresel protein sentezini inhibe eder (Cuesta ve ark., 2004). İnfluenza A virüsleri de diğer virüsler gibi, geliştirdikleri mekanizmalarla translasyon üzerinde etkili olmaktadır. Yapılan çalışmalarla viral RNA polimeraz kompleksinin translasyon başlama faktörlerine (eIF4E ve eIF4G) bağlandığı ve viral enfeksiyonun eIF4G ile cap-yapısı bağlantısını tetiklediği gösterilmiştir (Hooker ve ark., 2003). Ayrıca viral RNA polimerazın 5'-cap (m^7GTP) bağlama proteini olan eIF4E'den çok daha yüksek bir afinite ile 5'-cap yapısına bağlandığı da tespit edilmiştir. Bu durum konak protein sentezinin inhibe edilmesine rağmen viral proteinlerin sentezinin gerçekleşebilmesinin nedeni

niteliğindedir. İnfluenza A virüsleri NS1 proteininin de translasyon mekanizmaları üzerinde etkileri bulunmaktadır. NS1 proteini, eIF4G ve PABPI ile bağlanarak viral mRNA'ların translasyona başlamasını hızlandırır. Özellikle NP ve M1 mRNA'larının translasyonu üzerinde etkilidir (de la Luna ve ark., 1995). NS1 proteininin interferon antagonisti olarak translasyon üzerine etkisi, CPSF4-bağlanma bölgesinde yer alan F103 ve M106 bakiyeleri aracılığıyla interferonlar tarafından sentezi uyarılan genlerin (ISG) translasyonunu inhibe ettiğini gösteren çalışmalar ile ortaya konmuştur (Wang ve ark., 2017). Tez çalışmasına konu olan proteinlerden EEF1G proteininin bazı virüs replikasyonlarında etkili olduğu; viral polimeraz enzimi, yapısal olan/olmayan viral proteinler veya viral RNA'lar ile etkileşimleri gösterilmiştir. EEF1G proteininin, HIV-1 ve TBSV virüslerine ait polimeraz enzimleri ile etkileşim halinde viral patogeneze katkı sağladığı tespit edilmiştir (Sasvari ve ark., 2011; Warren ve ark., 2012). Enterovirüs (EV71) enfeksiyonuna karşı yanıt olarak *EEF1G* gen ekspresyonunda azalma görülmüştür (Leong ve Chow, 2006). Bununla birlikte *Picornaviridae* ailesi içinde sınıflandırılan FMDV virüsünün interferon antagonisti olan virionun yapısal olmayan 2B proteininin EEF1G proteini ile ilişkisi saptanmıştır (Zhang ve ark., 2017). Dolayısıyla literatür verileri, bu çalışmada ortaya konan NS1 ve EEF1G proteini arasındaki ilişkiyi desteklemektedir.

Memeli hücrelerinde bir dakikada, 80 ribozomal protein ve dört RNA molekülünden oluşan ortalama 7500 ribozom sentezlenmektedir (Kargas ve ark., 2019). Bununla birlikte biyosentezde görülebilecek bazı hataların başta lösemi olmak üzere genel olarak ribozomopati olarak adlandırılan önemli hastalıklara neden olduğu bilinmektedir (Warren, 2018). Ökaryotik hücrelerde ribozom biyosentezi; ribozomal alt ünitelerinin kalite-kontrolü, transportu, birleşimi ve modifikasyonlarında görev alan başlıca snoRNA'lar, ekzo/endonükleazlar, metiltransferazlar, RNA helikazlar, ATPaz ve GTPaz'lar olmak üzere ribozomal olan/olmayan yaklaşık 200 transaktivatör faktörün bir araya gelmesiyle gerçekleşir. Bu tez çalışmasına konu olan ve GTPaz aktivitesine sahip LSG1 proteini, bu faktörlerden biridir. LSG1 proteininin temel görevi ökaryotik ribozomal büyük alt üniteden adaptör Nmd3 (Nonsense-mediated mRNA decay-3) proteininin ayrılmasını katalizleyerek olgun-60S alt üniteleri oluşturmak ve biyosentezdeki son yapısal protein olan RPL10 (uL16) proteininin yapıya katılmasını sağlamaktır. Ribozom biyosentezi hücre proliferasyonu ve stres

yanıtlarının oluşumu açısından oldukça kritik bir mekanizmadır. Yapılan çalışmalarla LSG1 transkript düzeyi azaltılan hücrelerde yaşlanma ile ilişkili pro-inflamatuar sitokin ve kemokinlerin (IL-6, IL-8) sentezinin sınırlandığı ve endoplazmik retikulumda hasarlanmalara yol açtığı gösterilmiştir (Pantazi ve ark., 2019). Ribozomal biyosentez konak hücre ilişkilerinde virüsler tarafından hedef alınan en önemli olaylardan biridir. Bu anlamda RNA polimeraz I enzimi katalizörlüğünde, 18S, 5.8S ve 28S rRNA dizilerini içeren ribozomal DNA (rDNA) genlerinin transkripsiyonundan başlayarak aktif ribozomların oluşumuna kadar geçen tüm basamaklarda çok sayıda ribozomal protein ve ribozomal faktörün virüslerle ilişkisi tespit edilmiştir. İnfluenza A/Udorn/72-H3N2 virüsü NS1 proteininin karboksi-terminal bölgesinde yer alan ikinci nükleer lokalizasyon sinyalinin (NLS2) aynı zamanda nükleolar lokalizasyon sinyali (NoLS) işlevi gördüğü ve böylece NS1 proteininin nükleolin ve biyosentezde işlev gören şaperonlardan NPM1/B23 ile nükleoplazma ve nükleolusta birlikte lokalize olduğu belirlenmiştir (Melen ve ark., 2012). SARS-CoV nükleokapsit proteini, NDV (Newcastle disease virus) matriks proteini ve influenza A virüs NS1 proteinlerinin nükleoulusta ribozomal biyosentezin regülasyonunda işlev gördüğü saptanmıştır (Peeples ve ark., 1992; Chen ve ark., 2002). Ribozomal biyosentez faktörlerinden NOP53 HSV-1 (Herpes simplex virus-1) virüs replikasyonu için oldukça önemlidir (Meng ve ark., 2018). 18S, 5.8S ve 28S ribosomal RNA'larının ekspresyonunda yer alan transkripsiyon faktörü UBF adenovirüslere ait viral DNA replikasyonunu sağlar (Lawrence ve ark., 2006). RRP1B'nin (Ribosomal RNA Processing 1B) ise influenza A virüsü RNA polimeraz enziminin 5'-cap yapısına bağlanmasını kolaylaştırarak viral transkripsiyon için gerekli konak proteinlerinden olduğu saptanmıştır (Su ve ark., 2015). Bu çalışmada da influenza A virüsü NS1 proteinin hücresel LSG1 proteini ile ilişkisi olduğu hem maya hücreleri hem de memeli hücreleri ile yapılan deneyler ile ortaya konmuştur. Bununla birlikte bu etkileşimin moleküler düzeyde hangi olayları etkilediği sorusu yanıtlanması gereken önemli bir soru olarak durmaktadır.

Tez çalışmasında ele alınan bir diğer protein, ribozom biyosentezinde görev alan ve RNA helikaz aktivitesine sahip DDX56 proteinidir. Viral enfeksiyonlarda gerek viral replikasyonu stimüle edici gerekse anti-viral etkiye sahip çok sayıda RNA helikaz enzimi tanımlanmıştır. HCV virüslerine ait NS3 proteini viral helikazlardandır.

Kendilerine ait RNA helikaz enzimleri bulunmayan virüsler yaşamlarının devamlılığı için konak hücreye ait hücresel RNA helikazları kullanmaktadırlar. Örneğin DDX5 (p68), DDX6, DDX17, DDX21, DDX24, DDX47 ve DHX36 proteinleri HIV-1 ile ilişkilendirilen RNA helikazlardır ve viral replikasyonun birçok aşamasında kritik görevler üstlenmektedirler (Yasuda-Inoue ve ark., 2013; Cheng ve ark., 2018). Yapılan çalışmalarla çok sayıda hücresel RNA helikaz proteininin influenza A virüs replikasyonu üzerine de etki ettiği tespit edilmiştir. Hücresel RNA helikazlardan UAP56 (DDX39B) proteininin çift zincirli RNA molekülünün oluşumunu ve dolayısıyla doğal immün yanıtların aktivasyonunu engelleyici etki gösterdiği saptanmıştır (Wisskirchen ve ark., 2011). DDX19 proteininin enfekte hücrelerde viral mRNA'nın eksportunda görev aldığı bilinmektedir (Diot ve ark., 2016). Bir başka hücresel RNA helikaz olan MOV10 proteininin ise viral nükleoproteinlerin nükleer transportunu inhibe ettiği ve bu yönüyle anti-influenza virüs faktörü gibi davrandığı saptanmıştır (Zhang ve ark., 2016). Tez çalışmama konu olan nükleolar DDX56 proteini de diğer hücresel helikazlar gibi viral replikasyonda önemli görevlere sahiptir. DDX56 proteininin FMDV virüsünün yapısal olmayan 3A proteini ile interaksiyon göstererek IRF3 fosforilasyonunu inhibe ettiği ve böylece FMDV virüs replikasyonunu arttırdığı saptanmıştır (Fu ve ark., 2019). DDX56 proteininin HIV-1 virüsü ile ilişkisi tespit edilen diğer hücresel RNA helikazlarla birlikte Rev-bağımlı RNA eksportunu arttırdığı gösterilmiştir (Yasuda-Inoue ve ark., 2013). Maya ikili-hibrit metodu ile helikaz DDX56 proteininin WNV virüsü kapsid proteini ile ilişkili olduğu görülmüş, DDX56 proteininin WNV virüs replikasyonunda değil enfektif virüs partikülünün birleşmesini sağlayarak paketlenme aşamasında rol aldığı saptanmıştır (Xu ve ark., 2011). DDX56 proteininin helikaz aktivitesinin viral RNA'nın paketlenmesinde önemli olduğu görülmüştür (Xu ve Hobman, 2012). Ayrıca nükleolar DDX56 proteininin viral enfeksiyonda endoplazmik retikulumdaki virion birleşme bölgesinde lokalizasyon göstermesi de WNV virüsü için tespit edilen rolünü destekler niteliktedir (Reid ve Hobman, 2017). Bu çalışmada ise daha önce rapor edilmeyen, influenza A virüsü NS1 proteini ile insan DDX56 proteini arasında bir ilişki olduğu ve bu ilişkinin influenza A virüs replikasyonunu etkilediği ortaya kondu.

Maya ve memeli hücrelerinde gerçekleştirilen *in vivo* ve *in vitro* analizlere ek olarak influenza A virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri

arasındaki fiziksel etkileşimler *in siliko* yöntemler kullanılarak da değerlendirildi. *In siliko* yöntemler, teknolojik gelişmelerle birlikte bilgisayar ortamında simülasyonlar ile gerçekleştirilen çalışmaları ifade etmektedir. Bir moleküler modelleme yöntemi olan *doking;* bilgisayar ortamında belirlenen proteinlerin olası üç boyutlu modelleri arasında kovalent olmayan etkileşimlerle bağlanarak kararlı bir kompleks oluşumlarını, moleküllerin uzayda tercih ettikleri pozisyonları, bağlanma afinitelerini ve bu bağlanmada etkili olan amino asitleri tahmin etmede kullanılan yöntemdir (Huang ve Zou, 2010). Biyoinformatik araçlar kullanılarak gerçekleştirilen bu çalışmalarda, influenza A virüsü $NS1_W$ proteini için belirlenen olasılığı en yüksek olan üç boyutlu bir model ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinden her biri için belirlenen üç farklı model arasındaki olası etkileşimler belirlendi (**Şekil 73-75**). *İn siliko* yöntemler kullanılarak yapılan interaksiyon modellerinin analizlerine göre; EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin karboksi-terminal bölgesinin viral NS1 proteini ile bağlanmada önemli olduğu görüldü. Elde edilen bu veri, NS1 proteini ile EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri arasındaki fiziksel etkileşimin, konak proteinlerinin karboksi-terminal bölgesi aracılığıyla ile gerçekleştiğini ortaya koyan ve doktora tez çalışmasının çıkış noktası olan maya ikili-hibrit çalışması sonuçlarını destekler niteliktedir.

Maya ve memeli hücrelerinde saptanan influenza A virüsü NS1 proteini ile insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri arasındaki etkileşimlerin influenza A virüs replikasyonunu nasıl etkilediği tez çalışması kapsamında ele alınan diğer konulardır. Çalışmada, hücresel proteinlerin influenza A virüs replikasyonuna etkilerini saptamak için farklı yöntemler kullanıldı. Birinci yöntem olarak, konak proteinlerinin miktarları arttırılan (*İng. over-expression*) hücrelerde influenza A virüs replikasyonunun nasıl ilerlediği izlendi. HEK293 hücreleri EEF1G, LSG1 veya DDX56 proteinlerini kodlayan plazmitler ile geçici olarak transfekte edildi ve hücrelerde bu proteinlerin miktarları arttırıldı. Transfeksiyondan 36 saat sonra hücreler influenza A (WSN) veya influenza A (DkPen) virüsleri ile enfekte edildi. Viral replikasyon, influenza A virüsü M1 ve hücresel aktin beta proteinlerinin SDS-PAGE/Western melezleme tekniği ile analiz edilerek değerlendirildi. Elde edilen sonuçlar, memeli hücrelerinde EEF1G protein miktarındaki artışın hem WSN hem de DkPen tipi virüs replikasyonunu negatif yönde etkilediğini gösterdi (**Şekil 57A**). LSG1 protein miktarındaki artışın farklı

influenza A virüs tipleri üzerinde farklı düzeylerde etki ettiği saptandı. Bu artışın DkPen tipi virüs replikasyonunu negatif yönde etkilerken, WSN tipi virüs replikasyonunun LSG1 proteinindeki artıştan etkilenmediği görüldü (**Şekil 57B**). Geçici transfeksiyon ile DDX56 protein miktarı arttırılan hücrelerde ise, influenza A virüs replikasyonunda anlamlı bir değişiklik olmadığı görüldü (**Şekil 57C**).

Viral replikasyon üzerine konak hücre proteinlerinin etkilerini araştırmak için ikinci yöntem olarak RNA interferens (Sun ve ark., 2008) tekniğinden yararlanıldı ve *DDX56* geni transkript düzeyi azaltılan (*İng. knock down*) hücrelerde viral replikasyonun seyri izlendi. HeLa hücreleri özgün *DDX56* genine özgü siRNA'lar ile transfekte edildi ve bu hücrelerde DDX56 transkript düzeyi düşüldü (**Şekil 59A**). *DDX56* geni *knock down* edilen bu hücreler yaklaşık 1 moi titrede influenza A (WSN) virüsleri ile enfekte edildi. Enfeksiyondan 8 saat sonra hücreler SDS örnek yükleme tamponunda parçalandı ve lizatlarda viral M1 proteini ve aktin beta protein miktarları Western melezleme tekniği ile değerlendirildi. Elde edilen veriler, DDX56-siRNA'lar ile transfekte olmuş hücrelerde, DDX56 transkript düzeyindeki azalmanın viral replikasyonu negatif yönde etkilediğini ortaya koydu (**Şekil 59B**). *DDX56* geni susturulan HeLa hücrelerinde influenza A virüs replikasyonu, enfeksiyonun 8., 12. ve 24. saatinde alınan besiyeri örneklerinde virüs miktarının plak testi ile belirlenmesi ile de izlendi (**Şekil 59C**). Elde edilen sonuçlar *DDX56* geni susturulan hücrelerde virüs artış hızının kontrol siRNA'lar ile transfekte edilen hücrelere oranla daha düşük olduğunu gösterdi. Bu sonuç DDX56 proteininin influenza A virüs replikasyonu üzerinde pozitif etkiye sahip olduğunu ortaya koydu. Bununla birlikte yukarıda da değinildiği gibi DDX56 protein miktarı arttırılan hücrelerde influenza A virüs replikasyonunun kayda değer bir değişikliğe uğramamasının, hücrelerde endojen olarak sentezlenen DDX56 protein miktarının viral replikasyon için yeterli doygunlukta olmasından kaynaklandığı düşünülmektedir.

Konak proteinlerinin viral replikasyona etkilerini saptamak için üçüncü yöntem olarak oldukça yeni bir teknik olan CRISPR/Cas9 tekniğinden yararlanıldı. EEF1G ve LSG1 proteinlerini kodlayan genler bakımından kusurlu mutant hücre hatları elde edilerek bu hücrelerde viral replikasyonun seyri izlendi. CRISPR/Cas9 sistemi ökaryotik hücrelerde kullanılan hedefe yönelik olarak gerçekleştirilen genom

düzenleme araçlarından biridir (Hille ve Charpentier, 2016). Sistem; yaklaşık 20 nükleotid uzunluğunda bir kısa rehber RNA (sgRNA) molekülü aracılığıyla hedeflenen DNA molekülüne bağlanabiliyor olması, basitliği ve yüksek verimlilikle uygulanabilirliği gibi özellikleri sayesinde son dönemde bilimsel çalışmalarda ilgi odağı olmuş ve bu alanda yapılan çalışmalar Emmanuelle Charpentier ve Jennifer A. Doudna isimli bilim insanlarına 2020 Nobel Kimya ödülünü kazandırmıştır (Li ve ark., 2021). Bu tez çalışması kapsamında ilk aşamada CRISPR/Cas9 sisteminin uygulandığı *EEF1G* ve *LSG1* genlerine özgü sgRNA dizilerini taşıyan memeli ekspresyon vektörleri oluşturuldu. Bu amaçla her bir gen için iki farklı hedef bölge seçilerek (Tablo 2) rehber RNA dizisi tasarlandı. İki farklı bölgede *EEF1G* ve *LSG1* genlerini hedef alan sgRNA kodlayan 20 nükleotid uzunluğundaki çift zincirli DNA fragmentleri oluşturuldu ve her biri pSpCas9(BB)-2A-Puro(PX459)-V2.0 plazmit vektörüne, U6 promotörü kontrolündeki trans-aktive edici CRISPR RNA (tracrRNA) kodlayan dizinin sonunda yer alan *Bbs*I enzimi hedef bölgesine klonlandı (**Şekil 38**). Elde edilen rekombinant pCas9-EEF-1, pCas9-EEF-2, pCas9-LSG-1 ve pCas9-LSG-2 plazmit vektörlerinin (**Şekil 39**) kontrolü DNA dizi analizleri ile yapıldı (**Şekil 41**). Plazmit vektörlerinin memeli hücrelerinde Cas9 enzimini kodladıkları Western melezleme tekniği ile ortaya kondu (**Şekil 46**). Bu aşamadan sonra, EEF1G ve LSG1 proteinlerini kodlayan genler bakımından kusurlu hücre hatlarını elde etme çalışmalarına geçildi. HeLa hücrelerinin kullanıldığı çalışmada *EEF1G* veya *LSG1* genlerinde iki farklı bölgede mutasyona neden olmak için oluşturulan plazmit vektörler, hücrelere aynı anda transfekte edildi. Transfeksiyon sonrası hücrelerin ön seleksiyonu puromisin antibiyotiği kullanılarak gerçekleştirildi. Yapılan bu ön seleksiyondan sonra puromisine dirençli hücreler 96-kuyulu plaklara tek hücre düşecek şekilde seyreltilerek ekim yapıldı ve bu hücrelerden klonlar elde edildi. Hücre klonlarının hem mRNA hem de genomik DNA üzerinden *EEF1G* veya *LSG1* genleri bakımından mutant olup olmadıkları DNA dizi analizleri ile ortaya kondu. CRISPR/Cas9 aracılı mutasyonlar, genellikle PAM dizisinin *(İng. protospacer adjacent motif)* upstream bölgesinde 3. ve 4. bazların arasından çift zincir halinde kesilen DNA molekülünün onarım mekanizmaları sonucu ortaya çıkan insertsiyonlar veya delesyonlar ile gerçekleşir. Sözkonusu mutasyonlar diploid organizmalarda homolog kromozomların birinde veya her ikisinde, benzer veya farklı şekilde meydana

gelerek homozigot veya heterozigot allel yapılarını oluşturabilmektedir. Çalışmada aday klonlarda mutasyon tespitinin yapıldığı sekans sonuçlarının analizinde; bazı klonlar için manuel yöntemler izlenirken (Ma ve ark., 2015), DNA sekansı manuel olarak çözümlemeye olanak vermeyen ve dizi kromatogramı oldukça karışık olan bazı klonlar için çevrim içi Inference of CRISPR Edits-ICE, *(https://ice.synthego.com/*, Erişim tarihi: 14.05.2021) programından yararlanıldı. Yapılan analizlerin sonucunda; *EEF1G* geni veya *LSG1* geni hedeflenen 10 aday klondan; *EEF1G* geni için bir klonda (***E22***-EEF1G), *LSG1* geni için ise iki klonda (***L9***-LSG1 ve ***L11***-LSG1) orijinal cDNA dizisinde bozulma olduğu, buna karşın incelenen diğer klonlarda herhangi bir mutasyonun gerçekleşmediği saptandı (**Şekil 63** ve **66**). Dolayısıyla *EEF1G* geni düzenlenen ***E22***-EEF1G klonu ve *LSG1* geni düzenlenen ***L9***-LSG1 ve ***L11***-LSG1 klonları ile çalışmalar sürdürüldü. ***E22***-EEF1G klonundaki mutasyonlar, hem *EEF1G* geni cDNA'sı hem de genom DNA'sı üzerinden çoğaltılan hedef bölgelerin DNA dizileri belirlenerek değerlendirildi. Elde edilen DNA dizi analizi kromatogramlarına göre; genin kodlayıcı olmayan 1. intron bölgesini de içine alacak şekilde CRISPR/Cas9 tekniği ile düzenlenen ***E22***-EEF1G klonuna ait *EEF1G* geninin heterozigot mutasyona sahip olduğu görüldü (**Şekil 64** ve **65**). *LSG1* geni hedeflenen ***L9***-LSG1 klonunda, LSG1 allellerinin Cas9 enzimi kesimi sonrasında farklı şekillerde onarıldığı ve meydana gelen onarımların okuma çerçevesi içinde olmadığı ayrıca genin kodlanmayan bölgelerinde de (5'-UTR ve 2. intron) genom düzenlenmesinin gerçekleştiği sonucuna varıldı (**Şekil 67-69**). ***L11***-LSG1 klonunda ise 2. hedef bölgesinde protein yapısına bir amino asitin eklendiği ve genin kodlayıcı olmayan 1. intron bölgesinde de düzenlendiği görüldü (**Şekil 70** ve **71**).

EEF1G ve LSG1 proteinlerini kodlayan genler bakımından mutant hücre hatları elde edildikten sonra bu mutasyonların viral replikasyon açısından anlamlı olup olmadığı araştırıldı. Bunun için ***E22***-EEF1G, ***L9***-LSG1 ve ***L11***-LSG1 hücre klonları influenza A (WSN) ve influenza A (DkPen) virüsleri ile enfekte edildi. Sonuçların analizi, virüsler ile enfekte edilen kontrol HeLa hücreleri ve mutant hücrelerde Western melezleme tekniği ile belirlenen viral M1 proteinleri ve hücresel aktin beta protein miktarları karşılaştırılarak yapıldı. *EEF1G* geni hedeflenen ***E22***-EEF1G hücrelerindeki mutasyonların farklı influenza A virüs tipleri üzerinde farklı etki yaptığı saptandı. Elde edilen veriler; DkPen tipi influenza A virüslerinin EEF1G

proteinlerine karşı daha duyarlı olduğunu, mutant ***E22***-EEF1G hücrelerinde viral protein düzeyinin kontrol hücreye göre çok daha yüksek olduğunu, dolayısıyla proteinin DkPen tipi virüs replikasyonunu negatif yönde etkilediğini ortaya koydu. Buna karşın, mutant ***E22***-EEF1G hücrelerinde WSN tipi virüs replikasyonunda kontrol hücrelere kıyasla önemli bir farklılık görülmedi. Diğer taraftan daha öncede belirtildiği gibi geçici transfeksiyon ile EEF1G protein miktarı arttırılan hücrelerde WSN tipi virüs replikasyonu negatif yönde etkilenmiştir. Bu sonucun transfekte hücrelerde EEF1G proteininin aşırı ekspresyonundan kaynaklandığı düşünülmektedir.

LSG1 geni hedeflenen ***L9***-LSG1 ve ***L11***-LSG1 hücre klonlarında viral replikasyon etkileri incelendiğinde, bu iki klonlarda viral replikasyonun farklı seyrettiği göze çarpmaktadır. Enfekte edilen ***L11***-LSG1 hücre klonunda her iki virüs tipi için replikasyonda anlamlı bir değişiklik olmamasının, bu klonda *LSG1* geninde meydana gelen mutasyonun viral replikasyonu etkileyecek nitelikte olmadığından kaynaklandığı düşünülmektedir. Buna karşın, ***L9***-LSG1 klonunda viral replikasyon kontrol hücrelerine oranla daha düşük düzeyde seyretmiştir. Bu sonuç LSG1 proteinlerinin influenza A virüs replikasyonunu pozitif yönde etkilediği sonucunu vermektedir (**Şekil 72**).

Doktora tezi çalışmam sonucu elde edilen verilerden, maya ve memeli hücrelerinde influenza A virüsü NS1 proteini ile fiziksel etkileşim halinde bulunduğunu saptadığımız insan EEF1G proteininin viral replikasyonu negatif yönde etkilediği ve kuş tipi influenza A (DkPen) virüslerinin EEF1G proteinine karşı daha duyarlı olduğu sonucuna varıldı. İnfluenza A virüsleri ile yapılan bir çalışmada CRISPR/Cas9 tekniği aracılığıyla mutasyona uğratılan EEF1G proteininin viral replikasyon ve translasyon üzerine etkisinin virüs tipine bağlı olarak değiştiği rapor edilmiştir (Sammaibashi ve ark., 2018). EEF1G proteini bakımından mutant klonlarda A/WSN/33/H1N1 ve A/Perth/16/2009/H3N2 virüs replikasyonunun ve viral protein sentezinin azaldığı ancak A/California/04/2009/H1N1 virüs titresinde anlamlı bir değişikliğin olmadığı saptanmıştır. Ayrıca A/WSN/33/H1N1 virüsü PB2 ve PA proteinlerinin EEF1G-bağımlı viral replikasyon açısından önemli olduğu tespit edilmiştir. Bununla birlikte EEF1G proteininin mitokondriyal anti-viral sinyal proteininin (MAVS) CARD domaini ile bağlanarak NF-kB'nin aktivasyonunu

sağladığı bilinmektedir (Liu ve ark., 2014). Dolayısıyla anti-viral yanıtların oluşmasında pozitif regülatör görevi üstlenen EEF1G proteininin, hücre savunma mekanizmasını zayıflatıcı etkiye sahip influenza A virüsü NS1 proteininin hücresel hedeflerinden biri olabileceğini düşündürmektedir.

Tez çalışması kapsamında ele alınan proteinlerden LSG1 proteinine ait veriler sonucunda, LSG1 proteininin hem maya hem de insan hücrelerinde influenza A virüsü NS1 proteini ile fiziksel etkileşim içinde bulunduğu ve viral replikasyonu pozitif yönde etkilediği saptanmıştır. İnsan sitomegalovirüs (HCMV) ile yapılan bir çalışmada ribozom biyosentezi ile protein sentez mekanizmalarının birbirinden etkilenmeden, ribozom biyosentezinin inhibisyonunun HCMV replikasyonunu arttırdığı gösterilmiştir. Aynı çalışmada siRNA'lar ile ekspresyon miktarı azaltılan ribozom biyosentezinde görevli bazı transaktivatör faktörlerin (TIF-IA, UBF, TFIIIA ve BOP1) interferonlar üzerindeki etkileri incelenmiş ve RIG-I (DDX58), IFIT2, ISG15, IFIT3, RSAD2, OAS3, UBA7 ve IFIH1 ele alınmıştır. Sonuç olarak ribozom biyosentezinin baskılanmasının HCMV ile enfekte hücrelerde tip-I IFN yanıtlarını sınırlandırdığı tespit edilmiştir (Bianco ve Mohr, 2019). Ribozom biyosentezinde rol alan bazı hücresel proteinlerin viral proteinler ile ilişkileri, viral replikasyonlar üzerine olan etkileri ve nükleolar lokalizasyon gösteren influenza A virüsü NS1 proteininin ribozomal biyosentezin regülasyonundaki işlevi göz önünde bulundurulduğunda; mekanizması tam olarak anlaşılamamış olmakla birlikte, LSG1 proteininin de influenza A virüsleri için önemli olabileceği, interferon antagonisti olan NS1 proteini ile etkileşimi sonucu viral replikasyonu pozitif yönde etkileyebileceği düşünülmektedir.

Tez çalışmasına konu olan proteinlerden DDX56 proteini ile elde ettiğimiz veriler, DDX56 proteininin hem maya hem de insan hücrelerinde influenza A virüsü NS1 proteini ile fiziksel etkileşim halinde bulunduğunu ve viral replikasyonu pozitif yönde etkilediğini gösterdi. Yapılan çalışmalarla memeli hücrelerinde bazı hücresel RNA helikazlar ile influenza A virüsü NS1 proteininin etkileşimleri ve viral replikasyon üzerine etkileri saptanmıştır. DDX21 proteininin influenza A virüsü PB1 proteinine bağlanarak viral polimerazın kurulumunu engellediği ancak NS1 proteininin meydana gelen viral replikasyonun sınırlandırıcı etkisini ortadan

kaldırarak pozitif etki yaptığı tespit edilmiştir (Chen ve ark., 2014). NS1 proteininin çift zincirli RNA molekülü bağlanma bölgesinin DHX30 proteini ile interaksiyonda rol aldığı, benzer şekilde UAP56 ile RNA-bağlanma bakiyeleri (R38-K41) aracılığıyla interaksiyon göstererek nükleer membrana yakın bölgelerde birlikte lokalize oldukları ve DHX9 (RNA Helikaz-A) proteininin ise NS1 proteini ile interaksiyon gösterip viral replikasyon ve transkripsiyonu pozitif yönde etkilediği saptanmıştır (Lin ve ark., 2012; Chiba ve ark., 2018; Chen ve ark., 2020). Son yapılan bir çalışmada DDX56 proteininin IRF3 ve IPO5 arasındaki interaksiyona engel olarak viral enfeksiyonlar tarafından sentezi uyarılan tip-I IFN yanıtlarını engellediği tespit edilmiştir (Li ve ark., 2020). Dolayısıyla anti-viral yanıtların oluşmasında negatif regülatör görevi üstlenmesinin yanı sıra bir RNA helikaz olan DDX56 proteininin, çift zincirli RNA molekülüne bağlanma özelliği bulunan NS1 proteini ile etkileşim halinde bulunarak viral RNA'ların sekonder yapılarını yeniden düzenleyerek viral RNA polimeraz aktivitesini arttırıcı etkiye sahip olabileceği düşünülmektedir.

Sonuç olarak, Doktora tez çalışması kapsamında influenza A virüsü NS1 proteini ile insan hücrelerinde sentez edilen EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinleri arasındaki etkileşimler farklı teknikler kullanılarak maya ve memeli hücrelerinde araştırıldı ve influenza A virüs replikasyonu üzerindeki etkileri analiz edildi. *In vivo, in vitro* ve *in siliko* analizler sonucunda elde edilen veriler, insan EEF1G, LSG1 ve DDX56 proteinlerinin influenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkili olduğunu ve viral replikasyon üzerinde etkili olduklarını ortaya koydu. Bu proteinlerden LSG1 ve DDX56 proteinleri influenza A virüsleri üzerinde pozitif yönde regüle edici etkiye sahipken, EEF1G proteini negatif yönde etki gösterdi. Çalışma sonucunda, NS1 proteini ve ele alınan konak hücre proteinleri arasındaki ilişkiyi ve bu proteinlerin viral replikasyon üzerindeki etkilerini ortaya koyan önemli ipuçları elde edilmiş olmakla birlikte, moleküler düzeyde bu etkileşim mekanizmalarının tam olarak aydınlatılması için yeni verilere gereksinim vardır. Bununla birlikte, her aşamasının büyük bir merak ve titizlikle yürütüldüğü bu Doktora tez çalışması, ulaştığı sonuçlar itibariyle influenza A virüsü patogenezini aydınlatmaya ve virüslerle mücadeleye yönelik çalışmalar için önemli ipuçları sunmaktadır. Ayrıca bu çalışma, daha önce literatürde influenza A virüsü NS1 proteini ile ilişkilendirilmeyen yeni konak proteinlerinin saptanması açısından orjinallik taşımaktadır. Bununla birlikte, moleküler düzeyde bu

mekanizmaların nasıl gerçekleştiğinin detaylandırılması cevaplanmayı bekleyen sorulardandır.

8. KAYNAKLAR

Akira S. Pathogen recognition by innate immunity and its signaling. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci. 2009;85:143-56.

Akira S, Uematsu S, Takeuchi O. Pathogen recognition and innate immunity. Cell. 2006;124:783-801.

Al-Maghrebi M, Brule H, Padkina M, Allen C, Holmes WM, Zehner ZE. The 3' untranslated region of human vimentin mRNA interacts with protein complexes containing eEF-1gamma and HAX-1. Nucleic Acids Res. 2002;30:5017-28.

Albo C, Valencia A, Portela A. Identification of an RNA binding region within the N-terminal third of the influenza A virus nucleoprotein. J Virol. 1995;69:3799-806.

Allen IC, Scull MA, Moore CB, Holl EK, McElvania-TeKippe E, Taxman DJ, Guthrie EH, Pickles RJ, Ting JP. The NLRP3 inflammasome mediates in vivo innate immunity to influenza A virus through recognition of viral RNA. Immunity. 2009;30:556-65.

Andreou AZ, Klostermeier D. The DEAD-box helicase eIF4A: paradigm or the odd one out? RNA Biol. 2013;10:19-32.

Ank N, Paludan SR. Type III IFNs: new layers of complexity in innate antiviral immunity. Biofactors. 2009;35:82-7.

Aragon T, de la Luna S, Novoa I, Carrasco L, Ortin J, Nieto A. Eukaryotic translation initiation factor 4GI is a cellular target for NS1 protein, a translational activator of influenza virus. Mol Cell Biol. 2000;20(17):6259-68.

Aranda PS, LaJoie DM, Jorcyk CL. Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. Electrophoresis. 2012;33:366-9.

Arias-Mireles BH, de Rozieres CM, Ly K, Joseph S. RNA Modulates the Interaction between Influenza A Virus NS1 and Human PABP1. Biochemistry. 2018;57:3590-8.

Arzt S, Petit I, Burmeister WP, Ruigrok RW, Baudin F. Structure of a knockout mutant of influenza virus M1 protein that has altered activities in membrane binding, oligomerisation and binding to NEP (NS2). Virus Res. 2004;99:115-9.

Ayllon J, Garcia-Sastre A. The NS1 protein: a multitasking virulence factor. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;386:73-107.

Bach EA, Aguet M, Schreiber RD. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. Annu Rev Immunol. 1997;15:563-91.

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;18:1765-70.

Baig AM. Human Genome-Edited Babies: First Responder with Concerns Regarding Possible Neurological Deficits! ACS Chem Neurosci. 2019;10:39-41.

Bailey CC, Zhong G, Huang IC, Farzan M. IFITM-Family Proteins: The Cell's First Line of Antiviral Defense. Annu Rev Virol. 2014;1:261-83.

Ball LA. Induction of 2'5'-oligoadenylate synthetase activity and a new protein by chick interferon. Virology. 1979;94:282-96.

Baranovskaya I, Sergeeva M, Fadeev A, Kadirova R, Ivanova A, Ramsay E, Vasin A. Changes in RNA secondary structure affect NS1 protein expression during early stage influenza virus infection. Virol J. 2019;16:162.

Bass BL, Nishikura K, Keller W, Seeburg PH, Emeson RB, O'Connell MA, Samuel CE, Herbert A. A standardized nomenclature for adenosine deaminases that act on RNA. RNA. 1997;3:947-9.

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;83:1881-91.

Baudin F, Petit I, Weissenhorn W, Ruigrok RW. In vitro dissection of the membrane and RNP binding activities of influenza virus M1 protein. Virology. 2001;281:102-8.

Belanov SS, Bychkov D, Benner C, Ripatti S, Ojala T, Kankainen M, Kai Lee H, Wei-Tze TJ, Kainov DE. Genome-Wide Analysis of Evolutionary Markers of Human Influenza A(H1N1)pdm09 and A(H3N2) Viruses May Guide Selection of Vaccine Strain Candidates. Genome Biol Evol. 2015;7:3472-83.

Bello M. Impact of tetramerization on the ligand recognition of N1 influenza neuraminidase via MMGBSA approach. Biopolymers. 2019;110:e23251.

Beppu Y, Imamura Y, Tashiro M, Towatari T, Ariga H, Kido H. Human mucus protease inhibitor in airway fluids is a potential defensive compound against infection with influenza A and Sendai viruses. J Biochem. 1997;121:309-16.

Beveridge WI. The chronicle of influenza epidemics. Hist Philos Life Sci. 1991;13:223-34.

Beyer WE, Versluis DJ, Kramer P, Diderich PP, Weimar W, Masurel N. Trivalent influenza vaccine in patients on haemodialysis: impaired seroresponse with differences for A-H3N2 and A-H1N1 vaccine components. Vaccine. 1987;5:43-8.

Bianco C, Mohr I. Ribosome biogenesis restricts innate immune responses to virus infection and DNA. Elife. 2019;8.

Bikard D, Marraffini LA. Innate and adaptive immunity in bacteria: mechanisms of programmed genetic variation to fight bacteriophages. Curr Opin Immunol. 2012;24:15-20.

Bornholdt ZA, Prasad BV. X-ray structure of influenza virus NS1 effector domain. Nat Struct Mol Biol. 2006;13:559-60.

Bortesi L, Fischer R. The CRISPR/Cas9 system for plant genome editing and beyond. Biotechnol Adv. 2015;33:41-52.

Botos I, Segal DM, Davies DR. The structural biology of Toll-like receptors. Structure. 2011;19:447-59.

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;34:609-18.

Bram RJ, Lue NF, Kornberg RD. A GAL family of upstream activating sequences in yeast: roles in both induction and repression of transcription. EMBO J. 1986;5:603-8.

Brass AL, Huang IC, Benita Y, John SP, Krishnan MN, Feeley EM, Ryan BJ, Weyer JL, van der Weyden L, Fikrig E, Adams DJ, Xavier RJ, Farzan M, Elledge SJ. The IFITM proteins mediate cellular resistance to influenza A H1N1 virus, West Nile virus, and dengue virus. Cell. 2009;139:1243-54.

Brilot AF, Korostelev AA, Ermolenko DN, Grigorieff N. Structure of the ribosome with elongation factor G trapped in the pretranslocation state. Proc Natl Acad Sci U S A. 2013;110:20994-9.

Broszeit F, Tzarum N, Zhu X, Nemanichvili N, Eggink D, Leenders T, Li Z, Liu L, Wolfert MA, Papanikolaou A, Martinez-Romero C, Gagarinov IA, Yu W, Garcia-Sastre A, Wennekes T, Okamatsu M, Verheije MH, Wilson IA, Boons GJ, de Vries RP. N-Glycolylneuraminic Acid as a Receptor for Influenza A Viruses. Cell Rep. 2019;27:3284-94 e6.

Bui M, Wills EG, Helenius A, Whittaker GR. Role of the influenza virus M1 protein in nuclear export of viral ribonucleoproteins. J Virol. 2000;74:1781-6.

Burgui I, Aragon T, Ortin J, Nieto A. PABP1 and eIF4GI associate with influenza virus NS1 protein in viral mRNA translation initiation complexes. J Gen Virol. 2003;84:3263-74.

Burnham AJ, Armstrong J, Lowen AC, Webster RG, Govorkova EA. Competitive fitness of influenza B viruses with neuraminidase inhibitor-resistant substitutions in a coinfection model of the human airway epithelium. J Virol. 2015;89:4575-87.

Bushell M, Sarnow P. Hijacking the translation apparatus by RNA viruses. J Cell Biol. 2002;158:395-9.

Buttner K, Nehring S, Hopfner KP. Structural basis for DNA duplex separation by a superfamily-2 helicase. Nat Struct Mol Biol. 2007;14:647-52.

Cao W, Taylor AK, Biber RE, Davis WG, Kim JH, Reber AJ, Chirkova T, De La Cruz JA, Pandey A, Ranjan P, Katz JM, Gangappa S, Sambhara S. Rapid differentiation of monocytes into type I IFN-producing myeloid dendritic cells as an antiviral strategy against influenza virus infection. J Immunol. 2012;189:2257-65.

Cao Y, Portela M, Janikiewicz J, Doig J, Abbott CM. Characterisation of translation elongation factor eEF1B subunit expression in mammalian cells and tissues and co-localisation with eEF1A2. PLoS One. 2014;9:e114117.

Carr SM, Carnero E, Garcia-Sastre A, Brownlee GG, Fodor E. Characterization of a mitochondrial-targeting signal in the PB2 protein of influenza viruses. Virology. 2006;344:492-508.

Carrillo B, Choi JM, Bornholdt ZA, Sankaran B, Rice AP, Prasad BV. The influenza A virus protein NS1 displays structural polymorphism. J Virol. 2014;88:4113-22.

Cermak T, Doyle EL, Christian M, Wang L, Zhang Y, Schmidt C, Baller JA, Somia NV, Bogdanove AJ, Voytas DF. Efficient design and assembly of custom TALEN and other TAL effector-based constructs for DNA targeting. Nucleic Acids Res. 2011;39:e82.

Chakrabarti AK, Pasricha G. An insight into the PB1-F2 protein and its multifunctional role in enhancing the pathogenicity of the influenza A viruses. Virology. 2013;440:97-104.

Chan MC, Cheung CY, Chui WH, Tsao SW, Nicholls JM, Chan YO, Chan RW, Long HT, Poon LL, Guan Y, S J. Proinflammatory cytokine responses induced by influenza A (H5N1) viruses in primary human alveolar and bronchial epithelial cells. Respir Res. 2005;6:135.

Chan RW, Yuen KM, Yu WC, Ho CC, Nicholls JM, Peiris JS, Chan MC. Influenza H5N1 and H1N1 virus replication and innate immune responses in bronchial epithelial cells are influenced by the state of differentiation. PLoS One. 2010;5:e8713.

Chelbi-Alix MK, Wietzerbin J. Interferon, a growing cytokine family: 50 years of interferon research. Biochimie. 2007;89:713-8.

Chen G, Liu CH, Zhou L, Krug RM. Cellular DDX21 RNA helicase inhibits influenza A virus replication but is counteracted by the viral NS1 protein. Cell Host Microbe. 2014;15:484-93.

Chen G, Ma LC, Wang S, Woltz RL, Grasso EM, Montelione GT, Krug RM. A double-stranded RNA platform is required for the interaction between a host restriction factor and the NS1 protein of influenza A virus. Nucleic Acids Res. 2020;48:304-15.

Chen H, Wurm T, Britton P, Brooks G, Hiscox JA. Interaction of the coronavirus nucleoprotein with nucleolar antigens and the host cell. J Virol. 2002;76:5233-50.

Chen J, Huang S, Chen Z. Human cellular protein nucleoporin hNup98 interacts with influenza A virus NS2/nuclear export protein and overexpression of its GLFG repeat domain can inhibit virus propagation. J Gen Virol. 2010;91:2474-84.

Chen W, Calvo PA, Malide D, Gibbs J, Schubert U, Bacik I, Basta S, O'Neill R, Schickli J, Palese P, Henklein P, Bennink JR, Yewdell JW. A novel influenza A virus mitochondrial protein that induces cell death. Nat Med. 2001;7:1306-12.

Chen W, Zhong Y, Qin Y, Sun S, Li Z. The evolutionary pattern of glycosylation sites in influenza virus (H5N1) hemagglutinin and neuraminidase. PLoS One. 2012;7:e49224.

Chen Z, Li Y, Krug RM. Influenza A virus NS1 protein targets poly(A)-binding protein II of the cellular 3'-end processing machinery. EMBO J. 1999;18:2273-83.

Cheng W, Chen G, Jia H, He X, Jing Z. DDX5 RNA Helicases: Emerging Roles in Viral Infection. Int J Mol Sci. 2018;19.

Chiba S, Hill-Batorski L, Neumann G, Kawaoka Y. The Cellular DExD/H-Box RNA Helicase UAP56 Co-localizes With the Influenza A Virus NS1 Protein. Front Microbiol. 2018;9:2192.

Chien CY, Tejero R, Huang Y, Zimmerman DE, Rios CB, Krug RM, Montelione GT. A novel RNA-binding motif in influenza A virus non-structural protein 1. Nat Struct Biol. 1997;4:891-5.

Chien CY, Xu Y, Xiao R, Aramini JM, Sahasrabudhe PV, Krug RM, Montelione GT. Biophysical characterization of the complex between double-stranded RNA and the N-terminal domain of the NS1 protein from influenza A virus: evidence for a novel RNA-binding mode. Biochemistry. 2004;43:1950-62.

Choudhary C, Kumar C, Gnad F, Nielsen ML, Rehman M, Walther TC, Olsen JV, Mann M. Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. Science. 2009;325:834-40.

Cimarelli A, Luban J. Translation elongation factor 1-alpha interacts specifically with the human immunodeficiency virus type 1 Gag polyprotein. J Virol. 1999;73:5388-401.

Coloma R, Valpuesta JM, Arranz R, Carrascosa JL, Ortin J, Martin-Benito J. The structure of a biologically active influenza virus ribonucleoprotein complex. PLoS Pathog. 2009;5:e1000491.

Conenello GM, Tisoncik JR, Rosenzweig E, Varga ZT, Palese P, Katze MG. A single N66S mutation in the PB1-F2 protein of influenza A virus increases virulence by inhibiting the early interferon response in vivo. J Virol. 2011;85:652-62.

Cong L, Ran FA, Cox D, Lin S, Barretto R, Habib N, Hsu PD, Wu X, Jiang W, Marraffini LA, Zhang F. Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. Science. 2013;339:819-23.

Copeland CS, Doms RW, Bolzau EM, Webster RG, Helenius A. Assembly of influenza hemagglutinin trimers and its role in intracellular transport. J Cell Biol. 1986;103:1179-91.

Corbi N, Batassa EM, Pisani C, Onori A, Di Certo MG, Strimpakos G, Fanciulli M, Mattei E, Passananti C. The eEF1gamma subunit contacts RNA polymerase II and binds vimentin promoter region. PLoS One. 2010;5:e14481.

Couch RB. Orthomyxoviruses. In: th, Baron S, editors. Medical Microbiology. Galveston (TX)1996.

Cribbs AP, Perera SMW. Science and Bioethics of CRISPR-Cas9 Gene Editing: An Analysis Towards Separating Facts and Fiction. Yale J Biol Med. 2017;90:625-34.

Crisci E, Mussa T, Fraile L, Montoya M. Review: Influenza virus in pigs. Molecular Immunology. 2013;55:200-11.

Crotta S, Davidson S, Mahlakoiv T, Desmet CJ, Buckwalter MR, Albert ML, Staeheli P, Wack A. Type I and type III interferons drive redundant amplification loops to induce a transcriptional signature in influenza-infected airway epithelia. PLoS Pathog. 2013;9:e1003773.

Cuesta R, Xi Q, Schneider RJ. Structural basis for competitive inhibition of eIF4G-Mnk1 interaction by the adenovirus 100-kilodalton protein. J Virol. 2004;78:7707-16.

Cunha BA. Influenza: historical aspects of epidemics and pandemics. Infect Dis Clin North Am. 2004;18:141-55.

Darnell JE, Jr., Kerr IM, Stark GR. Jak-STAT pathways and transcriptional activation in response to IFNs and other extracellular signaling proteins. Science. 1994;264:1415-21.

Das K, Ma LC, Xiao R, Radvansky B, Aramini J, Zhao L, Marklund J, Kuo RL, Twu KY, Arnold E, Krug RM, Montelione GT. Structural basis for suppression of a host antiviral response by influenza A virus. Proc Natl Acad Sci U S A. 2008;105:13093-8.

Daugeron MC, Kressler D, Linder P. Dbp9p, a putative ATP-dependent RNA helicase involved in 60S-ribosomal-subunit biogenesis, functionally interacts with Dbp6p. RNA. 2001;7:1317-34.

de la Luna S, Fortes P, Beloso A, Ortin J. Influenza virus NS1 protein enhances the rate of translation initiation of viral mRNAs. J Virol. 1995;69:2427-33.

de Pater S, Neuteboom LW, Pinas JE, Hooykaas PJ, van der Zaal BJ. ZFN-induced mutagenesis and gene-targeting in Arabidopsis through Agrobacterium-mediated floral dip transformation. Plant Biotechnol J. 2009;7:821-35.

Di Pietro A, Kajaste-Rudnitski A, Oteiza A, Nicora L, Towers GJ, Mechti N, Vicenzi E. TRIM22 inhibits influenza A virus infection by targeting the viral nucleoprotein for degradation. J Virol. 2013;87:4523-33.

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;458:914-8.

Diot C, Fournier G, Dos Santos M, Magnus J, Komarova A, van der Werf S, Munier S, Naffakh N. Influenza A Virus Polymerase Recruits the RNA Helicase DDX19 to Promote the Nuclear Export of Viral mRNAs. Sci Rep. 2016;6:33763.

Doll MK, Winters N, Boikos C, Kraicer-Melamed H, Gore G, Quach C. Safety and effectiveness of neuraminidase inhibitors for influenza treatment, prophylaxis, and outbreak control: a systematic review of systematic reviews and/or meta-analyses. J Antimicrob Chemother. 2017;72:2990-3007.

Donelan NR, Dauber B, Wang X, Basler CF, Wolff T, Garcia-Sastre A. The N- and C-terminal domains of the NS1 protein of influenza B virus can independently inhibit IRF-3 and beta interferon promoter activation. J Virol. 2004;78:11574-82.

Draghi M, Pashine A, Sanjanwala B, Gendzekhadze K, Cantoni C, Cosman D, Moretta A, Valiante NM, Parham P. NKp46 and NKG2D recognition of infected dendritic cells is necessary for NK cell activation in the human response to influenza infection. J Immunol. 2007;178:2688-98.

Dubois J, Terrier O, Rosa-Calatrava M. Influenza viruses and mRNA splicing: doing more with less. mBio. 2014;5:e00070-14.

Dumont S, Cheng W, Serebrov V, Beran RK, Tinoco I, Jr., Pyle AM, Bustamante C. RNA translocation and unwinding mechanism of HCV NS3 helicase and its coordination by ATP. Nature. 2006;439:105-8.

Edgcomb SP, Carmel AB, Naji S, Ambrus-Aikelin G, Reyes JR, Saphire AC, Gerace L, Williamson JR. DDX1 is an RNA-dependent ATPase involved in HIV-1 Rev function and virus replication. J Mol Biol. 2012;415:61-74.

Elleman CJ, Barclay WS. The M1 matrix protein controls the filamentous phenotype of influenza A virus. Virology. 2004;321:144-53.

Enami M. [Structure and function of influenza virus NS1 and NS2 proteins]. Nihon Rinsho. 1997;55:2605-9.

Engelhardt OG, Smith M, Fodor E. Association of the influenza A virus RNA-dependent RNA polymerase with cellular RNA polymerase II. J Virol. 2005;79:5812-8.

Evans CH. Cytokines and viral anti-immune genes. Stem Cells. 1996;14:177-84.

Falk K, Aspehaug V, Vlasak R, Endresen C. Identification and characterization of viral structural proteins of infectious salmon anemia virus. J Virol. 2004;78:3063-71.

Fields S, Song O. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. Nature. 1989;340:245-6.

Flynn O, Gallagher C, Mooney J, Irvine C, Ducatez M, Hause B, McGrath G, Ryan E. Influenza D Virus in Cattle, Ireland. Emerg Infect Dis. 2018;24:389-91.

Fortes P, Beloso A, Ortin J. Influenza virus NS1 protein inhibits pre-mRNA splicing and blocks mRNA nucleocytoplasmic transport. EMBO J. 1994;13:704-12.

Franchi L, Eigenbrod T, Munoz-Planillo R, Nunez G. The inflammasome: a caspase-1-activation platform that regulates immune responses and disease pathogenesis. Nat Immunol. 2009;10:241-7.

Francis T, Jr. A. New Type of Virus from Epidemic Influenza. Science. 1940;92:405-8.

Fu SZ, Yang WP, Ru Y, Zhang KS, Wang Y, Liu XT, Li D, Zheng HX. DDX56 cooperates with FMDV 3A to enhance FMDV replication by inhibiting the phosphorylation of IRF3. Cell Signal. 2019;64:109393.

Fujii R, Okamoto M, Aratani S, Oishi T, Ohshima T, Taira K, Baba M, Fukamizu A, Nakajima T. A Role of RNA Helicase A in cis-Acting Transactivation Response Element-mediated Transcriptional Regulation of Human Immunodeficiency Virus Type 1. J Biol Chem. 2001;276:5445-51.

Fujioka Y, Tsuda M, Hattori T, Sasaki J, Sasaki T, Miyazaki T, Ohba Y. The Ras-PI3K signaling pathway is involved in clathrin-independent endocytosis and the internalization of influenza viruses. PLoS One. 2011;6:e16324.

Fujisawa H. Inhibitory role of neutrophils on influenza virus multiplication in the lungs of mice. Microbiol Immunol. 2001;45:679-88.

Fukuzawa M, Abe T, Williams JG. The Dictyostelium prestalk cell inducer DIF regulates nuclear accumulation of a STAT protein by controlling its rate of export from the nucleus. Development. 2003;130:797-804.

Fuller-Pace FV. DExD/H box RNA helicases: multifunctional proteins with important roles in transcriptional regulation. Nucleic Acids Res. 2006;34:4206-15.

Gack MU, Albrecht RA, Urano T, Inn KS, Huang IC, Carnero E, Farzan M, Inoue S, Jung JU, Garcia-Sastre A. Influenza A virus NS1 targets the ubiquitin ligase TRIM25 to evade recognition by the host viral RNA sensor RIG-I. Cell Host Microbe. 2009;5:439-49.

Gack MU, Shin YC, Joo CH, Urano T, Liang C, Sun L, O. Takeuchi O, Akira S, Chen Z, Inoue S, Jung JU. TRIM25 RING-finger E3 ubiquitin ligase is essential for RIG-I-mediated antiviral activity. Nature. 2007;446:916-20.

Gadal O, Strauss D, Kessl J, Trumpower B, Tollervey D, Hurt E. Nuclear export of 60s ribosomal subunits depends on Xpo1p and requires a nuclear export sequence-containing factor, Nmd3p, that associates with the large subunit protein Rpl10p. Mol Cell Biol. 2001;21:3405-15.

Gaj T, Gersbach CA, Barbas CF, 3rd. ZFN, TALEN, and CRISPR/Cas-based methods for genome engineering. Trends Biotechnol. 2013;31:397-405.

Galabru J, Hovanessian A. Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. J Biol Chem. 1987;262:15538-44.

Gao J, Morrison DC, Parmely TJ, Russell SW, Murphy WJ. An interferon-gamma-activated site (GAS) is necessary for full expression of the mouse iNOS gene in response to interferon-gamma and lipopolysaccharide. J Biol Chem. 1997;272:1226-30.

Gao S, Song L, Li J, Zhang Z, Peng H, Jiang W, Wang Q, Kang T, Chen S, Huang W. Influenza A virus-encoded NS1 virulence factor protein inhibits innate immune response by targeting IKK. Cell Microbiol. 2012;14:1849-66.

Garcia-Sosa AT, Sild S, Maran U. Design of multi-binding-site inhibitors, ligand efficiency, and consensus screening of avian influenza H5N1 wild-type neuraminidase and of the oseltamivir-resistant H274Y variant. J Chem Inf Model. 2008;48:2074-80.

Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. Cas9-crRNA ribonucleoprotein complex mediates specific DNA cleavage for adaptive immunity in bacteria. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:E2579-86.

Gatherer D. The 2009 H1N1 influenza outbreak in its historical context. J Clin Virol. 2009;45:174-8.

Giacomini A, Corich V, Ollero FJ, Squartini A, Nuti MP. Experimental conditions may affect reproducibility of the beta-galactosidase assay. FEMS Microbiol Lett. 1992;100:87-90.

Gonzalez S, Zurcher T, Ortin J. Identification of two separate domains in the influenza virus PB1 protein involved in the interaction with the PB2 and PA subunits: a model for the viral RNA polymerase structure. Nucleic Acids Res. 1996;24:4456-63.

Goraya MU, Wang S, Munir M, Chen JL. Induction of innate immunity and its perturbation by influenza viruses. Protein Cell. 2015;6:712-21.

Goraya MU, Zaighum F, Sajjad N, Anjum FR, Sakhawat I, Rahman SU. Web of interferon stimulated antiviral factors to control the influenza A viruses replication. Microb Pathog. 2020;139:103919.

Gorbalenya AE, Koonin EV, Donchenko AP, Blinov VM. Two related superfamilies of putative helicases involved in replication, recombination, repair and expression of DNA and RNA genomes. Nucleic Acids Res. 1989;17:4713-30.

Gottschalk A. Neuraminidase: the specific enzyme of influenza virus and Vibrio cholerae. Biochim Biophys Acta. 1957;23:645-6.

Goubau D, Schlee M, Deddouche S, Pruijssers AJ, Zillinger T, Goldeck M, Schuberth C, Van der Veen AG, Fujimura T, Rehwinkel J, Iskarpatyoti JA, Barchet W, Ludwig J, Dermody TS, Hartmann G, Reis e Sousa C. Antiviral immunity via RIG-I-mediated recognition of RNA bearing 5'-diphosphates. Nature. 2014;514:372-5.

Graham AC, Hilmer KM, Zickovich JM, Obar JJ. Inflammatory response of mast cells during influenza A virus infection is mediated by active infection and RIG-I signaling. J Immunol. 2013;190:4676-84.

Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. J Gen Virol. 1977;36:59-74.

Greenspan D, Palese P, Krystal M. Two nuclear location signals in the influenza virus NS1 nonstructural protein. J Virol. 1988;62:3020-6.

Gu L, Fullam A, Brennan R, Schroder M. Human DEAD box helicase 3 couples IkappaB kinase epsilon to interferon regulatory factor 3 activation. Mol Cell Biol. 2013;33:2004-15.

Guan Z, Liu D, Mi S, Zhang J, Ye Q, Wang M, Gao GF, Yan J. Interaction of Hsp40 with influenza virus M2 protein: implications for PKR signaling pathway. Protein Cell. 2010;1:944-55.

Guermonprez P, Valladeau J, Zitvogel L, Thery C, Amigorena S. Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. Annu Rev Immunol. 2002;20:621-67.

Guilligay D, Kadlec J, Crepin T, Lunardi T, Bouvier D, Kochs G, Ruigrok RW, Cusack S. Comparative structural and functional analysis of orthomyxovirus polymerase cap-snatching domains. PLoS One. 2014;9:e84973.

Guilligay D, Tarendeau F, Resa-Infante P, Coloma R, Crepin T, Sehr P, Lewis J, Ruigrok RW, Ortin J, Hart DJ, Cusack S. The structural basis for cap binding by influenza virus polymerase subunit PB2. Nat Struct Mol Biol. 2008;15:500-6.

Gultyaev AP, Fouchier RA, Olsthoorn RC. Influenza virus RNA structure: unique and common features. Int Rev Immunol. 2010;29:533-56.

Guo Z, Chen LM, Zeng H, Gomez JA, Plowden J, Fujita T, Katz JM, Donis RO, Sambhara S. NS1 protein of influenza A virus inhibits the function of intracytoplasmic pathogen sensor, RIG-I. Am J Respir Cell Mol Biol. 2007;36:263-9.

Hale BG, Barclay WS, Randall RE, Russell RJ. Structure of an avian influenza A virus NS1 protein effector domain. Virology. 2008;378:1-5.

Hale BG, Batty IH, Downes CP, Randall RE. Binding of influenza A virus NS1 protein to the inter-SH2 domain of p85 suggests a novel mechanism for phosphoinositide 3-kinase activation. J Biol Chem. 2008;283:1372-80.

Hale BG, Randall RE, Ortin J, Jackson D. The multifunctional NS1 protein of influenza A viruses. J Gen Virol. 2008;89:2359-76.

Han H, Cui ZQ, Wang W, Zhang ZP, Wei HP, Zhou YF, Zhang XE. New regulatory mechanisms for the intracellular localization and trafficking of influenza A virus NS1 protein revealed by comparative analysis of A/PR/8/34 and A/Sydney/5/97. J Gen Virol. 2010;91:2907-17.

Han P, Chen C. Detergent-free biotin switch combined with liquid chromatography/tandem mass spectrometry in the analysis of S-nitrosylated proteins. Rapid Commun Mass Spectrom. 2008;22:1137-45.

Hanika A, Larisch B, Steinmann E, Schwegmann-Wessels C, Herrler G, Zimmer G. Use of influenza C virus glycoprotein HEF for generation of vesicular stomatitis virus pseudotypes. J Gen Virol. 2005;86:1455-65.

Hara K, Schmidt FI, Crow M, Brownlee GG. Amino acid residues in the N-terminal region of the PA subunit of influenza A virus RNA polymerase play a critical role in protein stability, endonuclease activity, cap binding, and virion RNA promoter binding. J Virol. 2006;80:7789-98.

Hashimoto Y, Moki T, Takizawa T, Shiratsuchi A, Nakanishi Y. Evidence for phagocytosis of influenza virus-infected, apoptotic cells by neutrophils and macrophages in mice. J Immunol. 2007;178:2448-57.

Hassan MK, Kumar D, Naik M, Dixit M. The expression profile and prognostic significance of eukaryotic translation elongation factors in different cancers. PLoS One. 2018;13:e0191377.

Hatada E, Fukuda R. Binding of influenza A virus NS1 protein to dsRNA in vitro. J Gen Virol. 1992;73:3325-9.

Hatada E, Saito S, Fukuda R. Mutant influenza viruses with a defective NS1 protein cannot block the activation of PKR in infected cells. J Virol. 1999;73:2425-33.

Hause BM, Ducatez M, Collin EA, Ran Z, Liu R, Sheng Z, , Armien A, Kaplan B, Chakravarty S, Hoppe AD, Webby RJ, Simonson RR, Li F. Isolation of a novel swine influenza virus from Oklahoma in 2011 which is distantly related to human influenza C viruses. PLoS Pathog. 2013;9:e1003176.

Hayashi T, Chaimayo C, McGuinness J, Takimoto T. Critical Role of the PA-X C-Terminal Domain of Influenza A Virus in Its Subcellular Localization and Shutoff Activity. J Virol. 2016;90:7131-41.

He Y, Andersen GR, Nielsen KH. Structural basis for the function of DEAH helicases. EMBO Rep. 2010;11:180-6.

Hedges J, West M, Johnson AW. Release of the export adapter, Nmd3p, from the 60S ribosomal subunit requires Rpl10p and the cytoplasmic GTPase Lsg1p. EMBO J. 2005;24:567-79.

Herold S, Steinmueller M, von Wulffen W, Cakarova L, Pinto R, Pleschka S, Mack M, Kuziel WA, Corazza N, Brunner T, Seeger W, Lohmeyer J. Lung epithelial apoptosis in influenza virus pneumonia: the role of macrophage-expressed TNF-related apoptosis-inducing ligand. J Exp Med. 2008;205:3065-77.

Hille F, Charpentier E. CRISPR-Cas: biology, mechanisms and relevance. Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci. 2016;371(1707).

Hiscott J, Pitha P, Genin P, Nguyen H, Heylbroeck C, Mamane Y, Algarte M, Lin R. Triggering the interferon response: the role of IRF-3 transcription factor. J Interferon Cytokine Res. 1999;19:1-13.

Ho JH, Kallstrom G, Johnson AW. Nmd3p is a Crm1p-dependent adapter protein for nuclear export of the large ribosomal subunit. J Cell Biol. 2000;151:1057-66.

Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 integral membrane protein is a homotetramer stabilized by formation of disulfide bonds. Virology. 1991;183:32-43.

Honda A, Ueda K, Nagata K, Ishihama A. RNA polymerase of influenza virus: role of NP in RNA chain elongation. J Biochem. 1988;104:1021-6.

Hooker L, Sully R, Handa B, Ono N, Koyano H, Klumpp K. Quantitative analysis of influenza virus RNP interaction with RNA cap structures and comparison to human cap binding protein eIF4E. Biochemistry. 2003;42:6234-40.

Hou W, Gibbs JS, Lu X, Brooke CB, Roy D, Modlin RL, Bennink JR, Yewdell JW. Viral infection triggers rapid differentiation of human blood monocytes into dendritic cells. Blood. 2012;119:3128-31.

Hsieh HP, Hsu JT. Strategies of development of antiviral agents directed against influenza virus replication. Curr Pharm Des. 2007;13:3531-42.

Hsu MT, Parvin JD, Gupta S, Krystal M, Palese P. Genomic RNAs of influenza viruses are held in a circular conformation in virions and in infected cells by a terminal panhandle. Proc Natl Acad Sci U S A. 1987;84:8140-4.

Huang SSH, Banner D, Paquette SG, Leon AJ, Kelvin AA, Kelvin DJ. Pathogenic influenza B virus in the ferret model establishes lower respiratory tract infection. J Gen Virol. 2014;95:2127-39.

Huang SY, Zou X. Advances and challenges in protein-ligand docking. Int J Mol Sci. 2010;11:3016-34.

Huang Y, Carmichael GG. Role of polyadenylation in nucleocytoplasmic transport of mRNA. Mol Cell Biol. 1996;16:1534-42.

Hunter PR. The English sweating sickness, with particular reference to the 1551 outbreak in Chester. Rev Infect Dis. 1991;13:303-6.

Ilyushina NA, Bovin NV, Webster RG. Decreased neuraminidase activity is important for the adaptation of H5N1 influenza virus to human airway epithelium. J Virol. 2012;86:4724-33.

Inoue H, Nojima H, Okayama H. High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. Gene. 1990;96:23-8.

Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. Proc R Soc Lond B Biol Sci. 1957;147:258-67.

Ishino Y, Shinagawa H, Makino K, Amemura M, Nakata A. Nucleotide sequence of the iap gene, responsible for alkaline phosphatase isozyme conversion in Escherichia coli, and identification of the gene product. J Bacteriol. 1987;169:5429-33.

Jackson D, Lamb RA. The influenza A virus spliced messenger RNA M mRNA3 is not required for viral replication in tissue culture. J Gen Virol. 2008;89:3097-101.

Jagger BW, Wise HM, Kash JC, Walters KA, Wills NM, Xiao YL, Dunfee RL, Schwartzman LM, Ozinsky A, Bell GL, Dalton RM, Lo A, Efstathiou S, Atkins JF,

Firth AE, Taubenberger JK, Digard P. An overlapping protein-coding region in influenza A virus segment 3 modulates the host response. Science. 2012;337:199-204.

James P, Halladay J, Craig EA. Genomic libraries and a host strain designed for highly efficient two-hybrid selection in yeast. Genetics. 1996;144:1425-36.

Jang J, Bae SE. Comparative Co-Evolution Analysis Between the HA and NA Genes of Influenza A Virus. Virology (Auckl). 2018;9:1178122X18788328.

Jansen R, Embden JD, Gaastra W, Schouls LM. Identification of genes that are associated with DNA repeats in prokaryotes. Mol Microbiol. 2002;43:1565-75.

Jeang KT, Yedavalli V. Role of RNA helicases in HIV-1 replication. Nucleic Acids Res. 2006;34:4198-205.

Jeppesen MG, Ortiz P, Shepard W, Kinzy TG, Nyborg J, Andersen GR. The crystal structure of the glutathione S-transferase-like domain of elongation factor 1Bgamma from Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem. 2003;278:47190-8.

Jia D, Rahbar R, Chan RW, Lee SM, Chan MC, Wang BX, Baker DP, Sun B, Peiris JS, Nicholls JM, Fish EN. Influenza virus non-structural protein 1 (NS1) disrupts interferon signaling. PLoS One. 2010;5:e13927.

Jiang F, Doudna JA. The structural biology of CRISPR-Cas systems. Curr Opin Struct Biol. 2015;30:100-11.

Jiao P, Tian G, Li Y, Deng G, Jiang Y, Liu C, W. Liu W, Bu Z, Kawaoka Y, Chen H. A single-amino-acid substitution in the NS1 protein changes the pathogenicity of H5N1 avian influenza viruses in mice. J Virol. 2008;82:1146-54.

Jimenez-Garcia B, Pons C, Fernandez-Recio J. pyDockWEB: a web server for rigid-body protein-protein docking using electrostatics and desolvation scoring. Bioinformatics. 2013;29:1698-9.

John SP, Chin CR, Perreira JM, Feeley EM, Aker AM, Savidis G, Smith SE, Elia AE, Everitt AR, Vora M, Pertel T, Elledge SJ, Kellam P, Brass AL. The CD225 domain of IFITM3 is required for both IFITM protein association and inhibition of influenza A virus and dengue virus replication. J Virol. 2013;87:7837-52.

Johnson AW, Lund E, Dahlberg J. Nuclear export of ribosomal subunits. Trends Biochem Sci. 2002;27:580-5.

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;38:945-9.

Jones LD, Nuttall PA. Non-viraemic transmission of Thogoto virus: influence of time and distance. Trans R Soc Trop Med Hyg. 1989;83:712-4.

Juozapaitis M, Antoniukas L. [Influenza virus]. Medicina (Kaunas). 2007;43:919-29.

Kallstrom G, Hedges J, Johnson A. The putative GTPases Nog1p and Lsg1p are required for 60S ribosomal subunit biogenesis and are localized to the nucleus and cytoplasm, respectively. Mol Cell Biol. 2003;23:4344-55.

Karbstein K. Role of GTPases in ribosome assembly. Biopolymers. 2007;87:1-11.

Kargas V, Castro-Hartmann P, Escudero-Urquijo N, Dent K, Hilcenko C, Sailer C, Zisser G, Marques-Carvalho MJ, Pellegrino S, Wawiorka L, Freund SM, Wagstaff JL, Andreeva A, Faille A, Chen E, Stengel F, Bergler H, Warren AJ. Mechanism of completion of peptidyltransferase centre assembly in eukaryotes. Elife. 2019;8.

Karin M, Delhase M. The I kappa B kinase (IKK) and NF-kappa B: key elements of proinflammatory signalling. Semin Immunol. 2000;12:85-98.

Katze MG, He Y, Gale M, Jr. Viruses and interferon: a fight for supremacy. Nat Rev Immunol. 2002;2:675-87.

Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. Nat Immunol. 2010;11:373-84.

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

Khan FJ, Yuen G, Luo J. Multiplexed CRISPR/Cas9 gene knockout with simple crRNA:tracrRNA co-transfection. Cell Biosci. 2019;9:41.

Kim HM, Lee YW, Lee KJ, Kim HS, Cho SW, van Rooijen N, Guan NY, Seo SH. Alveolar macrophages are indispensable for controlling influenza viruses in lungs of pigs. J Virol. 2008;82:4265-74.

Kim JI, Hwang MW, Lee I, Park S, Lee S, Bae JY, Heo J, Kim D, Jang SI, Park MS, Kwon HJ, Song JW, Park MS. The PDZ-binding motif of the avian NS1 protein affects transmission of the 2009 influenza A(H1N1) virus. Biochem Biophys Res Commun. 2014;449:19-25.

Kirui J, Bucci MD, Poole DS, Mehle A. Conserved features of the PB2 627 domain impact influenza virus polymerase function and replication. J Virol. 2014;88:5977-86.

Knapp S, Yee LJ, Frodsham AJ, Hennig BJ, Hellier S, Zhang L, Wright M, Chiaramonte M, Graves M, Thomas HC, Hill AV, Thursz MR. Polymorphisms in interferon-induced genes and the outcome of hepatitis C virus infection: roles of MxA, OAS-1 and PKR. Genes Immun. 2003;4:411-9.

Kochs G, Garcia-Sastre A, Martinez-Sobrido L. Multiple anti-interferon actions of the influenza A virus NS1 protein. J Virol. 2007;81:7011-21.

Koliopoulos MG, Lethier M, van der Veen AG, Haubrich K, Hennig J, Kowalinski E, Stevens RV, Martin SR, Reis e Sousa C, Cusack S, Rittinger K. Molecular mechanism of influenza A NS1-mediated TRIM25 recognition and inhibition. Nat Commun. 2018;9:1820.

Kollerova E, Betakova T. Influenza viruses and their ion channels. Acta Virol. 2006;50:7-16.

Kolpashchikov DM, Honda A, Ishihama A. Structure-function relationship of the influenza virus RNA polymerase: primer-binding site on the PB1 subunit. Biochemistry. 2004;43:5882-7.

Koonin EV, Mushegian AR, Tatusov RL, Altschul SF, Bryant SH, Bork P, Valencia A. Eukaryotic translation elongation factor 1 gamma contains a glutathione transferase domain--study of a diverse, ancient protein superfamily using motif search and structural modeling. Protein Sci. 1994;3:2045-54.

Kotenko SV, Gallagher G, Baurin VV, Lewis-Antes A, Shen M, Shah NK, Langer JA, Sheikh F, Dickensheets H, Donnelly RP. IFN-lambdas mediate antiviral protection through a distinct class II cytokine receptor complex. Nat Immunol. 2003;4:69-77.

Krammer F, Smith GJD, Fouchier RAM, Peiris M, Kedzierska K, Doherty PC, Palese P, Shaw ML, Treanor J, Webster RG, Garcia-Sastre A. Influenza. Nature. 2018;4:3.

Krug RM, Etkind PR. Cytoplasmic and nuclear virus-specific proteins in influenza virus-infected MDCK cells. Virology. 1973;56:334-48.

Krug RM. Functions of the influenza A virus NS1 protein in antiviral defense. Curr Opin Virol. 2015;12:1-6.

Krumbholz A, Philipps A, Oehring H, Schwarzer K, Eitner A, Wutzler P, Zell R. Current knowledge on PB1-F2 of influenza A viruses. Med Microbiol Immunol. 2011;200:69-75.

Ksenofontov AL, Fedorova NV, Badun GA, Timofeeva TA, Grigor'ev VB, Baratova LA, Zhirnov OP. [Localization of the influenza virus M1 matrix protein in the virion]. Mol Biol (Mosk). 1999;33:881-6.

Kuszewski K, Brydak L. The epidemiology and history of influenza. Biomed Pharmacother. 2000;54:188-95.

Lamb RA, Choppin PW, Chanock RM, Lai CJ. Mapping of the two overlapping genes for polypeptides NS1 and NS2 on RNA segment 8 of influenza virus genome. Proc Natl Acad Sci U S A. 1980;77:1857-61.

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;76:4908-12.

Lamb RA, Lai CJ. Sequence of interrupted and uninterrupted mRNAs and cloned DNA coding for the two overlapping nonstructural proteins of influenza virus. Cell. 1980;21:475-85.

Lawrence FJ, McStay B, Matthews DA. Nucleolar protein upstream binding factor is sequestered into adenovirus DNA replication centres during infection without affecting RNA polymerase I location or ablating rRNA synthesis. J Cell Sci. 2006;119:2621-31.

Lawrence P, Rieder E. Identification of RNA helicase A as a new host factor in the replication cycle of foot-and-mouth disease virus. J Virol. 2009;83:11356-66.

Lazarovits J, Naim HY, Rodriguez AC, Wang RH, Fire E, Bird C, Henis YI, Roth MG. Endocytosis of chimeric influenza virus hemagglutinin proteins that lack a cytoplasmic recognition feature for coated pits. J Cell Biol. 1996;134:339-48.

Le Goffic R, Pothlichet J, Vitour D, Fujita T, Meurs E, Chignard M, Si-Tahar M. Cutting Edge: Influenza A virus activates TLR3-dependent inflammatory and RIG-I-dependent antiviral responses in human lung epithelial cells. J Immunol. 2007;178:3368-72.

Le Sourd F, Boulben S, Le Bouffant R, Cormier P, Morales J, Belle R, Mulner-Lorillon O. eEF1B: At the dawn of the 21st century. Biochim Biophys Acta. 2006;1759:13-31.

Leipe DD, Wolf YI, Koonin EV, Aravind L. Classification and evolution of P-loop GTPases and related ATPases. J Mol Biol. 2002;317:41-72.

Leonard WJ, O'Shea JJ. Jaks and STATs: biological implications. Annu Rev Immunol. 1998;16:293-322.

Leong WF, Chow VT. Transcriptomic and proteomic analyses of rhabdomyosarcoma cells reveal differential cellular gene expression in response to enterovirus 71 infection. Cell Microbiol. 2006;8:565-80.

Lew Y, Jones DV, Mars WM, Evans D, Byrd D, Frazier ML. Expression of elongation factor-1 gamma-related sequence in human pancreatic cancer. Pancreas. 1992;7:144-52.

Lewandowski LJ, Content J, Leppla SH. Characterization of the subunit structure of the ribonucleic acid genome of influenza virus. J Virol. 1971;8:701-7.

Li C, Brant E, Budak H, Zhang B. CRISPR/Cas: a Nobel Prize award-winning precise genome editing technology for gene therapy and crop improvement. J Zhejiang Univ Sci B. 2021;22:253-84.

Li D, Fu S, Wu Z, Yang W, Ru Y, Shu H, Liu X, Zheng H. Correction: DDX56 inhibits type I interferon by disrupting assembly of IRF3-IPO5 to inhibit IRF3 nucleus import. J Cell Sci. 2020;133.

Li D, Wei T, Abbott CM, Harrich D. The unexpected roles of eukaryotic translation elongation factors in RNA virus replication and pathogenesis. Microbiol Mol Biol Rev. 2013;77:253-66.

Li J, Tang H, Mullen TM, Westberg C, Reddy TR, Rose DW, Wong-Staal F. A role for RNA helicase A in post-transcriptional regulation of HIV type 1. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:709-14.

Li S, Sieben C, Ludwig K, Hofer CT, Chiantia S, Herrmann A, Schaap IA. pH-Controlled two-step uncoating of influenza virus. Biophys J. 2014;106:1447-56.

Li X, Palese P. Mutational analysis of the promoter required for influenza virus virion RNA synthesis. J Virol. 1992;66:4331-8.

Li Y, Yamakita Y, Krug RM. Regulation of a nuclear export signal by an adjacent inhibitory sequence: the effector domain of the influenza virus NS1 protein. Proc Natl Acad Sci U S A. 1998;95:4864-9.

Li ZN, Lin SC, Carney PJ, Li J, Liu F, Lu X, Liu M, Stevens J, Levine M, Katz JM, Hancock K. IgM, IgG, and IgA antibody responses to influenza A(H1N1)pdm09 hemagglutinin in infected persons during the first wave of the 2009 pandemic in the United States. Clin Vaccine Immunol. 2014;21:1054-60.

Lin D, Lan J, Zhang Z. Structure and function of the NS1 protein of influenza A virus. Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai). 2007;39:155-62.

Lin L, Li Y, Pyo HM, Lu X, Raman SN, Liu Q, Brown EG, Zhou Y. Identification of RNA helicase A as a cellular factor that interacts with influenza A virus NS1 protein and its role in the virus life cycle. J Virol. 2012;86:1942-54.

Linder P, Jankowsky E. From unwinding to clamping - the DEAD box RNA helicase family. Nat Rev Mol Cell Biol. 2011;12:505-16.

Lindstrom SE, Cox NJ, Klimov A. Genetic analysis of human H2N2 and early H3N2 influenza viruses, 1957-1972: evidence for genetic divergence and multiple reassortment events. Virology. 2004;328:101-19.

Liu D, Sheng C, Gao S, Jiang W, Li J, Yao C, Chen H, Wu J, Chen S, Huang W. eEF1Bgamma is a positive regulator of NF-small ka, CyrillicB signaling pathway. Biochem Biophys Res Commun. 2014;446:523-8.

Liu J, Lynch PA, Chien CY, Montelione GT, Krug RM, Berman HM. Crystal structure of the unique RNA-binding domain of the influenza virus NS1 protein. Nat Struct Biol. 1997;4:896-9.

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

Lohrmann F, Dijkman R, Stertz S, Thiel V, Haller O, Staeheli P, Kochs G. Emergence of a C-terminal seven-amino-acid elongation of NS1 in around 1950 conferred a minor growth advantage to former seasonal influenza A viruses. J Virol. 2013;87:11300-3.

Long JC, Fodor E. The PB2 Subunit of the Influenza A Virus RNA Polymerase Is Imported into the Mitochondrial Matrix. J Virol. 2016;90:8729-38.

Long JS, Mistry B, Haslam SM, Barclay WS. Host and viral determinants of influenza A virus species specificity. Nat Rev Microbiol. 2019;17:67-81.

Loo YM, Gale M, Jr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. Immunity. 2011;34:680-92.

Looke M, Kristjuhan K, Kristjuhan A. Extraction of genomic DNA from yeasts for PCR-based applications. Biotechniques. 2011;50:325-8.

Lu X, Shi Y, Gao F, Xiao H, Wang M, Qi J, Gao GF. Insights into avian influenza virus pathogenicity: the hemagglutinin precursor HA0 of subtype H16 has an alpha-helix structure in its cleavage site with inefficient HA1/HA2 cleavage. J Virol. 2012;86:12861-70.

Lu Y, Wambach M, Katze MG, Krug RM. Binding of the influenza virus NS1 protein to double-stranded RNA inhibits the activation of the protein kinase that phosphorylates the elF-2 translation initiation factor. Virology. 1995;214:222-8.

Luczo JM, Ronzulli SL, Tompkins SM. Influenza A Virus Hemagglutinin and Other Pathogen Glycoprotein Interactions with NK Cell Natural Cytotoxicity Receptors NKp46, NKp44, and NKp30. Viruses. 2021;13.

Ludwig S, Wang X, Ehrhardt C, Zheng H, Donelan N, Planz O, Pleschka S, Garcia-Sastre A, Heins G, Wolff T. The influenza A virus NS1 protein inhibits activation of Jun N-terminal kinase and AP-1 transcription factors. J Virol. 2002;76:11166-71.

Luo M, Terrell JR, McManus SA. Nucleocapsid Structure of Negative Strand RNA Virus. Viruses. 2020;12.

Luo W, Tian L, Gan Y, Chen E, Shen X, Pan J, Irwin DM, Chen RA, Shen Y. The fit of codon usage of human-isolated avian influenza A viruses to human. Infect Genet Evol. 2020;81:104181.

Luthy IA, Lamb CA. [Nobel Prize in Chemistry 2020 for gene editing with CRISPR / Cas9 technology]. Medicina (B Aires). 2020;80:738-40.

Ma J, Rong L, Zhou Y, Roy BB, Lu J, Abrahamyan L, Mouland AJ, Pan Q, Liang C. The requirement of the DEAD-box protein DDX24 for the packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA. Virology. 2008;375:253-64.

Ma K, Roy AM, Whittaker GR. Nuclear export of influenza virus ribonucleoproteins: identification of an export intermediate at the nuclear periphery. Virology. 2001;282:215-20.

Ma X, Chen L, Zhu Q, Chen Y, Liu YG. Rapid Decoding of Sequence-Specific Nuclease-Induced Heterozygous and Biallelic Mutations by Direct Sequencing of PCR Products. Mol Plant. 2015;8:1285-7.

Macken CA, Webby RJ, Bruno WJ. Genotype turnover by reassortment of replication complex genes from avian influenza A virus. J Gen Virol. 2006;87:2803-15.

Maeda Y, Horimoto T, Kawaoka Y. [Classification and genome structure of influenza virus]. Nihon Rinsho. 2003;61:1886-91.

Mahy, BMJ. Virology: a practical approach, Animal Virus Research Institue, UK. 1985.

Mali P, Yang L, Esvelt KM, Aach J, Guell M, DiCarlo JE, Norville JE, Church GM. RNA-guided human genome engineering via Cas9. Science. 2013;339:823-6.

Malyutin AG, Musalgaonkar S, Patchett S, Frank J, Johnson AW. Nmd3 is a structural mimic of eIF5A, and activates the cpGTPase Lsg1 during 60S ribosome biogenesis. EMBO J. 2017;36:854-68.

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

Mansilla F, Friis I, Jadidi M, Nielsen KM, Clark BF, Knudsen CR. Mapping the human translation elongation factor eEF1H complex using the yeast two-hybrid system. Biochem J. 2002;365:669-76.

Martin R, Straub AU, Doebele C, Bohnsack MT. DExD/H-box RNA helicases in ribosome biogenesis. RNA Biol. 2013;10:4-18.

Matrosovich MN, Matrosovich TY, Gray T, Roberts NA, Klenk HD. Neuraminidase is important for the initiation of influenza virus infection in human airway epithelium. J Virol. 2004;78:12665-7.

Matsuzaki Y, Katsushima N, Nagai Y, Shoji M, Itagaki T, Sakamoto M, Kitaoka S, Mizuta K, Nishimura H. Clinical features of influenza C virus infection in children. J Infect Dis. 2006;193:1229-35.

Mazur I, Anhlan D, Mitzner D, Wixler L, Schubert U, Ludwig S. The proapoptotic influenza A virus protein PB1-F2 regulates viral polymerase activity by interaction with the PB1 protein. Cell Microbiol. 2008;10:1140-52.

McAuley JL, Tate MD, MacKenzie-Kludas CJ, Pinar A, Zeng W, Stutz A, E. Latz E, Brown LE, Mansell A. Activation of the NLRP3 inflammasome by IAV virulence

protein PB1-F2 contributes to severe pathophysiology and disease. PLoS Pathog. 2013;9:e1003392.

Medina RA, Garcia-Sastre A. Influenza A viruses: new research developments. Nat Rev Microbiol. 2011;9:590-603.

Melen K, Kinnunen L, Fagerlund R, Ikonen N, Twu KY, Krug RM, Julkunen I. Nuclear and nucleolar targeting of influenza A virus NS1 protein: striking differences between different virus subtypes. J Virol. 2007;81:5995-6006.

Melen K, Tynell J, Fagerlund R, Roussel P, Hernandez-Verdun D, Julkunen I. Influenza A H3N2 subtype virus NS1 protein targets into the nucleus and binds primarily via its C-terminal NLS2/NoLS to nucleolin and fibrillarin. Virol J. 2012;9:167.

Mendelson M, Tekoah Y, Zilka A, Gershoni-Yahalom O, Gazit R, Achdout H, Bovin NV, Meningher T, Mandelboim M, Mandelboim O, David A, Porgador A. NKp46 O-glycan sequences that are involved in the interaction with hemagglutinin type 1 of influenza virus. J Virol. 2010;84:3789-97.

Meng W, Han SC, Li CC, Dong HJ, Wang XJ. Multifunctional viral protein gamma34.5 manipulates nucleolar protein NOP53 for optimal viral replication of HSV-1. Cell Death Dis. 2018;9:103.

Merrick WC. Mechanism and regulation of eukaryotic protein synthesis. Microbiol Rev. 1992;56:291-315.

Mielcarska MB, Bossowska-Nowicka M, Gregorczyk-Zboroch KP, Wyzewski Z, Szulc-Dabrowska L, Gierynska M, Toka FN. Syk and Hrs Regulate TLR3-Mediated Antiviral Response in Murine Astrocytes. Oxid Med Cell Longev. 2019;2019:6927380.

Min JY, Krug RM. The primary function of RNA binding by the influenza A virus NS1 protein in infected cells: Inhibiting the 2'-5' oligo (A) synthetase/RNase L pathway. Proc Natl Acad Sci U S A. 2006;103:7100-5.

Min JY, Li S, Sen GC, Krug RM. A site on the influenza A virus NS1 protein mediates both inhibition of PKR activation and temporal regulation of viral RNA synthesis. Virology. 2007;363:236-43.

Mishin VP, Novikov D, Hayden FG, Gubareva LV. Effect of hemagglutinin glycosylation on influenza virus susceptibility to neuraminidase inhibitors. J Virol. 2005;79:12416-24.

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;19:1069-98.

Molinari NA, Ortega-Sanchez IR, Messonnier ML, Thompson WW, Wortley PM, Weintraub E, Bridges CB. The annual impact of seasonal influenza in the US: measuring disease burden and costs. Vaccine. 2007;25:5086-96.

Morens DM, Taubenberger JK, Harvey HA, Memoli MJ. The 1918 influenza pandemic: lessons for 2009 and the future. Crit Care Med. 2010;38 (4 Suppl):e10-20.

Morens DM, Taubenberger JK. The Mother of All Pandemics Is 100 Years Old (and Going Strong)! Am J Public Health. 2018;108:1449-54.

Moriyama M, Chen IY, Kawaguchi A, Koshiba T, Nagata K, Takeyama H, Hasegawa H, Ichinohe T. The RNA- and TRIM25-Binding Domains of Influenza Virus NS1 Protein Are Essential for Suppression of NLRP3 Inflammasome-Mediated Interleukin-1beta Secretion. J Virol. 2016;90:4105-14.

Morris AK, Wang Z, Ivey AL, Xie Y, Hill PS, Schey KL, Ren Y. Cellular mRNA export factor UAP56 recognizes nucleic acid binding site of influenza virus NP protein. Biochem Biophys Res Commun. 2020;525:259-64.

Munch M, Nielsen LP, Handberg KJ, Jorgensen PH. Detection and subtyping (H5 and H7) of avian type A influenza virus by reverse transcription-PCR and PCR-ELISA. Arch Virol. 2001;146:87-97.

Muramoto Y, Noda T, Kawakami E, Akkina R, Kawaoka Y. Identification of novel influenza A virus proteins translated from PA mRNA. J Virol. 2013;87:2455-62.

Murphy BR, Clements ML. The systemic and mucosal immune response of humans to influenza A virus. Curr Top Microbiol Immunol. 1989;146:107-16.

Murti KG, Webster RG, Jones IM. Localization of RNA polymerases on influenza viral ribonucleoproteins by immunogold labeling. Virology. 1988;164:562-6.

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;240:274-81.

Nakajima K. [Influenza virus genome structure and encoded proteins]. Nihon Rinsho. 1997;55:2542-6.

Nakajima K. [The mechanism of antigenic shift and drift of human influenza virus]. Nihon Rinsho. 2003;61:1897-903.

Nakayama M, Ishihama A. [Structure and function of mouse Mx 1 protein]. Tanpakushitsu Kakusan Koso. 1992;37 (14 Suppl):2832-7.

Nayak DP, Balogun RA, Yamada H, Zhou ZH, Barman S. Influenza virus morphogenesis and budding. Virus Res. 2009;143:147-61.

Neelagandan N, Lamberti I, Carvalho HJF, Gobet C, Naef F. What determines eukaryotic translation elongation: recent molecular and quantitative analyses of protein synthesis. Open Biol. 2020;10:200292.

Nemeroff ME, Barabino SM, Li Y, Keller W, Krug RM. Influenza virus NS1 protein interacts with the cellular 30 kDa subunit of CPSF and inhibits 3'end formation of cellular pre-mRNAs. Mol Cell. 1998;1:991-1000.

Newby CM, Sabin L, Pekosz A. The RNA binding domain of influenza A virus NS1 protein affects secretion of tumor necrosis factor alpha, interleukin-6, and interferon in primary murine tracheal epithelial cells. J Virol. 2007;81:9469-80.

Ng AK, Zhang H, Tan K, Li Z, Liu JH, Chan PK, Li SM, Chan WY, Au SW, Joachimiak A, Walz T, Wang JH, Shaw PC. Structure of the influenza virus A H5N1 nucleoprotein: implications for RNA binding, oligomerization, and vaccine design. FASEB J. 2008;22:3638-47.

Ni F, Kondrashkina E, Wang Q. Determinant of receptor-preference switch in influenza hemagglutinin. Virology. 2018;513:98-107.

Noda T. [Genome Packaging Mechanism of Influenza A Virus]. Yakugaku Zasshi. 2015;135:1011-3.

Noda T. [Orthomyxoviruses]. Uirusu. 2012;62:219-28.

Noda T. Selective Genome Packaging Mechanisms of Influenza A Viruses. Cold Spring Harb Perspect Med. 2020.

Nogales A, M LD. Host Single Nucleotide Polymorphisms Modulating Influenza A Virus Disease in Humans. Pathogens. 2019;8.

Nogales A, Martinez-Sobrido L, Topham DJ, DeDiego ML. Modulation of Innate Immune Responses by the Influenza A NS1 and PA-X Proteins. Viruses. 2018;10.

Noton SL, Medcalf E, Fisher D, Mullin AE, Elton D, Digard P. Identification of the domains of the influenza A virus M1 matrix protein required for NP binding, oligomerization and incorporation into virions. J Gen Virol. 2007;88:2280-90.

Okamoto M, Tsukamoto H, Kouwaki T, Seya T, Oshiumi H. Recognition of Viral RNA by Pattern Recognition Receptors in the Induction of Innate Immunity and Excessive Inflammation During Respiratory Viral Infections. Viral Immunol. 2017;30:408-20.

Orlich M, Gottwald H, Rott R. Nonhomologous recombination between the hemagglutinin gene and the nucleoprotein gene of an influenza virus. Virology. 1994;204:462-5.

Palacios G, Shaw TI, Li Y, Singh RK, Valentine M, Sandlund JT, Lim MS, Mullighan CG, Leventaki V. Novel ALK fusion in anaplastic large cell lymphoma involving EEF1G, a subunit of the eukaryotic elongation factor-1 complex. Leukemia. 2017;31:743-7.

Palese P, Schulman JL. Differences in RNA patterns of influenza A viruses. J Virol. 1976;17:876-84.

Palese, P. & Shaw, M. L. Orthomyxoviridae: the viruses and their replication. In Fields Virology, Edited by D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins. 5th edn, 2007;1647–1689.

Pantazi A, Quintanilla A, Hari P, Tarrats N, Parasyraki E, Dix FL, Patel J, Chandra T, Acosta JC, Finch AJ. Inhibition of the 60S ribosome biogenesis GTPase LSG1 causes endoplasmic reticular disruption and cellular senescence. Aging Cell. 2019;18:e12981.

Park ES, Byun YH, Park S, Jang YH, Han WR, Won J, Cho KC, Kim DH, Lee AR, Shin GC, Park YK, Kang HS, Sim H, Ha YN, Jae B, Son A, Kim P, Yu J, Lee HM, Kwon SB, Kim KP, Lee SH, Park YM, Seong BL, Kim KH. Co-degradation of interferon signaling factor DDX3 by PB1-F2 as a basis for high virulence of 1918 pandemic influenza. EMBO J. 2019;38.

Park YW, Katze MG. Translational control by influenza virus. Identification of cis-acting sequences and trans-acting factors which may regulate selective viral mRNA translation. J Biol Chem. 1995;270:28433-9.

Patil G, Zhao M, Song K, Hao W, Bouchereau D, Wang L, Li S. TRIM41-Mediated Ubiquitination of Nucleoprotein Limits Influenza A Virus Infection. J Virol. 2018;92.

Patnaik S, Basu D, Dehdashti S, Zheng W, Ferrer M, Southall N, Taylor M, Engel DA, Marugan JJ. Discovery of Small Molecule Influenza Virus NS1 Antagonist. Probe Reports from the NIH Molecular Libraries Program. Bethesda (MD) 2010.

Pavlovic J, Schroder A, Blank A, Pitossi F, Staeheli P. Mx proteins: GTPases involved in the interferon-induced antiviral state. Ciba Found Symp. 1993;176:233-43; discussion 43-7.

Pavlovic J, Zurcher T, Haller O, Staeheli P. Resistance to influenza virus and vesicular stomatitis virus conferred by expression of human MxA protein. J Virol. 1990;64:3370-5.

Pedretti A, Mazzolari A, Gervasoni S, Fumagalli L, Vistoli G. The VEGA suite of programs: an versatile platform for cheminformatics and drug design projects. Bioinformatics. 2020.

Peeples ME, Wang C, Gupta KC, Coleman N. Nuclear entry and nucleolar localization of the Newcastle disease virus (NDV) matrix protein occur early in infection and do not require other NDV proteins. J Virol. 1992;66:3263-9.

Peiris JS, de Jong MD, Guan Y. Avian influenza virus (H5N1): a threat to human health. Clin Microbiol Rev. 2007;20:243-67.

Pelletier J, Thomas G, Volarevic S. Ribosome biogenesis in cancer: new players and therapeutic avenues. Nat Rev Cancer. 2018;18:51-63.

Perales C, Carrasco L, Gonzalez ME. Regulation of HIV-1 env mRNA translation by Rev protein. Biochim Biophys Acta. 2005;1743:169-75.

Pflug A, Gaudon S, Resa-Infante P, Lethier M, Reich S, Schulze WM, Cusack S. Capped RNA primer binding to influenza polymerase and implications for the mechanism of cap-binding inhibitors. Nucleic Acids Res. 2018;46:956-71.

Pinto LH, Holsinger LJ, Lamb RA. Influenza virus M2 protein has ion channel activity. Cell. 1992;69:517-28.

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

Piron M, Vende P, Cohen J, Poncet D. Rotavirus RNA-binding protein NSP3 interacts with eIF4GI and evicts the poly(A) binding protein from eIF4F. EMBO J. 1998;17:5811-21.

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;76:1618-22.

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;23:847-58.

Pothlichet J, Meunier I, Davis BK, Ting JP, Skamene E, von Messling V, Vidal SM. Type I IFN triggers RIG-I/TLR3/NLRP3-dependent inflammasome activation in influenza A virus infected cells. PLoS Pathog. 2013;9:e1003256.

Potter CW. A history of influenza. J Appl Microbiol. 2001;91:572-9.

Presti RM, Zhao G, Beatty WL, Mihindukulasuriya KA, da Rosa AP, Popov VL, Tesh RB, Virgin HW, Wang D. Quaranfil, Johnston Atoll, and Lake Chad viruses are novel members of the family Orthomyxoviridae. J Virol. 2009;83:11599-606.

Pulendran B, Maddur MS. Innate immune sensing and response to influenza. Curr Top Microbiol Immunol. 2015;386:23-71.

Pyle AM. Translocation and unwinding mechanisms of RNA and DNA helicases. Annu Rev Biophys. 2008;37:317-36.

Qian XY, Chien CY, Lu Y, Montelione GT, Krug RM. An amino-terminal polypeptide fragment of the influenza virus NS1 protein possesses specific RNA-binding activity and largely helical backbone structure. RNA. 1995;1:948-56.

Qiu Y, Krug RM. The influenza virus NS1 protein is a poly(A)-binding protein that inhibits nuclear export of mRNAs containing poly(A). J Virol. 1994;68:2425-32.

Qiu Y, Nemeroff M, Krug RM. The influenza virus NS1 protein binds to a specific region in human U6 snRNA and inhibits U6-U2 and U6-U4 snRNA interactions during splicing. RNA. 1995;1:304-16.

Racaniello VR, Palese P. Influenza B virus genome: assignment of viral polypeptides to RNA segments. J Virol. 1979;29:361-73.

Rambaut A, Pybus OG, Nelson MI, Viboud C, Taubenberger JK, Holmes EC. The genomic and epidemiological dynamics of human influenza A virus. Nature. 2008;453:615-9.

Ran FA, Hsu PD, Wright J, Agarwala V, Scott DA, Zhang F. Genome engineering using the CRISPR-Cas9 system. Nat Protoc. 2013;8:2281-308.

Raza H, Awasthi YC, Zaim MT, Eckert RL, Mukhtar H. Glutathione S-transferases in human and rodent skin: multiple forms and species-specific expression. J Invest Dermatol. 1991;96:463-7.

Reid CR, Hobman TC. The nucleolar helicase DDX56 redistributes to West Nile virus assembly sites. Virology. 2017;500:169-77.

Reis AL, McCauley JW. The influenza virus protein PB1-F2 interacts with IKKbeta and modulates NF-kappaB signalling. PLoS One. 2013;8:e63852.

Resa-Infante P, Jorba N, Coloma R, Ortin J. The influenza virus RNA synthesis machine: advances in its structure and function. RNA Biol. 2011;8:207-15.

Reynaud EG, Andrade MA, Bonneau F, Ly TB, Knop M, Scheffzek K, Pepperkok R. Human Lsg1 defines a family of essential GTPases that correlates with the evolution of compartmentalization. BMC Biol. 2005;3:21.

Riis B, Rattan SI, Clark BF, Merrick WC. Eukaryotic protein elongation factors. Trends Biochem Sci. 1990;15:420-4.

Robb NC, Chase G, Bier K, Vreede FT, Shaw PC, Naffakh N, Schwemmle M, Fodor E. The influenza A virus NS1 protein interacts with the nucleoprotein of viral ribonucleoprotein complexes. J Virol. 2011;85:5228-31.

Robinson DP, Hall OJ, Nilles TL, Bream JH, Klein SL. 17beta-estradiol protects females against influenza by recruiting neutrophils and increasing virus-specific CD8 T cell responses in the lungs. J Virol. 2014;88:4711-20.

Rosario-Ferreira N, Preto AJ, Melo R, Moreira IS, Brito RMM. The Central Role of Non-Structural Protein 1 (NS1) in Influenza Biology and Infection. Int J Mol Sci. 2020;21.

Roy A, Kucukural A, Zhang Y. I-TASSER: a unified platform for automated protein structure and function prediction. Nat Protoc. 2010;5:725-38.

S FdSG. Studies in experimental immunology of influenza. I. The state of virus receptors and inhibitors in the respiratory tract. Aust J Exp Biol Med Sci. 1950;28:15-29.

Saito T, Gale M, Jr. Differential recognition of double-stranded RNA by RIG-I-like receptors in antiviral immunity. J Exp Med. 2008;205:1523-7.

Sakaguchi T, Leser GP, Lamb RA. The ion channel activity of the influenza virus M2 protein affects transport through the Golgi apparatus. J Cell Biol. 1996;133:733-47.

Samji T. Influenza A: understanding the viral life cycle. Yale J Biol Med. 2009;82:153-9.

Sammaibashi S, Yamayoshi S, Kawaoka Y. Strain-Specific Contribution of Eukaryotic Elongation Factor 1 Gamma to the Translation of Influenza A Virus Proteins. Front Microbiol. 2018;9:1446.

Sang Lee J, Gyu Park S, Park H, Seol W, Lee S, Kim S. Interaction network of human aminoacyl-tRNA synthetases and subunits of elongation factor 1 complex. Biochem Biophys Res Commun. 2002;291:158-64.

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;79:471-8.

Sasvari Z, Izotova L, Kinzy TG, Nagy PD. Synergistic roles of eukaryotic translation elongation factors 1Bgamma and 1A in stimulation of tombusvirus minus-strand synthesis. PLoS Pathog. 2011;7:e1002438.

Satterly N, Tsai PL, van Deursen J, Nussenzveig DR, Wang Y, Faria PA, Levay A, Levy DE, Fontoura BM. Influenza virus targets the mRNA export machinery and the nuclear pore complex. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007;104:1853-8.

Schindler C, Levy DE, Decker T. JAK-STAT signaling: from interferons to cytokines. J Biol Chem. 2007;282:20059-63.

Schnell JR, Chou JJ. Structure and mechanism of the M2 proton channel of influenza A virus. Nature. 2008;451:591-5.

Schroder M, Baran M, Bowie AG. Viral targeting of DEAD box protein 3 reveals its role in TBK1/IKKepsilon-mediated IRF activation. EMBO J. 2008;27:2147-57.

Schuy W, Will C, Kuroda K, Scholtissek C, Garten W, Klenk HD. Mutations blocking the transport of the influenza virus hemagglutinin between the rough endoplasmic reticulum and the Golgi apparatus. EMBO J. 1986;5:2831-6.

Schweiger B, Zadow I, Heckler R. Antigenic drift and variability of influenza viruses. Med Microbiol Immunol. 2002;191:133-8.

Selman M, Dankar SK, Forbes NE, Jia JJ, Brown EG. Adaptive mutation in influenza A virus non-structural gene is linked to host switching and induces a novel protein by alternative splicing. Emerg Microbes Infect. 2012;1:e42.

Semkow R, Loza-Tulimowska M, Wilczynski J, Brydak L, Zgorzelska K. Humoral and cell-mediated immune response to influenza virus. I. Experiments in mice. Acta Microbiol Pol. 1982;31:185-94.

Sen GC. Viruses and interferons. Annu Rev Microbiol. 2001;55:255-81.

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.

Seng LG, Daly J, Chang KC, Kuchipudi SV. High basal expression of interferon-stimulated genes in human bronchial epithelial (BEAS-2B) cells contributes to influenza A virus resistance. PLoS One. 2014;9:e109023.

Senne DA, Panigrahy B, Kawaoka Y, Pearson JE, Suss J, Lipkind M, Kida H, Webster RG. Survey of the hemagglutinin (HA) cleavage site sequence of H5 and H7 avian influenza viruses: amino acid sequence at the HA cleavage site as a marker of pathogenicity potential. Avian Dis. 1996;40:425-37.

Seo SU, Kwon HJ, Ko HJ, Byun YH, Seong BL, Uematsu S, Akira S, Kweon MN. Type I interferon signaling regulates Ly6C(hi) monocytes and neutrophils during acute viral pneumonia in mice. PLoS Pathog. 2011;7:e1001304.

Shapiro GI, Gurney T, Jr., Krug RM. Influenza virus gene expression: control mechanisms at early and late times of infection and nuclear-cytoplasmic transport of virus-specific RNAs. J Virol. 1987;61:764-73.

Shapiro GI, Krug RM. Influenza virus RNA replication in vitro: synthesis of viral template RNAs and virion RNAs in the absence of an added primer. J Virol. 1988;62:2285-90.

Sharma K, Tripathi S, Ranjan P, Kumar P, Garten R, Deyde V, Katz JM, Cox NJ, Lal RB, Sambhara S, Lal SK. 2011. Influenza A virus nucleoprotein exploits Hsp40 to inhibit PKR activation. PLoS One. 2011;6:e20215.

Shaw PJ, Lamkanfi M, Kanneganti TD. NOD-like receptor (NLR) signaling beyond the inflammasome. Eur J Immunol. 2010;40:624-7.

Shi M, Jagger BW, Wise HM, Digard P, Holmes EC, Taubenberger JK. Evolutionary conservation of the PA-X open reading frame in segment 3 of influenza A virus. J Virol. 2012;86:12411-3.

Shi Y, Di Giammartino DC, Taylor D, Sarkeshik A, Rice WJ, Yates JR, 3rd, Frank J, Manley JL. Molecular architecture of the human pre-mRNA 3' processing complex. Mol Cell. 2009;33:365-76.

Shimizu T, Takizawa N, Watanabe K, Nagata K, Kobayashi N. Crucial role of the influenza virus NS2 (NEP) C-terminal domain in M1 binding and nuclear export of vRNP. FEBS Lett. 2011;585:41-6.

Shinya K, Hamm S, Hatta M, Ito H, Ito T, Kawaoka Y. PB2 amino acid at position 627 affects replicative efficiency, but not cell tropism, of Hong Kong H5N1 influenza A viruses in mice. Virology. 2004;320:258-66.

Shobugawa Y, Saito R, Sato I, Kawashima T, Dapat C, Dapat IC, Kondo H, Suzuki Y, Saito K, Suzuki H. Clinical effectiveness of neuraminidase inhibitors--oseltamivir, zanamivir, laninamivir, and peramivir--for treatment of influenza A(H3N2) and A(H1N1)pdm09 infection: an observational study in the 2010-2011 influenza season in Japan. J Infect Chemother. 2012;18:858-64.

Singleton MR, Dillingham MS, Wigley DB. Structure and mechanism of helicases and nucleic acid translocases. Annu Rev Biochem. 2007;76:23-50.

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

Smith DB, Johnson KS. Single-step purification of polypeptides expressed in Escherichia coli as fusions with glutathione S-transferase. Gene. 1988;67:31-40.

Smith GJ, Bahl J, Vijaykrishna D, Zhang J, Poon LL, Chen H, Webster RG, Peiris JS, Guan Y. Dating the emergence of pandemic influenza viruses. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:11709-12.

Stasakova J, Ferko B, Kittel C, Sereinig S, Romanova J, Katinger H, Egorov A. Influenza A mutant viruses with altered NS1 protein function provoke caspase-1 activation in primary human macrophages, resulting in fast apoptosis and release of high levels of interleukins 1beta and 18. J Gen Virol. 2005;86:185-95.

Stauffer S, Feng Y, Nebioglu F, Heilig R, Picotti P, Helenius A. Stepwise priming by acidic pH and a high K+ concentration is required for efficient uncoating of influenza A virus cores after penetration. J Virol. 2014;88:13029-46.

Steimer L, Klostermeier D. RNA helicases in infection and disease. RNA Biol. 2012;9:751-71.

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

Steinman RM, Hemmi H. Dendritic cells: translating innate to adaptive immunity. Curr Top Microbiol Immunol. 2006;311:17-58.

Stevens J, Blixt O, Glaser L, Taubenberger JK, Palese P, Paulson JC, Wilson IA. Glycan microarray analysis of the hemagglutinins from modern and pandemic influenza viruses reveals different receptor specificities. J Mol Biol. 2006;355:1143-55.

Stone GC, Sjobring U, Bjorck L, Sjoquist J, Barber CV, Nardella FA. The Fc binding site for streptococcal protein G is in the C gamma 2-C gamma 3 interface region of IgG and is related to the sites that bind staphylococcal protein A and human rheumatoid factors. J Immunol. 1989;143:565-70.

Su S, Fu X, Li G, Kerlin F, Veit M. Novel Influenza D virus: Epidemiology, pathology, evolution and biological characteristics. Virulence. 2017;8:1580-91.

Su WC, Hsu SF, Lee YY, Jeng KS, Lai MM. A Nucleolar Protein, Ribosomal RNA Processing 1 Homolog B (RRP1B), Enhances the Recruitment of Cellular mRNA in Influenza Virus Transcription. J Virol. 2015;89:11245-55.

Suarez DL, Senne DA, Banks J, Brown IH, Essen SC, Lee CW, Manvell RJ, Mathieu-Benson C, Moreno V, Pedersen JC, Panigrahy B, Rojas H, Spackman E, Alexander DJ. Recombination resulting in virulence shift in avian influenza outbreak, Chile. Emerg Infect Dis. 2004;10:693-9.

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.

Sun Y, Liu M, Tian L, Guo Y, Jin D. [The experimental investigation of laryngeal cancer growth in vive by recombinant lentivirus of small interference RNA (siRNA) targeting MMP-9]. Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi. 2008;22:1129-31.

Szewczyk B, Bienkowska-Szewczyk K, Krol E. Introduction to molecular biology of influenza a viruses. Acta Biochim Pol. 2014;61:397-401.

Takahashi T, Hashimoto A, Maruyama M, Ishida H, Kiso M, Kawaoka Y, Suzuki Y, Suzuki T. Identification of amino acid residues of influenza A virus H3 HA

contributing to the recognition of molecular species of sialic acid. FEBS Lett. 2009;583:3171-4.

Takeuchi H, Okada A, Miura T. Roles of the histidine and tryptophan side chains in the M2 proton channel from influenza A virus. FEBS Lett. 2003;552:35-8.

Takeuchi K, Lamb RA. Influenza virus M2 protein ion channel activity stabilizes the native form of fowl plague virus hemagglutinin during intracellular transport. J Virol. 1994;68:911-9.

Takeuchi O, Akira S. MDA5/RIG-I and virus recognition. Curr Opin Immunol. 2008;20:17-22.

Talon J, Horvath CM, Polley R, Basler CF, Muster T, Palese P, Garcia-Sastre A. Activation of interferon regulatory factor 3 is inhibited by the influenza A virus NS1 protein. J Virol. 2000;74:7989-96.

Taubenberger JK, Morens DM. 1918 Influenza: the mother of all pandemics. Emerg Infect Dis. 2006;12:15-22.

Thanos D, Maniatis T. NF-kappa B: a lesson in family values. Cell. 1995;80:529-32.

Thomas F, Kutay U. Biogenesis and nuclear export of ribosomal subunits in higher eukaryotes depend on the CRM1 export pathway. J Cell Sci. 2003;116:2409-19.

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;67:7695-700.

Tong S, Zhu X, Li Y, Shi M, Zhang J, Bourgeois M, Yang H, Chen X, Recuenco S, Gomez J, Chen LM, Johnson A, Tao Y, Dreyfus C, Yu W, McBride R, Carney PJ, Gilbert AT, Chang J, Guo Z, Davis CT, Paulson JC, Stevens J, Rupprecht CE, Holmes EC, Wilson IA, Donis RO. New world bats harbor diverse influenza A viruses. PLoS Pathog. 2013;9:e1003657.

Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading. J Comput Chem. 2010;31:455-61.

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.

Tu J, Guo J, Zhang A, Zhang W, Zhao Z, Zhou H, Liu C, Chen H, Jin M. Effects of the C-terminal truncation in NS1 protein of the 2009 pandemic H1N1 influenza virus on host gene expression. PLoS One. 2011;6:e26175.

Turan K, Ata P. Effects of intra- and extracellular factors on anti-aging klotho gene expression. Genet Mol Res. 2011;10:2009-23.

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;32:643-52.

Turan K, Nagata K, Kuru A. Antiviral effect of Sanicula europaea L. leaves extract on influenza virus-infected cells. Biochem Biophys Res Commun. 1996;225P:22-6.

Tynell J, Melen K, Julkunen I. Mutations within the conserved NS1 nuclear export signal lead to inhibition of influenza A virus replication. Virol J. 2014;11:128.

Uğurlu H. Hax-1 Geni Susturulan Hücrelerde İnfluenza Virüsü Replikasyonunun Araştırılması. M.Ü. Sağlık Bilimleri Enstitüsü, Yüksek Lisans Tezi, 2016, İstanbul (Danışman: Prof. Dr. K Turan).

Umate P, Tuteja N, Tuteja R. Genome-wide comprehensive analysis of human helicases. Commun Integr Biol. 2011;4:118-37.

Valcarcel J, Fortes P, Ortin J. Splicing of influenza virus matrix protein mRNA expressed from a simian virus 40 recombinant. J Gen Virol. 1993;74:1317-26.

van Damme H, Amons R, Janssen G, Moller W. Mapping the functional domains of the eukaryotic elongation factor 1 beta gamma. Eur J Biochem. 1991;197:505-11.

Varga ZT, Grant A, Manicassamy B, Palese P. Influenza virus protein PB1-F2 inhibits the induction of type I interferon by binding to MAVS and decreasing mitochondrial membrane potential. J Virol. 2012;86:8359-66.

Vasin AV, Temkina OA, Egorov VV, Klotchenko SA, Plotnikova MA, Kiselev OI. Molecular mechanisms enhancing the proteome of influenza A viruses: an overview of recently discovered proteins. Virus Res. 2014;185:53-63.

Verma S, Soto J, Vasudevan A, Schmeisser F, Alvarado-Facundo E, Wang W, Weiss CD, Weir JP. Determination of influenza B identity and potency in quadrivalent inactivated influenza vaccines using lineage-specific monoclonal antibodies. PLoS One. 2017;12:e0175733.

Wang BX, Brown EG, Fish EN. Residues F103 and M106 within the influenza A virus NS1 CPSF4-binding region regulate interferon-stimulated gene translation initiation. Virology. 2017;508:170-9.

Wang C, Takeuchi K, Pinto LH, Lamb RA. Ion channel activity of influenza A virus M2 protein: characterization of the amantadine block. J Virol. 1993;67:5585-94.

Wang H, Kim S, Ryu WS. DDX3 DEAD-Box RNA helicase inhibits hepatitis B virus reverse transcription by incorporation into nucleocapsids. J Virol. 2009;83:5815-24.

Wang Q, Li Q, Liu T, Chang G, Sun Z, Gao Z, F. Wang F, Zhou H, Liu R, Zheng M, Cui H, Chen G, Li H, Yuan X, Wen J, Peng D, Zhao G. Host Interaction Analysis of PA-N155 and PA-N182 in Chicken Cells Reveals an Essential Role of UBA52 for Replication of H5N1 Avian Influenza Virus. Front Microbiol. 2018;9:936.

Wang W, Riedel K, Lynch P, Chien CY, Montelione GT, Krug RM. RNA binding by the novel helical domain of the influenza virus NS1 protein requires its dimer structure and a small number of specific basic amino acids. RNA. 1999;5:195-205.

Wang X, Hinson ER, Cresswell P. The interferon-inducible protein viperin inhibits influenza virus release by perturbing lipid rafts. Cell Host Microbe. 2007;2:96-105.

Wang X, Li M, Zheng H, Muster T, Palese P, Beg AA, Garcia-Sastre A. Influenza A virus NS1 protein prevents activation of NF-kappaB and induction of alpha/beta interferon. J Virol. 2000;74:11566-73.

Wang Y, Zeng Y, Murray JM, Nishikura K. Genomic organization and chromosomal location of the human dsRNA adenosine deaminase gene: the enzyme for glutamate-activated ion channel RNA editing. J Mol Biol. 1995;254:184-95.

Ward AC, Azad AA, Macreadie IG. Expression and characterisation of the influenza A virus non-structural protein NS1 in yeast. Arch Virol. 1994;138:299-314.

Warren AJ. Molecular basis of the human ribosomopathy Shwachman-Diamond syndrome. Adv Biol Regul. 2018;67:109-27.

Warren K, Wei T, Li D, Qin F, Warrilow D, Lin MH, Sivakumaran H, Apolloni A, Abbott CM, Jones A, Anderson JL, Harrich D. Eukaryotic elongation factor 1 complex subunits are critical HIV-1 reverse transcription cofactors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2012;109:9587-92.

Watanabe T, Watanabe S, Kawaoka Y. Cellular networks involved in the influenza virus life cycle. Cell Host Microbe. 2010;7:427-39.

Watanabe T, Watanabe S, Shinya K, Kim JH, Hatta M, Kawaoka Y. Viral RNA polymerase complex promotes optimal growth of 1918 virus in the lower respiratory tract of ferrets. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106:588-92.

Weaver BK, Kumar KP, Reich NC. Interferon regulatory factor 3 and CREB-binding protein/p300 are subunits of double-stranded RNA-activated transcription factor DRAF1. Mol Cell Biol. 1998;18:1359-68.

Weber F, Haller O, Kochs G. MxA GTPase blocks reporter gene expression of reconstituted Thogoto virus ribonucleoprotein complexes. J Virol. 2000;74:560-3.

Weis BL, Missbach S, Marzi J, Bohnsack MT, Schleiff E. The 60S associated ribosome biogenesis factor LSG1-2 is required for 40S maturation in Arabidopsis thaliana. Plant J. 2014;80:1043-56.

White JM, Wilson IA. Anti-peptide antibodies detect steps in a protein conformational change: low-pH activation of the influenza virus hemagglutinin. J Cell Biol. 1987;105:2887-96.

Wild T, Horvath P, Wyler E, Widmann B, Badertscher L, Zemp I, Kozak K, Csucs G, Lund E, Kutay U. A protein inventory of human ribosome biogenesis reveals an essential function of exportin 5 in 60S subunit export. PLoS Biol. 2010;8:e1000522.

Wilson DN, Doudna Cate JH. The structure and function of the eukaryotic ribosome. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2012;4.

Wines BD, Vanderven HA, Esparon SE, Kristensen AB, Kent SJ, Hogarth PM. Dimeric FcgammaR Ectodomains as Probes of the Fc Receptor Function of Anti-Influenza Virus IgG. J Immunol. 2016;197:1507-16.

Wise HM, Barbezange C, Jagger BW, Dalton RM, Gog JR, Curran MD, Taubenberger JK, Anderson EC, Digard P. Overlapping signals for translational regulation and packaging of influenza A virus segment 2. Nucleic Acids Res. 2011;39:7775-90.

Wise HM, Foeglein A, Sun J, Dalton RM, Patel S, Howard W, Anderson EC, Barclay WS, Digard P. A complicated message: Identification of a novel PB1-related protein translated from influenza A virus segment 2 mRNA. J Virol. 2009;83:8021-31.

Wise HM, Hutchinson EC, Jagger BW, Stuart AD, Kang ZH, Robb N, Schwartzman LM, Kash JC, Fodor E, Firth AE, Gog JR, Taubenberger JK, Digard P. Identification of a novel splice variant form of the influenza A virus M2 ion channel with an antigenically distinct ectodomain. PLoS Pathog. 2012;8:e1002998.

Wisskirchen C, Ludersdorfer TH, Muller DA, Moritz E, Pavlovic J. The cellular RNA helicase UAP56 is required for prevention of double-stranded RNA formation during influenza A virus infection. J Virol. 2011;85:8646-55.

Wu X, Wang J, Wang S, Wu F, Chen Z, Li C, Cheng G, Qin FX. Inhibition of Influenza A Virus Replication by TRIM14 via Its Multifaceted Protein-Protein Interaction With NP. Front Microbiol. 2019;10:344.

Xu Z, Anderson R, Hobman TC. The capsid-binding nucleolar helicase DDX56 is important for infectivity of West Nile virus. J Virol. 2011;85:5571-80.

Xu Z, Hobman TC. The helicase activity of DDX56 is required for its role in assembly of infectious West Nile virus particles. Virology. 2012;433:226-35.

Yamayoshi S, Watanabe M, Goto H, Kawaoka Y. Identification of a Novel Viral Protein Expressed from the PB2 Segment of Influenza A Virus. J Virol. 2016;90:444-56.

Yasuda-Inoue M, Kuroki M, Ariumi Y. Distinct DDX DEAD-box RNA helicases cooperate to modulate the HIV-1 Rev function. Biochem Biophys Res Commun. 2013;434:803-8.

Yin C, Khan JA, Swapna GV, Ertekin A, Krug RM, Tong L, Montelione GT. Conserved surface features form the double-stranded RNA binding site of non-structural protein 1 (NS1) from influenza A and B viruses. J Biol Chem. 2007;282:20584-92.

Yondola MA, Fernandes F, Belicha-Villanueva A, Uccelini M, Gao Q, Carter C, Palese P. Budding capability of the influenza virus neuraminidase can be modulated by tetherin. J Virol. 2011;85:2480-91.

Yoneyama M, Fujita T. RNA recognition and signal transduction by RIG-I-like receptors. Immunol Rev. 2009;227:54-65.

Yoneyama M, Kikuchi M, Matsumoto K, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Foy E, Loo YM, Gale MJ, Akira S, Yonehara S, Kato A, Fujita T. Shared and unique functions of the DExD/H-box helicases RIG-I, MDA5, and LGP2 in antiviral innate immunity. J Immunol. 2005;175:2851-8.

Yoneyama M, Kikuchi M, Natsukawa T, Shinobu N, Imaizumi T, Miyagishi M, Taira K, Akira S, Fujita T. The RNA helicase RIG-I has an essential function in double-stranded RNA-induced innate antiviral responses. Nat Immunol. 2004;5:730-7.

Yoon SY, Kim JM, Oh JH, Jeon YJ, Lee DS, Kim JH, Choi JY, Ahn BM, Kim S, Yoo HS, Kim YS, Kim NS. Gene expression profiling of human HBV- and/or HCV-associated hepatocellular carcinoma cells using expressed sequence tags. Int J Oncol. 2006;29:315-27.

Yu SF, Lujan P, Jackson DL, Emerman M, Linial ML. The DEAD-box RNA helicase DDX6 is required for efficient encapsidation of a retroviral genome. PLoS Pathog. 2011;7:e1002303.

Yuan W, Krug RM. Influenza B virus NS1 protein inhibits conjugation of the interferon (IFN)-induced ubiquitin-like ISG15 protein. EMBO J. 2001;20:362-71.

Zamarin D, Garcia-Sastre A, Xiao X, Wang R, Palese P. Influenza virus PB1-F2 protein induces cell death through mitochondrial ANT3 and VDAC1. PLoS Pathog. 2005;1:e4.

Zambon M. Influenza and other emerging respiratory viruses. Medicine (Abingdon). 2014;42:45-51.

Zebedee SL, Lamb RA. Influenza A virus M2 protein: monoclonal antibody restriction of virus growth and detection of M2 in virions. J Virol. 1988;62:2762-72.

Zhang J, Huang F, Tan L, Bai C, Chen B, Liu J, Liang J, Liu C, Zhang S, Lu G, Chen Y, Zhang H. Host Protein Moloney Leukemia Virus 10 (MOV10) Acts as a Restriction Factor of Influenza A Virus by Inhibiting the Nuclear Import of the Viral Nucleoprotein. J Virol. 2016;90:3966-80.

Zhang K, Wang Z, Liu X, Yin C, Basit Z, Xia B, Liu W. Dissection of influenza A virus M1 protein: pH-dependent oligomerization of N-terminal domain and dimerization of C-terminal domain. PLoS One. 2012;7:e37786.

Zhang S, Wang J, Wang Q, Toyoda T. Internal initiation of influenza virus replication of viral RNA and complementary RNA in vitro. J Biol Chem. 2010;285:41194-201.

Zhang Y, Forys JT, Miceli AP, Gwinn AS, Weber JD. Identification of DHX33 as a mediator of rRNA synthesis and cell growth. Mol Cell Biol. 2011;31:4676-91.

Zhang Y, Xu Z, Cao Y. Host-Virus Interaction: How Host Cells Defend against Influenza A Virus Infection. Viruses. 2020;12.

Zhang Z, Pan L, Ding Y, Lv J, Zhou P, Fang Y, Liu X, Zhang Y, Wang Y. eEF1G interaction with foot-and-mouth disease virus nonstructural protein 2B: Identification by yeast two-hybrid system. Microb Pathog. 2017;112:111-6.

Zhao C, Hsiang TY, Kuo RL, Krug RM. ISG15 conjugation system targets the viral NS1 protein in influenza A virus-infected cells. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010;107:2253-8.

Zhou H, Zhu J, Tu J, Zou W, Hu Y, Yu Z, Yin W, Li Y, Zhang A, Wu Y, Yu Z, Chen H, Jin M. Effect on virulence and pathogenicity of H5N1 influenza A virus through truncations of NS1 eIF4GI binding domain. J Infect Dis. 2010;202:1338-46.

Zhou Y, Ma J, Bushan Roy B, Wu JY, Pan Q, Rong L, Liang C. The packaging of human immunodeficiency virus type 1 RNA is restricted by overexpression of an RNA helicase DHX30. Virology. 2008;372:97-106.

Zhu H, Wang J, Wang P, Song W, Zheng Z, Chen R, Guo K, Zhang T, Peiris JS, Chen H, Guan Y. Substitution of lysine at 627 position in PB2 protein does not change virulence of the 2009 pandemic H1N1 virus in mice. Virology. 2010;401:1-5.

Zhu X, McBride R, Nycholat CM, Yu W, Paulson JC, Wilson IA. Influenza virus neuraminidases with reduced enzymatic activity that avidly bind sialic Acid receptors. J Virol. 2012;86:13371-83.

Zirwes RF, Eilbracht J, Kneissel S, Schmidt-Zachmann MS. A novel helicase-type protein in the nucleolus: protein NOH61. Mol Biol Cell. 2000;11:1153-67.

9. EKLER

9.1. Ek-1. Araştırma Makalesi

Human DDX56 Protein İnteracts with İnfluenza A Virus NS1 Protein and Stimulates the Virus Replication

Genetics and Molecular Biology, 2021

DOI: https://doi.org/10.1590/1678-4685-GMB-2020-0158